

Hospederos alternativos y estandarización de métodos para evaluar la actividad biocontroladora de micoinsecticidas

Alternative hosts and standardization of methods to evaluate the biocontrol activity of mycoinsecticides

LISSETTE TORRES-TORRES¹; CARLOS ESPINEL-CORREAL²;
ADRIANA MARCELA SANTOS-DÍAZ³

¹ Bióloga, Profesional de Apoyo de Laboratorio, AGROSAVIA, km 14 vía Mosquera-Bogotá, Mosquera, Cundinamarca, Colombia, latorres@agrosavia.co, <https://orcid.org/0000-0001-6841-2851>. ² Biólogo, Ph. D., Investigador, AGROSAVIA, km 14 vía Mosquera-Bogotá, Mosquera, Cundinamarca, Colombia, cespinel@agrosavia.co, <https://orcid.org/0000-0002-8872-7188>. ³ Microbióloga Industrial M. Sc., Coordinadora Técnica Laboratorio Microbiología Agrícola, AGROSAVIA, km 14 vía Mosquera-Bogotá, Mosquera, Cundinamarca, Colombia, asantos@agrosavia.co, <https://orcid.org/0000-0002-3248-7322>.

Autor para correspondencia

Lisette Torres-Torres. Bióloga, Profesional de Apoyo de Laboratorio, AGROSAVIA, km 14 vía Mosquera-Bogotá, Mosquera, Cundinamarca, Colombia, latorres@agrosavia.co, <https://orcid.org/0000-0001-6841-2851>.

Citación sugerida

TORRES-TORRES, L.; ESPINEL-CORREAL, C.; SANTOS-DÍAZ, A. M. 2020. Hospederos alternativos y estandarización de métodos para evaluar la actividad biocontroladora de micoinsecticidas. Revista Colombiana de Entomología 46 (2): e7678. <https://doi.org/10.25100/socolen.v46i2.7678>

Recibido: 20-mar-2019

Aceptado: 5-dic-2019

Publicado: 31-dic-2020

Revista Colombiana de Entomología

ISSN (Print): 0120-0488

ISSN (On Line): 2665-4385

<https://revistacolombianaentomologia.univalle.edu.co>

Open access



BY-NC-SA 4.0
creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.es

Publishers: Sociedad Colombiana de Entomología
SOCOLEN (Bogotá, D. C., Colombia)

<https://www.socolen.org.co>

Universidad del Valle (Cali, Colombia)

<https://www.univalle.edu.co>

© 2020 Sociedad Colombiana de Entomología
- SOCOLEN y Universidad del Valle - Univalle

Resumen: Los hongos entomopatógenos *Metarhizium anisopliae* (Ascomycota: Clavicipitaceae) y *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Cordycipitaceae) son una alternativa para el control de plagas de gramíneas (e.g. *Rhammatocerus schistocercoides*, Orthoptera: Acrididae) y de soya (e.g. *Cerotoma tingomariana*, Coleoptera: Chrysomelidae). Con el fin de utilizar estos microorganismos como principio activo de micoinsecticidas, es necesario contar con métodos de control de calidad microbiológico, fisicoquímico y de actividad biológica que sean repetibles y reproducibles en el tiempo. Por tal razón, y dada la dificultad en la recolecta de individuos en el campo y en el establecimiento de crías masivas de *R. schistocercoides* y de *C. tingomariana*, se establecieron métodos para la evaluación rutinaria de la actividad biológica mediante el uso de hospederos alternativos. Para *M. anisopliae*, dirigido al control de *R. schistocercoides*, se evaluaron las especies *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) y *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) mientras que para *B. bassiana*, dirigido al control del insecto *C. tingomariana*, se evaluaron *D. saccharalis* y *Chloridea virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). Se seleccionaron a *D. saccharalis* y *C. virescens* como insectos alternativos para evaluar la eficacia de *M. anisopliae* y *B. bassiana*, respectivamente con eficacia cercana al 80 %, en los dos casos. Los métodos con los insectos alternativos seleccionados fueron estandarizados y se demostró que son repetibles y reproducibles bajo las condiciones evaluadas.

Palabras clave: *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Diatraea saccharalis*, *Chloridea virescens*, control calidad, actividad biológica.

Abstract: The entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* (Ascomycota: Clavicipitaceae) and *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Cordycipitaceae) are an alternative for the control of grassland pests (e.g. *Rhammatocerus schistocercoides*, Orthoptera: Acrididae) and soybean pests (e.g. *Cerotoma tingomariana*, Coleoptera: Chrysomelidae). To use these microorganisms as active principles of micoinsecticides, it is necessary to have quality control methods (microbiological, physicochemical and biological activity) accuracy, and reproducibility in a given timeframe. For this reason and given the difficulty in obtaining individuals in the field and in the establishment of the rearing of *R. schistocercoides* and *C. tingomariana*, we established methods for the routine evaluation of biological activity using alternative hosts. For *M. anisopliae* directed to the control of *R. schistocercoides*, the model insects *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) and *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) were tested, and for *B. bassiana* directed to the control of the target insect *C. tingomariana*, the model insects *D. saccharalis* and *Chloridea virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) were evaluated. *D. saccharalis* and *C. virescens* were selected as alternative insects to evaluate the efficacy of *M. anisopliae* and *B. bassiana*, respectively. Efficacy was close to 80 % for both pathogens. The methods with the selected alternative insects were standardized and showed that they are repeatable and reproducible under the evaluated conditions.

Keywords: *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Diatraea saccharalis*, *Chloridea virescens*, quality control, biological activity.

Introducción

La producción agrícola y ganadera de la Orinoquía colombiana está afectada por la presencia de insectos plaga como la langosta llanera *Rhammatocerus schistocercoides* (Rehn, 1906) (Orthoptera: Acrididae) (Instituto Colombiano Agropecuario 2017) y *Cerotoma tingomariana* (Bechyne) (Coleoptera: Chrysomelidae) (León y Guevara 2006), los cuales influyen de manera negativa en cultivos de importancia económica del país. La langosta llanera es uno de los insectos plaga más importantes de la entomofauna en la altillanura colombiana por su alta densidad y comportamiento gregario (Ebratt *et al.* 2000) y afecta extensas áreas de sabana nativa, pastos mejorados y, potencialmente, cultivos como arroz, maíz, caña de azúcar y sorgo (Instituto Colombiano Agropecuario 2017). Esta plaga está ubicada principalmente en el departamento del Vichada en donde se alimenta de pasturas nativas, pero suele emigrar hacia el departamento del Meta (Contexto Ganadero 2017). Por otra parte, *C. tingomariana* es un insecto plaga de gran impacto económico el cual se ha convertido en la especie más limitante del cultivo de soya dentro del complejo de crisomélidos que lo afectan; ocasiona daños hasta del 40 % en el área foliar en el piedemonte llanero y en la altillanura del país. Su impacto se debe a su aparición frecuente, distribución y por causar mayores pérdidas en el rendimiento del grano cuando alcanza altos niveles poblacionales (León y Guevara 2006). Además, estos insectos provocan la reducción hasta de un 45 % en la fijación de nitrógeno en estos cultivos (Layton 1983) debido a que el estado larval se alimenta de nódulos y raíces (Texeira y Franco 2007).

El uso indiscriminado del control químico de plagas en el mundo ha direccionado el interés hacia la implementación de alternativas más seguras como el control biológico, mediante el uso de hongos entomopatógenos (Nava-Pérez *et al.* 2012). Se ha demostrado que *Metarhizium* spp. y *Beauveria* spp. ocasionan eficacias satisfactorias y son candidatos viables como principio activo de micoinsecticidas que sirven para el control de plagas (Faria y Wraight 2007; Espinel Correal *et al.* 2018). Sin embargo, uno de los aspectos cruciales para la aceptación, adopción y comercialización de agentes de control biológico es la implementación de un sistema de control de calidad, que garantice la inocuidad y la eficacia en condiciones de campo. Este sistema debe ser implementado durante la producción del micoinsecticida como también en el producto final destinado para comercialización (Ravensberg 2011). De igual forma, el control de calidad debe ayudar a reducir los costos de producción, a maximizar los rendimientos, garantizar la seguridad del producto y a reducir los riesgos por fallas, lo cual genera confianza en los usuarios directos, en este caso el agricultor (Jenkins y Grzywacz 2000; Ravensberg 2011; Díaz *et al.* 2018).

En Colombia, la resolución 068370 de 2020 expedida por el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), establece los requisitos para registro y venta de bioinsumos. Esta resolución exige al fabricante contar con un área de control de calidad, la cual debe tener estandarizado los métodos microbiológicos, fisicoquímicos y biológicos para cada tipo de bioinsumo. A pesar de ser un requisito reglamentario, el fabricante de bioinsumos, debe desarrollar sus propios métodos de control de calidad de producto terminado, con el fin de asegurar la precisión y reproducibilidad en cada prueba,

lo cual ha generado una gran diversidad de normas entre fabricantes de productos similares (Jenkins y Grzywacz 2000; Díaz *et al.* 2018).

Este control de calidad incluye análisis microbiológicos, fisicoquímicos y biológicos. Dentro de los análisis microbiológicos se encuentran la confirmación de la identidad, viabilidad y concentración del agente de control biológico y la pureza del producto final (Burgess 1998). Para los análisis fisicoquímicos, se implementan de acuerdo con el tipo de formulación (sólida o líquida) (Jenkins y Grzywacz 2000). Para el análisis de actividad biológica, se involucra la estandarización de bioensayos para la evaluación de la eficacia del producto en condiciones controladas de laboratorio. Este último es la herramienta de mayor importancia en el control de calidad durante el desarrollo y producción de un micoinsecticida (Ravensberg 2011; Lacey 2012). Así pues, la evaluación de la actividad biológica en condiciones de laboratorio, es la única forma segura de validar su resultado y su acción en condiciones de campo (Díaz *et al.* 2018).

Existen numerosas pruebas disponibles para la evaluación de la actividad biológica; sin embargo, hay carencia de métodos estandarizados, aceptados y específicos para cada tipo de microorganismo (Ravensberg 2011; Shabana *et al.* 2003; Uguine *et al.* 2013). Una de las mayores dificultades en el proceso de estandarización de pruebas de actividad biológica es el establecimiento de las crías masivas de los insectos plaga bajo condiciones controladas, debido a varios factores, como su distribución en campo, comportamiento y ciclo de vida. Por ejemplo, la colecta de *R. schistocercoides* es difícil debido a su comportamiento migratorio; además, las condiciones ambientales son críticas para su desarrollo y su ciclo de vida dura un año (Ebratt *et al.* 2000). Asimismo, *C. tingomariana* es una plaga muy asociada al cultivo de la soya, que debido a su carácter rotacional (Valencia y Ligarreto 2010), no garantiza la consecución permanente y suficiente del insecto en los momentos requeridos. Además, no hay disponible una dieta artificial para esta especie de crisomélido.

Debido a los factores que dificultan el establecimiento de las crías masivas de estos insectos, para la evaluación de la actividad biológica de micoinsecticidas, el uso de insectos alternativos que cumplan ciertas características representa una ventaja deseable. Estos deben: tener ciclos de desarrollo corto (Cohen 2004), ser de fácil recolecta, desarrollar en dietas artificiales y las condiciones ambientales para su desarrollo y reproducción deben ser manejables (Portilla y Street 2006; Cohen 2004), y ser susceptibles a los hongos entomopatógenos en cuestión (Sewify *et al.* 2014). En la actualidad, la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA) cuenta con un laboratorio que ofrece, dentro de su portafolio de servicios, el control de calidad microbiológico y fisicoquímico de micoinsecticidas a base de los dos hongos objeto de estudio, pero aún no cuenta con los métodos para evaluar su actividad biológica. Por tal razón, y ante la necesidad de implementar una prueba biológica para el control de calidad de micoinsecticidas a base de *Beauveria bassiana* (Bals. Criv.) Vuill, 1912 (Ascomycota: Cordycipitaceae) y *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorokin, 1883 (Ascomycota: Clavicipitaceae) contra los insectos blanco *C. tingomariana* y *R. schistocercoides*, respectivamente, se realizó un tamizaje para seleccionar insectos alternativos para evaluar la eficacia de estos microorganismos. Asimismo, se establecieron y estandarizaron los métodos para su evaluación en condiciones de laboratorio.

Materiales y métodos

Los bioensayos se realizaron en el Centro de Investigación (C.I.) Tibaitatá de AGROSAVIA (Mosquera, Cundinamarca, Colombia), en el Laboratorio de Microbiología Agrícola y se mantuvieron a 26 ± 5 °C y 45 ± 5 % de humedad relativa.

Insectos. Los insectos alternativos *Diatraea saccharalis* (Fabricius, *sensu* Guenée, 1862) (Lepidoptera: Crambidae), *Spodoptera frugiperda* (Smith y Abbot, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) y *Chloridea virescens* (Fabricius, 1777) (Lepidoptera: Noctuidae) fueron suministrados por la Unidad de Crías del Laboratorio de Entomología de AGROSAVIA. Se mantuvieron bajo las condiciones experimentales descritas arriba.

Los insectos blancos se recolectaron en campo y, posteriormente, se identificaron usando las claves de Rehn (1906) y Riley *et al.* (2002) y se depositaron y registraron en la Colección Taxonómica Nacional de Insectos (CTNI) “Luis María Murillo” de Colombia. Las ninfas de *R. schistocercoides* [CTNI 2074] provinieron de pastos de sabana nativa ubicada en el municipio de Puerto López (Meta, Colombia) y los adultos de *C. tingomariana* [CTNI 224], se recolectaron en cultivos de soya (*Glycine max* (L.) Merr.), variedad Guayuriba ubicados en el C.I. La Libertad de AGROSAVIA, Villavicencio (Meta, Colombia). Estos insectos provenientes de campo se mantuvieron en cuarentena durante 15 días en jaulas entomológicas antes del montaje de los bioensayos, bajo las mismas condiciones experimentales descritas arriba.

Hongos entomopatógenos. Los aislamientos Bv060 de *B. bassiana* y Mt004 de *M. anisopliae*, se suministraron por el Banco de Germoplasma de Microorganismos de AGROSAVIA (BGM) y se cultivaron en Agar Papa Dextrosa (PDA) durante 12 días a 25 °C \pm 1 °C (Tabla 1). Estos microorganismos están cobijados dentro del contrato de acceso a recursos genéticos No. 168 de 2017.

Evaluación de *B. bassiana*. Se determinó la actividad biológica del aislamiento Bv060 sobre el insecto blanco *C. tingomariana* y sobre los insectos alternativos *C. virescens* y *D. saccharalis*. Para ello, se realizó una aspersión sobre diez adultos de *C. tingomariana* con 450 μ L de una suspensión del hongo ajustada a 1×10^7 conidios. mL^{-1} ; se usó un aerógrafo a una presión de 30 lb. Los insectos se ubicaron dentro de un recipiente plástico de 48 oz el cual contenía foliolos de soya para su alimentación, constituyendo una réplica. Lo mismo se hizo hasta completar tres réplicas por tratamiento y adicional se evaluó un tratamiento control (testigo absoluto). Se determinó la mortalidad cada tres días hasta el día noveno, post tratamiento. La evaluación del mismo agente de control sobre los insectos alternativos *C. virescens* y *D. saccharalis*, se realizó mediante la técnica de inmersión durante 20 segundos. 15 larvas del segundo estadio fueron sumergidas en una suspensión del hongo con una concentración final de 1×10^7 conidios. mL^{-1} . Se calculó la eficacia (%) para los días 11 y 12, respectivamente, mediante la

fórmula de Schneider-Orelli (Zar 1999): Eficacia (%) es igual a b menos k dividido 100 menos k por 100 donde: b = Porcentaje de mortalidad en el tratamiento con el hongo y k = Porcentaje de mortalidad en el tratamiento control (testigo absoluto).

Evaluación de *M. anisopliae*. Se evaluó el aislamiento Mt004 sobre el insecto blanco *R. schistocercoides* y sobre los insectos alternativos *D. saccharalis* y *S. frugiperda*. Para el insecto blanco, se usaron jaulas de 29 x 29 x 30 cm en las cuales se ubicaron 15 ninfas de quinto estadio previamente aplicadas tópicamente con una micropipeta en el pronoto, con 20 μ L de una suspensión del hongo en Tween® 80 al 0,1 % ajustada a 1×10^7 conidios. mL^{-1} , constituyendo una réplica. Lo mismo se hizo hasta completar tres réplicas por tratamiento. Los insectos se alimentaron con cortes de pasto kikuyo (*Pennisetum clandestinum* Hochst. ex Chiov.), al igual que los insectos del tratamiento control, sin aplicación del microinsecticida. Se registró la mortalidad cada cuatro días hasta el día 14 posterior a la aplicación y se calculó la eficacia (%), como fue mencionado.

En la evaluación del aislamiento Mt004 sobre el insecto alternativo *D. saccharalis*, se usó el mismo método de inmersión descrito. Luego se ubicaron de manera individual en recipientes plásticos de 0,5 oz con un grano de maíz (*Zea mays* L.) como sustrato de alimentación, constituyendo una réplica. Se evaluó un tratamiento control con sus tres réplicas. Se registró la mortalidad hasta el día nueve posterior a la inmersión y se calculó la eficacia (%).

Para el otro insecto alternativo, *S. frugiperda*, se evaluaron dos tratamientos correspondientes al control y a la aplicación del hongo. Se preparó una suspensión ajustada a 1×10^7 conidios. mL^{-1} y se realizó una aspersión de 1,8 mL sobre el haz y el envés de una hoja de higuera (*Ricinus communis* L., 1753) (Euphorbiaceae) con un aerógrafo a 30 lb de presión. De manera individual se ubicaron trozos de 2 cm^2 de la hoja asperjada en recipientes plásticos de 0,5 oz y se dispuso una larva de segundo estadio sobre cada uno de ellos (unidad experimental). Se registró la mortalidad hasta el día nueve y se calculó la eficacia (%) mediante la fórmula de Schneider-Orelli (Zar 1999).

Diseño experimental y análisis de datos para los bioensayos de selección de los insectos alternativos. Para los bioensayos de selección de los insectos alternativos, se utilizó un diseño experimental completamente al azar (DCA) con tres réplicas por tratamiento. Estos correspondieron a un tratamiento control y otro a la aplicación del microinsecticida. Los datos de mortalidad se sometieron a un análisis de varianza y a una prueba de diferencias mínimas significativas (DMS) utilizando el programa Statistix® versión 7.0 (Analytical Software 2008). Los porcentajes de eficacia se transformaron aplicando la raíz cuadrada del arco seno.

Estandarización del método con los insectos alternativos seleccionados. Una vez se seleccionaron los insectos alternativos, se estandarizaron los métodos mediante un estudio de repetibilidad (r), reproducibilidad (R) y la relación

Tabla 1. Aislamientos entomopatógenos Bv060 de *Beauveria bassiana* y Mt004 de *Metarhizium anisopliae* evaluados en el presente estudio.

Código	Especie	Hospedero de aislamiento	Lugar de Origen
Bv060	<i>Beauveria bassiana</i>	<i>Cerotoma tingomariana</i>	Villavicencio (Meta, Colombia)
Mt004	<i>Metarhizium anisopliae</i>	<i>Ancognatha scarabaeoides</i> (Erichson, 1847) (Coleoptera: Melolonthidae)	Rionegro (Antioquia, Colombia) (Espinel Correal <i>et al.</i> 1998)

entre estos dos parámetros (r&R), utilizando el método de promedios y rangos (Llamosa *et al.* 2007; Paisan y Moret 2010). Para evaluar la eficacia de *B. bassiana* (Bv060) se seleccionó *C. virescens* como insecto alternativo y *D. saccharalis* para *M. anisopliae* (Mt004). Para cada caso, la estandarización se llevó a cabo por dos analistas, quienes a partir de una misma muestra homogénea (el mismo cultivo del agente de control e insectos de la misma edad, según corresponda), bajo las mismas condiciones, mismos instrumentos, en el mismo laboratorio y durante el mismo día, evaluaron los métodos respectivos descritos anteriormente, con cinco repeticiones (por cada analista) y tres réplicas por cada repetición. Se calcularon los estimadores estadísticos para cada grupo de bioensayos realizados independientemente por cada uno de los analistas (repetibilidad) y entre ellos (reproducibilidad). Para establecer la repetibilidad de cada método, a cada analista se le definió el grado de concordancia entre los resultados obtenidos, mediante el cálculo del coeficiente de variación (Silva *et al.* 2003). Los porcentajes de eficacia se transformaron aplicando la raíz cuadrada del arcoseno y se estableció si los métodos son repetibles y reproducibles en el tiempo, mediante una prueba r&R (%). El método se aceptó como estandarizado de acuerdo con los siguientes criterios (Llamosa *et al.* 2007; Paisan y Moret 2010; Arango Serna *et al.* 2013):

- Si $r\&R (\%) \leq 10 \%$, el método se aprueba.
- Si $10 \% \leq r\&R (\%) < 30 \%$, puede ser aceptable según su uso y aplicación.
- Si $r\&R (\%) > 30 \%$ el método no se acepta y requiere mejoras.

Resultados

Evaluación de *Beauveria bassiana* (aislamiento Bv060).

El aislamiento Bv060 tuvo una eficacia de 82,6 % sobre adultos de *C. tingomariana* y no presentó diferencias significativas con las obtenidas sobre los insectos alternativos *D. saccharalis* y *C. virescens*, las cuales fueron del 63,6 % y 92,6 %, respectivamente. Sin embargo, estos dos valores fueron significativamente diferentes entre sí (DMS = 4,72, g.l.= 2, P = 0,0587) (Fig. 1), razón por la cual se seleccionó a *C. virescens* por presentar la mayor mortalidad.

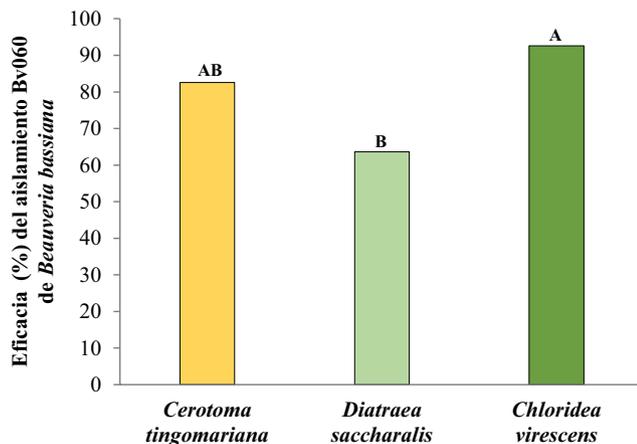


Figura 1. Eficacia (%) del aislamiento Bv060 de *Beauveria bassiana* sobre el insecto blanco *Cerotoma tingomariana* y sobre los insectos alternativos *Diatraea saccharalis* y *Chloridea virescens*. Letras iguales indican que no hay diferencias significativas, según DMS ($\alpha = 0.05$).

Evaluación de *Metarhizium anisopliae* (aislamiento Mt004).

El aislamiento Mt004 presentó una eficacia de 77,5 % después de 14 días de aplicación sobre ninfas de *R. schistocercoides*. No se detectaron diferencias significativas frente a la obtenida al evaluarlo sobre el insecto alternativo *D. saccharalis* la cual fue de 82,6 %, pero sí cuando se evaluó sobre *S. frugiperda* cuya eficacia no superó el 5 %, a los nueve días de aplicación para ambos casos (DMS = 34,2, g.l.= 2, P = 0,0005) (Fig. 2).

En los tres bioensayos, la mortalidad del tratamiento control no superó el 11 % y fue significativamente diferente a los tratamientos en los que se evaluó el entomopatógeno contra *R. schistocercoides* (DMS = 43,7, g.l.= 1, P = 0,0027) y *D. saccharalis* (DMS = 907, g.l.= 1, P = 0,000), pero no cuando se evaluó sobre *S. frugiperda* (DMS = 0,40, g.l.= 1, P = 0,5603). Por tal razón, se seleccionó como insecto alternativo a *D. saccharalis* para hacer la evaluación rutinaria del aislamiento Mt004.

Estandarización del método con los insectos alternativos seleccionados.

Los resultados correspondientes a la estandarización del método relacionado con la evaluación de la actividad biológica (eficacia %) de *B. bassiana* (Bv060) sobre *C. virescens* para los dos analistas se describen en la Tabla 2.

Para el Analista 1, se obtuvieron valores de eficacia que oscilaron entre 76,92 % y 100 % con una media del 90,00 % \pm 5,16 y un coeficiente de variación del 5,77 % mientras que para el Analista 2, estos valores fueron entre 53,85 % al 100 % con una media de 83,08 % \pm 7,50 y un coeficiente de variación del 9,02 %.

El método para la evaluación de la actividad biológica de *B. bassiana* sobre *C. virescens* presentó una repetibilidad del 26,93 %, una reproducibilidad del 12,32 % y un porcentaje de relación de estos dos parámetros (r&R) del 29,62 % (Tabla 3).

Los resultados correspondientes a la estandarización del método relacionado con la evaluación de la actividad biológica del agente microbiano a base *M. anisopliae* (Mt004) sobre *D. saccharalis* para los dos analistas se presentan en la Tabla 4.

El Analista 1 obtuvo eficacias del 65,91 % al 93,18 % con una media de 80,45 % \pm 8,48 y un coeficiente de variación de 10,54 %. Para el Analista 2, se obtuvieron eficacias de 65,91 % al 93,18 %, con una media de 77,06 % \pm 3,19 y un coeficiente de variación de 4,14 %.

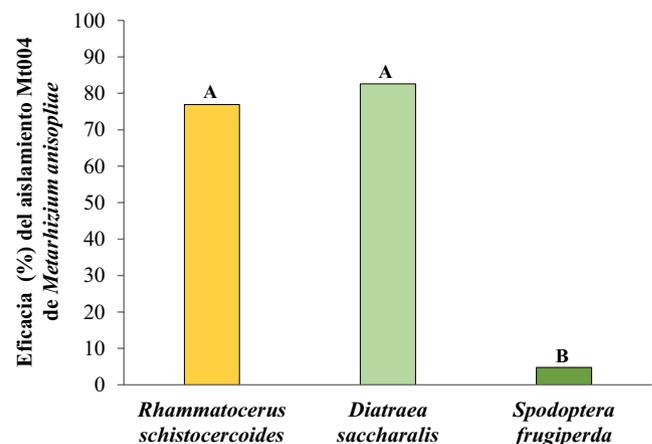


Figura 2. Eficacia (%) del aislamiento Mt004 de *Metarhizium anisopliae* sobre el insecto blanco *Rhammatocerus schistocercoides* y sobre los insectos alternativos *Diatraea saccharalis* y *Spodoptera frugiperda*. Letras iguales indican que no hay diferencias significativas, según DMS ($\alpha = 0.05$).

Tabla 2. Eficacia (%) de *Beauveria bassiana* en el control de *Chloridea virescens* obtenidos por los dos analistas.

	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3	Repetición 4	Repetición 5	Consolidado por analista	
Analista 1	100,00	88,46	88,46	76,92	100,00	x	90,00
	76,92	76,92	100,00	88,46	88,46	SD	5,16
	100,00	88,46	88,46	88,46	100,00	CV (%)	5,77
Analista 2	100,00	100,00	88,46	88,46	65,39	x	83,08
	100,00	76,92	65,39	76,92	88,46	SD	7,50
	76,92	88,46	88,46	53,85	88,46	CV (%)	9,02

X = Media; SD: Desviación estándar; CV (%): Coeficiente de variación.

Para el método de evaluación de la actividad biológica de *M. anisopliae* sobre *D. saccharalis* se obtuvo una repetibilidad del 18,09 %, una reproducibilidad del 4,23 % y el r&R fue del 19,37 % (Tabla 5).

Discusión

Debido al gran número de especies de insectos susceptibles a varios agentes biológicos de control, los métodos de evaluación de su actividad varían considerablemente. Por tal razón, estos se deben diseñar y estandarizar teniendo en cuenta varios criterios biológicos y ambientales, así como de análisis de datos y control de resultados que aseguran la precisión de cada prueba. Los bioensayos deben ser reproducibles en el tiempo y generar resultados consistentes (Lacey 2012, 2017).

Desde el punto de vista del control de calidad de la actividad biológica del principio activo de micoinsecticidas, un aspecto clave es el establecimiento de ensayos biológicos confiables, en el que se utilice el insecto blanco o bien un insecto alternativo, al que se le pueda determinar la actividad biológica del agente de control y que los resultados estén dentro de los límites previamente establecidos por el productor (Díaz *et al.* 2018).

El uso de insectos alternativos para la investigación en diferentes ramas de la ciencia es frecuente y debe cumplir con unas características mínimas. En el caso de insectos usados para explicar diferentes fenómenos e interacciones hay gran número de estudios realizados. Se tienen múltiples referencias sobre el uso de larvas de *Galleria mellonella* (L., 1758) (Lepidoptera: Pyralidae) como modelo alternativo a los mamíferos para el estudio de infecciones microbiales. Sin embargo, sus limitaciones se basan en que no cuenta con la secuencia completa de su genoma ni con unidades de crías

de genotipos específicos establecidas bajo condiciones estandarizadas, como en el caso de otro de los insectos modelo por excelencia como *Drosophila melanogaster* Meigen, 1830 (Diptera: Drosophilidae) (Tsai *et al.* 2016). A pesar de esto, se ha utilizado como modelo para el estudio de patógenos humanos (Champion *et al.* 2016), así como hospedero para la producción de nematodos entomopatógenos (Půža y Mráček 2009), de parasitoides (Boldt y Marston 1974) y para la reactivación de los hongos entomopatógenos *B. bassiana* y *M. anisopliae* (Chávarry Baca 2015). También se ha empleado a *Tribolium castaneum* (Herbst, 1797) (Coleoptera: Curculionidae) como un organismo modelo para dilucidar los mecanismos de resistencia a insecticidas químicos (Zhu *et al.* 2010) por ser fácilmente producido, tener un ciclo de vida corto y alta tasa de fecundidad. Sin embargo, a la fecha no se encontraron referencias en que se indique el uso de insectos alternativos (modelo) para determinar la virulencia de entomopatógenos dirigidos a otro insecto blanco específico, como es el caso de este estudio y más aún en el ámbito del control de calidad de insecticidas biológicos. Aprovechando la capacidad que tienen algunos hongos entomopatógenos de ser virulentos sobre varios órdenes de insectos (Espinel Correal *et al.* 1998; Gandarilla-Pacheco *et al.* 2013; Sewify *et al.* 2014), es posible establecer una estrategia encaminada a la realización de ensayos rutinarios de control de calidad de bioplaguicidas cuyo insecto objeto de control tenga dificultades en su consecución constante y en el establecimiento y mantenimiento de colonias artificiales. Por otra parte, los insectos alternativos pueden ser utilizados como control positivo en la evaluación de la actividad biológica de micoinsecticidas. Según Lacey (2012), uno de los principios que se pueden incluir en el montaje de un bioensayo es la evaluación de la supervivencia del patógeno a diferentes condiciones (controles positivos). Las cuales pueden involucrar insectos tratados con este y evaluar el éxito de la infección, bajo condiciones conocidas y estandarizadas.

Los resultados del presente trabajo permitieron seleccionar los insectos alternativos *D. saccharalis* y *C. virescens* para la evaluación de la actividad biocontroladora de los aislamientos Mt004 y Bv060, dirigidos al control de *R. schistocercoides* y *C. tingomariana*, respectivamente.

Para *D. saccharalis*, diferentes estudios indican su susceptibilidad a varias especies de hongos entomopatógenos como *M. anisopliae*, *B. bassiana*, *M. rileyi* e *Isaria* sp. (Alves *et al.* 2008; Bustillo-Pardey 2013; Cardona y Soto 2015). Para el caso de *M. anisopliae*, Alves y Lecuona (1998) reportaron una infección natural cerca del 10 % en cultivos de caña de azúcar en el nordeste brasileño y demostraron que este hongo es patogénico para todos los estados de desarrollo del insecto, siendo altamente eficiente para los huevos de uno

Tabla 3. Rangos de medición para cada analista y valores de repetibilidad (r), reproducibilidad (R) y la relación entre estos dos parámetros r&R (%) para la actividad biológica de *Beauveria bassiana* en el control de *Chloridea virescens*.

	Analista 1	Analista 2
Rango por medición	0,12	0,12
	0,06	0,12
	0,06	0,13
	0,06	0,06
	0,06	0,13
Repetibilidad (%)	26,93	
Reproducibilidad (%)	12,32	
r&R (%)	29,62	

Tabla 4. Eficacia (%) de *Metarhizium anisopliae* para el control de *Diatraea saccharalis* obtenidos por los dos analistas.

	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3	Repetición 4	Repetición 5	Consolidado por analista	
Analista 1	93,18	72,73	86,36	72,73	79,55	x	80,45
	93,18	65,91	79,55	72,73	72,73	SD	8,48
	93,18	79,55	93,18	86,36	65,91	CV (%)	10,54
Analista 2	65,91	65,91	79,55	79,55	84,27	x	77,06
	79,55	65,91	72,73	72,73	84,27	SD	3,19
	79,55	93,18	79,55	72,73	79,55	CV (%)	4,14

X = Media; SD: Desviación estándar; CV (%): Coeficiente de variación.

a dos días de edad. En ensayos en campo, el patógeno colonizó el 58 % de las larvas, mientras que *B. bassiana* el 48 % a la dosis de 1×10^{13} conidios. ha⁻¹. Por otra parte, Molina Acevedo *et al.* (2007) al evaluar dos aislamientos de *M. anisopliae* obtuvieron mortalidades del 60 % y 100 % sobre larvas de cuarto estadio de *D. saccharalis*; por estas características se reafirma su potencial para ser usado como insecto alternativo. De la misma manera para *C. virescens*, existen reportes en donde se evalúa su susceptibilidad a varios hongos y virus entomopatógenos (Ignoffo *et al.* 1983; Bojórquez-Ramos *et al.* 2016). Chávarry Baca (2015) encontró una supervivencia de larvas de *C. virescens* del 30 % y 48 % al ser tratadas con *B. bassiana* y *M. anisopliae* a una concentración de 1×10^7 conidios. mL⁻¹, respectivamente. Por otra parte, Acuña-Jiménez *et al.* (2015), obtuvieron mortalidades del 33,3 % y del 56,8 % sobre larvas de primer estadio al ser sumergidas durante 30 segundos al evaluar la patogenicidad de esporas microencapsuladas de *B. bassiana* y *M. anisopliae* a las 48 h, respectivamente.

Además de la susceptibilidad que tienen *D. saccharalis* y *C. virescens* a los hongos entomopatógenos *M. anisopliae* y *B. bassiana*, respectivamente, existen otras ventajas importantes en el uso de los insectos alternativos, relacionadas con el fácil establecimiento de colonias bajo condiciones de laboratorio y la elaboración de dietas artificiales económicas y de fácil preparación para su mantenimiento (Parra 2001; Lastra Borja y Gómez Laverde 2006).

Una vez seleccionados los insectos alternativos, se estandarizaron los métodos desarrollados con el fin de garantizar los resultados obtenidos. Para el caso de *B. bassiana* (Bv060) sobre *C. virescens* y de *M. anisopliae* (Mt004) sobre *D. saccharalis*, los resultados indicaron que la variabilidad de los ensayos para cada analista fue baja, evidenciado por un coeficiente de variación inferior al 10 %. Estos resultados son similares a los presentados por Silva *et al.* (2007) y Díaz

Tabla 5. Rangos de medición obtenidos para cada analista y valores de repetibilidad (r), reproducibilidad (R) y la relación entre estos dos parámetros r&R (%) para la actividad biológica de *Metarhizium anisopliae* sobre *Diatraea saccharalis*.

	Analista 1	Analista 2
Rango por medición	0,11	0,07
	0,07	0,15
	0,08	0,03
	0,07	0,03
	0,07	0,03
Repetibilidad (%)	18,09	
Reproducibilidad (%)	4,23	
r&R (%)	19,37	

(2016), quienes establecieron que coeficientes de variación entre 0 y 20 %, son aceptables y se considera un ensayo estandarizado con un coeficiente de variación dentro de este rango.

Teniendo en cuenta los resultados de la prueba r&R, en los dos métodos se presentó un mayor porcentaje de repetibilidad en comparación con el valor de la reproducibilidad, lo anterior según Paisan y Moret (2010) posiblemente se deba a la variabilidad entre los componentes que se evalúan en los métodos. Sin embargo, para estos se obtuvieron porcentajes de relación entre la repetibilidad y la reproducibilidad (r&R) entre el 10 % y el 30 %, lo que sugiere que los métodos analíticos utilizados en este estudio son repetibles y reproducibles en el tiempo. En general, los métodos de evaluación de la actividad biológica mediante el uso de insectos alternativos son útiles para el análisis de agentes microbianos destinados al control biológico de plagas cuya disponibilidad en el momento requerido es una limitante.

Conclusiones

Bajo las condiciones del trabajo, se estandarizaron los métodos de actividad biológica de los hongos entomopatógenos *M. anisopliae* y *B. bassiana*, usados comúnmente como ingredientes activos de micoinsecticidas, mediante la utilización de insectos alternativos de fácil manejo, como *D. saccharalis* y *C. virescens*. Estos métodos fueron repetibles y reproducibles en el tiempo, y permitieron dar solución al problema de consecución y manejo de los insectos blanco *R. schistocercoides* y *C. tingomariana*.

Literatura citada

ACUÑA-JIMÉNEZ, M.; ROSAS-GARCÍA, N. M.; LÓPEZ-MEYER, M.; SAÍNS-HERNÁNDEZ, J. C.; MUNDO-OCAMPO, M.; GARCÍA-GUTIÉRREZ, C. 2015. Pathogenicity of microencapsulated insecticide from *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* against Tobacco Budworm, *Heliothis virescens* (Fabricius). *Southwestern Entomologist* 40 (3): 531-538. <https://doi.org/10.3958/059.040.0311>

ALVES, S. B.; LECUONA, R. E. 1998. Epizootiología aplicada ao controle microbiano de insetos. pp. 97-170. En: Alves, S. B. (Ed.). Controle microbiano de insetos. Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz (Fealq). Piracicaba, Brasil. 1163 p.

ALVES, S.; LOPES, R.; VIEIRA, S.; TAMAI, M. 2008. Fungos entomopatogénicos usados no controle de pragas na América Latina. pp. 69-110. En: Alves, S.; Lopes, R. (Eds.). Controle microbiano de pragas na América Latina: Avanços e desafios. Piracicaba, Brasil. 414 p.

ANALYTICAL SOFTWARE. 2008. Statistix® versión 7.0. 14 sep 2008. Analytical Software, Florida, EE. UU.

ARANGO SERNA, M. D.; GÓMEZ M., R. A.; ZAPATA CORTES, J. A. 2013. Medición y mejoramiento de la operación de despacho de carbón a través de modelos estadísticos R&R. *Boletín de*

- Ciencias de la Tierra (33): 135-146. <https://revistas.unal.edu.co/index.php/rbct/article/view/29872/41118>
- BOJÓRQUEZ-RAMOS, C.; GARCÍA-GUTIÉRREZ, C.; SANTAMARÍA-MIRANDA, A. 2016. Pathogenicity and infection events of a *Beauveria bassiana* native strain in Tobacco Budworm, *Heliothis virescens*. Southwestern Entomologist 41 (3): 633-642. <https://doi.org/10.3958/059.041.0306>
- BOLDT, P. E.; MARSTON, N. 1974. Eggs of the greater wax moth as a host for *Trichogramma*. Environmental Entomology 3 (3): 545-548. <https://doi.org/10.1093/ee/3.3.545>
- BURGES, H. D. 1998. Formulation of microbial biopesticides. Beneficial microorganisms, nematodes and seed treatments. Kluwer Academic Publishers, Londres, Reino Unido. 424 p. <https://doi.org/10.1007/978-94-011-4926-6>
- BUSTILLO-PARDEY, A. E. 2013. Insectos plaga y organismos benéficos del cultivo de la caña de azúcar en Colombia. Cenicaña, Cali, Colombia. 170 p. https://www.cenicana.org/pdf_privado/documentos_no_seriadados/libro_plagas/libro_plagas.pdf
- CARDONA, L. F.; SOTO, G. A. 2015. Susceptibilidad de *Diatraea saccharalis* (F.) (Lepidoptera: Crambidae) a diferentes hongos entomopatógenos en caña panelera. Boletín científico Centro de Museos, Museo de Historia Nacional 19 (2): 95-103. [http://190.15.17.25/boletincientifico/downloads/Boletin\(19\)2_6.pdf](http://190.15.17.25/boletincientifico/downloads/Boletin(19)2_6.pdf)
- CHAMPION, O. L.; WAGLEY, S.; TITBALL, R. W. 2016. *Galleria mellonella* as a model host for microbiological and toxin research. Virulence 7 (7): 840-845. <https://doi.org/10.1080/21505594.2016.1203486>
- CHÁVARRY BACA, M. S. 2015. Efecto de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* sobre larvas de *Heliothis virescens*, en condiciones de laboratorio. Tesis Biólogo - Microbiólogo. Universidad Nacional de Trujillo. Facultad de Ciencias Biológicas. Perú. 52 p. <http://dspace.unitr.u.edu.pe/handle/UNITRU/4534>
- COHEN, C. A. 2004. Insects diets. Science and Technology. CRC Press. Florida, EE. UU. 324 p.
- CONTEXTO GANADERO. 2017. Preocupación por brote de langosta llanera en Vichada. Disponible en: <http://www.contextoganadero.com/regiones/preocupacion-por-brote-de-langosta-llanera-en-vichada> [Fecha revisión: 30 noviembre 2019].
- DÍAZ, J. 2016. Acción de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* (Berliner), como control biológico de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). Lepidoptera: Noctuidae. Revista Temas Agrarios 21 (2): 86-91. <https://doi.org/10.21897/rta.v21i2.904>
- DÍAZ, A.; GÓMEZ, M.; GRIJALBA, E.; SANTOS, A.; CRUZ, F.; LEÓN, D.; ALARCÓN, E.; COTES, A. 2018. Desarrollo y escalamiento de bioplaguicidas. pp. 628-691. En: Cotes, A. D. (Ed.). Control biológico de fitopatógenos, insectos y ácaros. Volumen 2. Aplicaciones y perspectivas. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA), Mosquera, Colombia. 512 p. <http://hdl.handle.net/20.500.12324/34077>
- EBRATT, E. E.; ESPINEL CORREAL, C.; GÓMEZ, M. I.; VILLAMIZAR, L. F.; COTES, A. M.; GUTIÉRREZ, J. C.; BARRERO TRIANA, N.; MARTÍNEZ GRANJA, E.; LEÓN, G. 2000. La langosta llanera en Colombia. Boletín Técnico. Enero 2000. Corpoica, Mosquera, Colombia. 103 p. <http://hdl.handle.net/20.500.12324/17955>
- ESPINEL CORREAL, C.; EBRATT, E. E.; COTES, A. M. 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. <https://doi.org/10.25100/socolen.v24i1.9823>
- ESPINEL CORREAL, C.; TORRES TORRES, L. A.; VILLAMIZAR RIVERO, L. F.; BUSTILLO PARDEY, A. E.; ZULUAGA MOGOLLÓN, M. V.; COTES PRADO, A. M. 2018. Hongos entomopatógenos en el control biológico de insectos plaga. Cap. 6. pp. 338-367. En: Cotes, A. M. (Ed.). Control biológico de fitopatógenos, insectos y ácaros. Volumen 1. Agentes de control biológico. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA), Mosquera, Colombia. 568 p. <http://hdl.handle.net/20.500.12324/34071>
- FARIA, M. R.; WRAIGHT, S. P. 2007. Mycoinsecticides and mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. Biological Control 43 (3): 237-256. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2007.08.001>
- GANDARILLA-PACHECO, F. L.; GALÁN-WONG, L. J.; LÓPEZ-ARROYO, J. I.; RODRÍQUEZ-GUERRA, R.; QUINTERO-ZAPATA, I. 2013. Optimization of pathogenicity tests for selection of native isolates of entomopathogenic fungi isolated from citrus growing areas of México on adults of *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae). Florida Entomologist 96 (1): 187-195. <https://doi.org/10.1653/024.096.0125>
- IGNOFFO, C. M.; MCINTOSH, A. H.; GARCÍA, C. 1983. Susceptibility of larvae of *Heliothis zea*, *H. virescens* and *H. armigera* [Lep.: Noctuidae] to 3 baculoviruses. Entomophaga 28 (1): 1-8. <https://doi.org/10.1007/BF02372091>
- INSTITUTO COLOMBIANO AGROPECUARIO (ICA). 2017. Informe especial: El ICA le sigue la pista a la langosta llanera en el municipio de Cumaribo. Disponible en: <http://www.ica.gov.co/Noticias/Todas/El-ICA-le-sigue-la-pista-a-la-langosta-llanera.aspx> [Fecha revisión: 3 marzo 2019].
- JENKINS, N. E.; GRZYWACZ, D. 2000. Quality control of fungal and viral biocontrol agents assurance of product performance. Biocontrol Science and Technology 10 (6): 753-777. <https://doi.org/10.1080/09583150020011717>
- LACEY, L. A. 2012. Manual of the techniques in invertebrate pathology. 2nd Edition. Elsevier Inc. Gran Bretaña, Reino Unido. 504 p.
- LACEY, L. A. 2017. Microbial control of insect and mite pests. 1st Edition. Elsevier Inc. Gran Bretaña, Reino Unido. 482 p.
- LASTRA BORJA, L. A.; GÓMEZ LAVERDE, L. A. 2006. La cría de *Diatraea saccharalis* (F.) para la producción masiva de sus enemigos naturales. Centro de Investigación de la Caña de Azúcar de Colombia (Cenicaña). Serie Técnica 36: 1-30. https://www.cenicana.org/pdf_privado/serie_tecnica/st_36/st_36.pdf
- LAYTON, B. 1983. The effects of feeding by bean leaf beetle larvae, *Cerotoma trifurcata* (Foster), on nodulation and nitrogen fixation of soybeans. Tesis de Maestría. Louisiana State University, EE. UU. 105 p.
- LEÓN, M. G. A.; GUEVARA, E. J. 2006. Manejo integrado de insectos plagas en soya para los Llanos Orientales. pp. 181-192. En: Jaramillo, C. A.; Cubillos, N. (Eds.). Soya (*Glycine max* (L.) Merrill) alternativa para los sistemas de producción de la Orinoquía colombiana. Plan estratégico de investigación y desarrollo tecnológico de soya. Corpoica. Villavicencio, Meta, Colombia. 224 p.
- LLAMOSAS R., L. E.; MEZA CONTRERAS, L. G.; BOTERO ARBELAEZ, M. 2007. Estudio de repetibilidad y reproducibilidad utilizando el método de promedios y rangos para el aseguramiento de la calidad de los resultados de calibración de acuerdo con la norma técnica NTC-ISO/IEC 17025. Universidad Tecnológica de Pereira Colombia, Scientia et Technica 1 (35): 455-460. <https://doi.org/10.22517/23447214.5479>
- MOLINA ACEVEDO, J. P.; SAMUELS, R. I.; MACHADO, I. R.; DOLINSKI, C. 2007. Interactions between isolates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and the entomopathogens nematode *Heterorhabditis bacteriophora* JPM4 during infection of the sugar cane borer *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae). Journal of Invertebrate Pathology 96 (2): 187-192. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2007.04.003>
- NAVA-PÉREZ, E.; GARCÍA-GUTIÉRREZ, C.; CAMACHO-BÁEZ, J. R.; VÁSQUEZ-MONTOYA, E. L. 2012. Bioplaguicidas: una opción para el control biológico de plagas. Revista Ra Ximhai 8 (3): 17-29. <https://doi.org/10.35197/rx.08.03.e2.2012.03.en>
- PAISAN, Y.; MORET, J. 2010. La repetibilidad y reproducibilidad en el aseguramiento de la calidad de los procesos de medición. Universidad de Oriente. Santiago de Cuba, Cuba. Revista Tecnología Química 30 (2): 117-121.

- PARRA, J. 2001. Técnicas de criação de insetos para programas de controle biológico. ESALQ/FEALQ. Piracicaba, Brasil. 137 p.
- PORTILLA, R. M.; STREET, D. 2006. Nuevas técnicas de producción masiva automatizada de *Hypothenemus hampei* sobre la dieta artificial Cenibroca modificada. *Revista Cenicafé* 57 (1): 37-50.
- PŮŽA, V.; MRÁČEK, Z. 2009. Mixed infection of *Galleria mellonella* with two entomopathogenic nematode (Nematoda: Rhabditida) species: *Steinernema affine* benefits from the presence of *Steinernema kraussei*. *Journal of Invertebrate Pathology* 102 (1): 40-43. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.06.005>
- RAVENSBURG, W. J. 2011. Quality control. pp. 129-197. En: Gould, J.; Hoelmer, K.; Goolshy, J. (Eds.). A roadmap to the successful development and commercialization of microbial pest control products for control products for control of arthropods. *Progress in Biological Control*, vol 10. Editorial Springer. Nueva York, EE. UU. 383 p. https://doi.org/10.1007/978-94-007-0437-4_4
- REHN, J. A. G. 1906. Studies in south and central american Acridinae (Orthoptera), with the descriptions of a new genus and six new species. *Proceeding of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia* 58 (1): 10-50. <https://www.jstor.org/stable/4063081>
- RILEY, E. G.; CLARK, S. M.; FLOWERS, R. W.; GILBERT, A. J. 2002. Family 124. Chrysomelidae Latreille 1802. pp. 617-691. En: Arnett Jr, R. H.; Thomas, M. C.; Skelley, P. E.; Howard, J. F. (Eds.). *American beetles. Polyphaga: Scarabaeoidea through Curculionoidea. Vol. 2.* Editorial CRC Press. EE. UU. 861 p.
- 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.
- SHABANA, Y. M.; MÜLLER-STÖVER, D.; SAUERBORN, J. 2003. Granular Pesta formulation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *orthoceras* for biological control of sunflower broomrape: efficacy and shelf-life. *Biological Control* 26 (2): 189-201. [https://doi.org/10.1016/S1049-9644\(02\)00130-5](https://doi.org/10.1016/S1049-9644(02)00130-5)
- SILVA, J.; TORREJÓN, G.; BAY-SCHMITH, E.; LARRAIN, A. 2003. Calibración del bioensayo de toxicidad aguda con *Daphnia pulex* (Crustacea: Cladocera) usando un tóxico de referencia. *Gayana (Concepción)* 67 (1): 87-96. <https://doi.org/10.4067/S0717-65382003000100011>
- SILVA, J.; FUENTEALBA, E.; BAY-SCHMITH, E.; LARRAÍN, A. 2007. Estandarización del bioensayo de toxicidad aguda con *Diplodon chilensis* usando un tóxico de referencia. *Gayana (Concepción)* 71 (2): 135-141. <https://doi.org/10.4067/S0717-65382007000200001>
- TEXEIRA M. L. F.; FRANCO, A. A. 2007. Susceptibilidade de larvas de *Ceratomyia arcuata* Olivier (Coleoptera: Chrysomelidae) a *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin, *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin e *Bacillus thuringiensis* Berliner. *Ciencia Rural* 37 (1): 19-25. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782007000100004>
- TSAI, C. J.-Y.; LOH, J. M. S.; PROFT, T. 2016. *Galleria mellonella* infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing. *Virulence* 7 (3): 214-229. <https://doi.org/10.1080/21505594.2015.1135289>
- UGINE, T. A.; WRAIGHT, S. P.; SANDERSON, J. P. 2013. Microbial biological control potential of three strains of *Beauveria bassiana* s. l. against greenhouse shore fly *Scatella tenuicosta*: Assessment of virulence, mass production capacity, and effects on shore fly reproduction. *Biological Control* 65 (3): 348-356. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2013.03.014>
- VALENCIA R., R. A.; LIGARRETO M., G. A. 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. <https://revistas.unal.edu.co/index.php/agrocol/article/view/18018>
- ZAR, J. H. 1999. *Biostatistical analysis.* 4th Edition. Prentice Hall. New Jersey, EE. UU. 663 p.
- ZHU, F.; PARTHASARATHY, R.; BAI, H.; WOITHE, K.; KAUSMANN, M.; NAUEN, R.; HARRISON, D. A.; PALLI, S. R. 2010. A brain-specific cytochrome P 450 responsible for the majority of deltamethrin resistance in the QTC279 strain of *Tribolium castaneum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (19): 8557-8562. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000059107>

Origen y financiación

El presente trabajo derivó del proyecto de investigación "Técnicas de laboratorios acreditadas y registradas ante organismos de inspección" realizado entre los años 2015-2016, y financiado por la Corporación colombiana de investigación agropecuaria (AGROSAVIA).

Contribución de los autores

Todos los autores contribuyeron al diseño y concepción del estudio y redacción del documento. El primer y segundo autor, Lissette Torres-Torres y Carlos Espinel-Correal, participaron en la ejecución de los ensayos, la obtención y análisis de resultados. El tercer autor, Adriana Marcela Santos-Díaz, participó en el análisis de resultados. Todos los autores leyeron y aprobaron el manuscrito final.