



Universidad de Concepción  
Dirección de Postgrado  
Facultad de Agronomía - Programa de Magíster en Ciencias Agronómicas

**Selección de hongos entomopatógenos para el control  
del “chape del cerezo” *Caliroa cerasi* L.  
(Hymenoptera:Tenthredinidae)**

**Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias Agronómicas mención  
Producción y Protección Vegetal**

DIANA ELIZABETH TOAPANTA GALLEGOS  
CHILLÁN, CHILE  
2015

Profesor Guía: Luis Devotto Moreno  
Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA)  
Centro Regional de Investigación Quilamapu

SELECCIÓN DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS PARA EL CONTROL DEL  
“CHAFE DEL CEREZO” *CALIROA CERASI* L. (HYMENOPTERA:  
TENTHREDINIDAE)

Aprobada por:

Luis Devotto Moreno  
Ing. Agrónomo, Dr.



---

Profesor guía

Macarena Gerding González  
Ing. Agrónomo, Ph.D.

---

Evaluadora Interna

Marisol Vargas Concha  
Ing. Agrónomo, Dr.

---

Evaluadora Interna

Inés Figueroa Cares  
Ing. Agrónomo, Mg. Sc., Dr.

---

Directora de Programa

## AGRADECIMIENTOS

*A los docentes del Programa de Magíster de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Concepción, por su orientación y conocimiento transmitido en cada etapa del programa de estudios.*

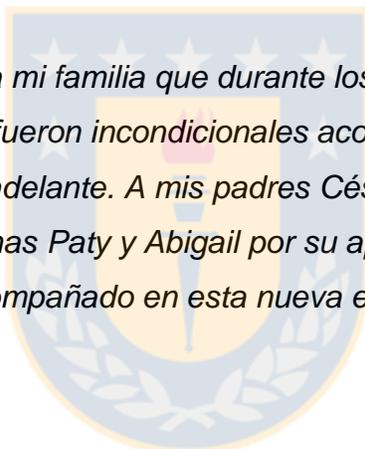
*Al Instituto de Investigaciones Agropecuarias INIA, Banco de Recursos Genéticos Microbianos, así como al Laboratorio de Entomología, por el financiamiento otorgado a la presente investigación. Al Prof. Luis Devotto, investigadores del Centro Tecnológico de Control Biológico, tesistas, estudiantes en práctica y a todo el personal que labora en dichas dependencias que hicieron posible la realización de la tesis.*

*A mis queridos compañeros y amigos, Clarita por su cálido recibimiento a mi llegada, Gloria, Carmen, Gabriel, Cristian, Catalina, Jaime, Verito, María Esperanza, Jhonatan, Diego, Leo, Luis, Marco, Edgardo, amigos con los que compartimos muchos momentos durante mi estadía.*

*Finalmente a la familia que me acogió durante toda la etapa de la duración de los estudios de postgrado, Fernando, Nancy, Valeria, Natalia y Carlita.*

## DEDICATORIA

*Dedico este trabajo a mi familia que durante los dos años de estadía en el programa de Magíster, fueron incondicionales acompañándome, apoyándome y animándome a seguir adelante. A mis padres César y Susy por sus consejos y sabiduría, a mis hermanas Paty y Abigail por su apoyo incondicional, a Dios por haberme acompañado en esta nueva experiencia de vida.*



**TABLA DE CONTENIDOS**

<b>Contenido</b>	<b>Página</b>
I. Resumen.....	1
II. Summary.....	2
III. Introducción.....	2
IV. Materiales y Métodos.....	11
V. Resultados y Discusión.....	18
VI. Conclusiones.....	28
VII. Referencias Bibliográficas.....	28



## INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

		<b>Página</b>
Figura 1	Ciclo de vida de <i>Caliroa cerasi</i> L	7
Figura 2	Experimentos de laboratorio para la evaluación de CL <sub>50</sub> y CL <sub>90</sub> con aislamientos patogénicos a larvas de <i>Caliroa cerasi</i>	16
Figura 3	Árbol filogenético basado en la secuencia del gen ITS-5,8 ADNr con 14 aislamientos de <i>Metarhizium</i> spp. y <i>Beauveria</i> spp.	19
Figura 4	Mortalidad de larvas de <i>Caliroa cerasi</i> alimentadas con hongos entomopatógenos al cuarto día post-inoculación.	20
Figura 5	Colonización de larvas de <i>Caliroa cerasi</i> por aislamientos patogénicos de <i>Metarhizium anisopliae</i>	22
Figura 6	Mortalidad de larvas de <i>Caliroa cerasi</i> alimentadas con hongos a diferentes concentraciones del inóculo Qu-M592, día 6 post-inoculación	23
Figura 7	Mortalidad de larvas de <i>Caliroa cerasi</i> alimentadas con hongos a diferentes concentraciones del inóculo Qu-M421, día 6 post-inoculación	24
Figura 8	Relación entre mortalidad de larvas de <i>Caliroa cerasi</i> expresada en valores Probit y el Log de las concentraciones de los aislamientos Qu-M592 y Qu-M421	25
Figura 9	Mortalidad de <i>Caliroa cerasi</i> en diapausa bajo suelo inoculado con hongos entomopatógenos, día 15 post-inoculación	26
Figura 10	Mortalidad de larvas de <i>Caliroa cerasi</i> expuestas a conidias de Qu-M421, previa exposición del hongo a luz solar	27
Tabla 1	Origen de aislamientos de <i>Beauveria bassiana</i> y <i>Metarhizium anisopliae</i>	12
Tabla 2	Concentración letal CL <sub>50</sub> y CL <sub>90</sub> de aislamientos patogénicos a larvas de <i>Caliroa cerasi</i> .	24

## SELECCIÓN DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS PARA EL CONTROL DEL “CHAPE DEL CEREZO” *Caliroa cerasi* L. (HYMENOPTERA: TENTHREDINIDAE)

SELECTION OF ENTOMOPATHOGENIC FUNGI TO CONTROL “SLUG CHERRY” *Caliroa cerasi* L. (HYMENOPTERA: TENTHREDINIDAE)

### I. RESUMEN

*Caliroa cerasi* es considerada una importante plaga en cerezo, debido al daño que causan las larvas al follaje. Su control se efectúa con insecticidas sintéticos, sin embargo una alternativa al control químico es el uso de hongos entomopatógenos. El objetivo general de la investigación fue evaluar la patogenicidad de 15 aislamientos de los géneros *Beauveria* y *Metarhizium* en bioensayos con larvas de *C. cerasi*. La identificación molecular de los aislamientos indicó que 13 de ellos pertenecen a *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* y dos a *Beauveria bassiana*. El porcentaje de mortalidad diaria determinó que tres de los aislamientos (Qu-B931, Qu-M421, Qu-M592) alcanzaron un 100% de mortalidad de larvas alimentadas con hojas inoculadas con conidias suspendidas en agua ( $1 \times 10^8$  conidias  $\text{mL}^{-1}$ ) al cuarto día de evaluación, a diferencia del testigo tratado con agua destilada estéril que no presentó mortalidad. La evaluación con suspensiones crecientes  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$  y  $10^8$  del inóculo (Qu-M421 y Qu-M592), demostraron que hubo un incremento significativo en la mortalidad de larvas, sin embargo al ser comparados los valores de  $CL_{50}$  y  $CL_{90}$  no se obtuvo diferencias significativas entre los dos tratamientos. De cinco aislamientos probados en suelo, el Qu-M490 alcanzó un 39% de mortalidad de pupas, a diferencia de los otros cuatro aislamientos no que superaron el 15% de mortalidad. La persistencia de conidias del aislamiento Qu-M421 bajo condiciones de campo sobre follaje de cerezo, mostró una reducción del porcentaje de mortalidad de larvas, al incrementar el número de horas expuestas a radiación solar, lo que demuestra que a pesar de ser patogénica a larvas de cerezo su efectividad se reduce en aplicaciones de campo.

**Palabras índice adicionales:** *Beauveria*, *Metarhizium*, patogenicidad, conidia, concentración letal, bioensayo.

## II. SUMMARY

*Caliroa cerasi* is a major pest in cherry, which causes severe leaf damage and is normally controlled by synthetic insecticides. However, an alternative to chemical control is the use of entomopathogenic fungi. The overall objective of this research was to evaluate the pathogenicity of 15 isolates of *Beauveria* and *Metarhizium* in bioassays with larvae of *C. cerasi*. The molecular identification of isolates through amplification of the ITS region, indicated that 11 of these belong to *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* and two were identified as *Beauveria bassiana*. The evaluation of the mortality percentage per day determined that the isolates Qu-B931, Qu-M421 and Qu-M592 achieved 100% mortality of larvae fed with inoculated leaves with conidial suspension in water ( $1 \times 10^8$  conidia ml<sup>-1</sup>) at the fourth day. The control treatment showed no mortality. The evaluation with increasing concentrations of the inoculum  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$  and  $10^8$  (Qu-M421 and Qu-M592), showed that there was a significant increase in the mortality of larvae. However when the lethal concentrations LC<sub>50</sub> and LC<sub>90</sub> were compared, no statistical differences were found between the two treatments. Five isolates were tested in soil isolates, the Qu-M490 isolate achieved 39% mortality of pupae, and other four isolates did not exceed 15% mortality. The viability of conidia of the strain Qu-M421 on cherry foliage under field conditions showed a reduced mortality rate of larvae, when increasing the number of hours exposed to solar radiation. This demonstrates that, in spite of strain being pathogenic to larvae, their effectiveness can be reduced in field applications.

**Key words:** *Beauveria*, *Metarhizium*, pathogenic, conidia, lethal, concentration, bioassay.

## III. INTRODUCCIÓN

El cerezo (*Prunus avium* L.) es una de las principales especies frutícolas de exportación en Chile, el año 2014 la superficie plantada alcanzó las 16.933 hectáreas. Las exportaciones de cerezas dulces frescas durante el mismo año alcanzaron las 85.250 toneladas, con un total de 535 millones dólares FOB. A estas cifras se suman las exportaciones de cereza dulce orgánica fresca, que

durante el periodo 2012 – enero 2015 lograron un total de 58.800 dólares en producto exportado (ODEPA, 2015). Los principales mercados de exportación son Estados Unidos, China y la Unión Europea, cuyos consumidores prefieren productos con bajos niveles de pesticidas (Mareggiani *et al.*, 2012).

Una de las mayores restricciones para el incremento de la producción agrícola son las pérdidas causadas por plagas, enfermedades y malezas. Estas pérdidas alcanzan el 40% del potencial productivo y a pesar del aumento en el mercado del uso de pesticidas, las pérdidas continúan relativamente constantes (Vega *et al.*, 2009). La producción de cerezas de alta calidad requiere de un adecuado monitoreo y control de plagas, sin embargo las regulaciones de protección medioambientales y la preocupación por la contaminación de frutos con pesticidas por parte de los consumidores de cerezas y otras frutas, han llevado a desarrollar métodos de control amigables con el medioambiente, dentro de éstos el manejo integrado de plagas permite regular las poblaciones de insectos plaga en diversos cultivos (Kutinkova & Andreev, 2004).

En sistemas de producción orgánica donde el uso de insecticidas sintéticos es reducido o reemplazado por entomopatógenos (virus, bacterias, hongos y nemátodos), métodos de confusión sexual, insecticidas de origen vegetal, parasitoides o depredadores (Mareggiani *et al.*, 2012), ofrecen un efectivo control de plagas en carozos tales como: *Grapholita molesta* (Lepidoptera: Tortricidae), *Synanthedon exitiosa* (Lepidoptera: Sesiidae), *Conotrachelus nenuphar* (Coleoptera: Curculionidae) y *Rhagoletis indifferens* (Diptera: Tephritidae) (Lacey & Shapiro, 2008).

Una de las principales plagas en el cultivo de cerezo es *Caliroa cerasi* L., conocida en Chile como el “chape del cerezo”. La plaga afecta a diversos frutales incluyendo: *Prunus cerasus* L. (guindo), *P. avium* L. (cerezo), *P. domestica* L. (ciruelo), *Cydonia oblonga* M. (membrillo) y *Pyrus communis* L. (peral), además de atacar a diversas especies ornamentales tales como *Sorbus* spp., *Crataegus* spp., *Cotoneaster* spp. *Rubus* spp. y *Rosa* spp. (Raddatz & Carrillo, 2008).

Las larvas consumen el parénquima foliar de las hojas dejando las nervaduras y la cutícula inferior intacta (Artigas, 1994). Severas infestaciones de la plaga pueden

reducir el vigor de los árboles (Shaw *et al.*, 2004), los daños son de tal naturaleza que éstos privados durante varios años seguidos de su follaje acaban por perecer (Izquierdo, 1921).

Este insecto es poco común en huertos con manejo convencional (González, 1989), su control no representa problemas con el uso de insecticidas, sin embargo bajo manejo orgánico puede llegar a ser un serio problema (Shaw *et al.*, 2004). Las aplicaciones de azufre son usadas para su manejo (Smirle & Wei, 1996), sin embargo es necesario contar con estrategias eficientes para el control de esta plaga en sistemas con manejo integrado de plagas.

### ***Caliroa cerasi* L. (Hymenoptera: Tenthredinidae)**

El género *Caliroa* es originaria de la región Holoártica las especies encontradas en el Neotrópico son una introducción, su método o forma de introducción es desconocida (Smith, 2003). *Caliroa cerasi* es nativa de la región Paleártica y fue introducida a diversas zonas del mundo (Carl, 1972). El primer reporte de esta plaga se registra en Europa en 1749 por Réaumur (Webster, 1912). El primer estudio de *C. cerasi* en el continente americano fue realizado por el Prof. Peck W.D. de la Universidad de Harvard, quién escribió un ensayo en 1797 titulado, "The Natural History of the Slug-worm" (Webster, 1912). Posteriormente se reportó en Nueva Zelanda en 1870 (Webster, 1912) y en Tasmania (Australia) en 1889 (Naumann *et al.*, 2002). En Chile se observó por primera vez en 1895 en Talcahuano (Octava Región) por Manuel J. Rivera en cerezos, perales y ciruelos (Artigas, 1994).

### **Distribución Geográfica**

Esta plaga se encuentra distribuida en el hemisferio norte (Europa, Norte de África, Norteamérica y Japón), así como en Australia, Nueva Zelanda y Sudáfrica, además se encuentra en algunos países de Sudamérica como: Argentina, Colombia, Chile y Uruguay (Mareggiani *et al.*, 2012). Su extensa distribución geográfica sugiere una amplia tolerancia climática y ecológica (Carl, 1972).

## **Taxonomía**

La clasificación taxonómica indica que pertenece al orden Hymenoptera, familia Tenthrenidae, subfamilia Heterarthrinae, género *Caliroa*, especie *cerasi*. Fue descrito por Linné en 1758 (Weltz & Vilhelmsen, 2013).

## **Morfología**

El adulto es un insecto pequeño de 4,0 a 6,0 milímetros de largo, de color negro brillante (Artigas, 1994), revestido de una corta pilosidad gris (González, 1989). La cabeza es ancha como el tórax, los ojos son negros y los tres ocelos color rojo oscuro, antenas negras de 9 segmentos atenuadas suavemente hacia el ápice (Artigas, 1994), el tercer segmento más largo casi tanto como los cuatro terminales, el cuarto segmento le sigue en tamaño. Tórax realzado, con surcos pronotales y pleurales muy hundidos, el dorso del tórax es negro, liso, brillante, alas hialinas con estigma negro (González, 1989), con una envergadura de 11,0 a 12,0 milímetros, transparentes, con brillo iridiscente, las venas abundantes, son castaño oscuras hacia el dorso y más claras hacia el área ventral; el primer par de alas presenta una franja transversal ligeramente oblicua, de tono ahumado. Las patas son castaño oscuro. Abdomen plano dorsalmente tenue, termina en un ovipositor en forma de sierra (Artigas, 1994). Dientes ventrales agudos e irregulares (González, 1989). Las hembras son partenogénicas y el macho es desconocido en América y poco frecuente en Europa, pero común en Turquía (Smith, 1971).

La larva alcanza hasta 8 milímetros de largo (González, 1989), posee tres patas torácicas cortas, carnosas con ventosas en el extremo (Artigas, 1994). Espuripedios en número de 7 pares, carece de espuripedio anal. Espiráculos abdominales con músculos aliformes. Tegumento verde oscuro, con pliegues transversales y recubiertos de un fluido reluciente producido por glándulas dorsales que le confieren una apariencia viscosa (González, 1989), de cuerpo grueso, más alto y ancho en la parte anterior. La cabeza es pequeña, castaño oscura, cráneo oculto, hundido en el protórax siendo solo visible desde el costado (Artigas, 1994). Cabeza y tórax más ensanchados que los segmentos posteriores

(González, 1989). Durante la etapa final de desarrollo, la larva alcanza una longitud de 12 milímetros (Artigas, 1994).

### **Ciclo de Vida**

Su ciclo comienza a mediados del mes de octubre en Chile, donde aparecen los primeros adultos. Posteriormente aparecen dos generaciones más durante el mes de diciembre y nuevamente a comienzos del mes de febrero (González, 1989). La oviposición de las hembras adultas se inicia en primavera (Artigas, 1994).

*Caliroa cerasi* es un insecto holometábolo, presenta los estados de adulto, huevo, larva y pupa. La hembra adulta deposita los huevos bajo la cutícula de la cara superior de la hoja desde el envés, introduciendo su aparato ovipositor a través de la lámina foliar hasta alcanzar la cutícula superior. Cada hoja puede contener hasta 12 huevos (González, 1989). Las hembras colocan un promedio de 47 huevos durante su vida adulta. El tamaño del huevo se incrementa durante la embriogénesis (Carl, 1972).

El lugar donde está depositado el huevo en la hoja luce como una pequeña mancha circular (2,5 milímetros de diámetro) de aspecto aceitoso. Los huevos son de color amarillo verdoso, al ser depositados forman una vesícula que contiene aire, ya que se produce un espacio vacío cuando el huevo es introducido. De esta manera queda contenido entre la epidermis superior de la hoja y el parénquima de la misma, quedando protegido de tal manera que no pueda desprenderse o destruirse. Esto puede explicar el alto porcentaje de huevos que dan origen a un gran número de larvas (Izquierdo, 1921).

Luego de 7 a 10 días de incubación emergen las pequeñas larvas que inicialmente se alimentan del corión del huevo (González, 1989), durante las dos primeras etapas de alimentación causan lesiones insignificantes en una limitada área de la superficie de la hoja, posteriormente las larvas se alimentan de la epidermis superior y del mesófilo, dejando intacta la epidermis inferior. En etapas posteriores, se observa una pronunciada esqueletización. Si el ataque es grave, resultado del hacinamiento y competencia por alimento, árboles enteros son completamente defoliados. Durante períodos cortos de lluvia las larvas se mueven hacia el lado inferior de las hojas y la alimentación ocurre de manera diferente a lo

usual, la epidermis superior se mantiene intacta. El estado larval demora entre 21 y 30 días, durante los cuales sufren 4 mudas (écdisis). En la última etapa larval no se alimenta, camina, cae a la tierra y forma la pupa en el suelo (Carl, 1972). Para pupar, las larvas se dejan caer al suelo y penetran entre 20 y 70 milímetros, dependiendo de la humedad y textura del suelo. Hiberna bajo suelo en estado de diapausa en un capullo de tierra, el geocio o celda pupal, está formado por la secreción de una sustancia marrón-blanquecina y partículas de tierra (Carl, 1972), que alcanza los 6,0 milímetros de largo por 2,5 milímetros de ancho. En primavera, se forman una eoninfa y los adultos emergen en una forma de proninfa (Carl, 1972). Las hembras adultas emergen entre los 12 y 20 días luego de la diapausa para iniciar de inmediato un nuevo ciclo (Artigas, 1994).



**Figura 1.** Ciclo de vida de *Caliroa cerasi* L. A. Adulto. B. Huevo. C. Larva. D. Pre-pupa.

### **Métodos de control para *Caliroa cerasi***

Los métodos de control para *C. cerasi* en sistemas tradicionales de cultivo se basan en el uso de insecticidas organosintéticos fosforados y piretroides (Pino *et al.*, 2007). En ataques próximos a la cosecha o posterior a ésta, se aplica insecticidas de baja carencia. El control químico orientado a la escama de San José (*Quadraspidiotus perniciosus* C.) después de la cosecha, también contribuye al manejo de las larvas de *C. cerasi* (Grau, 2007).

Durante décadas, diferentes métodos de control han sido evaluados en producción orgánica para el control de *C. cerasi* tales como: extracto de neem (Smirle & Wei, 1996), Peak Plus compuesto derivado de ácidos grasos (Pino *et al.*, 2007), pyrethrum + aceite mineral (Wearing, 2011), uso de cultivares de baja

susceptibilidad a daño por larvas de *C. cerasi* (Shaw *et al.*, 2004), parasitoides de la familia Ichneumonoidea (Naumann *et al.*, 2002), *Beauveria bassiana* (Aslantas *et al.*, 2008), *Bacillus cereus* y *Brevibacillus brevis* (Dadasoglu *et al.*, 2014), han sido reportados hasta la fecha.

### **Hongos entomopatógenos para el control de insectos plagas**

Se han desarrollado alrededor de 170 productos basados en hongos entomopatógenos, que pertenecen a los géneros *Beauveria*, *Metarhizium*, *Lecanicillium* e *Isaria*, la mayoría producidos comercialmente por su relativamente fácil producción en masa (Vega *et al.*, 2009).

*B. bassiana* (Balsamo) Vuillemin y *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin son enemigos naturales de una amplia gama de insectos y arácnidos (Meyling & Eilenberg, 2007). El género *Beauveria* ha sido extensivamente estudiado con potencial de control para aproximadamente 70 especies de plagas en diferentes cultivos (Aslantas *et al.*, 2008). El género *Metarhizium* es conocido por infectar a más de 200 especies de insectos, muchos de los cuales son considerados plagas en agricultura y forestería. Algunas cepas de *M. anisopliae* var. *majus* manifiestan especificidad a insectos del orden Coleoptera, cepas de *M. flavoviride* con específicas a insectos del orden Orthoptera y *M. album* a insectos del orden Hemiptera (Bidochka & Small, 2005).

Los hongos entomopatógenos son los únicos microorganismos capaces de ingresar a través de la cutícula del insecto, a diferencia de otros patógenos que necesitan ingresar al intestino del insecto para causar daño. La patogénesis se inicia con la adhesión de una conidia a la cutícula del insecto, para que el proceso de entrada sea eficiente. El apresorio y las enzimas líticas concentran la energía física sobre una pequeña área de la cutícula, sin embargo la infección puede ser interrumpida en la epicutícula si un factor esencial está ausente, tales como: baja humedad, inhabilidad de utilizar los nutrientes de la superficie de la cutícula o ausencia de factores necesarios para el reconocimiento de un huésped susceptible (Hajek & Legger, 1994).

Una vez que la epicutícula es penetrada, el progreso a la cutícula a través de las hifas que se extienden lateralmente puede causar fracturas y facilitar la

dispersión de enzimas degradadoras producidas por el patógeno. El hongo invade el hemocele y el huésped muere por la combinación del daño mecánico producido por el crecimiento del hongo, agotamiento de nutrientes y toxicosis. Los metabolitos producidos por los hongos entomopatógenos ayudan a la degradación de la cutícula a través de enzimas que destruyen o modifican la integridad estructural del huésped; son además capaces de inhibir procesos o de interferir con los sistemas de regulación del huésped. Tal daño, asociado con síntomas de la enfermedad, puede ser producido tanto por las enzimas del patógeno y por sus metabolitos de bajo peso molecular (toxinas) (Hajek & Legger, 1994). Durante la infección, *Metarhizium* produce destruxinas o toxinas que aceleran la muerte en insectos infectados (Schrank & Henning, 2010). Además produce enzimas extracelulares como proteasas (Pr1), tripsinas, carboxipeptidasas, aminopeptidasas entre otras, que están involucradas en la degradación de la cutícula (Bidochka & Small, 2005). *Beauveria* por otro lado es capaz de producir metabolitos secundarios con efecto insecticida de bajo peso molecular, principalmente péptidos cíclicos tales como beauvericina y bassianolida (Zimmermann, 2007) implicados en la patogénesis y virulencia de insectos (Rehner *et al.*, 2011).

La infección culmina con la salida del hongo a través de la ruptura de la cutícula para la formación y dispersión de conidias (Louela *et al.*, 2005). La conidia es la unidad infectiva adquirida por nuevos insectos huésped (Furlong & Pell, 2005), a través del contacto directo entre cadáveres infecciosos y huésped susceptible, indirectamente por conidias transportadas por el aire, por conidias depositadas en la vegetación o en partículas de suelo. Los entomopatógenos deben producir suficientes conidias infecciosas en cada generación y mantener viables las poblaciones. La producción con frecuencia requiere de la liberación de un número masivo de conidias desde el cadáver del huésped las que deben ser dispersadas bajo las condiciones medioambientales prevalecientes (Boomsma *et al.*, 2014).

La persistencia de las conidias en el medio ambiente está influenciada por la disponibilidad de agua, temperatura y luz ultravioleta (UV). La luz solar contiene

UVA (315-400 nm), UVB (280 – 315 nm) y UVC (100 – 280 nm), de las cuales la UV-B tiene acción directa sobre el ADN (Roberts & Leger, 2004). Las conidias son muy susceptibles a la radiación (UV), el daño causado no solo afecta a los ácidos nucleicos, además se observan daños a proteínas, lípidos y membranas. La exposición a la radiación ultravioleta puede causar alteraciones genéticas y fisiológicas, que reducen la virulencia o retrasar la germinación de conidias (Inglis *et al.*, 1995). Un factor fundamental para el éxito del uso de hongos entomopatógenos en las aplicaciones en campo es su persistencia. La selección de cepas con alta tolerancia a la radiación UV-B puede disminuir el número de aplicaciones necesarias en campo (Farenhorts, 2010) y con esto incrementar la eficacia de los bioinsecticidas contra insectos plaga (Fernandes *et al.*, 2007).

Varios aislamientos de hongos entomopatógenos nativos se han evaluado con éxito en el control de numerosas plagas en cultivos y árboles frutales en Chile. Algunos de ellos son: cabrito de la frambuesa *Aegorhinus superciliosus* (France *et al.*, 2000), capachito de los frutales *Asynonychus cervinus* (France *et al.*, 2002), polilla del tomate *Tuta absoluta* (Rodríguez *et al.*, 2006), cuncunilla negra de las praderas *Dalaca pallens* (Devotto *et al.*, 2008) y chanchito blanco *Pseudococcus viburni* (Pereira *et al.*, 2011).

El manejo tradicional en huertos de cerezo permite un control adecuado de la plaga con insecticidas de síntesis química, sin embargo existen pocas alternativas al uso de insecticidas químicos en el manejo y control de *C. cerasi* en cerezo. El objetivo general de esta investigación fue evaluar la efectividad de aislamientos de hongos entomopatógenos nativos para el control de *C. cerasi*, obtenidos de la Colección Chilena de Recursos Genéticos Microbianos. Los objetivos específicos fueron: 1) Seleccionar aislamientos de *Beauveria* spp. y *Metarhizium* spp. patogénicos a larvas de *C. cerasi*, mediante aplicaciones indirectas (follaje), 2) Determinar la concentración letal CL<sub>50</sub> y CL<sub>90</sub> de los aislamientos de *Beauveria* spp. y *Metarhizium* spp. más promisorios, 3) Evaluar el porcentaje de mortalidad en pupas de *C. cerasi* en suelo inoculado, 4) Analizar el grado de similaridad genética entre aislamientos usando herramientas

moleculares, 5) Evaluar la viabilidad de los mejores aislamientos de *Beauveria* spp. y *Metarhizium* spp. en follaje de cerezo.

#### **IV. MATERIALES Y MÉTODOS**

El estudio se llevó a cabo en los laboratorios del Centro Tecnológico de Control Biológico (CTCB) y el Banco de Recursos Genéticos Microbianos del Instituto Investigaciones Agropecuarias (INIA) Quilamapu, Chillán, Chile.

##### **1. Origen y multiplicación de aislamientos**

Los 15 aislamientos nativos de *Beauveria* spp. y *Metarhizium* spp. que formaron parte de este estudio pertenecen a la Colección Chilena de Recursos Genéticos Microbianos de INIA. La colección se obtuvo originalmente de muestras de suelo y de insectos enfermos colectados en terreno a lo largo del país (France *et al.*, 2000). El origen y la ubicación geográfica de los aislamientos se detallan en la tabla 1.

Los aislamientos se recuperaron desde criopreservación a  $-152\text{ }^{\circ}\text{C}$ , para multiplicarlos en placas Petri con agar-insecto ( $70\text{ g L}^{-1}$  de larvas de *Galleria melonella*,  $18\text{ g L}^{-1}$  de agar-agar,  $15\text{ g L}^{-1}$  de glucosa). Las placas inoculadas se mantuvieron a  $24^{\circ}\text{C}$  en oscuridad durante cinco días. A partir de un cultivo multiespórico, inoculado en medio agar-agua ( $20\text{ g L}^{-1}$ ), se obtuvieron cultivos monoespóricos, luego de 24 horas posteriores a la inoculación y mediante observación microscópica se aisló una conidia, la cual se colocó en el centro de la placa que contenía medio de cultivo agar-papa-dextrosa (APD) y se esperó el desarrollo de los aislamientos a  $24\text{ }^{\circ}\text{C}$  por siete días. Los cultivos monospóricos se re-inoculaban en tubos de ensayo, que contenían  $3\text{ mL}^{-1}$  de APD. Posteriormente las conidias obtenidas se multiplicaron en arroz, se deshidrataron y fueron envasadas al vacío, para su posterior utilización en cada uno de los bioensayos.

##### **2. Producción del inóculo**

Los aislamientos fueron multiplicados en arroz precocido estéril. Una vez colonizado el arroz, éste fue pesado ( $50\text{ g}$  por aislamiento) y se agregó  $250\text{ mL}$  de agua destilada estéril más Tween 20 al 0,1%. La suspensión fue agitada y tamizada para separar las conidias de las semillas de arroz.

**Tabla 1.-** Origen de aislamientos de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*, pertenecientes al Banco de Recursos Genéticos, INIA Quilamapu.

Número	Aislamiento	Especie	Origen	Ubicación geográfica
1	Qu-B323	<i>Beauveria</i> spp.	* Muestra de suelo	Chaca, Arica, I Región
2	Qu-B247	<i>Beauveria</i> spp.	*Muestra de suelo	Melipilla, Región Metropolitana
3	Qu-M185	<i>Metarhizium</i> spp.	*Muestra de suelo	Pradera Natural
4	Qu-M592	<i>Metarhizium</i> spp.	*Muestra de suelo	Santa Rosa, huerto frambuesas, VIII Región
5	Qu-M82	<i>Metarhizium</i> spp.	<i>Naupactus xanthographus</i>	El Carmen, VIII Región
6	Qu-M246	<i>Metarhizium</i> spp.	*Muestra suelo	Cañete, rastrojos, VIII Región
7	Qu-M221b	<i>Metarhizium</i> spp.	*Muestra de suelo	Bahía mansa, renoval, X Región
8	Qu-M363	<i>Metarhizium</i> spp.	<i>Sericoides viridis</i>	Pinto, VIII Región
9	Qu-B931	<i>Beauveria</i> spp.	<i>Dalaca pallens</i>	Remehue, Osorno X Región
10	Qu-M410	<i>Metarhizium</i> spp.	*Muestra de suelo	Soc. Campesina agroind. Puyehue, pradera natural, X Región
11	Qu-M421	<i>Metarhizium</i> spp.	*Muestra de suelo	Soc. Campesina agroind. Puyehue, pradera artificial X Región
12	Qu-M490	<i>Metarhizium</i> spp.	<i>Forficula auricularia</i>	La Fama, X Región
13	Qu-M430	<i>Metarhizium</i> spp.	*Muestra de suelo	Osorno, pradera natural X Región
14	Qu-M230	<i>Metarhizium</i> spp.	*Muestra de suelo	Maicolpue, bosque nativo, orilla de río, X Región
15	Qu-M791b	<i>Metarhizium</i> spp.	*Muestra de suelo	Río Aysen, XI Región

\*Aislados obtenidos desde muestras de suelo utilizando *Galleria melonella* como cebo.

Para calcular la concentración de conidias  $\text{mL}^{-1}$  de cada suspensión, se realizó el recuento en una cámara de Neubauer, bajo observación microscópica y un lente 40x. La concentración de las suspensiones de cada aislamiento se ajustó a  $1 \times 10^8$  conidias  $\text{mL}^{-1}$ , para realizar cada uno de los bioensayos.

### 3. Identificación de aislamientos en estudio

**3.1 Amplificación de genes ITS.** Los aislamientos de *Beauveria* spp. y *Metarhizium* spp. fueron inoculados en  $250 \text{ mL}^{-1}$  de medio de cultivo líquido papa-dextrosa (PD) y cultivados en agitación (120 revoluciones por minuto), durante siete días a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ . Posteriormente se removió el micelio por filtración utilizando un embudo Buchner y papel filtro conectado a una bomba de vacío. El micelio fue colocado en tubos Eppendorf y fue almacenado a  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ . Para extraer el ADN genómico, el micelio de cada aislamiento fue triturado en un tubo Eppendorf con un pistilo estéril. La extracción, se realizó utilizando el Kit de ADN Fúngico E.Z.N.A. OMEGA Bio-Tek, de acuerdo a las recomendaciones del fabricante (Omega Bio-Tek). La región espaciadora transcrita interna (ITS) del DNA ribosomal de los aislamientos de *M. anisopliae* y *B. bassiana*, fue amplificada con los primers SSZ (5'- ATA ACA GGT CTG TGA TG - 3') y LSU4 (5'- TTG TGC GCT ATC GGT CTC - 3') (Hausner et al., 1993). Las condiciones de amplificación fueron: un ciclo a  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  por 3 min, seguidos por 30 ciclos de 1 min a  $94 \text{ }^\circ\text{C}$ , 1 min a  $55 \text{ }^\circ\text{C}$  y 2 min a  $72 \text{ }^\circ\text{C}$ , terminando con un ciclo de extensión de 10 min a  $72 \text{ }^\circ\text{C}$ . La mezcla de reacción, de un volumen total de  $20 \text{ }\mu\text{l}$ , contenía: 1X buffer de reacción,  $0,2 \text{ mM}$  dNTPs,  $2 \text{ mM}$   $\text{MgCl}_2$ ,  $0,5 \text{ }\mu\text{M}$  de cada primer (Sigma-Genosys, Oakville, ON) y 1U *Taq* polimerasa (Gibco/BLR, Burlintong, ON).

La amplificación se realizó en un termociclador Eppendorf Mastercycler gradient, los productos de la amplificación fueron teñidos con SYBR Green y visualizados bajo luz UV mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% de TAE 1X (Invitrogen), como marcador de tamaño se utilizó 100 bp ladder (Promega). Los amplicones PCR fueron purificados usando el kit Quiagen (QIAquick), de acuerdo a las recomendaciones del fabricante (Inglis et al., 2007).

**3.2 Análisis de la secuencia.** Los productos amplificados luego de la PCR, fueron enviados para su secuenciación a la empresa MacroGen Corp. Corea. Las

secuencias fueron comparadas con secuencias de referencia, obtenidas de la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI), luego fueron sometidas a un análisis con el programa GeneTool 2.0. y posteriormente fueron alineadas con la aplicación Blast del programa MEGA 6.0. El árbol filogenético fue construido basándose en el método de distancia neighbor-joining (Inglis *et al.*, 2007), para agrupar los aislamientos en base al grado de similitud entre secuencias de distintas especies y entre especies del género *Metarhizium* y *Beauveria*.

El análisis filogenético de las regiones espaciadoras transcritas internas (ITS) 1 y 2, se realizó con secuencias de 15 aislamientos de hongos entomopatógenos (Inglis *et al.*, 2007), 3 aislamientos de *Beauveria* y 12 aislamientos de *Metarhizium*, las cuales fueron comparadas con 12 secuencias de la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI).

## **1. Bioensayos**

### **3.1 Larvas**

Los bioensayos se realizaron con larvas (L2) de *C. cerasi*, colectadas en un huerto de cerezos sin aplicaciones de insecticidas de la región del Bío Bío (36° 32' S, 71° 55' W). Las hojas de cerezo fueron retiradas de los árboles y depositadas en recipientes. Posteriormente cada larva fue seleccionada por su tamaño entre 8 y 12 milímetros de largo.

### **3.3 Selección de aislamientos patogénicos para larvas de *C. cerasi***

La selección evaluar patogenicidad se realizó con 15 aislamientos de hongos entomopatógenos de *Beauveria* y *Metarhizium* (Tabla 1). La suspensión de conidias estandarizada de *Beauveria* y de *Metarhizium*, fue aplicada mediante la inmersión de las hojas en la suspensión, como tratamiento testigo se utilizó agua destilada estéril. Se recortó el área de la hoja donde se encontraba la larva y sobre cada hoja inoculada con la suspensión, se colocó 10 larvas de *C. cerasi*, cada una de las hojas con larvas fue colocada sobre una toalla de papel absorbente humedecido, dentro de recipientes de 18 x 22 x 5 cm, los que fueron colocados en una cámara de crecimiento RGX-250 a una temperatura constante de 22 °C y fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad.

### 3.4 Mortalidad de larvas

La evaluación de la mortalidad de larvas se realizó diariamente, durante siete días posteriores a la alimentación con hojas inoculadas con hongos entomopatógenos. Las larvas muertas se trasladaron a placas de 10 pocillos, las cuales fueron cubiertas con una tapa y papel absorbente humedecido con agua destilada estéril. La temperatura de incubación de cadáveres en el interior de la sala presentó un promedio de 20 °C. Las mortalidades de los grupos expuestos fueron corregidas por la fórmula de Abbott (1925):

$$MC = \frac{(\% \text{ mortalidad tratamiento} - \% \text{ mortalidad testigo})}{(100 - \% \text{ mortalidad testigo})} \times 100$$

**Diseño Experimental.** Se empleó un diseño experimental completamente al azar, cuya unidad experimental estuvo constituida de un grupo de 10 larvas de *C. cerasi* de similar tamaño, con cuatro repeticiones, más un control sin inóculo. Los porcentajes de mortalidad fueron corregidos por la fórmula de Abbott (1925) y los valores porcentuales fueron transformados por la fórmula arccoseno  $\sqrt{x}/100$  previo al análisis de varianza y normalidad. Se empleó la prueba de Tukey (Gómez y Gómez, 1984) para la separación de medias para lo cual se usó el software estadístico InfoStat (2014).

### 3.5 Inoculación de suelo con aislamientos de hongos entomopatógenos

El ensayo de inoculación de suelo se realizó con 5 aislamientos de hongos entomopatógenos, que superaron el 50% de mortalidad en el ensayo de selección de aislamientos patogénicos.

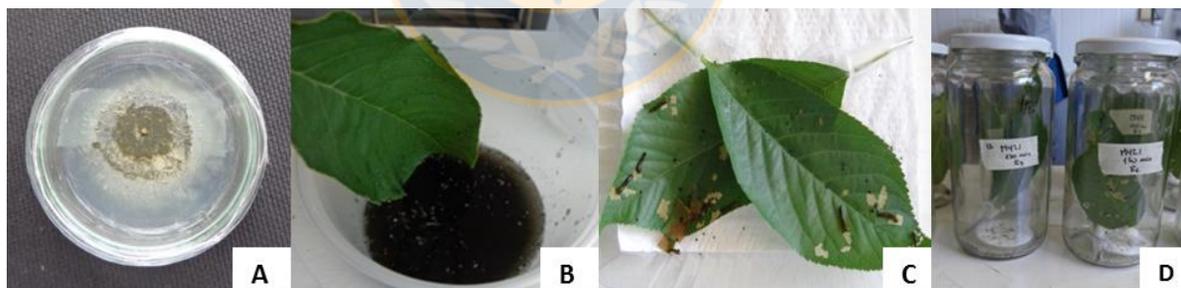
Se pesó 70 g de suelo no estéril derivado de ceniza volcánica (Arrayán, medial, amorphic, thermic, Humic Haploxerands) (Stolpe, 2006) (36°35'S, W72°05'), se retiró los restos de vegetación presente, se tamizó el suelo y luego se colocó en recipientes con orificios para permitir el paso de aire. Posteriormente se inoculó con 50 mL<sup>-1</sup> de suspensión a una concentración de 1 x 10<sup>8</sup> conidias mL<sup>-1</sup>. Se colocó dos hojas de cerezo con larvas de *C. cerasi* en su último estado larval, de color amarillo intenso. Para pupar las larvas ingresaron en el suelo y penetraron

entre 20 y 70 milímetros de profundidad (Carl, 1972). Al día 15 post-inoculación se tamizó el suelo y se realizó el recuento del número de pupas de cada tratamiento. Se abrieron las cámaras pupales y se dividieron en tres grupos, las pupas vivas, las pupas muertas que presentaban colonización por hongos entomopatógenos y las larvas que habían muerto por otras causas.

**Diseño Experimental.** Cada tratamiento tuvo 6 repeticiones y 10 larvas por unidad experimental en un diseño completamente al azar, más un control sin inóculo. Los porcentajes de mortalidad fueron corregidos por la fórmula de Abbott (1925) y los valores porcentuales fueron transformados por la fórmula arccoseno  $\sqrt{x/100}$  previo al análisis de varianza y normalidad. Se empleó la prueba de Tukey (Gómez & Gómez, 1984), para la separación de medias para lo cual se usó el software estadístico InfoStat (2014).

### 3.6 Evaluación de la Concentración Letal CL<sub>50</sub> y CL<sub>90</sub>

El ensayo de concentración letal, se realizó con dos aislamientos (Qu-M592 y Qu-M421, de la especie *Metarhizium anisopliae*) que alcanzaron el 100% de mortalidad de larvas de *C. cerasi* en el ensayo de selección de aislamientos patogénicos (Figura 2).



**Figura 2.** Experimentos de laboratorio para la evaluación de CL<sub>50</sub> y CL<sub>90</sub> con aislamientos patogénicos a larvas de *C. cerasi*. A. Aislamiento monospórico Qu-M592. B. Inoculación de hojas de cerezo. C. Larvas de *Caliroa cerasi* alimentadas con hojas inoculadas. D. Recipientes empleados para el ensayo.

Las hojas de cerezo fueron sumergidas en suspensiones de concentración creciente  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$  conidias mL<sup>-1</sup>.

Sobre cada hoja inoculada, se colocó 10 larvas de *C. cerasi* (L2), las hojas fueron colocadas en recipientes de vidrio en cuyo interior se depositó un disco de

algodón de 5,5 cm de diámetro humedecido con agua destilada. Los recipientes de vidrio fueron cubiertos con tapas metálicas con orificios para permitir el paso de aire. Los recipientes fueron colocados dentro de una cámara de crecimiento Lab Companion GC-300 a temperatura y fotoperiodo controlado, 22 °C con 16 horas luz y 8 horas de oscuridad.

**Diseño Experimental.** Se empleó un diseño experimental completamente al azar, cuya unidad experimental estuvo constituida de un grupo de 10 larvas de *C. cerasi* de similar tamaño, con cuatro repeticiones, más un control sin inóculo. Los porcentajes de mortalidad fueron corregidos por la fórmula de Abbott (1925) y los valores porcentuales fueron transformados por la fórmula arccoseno  $\sqrt{x}/100$  previo al análisis de varianza y normalidad. Se empleó la prueba de Tukey (Gómez & Gómez, 1984) para la separación de medias para lo cual se usó el software estadístico InfoStat (2014). Las curvas de mortalidad a diferentes concentraciones se linearizaron para calcular los valores  $CL_{50}$  y  $CL_{90}$ , de la población mediante la transformación Probit, con el software Statistical Analysis System (SAS versión 8, 1999).

### **3.7 Viabilidad de conidias sobre follaje del cerezo**

El ensayo de viabilidad de conidias en follaje se realizó con un método indirecto, el cual consistió en aplicar 500 mL de suspensión de conidias a una concentración de  $1 \times 10^8$  conidias  $L^{-1}$  del aislamiento Qu-M421. La aplicación se realizó con un pulverizador manual a un sector del árbol previamente identificado durante horas de alta radiación solar (medio día del 24 de noviembre del 2014), como tratamiento testigo se utilizó hojas inoculadas con hongos entomopatógenos sin exposición a luz solar. La medición de la radiación UVB se realizó con el equipo ST-513 Sentry. Posteriormente las hojas fueron tomadas del árbol y llevadas al laboratorio una vez transcurrido el lapso de tiempo de exposición a la radiación solar. El primer grupo de hojas fue tomado a las 11:30 am (hora 0), consecutivamente a las 12:30 pm (hora 1), 1:30 pm (hora 2), 2:30 (hora 3) y 3:30 pm (hora 4). Posteriormente sobre cada grupo de hojas inoculadas con la suspensión y expuestas a los diferentes lapsos de tiempo se colocó 10 larvas de *C. cerasi* de similar tamaño.

Las hojas fueron colocadas en recipientes de vidrio en cuyo interior se depositó un disco de algodón de 5,5 cm de diámetro humedecido con agua destilada. Los recipientes de vidrio fueron cubiertos con tapas metálicas con orificios para permitir el paso de aire. Los recipientes fueron colocados dentro de una cámara de crecimiento Lab Companion GC-300 a temperatura y fotoperiodo controlado, 22 °C con 16 horas luz y 8 horas de oscuridad.

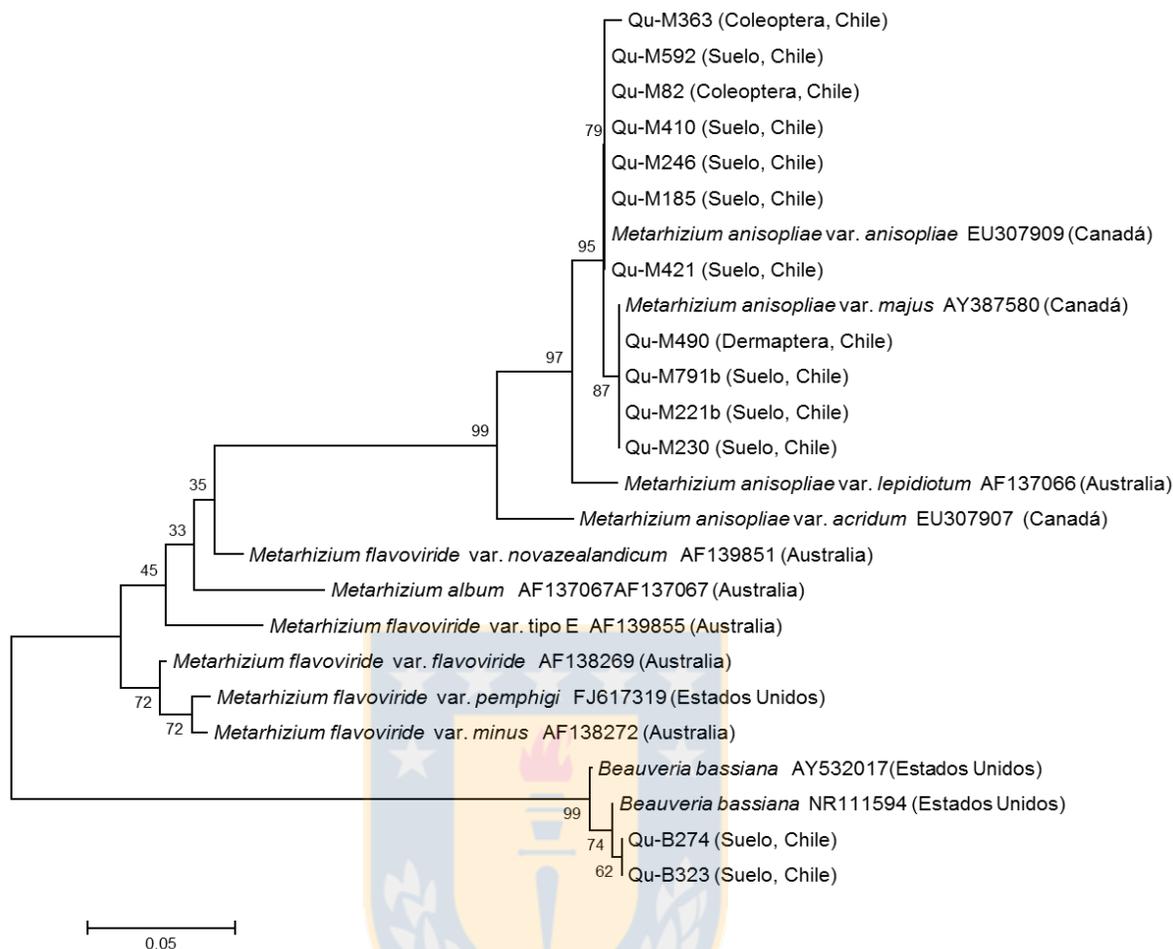
**Diseño Experimental.** Se empleó un diseño experimental completamente al azar, donde las unidades experimentales estuvieron constituidas por árboles de cerezo, cuatro repeticiones por tratamiento, más un control sin exposición a luz solar. Los porcentajes de mortalidad fueron corregidos por la fórmula de Abbott (1925) y los valores porcentuales fueron transformados por la fórmula arccoseno  $\sqrt{x}/100$  previo al análisis de varianza y normalidad. Se empleó la prueba de Tukey (Gómez y Gómez, 1984), para la separación de medias para lo cual se usó el software estadístico InfoStat (2014).

## V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Identificación de los aislamientos en estudio

Para todos los aislamientos se logró amplificar un fragmento de 540 pares de bases. La comparación de las secuencias con aquellas publicadas en el NCBI, indicó que los aislamientos fueron identificados como *Metarhizium anisopliae* o *Beauveria bassiana*. El aislamiento Qu-B931y Qu-M430 no lograron amplificar la región ITS del rDNA, razón por la cual no se incluyeron en el árbol filogenético.

En la figura 3, se observa que siete de los aislamientos en estudio fueron identificados como *M. anisopliae* var. *anisopliae*, ambos aislamientos fueron obtenidos de muestras de suelo pero no son originarios de la misma región geográfica. Los aislamientos Qu-M490, Qu-M791b, Qu-M221b y Qu-M230 se agruparon en un clado junto con *M. anisopliae* var. *majus*. La variedad *majus* ha demostrado ser específica a subfamilias de scarabaeidae (Legger *et al.*, 1992), en efecto algunos de ellos han sido evaluados en estudios de patogenicidad a insectos plaga presentes en suelo tales como: *Asynonychus cervinus*, *Aegorhinus superciliosus* y *Otiorhynchus sulcatus* (Coleoptera: Curculionidae) (France *et al.*, 2000) en Chile.

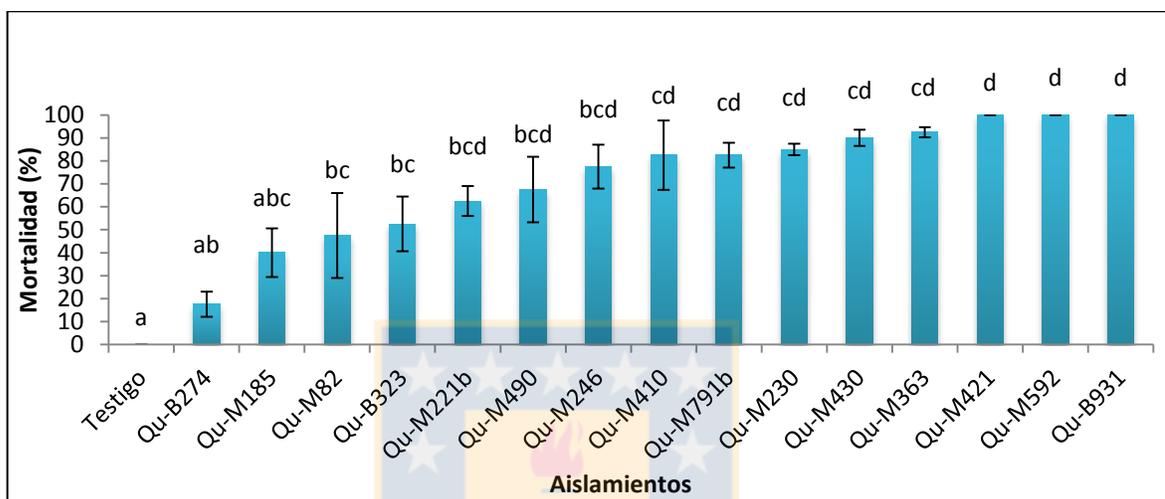


**Figura 3.** Árbol filogenético basado en la secuencia del gen ITS-5,8 DNAr con 13 aislamientos de *Metarhizium* spp. y *Beauveria* spp. Las secuencias provienen de la base de datos del GenBank. La información en el paréntesis indica el origen geográfico de los aislamientos.

Los aislamientos Qu-B274 y Qu-B323 fueron cercanos a *Beauveria bassiana*, sin embargo puede requerir de la secuenciación con más genes conservados para definir su posición con mayor certeza. La identificación de las especies de *Beauveria* usando dos loci (ITS y EF-1a) es más informativo que si solo se usa la región ITS (Rehner & Buckley, 2005), del mismo modo la identificación a nivel de especie dentro del género *Metarhizium* la secuenciación de la región ITS es limitada para resolver completamente la filogenia. Sin embargo, el análisis filogenético usando multigenes (EF-1a, RPB1, RPB2, Bt, IGS) ha demostrado ser efectivo para identificación de linajes (Bischoff *et al.*, 2009).

### Selección de aislamientos patogénicos para larvas de *C. cerasi*

Todos los aislamientos de *B. bassiana* y *M. anisopliae* que formaron parte del bioensayo de selección mostraron patogenicidad a larvas de *C. cerasi*. De estos los aislamientos Qu-M421, Qu-M592 (*M. anisopliae*) y Qu-B931 (*B. bassiana*) alcanzaron el 100% de mortalidad al cuarto día post-inoculación (Figura 4).



**Figura 4.** Mortalidad de larvas de *Caliroa cerasi* alimentadas con hongos entomopatogénicos al cuarto día post-inoculación. Letras distintas indican diferencias significativas con la prueba de Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

El aislamiento Qu-B931 fue descartado por no producir la cantidad necesaria de conidias en arroz precocido o medio de cultivo, factor fundamental en el desarrollo de un biopesticida (Lecuona, 1996).

Los aislamientos Qu-M363, Qu-M430, Qu-M230, Qu-M791b y Qu-M410, alcanzaron porcentajes de mortalidad de larvas entre el 80 y 90%, sin presentar diferencias significativas entre ellos, pero sí difirieron estadísticamente del tratamiento testigo. Los aislamientos Qu-M246, Qu-M490, Qu-M221b, Qu-B323 y Qu-M82 alcanzaron porcentajes de mortalidad de larvas entre el 40 y 80%, sin diferir estadísticamente entre ellos, pero sí difirieron estadísticamente del tratamiento testigo.

Los porcentajes más bajos de mortalidad en larvas se observaron con los aislamientos Qu-M185 y Qu-B274, que no superaron el 40% de mortalidad y que además no difirieron estadísticamente del tratamiento testigo, el cual no presentó

mortalidad al cuarto día de evaluación del ensayo.

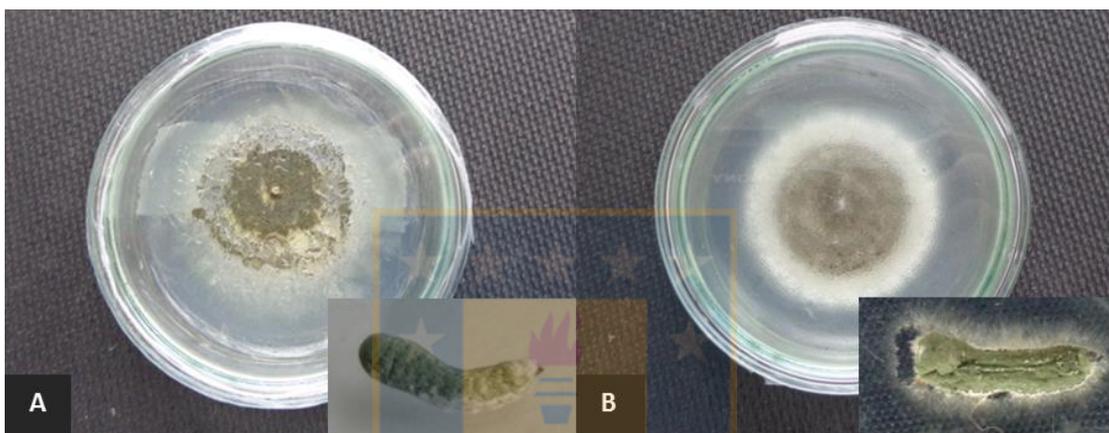
Resultados similares se observaron en larvas de *C. cerasi* al ser expuestas a hojas de perales inoculadas con aislamientos de *Metarhizium* (Qu-M221) y *Beauveria* (Qu-B323), alcanzando el 100% de mortalidad al séptimo día (Alvarez,1998) y en larvas de *C. cerasi* expuestas a hojas tratadas con *B. bassiana* a una concentración de  $1,5 \times 10^7$  conidias  $\text{mL}^{-1}$  alcanzando el 100% de mortalidad el tercer día de evaluación (Aslantas *et al*, 2008). Esto indicaría la susceptibilidad de *C. cerasi* en estado larval a la alimentación con follaje inoculado con entomopatógenos, confirmando los resultados obtenidos en esta investigación.

Otras especies de insectos minadores o defoliadores, muestran patogenicidad a cepas de *Metarhizium* y *Beauveria*, larvas de *Tuta absoluta* alimentadas con hojas inoculadas con *M. anisopliae* (Qu-M558), cuyo porcentaje de mortalidad alcanzó el 92% el octavo día de evaluación (Rodríguez *et al.*, 2006), en adultos de *Aegorhinus superciliosus* cuya mortalidad alcanzó el 100% el sexto día post-inoculación con *M. anisopliae* (Qu-M430) (France, 2002), en adultos del áfido *Nasonovia ribisnigri* que fueron expuestas a *B. bassiana* ( $1 \times 10^8$  conidias por  $\text{mL}^{-1}$ ) alcanzando el 94% de mortalidad al noveno día post-inoculación (Shrestha *et al.*, 2015).

Los primeros síntomas de las larvas de *C. cerasi* durante horas posteriores al ataque del hongo fueron: incapacidad de la larva de desplazarse y cese en la alimentación. La falta de movimiento y cese en la alimentación se podría atribuir a las micotoxinas (destruxinas) en el caso de *Metarhizium*, importantes factores de virulencia que aceleran la muerte de insectos infectados (Schrank & Henning, 2010). La proliferación de las células fungales en el cuerpo del huésped, hemocele, músculos y otros tejidos (Figura 5), colapsa el sistema inmune del insecto, lo que finalmente causa poco tiempo después la muerte del insecto (Boomsma *et al.*, 2014).

Diferentes niveles de patogenicidad se observan al evaluar los 15 aislamientos de *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana*, esto puede deberse a la especificidad que muestran algunas cepas de hongos entomopatógenos a

varias especies de insectos plaga, la importancia de esto radica en que la especificidad está relacionada a los factores de virulencia (Bidochka & Small, 2005), tales como: lipasas, proteasas y quitinasas que ayudan al ingreso del patógeno o degradan lípidos, proteínas y quitina, importantes constituyentes del huésped. Las lipasas involucradas en la degradación de la epicutícula, pueden considerarse como un elemento importante en el proceso de reconocimiento de un huésped susceptible (Schrank & Henning, 2010).



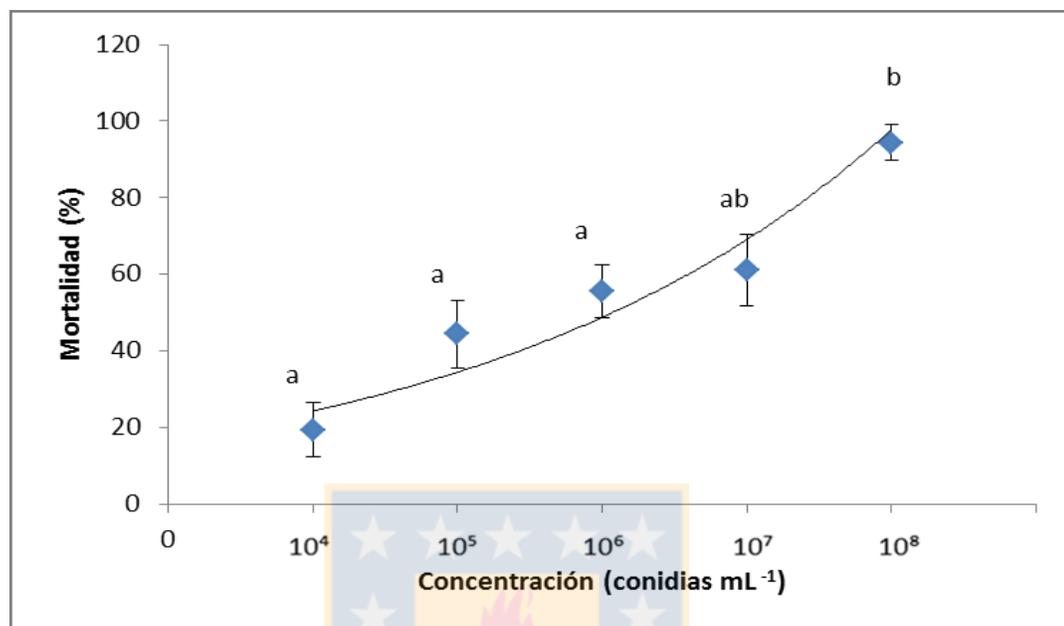
**Figura 5.** Colonización de larvas de *C. cerasi* por aislamientos patogénicos de *Metarhizium anisopliae* A. Aislamiento Qu-M592, B. Aislamiento Qu-M421.

Una de las características de las larvas de *C. cerasi*, que podrían contribuir a la patogenicidad de los aislamientos evaluados, puede atribuirse al integumento de la larva de *C. cerasi*, el cuerpo está cubierto por un fluido emitido por las glándulas dorsales que le proporcionan un aspecto húmedo y viscoso, lo que inicialmente puede ser considerado un mecanismo de defensa en contra de los depredadores (Boevé, 2009), sin embargo al desplazarse sobre la hoja inoculada con conidias, este fluido puede ayudar a la adhesión de conidias al cuerpo de larva e iniciar el proceso de infección.

#### **Evaluación de la Concentración letal CL<sub>50</sub> y CL<sub>90</sub>**

La evaluación del porcentaje de mortalidad de larvas de *C. cerasi* a las diferentes concentraciones del inóculo, corresponde al día 6 post-inoculación, donde los aislamientos Qu-M592 y Qu-M421 alcanzaron el 94% y 100% de mortalidad respectivamente. Las curvas de mortalidad construidas para los aislamientos Qu-

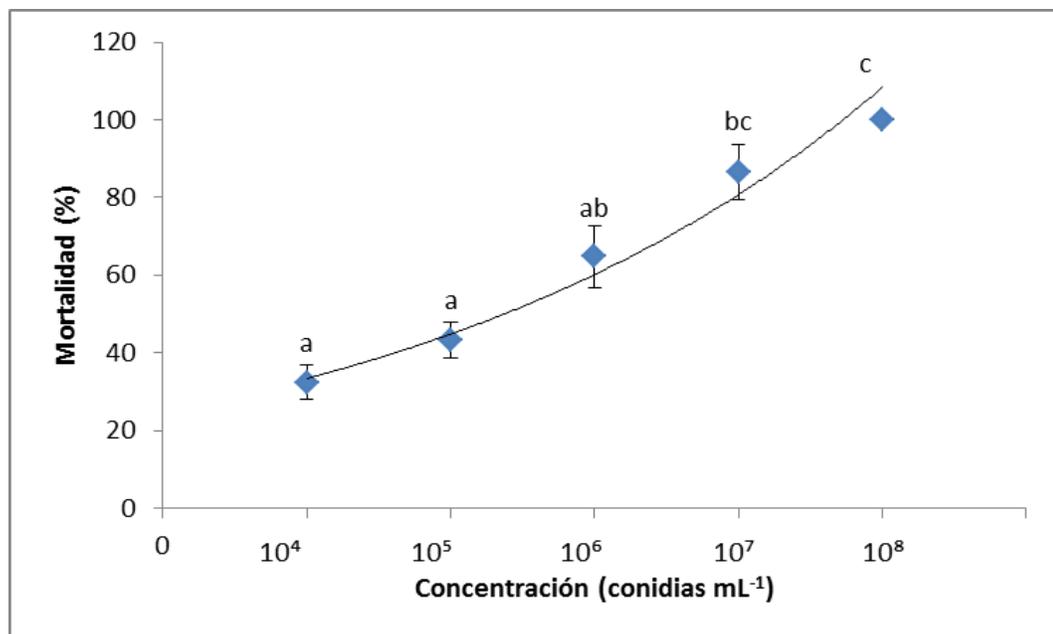
M592 y Qu-M421 a diferentes concentraciones del inóculo, se ajustaron a curvas de tipo sigmoideas (Figura 6).



**Figura 6.** Mortalidad de larvas de *Caliroa cerasi* alimentadas con diferentes concentraciones de conidias del aislamiento Qu-M592, día 6 post-inoculación. Letras distintas indican diferencias significativas con la prueba de Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

Ambas mostraron un incremento de la mortalidad con el aumento de la concentración del inóculo de  $1 \times 10^4$  a  $1 \times 10^8$  conidias mL<sup>-1</sup>. Las concentraciones  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$  y  $1 \times 10^7$  conidias por mL<sup>-1</sup> del aislamiento Qu-M592, no difieren estadísticamente entre sí, sin embargo la concentración  $1 \times 10^8$  conidias por mL<sup>-1</sup> se difirió estadísticamente del tratamiento testigo cuya mortalidad no superó el 10% al día 6 post-inoculación.

Las concentraciones  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$  conidias por mL<sup>-1</sup> del aislamiento Qu-M421, no difieren estadísticamente entre sí, sin embargo existen diferencias entre los tratamientos  $1 \times 10^7$  y  $1 \times 10^8$  conidias por mL<sup>-1</sup>, comparadas con el tratamiento testigo cuya mortalidad no supera el 8% al día 6 post-inoculación (Figura 7).

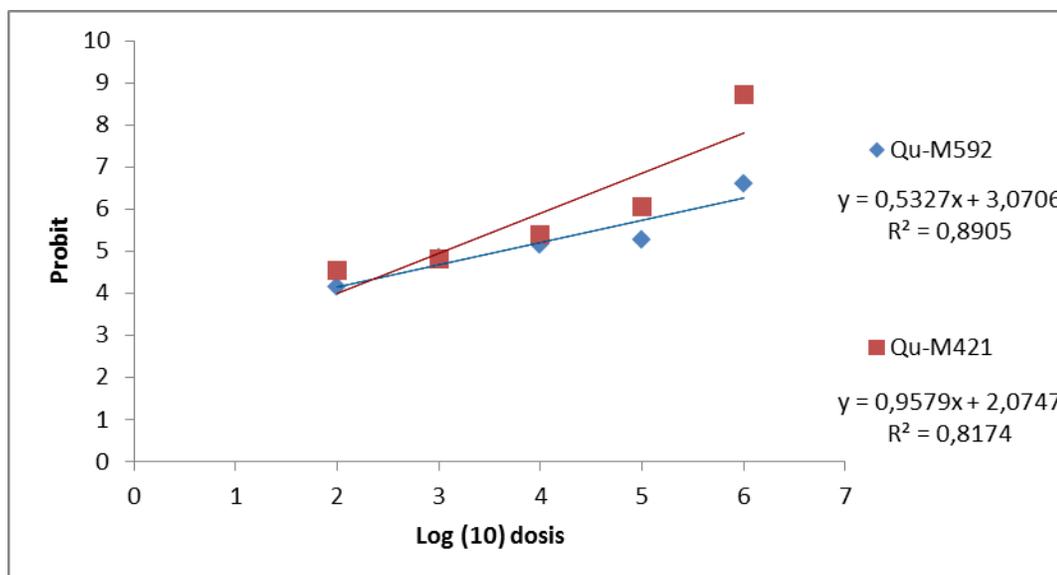


**Figura 7.** Mortalidad de larvas de *Caliroa cerasi* alimentadas con diferentes concentraciones de conidias del aislamiento Qu-M421, día 6 post-inoculación. Letras distintas indican diferencias significativas con la prueba de Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

La correlación de las regresiones lineales obtenidas mediante la transformación Probit, entre los aislamientos Qu-M592 y Qu-M421, indica que los límites de confianza para las dos concentraciones se trasladaron, es decir los valores de mortalidad para cada aislamiento no difirieron estadísticamente entre sí (Tabla 2 y Figura 8).

**Tabla 2.** Concentración letal CL<sub>50</sub> y CL<sub>90</sub> de aislamientos patogénicos a larvas de *Caliroa cerasi*.

Aislamiento	Límite Inferior	CL <sub>50</sub> (conidias mL <sup>-1</sup> )	Límite superior	Límite Inferior	CL <sub>90</sub> (conidias mL <sup>-1</sup> )	Límite superior
<b>Qu-M592</b>	$7,9 \times 10^4$	$4,1 \times 10^5$	$2,2 \times 10^6$	$1,2 \times 10^8$	$1,06 \times 10^8$	$9,3 \times 10^8$
<b>Qu-M421</b>	$2,2 \times 10^4$	$1,1 \times 10^5$	$5,6 \times 10^5$	$6,4 \times 10^5$	$2,5 \times 10^6$	$1,02 \times 10^7$

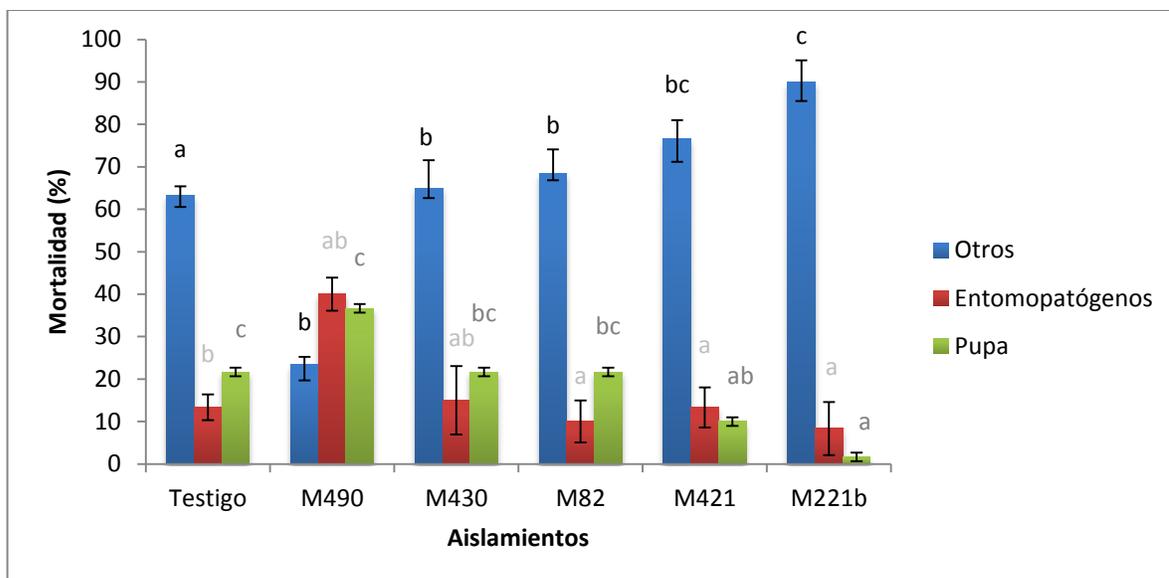


**Figura 8.** Relación entre mortalidad de larvas de *Caliroa cerasi* expresada en valores Probit y el Log de las concentraciones de los aislamientos Qu-M592 y Qu-M421.

### Evaluación del porcentaje de mortalidad en pupas de *C. cerasi* en suelo inoculado

Los suelos inoculados con los aislamientos Qu-M430, Qu-M421, Qu-M221b y Qu-M82, no superaron el 15% de mortalidad en pupas de *C. cerasi*. El aislamiento Qu-M490 presentó un 39% de mortalidad siendo el más alto porcentaje de todo el grupo, mientras que el aislamiento Qu-M221b no superó el 8%, siendo éste el más bajo de todos (Figura 9).

La mortalidad de larvas en estado de diapausa (pupas), se observa en la figura 9, causada por entomopatógenos 15 días luego de la inoculación. Los hongos entomopatógenos fueron capaces de colonizar al insecto en el interior de las cámaras pupales, la larva (L4) camina sobre suelo e ingresa en él para pupar (Carl, 1972), durante este desplazamiento puede adquirir conidias en su cuerpo que posteriormente causa la infección fungal en el interior de las cámaras pupales. El porcentaje de pupas vivas 15 días luego de la inoculación, se evaluó al encontrar larvas en estado de diapausa en el interior de las cámaras pupales totalmente sanas sin ningún signo de infección fungal o ataque producido por hongos entomopatógenos.

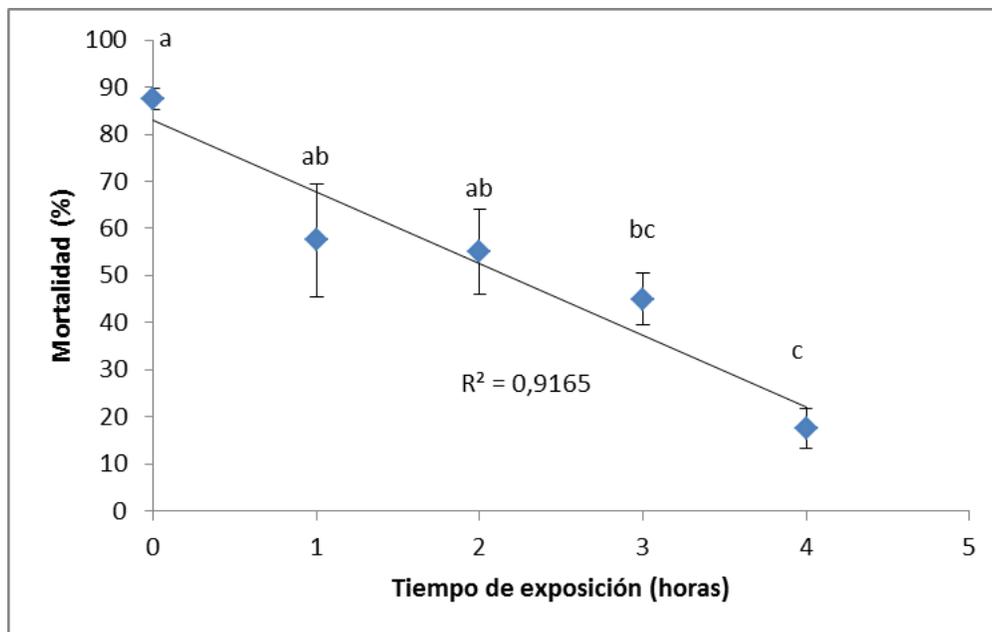


**Figura 9.** Mortalidad de *C. cerasi* en diapausa bajo suelo inoculado con hongos entomopatógenos, día 15 post-inoculación. Letras distintas indican diferencias significativas con la prueba de Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

El porcentaje de mortalidad producido por causas diferentes a la colonización por entomopatógenos, puede atribuirse a diversos microorganismos del suelo, debido a que este no fue esterilizado o larvas que mueren antes de ingresar al suelo a pupar. Factores bióticos y abióticos pueden influir en la mortalidad de pupas de *C. cerasi* en el suelo. Existen diferentes microorganismos, bacterias o protozoos que en competencia con entomopatógenos pueden colonizar las pupas. Factores abióticos como: tipo de suelo, excesiva o escasa humedad, influyen también en la mortalidad de pupas en el suelo (Carl, 1972).

#### **Evaluación de la viabilidad de conidias de *M. anisopliae* en follaje de cerezo**

La viabilidad de las conidias del aislamiento Qu-M421 se reduce al ser expuestas a radiación solar, mientras mayor es el tiempo de exposición de las conidias sobre follaje inoculado, menor es la capacidad del inóculo para matar larvas de *C. cerasi* (Figura 10). El porcentaje de mortalidad de larvas alimentadas con conidias (Qu-M421) expuestas a cuatro horas de luz solar (18%) difirió estadísticamente del porcentaje de mortalidad de larvas a la hora 0 de exposición a radiación solar.



**Figura 10.** Mortalidad de larvas de *Caliroa cerasi* expuestas a conidias de Qu-M421, previa exposición del hongo a luz solar, 4to día de evaluación del ensayo. Letras distintas indican diferencias significativas con la prueba de Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

La viabilidad de los hongos entomopatógenos aplicados en suspensiones acuosas en campo, se reduce drásticamente si se aplica durante periodos del año y horas de alta radiación solar. Similares resultados se observaron en aislamientos de *M. anisopliae* expuestos por 1 hora a radiación UVB, demostrando retraso en el porcentaje de germinación de conidias (Braga *et al*, 2001). En conidias de *Beauveria* luego de dos horas de exposición se observó un considerable retraso o una total inactivación de conidias expuestas a radiación UV-B (Fernandes *et al.*, 2007). Un estudio realizado con aplicaciones de conidias de *B. bassiana* a hojas de pasto forrajero (*Agropyron cristatum* L.) colectadas en campo, mostró una reducción del porcentaje de sobrevivencia de conidias en un 99,7 % a los 60 minutos de exposición a radiación UV-B (Inglis *et al*, 1995), en todos los casos se usó luz artificial de similar radiación a la luz natural para realizar los ensayos. En otros ensayos en campo las conidias de *B. bassiana* expuestas a radiación solar desde las 11 a.m. entre 1 p.m., fueron rápidamente inactivadas a los 60 minutos de exposición y su porcentaje de germinación se redujo del 89,4% al 2,8% (Edintong *et al.*, 2000). Evaluar la habilidad de los entomopatógenos para persistir

en el medioambiente es uno de los aspectos más importantes para el control de las plagas con agentes microbianos (Shrestha *et al.*, 2015). Estos resultados nos indican que Qu-M421 es eficaz en el control de larvas de *C. cerasi*, sin embargo su actividad patogénica fue afectada negativamente por la exposición de conidias a radiación solar, lo que se sugiere emplear una formulación que proporcione protección a la radiación UVB, si es usado en futuras investigaciones en campo como controlador biológico de *Caliroa cerasi*.

## VI. CONCLUSIONES

1. Aislamientos nativos de *Metarhizium* y *Beauveria* demostraron ser patogénicos a larvas de *C. cerasi* bajo condiciones de laboratorio.
2. El análisis de las secuencias confirmó la identificación tradicional de los aislamientos como *M. anisopliae* var. *anisopliae* (7 aislamientos), *M. anisopliae* var. *majus* (4 aislamientos) y *B. bassiana* (2 aislamientos).
3. Los aislamientos evaluados en suelo inoculado con suspensiones de conidias, no lograron control sobre pupas de *C. cerasi*.
4. Las concentraciones letales CL<sub>50</sub> y la CL<sub>90</sub> de los aislamientos Qu-M592 y Qu-M421 no difirieron entre sí.
5. Las conidias del aislamiento Qu-M421 aplicadas en suspensiones al follaje de cerezo, pierden su capacidad patogénica al ser expuestas a radiación solar.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abbott, W. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. J. Econ. Entomol. 18: 265-267
2. Álvarez, C. 1998. Control de *Caliroa cerasi* L. (Hymenoptera: Tenthredinidae) con *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana*. Tesis para optar al título de Ingeniero agrónomo Universidad Adventista Chillán, Chile.
3. Artigas, J. 1994. Entomología Económica Insectos de Interés Agrícola, Forestal, Médico y Veterinario. p. 853-855 (ed.) Universidad de Concepción. Concepción, Chile.

4. Aslantas, R., C. Eken & R. Hayat. 2008. *Beauveria bassiana* pathogenicity to the cherry slugworm, *Caliroa cerasi* (Hymenoptera: Tenthredinidae) larvae. World J. Microb. Biot. 24:119 – 122
5. Bidochka, M. & Ch. Small. 2005. Phylogeography of *Metarhizium* an Insect Patogenic Fungus. 20-50 p. Oxford University Press Inc. (ed.). Insect-Fungal Associations Ecology and Evolution. New York, USA.
6. Bischoff, J., S. Rehner & R. Humber. 2009. A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. Mycologia 101(4): 512–530
7. Boevé, J. 2009. Easily damage integument of some sawflies (Hymenoptera) is part of strategy against depredators. (p. 32) S.N. Gorb (ed.). Functional Surfaces in Biology, Belgium.
8. Boomsma, J., A. Jensen, N. Meyling & J. Eilenberg. 2014. Evolutionary Interaction Networks of Insect Pathogenic Fungi. Annu. Rev. Entomol. 59:467-85
9. Braga, G., S. Flint, Ch. Miller, A. Anderson & D. Roberts. 2001. 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
10. Carl, K. 1972. On the biology, Ecology and Population Dynamics of *Caliroa cerasi* (L.) (Hym., Tenthredinidae) Z. Ant. Ent. 71: 58-73
11. Dadasoglu, F., O. Calmasur, K. Karagoz & R. Kotan. 2014. Insecticidal effect of some bacteria on cherry slugworm (*Caliroa cerasi* Linnaeus, 1758) (Hymenoptera: Tenthredinidae). Fresen. Environ. Bull. 23: 2011-2015
12. Devotto, L., Cisternas E., Carrillo, R., and G. Marcos. 2008. Non-target effects of *Dalaca pallens* blanchard control examined through principal response curves: a guild approach in southern Chile. Chil. J. Agr. Res. 68(3): 228-237
13. Edgington, S., H., Segura, De la Rosa, W. & Williams T. 2000. Photoprotection of *Beauveria bassiana*: Testing simple formulations for control of the coffee berry borer. Int. J. Pest Manage. 46(3): 169-176
14. Farenhorts, M. 2010. Integrating fungal entomopathogens in malaria vector control. Thesis doctoral. University Wageningen, Holland.

15. Fernandes, E., D., Rangel, E. Bittencourt & D. Roberts. 2007. *Beauveria* spp. Variability in tolerance to UV-B radiation among isolates. J. Invertebr Pathol. J. 96: 237–243
16. France, A., M. Gerding, M. Gerding y A. Sandoval. 2000. Patogenicidad de una colección de cepas nativas de *Metarhizium* spp. y *Beauveria* spp. en *Aegorhinus superciliosus*, *Asynonychus cervinus* y *Otiorhynchus sulcatus*. Agric. Téc. (Chile) 60(3): 205-215
17. France, A., M. Gerding y A. Sandoval. 2002. Patogenicidad de aislamientos chilenos de *Beauveria bassiana* en adultos de *Asynonychus cervinus* (Boh.) Coleoptera: curculionidae. Chil. J. Agr. Res. 62: 489-496
18. Furlong, M. & J. Pell. 2005. Interactions between Entomopathogenic Fungi and Arthropod Natural Enemies. p. 51-52. Oxford University Press Inc. (ed.) Insect-Fungal Associations Ecology and Evolution. New York, USA.
19. Gómez, K. & A. Gómez. 1984. Statistical procedures for agricultural research. John Wiley and Sons (2da ed.). New York, USA.
20. González, R. 1989. Insectos y Ácaros de importancia agrícola y cuarentenaria en Chile. p. 214-218 Ograma (ed.). Santiago, Chile.
21. Grau, P. 2007. El Cultivo de cerezo en el secano Interior de la región del Bío Bío. Boletín INIA N°163 (ed.) Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Centro Regional de Investigación Quilamapu, Chillán Chile.
22. Hausner, G., J., Reid, G., Klassen. 1993. On the subdivision of *Ceratocystis s.l.*, based on partial ribosomal DNA sequences. Can. J. Bot. 71(1): 52–63.
23. Hayek, A. & R. Leger. 1994. Interactions between Fungal Pathogens and Insect Hosts. Annu. Rev. Entomol 39: 293-322
24. Inglis, D., M. Goettel & D. Jhonson. 1995. Influence of Ultraviolet Light Protectants on Persistence of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*. Biol. Control 5: 581-590
25. Inglis, D., G. Duke, M. Goettel, and J. Kabaluk. 2007. Genetic diversity of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* in southwestern British Columbia J Invertebr Pathol. 98: 101–113

26. Izquierdo, V. 1921. Notas sobre el huevo de *Eriocampoides limacina* ("Chape"). Rev. Chil. Hist. Nata. 25: 121-123
27. Kutinkova, H. & R. Andreev. 2004. Integrated Pest Management in sweet cherry (*Prunus avium* L.) Orchards in Bulgaria. J. Fruit. Ornam. Plant. Res. 12: 21- 47
28. Lacey, L. & D. Shapiro. 2008. Microbial Control of Insect Pests in Temperate Orchard Systems: Potential for Incorporation into IPM. Annu. Rev. Entomol. 53:121–44
29. Legger, R., B. May, L. Allee, D. Frank, R. Staples, and D. Roberts. 1992. Genetic Differences in Allozymes and in Formation of Infection Structures among Isolates of the Entomopathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae*. J. Invertebr. Pathol. 60:89-61
30. Lecuona, R.1996. Microorganismos patógenos empleados en el control microbiano de insectos plaga. (p. 100) Talleres Gráficos Mariano Mas (ed.). Buenos Aires, Argentina.
31. Louela, A., Castrillo, Donald, W., Roberts, John, D., Vandenberg. 2005. The fungal past, present, and future: Germination, ramification, and reproduction. J. Invertebr. Pathol. 89: 46–56.
32. Mareggiani, G. Bartoloni, N. Gorosito, N. Laffaye, C. 2012. Flight detection of *Caliroa cerasi* L. (Hymenoptera: Tenthredinidae) adults in the Andean Region of Parallel 42, Argentina. Bol. San. Veg. Plagas. 38: 233-238
33. Meyling, N. and J. Eilenberg. 2007. Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: Potential for conservation biological control. Biol. Control. 43:145 –155
34. Naumann, I., M. Williams & S. Schmidt. 2002. Synopsis of the Tenthredinidae (Hymenoptera) in Australia, including two newly recorded, introduced sawfly species associated with willows (*Salix* spp.). Aust. J. Entomol. 41: 1–6
35. ODEPA, 2015. Oficina de Estudios y Políticas Agrarias, Ministerio de Agricultura de Chile. Superficie plantada con frutales. <http://www.odepa.cl/superficie-de-frutales-por-region-2/> (Consulta: 1 de Abril del 2015)

36. Pereira, A., P. Casals, A. Salazar & M. Gerding. 2011. Research virulence and pre-lethal reproductive effects of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* on *Pseudococcus viburni* (Hemiptera: Pseudococcidae). *Chil. J. Agr. Res.* 71(4):554-559
37. Pino, C., Silva, G., Hepp, R., F. Venegas. 2007. Eficacia de Peak Plus® en el control de *Caliroa cerasi* (Hymenoptera: Tenthredinidae). *Cien. Inv. Agr.* 34(1): 23-29
38. Raddatz, L. & Carrillo, R. 2008. Relación de sexos en una población de chape del cerezo *Caliroa cerasi* L. (Hymenoptera: Tenthredinidae) en Valdivia. *Agro Sur* 36 3: 178 – 181
39. Rehner, S. & H. Buckley. 2005. A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1-a sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs. *Mycologia* 97(1):84-98
40. Rehner, S., A. Minnis, G. Song, J. Luangsa-ard & L. Devotto. Humber, R. 2011. Phylogeny and systematics of the anamorphic, entomopathogenic genus *Beauveria*. *Mycologia* 103(5): 1055 – 1073
41. Roberts, D. & R. Leger. 2004. *Metarhizium* spp., Cosmopolitan Insect-Pathogenic Fungi: Mycological Aspects. *Adv. Appl. Microbiol.* 54: 1-70
42. Rodríguez, M., M. Gerding y A. France. 2006. Selección de aislamientos de hongos entomopatógenos, sobre larvas de polilla del tomate *Tuta absoluta* Meyrick (Lepidoptera: Golenchiidae). *Chil. J. Agr. Res.* 66(2):159-165
43. Rodríguez, M., M. Gerding, A. France. 2006. Efectividad de los aislamientos de Hongos entomopatógenos sobre larvas de polilla del tomate *Tuta absoluta* Meyrick (Lepidoptera: Golenchiidae). *Chil. J. Agr. Res.* 66: 159-165
44. Schrank, A. & V. Henning. 2010. *Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins. *Toxicon* 56: 1267 – 1274
45. Shaw, P., D. Wallis, P., Alspach L. Brewer & V. Bus. 2004. Pear Sawfly (*Caliroa cerasi*) (Hymenoptera: Tenthredinidae) Host Preference and Larval Development on six *Pyrus* Genotypes. *New Zeal J. Crop Hort.* 32: 257- 262
46. Shrestha, G., A. Enkegaard & T. Steenberg. 2015. Laboratory and semi-field evaluation of *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) against the

lettuce aphid, *Nasonovia ribisnigri* (Hemiptera: Aphididae). Biol. Control 85 (37-45)

47. Smirle, M. & S. Wei. 1996. Effects of neem oil on feeding behaviour and development of the pear sawfly. Entomol. Exp. Appl. 80: 403-407
48. Smith D. 2003. A Synopsis of the Sawflies (Hymenoptera: Symphyta) of America South of the United States: Tenthredinidae (Nematinae, Heterarthrinae, Tenthredinidae) T. Am. Entomol. Soc. 129(1):1-45p.
49. Smith, D. 1971. Nearctic Sawflies III Heterarthrinae: Adults and Larvae (Hymenoptera: Tenthredinidae. Agricultural research service. Technical Bulletin N° 1420. (p. 15.) US. Department of Agriculture. Washington, USA.
50. Stolpe, N. 2006. Descripciones de los principales suelos de la VIII Región de Chile. p. 84. (1a. ed.) Departamento de Suelos y Recursos Naturales, Universidad de Concepción, Chile.
51. Vega, F., M. Goettel, M. Blackwell, D. Chandler, M. Jackson, S. Keller, M. et al., 2009. Fungal entomopathogens: new insights on their ecology. Fungal Ecol. 2: 149–159
52. Vega, F., N. Meyling, J. Luangsa-ard & M. Blackwell. 2012. Fungal Entomopathogens Insect Pathology. Elsevier (2da ed.). USA. 172-206p.
53. Wearing, C. 1992. *Ryania* and Pear Slug Control on Nashi. N. Z. Plant Protection New Zeland Conf. 45: 264-268
54. Wearing C.H., R.R. Marshall, B.A. Attfield and K. Colhoun. 2011. Insecticidal control and the phenology of cherryslug (*Caliroa cerasi* (L.)) (Hymenoptera: Tenthredinidae) on organic pears in Central Otago. New Zeal. J. Crop Hort. 89: 187-201
55. Webster, R. 1912. The Pear slug *Caliroa cerasi* Lin. (*Eriocampoides limacina*) Agricultural Experiment Station Iowa State College of Agriculture and Mechanic Arts. USA. Boletín N° 130: 167-193.
56. Weltz, C. & L. Vilhelmsen. 2013. The saws of sawflies: exploring the morphology of the ovipositor in Tenthredinoidea (Insecta: Hymenoptera), with emphasis on Nematinae. J. Nat. Hist. 48: 133–183

57. Zimmermann G., 2007. Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. *Biocontrol Sci. Techn.* 17(5) 6: 553-596

