

PROCOLOS DE CRIANZA DE
CONTROLADORES

Biológicos



Protocolo I

Crianza masiva de especies del género *Chrysoperla*

Protocolo II

Crianza masiva de *Telenomus remus* (Nixon)

Protocolo III

Producción de nematodos entomopatógenos



PERÚ

Ministerio de Agricultura y Riego

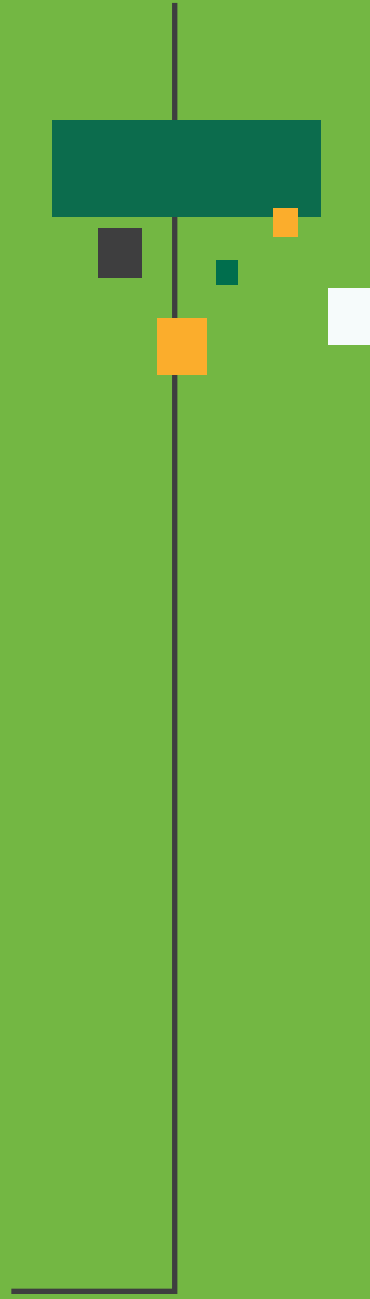
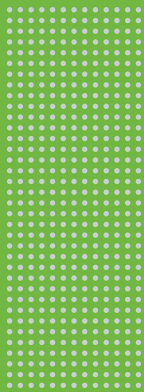


Instituto Nacional de Innovación Agraria

EL PERÚ PRIMERO



MINISTERIO DE AGRICULTURA Y RIEGO
INSTITUTO NACIONAL DE INNOVACIÓN AGRARIA
DIRECCIÓN DE DESARROLLO TECNOLÓGICO AGRARIO



Protocolos de crianza de
controladores biológicos



Protocolos de crianza de controladores biológicos

Ministro de Agricultura y Riego
Ing. Jorge Luis Montenegro Chavesta

Viceministro de Desarrollo e Infraestructura Agraria y Riego
Econ. Carlos Alberto Ynga La Plata

Viceministro de Políticas Agrarias
Alberto Dante Maurer Fossa, Ph.D.

Jefe del INIA
Jorge Luis Maicelo Quintana, Ph. D.

© Instituto Nacional de Innovación Agraria-INIA

Proyecto 071_PI

“Diseño de un paquete de manejo ecológico para el control de *Spodoptera frugiperda* "cogollero" en el cultivo de maíz amarillo duro en las regiones de Lambayeque y La Libertad”

Elaboración de contenido:

Edgar Darwin Pérez Tesén
María Elena Neira de Perales

Editado por:

Instituto Nacional de Innovación Agraria - INIA
Equipo Técnico de Edición y Publicaciones
Av. La Molina 1981, Lima- Perú
(51 1) 240-2100 / 240-2350
www.inia.gob.pe

Editor general:

Eliana Alviárez Gutierrez, D. Sc.

Revisión de contenido:

Betty Flores Gonzales
Heillen Calderón Castillo
Gabriela Salazar Alvarez

Diseño y diagramación:

Abner Fernando Mio Torrejón
Luis Carlos Arévalo Mercado
Jeams Lopez Acaro
Juan Pablo Gonzales Delgado

Hecho el Depósito Legal en la Biblioteca Nacional del Perú N° 2020-05234

Prohibida la reproducción de este libro por cualquier medio, total o parcialmente, sin permiso expreso.

Publicado:

Agosto, 2020

Primera edición:

Agosto, 2020

Tiraje:

500 ejemplares

Impreso en: Vayu Advertising & Communications S.A.C.

RUC: 20604037361

Dirección: De los Ingenieros Nro. 110 Dpto. 102 - Santiago de Surco

E-mail: ventas@vayucunicaciones.com

ISBN:

978-9972-44-062-5



Tabla

de contenido

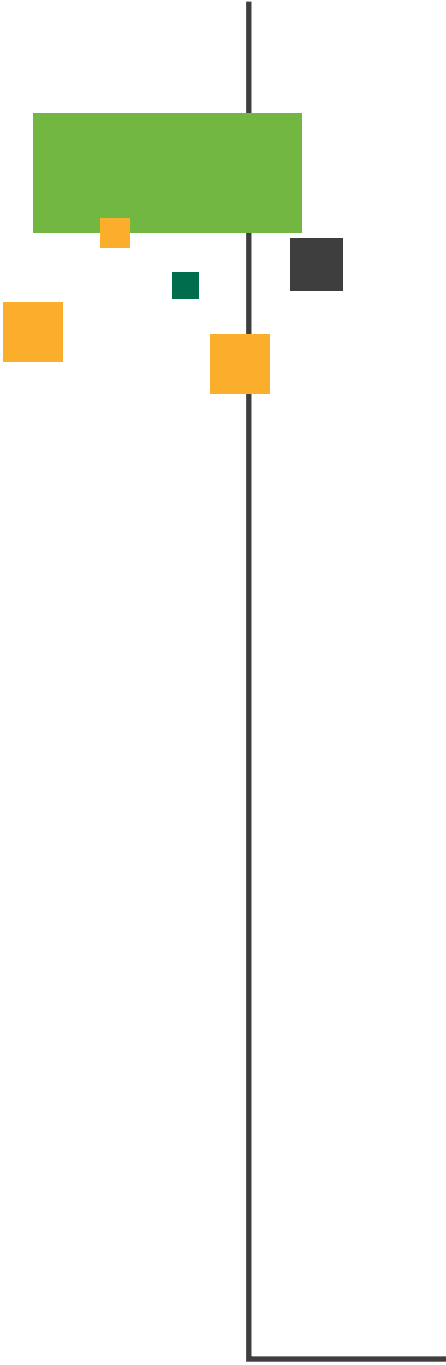
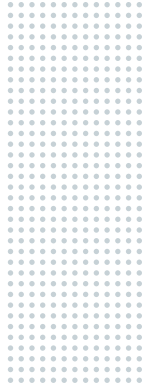
Presentación	6	
Protocolo I		
Crianza masiva de especies del género <i>Chrysoperla</i>	8	
1. Introducción	8	
2. Clasificación taxonómica	8	
3. Ciclo biológico de <i>Chrysoperla</i> sp.	9	
3.1 Huevos	10	
3.2 Larva	10	
3.3 Pre-pupa	10	
3.4 Pupa	10	
3.5 Adulto	10	
4. Objetivos	11	
5. Materiales	11	
6. Metodología de crianza de <i>Chrysoperla carnea</i> y <i>Chrysoperla externa</i>	12	
6.1 Cosecha de posturas	12	
6.2 Acondicionamiento de posturas	12	
6.3 Crianza de larvas	12	
6.4 Obtención de pupas	13	
6.5 Alimentación de los adultos	14	
6.6 Producción	14	
7. Referencias	15	
Protocolo II		
Crianza masiva de <i>Telenomus remus</i> (Nixon)	16	
1. Introducción	16	
2. Clasificación taxonómica de <i>Telenomus remus</i> (Nixon)	17	
3. Ciclo biológico de <i>Telenomus remus</i> (Nixon)	18	
4. Objetivos	18	

5.	Materiales	18
6.	Metodología de crianza de <i>Telenomus remus</i>	19
6.1	Crianza masiva de <i>Spodoptera eridania</i>	19
6.1.1	Cosecha de posturas	19
6.1.2	Crianza de larvas	19
6.1.3	Cosecha de pupas y adultos	20
6.2	Crianza masiva de <i>Telenomus remus</i>	21
6.2.1	Unidades de crianza y parasitación	21
6.2.2	Alimentación de adultos	21
7.	Referencias	23

Protocolo III

Producción de nematodos entomopatógenos 24

1.	Introducción	24
2.	Clasificación taxonómica	24
3.	Ciclo de vida de <i>Heterorhabditis</i>	25
4.	Objetivos	26
5.	Materiales	26
6.	Metodología	27
6.1	Crianza masiva de <i>Galleria mellonella</i>	27
6.2	Producción de nematodos entomopatógenos	29
6.2.1	Obtención de la solución madre	29
6.2.2	Trampa <i>White</i> modificada y cosecha de juveniles infectivos (JI)	29
6.2.3	Conteo de infectivos juveniles (IJ)	30
6.2.4	Conservación de infectivos juveniles (JI)	31
7.	Referencias	32



Presentación

Los controladores biológicos o biocontroladores, son organismos vivos de gran importancia en el área agrícola, ya que mediante la interacción y capacidad biológica (parasitismo, depredación, patogenicidad y virulencia) controlan la densidad poblacional de las plagas de un determinado cultivo.

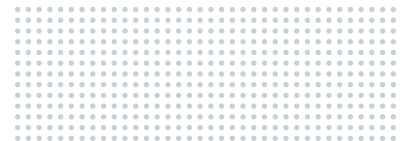
El uso excesivo e indiscriminado de agroquímicos en los cultivos, ha generado el aumento a la resistencia y propagación de las plagas, así como la contaminación ambiental, factores que han incentivado el uso de los controladores biológicos en el sector agrícola. No obstante, su actividad se ha visto disminuida debido a que poseen una baja tasa de reproducción, conllevando a que su población sea mínima en los campos agrícolas. Por tanto, se ha visto necesario buscar alternativas para aumentar su densidad poblacional; para ello, han surgido laboratorios encargados de la crianza y producción masiva de controladores biológicos, los cuales abarcan tanto a insectos, como a microorganismos, destacándose en este último, los virus, bacterias, hongos y nematodos entomopatógenos.

El Ministerio de Agricultura y Riego (MINAGRI), a través del Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA) pone a su disposición el presente documento titulado **Protocolos de crianza de controladores biológicos**, dirigido a técnicos, profesionales y toda persona interesada en el control biológico de plagas importantes en los cultivos, especialmente en el cultivo de maíz amarillo duro como una alternativa ambientalmente sostenible.

Este documento describe las metodologías para la producción masiva de tres controladores biológicos, tales como: *Telenomus remus*, *Chrysoperla* spp. y *Heterorhabditis* spp., optimizadas mediante la intervención del proyecto 071_PI “Diseño de un paquete de manejo ecológico para el control de *Spodoptera frugiperda* “cogollero” en el cultivo de maíz amarillo duro en las regiones de Lambayeque y La Libertad”, financiado por el Programa Nacional de Innovación Agraria (PNIA).

Jorge Luis Maicelo Quintana, Ph.D.

Jefe del INIA



Protocolo I

Crianza masiva de especies del género *Chrysoperla*

1. Introducción

Chrysoperla spp., pertenece a la familia Chrysopidae, una de las familias más grandes dentro del orden de los neurópteros, con cerca de 2 000 especies descritas, de las cuales, varias de ellas pueden ser utilizadas como agentes de control biológico (New, 1991; Valencia, Romero, Valdez, Carrillo y López, 2006). Son conocidas comúnmente como “alas de encaje”, “leones de áfidos” o “crisopas” (Núñez, 1988), siendo esta última denominación la más difundida. Las especies de este género han mostrado condiciones de adaptabilidad a diferentes ambientes, lo que les ha permitido una amplia distribución geográfica (Gitirana, Carvalho, Souza y Santa, 2001).

El género *Chrysoperla*, se caracteriza por atacar muchas plagas agrícolas como, cochinillas, *pseudococcus*, pulgones, moscas blancas, ácaros y otros (Debach, 1977). Además, existen trabajos en donde se señala que *Chrysoperla externa* se alimenta de *Spodoptera frugiperda* en maíz y en cultivo de alfalfa y papa (Salazar, 2016). Las especies de este género: *Chrysoperla externa*, *Chrysoperla carnea* y *Chrysoperla asoralis*, han despertado gran interés en el control biológico por presentar larvas voraces, polípagas y activas (New, 1991), siendo las larvas de estadio III, las de mayor voracidad (Salazar, 2016). Las larvas detectan la presa a través del contacto directo, al atacar a la presa, se lanza hacia ella e inyecta enzimas a través de la mandíbula, usando el extremo final de su abdomen para apoyarse y estabilizarse mientras está atacando (Clark, 1978).

2. Clasificación taxonómica

A continuación se muestra la clasificación taxonómica de *Chrysoperla carnea* según lo propuesto por Stephens (1836).

Phylum	: Artropoda
Clase	: Insecta
Orden	: Neuroptera
Familia	: Chrysopidae

Género : *Chrysoperla*
 Especie : *Chrysoperla externa*, *Chrysoperla carnea*
 Nombre común : “insecto gasa”, “alas de encaje” o “crisopas”

3. Ciclo biológico de *Chrysoperla sp.*

Presenta un ciclo biológico holometábolo o metamorfosis completa. Sus estadios biológicos se presentan en la figura 1.

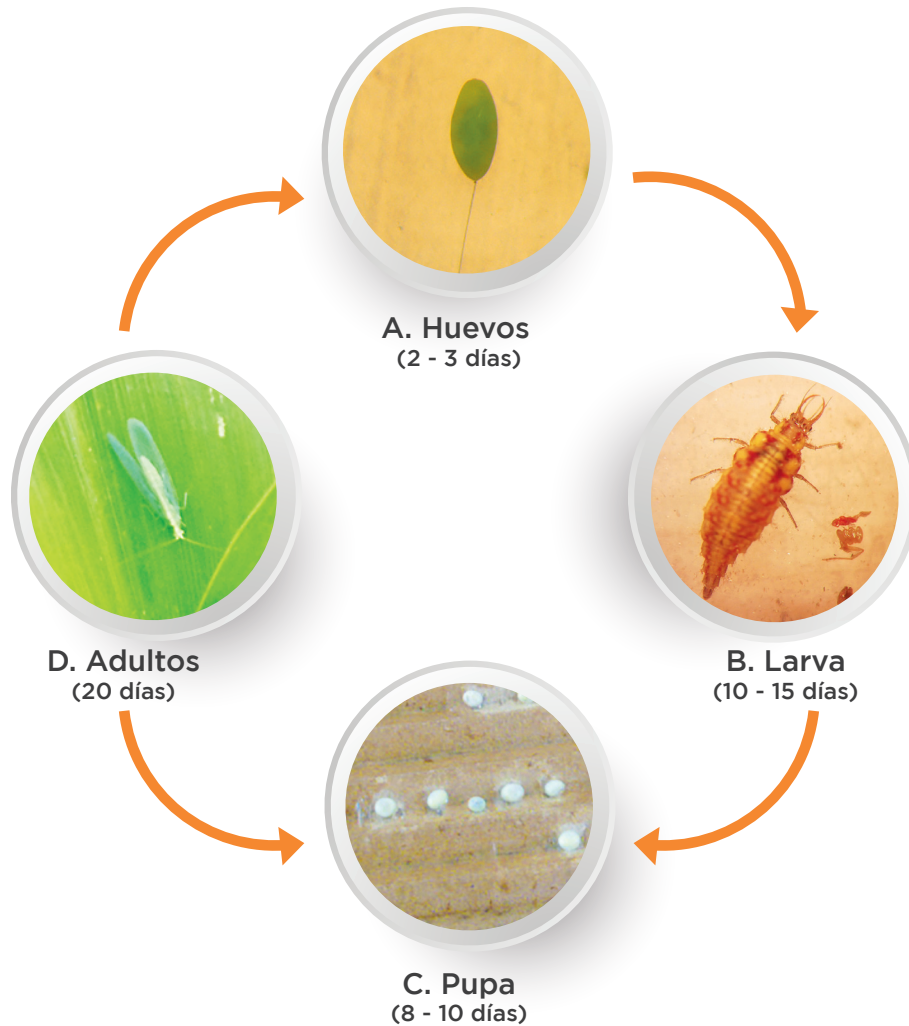


Figura 1. Ciclo biológico de *Chrysoperla sp.*

3.1 Huevos

Los huevos se presentan en este estadio en forma oval e individuales, sostenidos cada uno por un pedicelo gelatinoso (Núñez, 1988). El tiempo de duración es de 2 a 3 días aproximadamente (Figura 1A).

3.2 Larva

Presenta un tipo campodeiforme, su cuerpo fusiforme de color crema sucio, con marcas simétricas de color marrón o negro, cabeza prognata aplanada, el aparato bucal tiene la forma de una pinza de lados curvos. No posee ocelos, las antenas son cortas, filiformes, multisegmentadas y nacen encima de las mandíbulas. Las larvas pasan por dos mudas y tres estadios (Núñez, 1988).

El tiempo de duración del estadio es de 10 días a 15 días aproximadamente (Figura 1B).

3.3 Pre-pupa

En este estado, la larva acumula grasa, engrosa el abdomen, el cuerpo se aclara y el meconium es eliminado como una sustancia negruzca que puede ser visualizada a través del cocón. Se inicia cuando la larva suspende la alimentación después de su máximo desarrollo, procediendo a la elaboración del tejido del cocón con hilos finos de una sustancia mucoproteica, en un lugar protegido (Núñez, 1988).

3.4 Pupa

Presenta un tipo de pupa denominada exarata (pupa libre) de color verde, casi esférica de textura apergaminada, que puede ser apreciada a través del cocón blanco (Núñez, 1998). El periodo pupal dura aproximadamente de 8 días a 10 días (Figura 1C).

3.5 Adulto

Es un insecto de forma alargada, color verde claro, con una franja amarilla longitudinal central en el dorso del cuerpo, desde la base de la cabeza hasta el ápice del abdomen. Tiene manchas de color rojo violáceo que se encuentran presentes en el rostro. Las antenas son más cortas que la expansión alar, posee ojos dorados, cuerpo frágil y alas delgadas con numerosas venaciones, motivo por el cual, comúnmente son llamados “insectos gasa” o “alas de encaje”(Núñez, 1988). El período como adulto dura aproximadamente entre 20 días (Figura 1D).

4. Objetivo

- Producir masivamente y conservar núcleos de crisópidos de *Chrysoperla externa* y *Chrysoperla carnea* bajo condiciones controladas de laboratorio.

5. Materiales

- Huevos de *C. carnea* y *C. externa*
- Huevos de *Sitotroga cerealella*
- Miel
- Levadura de cerveza
- Agua hervida
- Polen
- Termohigrómetro
- Tapers plásticos rectangulares N° 5
- Placas de Petri 150 mm
- Baldes plásticos de 20 L
- Caja con luz led
- Cartón corrugado y papel cuadrimax
- Pinceles y brochas
- Balanza analítica
- Cucharas
- Tela poliseda
- Tull
- Refrigeradora
- Alcohol (96 %)
- Algodón hidrofílico
- Etiquetas

6. Metodología de crianza de *Chrysoperla carnea* y *Chrysoperla externa*

6.1 Obtención de posturas

La obtención de posturas (Figura 2) consiste en la colecta de los huevos de crisopa. Para esto, las posturas deben ser acondicionadas en tapers con tapa de plástico rectangular N° 5. Las tapas deben ser recortadas en la parte interna dejando 3 cm de borde y reemplazadas con tela blanca para la aireación del material biológico.

Los adultos de crisopas tienen un período de pre-oviposición de aproximadamente una semana, seguido del período de oviposición que se extiende por 20 días aproximadamente.

Pasado este tiempo, ovipositan pocos huevos y no es rentable mantenerlos.



Figura 2. Obtención de posturas.

6.2 Recuperación de pupas

Una vez formadas las pupas son retiradas del cartón corrugado, mojándolo, para facilitar su obtención (Figura 3). Después, se instalan en los baldes de producción grupos de 700 pupas por balde y se espera la emergencia de los adultos.

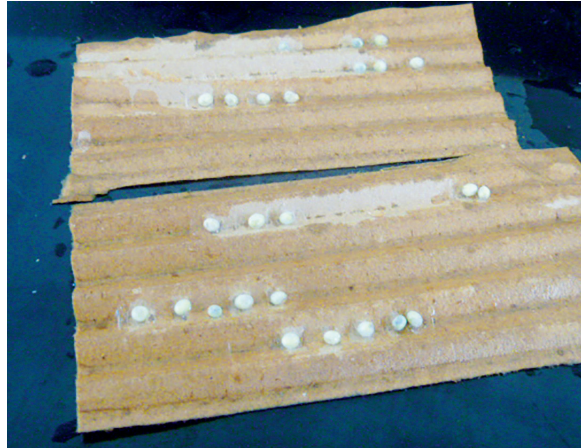


Figura 3. Obtención de pupas.

6.3 Crianza de larvas

Una vez eclosionadas las posturas, emergen las larvas, las cuales son repartidas en los tapers N° 5 en grupos de 1 000 huevos. Al emerger las larvas deben ser alimentadas con 2 g de *Sitotroga cerealella* (Figura 4). A los 7 días, el estadio larval está avanzado por lo que se colocan tiras de cartón corrugado de 4 a 5 cm de ancho en la base en forma transversal, además de acordeones de papel dentro del taper.



Figura 4. Crianza de larvas.

6.4 Alimentación de los adultos

El alimento de los adultos consiste en formar una pasta semisólida a base de polen, miel de abeja, levadura de cerveza en polvo y agua hervida, la cual debe ser refrigerada por 24 horas. Posteriormente, se colocan en cantidades necesarias sobre la malla superior de la unidad de oviposición de los adultos de las crisopas. Junto a esto, se coloca agua en un algodón. El alimento y el agua es suministrado según el requerimiento (Figura 5).



Figura 5. Alimentación de adultos.

6.5 Producción

En condiciones controladas de temperatura y humedad se realiza la producción de huevos de *Chrysoperla*. El rango de temperatura varía de 20.6 a 31 °C con 69 a 82 % de humedad, condiciones adecuadas para producir de 7 - 14 huevos por día por hembra, que durante todo el período de oviposición (20 días) puede producir aproximadamente de 140 a 280 huevos por hembra; considerando un ratio sexual de 1:1, la producción final sería aproximadamente de 5 250 a 10 500 huevos por cosecha, por unidades de oviposición, a partir de 1 500 adultos.

7. Referencias

- Clark, J. C. (1978). *Biological control: A guide to natural Enemies in north America*. University of California Statewide IPM Project.
- Debach, P. (1977). *Lucha biológica contra los enemigos de las plantas*. Madrid, España. Mundi-Prensa.
- Gitirana, J., Carvalho, C., Souza, B. y Santa, L. (2001). Flutuação populacional de espécies de *Ceraeochrysa* Adams. 1982 (Neuroptera: Chrysopidae) em citros, na região de Lavras-MG. *Ciência e Agrotecnologia*, 25(3), 550-559.
- Ingeborg, Z., Arévalo H. y Mejía, R. (2007). El gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) y algunas plantas transgénicas. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 1(1), 103-113.
- Jiménez, E. (2009). *Métodos de control de plagas*. Managua: Universidad Nacional Agraria. Recuperado de <http://repositorio.una.edu.ni/2457/1/nh10j61c.pdf>
- New, T. (1991). Neuroptera. En: *Naumann, ID et al.(Eds). The Insects of Australia. Division of Entomology Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization*.
- Nicholls, Cl. (2008). *Control biológico de insectos: un enfoque agroecológico*. Antioquía: Universidad Nacional de Antioquía. Recuperado de <https://www.socla.co/wp-content/uploads/2014/ClaraNicholls.pdf>
- Núñez, Z. (1988). Ciclo biológico y crianza de *Chrysoperla externa* y *Ceraeochrysa cincta* (Neuroptera, Chrysopidae). *Revista Peruana de Entomología*, 31, 76-82.
- Salazar, K. (2016). *Capacidad de predación de larvas de Chrysoperla externa Hagen sobre Spodoptera frugiperda (J. E. Smith) en condiciones de laboratorio del museo de entomología Klaus Raven Buller – Lima* (Tesis de pregrado).Universidad Nacional del Centro del Perú, Perú. Recuperado de <http://repositorio.uncp.edu.pe/handle/UNCP/4024>
- Valencia, L., Romero, J., Valdez, J., Carrillo, J. y López, V. (2006). Taxonomía y registros de Chrysopidae (Insecta: Neuroptera) en el estado de Morelos, México. *Acta zoológica mexicana*, 22(1), 17-61.



Protocolo II

Crianza masiva de *Telenomus remus* (Nixon)

1. Introducción

Telenomus remus (Nixon) es una avispa parasitoide de huevos de lepidóptero (Cave y Acosta, 1999), estudios realizados han reportado que esta avispa puede parasitar huevos de hasta 30 especies de lepidópteros (Morales, Gallardo, Vásquez y Ríos, 2000). En estudios realizados por Wojcik, Whitcomb y Habeck (1976), se encontró parasitismo de *Telenomus remus* entre un 80 - 100 % de huevos de *S. frugiperda* (Smith), *S. latisfacia* (Walker), *S. exigua* (Hubner) y *S. eridania* (Cramer), debido a las kairomonas que estimulan el reconocimiento de *Spodoptera* por parte de las hembras de *Telenomus remus* (Nordlund, Strand, Lewis y Vinson, 1987).

En un trabajo realizado por Corrêa, Castro y Cruz (2002), encontraron que las densidades de 9 a 12 hembras de *T. remus* por m² en infestación artificial de plantas de maíz con masas de huevos de *S. frugiperda*, presentaban una parasitación de 74 y 83.3 % respectivamente. En estudios de respuesta funcional de *Telenomus remus* se encontró que el número promedio de huevos parasitados, aumentaba conforme aumentaba la densidad de huevos; la unidad de hembra utilizada se mantenía; la tasa de búsqueda promedio era de 0.79 huevos/huevo en una densidad de 50 huevos y finalmente que la tasa promedio era de 0.39 huevos/huevo en una densidad de 250 huevos (Morales et al., 2000).

En el laboratorio de biocontroladores de la Estación Experimental Agraria Vista Florida se encontró, que el mejor hospedero para la crianza de *Telenomus remus*, era *Spodoptera eridania* (datos no publicados). Las imágenes de la parasitación se muestran en la figura 6.

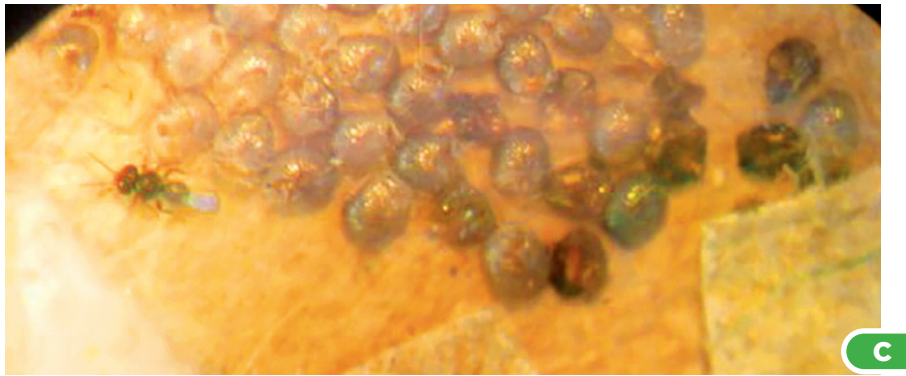
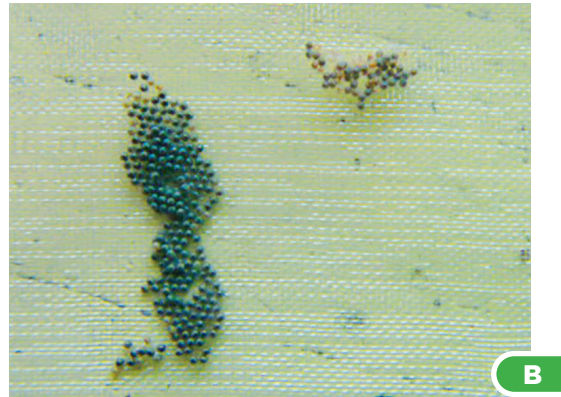


Figura 6. Parasitación de *Telenomus remus*. A) Huevos inmaduros de *Spodoptera eridania*. B) Huevos parasitados de *Spodoptera eridania*. C) Adulto de *Telenomus remus* emergiendo de huevos parasitado.

2. Clasificación taxonómica de *Telenomus remus* (Nixon)

Reino	: Animalia
Phylum	: Artropoda
Clase	: Insecta
Orden	: Himenóptera
Familia	: Platygasteridae
Género	: <i>Telenomus</i>
Especie	: <i>Telenomus remus</i> (Nixon)

3. Ciclo biológico de *Telenomus remus* (Nixon)

Las hembras de *Telenomus remus* depositan huevos que se caracterizan por ser pedicelados en el embrión del hospedero (Hernández y Dilcia, 1993). Después de aproximadamente 12 horas, el huevo se transforma en larva. En total, *Telenomus remus*, pasa por dos estadios larvales (larva I y larva II), diferenciándose el segundo, del primer estadio, por la presencia de segmentos y aberturas espiraculares en el dorso lateral del cuerpo, además presenta mandíbulas rectas y puntiagudas en comparación con las mandíbulas en forma de hoz de la larva del primer estadio (Gómez, 1989; Santos, 1998). Posteriormente, pasa por el estadio de prepupa, el cual se caracteriza por la presencia de discos imaginales bien pronunciados y marcados. Al inicio, la pupa presenta color blanco y opaco, que conforme va madurando se va tornando en color gris y posteriormente en color negro (Gómez, 1989). Los machos emergen antes que las hembras y se aparean en un lapso de tiempo de segundos (Hernández y Dilcia, 1993), presentándose además, una alta tasa de reproducción (Cave y Acosta, 1999).

4. Objetivo

- Producir masivamente y conservar núcleos de *Telenomus remus* bajo condiciones controladas de laboratorio.

5. Materiales

- Adultos de *Telenomus remus*
- Posturas de *Spodoptera eridania*
- Miel de abeja
- Hojas de *Amaranthus* sp. y *Ricinus communis*
- Tapers de plástico de 1 L
- Tapers de plásticos rectangulares N° 5
- Pinceles
- Etiquetas

6. Metodología de crianza de *Telenomus remus*

Para la producción masiva de *Telenomus remus* se adaptó la metodología utilizada en el laboratorio de insectos benéficos del Proyecto Especial Chavimochic, a través del protocolo básico del proceso de crianza de *Spodoptera frugiperda* y flujogramas de producción de *Telenomus remus* (Díaz, 2016).

Para la producción de *Telenomus remus* es necesario realizar la crianza masiva del hospedero, en este caso *Spodoptera eridania*. A continuación se describen los procesos de crianza masiva.

6.1 Crianza masiva de *Spodoptera eridania*

6.1.1 Cosecha de posturas

Para la oviposición de adultos de *Spodoptera eridania* se puede utilizar reposteros plásticos cilíndricos de 3 L, los cuales son forrados en su interior con papel kraft y colocados un recipiente de vidrio lleno de agua con una hoja de higuera y dos recipientes pequeños de plástico con un disco de esponja. Para la alimentación del adulto, los discos son embebidos en agua y el otro en miel de abeja respectivamente.

La cosecha de posturas se realiza de manera diaria o interdiaria, según el requerimiento. Para ello, el papel kraft y la hoja de higuera son retirados ya que éstos contienen los huevos de *Spodoptera eridania*. Los huevos son acondicionados en nuevos reposteros cilíndricos, para la recría de la especie o en cartón, para la parasitación de *Telenomus remus*.

Los adultos de *Spodoptera eridania* tienen un período de oviposición de 15 días, después de ese tiempo, ovipositan poco, por lo que es recomendable descartarlos.

6.1.2 Crianza de larvas

Como unidades de crianza de larvas, se deben emplear dos tipos de tapers de plástico: para neonatos (larva I y II y III) (Figura 7A) se pueden utilizar tapers reposteros de capacidad de 3 L y cubierto con tela organza; y para larvas (IV, V, VI) utilizar tapers rectangulares N° 5. En la base se coloca hojas de papel (bond, kraft, etc.). En el centro de la tapa se recorta un rectángulo, dejando 3 cm en todo el contorno y se coloca un pedazo de tela organza para darle ventilación.

Como alimento para los diferentes estadios larvarios, se recomienda emplear hojas de *Amaranthus* sp. “yuyo” para neonatos (larva I, II y III) y *Ricinus communis* “higuerilla” para larvas (IV, V y VI) (Figura 7B).

6.1.3 Cosecha de pupas y adultos

Una vez formadas las pupas son retiradas del taper N° 5 (Figura 7C) y colocadas en envases de 250 mL con algodón humedecido en la base, para la emergencia de los adultos. Colocar los adultos en reposteros cilíndricos de capacidad de 3 L para la oviposición (Figura 7D).



6.2 Crianza masiva de *Telenomus remus*

6.2.1 Unidades de crianza y parasitación

Para la crianza masiva de *Telenomus remus*, se puede utilizar taper de plástico de capacidad de 1 L con tapa, a la cual se le realiza un orificio en la parte céntrica y se cubre con un papel toalla. En el interior se coloca un millar de huevos parasitados de *Spodoptera eridania*, del cual emergerán adultos de *Telenomus remus* (Figura 8A).

Una vez emergidos los adultos de *Telenomus remus*, en el interior del taper plástico se colocan cartones con posturas inmaduras de *Spodoptera eridania* (posturas ovipositadas en menos de 24 horas).

Las hembras de *Telenomus remus* parasitan las posturas inmaduras y son retirados los cartones conteniendo las posturas parasitadas a las 24 horas de haber sido colocados en el taper de parasitación y depositado en otro recipiente plástico de 1 L, para la emergencia de nuevos adultos (Figura 8B). La emergencia sucede entre los 10 a 15 días, dependiendo de la temperatura (20.9 a 27.1 °C y humedad de 63 a 84 %).

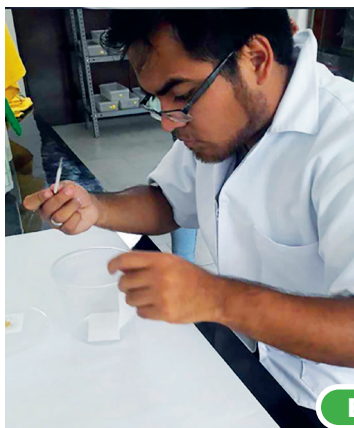
El tiempo que los adultos de *Telenomus remus* utilizan para la parasitación es de una semana, por lo que es importante cambiar diariamente los cartones conteniendo las posturas inmaduras. Después de 10 a 12 días de haber emergido, el adulto pierde la capacidad parasítica y posteriormente muere.

6.2.2 Alimentación de adultos

Para los adultos contenidos en los reposteros de capacidad de un litro, embeber el papel toalla de la tapa con miel de abeja y realizar esta actividad de manera interdiaria (Figura 8C).



A



B



C

Figura 8. Metodología de crianza de *Telenomus remus*. A) Unidad de crianza de *Telenomus remus*. B) Parasitación de posturas de *Spodoptera eridania*. C) Alimentación de adultos de *Telenomus remus*

7. Referencias

- Cave, R. y Acosta, N. (1999). *Telenomus remus* Nixon: un parasitoide en el control biológico del gusano cogollero, *Spodoptera frugiperda* (Smith) *CEIBA*, 40(2), 215-227.
- Corrêa, M., Castro, T. y Cruz, I. (2002). Effect of *Telenomus remus* Nixon (Hymenoptera: Scelionidae) density on control of *Spodoptera frugiperda* (Smith)(Lepidoptera: Noctuidae) egg masses upon release in a maize field. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo*, 1(02), 12-19
- Díaz, F. (2016). Proceso de Crianza de *Spodoptera frugiperda*. Protocolo Básico. Laboratorio de Insectos Benéficos, PECH. Viru, La Libertad. Recuperado de <https://www.senasa.gob.pe/senasa/descargasarchivos/2017/09/Gu%C3%ADa-Pr%C3%A1ctica-producci%C3%B3n-Insectos-Ben%C3%A9ficos.pdf>
- Gómez, H. (1987). Biología de *Telenomus remus* Nixon (Hymenoptera: Scelionidae). *Revista Peruana de Entomología*, 30, 29-72.
- Hernández, J. y Dilcia, M. (1993). *Estudio de la biología de Telenomus remus Nixon (Hymenoptera: Scelionidae) parasitoide de Spodoptera frugiperda (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae)* (Tesis de maestría). Universidad Central de Venezuela, Venezuela. Recuperado de <http://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=GREYLIT.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=018451>
- Morales, J., Gallardo, J. S., Vásquez, C. y Ríos, Y. (2000). Patrón de emergencia, longevidad, parasitismo y proporción sexual de *Telenomus remus* (Hymenoptera: Scelionidae) con relación al cogollero del maíz. *Bioagro*, 13(2), 49-55.
- Nordlund, D., Strand, M., Lewis, W. y Vinson, S. (1987). Role of kairomones from host accessory gland secretion in host recognition by *Telenomus remus* and *Trichogramma pretiosum*, with partial characterization. *Entomologia experimentalis et applicata*, 44(1), 37-43.
- Santos, F. (1998). *Uso combinado de VPN Spodoptera frugiperda, Telenomus remus y aplicaciones de azúcar para el control biológico del cogollero, Spodoptera frugiperda, en maíz* (Tesis de pregrado). Honduras. Recuperado de <https://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/2751/1/CPA-1998-T099.pdf>
- Wojcik, B., Whitcomb, W. y Habeck, D. (1976). Host range testing of *Telenomus remus* (Hymenoptera: Scelionidae). *Florida Entomologist*, 59(2), 195-198.

Protocolo III

Producción de nematodos entomopatógenos

1. Introducción

Los nematodos entomopatógenos son un grupo de organismos con grandes posibilidades de ser utilizados en programas de control biológico (Giayetto y Cichón, 2006). Se caracterizan por ser patógenos obligados de insectos (Del Valle, Dolinski, Barreto, Souza y Samuels, 2008) del orden de himenóptera, lepidóptera, díptera y coleóptera (González, 1998), presentan características de depredadores, parasitoides y patógenos (Argotti, Gallegos, Alcázar y Kaya, 2010). Los grupos de nematodos que son producidos comercialmente son de las familias: Heterorhabditidae y Steinernematidae (Woodring y Kaya, 1998), específicamente del género *Heterorhabditis* y *Steinernema*, los cuales presentan una relación simbiótica con enterobacterias gram negativas del género *Photorhabdus* y *Xenorhabdus* respectivamente. Estas bacterias se encuentran en el intestino del nematodo, básicamente en el estadio infectivo juvenil 3 (IJ3, IJ o dauer) (Figura 9) siendo esencial para el nematodo en la actividad entomopatogénica y su reproducción (Maciel-Vergara, Rodríguez-Hernández, y Chavarría-Hernández, 2010).

El género de nematodo *Heterorhabditis*, fue utilizado en el laboratorio de biocontroladores de la Estación Experimental Agraria Vista Florida, para el cual se establecieron las condiciones óptimas para su producción.

2. Clasificación taxonómica

A continuación se muestra la clasificación taxonómica de *Heterorhabditis*, según lo propuesto por Blaxter et al., (1998).

- Phylum : Nematoda
- Clase : Secernenteos
- Orden : Rhabditida
- Suborden: Rhabditidina
- Familia : Heterorhabditidae
- Género : *Heterorhabditis*
- Especie : *Heterorhabditis bacteriophora*, *Heterorhabditis* sp.

3. Ciclo de vida de *Heterorhabditis*

El ciclo de vida y el conocimiento del complejo de nematodo/bacteria, es similar en las diferentes especies de nematodos entomopatógenos (Hazir, Keskin, Stock, Kaya y Özcan, 2003). El ciclo de *Heterorhabditis*, consiste en seis estadios diferentes: el estadio de huevo, cuatro estadios juveniles (J1-J4) y el estadio adulto (Abolafia, Casado, Gilarte, Medina, Real y Sales, 2008). En los estadios infectivos juvenil (IJ3) los nematodos penetran en los insectos a través de las aberturas naturales (boca, ano y espiráculos) y a través de la cutícula (González, 1998), liberando en el hemoceloma la bacteria mutualista que portan. La bacteria se multiplica rápidamente, produciendo un colapso generalizado que lleva a la muerte del insecto en un período de 24 a 48 horas. (García-Hernández et al., 2009). El dauer o estadio infectivo juvenil 3 (IJ3), se caracteriza por sobrevivir largos periodos en el ambiente sin alimento (Tang, 1958). En menos de dos semanas, los nematodos completan de 2 a 3 generaciones en el cadáver que ocupan dentro de todo el cuerpo del hospedero y producen nuevos juveniles (IJ) que abandonan el insecto y buscan nuevos hospederos. Cuando los nutrientes se acaban, tras pocas semanas, la larva muere y se desintegra completamente (Figura 10). Esta capacidad infectiva, ha hecho que varias de estas especies entomopatógenas se utilicen en el control biológico de insectos que forman plagas (Grewal y Georgis, 1999).



Figura 9. Infectivos juveniles de *Heterorhabditis* sp.

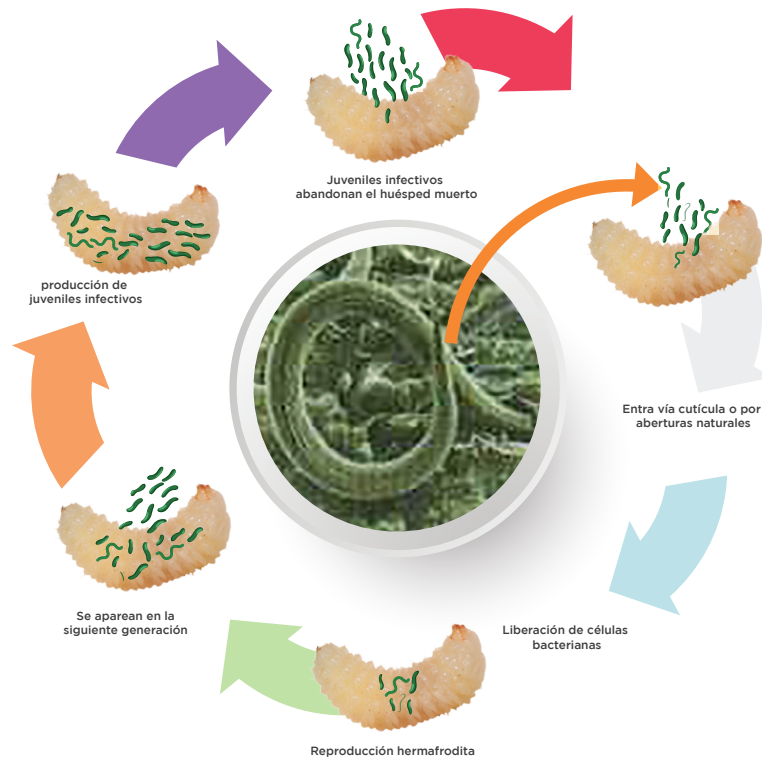


Figura 10. Ciclo Biológico de nemátodos entomopatógenos (DirtWorks, 2001) adaptado.

4. Objetivo

- Producir y conservar cepas de nemátodos entomopatógenos bajo condiciones controladas de laboratorio.

5. Materiales

- Nematodos entomopatógenos: *Heterorhabditis bacteriophora* y *Heterorhabditis* sp.
- Miel de abeja
- Croquetas para perro
- Polen
- Larvas de *Galleria melonella*

- Reposteros plásticos cilíndricos de 5 kg
- Tapers plástico BASA N° 5
- Baldes de 20 L
- Papel toalla
- Jeringa hipodérmica de 20 mL
- Pipeta de 1 mL y 10 mL
- Probetas de 50 mL y 100 mL
- Vasos de precipitación de vidrio
- Rejillas de plástico
- Gambal
- Contómetro de mano
- Antibiótico: megacilina oral

6. Metodología

Para la producción de nematodos entomopatógenos se debe tener en cuenta la crianza del hospedero *Galleria mellonella*, una plaga de las colmenas cuyas larvas en el último estadio se utilizan como hospedero de los nematodos entomopatógenos.

6.1 Crianza masiva de *Galleria mellonella*

Para la crianza de *Galleria mellonella* se realiza el siguiente procedimiento:

- Utilizar reposteros plásticos de 5 kg para la oviposición de adultos de *Galleria mellonella* (Figura 11A), tapar la superficie con tela negra, la cual presenta agujeros para colocar papel bond que sirve para la oviposición de las hembras adultas.
- Realizar la cosecha de posturas diariamente. Para ello, retirar el papel bond, el cual debe contener los huevos de *Galleria mellonella*. Adicionar estos huevos a tapers plásticos cilíndricos de medio litro con 10 g de polen. Acondicionar un millar de posturas de *Galleria mellonella* por 10 g de polen (Figura 11B).

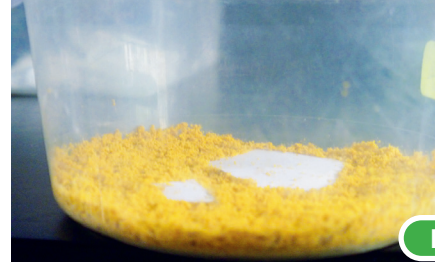


Figura 11. Metodología de crianza de *Galleria mellonella*. A) Oviposición de adultos de *Galleria mellonella*. B) Acondicionamiento de posturas de *Galleria mellonella* en polen.

- Dejar las larvas de *Galleria mellonella* en el alimento de polen hasta que alcancen 1 cm de tamaño (esto por lo general se logra a los 15 días de acondicionados).
- Colocar las larvas (1 cm) en baldes plásticos de 20 L conteniendo una mezcla de miel con croquetas molidas para perro (cachorro) en una proporción de 1:2, es decir, 0.5 kg de miel de abeja por 1 kg de croquetas molidas (Figura 12A). Desinfectar el alimento con antibiótico (0.25 g de megacilina oral) (Figura 12B).

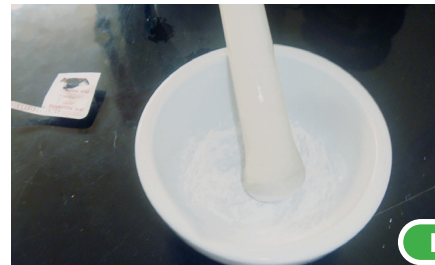


Figura 12. Metodología de producción.
A) Larvas de *Galleria mellonella* en alimento (croquetas molida para perro con miel).
B) Preparación de antibiótico (megacilina oral).

- Dejar las larvas en el alimento durante 10 días, tiempo suficiente para que logren llegar al último estadio larval (en el cual tienen un peso aproximado de 250 mg). Utilizar estas larvas en la parasitación, para la producción de infectivos juveniles de nematodos.

6.2 Producción de nematodos entomopatógenos

Para la producción de nematodos entomopatógenos se utiliza la técnica *in vivo* de Kaya (1993) modificada. Los nematodos entomopatógenos presentan un rango amplio de temperatura (21.2 - 32 °C) y humedad (59 - 75 %). A temperatura y humedad mínima, el ciclo se prolonga hasta 16 días para la caída de juveniles infectivos; a temperatura y humedad máxima, se acorta a 9 días.

6.2.1 Obtención de la solución madre

Para la obtención de la solución madre (solución de nematodos), se utiliza 12 mL de agua destilada con la proporción de 100 nematodos por larva a infestar.

Colocar en la base de un taper plástico (15 cm de largo x 8 cm de ancho) dos hojas de papel toalla y distribuir en toda la superficie 300 larvas de *Galleria mellonella* del último estadio larval.

Esparcir uniformemente 50 % de la solución madre con una jeringa hipodérmica de 20 mL, cubrir con otras hojas de papel toalla y terminar de distribuir el 50 % restante de la solución sobre toda la superficie. Tapar herméticamente el taper.

A partir del tercer día, las larvas de *Galleria mellonella* cambian de color a un marrón rojizo (característico del género *Heterorhabditis*).

6.2.2 Trampa *White* modificada y cosecha de juveniles infectivos (JI)

Después de 5 a 7 días de ser infestadas, separar las larvas de *G. mellonella* y acondicionar en trampas *White* (modificadas). Esto consiste en colocar las larvas infectadas con nematodos sobre una rejilla de plástico, dentro de los tapers plásticos de 15 cm de largo x 8 cm de ancho, con 90 mL de agua destilada (Figura 13).



Figura 13. Larvas de *Galleria mellonella* parasitadas colocadas en trampa *White* modificada.

Cosechar por siete días los nematodos que emergieron de la trampa y cambiar diariamente el agua destilada de la trampa *White*. La emergencia de los infectivos juveniles varía de acuerdo a la cepa aislada del nematodo entomopatógeno.

Al momento de efectuar la parasitación, trabajar con soluciones de infectivos juveniles de hasta 15 días de cosechado, dado que, conforme van pasando los días, al estar los infectivos juveniles activos, van perdiendo patogenicidad.

6.2.3 Cuento de infectivos juveniles (IJ)

El conteo de los nematodos se realiza mediante el método de la dilución volumétrica de Leucona (1996). Tomar una alícuota de 0.1 mL a partir de la solución madre y diluir en 50 mL de agua destilada. Luego, con una pipeta de 10 mL, colocar de ésta segunda suspensión, 5 mL en una placa de Petri rayada o dividida (Figura 14). Proseguir con el conteo de los juveniles infectivos vivos, con un contómetro y en el estereoscopio, realizar tres repeticiones para obtener un promedio. La concentración de nematodos se determina mediante la siguiente fórmula:

$$N = V * n / v$$

Donde:

n = número de nematodos en la solución

N = número de nematodos en la muestra

v = volumen de la solución

V = volumen de la muestra



Figura 14. Preparación de diluciones para el conteo de infectivos juveniles de nematodos entomopatógenos.

6.2.4 Conservación de infectivos juveniles (JI)

Conservar en una razón de 1 000 000 de (JI) en 100 mL de agua destilada o 10 000/ mL y conservar durante un tiempo máximo de 15 días a temperatura y humedad del ambiente (Figura 15).



Figura 15. Conservación de infectivos juveniles de nematodos entomopatógenos.

7. Referencias

- Abolafia, J., Casado, S., Gilarte, P., Medina, B., Real, S. y Sales, M. (2008). Presencia de Nemátodos del Género *Heterorhabditis* Poinar, 1976 Nematoda: Rhabditida en Guano de Murciélago de una Cueva de Antequera Málaga. *Monografías Bioespeleológicas*, 3.
- Argotti, E., Gallegos, P., Alcázar, J. y Kaya, H. (2010). Caracterización ecológica de nemátodos entomopatógenos del género *Heterorhabditis* aislados de *Tecia solanivora*. *Boletín Técnico Serie Zoológica*, 9(6), 173-184.
- Blaxter, M. L., De Ley, P., Garey, J. R., Liu, L. X., Scheldeman, P., Vierstraete, A., ... y Vida, J. T. (1998). A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda. *Nature*, 392(6671), 71.
- Del Valle, E., Dolinski, C., Barreto, E., Souza, R. y Samuels, R. (2008). Efficacy of *Heterorhabditis* baujardi LPP7 (Nematoda: Rhabditida) applied in *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) insect cadavers to *Conotrachelus psidii*, (Coleoptera: Curculionidae) larvae. *Biocontrol Science and Technology*, 18(1), 33-41.
- DirtWoks. (2001). Recuperado de <https://www.dirtworks.net/Images/NCO/nematode/Nematocycle.jpg>.
- García-Hernández, J., Cepeda, R., Servín-Villegas, R., Murillo-Amador, B., Rueda-Puente, E., Salazar-Sosa, E., ... y Troyo-Diéguez, E. (2009). Manejo de plagas en la producción de hortalizas orgánicas. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 10(1), 15-28.
- Giayetto, A. y Cichón, L. (2006). Distribución, gama de huéspedes y especificidad de cinco poblaciones de *Heterorhabditis bacteriophora* (Nematoda: Heterorhabditidae) del Alto Valle de Río Negro y Neuquén, Argentina. *RIA. Revista de Investigaciones Agropecuarias*, 35(2), 163-183.
- González, E. (1998). Efecto de la concentración de nemátodos entomopatógenos, sobre la mortalidad de *Anastrepha ludens* (tesis de posgrado). Universidad de Colima, Colima, México. Recuperado de <http://bvvirtual.ucol.mx/consultaxcategoria.php?categoria=3&id=5277>
- Grewal, P. y Georgis, R. (1999). Entomopathogenic nematodes. En: Hall, F. R., & Menn, J. J. (5) *Biopesticides: use and delivery. Methods in Biotechnology* (pp. 271-299). Totowa N. J.: Humana Press.
- Hazir, S., Keskin, N., Stock, S. P., Kaya, H. K., y Özcan, S. (2003). Diversity and distribution of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae) in Turkey. *Biodiversity & Conservation*, 12(2), 375-386.
- Kaya, H (1993). Entomogenous and entomopathogenic nematodes in Biological Control. En: *Plant Parasitic Nematodes in Temperate Agriculture*. K. Evans. Cab International. Wallingford 563 – 591

- Lecuona, R. (1996). *Microorganismos patógenos empleados en el control microbiano de insectos plaga*. Argentina. Talleres gráficos Mariano. 338 p
- Maciel-Vergara, G., Rodríguez-Hernández, A., y Chavarría-Hernández, N. (2010). Cultivo Monoxénico Sumergido del Nematodo Entomopatígeno, *Steinernema carpocapsae* CABA01, en Biorreactor *airlift* con Recirculación Interna. *Biotechnología*, 14(1), 11-24.
- Tang, J. (1958). Notas Generales sobre Nematodes Portadores de Bacterias como un Método de Control Biológico. *Revista Peruana de Entomología*, 1(1), 19-22.
- Woodring, J. y Kaya, K. (1988). Steinernematidae and Heterorhabditidae nematodes: a handbook of techniques southern cooperative. *Series Bulletin. Arkansas, Arkansas Agricultural Experiment Station Fayetteville*.





Instituto Nacional de Innovación Agraria



Instituto Nacional de Innovación Agraria

Av. La Molina 1981, La Molina
(51 1) 240-2100 / 240-2350
www.inia.gob.pe



ISBN: 978-9972-44-062-5



9 789972 440625