

Identificación y virulencia de *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales: Clavicipitaceae) como agente de control biológico de *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) en Panamá

Identification and virulence of *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales: Clavicipitaceae) as biological control agent of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) in Panama

Vidal Antonio Aguilera-Cogley^{1*}, Marcelino Jaén-Torrijos², Lissy Yinela Ávila-Rodríguez², José Ángel Herrera-Vásquez¹, José Natividad Jaén-Sanjur¹, Anovel Amet Barba-Alvarado¹

RESUMEN

La garrapata *Rhipicephalus microplus* es el principal ectoparásito del bovino en Panamá y en otras regiones tropicales y subtropicales del mundo. Tradicionalmente, el método de control de *R. microplus* se basa en la utilización de acaricidas químicos. Sin embargo, este método presenta inconvenientes como el desarrollo de resistencia, contaminación al ambiente y a los alimentos, lo que ha promovido la evaluación de estrategias de control alternativas a los acaricidas. El objetivo de este estudio fue identificar y evaluar la virulencia de aislados nativos de *Metarhizium anisopliae* sobre larvas de *R. microplus* en condiciones *in vitro*. La identificación de los aislados Mt1, Mt2 y Mt5 se realizó sobre la base de sus características morfológicas y mediante la secuenciación de la región ITS-5,8S del ADN ribosomal. Los tres aislados nativos se identificaron como *M. anisopliae*. Se hicieron bioensayos utilizando un diseño experimental completamente al azar. Con cada aislado, se evaluaron cuatro concentraciones de 1×10^5 , 10^6 , 10^7 y 10^8 conidias mL^{-1} , y un control (solución de Tween 80 al 0,1%). Se encontraron diferencias significativas ($P < 0,01$) en los porcentajes de mortalidad (PM) sobre larvas entre las concentraciones evaluadas para cada uno de los aislados, a los 10, 20 y 30 días postratamiento (DPT). Los tres aislados alcanzaron el máximo PM (> 98%) sobre larvas a las concentraciones 1×10^7 y 1×10^8 conidias mL^{-1} , a los 30 DPT. En el tratamiento control no se observó mortalidad de larvas. El aislado Mt5 resultó el más virulento con una concentración letal media (CL_{50}) de $1,17 \times 10^5$ conidias mL^{-1} , seguido de los aislados Mt2 y Mt1 con CL_{50} de $2,94 \times 10^5$ y $1,23 \times 10^6$ conidias mL^{-1} , respectivamente. Los resultados encontrados en el presente estudio sugieren que los aislados nativos Mt5 y Mt2 de *M. anisopliae* podrían ser considerados agentes promisorios para el control biológico de la garrapata tropical del bovino *R. microplus* en fincas ganaderas de Panamá.

Palabras clave: garrapata, hongos entomopatógenos, región ITS-5,8S, virulencia.

ABSTRACT

The *Rhipicephalus microplus* tick is the main ectoparasite of cattle in Panama and other tropical and subtropical regions of the world. Traditionally, the *R. microplus* control method is based on the use of chemical acaricides. However, this method has obstacles such as the development of resistance, contamination of the environment, and food, which has favored the evaluation of control strategies alternative to acaricides. The objective of this study was to identify and evaluate the virulence of native isolates of *Metarhizium anisopliae* on larvae of *R. microplus* under *in vitro* conditions. The identification of Mt1, Mt2, and Mt5 isolates was performed based on their morphological characteristics and by sequencing the ITS-5.8S region of ribosomal DNA. The three native isolates were identified as *M. anisopliae*. Bioassays were done using a completely randomized experimental design. With each isolate, four concentrations of 1×10^5 , 10^6 , 10^7 and 10^8 conidia mL^{-1} , and a control (0.1% Tween 80 solution) were evaluated. Significant differences ($P < 0.01$) were found in the mortality percentages (PM) on larvae between the concentrations evaluated for each of the isolates, at 10, 20, and 30 days post-treatment (DPT). The three isolates reached the maximum PM (>98%) on larvae at concentrations 1×10^7 and 1×10^8 conidia mL^{-1} , at 30 DPT. In the control treatment, no larval mortality was observed. The Mt5 isolate was the most virulent with a mean lethal concentration (LC_{50}) of 1.17×10^5 conidia mL^{-1} , followed by the Mt2 and Mt1 isolates with LC_{50} of 2.94×10^5 and 1.23×10^6 conidia mL^{-1} , respectively. The results found in the present study suggest that the native Mt5 and Mt2 isolates of *M. anisopliae* could be considered promising agents for the biological control of the tropical tick of the *R. microplus* cattle in cattle farms in Panama.

Keywords: entomopathogenic fungi, ITS-5.8S region, tick, virulence.

¹ Grupo de Investigación de Protección Vegetal (GIPV), Centro de Investigación Agropecuaria Divisa (CIAD), Instituto de Investigación Agropecuaria de Panamá (IDIAP), Ctra. Panamericana, Los Canelos, Santa María, Estafeta de Divisa, 0619 Herrera, Panamá.

² Laboratorio de Salud Animal, Centro de Investigación Agropecuaria Divisa (CIAD), Instituto de Investigación Agropecuaria de Panamá (IDIAP), Ctra. Panamericana, Los Canelos, Santa María, Estafeta de Divisa, 0619 Herrera, Panamá.

* Autor para correspondencia: vidalaguilera@gmail.com, vidal.aguilera@idiap.gob.pa

Introducción

Rhipicephalus microplus (Acari: Ixodidae), conocida como la garrapata tropical del bovino, es el principal ectoparásito del ganado en Panamá (Morán *et al.*, 1995), así como en la mayoría de las regiones tropicales y subtropicales del mundo. Esta garrapata causa graves pérdidas económicas, que se traducen en baja producción de leche, lento crecimiento y transmisión de patógenos, entre estos, *Babesia bovis*, *B. bigemina* y *Anaplasma marginale* (FAO, 1984).

Tradicionalmente, el método de control de *R. microplus* se basa en la utilización de acaricidas, pero su uso excesivo sobre este ectoparásito ha generado la aparición de resistencia química, con el alto costo que esto supone para su control (Kunz y Kemp, 1994; FAO, 2003). En Panamá, en un estudio realizado por Jaén *et al.* (2015), se mostraron evidencias de la baja sensibilidad de *R. microplus* a piretroides sintéticos (cipermetrina), en fincas de ganado bovino distribuidas en varias provincias de este país. Esta resistencia química podría traer consigo daños al entorno natural y a la salud humana, por la contaminación de la leche y de la carne bovina (Leal *et al.*, 2003). Por lo tanto, se requiere integrar nuevas opciones de control no químico para minimizar estos efectos nocivos.

Los hongos entomopatógenos son enemigos naturales de artrópodos, y han sido estudiados con éxito a nivel mundial como agentes controladores de la garrapata del bovino (Fernandes y Bittencourt, 2008). El hongo *Metarhizium anisopliae* (Hymenozoa: Clavicipitaceae) ha demostrado ser uno de los entomopatógenos más eficientes para la biorregulación de *R. microplus* en condiciones *in vitro* e *in vivo*, contra diferentes estadios de esta garrapata. Además ha supuesto una reducción de fases parasitarias sobre bovinos (Arguedas *et al.*, 2008; Ojeda-Chi *et al.*, 2011; Quinelato *et al.*, 2012).

El control de la garrapata del bovino mediante el uso de hongos entomopatógenos requiere realizar, previamente a las evaluaciones *in vitro* e *in vivo*, la correcta identificación del hongo. Tradicionalmente, el método para la identificación de hongos entomopatógenos se basa en la morfología de las esporas, características bioquímicas y propiedades inmunológicas. Sin embargo, técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y el análisis de secuencias de ADN son ampliamente utilizadas para la identificación de

diferentes especies de hongos entomopatógenos (Destéfano *et al.*, 2004).

El objetivo del estudio fue identificar aislados nativos de *M. anisopliae* mediante características morfológicas y secuenciación de la región ITS-5.8S del ADN ribosomal y evaluar su virulencia en condiciones *in vitro* sobre larvas de *R. microplus*.

Materiales y métodos

Producción de larvas de *Rhipicephalus microplus*

Este estudio se desarrolló en el Centro de Investigación Agropecuaria Divisa (CIAD), del Instituto de Investigación Agropecuaria de Panamá (IDIAP), ubicado en la localidad de Divisa, corregimiento de Los Canelos, distrito de Santa María, provincia de Herrera, Panamá. Inicialmente, se colectaron garrapatas hembras adultas de un bovino confinado en un corral de la Unidad Pecuaria del CIAD sin tratamiento químico previo. Las garrapatas se trasladaron al Laboratorio de Salud Animal del CIAD, donde se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 1% y, seguidamente, se enjuagaron, secaron, pesaron y se revisaron con la ayuda de un estereoscopio SMZ-168 (Motic, CN) para verificar su condición física. La identificación se realizó utilizando la clave taxonómica de garrapatas de Bautista-Garfias (2006). Para la producción de huevos, las garrapatas se colocaron en placas de Petri (90 mm x 15 mm) estériles y se incubaron a 27 ± 1 °C y humedad relativa (HR) $\geq 80\%$ durante 10 días (Jaén *et al.*, 2015). Para la producción de larvas, se tomaron alícuotas de huevos de 50 mg (~1,000 huevos), que se colocaron en viales estériles con capacidad para 20 mL, los cuales se taparon con algodón igualmente estéril (Quinelato *et al.*, 2012). La eclosión de las larvas en los viales ocurrió aproximadamente a los 20 días. Se descartaron los viales con porcentajes de eclosión $< 95\%$. En los bioensayos, se utilizaron viales con larvas entre 10 y 15 días de edad.

Identificación morfológica de *Metarhizium anisopliae*

Se seleccionaron tres aislados nativos de *Metarhizium* sp. procedentes de las provincias de Coclé y Herrera, ubicadas en la región central

de Panamá (Tabla 1), los cuales se encontraban conservados en papel filtro a -20°C , en la colección de hongos entomopatógenos del Laboratorio de Protección Vegetal (LPV) del CIAD. Estos hongos se sembraron en placas de Petri que contenían medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA) (Difco, USA), y se mantuvieron a $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ en oscuridad durante 14 días. Se obtuvieron cultivos monospóricos de cada uno de los aislados mediante la técnica de diluciones sucesivas (Dhingra y Sinclair, 1995), con la finalidad de obtener cultivos puros para ser usados en la identificación morfológica a nivel de especie, utilizando la clave de identificación de hongos entomopatógenos de Humber (2012). Se evaluó el color de la colonia en medio de cultivo PDA y se determinó la forma, largo y ancho de un total de 25 conidias de cada uno de los aislados con la ayuda de un microscopio óptico DM750 (Leica Microsystems, DE), con un aumento de 400X.

Identificación molecular de *Metarhizium anisopliae*

La identificación molecular se realizó con los mismos aislados de *Metarhizium* sp. determinados inicialmente mediante morfología. Para ello, se realizó la extracción del ADN genómico a partir de micelio de cada uno de los aislados, utilizando el kit de extracción EZNA (Omega Bio-tek, USA), según la instrucción del fabricante. La identificación se hizo por PCR, utilizando la pareja de oligonucleótidos ITS1 y ITS4, los cuales amplifican un fragmento de ~500-pb, correspondiente a la región ITS del ADN ribosómico, incluyendo el gen 5,8S (White *et al.*, 1990). Las concentraciones finales de cada reactivo en la reacción fueron las siguientes: 1x de tampón PCR, 2,5 mM MgCl_2 , 0,2 mM dNTPs (Amresco INC., USA), 0,4 μM de cada cebador, 1U de *Taq* ADN polimerasa (Invitrogen, BR), 1 μL de cada extracto de ADN, y agua ultrapura estéril hasta alcanzar un volumen de 25 μL . El ADN se amplificó con la ayuda de un termociclador

Mastercycler® gradient (Eppendorf, USA), el cual se programó para llevar a cabo un ciclo inicial de desnaturalización a 94°C durante cuatro minutos, seguido por 35 ciclos de desnaturalización a 94°C durante un minuto, hibridación a 55°C durante un minuto y extensión a 72°C durante un minuto y medio. Adicionalmente, se llevó a cabo un ciclo de extensión final a 72°C durante diez minutos, este último con la finalidad de sintetizar todos los fragmentos que posiblemente quedaron incompletos, seguido de un paso de enfriamiento a 4°C hasta que las muestras fueron recuperadas. Como control negativo, se utilizó agua ultrapura estéril, la cual se analizó bajo las mismas condiciones descritas anteriormente.

Para confirmar la especie de los aislados de *Metarhizium* sp., los productos de PCR se purificaron y secuenciaron en MacroGen Inc. en Corea del Sur. Las secuencias se editaron utilizando el programa Chromas versión 2.6.6 (Technelysium Pty Lda, AU), y se depositaron y compararon con las secuencias de referencia existentes en la base de datos del GenBank mediante el programa BLAST del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI, USA) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Adicionalmente, se obtuvo un árbol de homología mediante la comparación de las secuencias de los aislados analizados en el presente estudio y de las secuencias de referencia en el programa DNAMAN versión 5.2.9 (Lynnon BioSoft, DE). En este análisis se incluyó como “outgroup” la secuencia del aislado de *Beauveria bassiana* ARSEF 751 (No. de Acceso AY532045), ya que esta especie de hongo se considera también un agente de control biológico (Rehner y Buckley, 2005).

Preparación de suspensión de conidias

La cosecha de conidias se realizó a partir de colonias de los aislados de *Metarhizium* sp. indicados anteriormente, crecidos en medio de

Tabla 1. Aislados nativos de *Metarhizium anisopliae*, hospedante, origen geográfico y número de accesoión de la secuencia de la región ITS-5.8S del ADN ribosomal depositada en el GenBank (NCBI).

Aislados	Hospedante	Origen geográfico	Nº de accesoión en el Genbank
Mt1	<i>Aeneolamia</i> sp. (Hemiptera: Cercopidae)	Coclé, Panamá	MN294981
Mt2	<i>Aeneolamia</i> sp. (Hemiptera: Cercopidae)	Coclé, Panamá	MN294982
Mt5	<i>Cyrtomenus bergi</i> (Hemiptera: Cydnidae)	Herrera, Panamá	MN294983

cultivo PDA y raspadas de su superficie con la ayuda de un escalpelo. Las conidias cosechadas se suspendieron en una solución de Tween 80 al 0,1%, para luego ser homogenizadas mediante agitación en vortex durante un minuto. La concentración de conidias mL^{-1} fue estimada con la ayuda de un hemocitómetro y ajustada a las concentraciones de 1×10^5 , 10^6 , 10^7 y 10^8 conidias mL^{-1} . La viabilidad de las conidias se determinó colocando $100 \mu\text{L}$ de la suspensión en medio de cultivo PDA e incubada a $25 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ y $\text{HR} \geq 80\%$. La germinación de las conidias se evaluó después de 24 horas, mediante la observación directa bajo microscopio óptico a 400X, para luego calcular el porcentaje de viabilidad (Ojeda-Chi *et al.*, 2011).

Bioensayos

En los bioensayos se utilizó un diseño experimental completamente al azar con cuatro tratamientos (concentraciones 1×10^5 , 10^6 , 10^7 y 10^8 conidias mL^{-1}) y un control (solución de Tween 80 al 0,1%). Cada tratamiento se conformó con cuatro repeticiones con viales que contenían las larvas. Los tratamientos se aplicaron siguiendo la metodología propuesta por Quinelato *et al.* (2012), que consistió en la inyección de 1 mL de la suspensión de conidias dentro de cada vial para humedecer las larvas durante tres minutos. Seguidamente, se descartó la suspensión de conidias, mientras que los viales se taparon con algodón estéril, incubándolos a $27 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ y $\text{HR} \geq 80\%$. Como variables de respuesta se evaluó el porcentaje de mortalidad por cada concentración y aislado a los 10, 20 y 30 días posttratamiento (DPT) y se estimó la concentración letal media (CL_{50}). Al final del experimento, las larvas muertas se colocaron en placas de Petri que contenían medio de cultivo PDA y se incubaron a $25 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ para inducir el crecimiento del hongo y, posteriormente, confirmar la identidad del hongo entomopatógeno inoculado.

Análisis estadístico

Los datos de porcentaje de mortalidad a los 10, 20 y 30 DPT se analizaron mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, mientras que la CL_{50} se obtuvo mediante el análisis Probit. El análisis de los datos se realizó con el software v.3.2.5 (R Core Team, 2016).

Resultados y discusión

Identificación morfológica y molecular de *Metarhizium anisopliae*

Los tres aislados nativos de *Metarhizium sp.* provenientes de la colección de hongos entomopatógenos del LPV del CIAD mostraron colonias inicialmente de color blanco, que posteriormente se tornaron de color verde olivo. Estos aislados produjeron conidióforos simples con fiálides en forma de botella, mientras que las conidias presentaron forma cilíndrica, aseptada, con dimensiones de $5,60\text{-}8,0 \times 2,0\text{-}2,80 \mu\text{m}$. Las características morfológicas descritas para los aislados nativos de *Metarhizium sp.* indicados anteriormente coinciden con las descripciones realizadas por Humber (2012) y Bischoff *et al.* (2009) para *M. anisopliae*. La amplificación por PCR de la región ITS-5.8S del ADN ribosómico generó un producto de 490-pb para estos aislados, mientras que las secuencias obtenidas a partir de estos (Tabla 1) mostraron 100% de homología con secuencias de referencia de los aislados ARSEF 7450 (No. Accesoión HQ331464) y ARSEF 7487 (No. Accesoión HQ331446) (Figura 1) de *M. anisopliae* (Schneider *et al.*, 2011). En estudios previos realizados por Driver *et al.* (2000) y Schneider *et al.* (2011), la región ITS-5.8S del ADN ribosómico ha sido ampliamente usada para determinar la identidad y diversidad genética de *M. anisopliae*. Basados en las características morfológicas y en el análisis de secuencias de esta región genómica, se

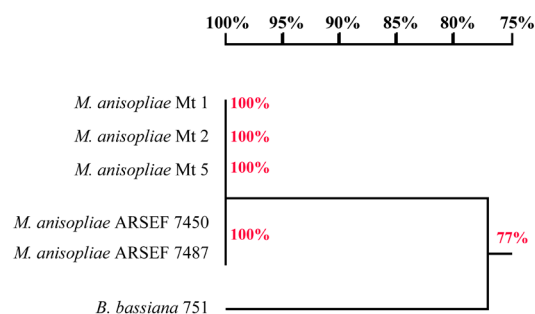


Figura 1. Árbol de homología de la secuencia de la región ITS-5.8S del ADN ribosómico obtenido con el programa DNAMAN. En el análisis realizado se incluyeron las secuencias de los aislados nativos Mt1, Mt2 y Mt5 de *Metarhizium anisopliae* (este estudio) y secuencias de aislados de referencia de este hongo depositadas en el GenBank (NCBI). La secuencia de *Beauveria bassiana* ARSEF 751 se incluyó como "outgroup".

confirmó la identidad de los tres aislados nativos como *M. anisopliae*.

Bioensayos

La viabilidad de las conidias resultó > 95% en los tres aislados de *M. anisopliae* evaluados. La media de los porcentajes de mortalidad (PM) observada en larvas de *R. microplus* se muestra en la Tabla 2. El análisis estadístico utilizado en el estudio presentó diferencias significativas ($P < 0,01$) entre las concentraciones evaluadas para cada uno de los aislados de *M. anisopliae* a los 10, 20 y 30 DPT (Tabla 2). No se observó mortalidad de larvas en el tratamiento control a los 30 DPT. Todas las concentraciones de conidias evaluadas de cada uno de los aislados a los 10 DPT provocaron PM sobre larvas de *R. microplus* en un rango de 3,5%-92,3% (Tabla 2). Estos resultados son similares a los reportados por Fernandes *et al.* (2004), quienes evaluaron tres aislados de *M. anisopliae* obteniendo un incremento en el PM de larvas entre 11%-94% en un rango de concentraciones de 1×10^5 a 1×10^8 conidias mL^{-1} , en comparación con el control (0%) a los 10 DPT. Los PM sobre larvas aumentaron ligeramente en un rango entre 4,8%-98% a los 20 DPT. Los PM más altos, que presentaron valores entre 24%-100%, se obtuvieron a los 30 DPT (Tabla 2), observándose PM más elevados (>98%) a las concentraciones de 1×10^7 y 1×10^8 conidias mL^{-1} . Estos resultados son similares a los reportados por Quinelato *et al.*

(2012), quienes obtuvieron altas mortalidades sobre larvas de *R. microplus* (> 98%) a las concentraciones 1×10^7 y 1×10^8 conidias mL^{-1} de cuatro aislados de *M. anisopliae* a los 30 DPT. La alta mortalidad inducida por los aislados nativos de *M. anisopliae* evaluados en el estudio podría ser atribuida a la sensibilidad de la población de *R. microplus* a la infección del hongo. Perinotto *et al.* (2012) indican que la variación en la virulencia de *M. anisopliae* podría ser atribuida a las diferencias en la susceptibilidad de las poblaciones de garrapatas. Esto sugiere la importancia de considerar poblaciones de garrapatas susceptibles para evaluar la potencial virulencia de hongos entomopatógenos.

La CL_{50} se determinó con los datos de mortalidad obtenidos a los 30 DPT (Tabla 3). De acuerdo con los intervalos de confianza al 95%, el aislado Mt5 de *M. anisopliae* resultó el más virulento con una CL_{50} de $1,17 \times 10^5$ conidias mL^{-1} , seguido del aislado Mt2 con una CL_{50} de $2,94 \times 10^5$ conidias mL^{-1} , mientras que el aislado Mt1 fue el menos virulento con una CL_{50} de $1,23 \times 10^6$ conidias mL^{-1} . En evaluaciones *in vitro* realizadas por Ángel-Sahagún *et al.* (2010) sobre larvas de *R. microplus*, estos autores reportan que los aislados de *M. anisopliae* más virulentos presentaron una CL_{50} en un rango de $1,1 \times 10^4$ y $9,3 \times 10^5$ conidias mL^{-1} . Estudios *in vitro* han demostrado la elevada virulencia de *M. anisopliae* sobre la garrapata del bovino en diversas etapas de su ciclo de vida (Ángel-Sahagún *et al.*, 2010; Quinelato *et al.*, 2012; Ren *et al.*, 2012; Fernández-Salas *et al.*, 2017). Por último, se incubaron larvas muertas

Tabla 2. Media de porcentajes de mortalidad de larvas de *Rhipicephalus microplus* tratadas con aislados nativos de *Metarhizium anisopliae*.

Aislados	DPT ^a	Control	Media de mortalidad de <i>Rhipicephalus microplus</i> en larvas (%) ^c			
			10 ^{5b}	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸
Mt1	10	0,0 ± 0,0 a	3,5 ± 1,7 b	11,3 ± 6,1 c	54,3 ± 15,5 d	92,3 ± 13,5 e
	20	0,0 ± 0,0 a	4,8 ± 2,1 b	22,0 ± 11,9 c	79,5 ± 19,2 d	98,0 ± 2,9 e
	30	0,0 ± 0,0 a	24,0 ± 3,5 b	26,8 ± 8,9 b	98,5 ± 1,3 c	99,5 ± 1,0 c
Mt2	10	0,0 ± 0,0 a	11,0 ± 3,6 b	28,3 ± 15,7 c	35,3 ± 22,8 c	89,3 ± 11,5 d
	20	0,0 ± 0,0 a	16,8 ± 13,5 b	49,3 ± 18,0 c	84,8 ± 10,8 d	96,5 ± 4,5 e
	30	0,0 ± 0,0 a	26,0 ± 12,7 b	83,2 ± 13,6 c	100,0 ± 0,0 d	100,0 ± 0,0 d
Mt5	10	0,0 ± 0,0 a	7,8 ± 4,2 b	38,5 ± 19,1 c	58,3 ± 11,0 d	91,5 ± 10,7 e
	20	0,0 ± 0,0 a	38,5 ± 14,2 b	55,3 ± 15,2 c	82,3 ± 5,2 d	93,8 ± 12,5 d
	30	0,0 ± 0,0 a	47,8 ± 19,2 b	83,0 ± 12,4 c	99,3 ± 0,5 d	100,0 ± 0,0 e

^a DPT: Días postratamiento.

^b Concentraciones de conidias mL^{-1}

^c Medias dentro de la misma fila con la misma letra no difieren estadísticamente $P > 0,05$ (prueba de Kruskal-Wallis).

Tabla 3. Concentración letal media (CL₅₀) de conidias mL⁻¹ de aislados nativos de *Metarhizium anisopliae* sobre larvas de *Rhipicephalus microplus* a los 30 días postratamiento (DPT).

Aislados	CL ₅₀	Intervalos de confianza al 95%
Mt1	1,23 x 10 ⁶	1,04 x 10 ⁶ – 1,45 x 10 ⁶
Mt2	2,94 x 10 ⁵	2,53 x 10 ⁵ – 3,42 x 10 ⁵
Mt5	1,17 x 10 ⁵	8,75 x 10 ⁴ – 1,56 x 10 ⁵

de *R. microplus* de los grupos tratados a una HR ≥ 80, lográndose reaislar los aislados de *M. anisopliae* inoculados inicialmente, lo que confirma la infección y su desarrollo sobre dichas larvas.

Conclusiones

Este estudio ha permitido identificar aislados nativos de *M. anisopliae* mediante características

morfológicas y el análisis de secuencias de la región ITS-5.8S del ADN ribosomal. Se demostró mediante evaluaciones *in vitro* la alta virulencia de los aislados Mt5 y Mt2 sobre larvas de *R. microplus*, que los sitúa como potenciales agentes para ser empleados en el control biológico de la garrapata tropical del bovino *R. microplus* en fincas ganaderas de Panamá.

Agradecimiento

Los autores expresan su agradecimiento al Dr. Luis Galipienso del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Valencia, España, por su apoyo en la secuenciación del aislado Mt5 de *M. anisopliae*. La SENACYT, a través del Sistema Nacional de Investigación (SNI) (subvención 151-2018), apoya las actividades de investigación del Dr. José Angel Herrera-Vázquez.

Literatura Citada

- Ángel-Sahagún, C.; Lezama-Gutiérrez, R.; Molina-Ochoa, J.; Pescador-Rubio, A.; Skoda, S.; Cruz-Vázquez, C.; Foster, J. 2010. Virulence of Mexican isolates of entomopathogenic fungi (Hypocreales: Clavicipitaceae) upon *Rhipicephalus = Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) larvae and the efficacy of conidia formulations to reduce larval tick density under field conditions. *Veterinary Parasitology*, 170: 278-286.
- Arguedas, M.; Álvarez, V.; Bonilla, R. 2008. Eficacia del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* en el control de *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Agronomía Costarricense: Revista de Ciencias agrícolas*, 32: 137-147.
- Bautista-Garfias, CR. 2006. Entomología Veterinaria Esencial. Ed. INIFAP, México DF, México. 46 p.
- Bischoff, J.F.; Rehner, S.A.; Humber, R.A. 2009. A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. *Mycologia*, 101: 512-530.
- Destéfano, R.H.; Destéfano, S.A.; Messias, C.L. 2004. Detection of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* within infected sugarcane borer *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera, Pyralidae) using specific primers. *Genetics and Molecular Biology*, 27: 245-252.
- Dhingra O.D.; Sinclair, J.B. 1995. Basic plant pathology methods. CRC Press Inc., Florida, U.S. 448 p.
- Driver, F.; Milner, R.J.; Trueman, J.W. 2000. A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data. *Mycological Research*, 104: 134-150.
- Fernandes, E.K.; da Costa, G.L.; Lage de Moraes, A.M.; Bittencourt, V.R. 2004. Entomopathogenic potential of *Metarhizium anisopliae* isolated from engorged females and tested in eggs and larvae of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Journal of Basic Microbiology*, 44: 270-274.
- Fernandes, E.K.; Bittencourt, V.R. 2008. Entomopathogenic fungi against South American tick species. *Experimental and Applied Acarology*, 46: 71-93.
- Fernández-Salas, A.; Alonso-Díaz, M.A.; Alonso-Morales, R.A.; Lezama-Gutiérrez, R.; Rodríguez-Rodríguez, J.C.; Cervantes-Chávez, J.A. 2017. Acaricidal activity of *Metarhizium anisopliae* isolated from paddocks in the Mexican tropics against two populations of the cattle tick *Rhipicephalus microplus*. *Medical and Veterinary Entomology*, 31: 36-43.
- FAO. 1984. Ticks and tick-borne disease control. A practical field manual. Vol. I. Food and Agricultural Organization. Rome, Italy. 299 p.
- FAO. 2003. Resistencia a los antiparasitarios: estado actual con énfasis en América Latina. Food and Agricultural Organization. Rome, Italy. 51 p.
- Humber, R.A. 2012. Identification of entomopathogenic fungi. In: Lacey, L.A. (Ed.), *Manual of Techniques in Insect Pathology*, Second ed. Academic Press. California, U.S. pp. 151-187.
- Jaén, M.; Álvarez, V.; Quintero, R.; Espinales, K.; Rangel, G.; Quintero, N. 2015. Sensibilidad al clorpirifos y cipermetrina en la garrapata *Rhipicephalus microplus* en fincas ganaderas de Panamá. *Revista Ciencia Agropecuaria*, 22: 70-77.
- Kunz, S.; Kemp, D. 1994. Insecticides and acaricides: resistance and environmental impact. *Revue Scientifique et Technique International Office des Epizootics*, 13: 1249-1286.

- Leal, A.T.; Freitas, D.R.; da Silva, I.J.
2003. Perspectivas para o controle do carrapato bovino. *Acta Scientiae Veterinariae*, 31: 1-11.
- Morán, C.; Aparicio, A.; Mora, F.
1995. Programa estacional con uso estratégico de medicamentos y sus componentes, de "Prevalencia de helmintos y control de las garrapatas de los bovinos". Ministerio de Desarrollo Agropecuario. Dirección Nacional de Ganadería. Panamá, pp. 27-38.
- Ojeda-Chi, M.M.; Rodríguez-Vivas, R.I.; Galindo-Velasco, E.; Lezama-Gutiérrez, R.; Cruz-Vázquez, C.
2011. Control de *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) mediante el uso del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales: Clavicipitaceae): Revisión. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 2: 177-192.
- Perinotto, W.M.; Angelo, I.C.; Golo, P.S.; Quinelato, S.; Camargo, M.G.; Sá, F.A.; Bittencourt, V.R.
2012. Susceptibility of different populations of ticks to entomopathogenic fungi. *Experimental parasitology*, 130: 257-260.
- Quinelato, S.; Golo, P.S.; Perinotto, W.M.; Sá, F.A.; Camargo, M.G.; Angelo, I.C.; Bittencourt, V.R.
2012. Virulence potential of *Metarhizium anisopliae* sl isolates on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* larvae. *Veterinary Parasitology*, 190: 556-565.
- R Core Team.
2016. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna.
- Rehner, S.A.; Buckley, E.
2005. A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1- α sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs. *Mycologia*, 97: 84-98.
- Ren, Q.; Liu, Z.; Guan, G.; Sun, M.; Ma, M.; Niu, Q.; Li, Y.; Liu, A.; Liu, J.; Yang, J.; Yin, H.; Luo, J.
2012. Laboratory evaluation of virulence of Chinese *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates to engorged female *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ticks. *Biological Control*, 63: 98-101.
- Schneider, S.; Rehner, S.A.; Widmer, F.; Enkerli, J.
2011. A PCR-based tool for cultivation independent detection and quantification of *Metarhizium* clade 1. *Journal of Invertebrate Pathology*, 108: 106-114.
- White, T.J.; Bruns, T.; Lee, S.; Taylor, J.W.
1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetic. In: Innis, M.A.; Gelfand, D.H.; Sninsky, J.J.; White, T.J. (Ed.), PCR protocols, a guide to methods and applications. Academic Press. San Diego, U.S. pp. 315-322.

