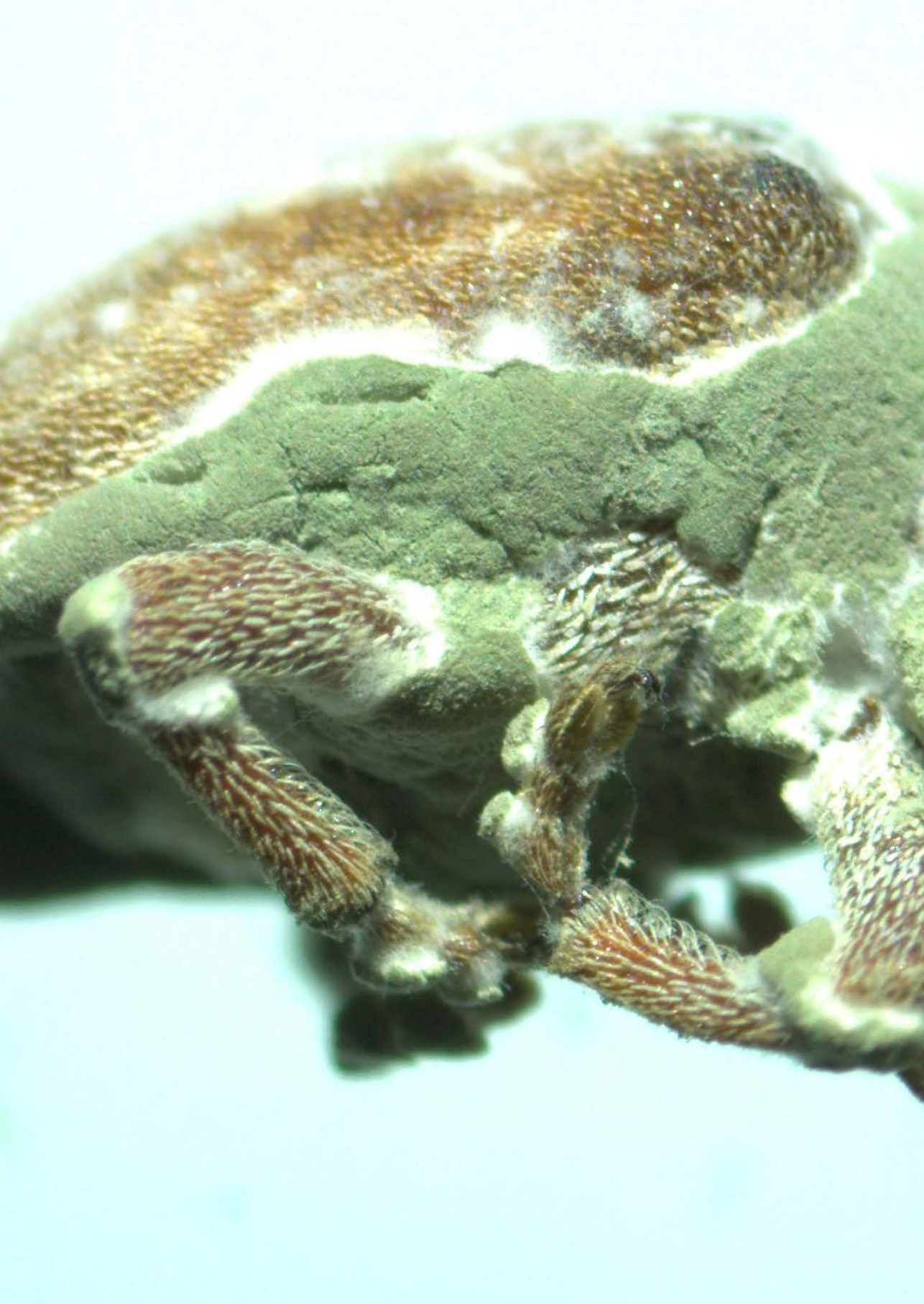




Capítulo IV

Control de calidad de la actividad biológica contra insectos

Lisette Torres Torres

La evaluación de la actividad biológica es, quizá, la herramienta más importante en el control de calidad durante el desarrollo y la producción de un bioplaguicida, la cual involucra la estandarización de bioensayos para determinar su eficacia en condiciones controladas teniendo en cuenta la definición de ciertos criterios.

Además de los controles de calidad microbiológicos y fisicoquímicos que se deben realizar durante las diferentes etapas de desarrollo de un bioplaguicida (incluidos los del producto terminado), se debe evaluar su actividad biológica en condiciones controladas mediante el montaje de bioensayos. Debido al gran número de especies de insectos susceptibles a varios agentes biológicos de control, las metodologías de evaluación de su actividad varían considerablemente (Lacey, 2017). Por tal razón, estas se deben diseñar y estandarizar teniendo en cuenta varios criterios que aseguran la precisión de cada prueba. Estos incluyen los biológicos (Rasenberg, 2011), de evaluación, estadísticos y de aseguramiento de los resultados.

Criterios biológicos

Dentro de los criterios biológicos que se deben tener en cuenta en el control de calidad de un bioplaguicida se encuentran varios aspectos relacionados con el insecto plaga y con el agente de control biológico.

Con relación al insecto plaga

Los insectos constituyen el grupo más dominante de la tierra y han establecido una relación estrecha con el hombre. En algunos casos le han aportado importantes beneficios al ser humano e, incluso, han ocasionado afecciones en su salud y grandes pérdidas económicas, como es el caso de las plagas con importancia agrícola (Borrór et al., 1992).

Ante esta gran diversidad es necesario conocer los hábitos de los insectos plaga, los cuales se relacionan y se determinan por las características de su aparato bucal en diferentes etapas de desarrollo. Es así como existen insectos con comportamiento barrenador, los cuales penetran el ápice de la planta y desarrollan su ciclo dentro de esta de forma total o parcial. Tal es el caso de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae), la plaga de mayor importancia económica en el cultivo de la caña de azúcar. En estado larval, este insecto se alimenta dentro de los tallos y construye galerías (Vargas & Gómez, 2005). También existen los insectos de hábitos cortadores en estado larval, como el gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) (López-Ávila, 1981) y el insecto polífago *Erinnyis ello* (Lepidoptera: Sphingidae), conocido comúnmente como “gusano cachón” (Bellotti et al., 1989). Asimismo, se destacan insectos como *Cerotoma tingomariana* (Coleoptera: Chrysomelidae), cuyos adultos se alimentan del follaje y vainas de la soya y sus larvas de hábitos rizófagos afectan las raíces y su nodulación (León & Guevara, 2006). Dentro de las plagas con hábito perforador y minador, se destaca el gusano cogollero del tomate *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). Las larvas son capaces de comer todo el mesófilo de la hoja, dejan solo su epidermis; las galerías son superficies más o menos amplias donde a contraluz se puede observar la larva. Adicionalmente, es capaz de perforar el tallo y generar daños en brotes, sobre todo en las inserciones de las hojas o pedúnculos y en aquellos más tiernos. Los frutos pueden ser afectados desde el momento en que comienza el cuajado, antes de la maduración (Hurtado, 2012). Algunos ejemplos de insectos con hábito chupador son las moscas blancas *Bemisia tabaci* y *Trialeurodes vaporariorum* (Hemiptera: Aleyrodidae). Estos insectos fitófagos afectan diferentes especies de plantas, entre

ellas, herbáceas, arbustos, árboles, plantas silvestres y cultivos de importancia económica. En ocasiones estos insectos se convierten en un serio problema debido a daños directos que ocasionan cuando sus ninfas succionan la savia y se convierten en transmisores de virus. También causan daños indirectos por la excreción de sustancias azucaradas, que ocasiona la formación de fumagina en las hojas (Carapia-Ruiz & Castillo-Gutiérrez, 2013) (figura 4.1).

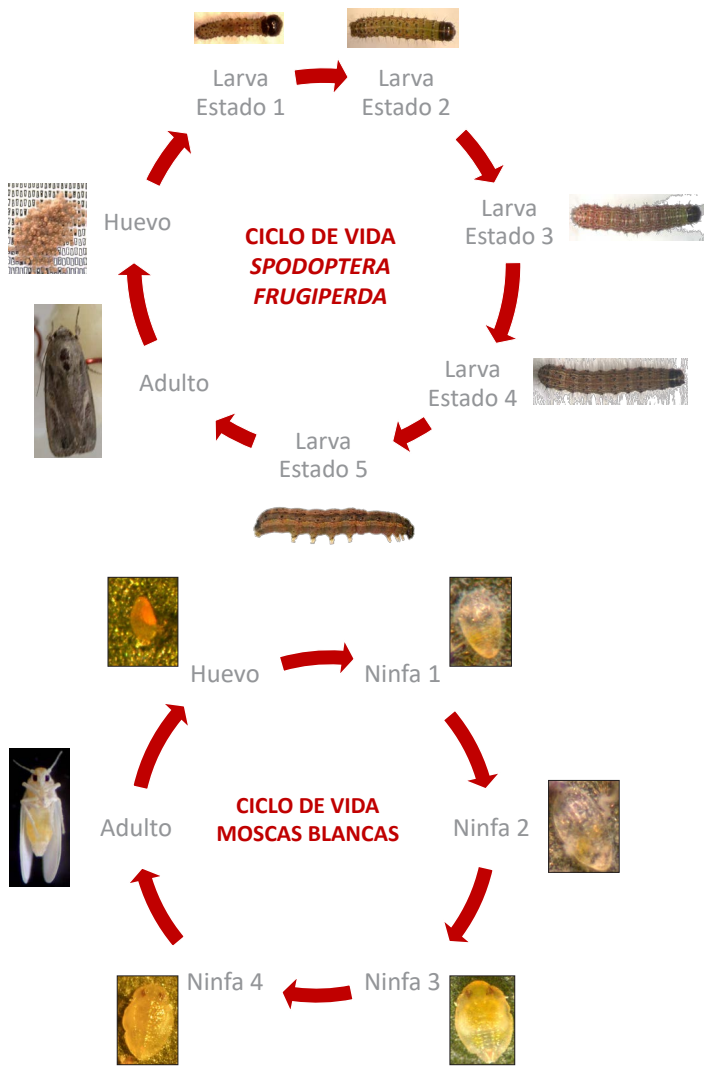


Fotos: Carlos Espinel Correia y Lissette Torres Torres

Figura 4.1. Hábitos de insectos plaga. a. *S. frugiperda*, insecto cortador; b. *Tuta absoluta*, insecto perforador y minador; c. *T. vaporariorum*, insecto chupador.

Además de la identificación de los hábitos del insecto a controlar, es necesario conocer su ciclo de vida, identificar cada estado de desarrollo, su duración y las condiciones medioambientales requeridas. La metamorfosis es un proceso de transformación que ocurre en los insectos durante su desarrollo hasta llegar al estado adulto. Existen insectos que tienen una metamorfosis completa (holometábolos), los cuales pasan por los estados de larva, pupa y adulto. Las larvas de diferente estadio usualmente son iguales en forma, pero difieren en tamaño; no tienen ojos, pueden o no tener patas torácicas y presentan apéndices bucales masticadores. Las alas, cuando están presentes en los adultos, se desarrollan internamente durante el estado

larval y no emergen sino hasta el final de este estado para transformarse en pupa, donde el insecto no se alimenta y permanece inactivo hasta convertirse en adulto. Algunos ejemplos de esta clase de insectos son los lepidópteros y los coleópteros. Por otra parte, existen los insectos con metamorfosis incompleta (hemimetábolos), cuyos estados juveniles o iniciales se denominan ninfas y usualmente son muy similares a los adultos, como es el caso de las moscas blancas y de los ortópteros (Borrór et al., 1992) (figura 4.2).



Fotos: Carlos Espinel Correal

Figura 4.2. Ciclos de vida de los insectos de acuerdo al tipo de metamorfosis. a. Ciclo de vida de un insecto holometábolo; b. Ciclo de vida de un insecto hemimetábolo.

Fuente: Elaboración propia

Una vez se conozca el ciclo de vida del insecto plaga a controlar, sus estados de desarrollo y su impacto en un cultivo específico, es necesario identificar y definir aquel o aquellos más susceptibles al agente biológico de control (hongos, bacterias o virus) a evaluar. Para ello es necesario tener en cuenta los reportes bibliográficos, así como las observaciones que se hagan en campo o durante el proceso experimental.

Los grupos de hongos más importantes usados para el control de plagas son los pertenecientes a la división Entomophthoromycota y al orden Hypocreales. A este último grupo pertenecen los géneros *Lecanicillium*, *Aschersonia*, *Beauveria*, *Isaria* y *Metarhizium*. Dichos géneros afectan diferentes insectos como hemípteros, coleópteros, lepidópteros, ortópteros, formícidos y dípteros en diferentes estados de desarrollo (Lacey, 2017; Marín-Cruz et al., 2017; Malarvannan et al., 2010). Dentro de las bacterias entomopatógenas se destacan el bacilo grampositivo formador de esporas *Bacillus thuringiensis* (Bacillales: Bacillaceae), utilizado para el control de lepidópteros y dípteros y el bacilo gramnegativo no formador de esporas *Serratia entomophila* (Enterobacteriales: Enterobacteriaceae), utilizado para el control del coleóptero *Costelytra zealandica* (Coleoptera: Scarabaeidae) (Lacey, 2017). Con respecto a los virus entomopatógenos, se encuentran las familias Ascoviridae, Iridoviridae y Baculoviridae. Esta última es la más numerosa y ampliamente estudiada, con casos exitosos en el control de lepidópteros, dípteros e himenópteros (Robernann, 2011, citado por Villamizar et al., 2018).

Otro aspecto muy importante que se debe tener en cuenta para la evaluación de la actividad biológica de agentes de control, es la facilidad en la consecución de los insectos blanco en los estados de desarrollo, tiempos, cantidades y frecuencias requeridas. Estos pueden provenir directamente de campo o de crías masivas mantenidas bajo condiciones controladas. En el primer caso, es necesario mantener a los insectos recolectados bajo condiciones de cuarentena mínimo una semana antes del montaje de los bioensayos. De esta manera se garantiza en cierta medida que estos estén libres de patógenos y enfermedades, con lo cual se reduce el riesgo de obtener resultados poco confiables. Por otra parte, la cría masiva de insectos ofrece grandes ventajas, no solo garantiza que estos estén sanos, sino que presenten homogeneidad en sus características morfológicas, fisiológicas y nutricionales; lo cual es ideal en procesos de investigación y análisis rutinarios de control de calidad (Jenkins & Grzywacz, 2000). Sin embargo, cuando la consecución de los insectos blanco es una limitante debido a la dificultad en su recolección en campo o en el establecimiento de crías, se deben diseñar y estandarizar metodologías que incluyan el uso de insectos alternos. Estos deben tener ciclos cortos de desarrollo (Cohen, 2004), deben ser de fácil colecta, se

deben desarrollar en dietas artificiales y las condiciones ambientales para su desarrollo y reproducción deben ser manejables (Portilla & Street, 2006; Cohen, 2004). Adicionalmente, deben ser susceptibles al agente biocontrolador en cuestión (Sewify et al., 2014).

Por citar un ejemplo, *Cerotoma tingomariana* es un insecto plaga de gran impacto económico en el cultivo de soya. Ante esta problemática, el hongo *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Cordycipitaceae) se ha convertido en un candidato promisorio para su control. Sin embargo, debido a que esta plaga está muy asociada al cultivo de soya, el cual es de carácter rotacional (Valencia & Ligarreto, 2010), no se puede garantizar su consecución permanente y suficiente en los momentos requeridos. Además, debido a que no hay una dieta artificial disponible para esta especie de crisomélido que permita su establecimiento en condiciones controladas, para AGROSAVIA surgió la necesidad de evaluar este agente de control sobre insectos alternos, por lo cual se seleccionó a *Chloridea virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) (Torres et al., 2020).

Con relación al agente de control

Mecanismos de acción

Los mecanismos de acción del agente de control dependen de su naturaleza, es así como los hongos entomopatógenos actúan por contacto con su hospedero, mientras que los virus y las bacterias actúan luego de su ingestión.

La infección natural de un hongo entomopatógeno comienza cuando este entra en contacto con el insecto al transitar por sustratos colonizados. Posteriormente, las unidades infectivas (conidios) se adhieren a la superficie de la cutícula del insecto. Estas germinan y producen el tubo germinal, en cuyo extremo se forma el apresorio. Mediante presión física y producción de enzimas, este penetra la cutícula del insecto a través de sus orificios naturales como las partes bucales, las membranas intersegmentales, los espiráculos o los sitios donde exista una alta humedad (Ferron, 1978). Una vez el hongo llega a la hemolinfa del insecto, los cuerpos hifales producen blastosporas para colonizar al hospedero y aprovechar sus nutrientes. Adicionalmente, secretan proteínas y metabolitos secundarios para evadir la respuesta inmune del insecto, hasta que este muere por la combinación de tres factores: el daño mecánico, la desnutrición y la acción de metabolitos secundarios o toxinas (Gillespie & Claydon, 1989). El hongo termina por colonizar el insecto, posteriormente las hifas emergen de este y se forman células conidiógenas que producen la esporulación

sobre el hospedero si las condiciones son favorables. De esta manera, el hongo se disemina y permite la posterior infección de otros individuos (Alatorre-Rosas, 2007; Kachatourians, 1991) (figura 4.3).

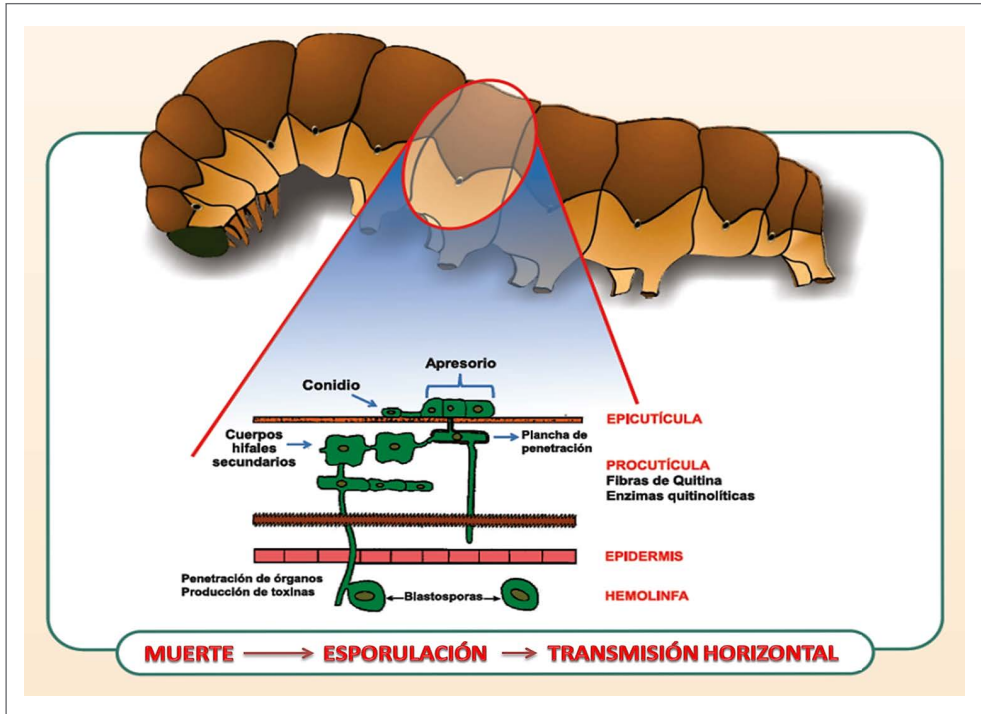
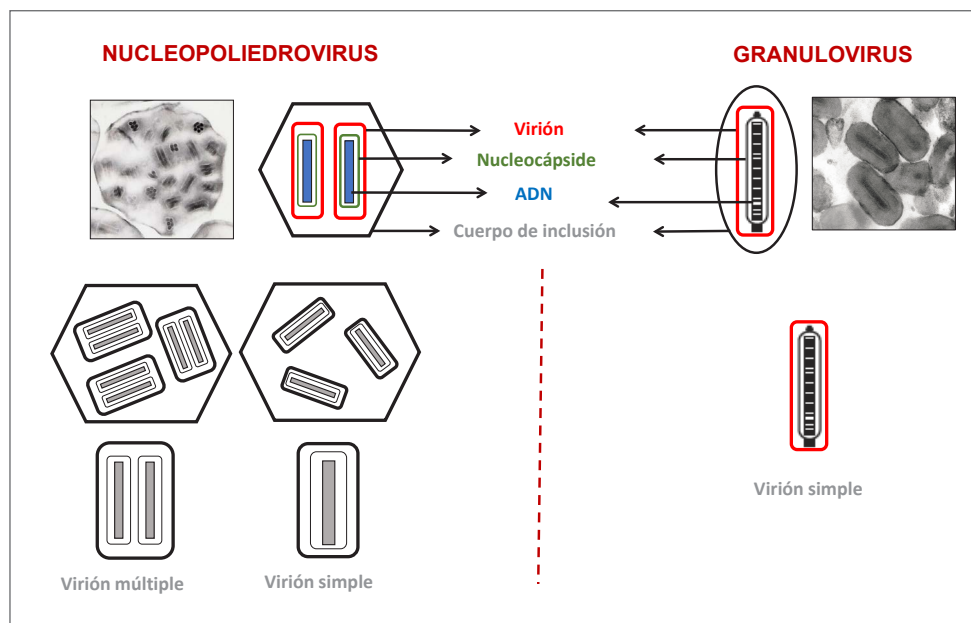


Figura 4.3. Esquema del mecanismo de acción de un hongo entomopatógeno.

Fuente: Grupo de Control Biológico de Insectos de AGROSAVIA

Dentro de los virus patógenos de insectos se destaca la familia Baculoviridae, que se caracteriza por tener una molécula de ADN circular envuelta en una capa de proteínas llamada nucleocápside, que junto con otros componentes proteicos forman el virión (partícula infectiva). Los viriones tienen forma de bastón y están inmersos en una matriz proteica que forma el cuerpo de inclusión (CI) (Erlandson, 2009). Estos últimos pueden ser de forma poliédrica o irregular y están constituidos por una matriz proteica de poliedrina, principalmente. Asimismo, poseen múltiples viriones que, a su vez, pueden contener una o varias nucleocápsides como los Nucleopoliedrovirus. Por otra parte, los Granulovirus se caracterizan por su forma granular y los cuerpos de inclusión pequeños, constituidos por una proteína mayoritaria denominada granulina (Caballero et al., 2001) (figura 4.4).



Fotos: Gloria Barrera Cubillos

Figura 4.4. Estructura de un nucleopoliedrovirus y un granulovirus.

Fuente: Elaboración propia con base en Barrera (2013)

El ciclo de infección de los baculovirus inicia cuando los cuerpos de inclusión son consumidos por las larvas del insecto blanco. Posteriormente, estos se disuelven en el intestino medio del insecto debido a su pH alcalino, donde se solubilizan las proteínas y se liberan los viriones que atraviesan la membrana peritrófica del intestino. Estos se fusionan con las microvellosidades de las células epiteliales e ingresan posteriormente a las células, donde liberan sus nucleocápsides (infección primaria), las cuales se dirigen hacia el núcleo donde se produce la transcripción genética y originan una nueva progenie viral (Rohrmann, 2013; Caballero et al., 2001). Las nuevas nucleocápsides atraviesan la membrana celular y adquieren de esta una envoltura, para luego brotar al exterior de la célula en forma de viriones brotados (infección secundaria). Estos viriones circulan por la hemolinfa e infectan otros tejidos y órganos. Hacia el final de la infección, se da la oclusión o encapsulación de las nucleocápsides en una matriz proteica de poliedrina o granulina para formar nuevamente los cuerpos de inclusión. Finalmente, la larva muere y se puede presentar la ruptura de su tegumento, con lo cual se liberan los cuerpos de inclusión e inicia un nuevo ciclo de infección (Rohrmann, 2013; Villamizar, 2018) (figura 4.5).

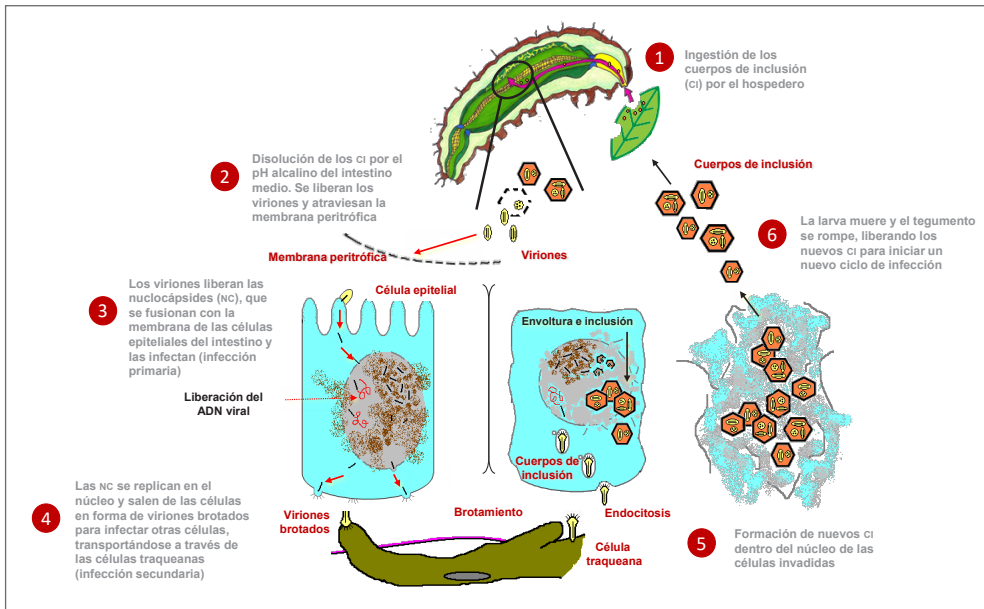


Figura 4.5. Ciclo de infección de los baculovirus.

Fuente: Elaboración propia con base en Espinel-Correal (2010)

Dentro de las bacterias entomopatógenas, se destacan las grampositivas, las cuales tienen la capacidad de formar esporas de resistencia frente a condiciones adversas. Adicionalmente, son capaces de producir toxinas que destruyen el epitelio intestinal para favorecer el paso de la bacteria a la hemolinfa, donde se divide y esporula, lo cual provoca septicemia y la muerte del insecto. Tal es el caso de *Bacillus thuringiensis* (Bacillaceae: Bacillus), cuyas cepas, en su gran mayoría, son capaces de producir cristales proteicos parasporales. Estos están compuestos por una o varias toxinas (δ endotoxinas como las toxinas *Cry* y las *Cyt*) que tienen efecto letal sobre lepidópteros, dípteros y coleópteros, así como sobre ácaros, nematodos y protozoos (Jisha et al., 2013).

El mecanismo de acción inicia cuando el insecto ingiere el cristal, cuyas toxinas *Cry* se expresan como protoxinas. Posteriormente, estas se someten a un proceso proteolítico en el intestino del insecto debido a sus condiciones alcalinas, lo cual produce la liberación de la toxina activada. Se ha reportado que tanto las protoxinas como las toxinas activas, son capaces de interactuar con los receptores intestinales de la membrana apical del epitelio del intestino medio, asunto que favorece el proceso de oligomerización y la formación de poros (Soberon et al., 2016). Finalmente, se genera la muerte celular por una interacción entre el flujo de iones de la toxina *Cry* y el agua (impacto osmótico) (Endo et al., citado por Grijalba et al., 2018). La muerte

de las células del intestino produce una desintegración del epitelio, lo cual permite la entrada de las bacterias a la hemolinfa y causa la muerte del insecto por septicemia (Raymond et al., citado por Grijalba, 2018) (figura 4.6).

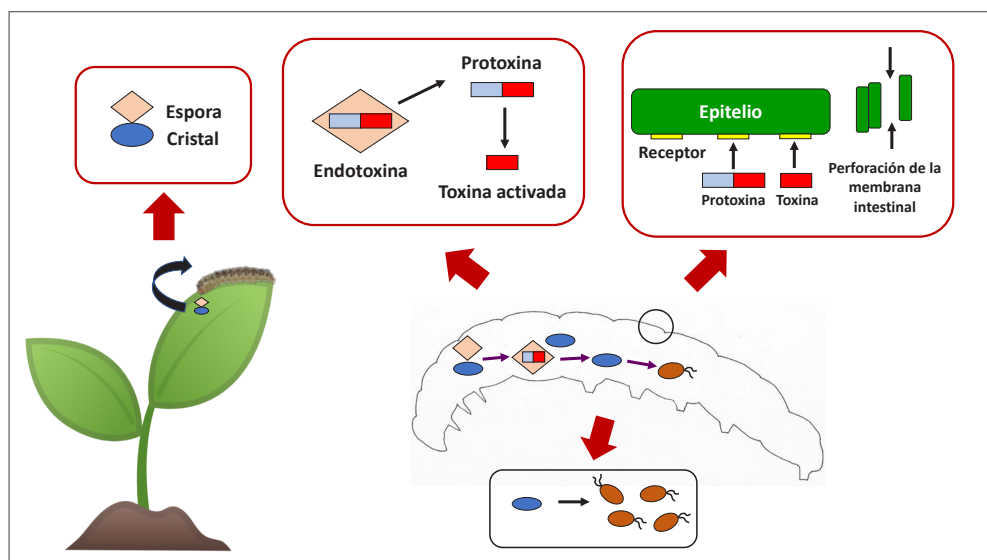


Figura 4.6. Ciclo de infección de *Bacillus thuringiensis*.

Fuente: Elaboración propia

Estructuras de infección y su formulación

El desarrollo de un micoplaguicida involucra la producción masiva y la formulación de propágulos infectivos que pueden incluir conidios, blastosporas, micelio y microesclerocios, cuya selección debe tener en cuenta diferentes factores. Estos involucran el uso que se tiene proyectado del inóculo en cuestión, su virulencia, su tolerancia a la desecación, su tolerancia térmica, su velocidad de germinación e infección, su estabilidad a las condiciones ambientales, su reproducción y tolerancia a los rayos UV, así como otros factores inherentes al hongo seleccionado que lo produce, como es el caso de su estabilidad genética (Lacey, 2017).

Los conidios aéreos son producidos principalmente en sustratos sólidos de fermentación, donde se da una colonización fúngica sobre un sustrato nutritivo sólido y estéril (López-Pérez et al., 2015). Este, generalmente, está constituido por granos de cereales (arroz, cebada, centeno, trigo, maíz) que favorecen el crecimiento vegetativo y la esporulación del hongo. Otro tipo de fermentación es la líquida, la cual incluye dos categorías: la fermentación líquida sumergida, en la cual el hongo se sumerge en

un medio líquido aireado con agitación constante para la obtención de blastosporas, conidos sumergidos (formados por conidiación microcíclica a partir de blastosporas) y microesclerocios. Por otra parte, está la fermentación líquida estacionaria, de la cual se obtienen el micelio y los conidios aéreos (Lacey, 2017).

Las formulaciones de bioplaguicidas deben cumplir con una serie de requisitos que garanticen su eficacia. Los propágulos infectivos deben mantenerse inactivos pero vivos durante su almacenamiento antes de su uso y luego de su aplicación sobre el sustrato tratado (suelo, material vegetal e infraestructura). Estos deben suspenderse fácilmente en un vehículo principalmente acuoso y su comportamiento y actividad no deben afectarse por los adyuvantes (excipientes de formulación) ni por las condiciones ambientales a las cuales están expuestos (Lacey, 2017).

Los propágulos fúngicos deben ser incorporados dentro de la formulación con agentes humectantes y de suspensión, dispersantes, antiespumantes, emulsificantes y asperjantes. Teniendo en cuenta el uso del bioplaguicida, se pueden desarrollar formulaciones acuosas, oleosas como las suspensiones emulsificables (OD) o sólidas que incluyen granulados (G), granulados dispersables en agua (WDG), polvos de contacto (CP), polvos humectables (WP), cebos y espumas (Lacey, 2017) (ver capítulo 2).

La producción masiva de baculovirus se realiza *in vivo*, principalmente, infectando de manera artificial el insecto blanco y posteriormente aislando y purificando los cuerpos de inclusión para su formulación. Otra metodología alterna de producción es el uso de líneas celulares específicas de insectos, la cual es costosa, riesgosa y no siempre exitosa (Lacey, 2012). La mayoría de los bioplaguicidas a base de baculovirus son formulaciones líquidas constituidas como suspensiones concentradas. Sin embargo, las formulaciones sólidas pueden ser aplicadas en seco como polvos o pueden ser asperjadas en agua como polvos humectables o granulados. La aplicación de polvo es poco común y se usa, generalmente, para la aplicación en postcosecha o en productos almacenados; tal es el caso del granulovirus de *Phthorimaea operculella* PhopGV para el control de la polilla guatemalteca *Tecia solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae) (Lacey, 2017; Gómez et al., 2009).

Asimismo, la producción de bacterias entomopatógenas también puede realizarse *in vivo*, mediante la inoculación de insectos sanos. Tal es el caso del bacilo *Paenibacillus popilliae* (Bacillales: Paenibacillaceae) para el control del escarabajo japonés *Popillia japonica* (Coleoptera: Ritelidae), en el cual larvas sanas son inyectadas con una suspensión del patógeno para la posterior obtención de esporas (Fleming, 1968;

citado por Lacey, 2017). Adicionalmente, también se pueden obtener propágulos bacterianos (expresados como número de UFC o concentración de esporas o cristales) mediante su producción sobre sustratos sólidos de fermentación o fermentación líquida. Este último es el método de producción masiva más común de bacterias para el desarrollo de bioplaguicidas (Lacey, 2017).

Concentración de aplicación

Para el control de calidad de la actividad biológica de un agente microbiano (mortalidad), es necesario tener en cuenta la concentración de la aplicación recomendada por el fabricante. Esta se determina con antelación mediante estudios de la concentración y el tiempo letal medio, principalmente (CL_{50} y TL_{50}).

Las concentraciones de los bioplaguicidas, generalmente, se expresan como estructuras de infección (conidos, esporas, blastosporas, células, cuerpos de inclusión, entre otros) por unidad de masa (gramo o kilogramo) o de volumen (mililitro o litro). Es así como a partir de la concentración del producto se debe ajustar la concentración de la aplicación recomendada mediante la realización de diluciones seriadas utilizando diferentes diluyentes como agua, fosfato tampón, solución salina o Tween (Lacey, 2012).

Generalmente, se realizan diluciones decimales (1/10). Para ello se añade 1 ml o 1 g de la muestra (bioplaguicida) a 9 ml de diluyente (ecuación 4.1) (ver capítulo 1).

$$\text{Dilución } \frac{1}{10} = \frac{1 \text{ ml o g de la muestra}}{1 \text{ ml o g de la muestra} + 9 \text{ ml de diluyente}} \quad 10 \text{ ml de dilución } \frac{1}{10} \text{ o } 10^{-1}$$

Ecuación 4.1. Cálculo de la dilución 1/10 (Arana et al., s. f.)

Criterios de evaluación

Una vez reconocidos los criterios biológicos mencionados anteriormente, es necesario definir las condiciones en las cuales se va a realizar el bioensayo de evaluación de la actividad biológica del bioplaguicida, las cuales incluyen las condiciones físicas y ambientales, los sistemas de aplicación, el montaje de la unidad experimental, la identificación de los síntomas y signos de infección y los materiales de referencia.

Condiciones físicas y ambientales

Dependiendo de las características del ensayo, así como de los componentes a evaluar en el control de calidad del bioplaguicida en cuestión, este se puede realizar en condiciones de laboratorio o bajo condiciones de invernadero. En ambos casos, se deben controlar las condiciones que puedan influir negativamente en los resultados e identificar con antelación los riesgos potenciales.

Dentro de las condiciones que requieren especial control están la temperatura, la humedad o el fotoperiodo, las cuales se deben ajustar de manera previa al montaje del bioensayo. Posteriormente, se debe hacer su seguimiento durante todo el tiempo que dure la evaluación mediante el registro diario mínimo en la mañana y en la tarde de tales condiciones.

La definición de los rangos para cada una de las condiciones ambientales requeridas dependerá de lo reportado en la literatura y de las observaciones experimentales realizadas durante el proceso de estandarización de la metodología. Adicionalmente, el cumplimiento de los rangos establecidos determinará la aceptación o el rechazo de la evaluación, en caso de considerarse críticos.

Sistemas de aplicación

Existen dos sistemas de aplicación del agente de control sobre el insecto blanco: el directo y el indirecto. En el primero, la aplicación se realiza sobre o dentro del insecto y en el segundo sobre el sustrato de alimentación.

La aplicación directa se puede realizar mediante la aspersión de una suspensión del agente de control sobre el insecto a la concentración indicada, mediante un atomizador, aerógrafo o nebulizador. En este caso es necesario establecer con antelación la distancia, la presión (si aplica), el volumen y la cobertura de la aplicación para garantizar que esta sea suficiente, homogénea y no afecte negativamente al insecto o incluso su alimento (figura 4.7).



Fotos: Lissette Torres Torres

Figura 4.7. Aplicación directa por aspersión del agente de control sobre el insecto blanco. a. Aspersión con atomizador de *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Cordycipitaceae) sobre adultos de *Cerotoma tingo-mariana* (Coleoptera: Chrysomelidae); b. Aspersión con aerógrafo de *Lecanicillium lecanii* (Ascomycota: Cordycipitaceae) sobre ninfas de *Trialeurodes vaporariorum* (Hemiptera: Aleyrodidae).

Por otra parte, está la aplicación por inmersión, en la cual y, como su nombre lo indica, el insecto se sumerge en un volumen específico de la suspensión del agente de control por un tiempo determinado, de tal manera que se garantice la adherencia de los propágulos infectivos al cuerpo del insecto tratado, así como la supervivencia de éste luego de su inmersión. En este tipo de aplicación, se debe definir con precisión el estado de desarrollo indicado, de tal forma que sea susceptible al agente de control pero no al método de aplicación (figura 4.8).

Otra forma de aplicación directa es la que se hace de manera tópica sobre una parte específica del cuerpo del insecto. Tal es el caso de la metodología reportada por Espinel-Correal et al. (1998) para evaluar la actividad biocontroladora de *M. anisopliae* sobre ninfas y adultos de la langosta llanera *Rhammatocerus schistocercoides* (Rehn) (Orthoptera: Acrididae), en la cual se aplican 20 μ l de una suspensión del hongo entomopatógeno sobre el pronoto del insecto con una micropipeta (figura 4.9).



Fotos: Fotos: Lisette Torres Torres

Figura 4.8. Aplicación directa por inmersión de larvas de *Diatraea saccharalis* de seis días de edad en una suspensión de conidios de *Metarhizium anisopliae* (Ascomycota: Clavicipitaceae).



Foto: Carlos Espinel Correal

Figura 4.9. Aplicación *M. anisopliae* sobre el pronoto de una ninfa de *R. schistocercoides*.

Una forma directa de evaluar la actividad biológica de virus entomopatógenos es mediante su ingestión. Según reportes de diferentes autores, una suspensión viral se puede mezclar con una solución de sacarosa y colorante azul de alimentos; de esta manera es posible evidenciar de manera visual la ingestión del virus debido a la pigmentación que adquiere la larva luego de beberla. Un ejemplo de esta metodología es la reportada por Hughes & Wood (1980), cuando evaluaron tres aislamientos del nucleopoliedrovirus de *Autographa californica* y uno del nucleopoliedrovirus de *Heliothis zea* sobre larvas de *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae) y *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae). Por otra parte, Gómez et al. (2010) utilizaron esta misma metodología para evaluar el nucleopoliedrovirus de *Spodoptera frugiperda* (SfNPV) sobre larvas neonatas de *Spodoptera frugiperda* (figura 4.10).



Foto: Carlos Espinel Correal

Figura 4.10. Ingestión de la suspensión viral de una larva neonata de *S. frugiperda*.

La inyección directa del agente de control dentro del cuerpo del insecto es otra forma de aplicación que, si bien no es muy usada en el control de calidad rutinario de agentes biológicos de control, se lleva a cabo en la producción masiva, especialmente de bacterias entomopatógenas. Dutky (1942) citado por Koppenhöfer et al. (2012), reportó un método en el cual una suspensión de esporas del bacilo *P. popilliae* de concentración conocida, es inyectada en larvas de *P. japonica*. Para ello se usa una jeringa hipodérmica con una aguja de calibre 27-30, acoplada a un sistema de microinyección manual o motorizado, que inyecta la suspensión en la región dorsal del insecto entre el segundo y tercer segmento abdominal posterior. Se debe prestar especial atención a que la aguja entre horizontalmente para evitar perforar el intestino (figura 4.11).

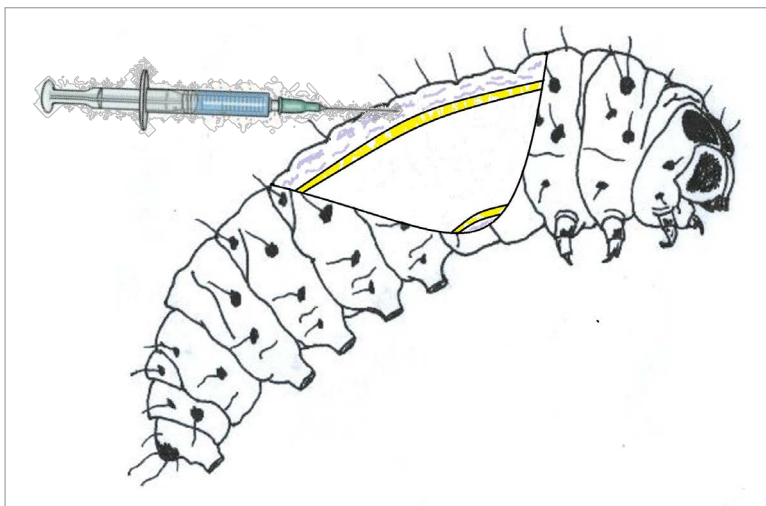


Figura 4.11. Aplicación del agente de control por inyección directa.

Fuente: Elaboración propia

Por otra parte, esta misma metodología de aplicación se ha utilizado como alternativa a los cultivos celulares de insectos en biorreactores para producir proteínas recombinantes a partir de larvas infectadas con vectores derivados de nucleopoliedrovirus múltiples. Tal es el caso del nucleopoliedrovirus de *Autographa californica* (AcMNPV) sobre *Trichoplusia ni*, cuyas larvas pueden ser inyectadas con vectores de baculovirus negativos a la poliedrina (Polh -) debido a la falta de la infectividad oral de estos virus (Guijarro-Pardo et al., 2017).

La aplicación indirecta del agente de control generalmente se hace asperjando una suspensión o espolvoreando una formulación sólida (especialmente polvos) de este sobre el sustrato de alimentación, que puede ser dieta natural o artificial. Por citar algunos casos, está la aspersión con atomizador de suspensiones virales sobre hojas de yuca para evaluar la actividad biocontroladora de un granulovirus sobre larvas del gusano cachón *E. ello* (Barrera et al. 2014). Así como también la aspersión con nebulizador del granulovirus de *Phthorimaea operculella* (PhopGV) sobre hojas de tomate *Solanum lycopersicum* (Solanales: Solanaceae) para evaluar su actividad biológica sobre larvas de *T. absoluta* (Gómez et al., 2017) (figura 4.12).

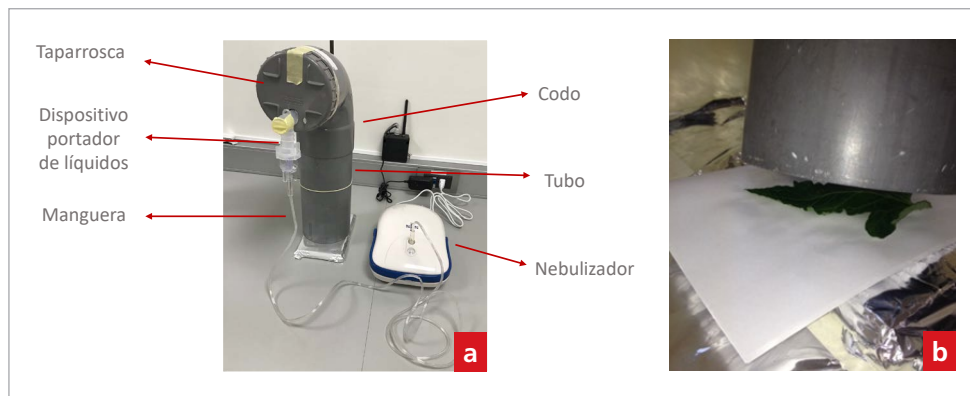


Foto: Carlos Espinel Correal

Figura 4.12. Aplicación por aspersión de un agente biológico. a. Equipo de nebulización para la aplicación suspensiones a base de baculovirus; b. Aspersión del Granulovirus de *Phthorimaea operculella* PhopGV sobre hojas de tomate.

Un método para pulverizaciones de precisión de suspensiones de agentes de control consiste en la utilización de la torre de Potter, la cual garantiza una aplicación homogénea y constante por intervalos específicos de tiempo. Este mismo método también se usa en la aplicación directa sobre el insecto o sobre lotes de estos (Paramasivam & Selvi, 2017).

Por otra parte, la aplicación de productos sólidos sobre el sustrato de alimentación usualmente se realiza de manera directa, a través del espolvoreo y la posterior mezcla hasta evidenciar su adherencia al sustrato. Un ejemplo, es la aplicación del bioplaguicida formulado como polvo a base del granulovirus de *Phthorimaea operculella* (PhopGV) para el control de la polilla guatemalteca *Tecia solanivora*. El bioplaguicida se aplica sobre tubérculos de papa almacenados como semilla (figura 4.13). Según la metodología reportada por Cuartas et al. (2009), se pesaron tres tubérculos de papa criolla, *Solanum phureja* (Solanales: Solanaceae) y se ubicaron en una bolsa plástica que contenía el producto formulado según la dosis comercial (5 g de bioplaguicida/kg de papa; producto a base de baculovirus con Registro ICA No. 5416). Posteriormente, las bolsas se cerraron y se agitaron hasta que los tubérculos quedaron cubiertos con el producto. Cada tubérculo se ubicó de manera individual dentro de un recipiente y se infestó con 15 larvas neonatas de *T. solanivora*. Transcurridos 20 días se determinó su mortalidad.



Foto: Carlos Espinel Correal

Figura 4.13. Tubérculos de papa - semilla. a. Tubérculos de papa sin inocular; b. Tubérculos de papa inoculados con el producto a base del granulovirus de *Phthorimaea operculella* (PhopGV) para el control de la polilla guatemalteca *Tecia solanivora*.

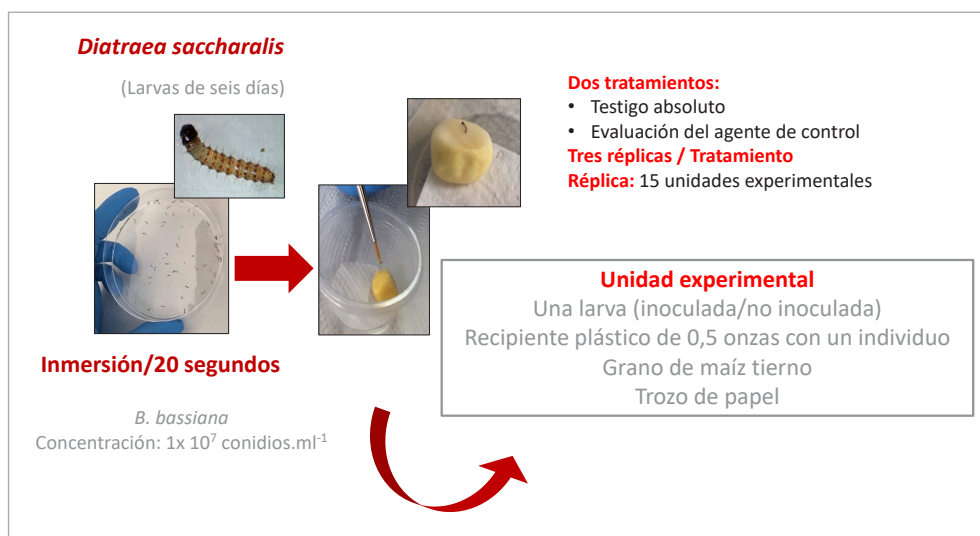
Montaje de la unidad experimental

La unidad experimental es la unidad sobre la cual se aplica un tratamiento (Lacey, 2012). En el caso particular de los bioensayos en los cuales se pretende determinar la actividad biológica de un agente de control, la unidad experimental corresponde al individuo o grupo de individuos sometidos o no (en el caso del tratamiento correspondiente al testigo absoluto) a una intervención de manera planeada para evaluar posteriormente su respuesta.

En el momento de establecer la unidad experimental en la realización de un bioensayo, se deben definir con antelación los tratamientos a evaluar, el número de réplicas e individuos, el sistema de confinamiento (recipientes, materas, jaulas, entre otros), así como el sustrato de alimentación y demás requerimientos para garantizar la supervivencia de los individuos del testigo absoluto durante el tiempo que dure la evaluación (ejemplos 1 y 2).

Ejemplo 1

En un bioensayo para determinar la actividad biocontroladora de un producto a base de *B. bassiana* sobre *D. saccharalis*, se inoculan larvas de seis días de edad mediante inmersión durante 20 segundos en una suspensión del hongo a la concentración de 1×10^7 conidios. ml^{-1} . Posteriormente, estas se ubican de manera individual en recipientes plásticos de 0,5 oz con tapa, los cuales contienen un trozo de papel y un grano de maíz tierno para su alimentación (unidad experimental). Se evalúan tres réplicas por tratamiento, incluido un tratamiento control (testigo absoluto) en el cual las larvas no se someten a ninguna inmersión. Cada réplica está conformada por 15 unidades experimentales (figura 4.14).



Fotos: Lissette Torres Torres

Figura 4.14. Montaje de la unidad experimental de un ensayo de evaluación de la actividad biocontroladora de *B. bassiana* sobre *D. saccharalis*.

Fuente: Elaboración propia

Ejemplo 2

En un bioensayo para determinar la actividad biocontroladora de un producto a base de *Metarhizium anisopliae* sobre *Rhammatocerus schistocercoides*, se inoculan ninfas mediante aplicación tópica de 20 μl de una suspensión del hongo a la concentración de 1×10^7 conidios. ml^{-1} entre el pronoto y el primer tergo. Posteriormente, se ubican 15 insectos inoculados dentro de una jaula, la cual dispone de un plato plástico con 30 g de algodón humedecido con agua y dos vasos plásticos, cada uno con 165 g de pasto kikuyo y agua para mantenerlo fresco (unidad experimental).

Se evalúan tres réplicas por tratamiento, incluido un tratamiento control (testigo absoluto). Cada réplica o unidad experimental, en este caso, está conformada por 15 individuos (figura 4.15).

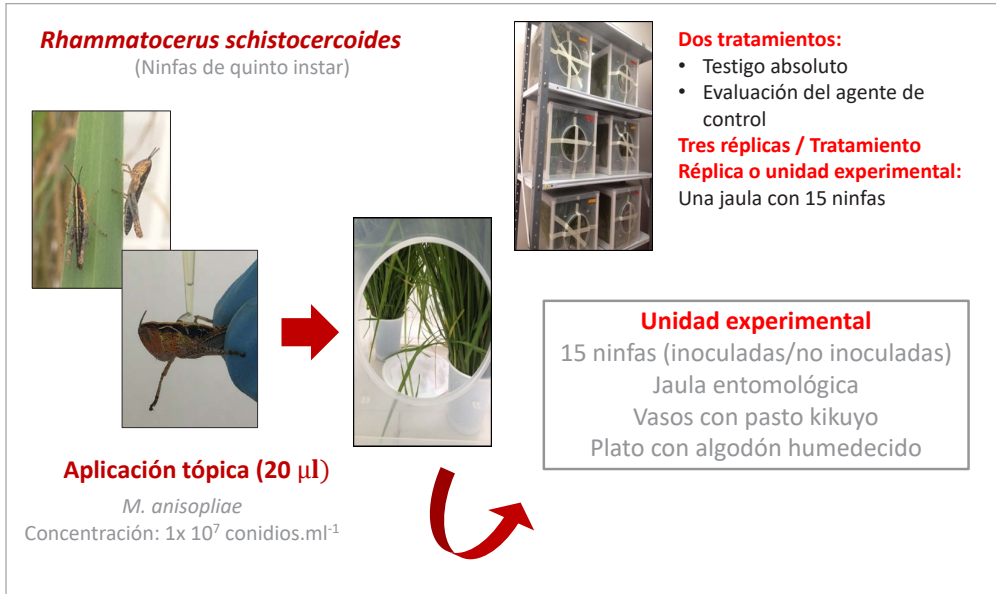
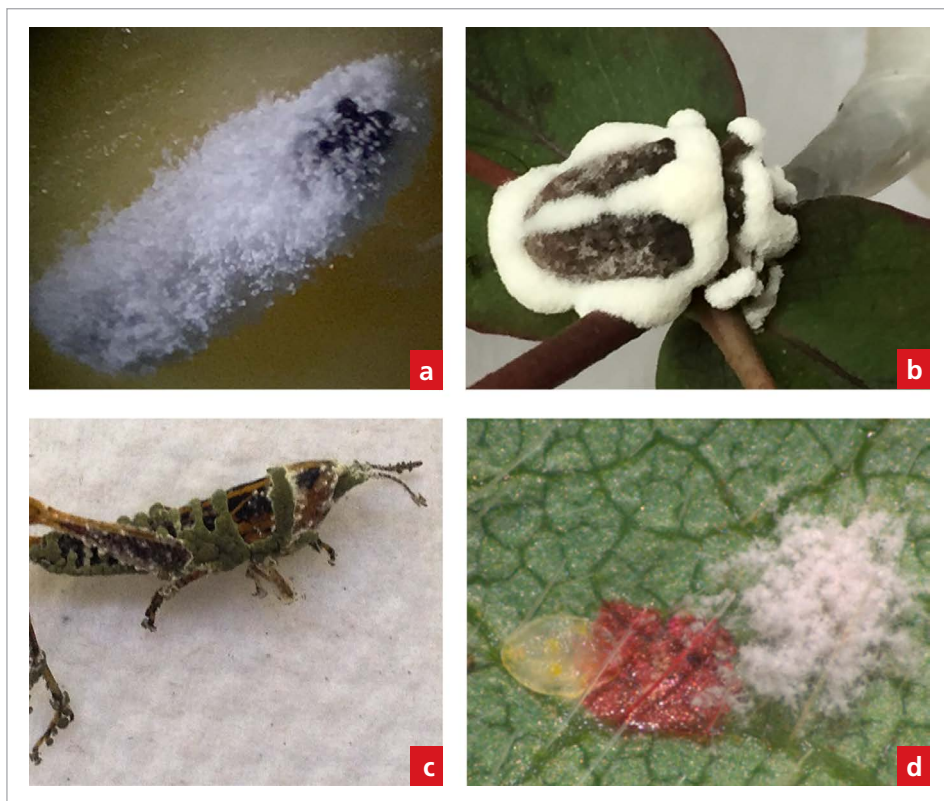


Figura 4.15. Montaje de la unidad experimental de un ensayo de evaluación de la actividad biocontroladora de *M. anisopliae* sobre *R. schistocercoides*.

Fuente: Elaboración propia

Identificación de síntomas y signos de infección

De manera general, los síntomas ocasionados por la infección de hongos, bacterias y virus entomopatógenos son similares y están asociados con el cese de la ingestión, disminución en el tamaño y peso de los insectos infectados con respecto a los sanos, disfunción en el intestino y el tejido muscular generando vómito y diarrea, parálisis celular que puede ser general en todo el cuerpo y la muerte (Aronson et al., 1986; Caballero et al., 2001; Kachaturians, 1991; Lacey, 2012). Sin embargo, los signos pueden cambiar dependiendo del agente de control, por ejemplo, los insectos muertos por hongos entomopatógenos pueden presentar crecimiento micelial y esporulación si las condiciones ambientales son favorables. Las hifas emergen del insecto y ocurre la esporulación sobre su superficie, lo cual contribuye a la diseminación del hongo y a la posterior infección de otros individuos (Alatorre-Rosas, 2007) (figura 4.16).



Fotos: Carlos Espinel Correal y Lissette Torres

Figura 4.16. Infecciones características de hongos entomopatógenos. a. *B. bassiana* sobre larva de *D. saccharalis*; b. *B. bassiana* sobre *Gonipterus platensis* (Coleoptera: Curculionidae); c. *M. anisopliae* sobre ninfa de *R. schistocercoides*; d. *L. lecanii* sobre ninfa de *T. vaporariorum*.

En el caso de *B. thuringiensis*, es posible observar la melanización defensiva a nivel del mesenterón, que aparece ahí para tratar de contrarrestar la invasión de las bacterias presentes en el intestino del insecto. Este es el caso del gusano cuerno del tabaco *Manduca sexta* (Lepidoptera: Bombycoidea) (en larvas de primer estadio de desarrollo) (Grijalba et al., 2018). Por otra parte, cadáveres de insectos infectados con la bacteria gramnegativa *Serratia marcescens* (Enterobacteriales: Enterobacteriaceae), se caracterizan por presentar una coloración rojiza debido a la producción del pigmento denominado prodigiosina (Ruiz-Sánchez et al., 2003). Precisamente, los primeros registros de *Serratia* sp. como patógeno de insectos se realizaron a partir de cadáveres de gusanos de seda *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae) que tenían una coloración de estas características (Steinhaus, 1941; citado por Grijalba et al., 2018).

Con respecto a los insectos infectados con baculovirus, se evidencian cambios en la coloración del tegumento y licuefacción de los tejidos, cuyos cuerpos se convierten en bolsas llenas de virus. Tal es el caso del granulovirus de las larvas del gusano cachón de yuca, *Erinnyis ello* (EeGV), plaga con amplia distribución en zonas tropicales y subtropicales. Esta plaga afecta a plantas con importancia económica como el tomate, el caucho, la yuca, el tabaco, la papaya y el algodón (Pratissoli et al., 2002 citado por Villamizar et al., 2018) (figura 4.17).

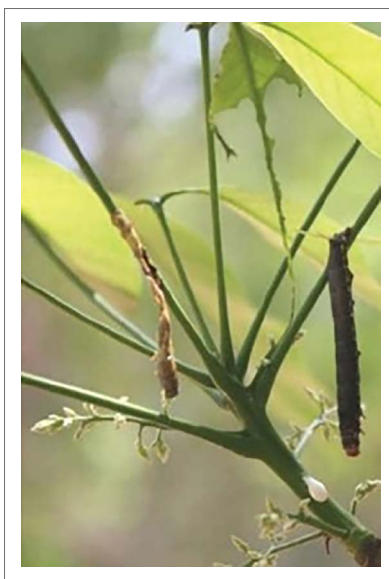


Foto: Grupo de Investigación Control Biológico de AGROSAVIA

Figura 4.17. Larva de *E. ello* infectada por el granulovirus de *Erinnyis ello* EeGV.

Larvas de *T. solanivora* infectadas con el granulovirus de *Phthorimaea operculella* (PhopGV) presentan una coloración blanca y pérdida de turgencia corporal debido a la desintegración de tejidos y órganos (Caballero et al., 2001; Quiroga et al., 2011) (figura 4.18).



Foto: Carlos Espinel Correal

Figura 4.18. Larvas de *T. solanivora* de tercer ínstar, sana e infectadas con el granulovirus de *Phthorimaea operculella* (PhopGV).

Por otra parte, larvas de *T. absoluta* infectadas con el granulovirus de *Phthorimaea operculella* (PhopGV) presentan cambio en el color del tegumento de verde a blanco brillante o amarillo, con marcación de los segmentos corporales. Las pupas presentan deformaciones y pérdida de turgencia (Gómez et al., 2017) (figura 4.19).



Fotos: Carlos Espinel Correal y Lisette Torres Torres

Figura 4.19. Diferencias entre larvas de *T. absoluta* sanas e infectadas por baculovirus. a y b. Sintomatología de larvas infectadas; c. Larva sana.

Material de referencia

Una estrategia para el aseguramiento en la calidad de los bioensayos es la evaluación adicional de un material de referencia. Este corresponde al agente de control biológico con el cual se establece y estandariza el protocolo de evaluación de su actividad contra un insecto blanco o un insecto alterno. Cuando se requiere analizar una muestra (bioplaguicida o principio activo sin formular) es necesario evaluar como control positivo el material de referencia, al mismo tiempo y en las mismas condiciones. De esta manera su comportamiento y los datos de mortalidad obtenidos se convierten en un parámetro de aceptación o rechazo del bioensayo de evaluación.

El material de referencia debe estar debidamente identificado y caracterizado, incluidos los aspectos de tipo morfológico, biológico, bioquímico, genético y molecular. Por otra parte y para garantizar la preservación de todas estas características en el tiempo (incluso su potencial biocontrolador), se debe mantener una colección suficiente y debidamente conservada. Para ello se pueden implementar métodos de conservación a largo plazo como la crioconservación a ultrabajas temperaturas y la liofilización (Lacey, 2012). Una vez el material biológico sea conservado, se debe definir la metodología necesaria para su reactivación, ya sea en medios de cultivo específicos o sobre el mismo insecto. Así se garantiza que su actividad biológica sea similar a la obtenida en el proceso de estandarización de la metodología de evaluación.

Por citar un ejemplo, el aislamiento Bv060 de *B. bassiana* es utilizado como principio activo de un bioplaguicida desarrollado como suspensión oleosa para el control de adultos de *Cerotoma tingomariana*. Para la estandarización de la metodología relacionada con la evaluación de su actividad biológica, se hizo un estudio de repetibilidad (r), reproducibilidad (R) y la relación entre estos dos parámetros (r&R) usando el aislamiento sin formular (ver capítulo 5). La metodología resultó ser repetible y reproducible y permitió definir entre los parámetros de aceptación (bioensayo válido) un porcentaje de eficacia superior al 80 %. De esta forma, al evaluar otro agente de control dentro de un análisis de calidad sobre este insecto y bajo el mismo protocolo y condiciones de estandarización, se incluye el aislamiento Bv060 como material de referencia. Es decir, el bioensayo debe incluir tres tratamientos: un testigo absoluto, la muestra por analizar y el correspondiente a la evaluación del material de referencia (figura 4.20).

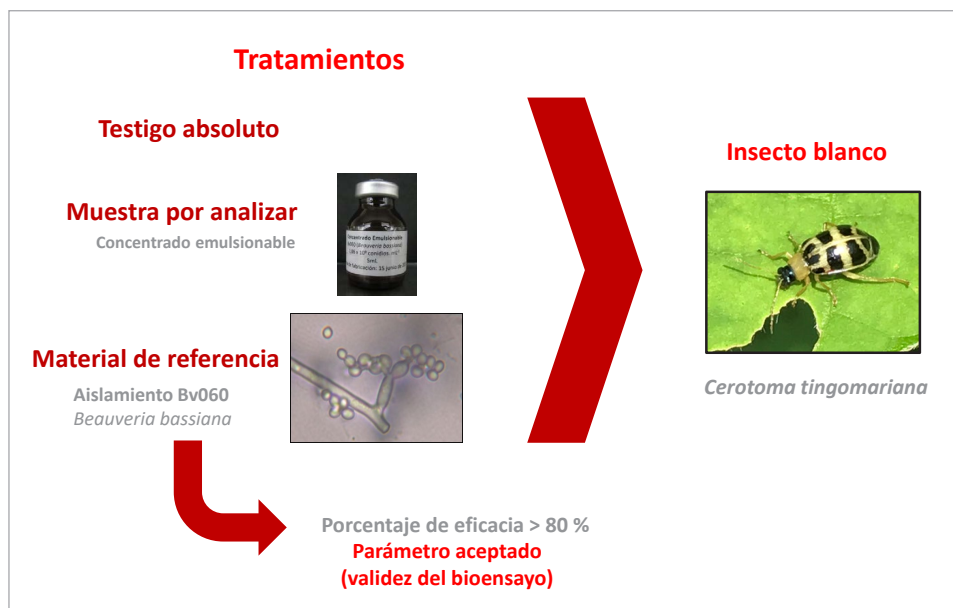


Foto: Carlos Espinel Correal, Lorena García Riaño, Lissette Torres Torres

Figura 4.20. Evaluación del material de referencia en el control de calidad de una muestra a base de *B. bassiana* para el control de adultos de *C. tingomariana*.

Fuente: Elaboración propia

Caso de estudio

El siguiente caso de estudio corresponde a los resultados del control de calidad obtenidos de una muestra analizada por AGROSAVIA en el Centro de Investigación Tibaitatá. Para ello y siguiendo lo establecido en un protocolo previamente estandarizado, se determinó la actividad biológica (mortalidad) de un bioplaguicida a base de *Lecanicillium lecanii* sobre ninfas en segundo estadio de *T. vaporariorum* mediante la realización de un bioensayo bajo condiciones de invernadero con un diseño experimental completamente al azar. En dicho bioensayo se evaluaron tres tratamientos: uno correspondiente a un testigo absoluto y los otros dos relativos a la aplicación del agente microbiano (material de referencia y la muestra por evaluar) sobre ninfas en segundo estadio mantenidas en folíolos de frijol *Phaseolus vulgaris* (Fabales: Fabaceae). Las ninfas se infectaron al estar en contacto con el hongo entomopatógeno; presentaron síntomas relacionados con una coloración amarilla y una pérdida de turgencia o aplastamiento.

Para la evaluación de la actividad biológica se definieron los siguientes criterios:

Criterios biológicos

- **Insecto plaga:** ninfas en segundo estadio de mosca blanca (Hemiptera: Aleyrodidae), *Trialeurodes vaporariorum* y plantas de fríjol bola roja provenientes de la Unidad de Crías del Laboratorio de Entomología de AGROSAVIA del Centro de Investigación Tibaitatá.
- **Agente de control:** hongo entomopatógeno *Lecanicillium lecanii* (Zimm.) Zare & W. Gams (Ascomycota: Cordycipitaceae) (muestra por analizar y material de referencia).

Criterios de evaluación

- **Condiciones físicas y ambientales:** bioensayo montado en condiciones de invernadero con una temperatura entre 15 °C y 35 °C y una humedad relativa entre el 16 % y el 85 %.
- **Sistema de aplicación:** directa, mediante aspersión con aerógrafo sobre ninfas de segundo estadio.
- **Montaje de la unidad experimental:** un foliolo de fríjol variedad bola roja infestado con ninfas de segundo estadio.
- **Síntomas y signos de la infección:** se evidencian por una coloración amarilla de las ninfas, por una pérdida de turgencia o aplastamiento y por el crecimiento micelial y esporulación del hongo sobre el cuerpo del insecto de coloración blanca.
- **Material de referencia:** aislamiento V1026 de *L. lecanii*.

Criterios para el aseguramiento de los resultados

- **Parámetros de aceptación:** la mortalidad en el testigo absoluto no debe ser mayor al 20 %. El coeficiente de variación entre las réplicas de un mismo tratamiento debe ser menor al 30 %. El material de referencia (aislamiento V1026) de *L. lecanii* debe alcanzar un porcentaje de eficacia superior al 80 %. El bioensayo se debe realizar bajo las condiciones de temperatura y humedad establecidas y descritas anteriormente.

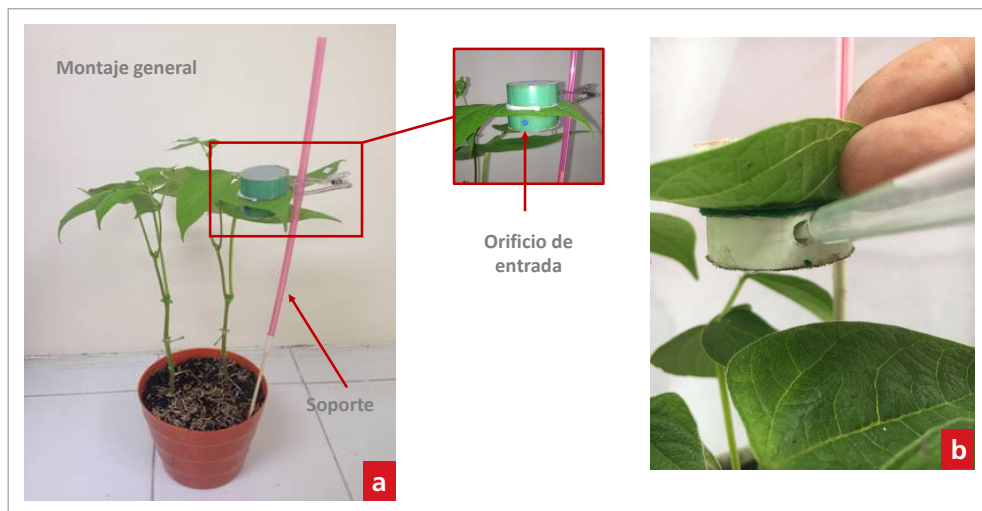
Criterios estadísticos

- **Tratamientos:** la muestra por analizar (producto comercial), el material de referencia como control positivo (aislamiento V1026) y un testigo absoluto.
- **Número de réplicas:** se evalúan tres réplicas por tratamiento y cada foliolo infestado corresponde a una réplica.
- **Unidades experimentales:** un foliolo de frijol infestado con ninfas en segundo estadio. El número de individuos no fue el mismo por cada unidad experimental, este se cuantificó dentro de un área determinada por el diámetro de la jaula pinza (4cm^2), según la metodología establecida.
- **Diseño experimental:** diseño experimental completamente al azar (DCA).
- **Variable respuesta:** porcentaje de eficacia.

La metodología desarrollada se describe a continuación:

Semillas de frijol de la variedad ICA-Calima se sembraron en materas No. 20. Una vez emergieron las plantas y estas tuvieron mínimo dos trifolios formados, se llevó a cabo su infestación con adultos de *T. vaporariorum*. Para ello, 30 insectos se ubicaron dentro de una jaula pinza dispuesta en un foliolo para favorecer su oviposición (figura 4.21) y transcurridas 48 horas se llevó a cabo su desinfestación mediante la recolección de los adultos con un aspirador bucal.

Una vez se observó la presencia de ninfas de segundo instar, se realizó su conteo en cada foliolo infestado y se llevó cabo su identificación (tres foliolos por tratamiento). Posteriormente, se aplicó una suspensión del agente de control (muestra y material de referencia) ajustada a la concentración de 1×10^7 conidios. ml^{-1} en Tween 80 al 0,1 %. Para ello, se hicieron aspersiones sobre el envés de cada foliolo infestado haciendo dos disparos (600 μl) a 30 psi con ayuda de un aerógrafo a una distancia aproximada de 20 cm. Adicionalmente, se evaluó un testigo absoluto.



Fotos: Carlos Espinel Correal y Lissette Torres Torre

Figura 4.21. Evaluación biológica de *Lecanicillium lecanii* sobre mosca blanca. a. Montaje general de la jaula pinza en la maceta, para la infestación con los adultos de *T. vaporariorum*; b. Infestación de folíolos de frijol con adultos de mosca blanca.

Las ninfas se revisaron cada tres días hasta que estas alcanzaron el cuarto instar o hasta que se evidenció la presencia de exuvias en el testigo absoluto (indicador de la emergencia de adultos). Se realizó el conteo de estas, así como el de los insectos vivos y muertos sobre cada folíolo de cada tratamiento. Posteriormente se calculó el porcentaje de eficacia mediante la fórmula de Schneider-Orelli:

$$Eficacia(\%) = \left(\frac{(b - k)}{(100 - k)} \right) * 100$$

Ecuación 4.2. Cálculo del porcentaje de eficacia (Zar, 1999).

Donde:

b = % de individuos muertos en el tratamiento donde se aplicó el agente de control

k = % de individuos muertos en el testigo absoluto

Los resultados del control de calidad relacionados con la evaluación de la actividad biológica de un bioplaguicida a base de *L. lecanii* se presentan en la tabla 4.1.

Tabla 4.1. Porcentaje de eficacia de un bioplaguicida a base de *L. lecanii* sobre ninfas de *T. vaporariorum*

Tratamientos		Conteo inicial (I)*	Conteo final (F)**	I - F	Mortalidad (%)	Eficacia (%)
Testigo absoluto	R 1	120	113	7	5,83	
	R 2	105	96	9	8,57	
	R 3	110	103	7	6,36	
Promedio					6,92	
Desviación estándar					1,45	
cv (%)					20,98	
Material de referencia	R 1	129	5	124	96,12	95,84
	R 2	167	13	154	92,22	91,64
	R 3	208	17	191	91,83	91,22
Promedio					93,39	92,90
Desviación estándar					2,38	2,55
cv (%)					2,54	2,75
Bioplaguicida	R 1	78	12	66	84,62	83,47
	R 2	106	5	101	95,28	94,93
	R 3	81	9	72	88,89	88,06
Promedio					89,60	88,82
Desviación estándar					5,37	5,77
cv (%)					5,99	6,49

* Conteo inicial de ninfas. ** Conteo final de ninfas o exuvias

Fuente: Elaboración propia

El promedio de mortalidad en el testigo absoluto fue inferior al 20 %, el coeficiente de variación (cv) entre las réplicas de un mismo tratamiento fue inferior al 30 % y el porcentaje de eficacia del material de referencia fue superior al 80 %. Adicionalmente, las condiciones ambientales (temperatura y humedad) durante el tiempo de la evaluación estuvieron entre los rangos establecidos. De esta manera se cumplieron con todos los parámetros de aceptación, por lo cual los resultados obtenidos son aceptados y correctos.

Los insectos encontrados en el tratamiento correspondiente a la suspensión del bioplaguicida y del material de referencia (aislamiento V1026) presentaron signos de infección relacionados con una coloración amarilla, pérdida de turgencia y aplastamiento de las ninfas. También se evidenció un crecimiento micelial típico de *L. lecanii* sobre ninfas y adultos que alcanzaron a emerger pero que no sobrevivieron.

En contraste, en el testigo absoluto se evidenciaron ninfas vivas turgentes y exuvias que indicaron la emergencia de adultos (figura 4.22).

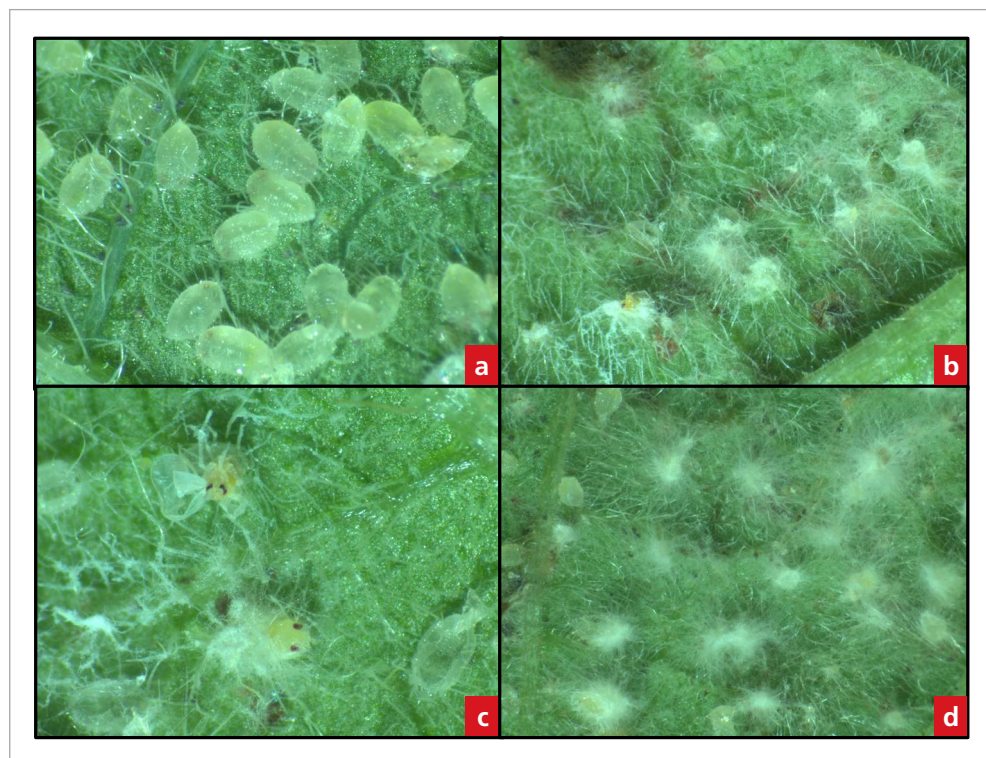


Foto: Carlos Espinel Correal y Lissette Torres Torres

Figura 4.22. Individuos de *T. vaporariorum*. a. Testigo absoluto, ninfas sanas de *T. vaporariorum* en cuarto estadio; b. Ninfas de *T. vaporariorum* en cuarto estadio, infectadas y con crecimiento micelial del bioplaguicida a base *L. lecanii*; c. Adultos de *T. vaporariorum* con crecimiento micelial del bioplaguicida a base *L. lecanii*; d. Ninfas de *T. vaporariorum* de cuarto estadio, infectadas y con crecimiento micelial del material de referencia (aislamiento VI026).

Adicionalmente, se confirmaron las características macroscópicas y microscópicas del hongo entomopatógeno. El aislamiento VI026 (material de referencia) y el principio activo del bioplaguicida analizado a base de *L. lecanii* se caracterizaron por presentar micelio aéreo de aspecto algodonoso y color blanco, con fiálides alargadas y estrechas organizadas de manera verticilar, a partir de las cuales se forman los conidios, los cuales son pequeños, hialinos y cilíndricos. Estas características concordaron con las descritas por Barnett & Hunter (1998) para esta misma especie (figura 4.23).



Foto: Lissette Torres Torres

Figura 4.23. Fotografías de *L. lecanii*. a. Características microscópicas del aislamiento V1026 de *L. lecanii* (material de referencia); b. Características microscópicas del principio activo del bioplaguicida analizado a base de *L. lecanii*.

Perspectivas

- Los criterios biológicos y de evaluación expuestos en el presente capítulo constituyen una herramienta importante para la definición y estandarización de metodologías encaminadas a la evaluación de la actividad biológica de agentes de control de insectos en condiciones controladas.
- Los criterios expuestos, aplicados en el control de calidad rutinario de agentes de control de insectos, permiten diseñar metodologías sencillas que, acompañadas de criterios estadísticos y de aceptación, garantizan la generación de resultados confiables.
- Los resultados de la actividad biológica de un agente de control deben complementarse con análisis microbiológicos y fisicoquímicos para su interpretación integral.

Referencias

Alatorre-Rosas, R. (2007). Hongos entomopatógenos. En L. A. Rodríguez-Del-Bosque, & H. Arredondo-Bernal (Eds.), *Teoría y aplicación del control biológico* (pp.127- 143). Sociedad Mexicana de Control Biológico.

- Arana, I., Maite, O., & Barcina, I. (s. f.). *Cómo abordar y resolver aspectos prácticos de microbiología. Departamento Inmunología, Microbiología y Parasitología*. Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea.
- Aronson, A. I., Beckman, W., & Dunn, P. (1986). *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. *Microbiological reviews*, 50(1) 1-24. <https://doi.org/10.1128/mr.50.1.1-24.1986>
- Barnett, H. L. & Hunter, B. B. (1998). *Illustrated Genera on Imperfect Fungi*. The American Phytopathological Society.
- Barrera, G. P. (2013). *Spodoptera frugiperda* nucleopolyhedrovirus the basis for a biopesticide product in Colombia [Tesis de doctorado, Universidad Pública de Navarra]. <https://academica-e.unavarra.es/xmlui/handle/2454/16983/Tesis-Barrera.pdf?sequence=4>
- Barrera, G. P., Gómez, J. A., Cuartas, P. E., León, G., & Villamizar, L. (2014). Caracterización morfológica, biológica y genética de un aislamiento colombiano de granulovirus de *Erinnyis ello* (L.) (Lepidoptera: Sphingidae). *Revista Colombiana de Biotecnología*, 16(2), 129-140.
- Bellotti, A., Arias, B., & Reyes, J. (1989). *Manejo Integrado de Erinnyis ello (L) (gusano cachón de la yuca)*. CIAT.
- Borror, D. J., Triplehorn, C. A., & Johnson, N. F. (1992). *Study of Insects*. Harcourt Brace College Publishers.
- Caballero, P., Williams, T., & López-Ferber, M. (2001). *Los baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de plagas*. Phytoma.
- Carapia-Ruiz, V., & Castillo-Gutiérrez, A. (2013). Estudio comparativo sobre la morfología de *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) y *Bemisia tabaci* (Genadius) (Hemiptera: Aleyrodidae). *Acta Zoológica Mexicana*, 29(1), 178-193.
- Cohen, A. (2004). *Insects diets. Science and Technology*. CRC Press.
- Cuartas, P., Villamizar, L., Espinel, C., & Cotes, A. (2009). Infección de granulovirus nativos sobre *Tecia solanivora* y *Phthorimaea operculella* (Lepidoptera: Gelechiidae). *Revista Colombiana de Entomología*, 35(2), 122-129.
- Díaz, A., Gómez, M., Grijalba, E., Santos, A., Cruz, F., León, D., Alarcón, E., & Cotes, A. (2018). Desarrollo y escalamiento de bioplaguicidas. En A. Cotes. (Ed.), *Control biológico de fitopatógenos, insectos y ácaros: aplicaciones y perspectivas* (pp. 628-692). AGROSAVIA.

- Erlandson, M. A. (2009). Genetic variation in field populations of baculoviruses: mechanisms for generating variation and its potential role in baculovirus epizootiology. *Virologica Sinica*, 24(5), 458-469. <https://doi.org/10.1007/s12250-009-3052-1>
- Espinel-Correal, C. (2010). *Analyse de l'évolution des populations du granulovirus PhopGV en contact avec des hôtes alternatifs Phthorimaea operculella et Tecia solanivora (Lepidoptera: Gelechiidae)* [Tesis de doctorado, École Nationale Supérieure des Mines de Saint-Étienne].
- Espinel-Correal, C., Ebratt, E., & Cotes, A. (1998). Evaluación de cepas nativas de *Metarhizium anisopliae* para el control biológico de *Rhammatocerus schistocercoides* (Orthoptera: Acrididae). *Revista Colombiana de Entomología* 24(1-2), 1-5.
- Ferron, P. (1978). Biological control of insect pest by entomogenous fungi. *Annual Review of Entomology*, 23(1), 409-442. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.23.010178.002205>
- Guijarro-Pardo, E., Gómez-Sebatán, S., & Escribano, J. M. (2017). *In vivo* production of recombinant proteins using occluded recombinant AcMNPV-derived baculovirus vectors. *Journal Virological Methods*, 250(1), 17-24. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2017.09.017>
- Gillespie, A. T., & Claydon, N. (1989). The use of entomogenous fungi for pest control and the role of toxins in pathogenesis. *Pest Management Science*, 27(2), 123-130. <https://doi.org/10.1002/PS.2780270210>
- Gómez, H. (1997). *Estadística experimental*. Universidad Nacional de Colombia.
- Gómez, J. A., Barrera, G., López-Ferber, M., Belaich, M., Ghiringhelli, P. D., & Villamizar, L. (2017). Potential of betabaculoviruses to control the tomato leafminer *Tuta absoluta* (Meyrick). *Journal of Applied Entomology*, 142(1-2), 1-11. <https://doi.org/10.1111/jen.12406>
- Gómez, J., Guevara, E., Barrera, G., Cotes, A., & Villamizar, L. (2010). Aislamiento, identificación y caracterización de Nucleopoliedrovirus nativos de *Spodoptera frugiperda* en Colombia. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 63(2), 5511-5520.
- Gómez, J., Villamizar, L., Espinel, C., & Cotes, A. M. (2009). Comparación de la eficacia y la productividad de tres granulovirus nativos sobre larvas de *Tecia solanivora* (Povolny) (Lepidoptera: Gelechiidae). *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 10(2), 152-158.

- Grijalba, E. P., Hurst, M., Ibarra, J., Jurat-Fuentes, J., & Jackson, T. (2018). Bacterias entomopatógenas en el control biológico de insectos. En A. Cotes. (Ed.), *Control biológico de fitopatógenos, insectos y ácaros: agentes de control biológico* (pp. 296-334). AGROSAVIA.
- Hughes, P., & Wood, H. A. (1981). A synchronous per oral technique for the bioassay of insect viruses. *Journal of Invertebrate Pathology*, 37(2), 154-159. [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(81\)90069-0](https://doi.org/10.1016/0022-2011(81)90069-0)
- Hurtado, M. (2012). *Tuta absoluta*. Guía visual del daño causado por el minador del tomate en frutas y hojas [Plegable informativo]. Animal and Plant Health Inspection Service. USDA.
- Instituto Colombiano Agropecuario [ICA]. (2011). Resolución 000698 de 2011 “Por medio de la cual se establecen los requisitos para el registro de departamentos técnicos de ensayos de eficacia, productores e importadores de bioinsumos de uso agrícola y se dictan otras disposiciones”. <https://www.ica.gov.co/getattachment/225bd110-d1c4-47d7-9cf3-43745201e39a/2011R698.aspx>
- Jenkins, N., & Grzywacz, D. (2000). Quality control of fungal and viral biocontrol agents assurance of products performance. *Biocontrol Science and Technology*, 10(6), 753-777. <https://doi.org/10.1080/09583150020011717>
- Jisha, V. N., Smitha, R. B., & Benjamin, S. (2013). An overview on the crystal toxins from *Bacillus thuringiensis*. *Advances in Microbiology*, 3(1), 462-472. <https://doi.org/10.4236/aim.2013.35062>
- Johnson, P. D., & Besselsen, D. G. (2002). Practical aspects of experimental design in animal research. *ILAR Journal*, 43(4), 223-232. <https://doi.org/10.1093/ilar.43.4.202>
- Kachatourians, G. (1991). Physiology and genetics of entomopathogenic fungi. En D. K. Arora, L. Ajello, K. G. Mukerji (Eds.), *Handbook of Applied Micology: Humans, animals and insects* (pp. 548-611). CRC Press.
- Koppenhöfer, A. M., Jackson, T. A., & Klein, M. G. (2012). Bacteria for use against soil-inhabiting insects. En L. A. Lacey (Ed.), *Manual of Techniques in Invertebrate Pathology* (pp. 129-149). Elsevier.
- Lacey, A. L. (2012). *Manual of techniques in invertebrate pathology*. Elsevier.
- Lacey, A. L. (2017). *Microbial control of insect and mite pests*. Elsevier.
- León, G., & Guevara, J. (2006). Manejo integrado de insectos plagas en soya para los Llanos Orientales. En Soya (*Glicine max (L.) Merrill*) *Alternativa para*

- los sistemas de producción de la Orinoquía colombiana. Plan estratégico de investigación y desarrollo tecnológico de soya* (pp. 174-205). AGROSAVIA.
- López-Ávila, A. (1981). *Estudios básicos para la cría de Meteorus laphygmae Viereck parásito de Spodoptera frugiperda (J.E. Smith)* [Tesis de maestría, Universidad Nacional de Colombia].
- López-Pérez, M., Rodríguez-Gómez, D., & Loera, O. (2015). Production of conidia of *Beauveria bassiana* in solid-state culture: current status and future perspectives. *Critical Reviews Biotechnology*, 35(3), 334-341. <https://doi.org/10.3109/07388551.2013.857293>
- Malarvannan, S., Murali, P. H., Shanthakumar, S. P., Prabavathy, V. R., & Nair, S. (2010). Laboratory evaluation of the entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana* against the Tobacco caterpillar, *Spodoptera litura* Fabricius (Noctuidae: Lepidoptera). *Journal of Biopesticides*, 3(1), 126-131.
- Marín-Cruz, V. H., Rodríguez-Navarro, S., Barranco-Flórido, J. E., & Cibrián-Tovar, D. (2017). Insectistatic and insecticide activity of *Beauveria bassiana* in *Bradysia impatiens* (Diptera: Sciaridae). *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 23(3), 329-340.
- Paramasivam, M., & Selvi, C. (2017). Laboratory bioassay methods to assess the insecticide toxicity against insect pest-A review. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 5(3), 1441-1445.
- Patel, J. K., Patel, N. M., & Shyani, R. L. (2001). Coefficient of variation in field experiments and yardstick thereof - An empirical study. *Current Science*, 81(9,10), 1163-1164.
- Portilla, M., & Street, D. (2006). Nuevas técnicas de producción masiva automatizada de *Hypothenemus hampei* sobre la dieta artificial Cenibroca modificada. *Revista Cenicafé*, 57(1), 31-50.
- Quiroga, G., Gómez, M., & Villamizar, L. (2011). Estabilidad de formulaciones a base de granilovirus para controlar *Tecia solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae) en campo. *Revista Colombiana de Entomología*, 37(1), 27-35.
- Ravensberg, W. (2011). Quality control. En J. Grould, K. Hoelmer, & J. Goolshy (Eds.), *A roadmap to the successful development and commercialization of microbial pest control products for control products for control of arthropods* (pp. 129-197). Springer.

- Rey, A., Garea, M., & Lago, J. C. (2017). *Glosario micológico y acepciones complementarias o afines*. Agrupación Micótica A. Zarrota.
- Rohrmann, G. F. (2013). *Baculovirus Molecular Biology*. National Library of Medicine, National Centre for Biotechnology Information.
- Ruiz-Sánchez, A., Cruz-Camarillo, R., Salcedo-Hernández, R., & Berbozaz-Corona, J. (2003). *Serratia marcescens*: De patógeno oportunista al control de insectos que afectan cultivos agrícolas. *Biotecnología*, 8(2), 31-37.
- Sewify, G. H., El Shabrawy, H. A., Eweis, M. E., & Naroz, M. H. (2014). Efficacy of entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* for controlling certain stored product insects. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 24(1), 191-196.
- Sistema Potosino de Vigilancia Epidemiológica [Sipove]. (s. f.). *Ficha Técnica: Barrenador de la Caña de Azúcar Diatraea saccharalis*. Sipove.
- Soberón, M., Monnerat, R., & Bravo, A. (2016). Mode of action of Cry toxins from *Bacillus thuringiensis* and resistance mechanisms. En *Microbial Toxins* (pp. 1-13). Springer.
- Torres, L., Espinel, C., & Santos, A. (2020). Hospederos alternativos y estandarización de métodos para evaluar la actividad biocontroladora de micoinsecticias. *Revista Colombiana de Entomología*, 46(2), e7678. <https://doi.org/10.25100/socolen.v46i2.7678>
- United States Environmental Protection Agency [US EPA]. (2017). What are biopesticides. <https://www.epa.gov/pesticide-registration/biopesticide-registration#what>
- Valencia, R., & Ligarreto, G. (2010). Mejoramiento genético de la soya (*Glycine max* [L.] Merrill) para su cultivo en la altillanura colombiana: una visión conceptual prospectiva. *Agronomía Colombiana*, 28(2), 155-163.
- Vargas, G., & Gómez, L. (2005). *Evaluación del daño causado por Diatraea spp. En caña de azúcar y su manejo en el valle del río Cauca*. Serie Divulgativa. Cenicaña.
- Villamizar, L., Cuartas, P., Gómez, J., Barrera, G., Espinel, C., & López-Ferber, M. (2018). Virus entomopatógenos en el control biológico de insectos. En A. Cotes. (Ed.), *Control biológico de fitopatógenos, insectos y ácaros: agentes de control biológico* (pp. 368-409). AGROSAVIA.
- Zar, J.H. (1999). *Biostatistical analysis*. Prentice Hall.