



Short Note [Nota Corta]

SELECCIÓN DE AISLADOS DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS PARA EL CONTROL DE *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae)

[SELECTION OF ISOLATES OF ENTOMOPATHOGENIC FUNGUS FOR CONTROL OF *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae)]

Ana Cruz-Avalos¹, Carlos Cruz-Vázquez^{1,*}, Roberto Lezama-Gutiérrez², Irene Vitela-Mendoza¹, Cesar Angel-Sahagún³

¹ Instituto Tecnológico El Llano Aguascalientes, km. 18 carretera Aguascalientes - San Luis Potosí, El Llano, 20330, Aguascalientes, México. Email: cruva18@yahoo.com.mx, cruz20_5@hotmail.com, vitelairene@yahoo.com.mx

² Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Colima, AP No. 36, 28930, Tecmán, Colima, México. Email: rlezama@uacol.mx

³ División de Ciencias de la Salud, Universidad de Guanajuato, AP 3111, 36500, Irapuato, Guanajuato, México. Email: csahagun@ugto.mx

* Corresponding author

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue evaluar la susceptibilidad *in vitro* de larvas no alimentadas de *Rhipicephalus microplus* a diferentes aislados de hongos entomopatógenos nativos de suelo de unidades ganaderas y conocer las características de crecimiento y potencial de inóculo de los aislados que mostraran ser más patógenos. Se evaluó la patogenicidad y virulencia de aislados de *Metarhizium anisopliae sensu lato* (Ma), *Beauveria bassiana* (Bb) e, *Isaria fumosorosea* (Ifr), en larvas de *R. microplus* de 7 días de edad, expuestas mediante inmersión en una solución acuosa a la concentración 1×10^8 conidios/ml. Los aislados Ma135 y Ma133, presentaron alta patogenicidad con 100 y 94% de mortalidad, con valores CL_{50} de 5.2×10^4 y 2.5×10^4 conidios/ml, respectivamente. En estos aislados, la producción de esporas fue de 1.0×10^{10} conidios/ml, y el crecimiento radial de micelio fue de 3.07 y 3.60 mm/día, respectivamente. Estos resultados demuestran que los aislados Ma135 y Ma133, pueden ser considerados potenciales agentes de control biológico en larvas de *R. microplus*.

Palabras clave: *Rhipicephalus microplus*; *Metarhizium anisopliae*; *Beauveria bassiana*; *Isaria fumosorosea*; Control Biológico.

INTRODUCCIÓN

La garrapata del ganado, *Rhipicephalus microplus*, es actualmente el ectoparásito hematófago mas importante en las regiones tropicales y subtropicales

SUMMARY

The aim of this study was to evaluate the *in vitro* susceptibility of larvae unfed of *Rhipicephalus microplus* to different isolates of entomopathogenic fungi native of soil of livestock units and know the characteristics of growth and inoculum potential of isolates that showed to be more pathogenic. Pathogenicity and virulence of isolates of *Metarhizium anisopliae sensu lato* (Ma), *Beauveria bassiana* (Bb) and, *Isaria fumosorosea* (Ifr) was evaluated in *R. microplus* larvae of 7 days old, exposed by immersion in an aqueous solution at concentration of 1×10^8 conidia / ml. Ma135 and Ma133 isolates, showed high pathogenicity with 100 and 94% mortality, with LC_{50} values of 5.2×10^4 and 2.5×10^4 conidia / ml, respectively. In these isolates, the production of spores was 1.0×10^{10} conidia / ml, and the radial mycelial growth were 3.07 and 3.60 mm / day, respectively. These results demonstrate that the isolated Ma135 and Ma133, can be considered as potential biocontrol agents in *R. microplus* larvae

Key words: *Metarhizium anisopliae*; *Beauveria bassiana*; *Isaria fumosorosea*; *Rhipicephalus microplus*; Biological control.

de México, sus efectos negativos en la salud animal son patentes por la exsanguinación y la transmisión de enfermedades, en tanto que causa pérdidas importantes en la producción de leche, carne y calidad de las pieles (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2005).

Las estrategias de control de esta parasitosis incluyen principalmente el uso extensivo y muchas veces indiscriminado, de compuestos químicos ixodicidas de las familias de los organofosforados, piretroides sintéticos, amidinas, fenilpirazolonas y lactonas macrocíclicas, los cuales muestran actualmente diferentes niveles de resistencia en el campo, además de que su uso representa un riesgo ambiental y de salud pública ampliamente reconocido; en México, la resistencia a ixodicidas en la garrapata del ganado se encuentra ampliamente distribuida (Alonso-Díaz *et al.*, 2006). Esta situación ha motivado la búsqueda y aplicación de alternativas de control no químico de tipo biológico, que incluye el uso de enemigos naturales de las garrapatas tales como ácaros, parasitoides, hormigas, hongos entomopatógenos y nemátodos, además de las pasturas anti-garrapata, entre otros (Jonsson, 2004; Samish *et al.*, 2004).

El control biológico basado en el uso de hongos entomopatógenos representa una atractiva alternativa de control de las garrapatas, los conidios de estos organismos se adhieren a la cutícula, germinan, forman un aprensorio, y finalmente penetran la cutícula provocando un desarrollo masivo en el cuerpo y con ello la muerte (Arruda et al., 2005). Dentro de estos organismos, se encuentran *Beauveria bassiana*, *Isaria fumorosea*, *I. farinosa*, *Lecanicillium lecanii* y *Metarhizium anisopliae*, que han demostrado ser eficientes para la biorregulación de *R. microplus*; *M. anisopliae* ha sido el más estudiado debido a su distribución cosmopolita y alta patogenicidad (Fernandes y Bittencourt, 2008; Lemmon y Jonsson, 2008; Angel-Sahagún *et al.*, 2010; Ojeda-Chi *et al.*, 2011; Fernandes *et al.*, 2011).

El objetivo del presente estudio fue evaluar la susceptibilidad *in vitro* de larvas no alimentadas de *Rhipicephalus microplus* a diferentes aislados de hongos entomopatógenos nativos de suelo de unidades ganaderas y de forma complementaria conocer las características de crecimiento y potencial de inóculo de los aislados que mostraran ser más patógenos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se evaluaron diez aislados de hongos entomopatógenos, cinco de *Metarhizium anisopliae sensu lato* (Ma), cuatro de *Beauveria bassiana* (Bb) y uno de *Isaria fumorosea* (If), que fueron aislados a partir de muestras de suelo de unidades ganaderas de cuatro municipios de Aguascalientes, México, mediante la técnica de larvas de *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) (Zimmerman, 1986). La identificación de género y especie se llevó a cabo de acuerdo a criterios morfológicos de las estructuras reproductivas (Samson, 1981; Humber, 1997; Bischoff et al., 2009).

Los aislados fueron cultivados en Agar Dextrosa Sabouraud, enriquecido con 1% de extracto de levadura (Watson *et al.*, 1995), conteniendo 500 ppm de cloranfenicol, incubándose a $25\pm 1^\circ\text{C}$ con 70% HR por 3 semanas bajo un régimen de 12:12 h luz/obscuridad. Los conidios fueron cosechados por raspado y suspendidos en agua destilada estéril conteniendo 0.1% (v:v) de Tween 80, la suspensión fue colocada en tubos de vidrio estériles y homogenizada en vortex; la viabilidad de las esporas, la cual excedió del 98%, fue determinada sembrando 100 μl de la suspensión de conidias en Agar Dextrosa Sabouraud contando las colonias a las 48 h (Ángel-Sahagún *et al.*, 2010). La patogenicidad de los aislados fue evaluada por ajuste de la concentración de conidios por dilución con 0.1% de Tween 80 a 1×10^8 conidios/ml, determinada por conteo directo usando un hemocitómetro de Neubauer. La virulencia fue evaluada por la estimación de la Concentración Letal 50 (CL_{50}), de los aislados que tuvieron más de 90% de mortalidad en las larvas de *R. microplus*. Los ensayos de virulencia fueron desarrollados usando seis concentraciones de conidios, a partir de 1×10^2 y hasta 1×10^7 conidios/ml (Arthurs y Thomas, 2001).

Se colectaron de ganado naturalmente infestado, hembras adultas ingurgitadas de *R. microplus*; que fueron llevadas al laboratorio para obtener larvas de 7 días de edad siguiendo el procedimiento descrito por Angel-Sahagún *et al.* (2010). Se formaron grupos de 25 larvas que se colocaron en una porción de 5 cm de cinta adhesiva y fueron inmersas por 30 segundos en una solución acuosa a la concentración 1×10^8 conidios/ml, las larvas usadas como control fueron tratadas con 0.1% (v:v) de solución Tween 80. Las larvas tratadas se guardaron en cajas de Petri sobre una doble capa de papel filtro (Whatman Num. 1) humedecido con agua destilada estéril y se incubaron a $25\pm 1^\circ\text{C}$ bajo condiciones de 12:12 h de luz/obscuridad. La mortalidad de las larvas y la presencia de micelio del hongo fueron registradas cada 48 h durante 16 días (Ojeda-Chi *et al.*, 2010). La evaluación estadística de la patogenicidad se realizó bajo un diseño completamente al azar. En el análisis se incluyeron diez aislados de hongos y un tratamiento control, con cuatro repeticiones de cada uno. Se calcularon los porcentajes de mortalidad y se analizaron usando un ANOVA de una vía, previa transformación angular de las proporciones ($Y = \arcsin \sqrt{p}$), y prueba de comparación de medias de Tukey al 95% de confianza. Los datos de virulencia fueron examinados mediante un análisis Probit, para obtener los valores de las CL_{50} , para cada aislado evaluado hubo cuatro réplicas (Gindin *et al.*, 2001).

Para conocer las características de crecimiento y potencial de inóculo de los aislados que mostraron ser más patógenos, se desarrolló el siguiente procedimiento: se preparó una solución a la

concentración de 1×10^8 conidios/ml y se colocaron 100 μ l de la suspensión en una caja de Petri con medio Agar Papa Dextrosa, dispersándola manualmente; las cajas fueron incubadas a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ y 12:12 h luz/obscuridad por tres días para promover el crecimiento de micelio, sin que existiera la formación de conidios, en toda la superficie de la caja Petri (Lawrence y Khan, 2009). El micelio fue cortado con un sacabocado de 0.8 mm y se colocó invertido en el centro de una caja Petri de 90 mm de diámetro con medio Agar Papa Dextrosa (Dimbi et al., 2004; Shimazu, 2004), y se incubaron a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 70% de HR y 12:12 h de luz/obscuridad por 14 días. El crecimiento radial fue registrado bajo el microscopio cada 48 h durante 14 días (Yeo et al., 2003), utilizando dos diámetros cardinales como referencia en cada caja Petri (Shimazu, 2004). La evaluación estadística se realizó bajo un diseño completamente al azar. En el análisis se incluyeron cuatro aislados de hongos con cuatro repeticiones de cada uno, y se analizaron usando un ANOVA de una vía, con prueba de comparación de medias de Tukey al 95% de confianza.

Después de que fue medido el diámetro de la colonia, la caja fue lavada 10 veces con 9.5 ml de 0.1% de Tween 80. Los lavados fueron colectados en un tubo de policarbonato de 125 ml y se mezcló su contenido por 3 min con ayuda de un vortex. El número de conidios en cada tubo, fue determinado usando un hemocitómetro de Neubauer y el promedio de conidios por colonia en cada caja fue utilizado como medida de esporulación (Arthurs y Thomas, 2001). El análisis estadístico fue realizado bajo un diseño completamente al azar. En el análisis se incluyeron cuatro aislados de hongos con cuatro repeticiones de cada uno, y se analizaron usando un ANOVA de una vía, con prueba de comparación de medias de Tukey al 95% de confianza.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La mortalidad observada en larvas no alimentadas de *R. microplus*, se muestra en la Tabla 1; el análisis de varianza mostró diferencias significativas entre los tratamientos ($F = 64.02$; $P < 0.0001$) y la prueba de comparación de medias de Tukey determinó a los aislados Ma135 y Ma133 como los más patógenos, con 100 y 94% de mortalidad, respectivamente. Estos aislados fueron seleccionados para estimar su CL_{50} , las cuales fueron 5.2×10^4 (Intervalo de Confianza (I.C) 95% $2.7 \times 10^4 - 9.9 \times 10^4$) para Ma135, y 2.5×10^4 conidios/ml (IC 95% $1.6 \times 10^4 - 3.6 \times 10^4$) para Ma133.

La producción de conidios en los aislados Ma135 y Ma133 fue de 1.0×10^{10} conidios/ml, mientras que en Ma136 y Ma134 fue de 7.8×10^9 y 6.5×10^9 , respectivamente; el análisis de varianza mostró

diferencias significativas entre tratamientos ($F = 16.84$; $Pr > F = 0.0001$), y la prueba de Tukey separó a los hongos Ma135 y Ma133, como los más sobresalientes y sin diferencia estadística entre ellos (Tabla 1).

El crecimiento radial de los cuatro aislados estudiados, tuvo un rango de 1.3 a 3.6 mm/día; los aislados Ma135 y Ma133 fueron los de mayor crecimiento; el análisis de varianza mostró diferencias significativas entre tratamientos ($F = 6.72$; $Pr > F = 0.0001$). La prueba de Tukey separó a los hongos Ma135 y Ma133, como los más sobresalientes y sin diferencia estadística entre ellos (Tabla 1).

Los hongos *M. anisopliae* y *B. bassiana* son los que con mayor frecuencia han sido evaluados en la garrapata *R. microplus*, y muestran las mejores perspectivas como agentes de control biológico, sin embargo, su comportamiento es variable tanto en condiciones *in vitro* como *in vivo* debido a diferentes factores, entre ellos se mencionan a las condiciones ambientales en que se realizan las pruebas, el estado evolutivo de las garrapatas expuestas al hongo, el origen de los aislados y las características metodológicas de cada ensayo (Fernandes y Bittencourt, 2008; Fernandes et al., 2011).

La patogenicidad de los aislados de *M. anisopliae* en larvas de *R. microplus* fue superior a la de los demás aislados evaluados, en particular, los identificados como Ma135 y Ma133, que tuvieron mortalidades de 100 y 94%, respectivamente. Otros estudios han reportado una eficacia de *M. anisopliae* para el control de larvas de *R. microplus* que va del 60% al 97% dependiendo de la cepa y la concentración de conidios, las larvas son el estado de desarrollo más susceptible a los hongos entomopatógenos (Fernandes y Bittencourt, 2008; Fernandes et al., 2011).

En México, diferentes cepas de *M. anisopliae* han sido evaluadas en larvas de *R. microplus*, encontrando mortalidades en un rango de 2% a 100% a la concentración de 1×10^8 conidios/ml, las cepas más sobresalientes han mostrado valores de mortalidad de 93 a 100% y de 45% a 62% a la concentración de 1×10^8 conidios/ml (Ojeda-Chi et al., 2010). Esta información confirma que el comportamiento de las diferentes cepas es variable en cada estudio, aún en condiciones de una misma concentración de conidios, lo que sugiere que la mortalidad está influenciada por factores como los enunciados en párrafos anteriores así como por la habilidad del hongo para penetrar directamente la cutícula de la garrapata utilizando mecanismos físicos y enzimáticos (Ojeda-Chi et al., 2011). Los valores de CL_{50} fueron de 2.5×10^4 y 5.2×10^4 conidios/ml, para los aislados Ma133 y Ma135, respectivamente, mismos que resultan adecuados para el desarrollo de formulaciones

prácticas aplicables en condiciones de campo (Ángel-Sahagún *et al.*, 2010). Los aislados de *B. bassiana* mostraron mortalidades de 2.5% a 42.9%, mientras que el de *I. fumoserosea* fue de 28.6%, valores que se consideran poco patógenos.

El conocimiento integral del ciclo de vida y de algunas características biológicas de los hongos entomopatógenos es necesario para determinar con mayor seguridad el potencial de los mismos como mico-acaricidas, las características de crecimiento y producción de esporas en condiciones de laboratorio proporcionan información útil para este fin. Los aislados evaluados en este trabajo se reprodujeron fácilmente bajo las condiciones de laboratorio usadas en el estudio; la producción de esporas fue de 1.0×10^{10} conidios/ml, en los hongos más sobresalientes y el crecimiento radial de micelio en

esos mismos aislados fue de 3.07 a 3.60 mm/día. La temperatura y la humedad relativa tiene un efecto directo en el crecimiento de micelio así como en la producción de esporas, los mejores resultados en el laboratorio, de acuerdo a diversos autores, se obtienen entre 25 a 30°C y $\leq 70\%$ de HR (Ferron 1975; Ouedraogo *et al.*, 1997; Dimbi *et al.*, 2004; Lemmon y Jonsson, 2008); las temperaturas arriba o abajo de este rango inhiben el crecimiento de micelio y la producción de esporas (Lubek *et al.*, 2008). En el presente estudio, la temperatura de cultivo fue de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, por lo que se considera que los resultados observados en el cultivo en el laboratorio son confiables, si bien podrían desarrollarse protocolos para identificar la temperatura ideal para que estos aislados alcancen su máxima producción *in vitro*, como se sugiere en la literatura (Lemmon *et al.*, 2008).

Tabla 1. Mortalidad, producción de conidios y crecimiento radial de los hongos entomopatógenos *M. anisopliae* (Ma), *B. bassiana* (Bb) e *I. fumoserosea* (Ifr), aislados de suelos de unidades de producción de ganaderías en Aguascalientes, México, sobre larvas de la garrapata *R. microplus*.

Aislado	Mortalidad (%)	Producción de esporas (conidios/ml)	Crecimiento radial (mm/día)
Ma135	100 a	1.0×10^{10} a	3.07 a
Ma133	94.0 a	1.0×10^{10} a	3.60 a
Ma136	77.0 bc	6.5×10^9 b	2.37 b
Ma134	70.3 c	7.8×10^9 b	1.30 c
Ma132	64.6 cd	ND	ND
Bb114	42.9 de	ND	ND
Ifr22	28.6 e	ND	ND
Bb113	27.0 e	ND	ND
Bb115	19.0 e	ND	ND
Bb112	2.5 f	ND	ND
Control	0.0 f	----	----

*Valores con diferente letra dentro de la misma columna son estadísticamente diferentes ($p < 0.05$).
ND = No Determinado.

CONCLUSIONES

El presente estudio ha permitido identificar diferentes hongos entomopatógenos, de los cuales dos de ellos, *M. anisopliae* 135 y 133, mostraron una alta patogenicidad y virulencia, además de adecuadas características de crecimiento y potencial de inóculo bajo cultivo en el laboratorio, lo que los ubica como potenciales candidatos a ser empleados como agentes de control biológico de *R. microplus*.

Agradecimientos

Los autores agradecen a los ganaderos que participaron en este estudio por su invaluable

colaboración. Este estudio fue financiado por DGEST-SEP (2233.09-P).

REFERENCIAS

- Rodríguez-Vivas, R.I., Quiñones, A.F., Frago, S.H. 2005. Epidemiología y control de la garrapata *Boophilus* en México. En: Rodríguez-Vivas, R.I. (ed). Enfermedades de importancia económica en producción animal. México D.F. McGraw-Hill-UADY. pp. 571-592.
- Alonso-Díaz, M.A., Rodríguez-Vivas, R.I., Frago, S.H. 2006. Resistencia de la garrapata *Boophilus microplus* a los ixodicidas.

- Archivos de Medicina Veterinaria. 38:105-113.
- Angel-Sahagún, C., Lezama-Gutiérrez, R., Molina-Ochoa, J., Pescador-Rubio, A., Skoda, S.R., Cruz-Vázquez, C., Lorenzoni, A.G., Galindo-Velasco, E., Fragoso, S.H., Foster, J.E. 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.
- Arruda, W., Lübeck, I., Achrank, I.A., Henning, M. 2005. Morphological alterations of *Metarhizium anisopliae* during penetration of *Boophilus microplus* ticks. *Experimental and Applied Acarology*. 37: 231-244.
- Arthurs, S., Thomas, M.B. 2001. Effect of dose, pre-mortem host incubation temperature and thermal behaviour on host mortality, mycosis and sporulation of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* in *Schistocerca gregaria*. *Biocontrol Science and Technology*. 11: 411-420.
- Bischoff, J.F., Rehner, S.A., Humber, R.A. 2009. A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. *Mycologia*. 101: 512-530.
- Dimbi, S., Maniania, N.K., Lux, S.A., Mueke, J.M. 2004. Effect of constant temperatures on germination, radial growth and virulence of *Metarhizium anisopliae* to three species of African Tephritid fruit flies. *BioControl*. 49: 83-94.
- Fernandes, E.K.K., Bittencourt, V.R.E.P. 2008. Entomopathogenic fungi against South American tick species. *Experimental and Applied Acarology*. 46: 71-93.
- Fernandes, E.K.K., Angelo, I.C., Rangel, D.E.N., Bahiense, T.C., Moraes, A.L.M., Roberts, D.W., Bittencourt, V.R.E.P. 2011. An intensive search for promising fungal biological control agents of ticks, particularly *Rhipicephalus microplus*. *Veterinary Parasitology*. 182: 307-318.
- Ferron, P. 1975. Les champignons entomopathogènes: evolution des recherches au cours des dix dernières années. In: Bulletin SROP, WPRS Bulletin. INRA La Minière, Versailles: France. 54 p.
- Gindin, G., Samish, M., Alekseev, E., Glazer, I. 2001. The susceptibility of *Boophilus annulatus* (Ixodidae) ticks to entomopathogenic fungi. *Biocontrol Science and Technology*. 11: 111-118.
- Humber, R.A. 1997. Fungi: Identification. In: Lacey, L.A. (ed). *Manual of Techniques in Insect Pathology*. New York, USA: Academic Press. pp. 153-185.
- Jonsson, N. 2004. Integrated control programs for ticks on cattle: an examination of some possible components. Rome, Italy: FAO Animal Production Health Paper. 82p.
- Lawrence, A.A., Khan, A. 2009. Variation in germination and growth rates of two isolates of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (Deuteromycota: Hyphomycetes) at different temperatures and their virulence to *Callosobruchus maculatus* (Fabricius) (Coleoptera: Bruchidae). *Journal of Entomology*. 6: 102-108.
- Lemmon, D.M., Jonsson, N.N. 2008. Laboratory studies on Australian isolates of *Metarhizium anisopliae* as a biopesticide for the cattle tick *Boophilus microplus*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 97: 40-49.
- Lubek, I., Arruda, W., Souza, B., Stanisçuaski, F., Carlini, C.R., Schrank, A., Vainstein, M. 2008. Evaluation of *Metarhizium anisopliae* strains as potential biocontrol agents of the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* and the cotton stainer *Dysdercus peuvianus*. *Fungal Ecology*. 1: 78-88.
- Ojeda-Chi, M.M., Rodríguez-Vivas, R.I., Galindo-Velasco, E., Lezama-Gutiérrez, R. 2010. Laboratory and field evaluation of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) for the control of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) in the Mexican tropics. *Veterinary Parasitology*. 170: 348-354.
- Ojeda-Chi, M.M., Rodríguez-Vivas, R.I., Galindo-Velasco, E., Lezama-Gutiérrez, R., Cruz-Vázquez, C. 2011. Control of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) using the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales: Clavicipitaceae). *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*. 2:177-192.
- Ouedraogo, A., Fargues, J., Goettel, M.S., Lomer, C.J. 1997. Effect of temperature on vegetative growth among isolates of *Metarhizium anisopliae* and *M. flavoviride*. *Mycopathologia*. 137: 37-43.
- Samish, M., Ginsberg, H., Glazer, R.I. 2004. Biological Control of Ticks. *Parasitology*. 129: 389-403.
- Samson, R.A. 1981. Identification: Entomopathogenic Deuteromycetes. In: Burges, H.D. (ed). *Microbial Control of Pests and Plant Diseases 1970-1980*. New York, USA: Academic Press. pp. 93-106.
- Shimazu, M. 2004. Effects of temperature on growth of *Beauveria bassiana* F-263, a strain highly virulent to the Japanese pine sawyer, *Monochamus alternatus*, especially tolerance

- to high temperatures. *Applied Entomology and Zoology*.39: 469-475.
- Watson, D.W., Geden, C.J., Long, S.J., Rutz, D.A. 1995. Efficacy of *Beauveria bassiana* for controlling the house fly and stable fly (Diptera: Muscidae). *Biological Control*. 5: 405-411.
- Yeo, H., Pell, J.K., Alderson, P.G., Clark, S.J., Pye, B.J. 2003. Laboratory evaluation of temperature effects on the germination and growth of entomopathogenic fungi and their pathogenicity to two aphid species. *Pest Management Science*. 59: 56-165.
- Zimmermann, G. 1986. The “Galleria Bait Method” for detection of entomopathogenic fungi in soil. *Journal of Applied Entomology*.102: 213-215.

Submitted September 18, 2014 – Accepted August 11, 2015