

**Nematodos entomopatógenos como biocontroladores de la Mosca del ovario y protocolo de evaluación en Trips, plagas del cultivo de maracuyá**



**Kevin Andres Camara Mosquera.**

**Giuliana Valeria Castro Cortes.**

**Trabajo de grado.**

**Presentado como requisito parcial para optar por el título de  
MICROBIÓLOGOS INDUSTRIALES**

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA  
FACULTAD DE CIENCIAS-DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA  
CARRERA DE MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL  
BOGOTA D.C  
2021**

**Nematodos entomopatógenos como biocontroladores de la Mosca del ovario y  
protocolo de evaluación en Trips, plagas del cultivo de maracuyá**

**KEVIN ANDRÉS CÁMARA MOSQUERA  
GIULIANA VALERIA CASTRO CORTES**

**Adriana Sáenz Aponte, MSc  
Directora**

**Pedro Fabián Grifaldo Alcantaran  
Evaluador**

**Concepcion Judith Puerta Bula,  
PhD  
Decana Facultad de Ciencias**

**Marcela Franco Correa, PhD  
Directora Carrera de Industrial  
Microbiología**

### **NOTA DE ADVERTENCIA.**

“La universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará por que no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y porque las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.

Artículo 23 de la Resolución No 13 de Julio de 1996

## **Agradecimientos**

Agradecemos a nuestras familias por siempre motivarnos y apoyarnos en los momentos más difíciles que pasamos por la carrera

Amigos que nos ofrecieron una amistad incondicional donde pasamos unas de las mejores épocas de nuestras vidas.

A nuestra directora de trabajo de grado Adriana Sáenz Aponte por siempre orientarnos y ayudarnos en este tiempo de trabajo. Por confiar en nosotros en la realización de este trabajo.

Agradecemos a Nicolás Sánchez y trabajadores de la finca, por la colecta de las plagas, sin ellos este trabajo no se hubiera podido realizar.

## Índice

Resumen.....	1
1. Introducción.....	2
2. Marco teórico.....	3
2.1. Maracuyá ( <i>Passiflora edulis</i> ).....	3
2.2. Plagas.....	3
2.2.1. Mosca del ovario (Diptera: Lonchaeidae).....	4
2.2.2. Trips (Thysanoptera:Thripidae).....	4
2.3. Nematodos entomopatógenos.....	5
3.Objetivos.....	5
3.1. Objetivos generales.....	5
3.2. Objetivos específicos.....	5
4. Metodología.....	6
4.1. Obtención de moscas del ovario.....	6
4.2. Obtención de las cepas de nematodos entomopatógenos.....	7
4.3. Unidades experimentales de la mosca del ovario.....	9
4.4. Evaluación de nematodos entomopatógenos.....	9
4.5. Análisis estadístico.....	10
4.6. Elaboración de protocolo.....	10
5.Resultados y discusión.....	10
5.1. Evaluación de nematodos entomopatógenos.....	10
5.2. Procedimiento operativo estándar (POE) para la evaluación de nematodos entomopatógenos sobre <i>Neohydatothrips signifer</i> (Thysanoptera:Thripidae).....	14
6. Conclusiones.....	17
7. Recomendaciones.....	17
Referencias.....	18

## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Especies de nematodos entomopatógenos evaluadas para el control de moscas del ovario.....	8
---	---

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Flores y frutos de maracuyá afectados por la mosca del ovario.....	7
<b>Figura 2.</b> Larva de <i>Tenebrio molitor</i> infectada con nematodos entomopatógenos.....	8
<b>Figura 3.</b> Unidad experimental de moscas del ovario.....	9
<b>Figura 4.</b> Porcentaje de mortalidad de larvas de mosca del ovario <i>Dasiops inedulis</i> por nematodos entomopatógenos.....	11
<b>Figura 5.</b> Sintomatología de la mosca del ovario por nematodos entomopatógenos...	13
<b>Figura 6.</b> Moscas obtenidas en el tratamiento control.....	14
<b>Figura 7.</b> Pupas con presencia de estados de desarrollo de nematodos entomopatógenos.....	14
<b>Figura 8.</b> Unidad experimental de trips.....	15
<b>Figura 9.</b> Placa de pozos para cultivo celular.....	17

## Resumen

*Passiflora edulis* es la especie dentro del grupo de las pasifloráceas cultivadas en Colombia con mayor importancia a nivel nacional y cuyos cultivos predominan en el Departamento del Tolima, dada las condiciones climáticas, las cuales permiten su buen desarrollo. Desafortunadamente este valor ha sido afectado negativamente por la presencia de insectos plaga. Entre los insectos de mayor impacto en los cultivos de maracuyá, se encuentran *Neohydatothrips signifer* (Thysanoptera: Thripidae) y la mosca del ovario *Dasiops inedulis* (Diptera: Lonchaeinae). El manejo de ambas plagas en Colombia, se centran principalmente en estrategias de aplicación de plaguicidas, las cuales han generado un fuerte impacto negativo, no solo a nivel ambiental, sino afectación en la salud de los productores, puesto que adicionalmente al presentar residualidad química, no cumplen con la normatividad de exportación de fruta. Por tanto, se buscan alternativas para el manejo de estas plagas, las cuales sean eficaces y que no generen efectos adversos, dentro de las estrategias se encuentra el control biológico con nematodos entomopatógenos, dado que tienen un amplio rango de hospederos, generan mortalidad en corto tiempo y no afectan el ambiente. Por ende, el objetivo del presente estudio fue Evaluar la eficiencia de nematodos entomopatógenos como biocontroladores de la mosca del ovario *Dasiops inedulis* y elaborar un protocolo para establecer su control en *Neohydatothrips signifer*. Para esto, la plaga del estudio, se colecto de botones florales y frutos de maracuyá obtenidos en la vereda La Meseta (Libano: Tolima). De acuerdo a la patogenicidad en larvas de tercer instar de *Dasiops inedulis*, el mayor porcentaje de mortalidad fue de 40,76% por *Steinernema feltiae* (SCT125). Para la evaluación de *Neohydatothrips signifer* se desarrolló un protocolo operativo estándar, basado en la literatura. encontrada de la base de datos de Pubmed, Proquest, ScienceDirect y la experiencia trabajada en el laboratorio de control biológico, con la finalidad de describir una mejor metodología de evaluación en esta plaga. De acuerdo a lo anterior, se concluye que a pesar que existe control frente a la mosca del ovario, se requiere más estudios para obtener un porcentaje de mortalidad que supere el 50% en larvas de la mosca del ovario. Por otro lado, es necesario evaluar el protocolo de nematodos entomopatógenos en *Neohydatothrips signifer*.



## 1. Introducción

En Colombia la exportación de frutas se ha visto incrementada en los últimos años, debido al aumento de la demanda de frutas exóticas en países como Francia, España, Canadá y Portugal; entre estas se destaca el maracuyá, como una de las frutas promotoras del desarrollo socioeconómico, con un total de 23,701 Ha, una producción de 241,393(Ton) y un rendimiento del 14,49(Ton/Ha) para el año 2019 [1]. Desafortunadamente este valor ha sido afectado negativamente por la presencia de insectos plaga. Entre los insectos de mayor impacto en los cultivos de maracuyá se encuentran *Neohydatothrips signifer* (Thysanoptera: Thripidae) y la mosca del ovario *Dasiops inedulis* (Diptera: Lonchaeinae) [2]. Los daños por trips se asocian al follaje (95%) y al botón floral (75%) [4]. En cuanto a la mosca del ovario, sus daños se realizan en los botones florales, en donde se depositan los huevos, por lo cual puede ocasionar pérdidas económicas del 20-65% [3,7].

El manejo de ambas plagas en Colombia, se centran principalmente en estrategias de aplicación de plaguicidas, ya que aproximadamente el 90,5% de los cultivos es tratado con pesticidas [8], las cuales han generado un fuerte impacto negativo, no solo a nivel ambiental, sino afectación en la salud de los campesinos, puesto que adicionalmente al presentar residualidad química, no cumplen con la normatividad de exportación de fruta [5]. Por tanto, se buscan alternativas para el manejo de estas plagas, las cuales sean eficaces y que no generen efectos adversos, dentro de las estrategias se encuentra el control biológico con nematodos entomopatógenos, dado que tienen un amplio rango de hospederos, generan mortalidad en corto tiempo y no afectan el ambiente [8], sin embargo, en países como Colombia es muy escaso el uso de esta alternativa para el control de insectos plaga en maracuyá. Por ello, este estudio busca determinar la eficiencia de nematodos entomopatógenos como biocontroladores de la mosca del ovario *Dasiops inedulis* y elaborar un protocolo de evaluación para el control de trips *Neohydatothrips signifer*, plagas del cultivo de maracuyá en Tolima, Colombia. Aportando así a investigaciones futuras para obtener otra alternativa para el manejo de dichas plagas en el cultivo de maracuyá.

## 2. Marco teórico

### 2.1. Cultivo de Maracuyá (*Passiflora edulis*)

*Passiflora edulis* es la especie dentro del grupo de las pasifloráceas cultivadas en Colombia con mayor importancia a nivel nacional y cuyos cultivos predominan en el Departamento del Tolima dado a las condiciones climáticas, las cuales permiten su correcto desarrollo [5]. Dentro de las características físicas se puede destacar que es una planta trepadora, que puede llegar a alcanzar 9 metros de longitud en condiciones climáticas favorables, aunque su periodo de vida no es más allá de una década. La fruta es una baya oval o redonda de 4 a 10 cm de diámetro, recubierta de una cáscara gruesa, cerosa e incomedible. Dicha fruta se puede encontrar en países como Perú, Colombia, Ecuador, Venezuela, Brasil, Paraguay, Bolivia y el norte de Argentina [9].

El cultivo de maracuyá posee la facilidad de adaptarse a diferentes suelos siempre y cuando, sean profundos y fértiles. Los mejores suelos para este cultivo son los francos, con buena capacidad de retención de humedad y un pH entre 5.5 y 7.0. La textura del suelo puede influir en el peso y tamaño del fruto. Suelos muy pesados y poco permeables, no son los más adecuados, ya que facilita la aparición de enfermedades como la fusariosis o la pudrición seca del cuello de la raíz. [10]

La temperatura óptima oscila entre los 23-25°C, aunque es un cultivo que tiene la facilidad de crecer en temperaturas desde los 21°C hasta los 32°C. En algunos casos se cultiva a 35°C debido a que acelera el crecimiento, pero la producción disminuye a causa de la deshidratación de los estigmas, lo que dificulta la fecundación de los ovarios. Se recomienda el cultivo a altitudes de 300 y 900 msnm, con una humedad relativa del 60%. La floración del fruto ocurre entre los cinco y siete meses de sembrado, la maduración del fruto ocurre entre los 60 y 65 días después de la floración [9].

### 2.2. Plagas

Los cultivos pertenecientes al grupo de las pasifloráceas presentan una fuerte afectación a nivel fitosanitario. Especialmente asociado a insectos. En el caso del maracuyá, los insectos de mayor predominancia son: Mosca del ovario (*Dasiops*

*inedulis*), Trips (*Neohydatothrips signifer*), Arañita roja (*Tetranychus* sp.), entre otras.[7,10]

### **2.2.1. Mosca del ovario (Diptera: Lonchaeinae)**

La mosca del ovario (*Dasiops inedulis*) se caracteriza por presentar una coloración negra metalizada con tonalidades verdosas, son fitófagos y plagas de frutas como el maracuyá, gulupa y granadilla ocasionando una pérdida del 40% y 50% de los cultivos en el Tolima [2,3]. Generan daño en el botón floral debido a que las hembras ponen los huevos en esta o directamente en el fruto, una vez eclosiona, la larva se alimenta de los sacos polínicos, antenas y ovarios en formación, generando clorosis, lo cual conlleva a la pérdida total del botón floral. Una vez finaliza la alimentación, la larva cae al suelo y busca refugio en el suelo, lugar donde permanece de 9 a 11 días, periodo en el cual pasa a pupa y posteriormente emerge como adulto [7].

### **2.2.2. Trips (Thysanoptera:Thripidae)**

Los Trips son un grupo de pequeños insectos neopteros que suelen ser de color marrón o negro. La alimentación consta de vegetales, frutas y hongos. Este insecto es vector del virus *Tospovirus* sp., causando una gran pérdida en diferentes cosechas como aguacate, mango, guayaba, cítricos, soya, yuca, maíz, etc. [12]. Las especies que están relacionadas fuertemente con el fruto del maracuyá son *Neohydatothrips signifer*. Es la principal plaga del cultivo en Tolima donde se han registrado daños del 95% en terminales vegetativos y 75% en botones florales. Afectan el desarrollo del fruto, deformando las hojas y el sellamiento de los cogollos, impidiendo así, la formación de nuevas estructuras [5,6]. Las hembras son las primeras en colonizar el hospedante, normalmente se ubican en las hojas y en el botón floral del maracuyá. Además, están provistas de un ovipositor con el cual insertan los huevos en las nervaduras de las hojas. Dicha plaga alcanza su desarrollo hasta adulto pasando por dos instares ninfales, una prepupa y pupa. Las ninfas se alimentan del envés de las hojas hasta lograr una coloración blanco amarillenta, donde al terminar este estadio, que se conoce como prepupa, se empiezan a observar los cojinetes alares tardíos y los individuos caminan inquietos sobre las hojas, buscando un lugar para empupar. La mayoría se dejan caer al suelo enterrándose 2 o 3 mm y forma la pupa. En la pupa se puede llegar a evidenciar pequeños esbozos alares, antenas cortas inclinadas sobre el dorso y con artejos

bien diferenciados. El adulto recién emergido es amarillo claro, pero con el tiempo adquieren un color más oscuro. Una vez los adultos emergen del suelo, pueden copular para la continuación del ciclo de vida [11].

### **2.3. Nematodos entomopatógenos**

Los nematodos entomopatógenos son organismos vermiformes de cuerpo blando, no segmentados y parásitos obligados de insectos. Normalmente se encuentran en el suelo donde son capaces de buscar y localizar el huésped, respondiendo a emisiones de CO<sub>2</sub>, vibraciones y señales químicas. Los géneros más usados para dicho control son *Heterorhabditis* y *Steinernema* [4,13]

*Heterorhabditis* y *Steinernema* poseen seis estadios de vida: huevo, cuatro estadios juveniles (J1, J2, J3-JIs, J4) y adulto. La fase infectiva JI, está asociada con bacterias simbiotas pertenecientes a los géneros *Photorhabdus* y *Xenorhabdus* respectivamente. Una vez los JIs inician el ciclo de vida son capaces de localizar e invadir los insectos. Los JIs durante la búsqueda del hospedero, no se alimentan, pero usan sus reservas de lípidos, esto conlleva a que el metabolismo se reduzca al mínimo, permitiendo sobrevivir varias semanas o meses. Este ciclo requiere entre 12-15 días como mínimo. [14,15,16]

La asociación mutualista entre nematodos y las bacterias es altamente específica, debido a que los nematodos actúan como vectores y protegen a la bacteria de las condiciones ambientales del suelo y contribuyen en la patogénesis del hospedero. Mientras que las bacterias poseen un papel nutricional para el nematodo, al crear condiciones favorables para el desarrollo y reproducción de estos nematodos. [16,18]

## **3. Objetivos**

### **3.1. Objetivo general**

- Evaluar la eficiencia de nematodos entomopatógenos como biocontroladores de la mosca del ovario *Dasiops inedulis* y elaborar un protocolo para establecer su control en *Neohydatothrips signifer*, plagas del cultivo de maracuyá.

### 3.2. Objetivos específicos

- Seleccionar la especie(s) de nematodo entomopatógeno que ocasiona mayor mortalidad en larvas de la mosca del ovario *Dasiops inedulis*.
- Establecer la sintomatología que presenta las larvas de la mosca del ovario *Dasiops inedulis*, ocasionada por juveniles infectivos de nematodos(s) entomopatógenos.
- Elaborar un protocolo de evaluación de nematodos entomopatógenos para el manejo de *Neohydatothrips signifer*, plaga en cultivos de maracuyá.

## 4. Metodología

### 4.1. Obtención de moscas del ovario.

Las larvas de tercer instar de la mosca del ovario se obtuvieron de botones florales y frutos en cultivos de maracuyá localizados en la vereda La Meseta (Libano: Tolima), a 1300 msnm y 18-20°C. El material vegetal se depositó en recipientes plásticos y fue transportado al laboratorio de control biológico (Figura 1), donde se mantuvo en observación por 48 horas a temperatura ambiente [7].



**Figura 1.** Flores y frutos de maracuyá afectados por la mosca del ovario **A.** Recipientes plásticos de almacenamiento y transporte de botones florales-frutos infectados con especímenes de mosca del ovario; **B.** Botón floral afectados por larvas de la mosca del ovario; **C.** Fruto afectado por larvas de la mosca del ovario

#### **4.2. Obtención de nematodos entomopatógenos**

Todas las especies/cepas de nematodos entomopatógenos que se evaluaron, se obtuvieron del laboratorio de Control Biológico de la Pontificia Universidad Javeriana (Tabla 1).

**Tabla 1.** Especies de nemátodos entomopatógenos evaluadas para el control de moscas del ovario.

Tratamiento	Especie	Cepa	Origen
1	<i>Steinernema carpocapsae</i>	SCBCASA19	Toribio-Cauca
2	<i>Steinernema carpocapsae</i>	SCASA16	Chinchiná - Caldas
3	<i>Steinernema websteri</i>	SWJL10	Chinchiná - Caldas
4	<i>Steinernema colombiense</i>	S.STP1	Quimbaya - Quindio
5	<i>Steinernema feltiae</i>	SCT125	Circasia, Quindio.
6	<i>Heterorhabditis bacteriophora</i>	HHOND	Rio frio Valle del Cauca
7	<i>Heterorhabditis bacteriophora</i>	HTSP1	Armenia-Quindio
8	<i>Heterorhabditis bacteriophora</i>	HNI100	Fresno-Tolima

Las especies de nematodos entomopatógenos se multiplicaron *in vivo* en larvas de *Tenebrio molitor* (Coleoptera, Tenebrionidae), (Figura 2), con el fin de obtener juveniles infectivos de al menos tres semanas de almacenamiento. Posteriormente, se realizó la recuperación de los juveniles infectivos, mediante trampas White

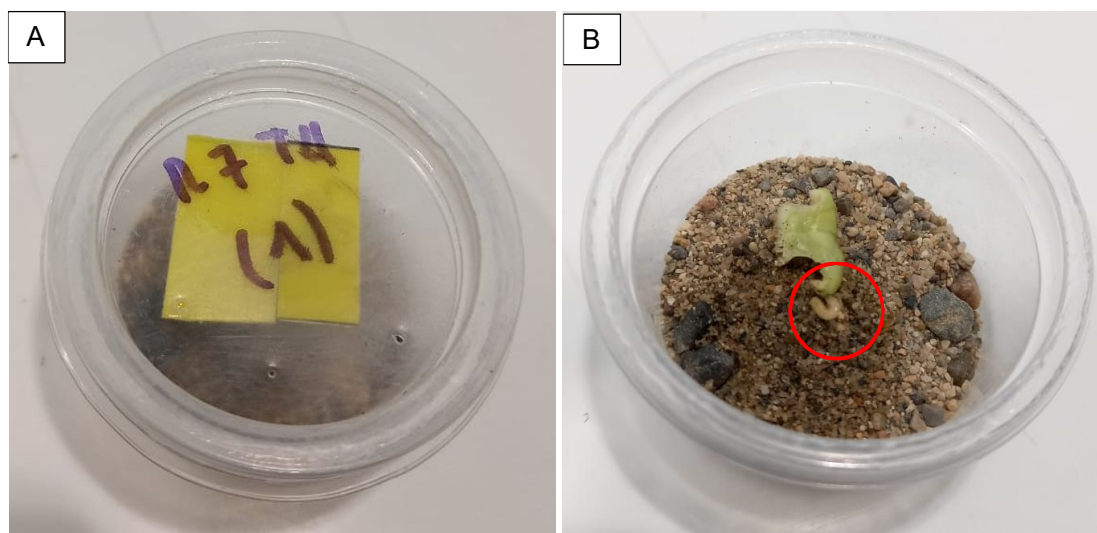


siguiendo la metodología de Kaya y Stock [17] y almacenadas a 25°C,.

**Figura 2.** Larva de *Tenebrio molitor* infectado con nematodos entomopatógenos.

#### 4.3. Unidades experimentales de la mosca del ovario

La unidad experimental de la mosca del ovario consistió en un recipiente plástico de 5 cm de ancho y 4 cm de alto, al cual se le agregaron 15 g de arena de río estéril. En la tapa de las unidades experimentales, se realizaron 4 orificios, los cuales permitieron la ventilación y a su vez se adiciono una trampa adhesiva amarilla que permitió la captura de adultos que alcanzaron a cumplir su ciclo de vida. En cada unidad se dispuso una larva de tercer instar con alimento (un círculo de botón floral de maracuyá),(Figura 3). En total se realizaron 7 unidades experimentales por tratamiento y tres repeticiones en el tiempo.



**Figura 3.** Unidad experimental de moscas del ovario **A.** Tapa con orificios de ventilación y trampa adhesiva **B.** Arena experimental con larva de tercer instar de mosca del ovario.

#### **4.4. Evaluación de nemátodos entomopatógenos**

Para la evaluación de la susceptibilidad se inoculó una 200JIs/200 $\mu$ L sobre la arena de río estéril. En total se evaluaron nueve tratamientos; ocho correspondientes a cada cepa de nematodos (Tabla 1) y un control, el cual consistió en agua destilada estéril. Posteriormente se incubó a 25°C, en condiciones de 12h luz, 12h oscuridad y 70% de humedad relativa. El monitoreo de las unidades experimentales, se realizó acorde al ciclo de vida, registrando dos lecturas: 8 y 15 días, posterior a la infección. A los cadáveres encontrados se les realizó disección, consignando porcentaje de mortalidad, presencia/ausencia de nematodos y sintomatología por medio del cambio de color.



#### **4.5. Análisis estadístico**

Los datos procesados cumplieron con los supuestos de normalidad (Shapiro-Wilk y Kolmogorov-Smirnov), homogeneidad de varianzas (Levene) e independencia (prueba de independencia), por lo que se analizaron utilizando un ANOVA de un factor, con el fin de establecer las diferencias significativas entre los tratamientos ( $p \leq 0,05$ ) en relación a la mayor mortalidad en el menor tiempo y prueba Duncan como análisis post-hoc. Las pruebas se realizaron utilizando el software estadístico IBM SPSS statistics 27.

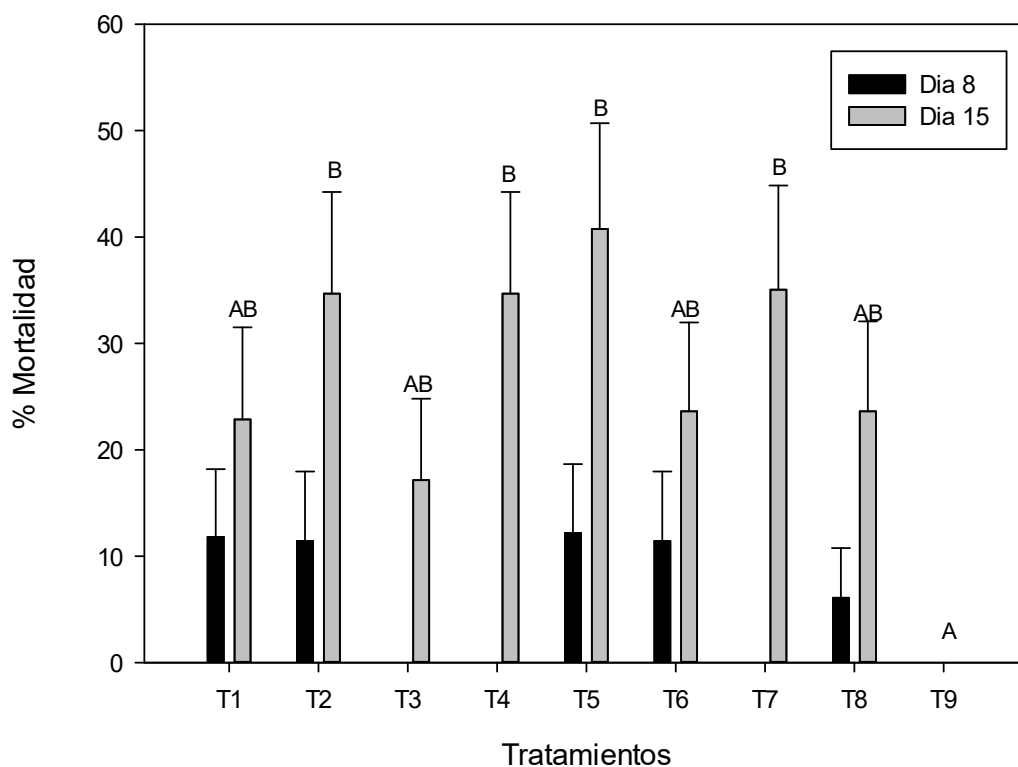
#### **4.6. Elaboración de protocolo.**

Debido a las inconsistencias de los resultados obtenidos en las evaluaciones de los dos ensayos iniciales con nematodos sobre trips y sumado a las restricciones de movilidad e ingreso a la universidad, a causa de la pandemia de COVID-19 y los problemas sociales en la ciudad, no permitieron desarrollar colectas y un nuevo montaje para evaluación. Por tal razón, a partir de la búsqueda de información en bases de datos como Pubmed, Proquest, ScienceDirect, se realizó un análisis de las diferentes metodologías que evalúan nemátodos entomopatógenos en trips, para elaborar un protocolo Operativo Estándar (POE), que permita definir ensayos para su futura evaluación en esta plaga.

### **5. Resultados y discusión**

#### **5.1. Evaluación de nematodos entomopatógenos**

Los resultados obtenidos de la evaluación de las cepas de nematodos entomopatógenos permitieron evidenciar que en el día 8, no se observaron diferencias significativas en los porcentajes de mortalidad registrados en la mosca del ovario ( $F=1.553$ ;  $gl=8$ ;  $P \leq 0,142$ ), sin embargo en el día 15, se presentaron diferencias significativas ( $F=2.015$ ;  $gl=8$ ;  $P \leq 0,047$ ), (Figura 4).



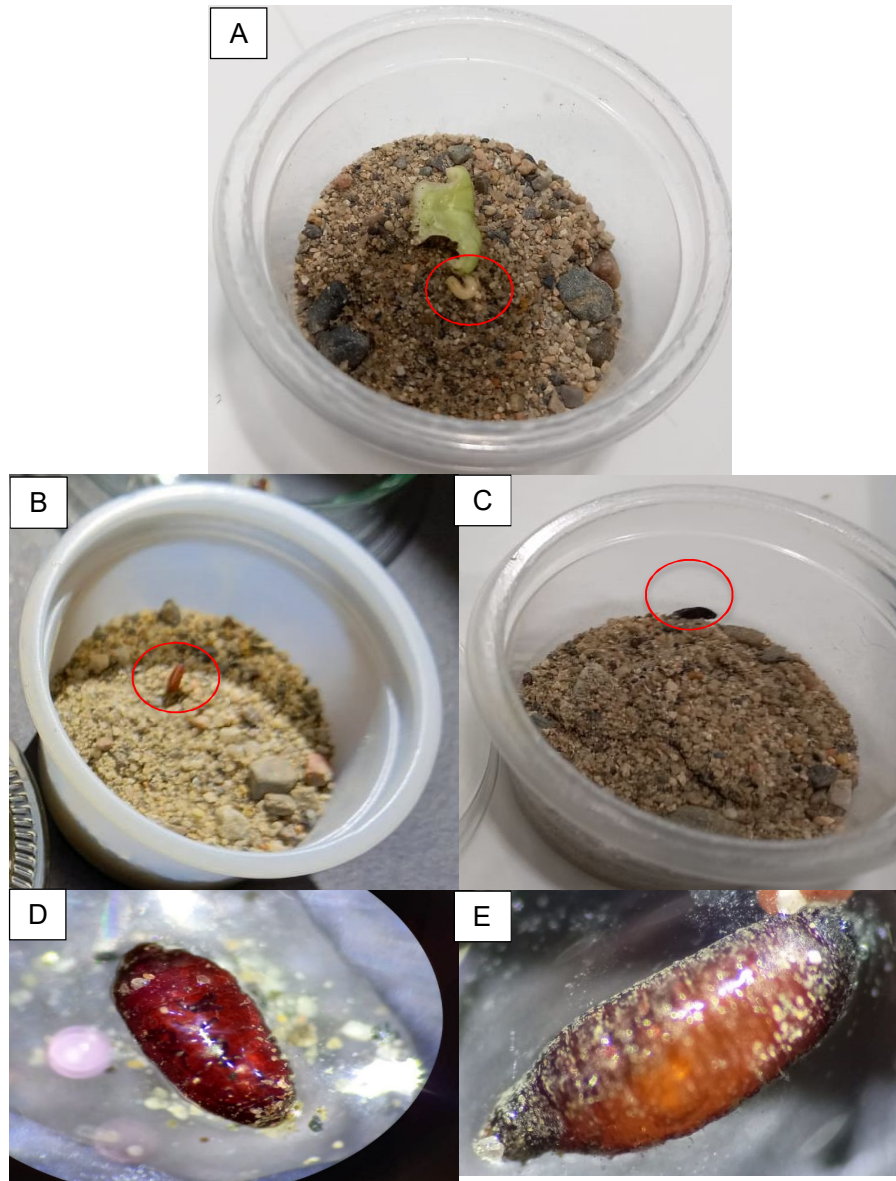
**Figura 4.** Porcentaje de mortalidad de larvas de mosca del ovario *Dasiops inedulis* por nematodos entomopatógenos. **Tratamiento 1:** *Steinernema carpocapsae* (SCBCASA19), **Tratamiento 2:** *Steinernema carpocapsae* (SCASA16), **Tratamiento 3:** *Steinernema websteri* (SWJL10), **Tratamiento 4:** *Steinernema colombiense* (S. STP1), **Tratamiento 5:** *Steinernema feltiae* (SCT125), **Tratamiento 6:** *Heterorhabditis bacteriophora* (HHOND), **Tratamiento 7:** *Heterorhabditis bacteriophora* (HTSP1), **Tratamiento 8:** *Heterorhabditis bacteriophora* (HNI100), **Tratamiento 9:** control. Las barras representan el error estándar. Las letras sobre las barras corresponden a las diferencias significativas (ANOVA con Duncan *post hoc*  $p < 0.05$ )

La mortalidad a los 15 días muestra un incremento en el efecto de los nematodos entomopatógenos sobre las larvas de la mosca del ovario (Figura 4), sin embargo, todos los tratamientos obtuvieron porcentajes de mortalidad menor al 50%. De acuerdo a esto, *Steinernema websteri* (SWJL10) presentó el menor porcentaje de mortalidad (17.14 %) y *Steinernema feltiae* (SCT125) 40,76%. Estos rangos tan amplios en los porcentajes e inferiores a un 50%, posiblemente se atribuyan a la

capacidad de búsqueda de los juveniles infectivos, capacidad de ingreso en las larvas y las defensas que puedan tener las larvas frente a la respuesta de los nematodos. Tourstois *et al.*, [19], establecen que las larvas de varias especies del orden díptera, presentan una cutícula gruesa y dura, lo que dificulta la penetración de los nematodos, esto puede ser una de las causas a la baja susceptibilidad de las mismas. No obstante. A su vez esto se relaciona estrechamente con la capacidad de los nematodos de seleccionar un hospedero adecuado, sin embargo, en la literatura se ha establecido que las cepas de *Heterorhabditis bacteriophora*, presentan mayor susceptibilidad a la calidad de su posible hospedero, lo cual debería generar disminuciones en su capacidad infectiva, a su vez en el porcentaje de mortalidad. Caso opuesto con las cepas de *Steinernema*, las cuales no presentan una fuerte selectividad con el hospedero [19,20]. Por otra parte, es posible, que la dosis evaluada para algunas especies de nematodos, llevan a una competencia intraespecífica para la infección en este hospedero.

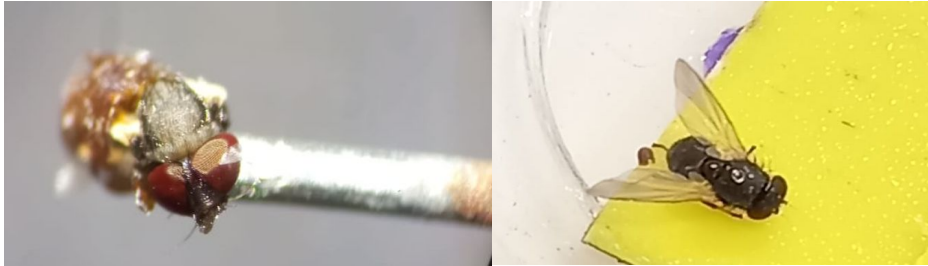
Las larvas de mosca del ovario sanas, presentan una coloración blanco crema (Figura 5A), una vez en la unidad experimental, las larvas se desplazaron y se ubicaron bajo la arena de río. Al realizar los monitoreos a los 8 y 15 días, se hallaron larvas y pupas muertas en los tratamientos con nematodos y moscas pegadas en la trampa pegante, en las unidades experimentales del tratamiento control (Figura 6A y 6B). Además, la sintomatología presentada en las larvas-pupas, se evidenció por el cambio en coloración: café oscuro y negro (*Steinernema*), (Figura 5B-D) y café-rojo ladrillo (*Heterorhabditis*) (Figura 5C-E). Por otra parte, al realizar las disecciones, se evidenció la presencia de nematodos en las larvas-pupas, lo cual corrobora la muerte del hospedero, por nematodos entomopatógenos (Figura 7).

Las coloraciones se relacionan con la presencia de las bacterias simbiotes; *Photorhabdus* (*Heterorhabditis*) y *Xenorhabdus* (*Steinernema*), las cuales se liberan luego de que el nematodo ingresa al hemocele de la mosca y dentro de las siguientes 24-48 horas, se encargan de colonizar y matar al hospedero, mediante la producción de una variedad de toxinas y exo-enzimas generando así un ambiente favorable para el desarrollo de los nematodos y generando cambios en la coloración del hospedero.[21]

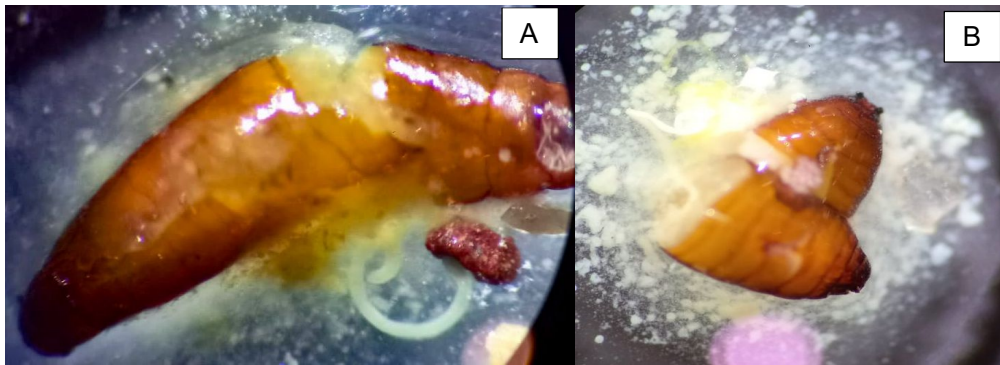


**Figura 5.**

Sintomatología de la mosca del ovario por nematodos entomopatógenos. **A.** Larva de mosca del ovario sana, **B.** Larva infectada con *Heterorhabditis bacteriophora* (HNI100), **C.** Larva infectada con *Steinernema websteri* (SWJL10), **D.** Pupa infectada con *Heterorhabditis bacteriophora* (HTSP1) **E.** Pupa infectada con *Steinernema carpocapsae* (SCASA16)



**Figura 6.** Moscas obtenidas en el tratamiento control.



**Figura 7.** Pupas con presencia de estados de desarrollo de nematodos entomopatógenos. **A.** *Steinernema carpocapsae* (SCBCASA19), **B.** *Heterorhabditis bacteriophora* (HNI100).

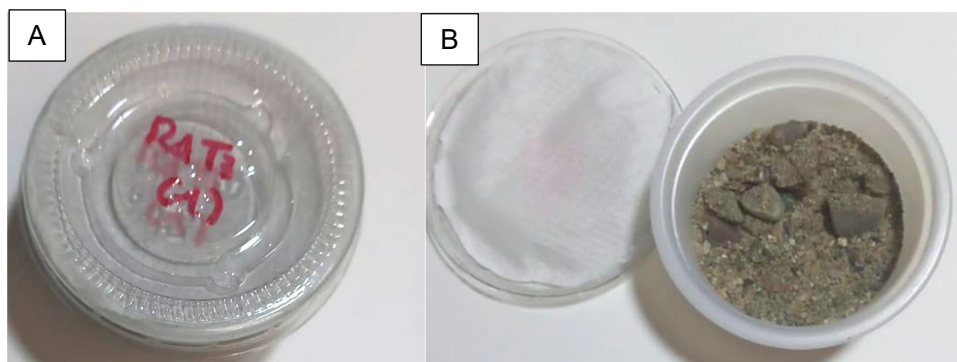
## **5.2. Procedimiento operativo estandar (POE) para la evaluación de nematodos entomopatógenos sobre de *Neohydatothrips signifer* (Thysanoptera:Thripidae).**

Para la construcción de este protocolo se tomaron en consideración 4 artículos relacionados con el manejo de *Frankliniella occidentalis* y los resultados obtenidos a partir del desarrollo de una metodología previamente diseñada, la cual debido a errores de diseño y alteraciones en los tiempos de observación no generó los resultados esperados.

### **Ensayo realizado en el laboratorio de Control biológico**

Para el ensayo se plantearon evaluaciones de mortalidad en *Neohydatothrips signifer*, en unidades experimentales de 5 cm de ancho y 4 cm de alto, con orificios de ventilación en la tapa del recipiente, 15 gramos de arena estéril, un círculo de papel servilleta para evitar la

salida de los adultos (Figura 8). Para esto se evaluaron 5 tratamientos. En total se realizaron 5 réplicas y 2 repeticiones en el tiempo



**Imagen 8.** Unidad experimental de trips **A.** Recipiente plástico cerrado con su respectivo círculo de papel servilleta. **B.** Parte interna de la unidad.

### **ALCANCE/ CAMPO DE APLICACIÓN**

Con la elaboración del protocolo, se busca corroborar los procedimientos planteados para evaluar nemátodos entomopatógenos sobre *Neohydatothrips signifer* bajo condiciones de laboratorio.

### **Materiales**

**Material biológico:** juveniles infectivos de Nematodos entomopatógenos, mínimo de dos semanas de almacenamiento, Larvas y/o pupas de *Neohydatothrips signifer*.

**Material de laboratorio:** Micropipetas, vasos de precipitado, agua destilada estéril y papel filtro.

**Equipos:** Incubadora y Estereoscopio.

### **DESARROLLO DEL PROCEDIMIENTO**

Para llevar a cabo el desarrollo de las diferentes etapas que conllevan a la evaluación del protocolo, es indispensable tener en cuenta:

### **Recolección de especímenes**

Los especímenes de *Neohydatothrips signifer*, coleccionarlos directamente del cultivo mediante la identificación de flores y hojas infestadas; transportarlos en recipientes semi-herméticos con fuentes de alimentación (hojas). Dejar en observación por 72 horas para establecer su viabilidad y ser usados posteriormente en los ensayos de evaluación. Se recomienda evitar coleccionar adultos, por su alta movilidad y al presentar alas, pueden generar errores e interferencia en los ensayos, dado que se escapan con facilidad [22].

### **Reactivación de las cepas de nematodos entomopatógenos**

Para el proceso de reactivación de las cepas de nematodos entomopatógenos que se van a evaluar, se recomienda implementar la metodología descrita en el apartado 4.2. (Obtención de nematodos entomopatógenos) del presente trabajo, así como la metodología de Kaya y Stock [17].

### **Ensayo de Evaluación de susceptibilidad**

Teniendo en cuenta las revisiones realizadas en la literatura (4, 13, 22, 23, 24), se diseñó el siguiente procedimiento:

Organizar unidades experimentales en placas de cultivo celular de 24 pozos (Figura 9), adicionar 3 gramos de arena de río estéril, juveniles infectivos de cada una de las especies a evaluar [0, 50, 100, 150, 200, 250 JIs/pozo], [4], alimento vegetal y 3 larvas y/o pupas de *Neohydatothrips signifer* [23,24]. La tapa de cada placa cubrirla con cinta adhesiva azul, para la captura de los adultos que emerjan de cada pozo en cada tratamiento. Todas las unidades experimentales incubarlas a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , 12 horas luz y 12 horas oscuridad.

Las evaluaciones de los tratamientos realizarlas a los 2 y 5 días, posterior a la infección. Las variables a tener en cuenta son: sintomatología por cambio de coloración en el hospedero y número de adultos presentes en las trampas adhesivas, esto permitirá determinar el porcentaje de mortalidad en las larvas y/o pupas en cada tratamiento. Igualmente, para corroborar la muerte por nemátodos entomopatógenos, se realizará disecciones para verificar su presencia. De igual manera, se recomienda realizar diferentes montajes a rangos de temperatura como

20, 25, 30 [25], con el fin de verificar el efecto de los nematodos sobre el trips, dado que normalmente los cultivos de maracuyá y las poblaciones de esta plaga se



encuentran entre 25 y 30 °C.

**Figura 9.** Placa de pozos para cultivo celular

## 6. Conclusiones

La especie de nematodo que ocasiona mayor mortalidad en la mosca del ovario *Dasiops inedulis*, corresponde a *Steinernema feltiae* (SCT125), seguido de los aislamientos de la especie *Steinernema carpocapsae* (SCBCASA19), (SCASA16), *Heterorhabditis bacteriophora* (HTSP1), *Heterorhabditis bacteriophora* (HNI100). Además, se registra mortalidad a los 8 y 15 días de evaluación, sin embargo, el mayor efecto se registra a los 15.

En términos de sintomatología se pudo observar que tanto las especies del género *Heterorhabditis* como las del género *Steinernema*, generaron en la mosca del ovario las coloraciones típicas reportadas en la literatura.

A partir de la experiencia obtenida con algunos montajes y análisis de evaluación, se estableció un protocolo, que permite evaluar el efecto de los diferentes aislamientos



colombianos de nematodos entomopatógenos sobre *Neohydatothrips signifer*, plaga limitante en maracuyá.

## 7. Recomendaciones

- Desarrollar un ensayo don se evalúen diferentes concentraciones de *Steinernema feltiae* (SCT125) en larvas de la mosca del ovario, con la finalidad de observar si hay un incremento en el porcentaje de mortalidad que supere el 50%. Además de determinar la CL<sub>50</sub> y TL<sub>50</sub>.
- Evaluar las combinaciones de *Steinernema feltiae* (SCT125), *Steinernema carpocapsae* (SCASA16) y/o *Heterorhabditis bacteriophora* (HTSP1), para determinar si se tiene un mayor porcentaje de mortalidad superior a 50% en la mosca del ovario.
- Evaluar el protocolo descrito, para establecer el efecto de nematodos entomopatógenos sobre *Neohydatothrips signifer*.

## Bibliografía

[1] William Granados P, Noreña Triana E. Cadena de Pasifloras, Indicadores e instrumentos, Dirección de Cadenas Agrícolas y Forestales; *Ministerio de agricultura y desarrollo rural*, Colombia, 2019. Retrieved from: <https://sioc.minagricultura.gov.co/Pasifloras/Documentos/2019-06-30%20Cifras%20Sectoriales.pdf>

[2] Iveda Silva A, Vallejo Sánchez C, Korytkowski G C, Ebratt Ravelo E, Brochero H, Matheus Gomez H et al. Moscas del género *Dasiops Rondani* 1856 (Diptera: Lonchaeidae) en cultivos de pasifloras. *Repository.agro savia.co.*, Colombia. 2013. Available from: <https://repository.agrosavia.co/handle/20.500.12324/2041>

[3] Delgado A, Kondo T, Imbachi K. Biología y algunos datos morfológicos de la mosca del botón floral de la pitaya amarilla, *Dasiops inedulis* (Diptera: Lonchaeidae) en el Valle del Cauca, Colombia. Museo de entomología de la Universidad del Valle. 11(2):1-10.2010.

[4] Ebssa L, Borgemeister C, Poehling H. Effectiveness of different species/strains of entomopathogenic nematodes for control of western flower thrips (*Frankliniella occidentalis*) at various concentrations, host densities, and temperatures, *Biological Control*, 29(1): pp.145-154, 2004. Doi: 10.1016/s1049-9644(03)00132-4

[5] Santos A, Varón E, Gaigl A, Floriano A. Nivel de daño económico para *Neohydatothrips signifer* (Thysanoptera: Thripidae) en maracuyá en el Huila, Colombia. *Revista Colombiana de Entomología*, 38(1): pp. 23-29, 2012. Available from: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_issuetoc&pid=0120-048820120001&lng=e&nrm=iso](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_issuetoc&pid=0120-048820120001&lng=e&nrm=iso)

[6] Bastidas J, Devia E, Amaya Ó. Cría y evaluación de la capacidad de depredación de *Chrysoperla externa* sobre *Neohydatothrips signifer*, trips plaga del cultivo de maracuyá, *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 11(1): p.31, 2010. Doi: 10.21930/rcta.vol11\_num1\_art:192

[7] Carrero D, Melo D, Uribe S, Wyckhuys K. Population dynamics of *Dasiops inedulis* (Diptera: Lonchaeidae) and its biotic and abiotic mortality factors in Colombian sweet passion fruit orchards, *Journal of Pest Science*, 86(3): pp.437-447, 2013. Doi: 10.1007/s10340-013-0487-9

[8] Bastidas D, Guerrero J, Wyckhuys K. Residuos de plaguicidas en cultivos de pasifloras en regiones de alta producción en Colombia, *Rev. Colomb. Quim.*, 42 (2), 2013. Available from: <http://www.scielo.org.co/pdf/rcq/v42n2/v42n2a05.pdf>

[9] Gómez G. Maracuyá, Nueva opción para zona bananera del Magdalena. *Presidencia de la República de Colombia*, Colombia, 2005. Available from: <http://www.presidencia.gov.co/sne/2005/junio/10/08102005>.

- [10] García M. Guía técnica del cultivo del maracuyá. Programa MAG-CENTA-FRUTALES. *El Salvador: Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal*, El Salvador, 2010. Retrieved from: <http://centa.gob.sv/docs/guias/frutales/GUIA%20MARACUYA%202011.pdf>
- [11] Arévalo E, Quintero O, Correa G. Reconocimiento de trips (Insecta: Thysanoptera) en floricultores de tres corregimientos del municipio de Medellín, Antioquia (Colombia). *Revista Colombiana de Entomología*, vol 29(2): pp. 169-175. 2003.
- [12] Mesa N. Ciclo de vida de *Thrips palmi* (Thysanoptera: Thripidae) y registro de Hospedante en el Valle del Cauca, *Revista colombiana de entomología*, 1999. Available from: [https://www.researchgate.net/publication/283090186\\_Ciclo\\_de\\_vida\\_de\\_Thrips\\_palmi\\_Thysanoptera\\_Thripidae\\_y\\_registro\\_de\\_Hospedante\\_en\\_el\\_Valle\\_del\\_Cauca](https://www.researchgate.net/publication/283090186_Ciclo_de_vida_de_Thrips_palmi_Thysanoptera_Thripidae_y_registro_de_Hospedante_en_el_Valle_del_Cauca)
- [13] Grewal P, Georgis R. Entomopathogenic nematodes. Methods Biotechnology. Biopesticides: Uses and Delivery. *Methods in Biotechnology*, vol 5: pp. 271-299, 1999. Humana Press. <https://doi.org/10.1385/0-89603-515-8:271>
- [14] Ishibashi N, Kondo E. Behaviour of infective juveniles, Entomopathogenic Nematodes in Biological Control, *CRC press*, pp 139-153, 1990.
- [15] Samish M, Glazer I. Infectivity of entomopathogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) to female ticks of *Boophilus annulatus* (Arachnida: Ixodidae), *Journal of Medical Entomology*, 29(4): 614-618, 1992. Doi: 10.1093/jmedent/29.4.614
- [16] Boemare N, Akurst R. Biochemical and Physiological Characterization of Colony form Variants in *Xenorhabdus* spp. (Enterobacteriaceae), *International Journal of Systematic Bacteriology*, 134: 751-761, 1988. Doi: 10.1099/00221287-134-3-751
- [17] Kaya H, Stock S. Techniques in insect nematology. *Manual of techniques in insect pathology*, Academic Press, Retrieved from: 281-

324,1997.<https://www.elsevier.com/books/manual-of-techniques-in-insect-pathology/lacey/978-0-12-432555-5>

[18] Ehlers R, Peters A. Entomopathogenic nematodes in biological control: Feasibility. Perspectives and Risks, *Biotechnology Research:Cambridge University Press*, p. 119-126, 1996. Doi: <https://doi.org/10.1017/CBO9780511661730.013>

[19] Tourtois J, Ali J, Grieshop M. Susceptibility of wounded and intact black soldier fly *Hermetia illucens* (L.) (Diptera: Stratiomyidae) to entomopathogenic nematodes, *Journal of Invertebrate Pathology*, Vol 150: pp.121-129, 2017. Doi: [10.1016/j.jip.2017.10.002](https://doi.org/10.1016/j.jip.2017.10.002)

[20] Castellón M, González J, & Pozo E. Susceptibilidad de larvas y pupas de *Typophorus nigrinus* F. al nematodo entomopatógono *Heterorhabditis indica* Poinar. *Cuba: Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales (INIVIT)*, 2014

[21]Jean-Baptiste M, de Brida A, Bernardi D, da Costa Dias S, de Bastos Pazini J, Leite L et al. Effectiveness of Entomopathogenic Nematodes Against *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) Pupae and Nematode Compatibility with Chemical Insecticides, *Journal of Economic Entomology*, Vol 114(1): pp.248-256, 2021. Doi: [10.1093/jee/toaa301](https://doi.org/10.1093/jee/toaa301)

[22] Dlamini T, Allsopp E, Malan A. Efficacy of Entomopathogenic Nematodes Against Western Flower Thrips, *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae), Under Laboratory Conditions, *African Entomology*, Vol 27(2): pp. 322-335, 2019. Doi: [10.4001/003.027.0322](https://doi.org/10.4001/003.027.0322)

[23] Arthurs S, Heinz K, Thompson S, Krauter P.C. Effect of temperature on infection, development and reproduction of the parasiticnematode *Thripinema nicklewoodi* in *Frankliniella occidentalis*, *BioControl*, Vol 48: pp. 417–429, 2003. Doi: [10.1023/A:1024798928406](https://doi.org/10.1023/A:1024798928406).

[24] Premachandra D, Borgemeister C, Berndt O, Ehlers R, Poehling H. Laboratory bioassays of virulence of entomopathogenic nematodes against soil-inhabiting

stages of *Frankliniella occidentalis* Pergande (Thysanoptera: Thripidae), *Nematology*, Vol 5(4): pp. 539-547, 2003. Doi: 10.1163/156854103322683256

[25] Ebssa L, Borgemeister C, Berndt O, Poehling H. Impact of Entomopathogenic Nematodes on Different Soil-dwelling Stages of Western Flower Thrips, *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae), in the Laboratory and Under Semi-field Conditions. *Biocontrol Science and Technology*, Vol 11(4): pp. 515-525, 2001. Doi: 10.1080/09583150120067544