

## INVESTIGACIÓN

### PATOGENICIDAD DE AISLAMIENTOS CHILENOS DE *Beauveria bassiana* EN ADULTOS DE *Asynonychus* *cervinus* (Boh.) (Coleoptera: Curculionidae)<sup>1</sup>

#### Pathogenicity of Chilean isolates of *Beauveria bassiana* to adults of *Asynonychus cervinus* (Coleoptera: Curculionidae)<sup>1</sup>

Andrés France<sup>2\*</sup>, Marcos Gerding<sup>3</sup> y Alicia Sandoval<sup>3</sup>

#### ABSTRACT

Four native isolates of *Beauveria bassiana* were evaluated for food consumption and mortality over time against adults of *Asynonychus cervinus* (Boh.) through inoculation at different concentrations (0-10<sup>8</sup> conidia mL<sup>-1</sup>). The results indicated that food intake of insects treated with *B. bassiana* decreased linearly, reducing 70% consumption after 35 days. As to mortality, no differences were observed among the four isolates, all were lethal for *A. cervinus* and the deadliness increased with the concentrations of the isolate. From the mortality curves, the lethal concentrations LC<sub>50</sub> and LC<sub>90</sub> were calculated, and the best isolate (Qu-B299) had values of 1 x 10<sup>4.7</sup> and 1 x 10<sup>8.3</sup> conidia mL<sup>-1</sup>, respectively.

**Key words:** biological control, curculionids, entomopathogens, fungi.

#### RESUMEN

Se evaluó el efecto de cuatro aislamientos nativos de *Beauveria bassiana* sobre el consumo de alimento y la mortalidad a través del tiempo de adultos de *Asynonychus cervinus*, mediante inmersión a distintas concentraciones de inóculo (0-10<sup>8</sup> conidias mL<sup>-1</sup>). Los resultados indicaron que los insectos tratados con *B. bassiana* redujeron el consumo de alimento en forma lineal, disminuyendo en 70% su consumo a los 35 días. En cuanto a la mortalidad, los cuatro aislamientos no presentaron diferencias entre ellos, todos fueron letales para *A. cervinus* y la letalidad aumentó junto a las concentraciones de inóculo. A partir de las curvas de mortalidad se calcularon las concentraciones letales CL<sub>50</sub> y CL<sub>90</sub>, donde la mejor aislación (Qu-B299) obtuvo valores de 1 x 10<sup>4.7</sup> y 1 x 10<sup>8.3</sup> conidias mL<sup>-1</sup>, respectivamente.

**Palabras clave:** control biológico, curculiónidos, entomopatógenos, hongos.

<sup>1</sup>Recepción de originales: 24 de mayo de 2001.

<sup>2</sup>Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Centro Regional de Investigaciones Quilamapu, Casilla 426, Chillán, Chile.  
E-mail: afrance@quilamapu.inia.cl \*Autor para correspondencia.

<sup>3</sup>Avenida Prat N° 275, Coihueco, Chillán.

## INTRODUCCIÓN

El capachito de los frutales, *Asynonychus cervinus* Boheman (Coleoptera: Curculionidae), es una especie polífaga y voraz consumidora de plantas ornamentales, cultivos hortícolas, diversos frutales, cultivos industriales, anuales y empastadas, entre otros (Prado, 1991; Lanteri *et al.*, 1994; Futch y Clayton, 1998).

El mayor daño causado por *A. cervinus* es provocado durante el invierno, primavera y comienzos del verano, por las larvas que se alimentan preferentemente de raicillas y tejidos radicales externos, afectando la corteza y el floema de la raíz principal. Las zonas dañadas resultan más susceptibles a la contaminación por patógenos del suelo, y las plantas son más sensibles a la sequía y tienen un crecimiento anormal. Las consecuencias pueden ser letales en plantas jóvenes, ya que al lesionar la raíz principal provocan su muerte (Artigas, 1994; Loíacono y Marvaldi, 1994).

Los adultos tienen hábito gregario en el follaje, alimentándose preferentemente de los márgenes de las hojas, brotes, tallos tiernos y flores, dejando zonas desprovistas de tejido en forma de medias lunas. Aunque el daño de los adultos se puede considerar de menor importancia, la presencia de ejemplares en productos de exportación es causal de rechazo por tratarse de una plaga cuarentenaria (Warren y Lyon, 1988; Artigas, 1994; Loíacono y Marvaldi, 1994).

Se han estudiado diversos métodos de control para esta plaga, destacándose el uso de hongos entomopatógenos como una estrategia de control biológico. Entre las especies que se están estudiando cabe destacar *Beauveria bassiana*, hongo que pertenece a la Subdivisión Deuteromycetes, Orden Moniliales (Alves, 1998), el cual se encuentra comúnmente parasitando insectos de los órdenes Lepidoptera, Coleoptera y Hemiptera (Falcon, 1985; Tanada y Kaya, 1993; Humber, 1996; Alves, 1998). *B. bassiana* se caracteriza por un micelio blanco a levemente coloreado, de

apariencia polvorienta, conidióforos simples, irregularmente agrupados en racimos y cuya parte superior tiene forma de zig-zag (Barnett y Hunter, 1998).

La existencia de una colección chilena de hongos entomopatógenos, en la cual se destacan aislamientos de *Beauveria* spp. identificados previamente como parásitos del capachito de los frutales (France *et al.*, 2000), constituye una alternativa de control biológico para esta plaga. Por consiguiente, esta investigación planteó los siguientes objetivos: evaluar el consumo de alimento en los adultos de *A. cervinus* inoculados con *B. bassiana*, determinar concentraciones letales de cuatro aislamientos de *B. bassiana* en adultos del insecto, e identificar estos cuatro aislamientos a nivel de especie.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Adultos de *A. cervinus* fueron colectados en los meses de marzo y abril de 1998 en un huerto de frambuesas (*Rubus idaeus* L.) de cuatro años de edad, ubicado en la localidad de Parral, VII Región (36°7' lat. Sur; 71°49' long. Oeste). El ensayo se realizó en el Centro Regional de Investigación Quilamapu, dependiente del Instituto de Investigaciones Agropecuarias, ubicado en la ciudad de Chillán. Los adultos se mantuvieron en una cámara de incubación a 18 °C y oscuridad y dentro de cajas plásticas con poliestireno de baja densidad como sustrato inerte, se alimentaron con hojas y brotes de frambuesas desinfectados con hipoclorito de sodio al 0,05% por 1 min y posteriormente lavados con agua destilada estéril. El alimento se suministró diariamente *ad libitum*.

Para el estudio de la concentración letal del 50 y 90% de la población (CL<sub>50</sub> y CL<sub>90</sub>), se utilizaron cuatro aislamientos de *Beauveria bassiana* (Cuadro 1) seleccionadas por su mayor letalidad a larvas de *A. cervinus* (France *et al.*, 2000). Los aislamientos fueron multiplicados en placas Petri con agar Sabouraud (AS); una vez cubiertas las placas con el hongo se colectaron las conidias y

se prepararon concentraciones de  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$  y  $10^8$  conidias  $\text{mL}^{-1}$ , en agua destilada estéril más 0,1% de humectante (Tween 20); también se incluyó como testigo agua destilada estéril con el humectante. En cada tratamiento se sumergieron cinco adultos de *A. cervinus* por 3 s, luego fueron incubados dentro de cajas plásticas con papel absorbente humedecido, y mantenidos en cámaras con temperatura de 18 °C en oscuridad (Butt y Goettel, 2000). El comportamiento de los individuos y la mortalidad se evaluó diariamente, mediante incubación de los cadáveres en cámaras húmedas, el consumo de alimento fue medido mediante el forrajeo de brotes de frambuesa desinfectados como se describió en el párrafo anterior. Diariamente se reemplazó el alimento por brotes frescos, y cada cinco días se midió la diferencia entre la cantidad proporcionada y el remanente de alimento a las 24 h como peso húmedo.

Para identificar los cuatro aislamientos de *Beauveria* a nivel de especie, se realizaron 50 mediciones de conidias y conidióforos, junto con observar las características de las colonias en medio AS (Lecuona, 1996).

El diseño del experimento fue completamente al azar con cuatro repeticiones. Los resultados de mortalidad obtenidos a diferentes concentraciones de inóculo fueron sometidos a análisis probit e interpolación desde la curva para el cálculo de la  $CL_{50}$  y  $CL_{90}$ . El efecto de distintas concentraciones de inóculo sobre la mortalidad, fue

evaluado el día que en que el primer aislamiento alcanzó 95% de mortalidad. El consumo de alimento de los insectos tratados con diferentes aislamientos fue medido en forma acumulativa sobre la misma unidad experimental, por lo cual fueron analizados como observaciones correlacionadas que perdieron su independencia, impidiendo el análisis probit. En reemplazo se utilizó la distribución de Weibull, función que describe la tendencia a través del tiempo para datos correlacionados (Marcus e Eaves, 2000), calculándose el tiempo para alcanzar el 50% del consumo ( $TA_{50}$ ) y sus respectivos intervalos de confianza.

La comparación entre las curvas de mortalidad para las diferentes concentraciones de inóculo, se realizó mediante un análisis de varianza de las pendientes de las regresiones obtenidas de cada repetición. El tratamiento testigo no se incluyó en el análisis de varianza, debido a que no presentó mortalidad durante el tiempo que duró el ensayo. Los análisis se realizaron con el programa estadístico Minitab 13 (Minitab Inc., State Collage, Pennsylvania, USA).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los primeros síntomas que presentaron los adultos de *A. cervinus* tratados con los cuatro aislamientos de *Beauveria*, fueron el menor consumo de alimento y disminución de sus movimientos. Esto pudo deberse a que este hongo se caracteriza por producir toxinas, tales como bassianolide y beauvericinas, que actúan como inhibidoras de

**Cuadro 1. Origen de los aislamientos de *Beauveria bassiana* utilizados en los ensayos**

**Table 1. Origin of the *Beauveria bassiana* isolates used in the experiment**

Aislamiento	Lugar	Localidad	Coordenadas geográficas (lat. Sur; long. Oeste)
Qu-B179	Pumanzano	Chiloé, X Región	41°53'; 73°45'
Qu-B299	Lago Chungará	Arica, I Región	18°15'; 69°13'
Qu-B314	Santa Lucía Alto	Yungay, VIII Región	37°06'; 72°00'
Qu-B323	Río Chaca	Arica, I Región	18°18'; 70°11'

las reacciones de defensa del hospedero, destruyen la hemolinfa y núcleos de las células (Tanada y Kaya, 1993; Lecuona, 1996; Alves, 1998).

El consumo de alimento de los insectos tratados con la concentración de  $10^5$  conidias  $\text{mL}^{-1}$  de *Beauveria* (concentración equivalente al  $\text{CL}_{50}$ ) mostró una tendencia lineal decreciente para los cuatro aislamientos seleccionados (Figura 1). Esta disminución se hizo estadísticamente diferente ( $P \leq 0,05$ ), con respecto al testigo, al cabo de 10 días postinoculación. Luego de 35 días postinoculación, las diferencias entre el tratamiento testigo y aquellas inoculadas con *Beauveria* fueron en promedio 70% menos de consumo de alimento (Figura 1). El 50% de disminución en el consumo de alimento ( $\text{TA}_{50}$ ) se alcanzó aproximadamente a los 20 días de tratados los insectos, incluido el testigo, sin embargo, el consumo promedio al tiempo  $\text{TA}_{50}$  ( $\text{CA}_{50}$ ) fue noto-

riamente diferente entre el testigo y los insectos tratados con *B. bassiana*, los que disminuyeron en promedio 58% su consumo diario de alimento (Cuadro 2). El modelo de Weibull indicó que no existieron diferencias entre los aislamientos de *B. bassiana*, pero sí con el testigo, el cual fue el único tratamiento que no traslapó sus límites de confianza (95%). La disminución del consumo de alimento en el tratamiento testigo se debió, probablemente, al envejecimiento de los insectos, ya que el testigo no presentó mortalidad durante el ensayo.

El menor consumo de alimento pudo deberse al daño que causa *Beauveria*, tanto en el sistema circulatorio como en el digestivo. En el primero, *Beauveria* puede utilizar la hemolinfa como sustrato, la que representa de 10 a 40% del peso de la mayoría de los insectos. En el sistema digestivo se producen problemas tales como

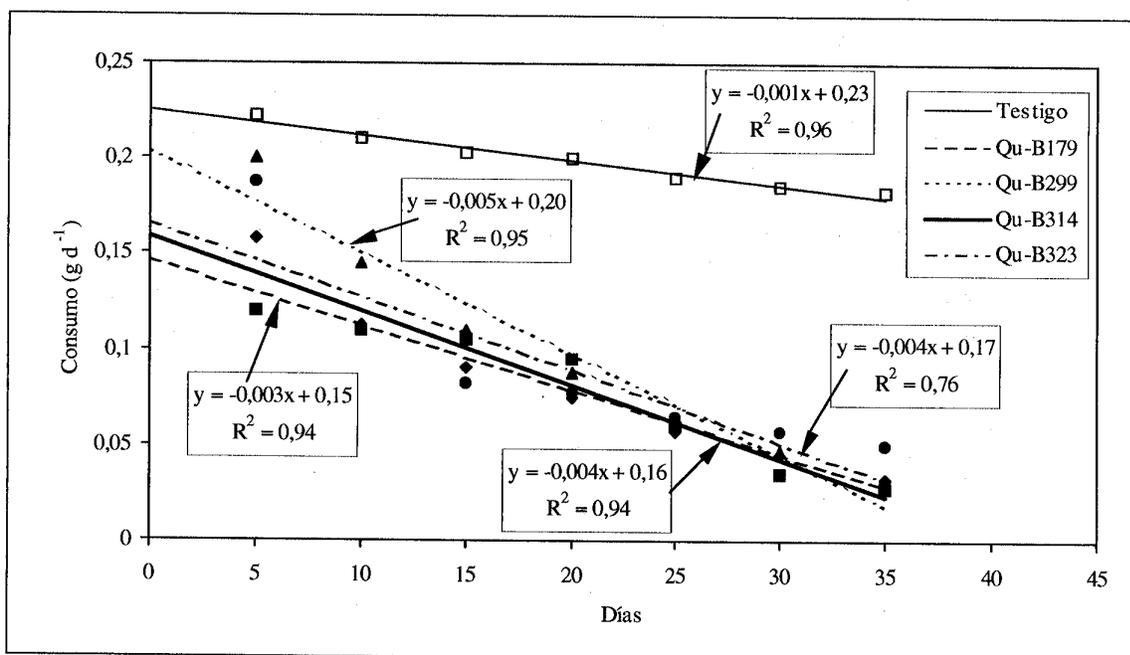


Figura 1. Consumo promedio de hojas de frambuesa (peso húmedo) a través del tiempo por adulto de *Asynonychus cervinus* tratado con  $10^5$  conidias  $\text{mL}^{-1}$  de *Beauveria bassiana*. Aislamientos Qu-B179, Qu-B299, Qu-B314, Qu-B323 y Testigo.

Figure 1. Average fresh raspberry leaf consumption (fresh weight) over time per adult of *Asynonychus cervinus* treated with *Beauveria bassiana* ( $10^5$  conidia  $\text{mL}^{-1}$ ). Isolates Qu-B179, Qu-B299, Qu-B314, Qu-B323 and Control.

**Cuadro 2. Tiempo para alcanzar el 50% de consumo de alimentos (TA<sub>50</sub>), consumo diario de alimento al tiempo TA<sub>50</sub> (CA<sub>50</sub>) y límites de confianza para CA<sub>50</sub> de *Asynonychus cervinus* tratados con diferentes aislamientos de *Beauveria bassiana***

**Table 2. Time to reach 50% of food consumption (TA<sub>50</sub>), daily food consumption at TA<sub>50</sub> time (CA<sub>50</sub>), and upper and lower confidence limits for the CA<sub>50</sub> of *Asynonychus cervinus* treated with different *Beauveria bassiana* isolates**

Aislamiento	TA <sub>50</sub> (días)	CA <sub>50</sub> (g d <sup>-1</sup> )	Límites de confianza (95%)	
			Superior	Inferior
Testigo	19,23	0,20	0,19	0,21
Qu-B179	20,11	0,08	0,06	0,11
Qu-B299	21,34	0,09	0,06	0,15
Qu-B314	21,05	0,08	0,05	0,12
Qu-B323	20,99	0,09	0,06	0,13

regurgitación, diarreas y pérdida de apetito. Otro efecto se presenta en el sistema respiratorio, donde se obstruyen los espiráculos del insecto, lo que causa un aumento del consumo de energía para mantener la tasa de respiración (Alves, 1998).

Para evaluar el porcentaje de mortalidad a distintas concentraciones de inóculo, se utilizaron los resultados del día 35 postinoculación, debido a que fue el primer día que se alcanzó 95% de mortalidad con uno de los tratamientos (10<sup>8</sup> conidias mL<sup>-1</sup> de Qu-B179). Los cuatro aislamientos estudiados mostraron una tendencia lineal respecto a la mortalidad, la cual fue directamente proporcional a la concentración de inóculo (Figura 2). Además, estos aislamientos no mostraron diferencias ( $P \leq 0,05$ ) entre ellos en cuanto a mortalidad inicial y tasas de mortalidad. El testigo no presentó mortalidad mientras duró el experimento.

Utilizando las regresiones de la Figura 2, se obtuvieron como resultado valores promedios para la CL<sub>50</sub> entre  $1 \times 10^{4,8}$  y  $1 \times 10^{5,2}$  conidias mL<sup>-1</sup> para los cuatro aislamientos, en tanto la CL<sub>90</sub> requirió entre  $1 \times 10^{8,3}$  y  $1 \times 10^{9,2}$  conidias mL<sup>-1</sup> (Cuadro 3). El aislamiento Qu-B299 requirió la menor concentración de inóculo para eliminar 50% de la población tratada. Sin embargo,

el análisis de las pendientes indicó que no existieron diferencias estadísticas entre los distintos aislamientos (Cuadro 3).

Todos los adultos muertos e incubados en cámara húmeda presentaron signos del hongo luego de 72 h, los que se manifestaron a través de un micelio blanco algodonoso emergido a través de la unión de los élitros. Transcurridos cinco días de muertos se observó esporulación a través de conidióforos que cubrieron totalmente la superficie corporal de cada insecto parasitado, los cuales fueron semejantes al de los aislamientos de *Beauveria* inoculados. Estos signos fueron similares a lo observado por otros autores y para diferentes hospederos (Vasicek *et al.*, 1995; Alves, 1998).

En estudios similares realizados en condiciones de laboratorio con coleópteros (Vasicek *et al.*, 1995), se encontró 92% de mortalidad de insectos tratados con *B. bassiana* en concentración de  $2,3 \times 10^6$  conidias mL<sup>-1</sup>. Gerding *et al.* (2000) encontraron resultados similares con aislamientos chilenos de *Metarhizium* para el control de *Otiiorhynchus sulcatus* (gorgojo de la frutilla), donde la CL<sub>50</sub> fluctuó entre 6,5 y 7,9 conidias mL<sup>-1</sup>. Esta alta mortalidad observada en condiciones de laboratorio, no siempre es equivalente a la obtenida en condiciones de campo, donde la

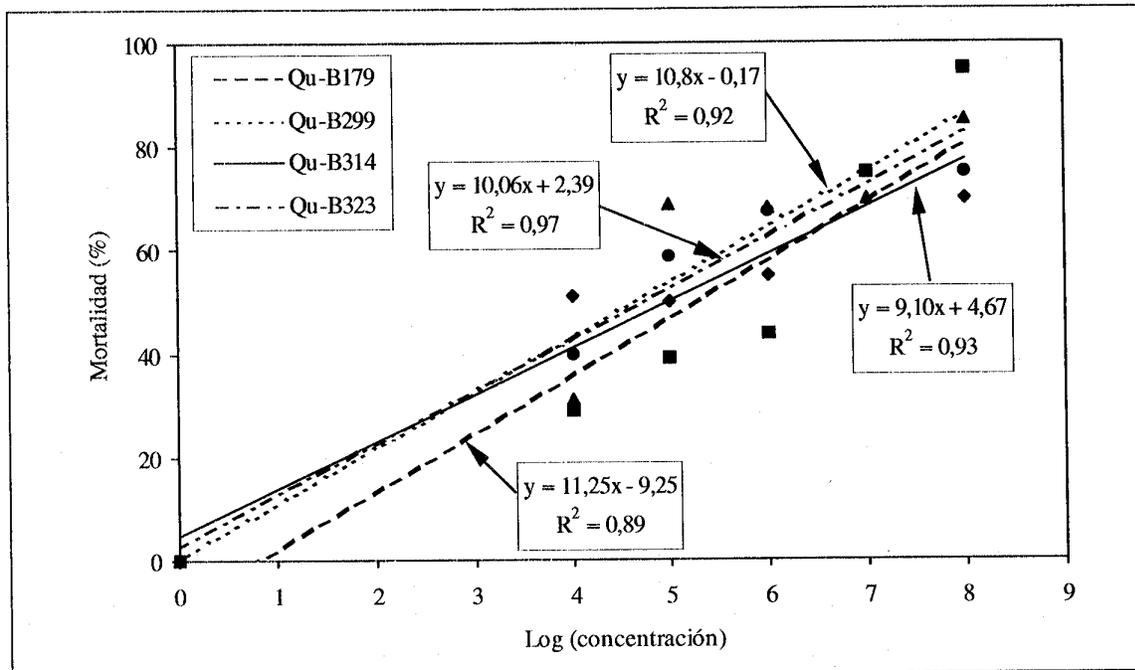


Figura 2. Mortalidad de adultos de *Asynonychus cervinus* 35 días después de tratados con distintas concentraciones de *Beauveria bassiana*. Aislamientos Qu-B179, Qu-B299, Qu-B314 y Qu-B323.

Figure 2. Mortality of *Asynonychus cervinus* adults 35 days after treatment with distinct concentrations of *Beauveria bassiana*. Isolates Qu-B179, Qu-B299, Qu-B314 and Qu-B323.

Cuadro 3. Pendiente de las regresiones de mortalidad por concentración, y concentraciones letales de cuatro aislamientos de *Beauveria bassiana* para matar el 50 (CL<sub>50</sub>) y 90% (CL<sub>90</sub>) de la población de *Asynonychus cervinus*

Table 3. Regression slope of mortality by concentration, and lethal concentration of four *Beauveria bassiana* isolates to kill 50 (CL<sub>50</sub>) and 90% (CL<sub>90</sub>) of *Asynonychus cervinus* population

Aislamiento	Pendiente <sup>1</sup>	CL <sub>50</sub> log (conidias mL <sup>-1</sup> )	CL <sub>90</sub> log (conidias mL <sup>-1</sup> )
Qu-B179	11,25 NS	5,18 (± 2,23) <sup>1</sup>	8,85
Qu-B299	10,80	4,69 (± 1,67)	8,31
Qu-B314	9,10	4,76 (± 0,67)	9,16
Qu-B323	10,06	5,14 (± 0,90)	8,69

<sup>1</sup>Los valores de pendientes corresponden a porcentaje de mortalidad por log (concentración).

CL<sub>50</sub> evaluado al día 35 postinoculación.

Valores entre paréntesis indican intervalos de confianza de CL<sub>50</sub> (P ≤ 0,05).

NS: no significativo.

cantidad de inóculo que atrapa el insecto es menor; además influyen las condiciones meteorológicas (Alves, 1998).

Los cuatro aislamientos fueron identificados como *B. bassiana*, las dimensiones de sus conidias fluctuaron en promedio entre 2,32 y 2,42 μm de largo, y 2,00 a 2,20 μm de ancho,

mientras que los conidióforos fueron simples, de base globosa, irregularmente agrupados en racimos, cuyas mediciones variaron entre 8,20 a 9,20  $\mu\text{m}$  para la parte más ancha del conidióforo. La parte superior del conidióforo o raquis presentó forma de zig-zag, con un largo de 4,00 a 5,35  $\mu\text{m}$  para los distintos aislamientos (Cuadro 4). Estas medidas junto con las características macroscópicas de las colonias, tales como crecimiento circular formando anillos concéntricos, la presencia de un micelio compacto, rastrero, de apariencia polvorienta y de color blanco a levemente rosado, fueron semejantes a las mencionadas en las claves de Samson *et al.* (1988), Humber (1996) y Barnett y Hunter (1998) para *B. bassiana*.

Cabe destacar que la temperatura de incubación en los ensayos fue de 18 °C, obteniéndose altos porcentajes de mortalidad. Sin embargo, Alves (1998) señaló que la temperatura óptima para el

crecimiento de *Beauveria* varía entre 23 y 28 °C, lo que podría indicar que con temperaturas más altas que las del ensayo se podrían obtener diferentes resultados respecto a la  $CL_{50}$  y  $CL_{90}$ , ya que se favorecería la germinación y crecimiento del hongo. Sin embargo, también es útil contar con aislamientos patogénicos a bajas temperaturas, lo que permitiría su uso en las condiciones más frías del sur de Chile.

Los resultados de este trabajo pueden ser de utilidad para implementar un sistema de control biológico de esta plaga, que ha venido adquiriendo mayor importancia en los cultivos y plantaciones frutales de la zona centrosur y sur de Chile. Sin embargo, nuevas pruebas deben ser realizadas en condiciones de campo para establecer concentraciones óptimas y las condiciones en las cuales pueden ser diseminados estos hongos benéficos.

**Cuadro 4. Dimensiones promedios ( $\mu\text{m}$ ) de conidias y conidióforos de los cuatro aislamientos seleccionados de *Beauveria bassiana***

**Table 4. Average measurements ( $\mu\text{m}$ ) of conidia and conidiophore of the four selected *Beauveria bassiana* isolates**

Aislamiento	Conidias		Conidióforo	
	Largo	Ancho	Base	Largo
Qu-B179	2,42 ( $\pm$ 0,49)	2,00 ( $\pm$ 0,57)	8,95 ( $\pm$ 3,84)	4,00 ( $\pm$ 1,43)
Qu-B299	2,40 ( $\pm$ 0,63)	2,20 ( $\pm$ 0,59)	8,20 ( $\pm$ 3,76)	4,70 ( $\pm$ 1,87)
Qu-B314	2,36 ( $\pm$ 0,52)	2,00 ( $\pm$ 0,41)	9,20 ( $\pm$ 3,48)	4,40 ( $\pm$ 1,86)
Qu-B323	2,32 ( $\pm$ 0,59)	2,00 ( $\pm$ 0,49)	8,55 ( $\pm$ 3,68)	5,35 ( $\pm$ 2,14)

## CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos en las pruebas de inoculación, se puede concluir que los cuatro aislamientos de *Beauveria* utilizados fueron similares en su capacidad para disminuir el consumo de alimentos de adultos de *Asynonychus cervinus*. Comparados con insectos sin inocular, estos aislamientos lograron disminuir el consumo de brotes de frambuesa, en promedio,

30% a los 10 días y 70% a los 35 días postinoculación. Además, estas cuatro cepas produjeron mortalidad de los adultos a tasas de 10% a medida que se aumentó en forma logarítmica la concentración de inóculo, lográndose  $CL_{50}$  de  $1 \times 10^{4,7}$  conidias  $\text{mL}^{-1}$  cuando se utilizó el aislamiento Qu-B299. Los cuatro aislamientos resultaron ser la especie *Beauveria bassiana*, de acuerdo a su morfometría y características de crecimiento.

## LITERATURA CITADA

- Alves, S. 1998. Fungos entomopatogénicos. p. 289-381. In B. Alves (ed.). Controle microbiano de insetos. 2<sup>nd</sup> ed. Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, Piracicaba, Brazil.
- Artigas, J. 1994. Entomología económica. 943 p. Ediciones Universidad de Concepción, Concepción, Chile.
- Barnett, H., and B. Hunter. 1998. Illustrated genera of imperfect fungi. 218 p. 3<sup>rd</sup> ed. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA.
- Butt, T., and M. Goettel. 2000. Biossays of entomopathogenic fungi. p. 141-196. In A. Navon and K. Ascher (eds.). Biossays of entomopathogenic microbes and nematodes. CABI Publishing, Wallingford, UK.
- Falcon, L. 1985. Development and use of microbial insecticides. p. 229-242. In Biological Control in Agricultural IPM Systems. Academic Press, London, UK.
- France, A., M. Gerding G., M. Gerding P., 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*. Agricultura Técnica (Chile) 60:205-215.
- Futch, S., and M. Clayton. 1998. Citrus root weevils. Available in: <http://hammock.ifas.ufl.edu/Txt/fairs/197050>. Accessed: August 15, 1998.
- Gerding G., M., A. France, y M. Gerding P. 2000. Evaluación de cepas de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* sobre *Otiorhynchus sulcatus* Fab. (Coleoptera: Curculionidae). Agricultura Técnica (Chile) 60:216-221.
- Humber, R. 1996. Fungi: Identification. p. 153-185. In L. Lacey (ed.). Manual of techniques in insect pathology. Academic Press, New York, USA.
- Lanteri, A., N. Díaz, y J. Morrone. 1994. Identificación de las especies. p. 26-40. In A. Lanteri (ed.). Bases para el control integrado de los gorgojos de la alfalfa. De la Campana Ediciones, Buenos Aires, Argentina.
- Lecuona, R. 1996. Microorganismos patógenos empleados en el control microbiano de insectos plaga. 338 p. Talleres Gráficos Mariano Mas, Buenos Aires, Argentina.
- Loiácono, M., y A. Marvaldi. 1994. Biología y daños ocasionados. p. 49-56. In A. Lanteri (ed.). Bases para el control integrado de los gorgojos de la alfalfa. De la Campana Ediciones, Buenos Aires, Argentina.
- Marcus, R., and D. Eaves. 2000. Statistical and computational analysis of biossay data. p. 249-293. In A. Navon and K. Ascher (eds.). Biossays of entomopathogenic microbes and nematodes. CABI Publishing, Wallingford, UK.
- Prado, E. 1991. Artrópodos y sus enemigos naturales asociados a plantas cultivadas en Chile. Serie Boletín Técnico N° 169. 207 p. Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Santiago, Chile.
- Samson, R., H. Evans, and J. Latgé. 1988. Atlas of entomopathogenic fungi. 187 p. Springer-Verlag, New York, USA.
- Tanada, Y., and H. Kaya. 1993. Insect pathology. 666 p. Academic Press, New York, USA.
- Vasicek, A., G. Dal Bello, y N. Battaglino. 1995. El entomopatógeno *Beauveria bassiana* como potencial agente biocontrolador del coleóptero *Xanthogaleruca luteola* (Müller). Boletín Micológico 10:13-17.
- Warren, T., and H. Lyon. 1988. Insects that feed on trees and shrubs. 556 p. 2<sup>nd</sup> ed. Cornell University Press, New York, USA.