

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO.

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS.



CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

TEMA:

“DETERMINACIÓN DE RESISTENCIA INDUCIDA EN ESPECIES DE ZANAHORIA BLANCA (*Arracacia xanthorrhiza* BANCROFT) AL ATAQUE DE *Tetranychus urticae* KOCH (ACARI: TETRANYCHIDAE)”

Documento Final del Proyecto de Investigación como requisito para obtener el grado de
Ingeniera Agrónoma

AUTOR:

VILLAFUERTE PEÑA ELIZABETH DEL ROCIO

TUTOR:

Ph.D CARLOS VÁSQUEZ

CEVALLOS - ECUADOR

2018

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

El suscrito, ELIZABETH DEL ROCIO VILLAFUERTE PEÑA, portador de la cédula de identidad número: 1804664249, libre y voluntariamente declaro que el Informe Final del Proyecto de investigación titulado: “DETERMINACIÓN DE RESISTENCIA INDUCIDA EN ESPECIES DE ZANAHORIA BLANCA (*Arracacia xanthorrhiza* BANCROFT) AL ATAQUE DE *Tetranychus urticae* KOCH (ACARI: TETRANYCHIDAE)”, es original, auténtico y personal.

En tal virtud, declaro que el contenido es de mi sola responsabilidad legal y académica, excepto donde se indican las fuentes de información consultadas.

.....
ELIZABETH DEL ROCIO VILLAFUERTE PEÑA

DERECHOS DE AUTOR

Al presentar este Informe Final del Proyecto de Investigación titulado “DETERMINACIÓN DE RESISTENCIA INDUCIDA EN ESPECIES DE ZANAHORIA BLANCA (*Arracacia xanthorrhiza* BANCR) AL ATAQUE DE *Tetranychus urticae* KOCH (ACARI: TETRANYCHIDAE)”, como uno de los requisitos previos para la obtención del título de grado de Ingeniera Agrónoma, en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato, autorizo a la Biblioteca de la Facultad, para que este documento esté disponible para su lectura, según las normas de la Universidad.

Estoy de acuerdo en que se realice cualquier copia de este Informe Final, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica potencial.

Sin perjuicio de ejercer mi derecho de autor, autorizo a la Universidad Técnica de Ambato la publicación de este Informe Final, o de parte de él.

.....
ELIZABETH DEL ROCIO VILLAFUERTE PEÑA

“DETERMINACIÓN DE RESISTENCIA INDUCIDA EN ESPECIES DE ZANAHORIA BLANCA (*Arracacia xanthorrhiza* BANCR) AL ATAQUE DE *Tetranychus urticae* KOCH (ACARI: TETRANYCHIDAE)”

REVISADO POR:

Phd. Carlos Vásquez

TUTOR

Phd. Marta Dávila

ASESOR DE BIOMETRÍA

APROBADO POR LOS MIEMBROS DE CALIFICACIÓN:

FECHA

Ing. Mg. Hernán Zurita

PRESIDENTE TRIBUNAL

Phd. Marta Dávila

MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN

Phd. Pedro Pablo Pomboza

MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por regalarme el milagro de la vida y concederme la dicha de tener una familia maravillosa, quienes me han acompañado en cada paso que doy, que han estado junto a mí, festejando cada triunfo y animándome en cada fracaso, quienes con su cariño y afecto contribuyeron a mi formación como profesional, pero sobretodo como persona y ser humano, aquellos que han estado apoyándome en el transcurso de este tiempo, para alcanzar mis más grandes sueños.

A la Universidad Técnica de Ambato, en especial a la Facultad de Ciencias Agropecuarias por ser una pieza fundamental en mi formación académica.

A mi tutor PhD Carlos Vásquez, quién me ayudo y compartió sus conocimientos conmigo para poder terminar con éxito la investigación, a la PhD. Marta Dávila, Asesor de Biometría quien me guio y asesoro en el transcurso de la investigación, al PhD Pedro Pablo Pomboza, Asesor de Redacción Técnica quien en su momento supo aconsejarme y a la PhD Liliana Lalaleo, quien, sin ser parte de la investigación, me ayudo gustosa aportándome sus conocimientos y tiempo para poder culminar el proyecto de investigación.

ELIZABETH VILLAFUERTE PEÑA

DEDICATORIA

A Dios, por darme la sabiduría suficiente para no desfallecer y seguir luchando por mis sueños; por regalarme la dicha que conocer el amor verdadero en aquella personita especial, a mi Chiquito\ a quien ha sido mi motivación y mi fuerza, para seguir adelante, el mejor regalo que la vida y Dios me pudieron regalar en el momento indicado.

A mis padres, Manuel Villafuerte y Marlen Peña, quienes han sido mi ejemplo, mi mayor bendición, aquellos que me han regalado parte de su vida, me han cuidado con amor y dedicación, a quienes amo sobre todas cosas y a quienes dedico cada uno de mis triunfos y fracasos porque sin ellos no habría llegado hasta donde estoy ahora.

A mis hermanos, Iván, Lorena, Daniel, Soraya, y mi cuñada Katia Arias quienes han sido mis amigos incondicionales en los que puedo confiar, y sin importar el tiempo y la distancia siempre están ahí junto a mí, animándome a alcanzar los sueños y metas que me he propuesto.

A mi Abuelita, que cuando estuvo a mi lado, supo enseñarme a no rendirme y a luchar por lo que quiero; y ahora desde el cielo sigue guiando mis pasos, hasta lograr mis sueños.

A mi esposo, Rafael Pinto, quien ha tomado mi mano y ha caminado en junto a mí, ayudándome a supera cada adversidad que se me ha presentado en frente.

RESUMEN EJECUTIVO

El ácaro de dos manchas (*Tetranychus urticae* Koch) es una plaga importante en diferentes cultivos, incluyendo la zanahoria blanca (*Arracacia xanthorrhiza*), sin embargo, poco se conoce sobre esta asociación planta–herbívoro. Para determinar la presencia de posibles mecanismos de resistencia, se evaluó el efecto de la alimentación de diferentes densidades del ácaro (0, 2, 4, 6 y 8 ácaros/planta) sobre la actividad de la polifenol oxidasa (PO) y peroxidasa (POX) a las 24, 48 y 72 h después de la infestación en plantas de zanahoria blanca de los cultivares Quinchicoto y Baños de cinco meses de edad, así como las posibles barreras morfológicas para la alimentación del ácaro. Adicionalmente se estudió la duración del ciclo biológico de *T. urticae* en estos materiales, usando unidades de cría. No se observaron diferencias en las diferentes variables morfo-anatómicas (cutícula-epidermis, profundidad del parénquima y longitud de tricomas) entre los dos materiales evaluados. Con relación al ciclo biológico, el tiempo de desarrollo fue significativamente más corto en el cultivar Quinchicoto con respecto a Baños y el control (hojas de fresa).

Se estudió también las concentraciones de enzimas oxidativas producidas por las plantas de *A. xanthorrhiza* en donde se pudo observar en general, que el cultivar Quinchicoto mostró los mayores valores de PPO en comparación al cultivar Baños ($P < 0,0082$; $F = 120,47$; $gl = 1$). Con relación al tiempo después de la infestación y densidad del ácaro, los máximos valores de expresión de la PPO fueron observados en plantas infestadas con 6 y 8 ácaros/hoja a las 48 y 72 horas, respectivamente en el cultivar Quinchicoto, mientras que en el cultivar Baños, las plantas infestadas con 6 y 8 ácaros/planta mostraron los mayores incrementos, aunque fue más evidente con la densidad de 6 ácaros/planta ($P < 0,05$; $F = 66,289$; $gl = 9$), mientras que un comportamiento diferente fue observado con la peroxidasa, puesto que los mayores valores fueron observados en el cultivar Baños a las 24 y 48 h después de la infestación con 4 y 8 ácaros/planta, mientras que el resto de las densidades no provocaron una respuesta consistente a lo largo del período de evaluación. En plantas del cultivar Quinchicoto, la respuesta no mostró diferencias significativas en los diferentes tiempos y densidades evaluadas.

PALABRAS CLAVES: Enzimas, Peroxidasa oxidativa, Polifenol Oxidasa, Proteínas Totales, Ciclo Biológico.

SUMMARY

The two-spotted mite (*Tetranychus urticae* Koch) is an important pest in different crops, including the white carrot (*Arracacia xanthorrhiza*), however little is known about this plant-herbivore association. To determine the presence of possible mechanisms of resistance, the effect of feeding different densities of the mite (0, 2, 4, 6 and 8 mites / plant) on the activity of polyphenol oxidase (PO) and peroxidase (POX) was evaluated.) at 24, 48 and 72 h after the infestation on white carrot plants of the five-month-old Quinchicoto and Baños cultivars, as well as the possible morphological barriers for feeding the mite. Additionally, the duration of the biological cycle of *T. urticae* in these materials was studied, using breeding units. No differences were observed in the different morpho-anatomical variables (cuticle-epidermis, parenchyma depth and trichome length) between the two evaluated materials. In relation to the biological cycle, the development time was significantly shorter in the cultivar Quinchicoto with respect to Baños and the control (strawberry leaves).

The concentrations of oxidative enzymes produced by the plants of *A. xanthorrhiza* were also studied, where it was observed in general that the Quinchicoto cultivar showed the highest PPO values in comparison to the cultivated Baños ($P < 0.0082$, $F = 120, 47$, $gl = 1$). Regarding the time after the infestation and density of the mite, the maximum expression values of the PPO were observed in plants infested with 6 and 8 mites / leaf at 48 and 72 hours, respectively in the cultivar Quinchicoto, while in the cultivate Baths, plants infested with 6 and 8 mites / plant showed the highest increases, although it was more evident with the density of 6 mites / plant ($P < 0.05$, $F = 66.289$, $gl = 9$), while a behavior different was observed with peroxidase, since the highest values were observed in the cultivar Baños at 24 and 48 h after the infestation with 4 and 8 mites / plant, while the rest of the densities did not provoke a consistent response throughout the evaluation period. In plants of the Quinchicoto cultivar, the response did not show significant differences in the different times and densities evaluated.

KEY WORDS: Enzymes, Oxidative Peroxidase, Polyphenol Oxidase, Total Proteins, Biological Cycle

INDICE DE CONTENIDOS

CAPITULO I	1
INTRODUCCION	1
CAPITULO II	3
MARCO TEÓRICO O REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1.- ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS	3
2.2. CATEGORÍAS FUNDAMENTALES O MARCO CONCEPTUAL	5
2.2.1. Unidad de análisis	5
2.2.2 Taxonomía y morfología	5
2.2.2.1 Otros nombres vulgares	5
2.2.2.2 Características	6
2.2.2.3 Usos.....	6
2.2.2.4 Otras especies	6
2.2.2.5 Descripción botánica de la zanahoria blanca	6
2.2.2.6 Ciclo biológico o agronómico de la zanahoria blanca.....	7
2.2.2.7 Plagas de la zanahoria blanca	8
2.2.2.8 Enfermedades de la zanahoria blanca	8
2.2.3 <i>Tetranychus urticae</i>	9
2.2.3.1 Taxonomía del Ácaro de dos manchas	9
2.2.3.2 Caracteres morfológicos	10
2.2.3.3 Ciclo biológico	10
2.2.3.4 Síntomas / daños.....	11
2.2.3.5 Control Biológico	12
2.2.3.6 Medidas culturales.....	12
2.2.4. Variable dependiente	12
2.2.4 Variable independiente	14
CAPÍTULO III	15
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	15
3.1. HIPÓTESIS.....	15
3.2. OBJETIVOS.....	15
3.2.1. Objetivo General	15
3.2.2. Objetivos Específicos	15
CAPÍTULO IV	16

MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
4.1. UBICACIÓN DEL ENSAYO	16
4.2. CARACTERIZACIÓN DEL LUGAR	16
4.3. EQUIPOS Y MATERIALES	16
4.4. FACTORES DE ESTUDIO	17
4.4.1. Duración del ciclo biológico:	17
4.4.2. Respuesta de la planta al ataque de <i>T. urticae</i>.	18
4.5. DISEÑO EXPERIMENTAL	18
4.6. ESQUEMA DE LA DISPOSICIÓN DEL ENSAYO	18
4.6.1. Estudio de biología	18
4.6.2. Estudio de respuesta de la planta al ataque del ácaro	18
4.7. MANEJO DEL EXPERIMENTO	19
4.8. VARIABLES RESPUESTA	20
4.9. PROCESAMIENTO DE LA INFORMACION	23
4.9.1. Duración del ciclo biológico de <i>T. urticae</i>.	20
4.9.2. Posible presencia de estructuras morfológicas o anatómicas de la hoja de <i>A. xanthorrhiza</i> como mecanismo de defensa al ataque de <i>T. urticae</i>.	21
4.9.3. Determinación de las concentraciones de compuestos derivados de la acción de las enzimas oxidativas (PO y POX) en hojas de <i>A. xanthorrhiza</i>.	21
CAPÍTULO V	24
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24
5.1. Ciclo biológico de <i>T. urticae</i> en dos cultivares de Zanahoria Blanca <i>Arracacia xanthorrhiza</i>, comparado con Fresa <i>Fragaria Vesca</i>	24
5.2. Estructuras morfológicas o anatómicas de la hoja de <i>A. xanthorrhiza</i> como mecanismo de defensa al ataque de <i>T. urticae</i>.	25
5.3 Determinación de las concentraciones de compuestos derivados de la acción de las enzimas oxidativas (PO y POX) en hojas de <i>A. xanthorrhiza</i>	26
CAPITULO VI	31
CONCLUSIONES, BIBLIOGRAFÍA Y ANEXOS	31
6.1 CONCLUSIONES	31
6.2 BIBLIOGRAFIA	32
6.3 ANEXOS	36
CAPÍTULO VII	45
PROPUESTA	45
7.1 TITULO	45
7.2 DATOS INFORMATIVOS	45

7.3 ANTECEDENTES DE LA PROPUESTA	45
7.4 JUSTIFICACION	45
7.5 OBJETIVO	46
7.6 ANALISIS DE FACTIBILIDAD	46
7.7 FUNDAMENTACION	46
7.8 METODOLOGIA	46
7.9 PREVISIÓN DE LA EVALUACIÓN	49

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo bilogico del Tetrnichus urticae	11
Figura 2. Características de la Morfología de la hoja de zanahoria blanca	26
Figura 3. Variación en el contenido de polifenol oxidasa y peroxidasa en plantas de A. xanthorrhiza	29

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Ciclo Biológico del <i>Tetranychus urticae</i>	36
Anexo 2. Morfología de la hoja de <i>Arracacia xanthorrhiza</i>	37
Anexo 3 Características de la Morfología de la hoja de zanahoria blanca	40
Anexo 4 Corte transversal de la hoja de <i>A. xanthorrhiza</i> cultivar Quinchicoto, en donde podemos observar las estructuras internas (cutícula, epidermis, parénquima).	41
Anexo 5. Hoja de <i>A. xanthorrhiza</i> cultivar Baños, en donde podemos observar las estructuras externas (tricoma).....	41
Anexo 6. Hoja de <i>A. xanthorrhiza</i> cultivar Baños, en donde podemos observar las estructuras externas (tricoma).....	42
Anexo 7 Determinación de las concentraciones de compuestos derivados de la acción de las enzimas oxidativas (PO y POX) en hojas de <i>A. xanthorrhiza</i>	42

INDICE DE TABLAS

TABLA 1. Clasificación taxonómica de la zanahoria blanca	5
TABLA 2. Clasificación taxonómica del ácaro.....	9
TABLA 3. Distribución del ensayo en campo	18
TABLA 4. Disposición de los tratamientos en el invernadero.....	19
TABLA 5. Ciclo biológico de <i>T. Urticae</i> en dos cultivares de zanahoria blanca (<i>A. xanthorrhiza</i>), comparado con fresa (<i>F. Vesca</i>)	24

CAPITULO I

INTRODUCCION

La zanahoria blanca (*Arracacia xanthorrhiza*) es la planta cultivada más antigua de América, es una umbelífera, las raíces de la arracacha constituyen uno de los alimentos nativos más agradables y alimenticios, destacando su almidón, el cual se caracteriza por tener diminutos gránulos, empleados generalmente como un alimento altamente digerible de niños y ancianos, (Suarez, 2009). La arracacha es un producto de gran importancia agro-alimentaria y socio-económica que, alternada con la papa, se cultiva en parcelas de pequeños agricultores, quienes han adquirido tradicionalmente sus conocimientos sobre el sistema de producción (Alvarado & Ochoa, 2010)

A pesar de su alta potencialidad para la agroindustria y sus buenas cualidades nutricionales, es una especie a la que no se le ha dado suficiente importancia dentro de los planes de desarrollo agrícola, tanto nacionales, como departamentales (Rodríguez, 2006).

Desde el inicio de la agricultura, numerosos cultivos son afectados por el ataque de plagas, las cuales pueden provocar serias pérdidas económicas, incluyendo insectos y ácaros (Jiménez, 2016). El ácaro de dos manchas, *Tetranychus urticae* Koch es una de las plagas más perjudiciales que afectan los huertos, en los cultivos (Bolland, 1998). Esta especie generalmente se encuentra en el envés de las hojas, donde produce tela y colonias densas donde se alimenta del contenido de las células, lo que se manifiesta en forma de manchas cloróticas en el lado superior de las hojas (Jiménez, 2016). Hasta la fecha, el control de *T. urticae* se ha basado, principalmente, en el control químico, sin embargo, este método no es siempre eficaz, además que ejerce control sobre los enemigos naturales y se crean condiciones favorables para el aumento poblacional de *T. urticae* y otras plagas (Poliane, 2012).

Tetranychus urticae se reproduce mediante partenogénesis de tipo arrenotoca en la que los machos se desarrollan a partir de huevos no fertilizados (haploides), mientras que las hembras se desarrollan a partir de huevos fecundados (diploides) (Poliane, 2012).

Esta especie presenta una proporción de sexos entre 2:1 y 9:1 a favor de las hembras, cada hembra adulta puede poner unos 100-120 huevos, con una tasa de 3-5 huevos por día, sin embargo, estas cifras pueden variar según la cantidad y la calidad del alimento, o las condiciones ambientales (Poliane, 2012).

Experimentos de infestaciones artificiales con áfidos mostraron que los cultivares más resistentes son los que poseen los tricomas más largos, más altos y más densos, las células glandulares más grandes y más completas, y la mayor parte de la cera en la epidermis de la hoja inferior, en los cultivares más resistentes se mostró que la actividad de las enzimas superóxido dismutasa y ascorbato peroxidasa aumentó rápidamente después de infestación, y sus niveles se mantuvieron altos de setenta y dos a ciento sesenta y ocho horas después de la inoculación (Junping & Sumei, 2011). De manera similar, (Vasqu ez & al, 2016) observaron mayor tiempo de desarrollo y menor tasa de oviposición de *Raoiella indica* Hirst cuando fue criada sobre hojas de coco cultivar Alto Caribe, lo que sugirió que este cultivar es más resistente al daño por alimentación de *R. indica*. Adicionalmente este cultivar mostró mayor relación PPO/POX, siendo hasta dos veces mayor que en el cultivar Enano Amarillo malayo (EAM).

Poco se conoce sobre el impacto del daño por alimentación del ácaro de dos manchas (*T. urticae*) sobre plantas en zanahoria blanca (*A. xanthorrhiza*), en el presente estudio se evaluó el efecto de diferentes densidades del ácaro sobre la actividad de las enzimas oxidativas (peroxidasa oxidativa, Polifenol Oxidasa), así como algunos parámetros morfo-anatómicos de la hoja de plantas *A. xanthorrhiza* de los cultivares Quinchicoto y Baños. Adicionalmente se evaluó la duración del ciclo biológico del ácaro como posibles formas de evaluar la resistencia inducida por efecto de la alimentación de *T. urticae*.

CAPITULO II

MARCO TEÓRICO O REVISIÓN DE LITERATURA

2.1.- ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS

Las plantas superiores han desarrollado una diversidad de mecanismos de defensa contra patógeno y plagas, los cuales han generado contra-respuestas en los herbívoros de modo de superar estas barreras físicas y químicas (Ramírez & Rodríguez, 2012). En el caso de los patógenos, los factores que regulan las reacciones de defensa son conocidas como moléculas activadoras o promotoras, las cuales inducen reacciones de defensa, tales como la producción de fitoalexinas, proteínas antimicrobianas, proteínas relacionadas con la patogenicidad, reacciones de oxidación y cambios estructurales a nivel de la pared celular, entre otras, cuya aparición está regulada espacio-temporalmente (Riveros, 2001).

Las plantas, organismos sésiles, están obligadas a discriminar entre los diferentes retos que les plantea su entorno y responder a ellos, estas respuestas a su ambiente biótico y abiótico les permiten la mejor distribución de sus recursos para crecer, reproducirse y defenderse, la enorme diversidad fitoquímica y el largo tiempo de evolución de este metabolismo han resultado en interacciones de complejidad creciente (Vivanco & Cosio, 2005). En el caso de las interacciones entre plantas e insectos, por ejemplo, ciertos compuestos con estructuras muy similares pueden ejercer actividades muy disímiles, desde insecticidas hasta repelentes o incluso atrayentes (Vivanco & Cosio, 2005)

El conocimiento de las bases genéticas y moleculares que controlan los mecanismos de defensa de las plantas frente a patógenos y plagas ha permitido comprobar la existencia de grandes similitudes entre los mecanismos de defensa vegetales y el sistema de inmunidad innata, no mediado por anticuerpos, de los animales, siendo en ambos casos basados en la activación de barreras de defensa inducibles posterior al reconocimiento mediante receptores de membrana o intracelulares de moléculas características de los patógenos (Molina & Sánchez, 2007). En las plantas, este reconocimiento puede ser especie-específico, como ocurre en la resistencia basal y de no-huésped, a nivel de cultivar, como sucede en la resistencia gen a gen y también disponen de barreras de defensa constitutivas o preexistentes que desempeñan un papel relevante en resistencia basal y de no-huésped (Molina & Sánchez, 2007).

El estudio de las bases moleculares y genéticas de la resistencia inducida ha despertado el interés de investigadores debido a que estos mecanismos de defensa inducibles son sistémicos, es decir, no sólo se activan en el tejido donde se produce el reconocimiento del patógeno/plaga, sino también en el resto de la planta que no ha estado expuesta a la infección que confiere protección a la planta frente a posteriores ataques de patógenos/plagas, lo cual tiene un marcado potencial utilidad en producción de cultivos (Molina & Sánchez, 2007).

Las peroxidasas (PO) están ampliamente distribuidas entre las plantas superiores, parte de su importancia se debe a que catalizan la oxidación de varios fenoles donadores de electrones en presencia de peróxido de hidrógeno, generando radicales libres que reaccionan entre sí y producen dímeros (Rivas & et al, 2008). La peroxidasa de rábano es una enzima muy efectiva para oxidaciones orgánicas e inorgánicas pero su utilización está limitada a una sola fuente comercial, que tiene un alto costo y en ocasiones tiene limitada capacidad para reconocer nuevos sustratos. Algunas de las funciones fisiológicas de las peroxidasas en las plantas son: su participación en la biosíntesis del etileno, la defensa contra infecciones, en la curación de heridas y en la lignificación de la pared celular (Rivas & et al, 2008)

El polifenol oxidasa (PPO) es un metaloenzima que se encuentra ampliamente distribuido en plantas y hongos. La PPO contiene dos átomos de cobre en el sitio activo que catalizan dos tipos de reacciones usando O_2 como agente oxidante: (a) la o-hidroxilación de monofenoles para producir o-difenoles (actividad monofenol monoxigenasa); y (b) la posterior oxidación de o-difenoles a o-quinonas (actividad catecolasa), la reacción general sugiere que la enzima cataliza la formación de quinonas altamente reactivas que reaccionan con grupos amino o sulfhidrilo de proteínas; estas reacciones generan cambios en las características físicas, químicas y nutricionales del alimento (Muñoz & Londoño, 2007). Las quinonas también pueden conducir a la polimerización y a reacciones de condensación entre proteínas y polifenoles, produciendo como consecuencia pigmentos de color café, proceso conocido como “pardeamiento enzimático” que va en detrimento del perfil nutricional del alimento, dado el impacto negativo de ésta reacción para la industria alimenticia, las PPO son ampliamente estudiadas, sin embargo su función en muchos vegetales no ha sido totalmente resuelta (Muñoz & Londoño, 2007).

2.2. CATEGORÍAS FUNDAMENTALES O MARCO CONCEPTUAL

2.2.1. Unidad de análisis

La zanahoria blanca o arracacha es considerada una de las plantas domesticadas más antiguas de América en virtud de su gran variabilidad y la existencia de formas silvestres. No hay vestigios que permitan identificar el origen exacto de la especie, pero es probable que se encuentre en el área septentrional de América del Sur, entre Colombia, Ecuador y Perú, por la presencia de especies silvestres afines (Rodríguez, y otros, 2007).

2.2.2 Taxonomía y morfología

Tabla 1. Clasificación Taxonómica de la zanahoria blanca

Familia	Apiaceae
Nombre Científico	<i>Arracacia xanthorrhiza</i> Bancr
Nombre Común	Arracacha, Zanahoria Blanca
Descripción	Hierba erecta, perenne, que alcanza hasta 1 m de altura, con raíces amarillas o blancas. Hojas basales grandes, usualmente con cinco pinnas avado-acuminadas. Fruto oblongo
Usos	Ornamentales y como especia
Origen	Centro Asiático

Fuente: (UTE, 2012).

2.2.2.1 Otros nombres vulgares

Apio criollo, Racacha, Virraca, Afió o Mandioquinha salsa.

2.2.2.2 Características

La planta de la arracacha tiene un tronco cilíndrico corto con numerosos brotes en la parte superior de donde parten las hojas de peciolo largos y sus flores son de color púrpura. Su parte comestible es la raíz que asemeja a una zanahoria engrosada, ésta puede ser de color blanco, amarillo o morado según la variedad (Stocco, 2016).

2.2.2.3 Usos

La arracacha se cultiva principalmente por su raíz, que es de sabor agradable y de fácil digestibilidad, ya que posee un almidón muy fino, alto contenido de calcio y vitamina A y niveles adecuados de niacina, ácido ascórbico y fósforo. Su principal inconveniente es su corta vida de almacenamiento y su vulnerabilidad a sufrir daños durante el transporte. Dado su valor nutricional el consumo de arracacha es recomendado en la dieta alimenticia de niños, ancianos y convalecientes. Aunque la arracacha es más conocida por sus raíces, ninguna parte de esta planta queda sin aprovecharse, puesto que los tallos y las hojas se usan como alimento (Cueva, 2016).

En la medicina tradicional es utilizada cocida y amasada en calidad de cataplasmas antiinflamatorios y antisépticos; también se le conocía como diurético y estimulante, antidiarréico, para expulsar la placenta y para las verrugas de la piel. Los tallos jóvenes pueden ser consumidos en ensaladas y las hojas pueden ser utilizadas como forraje para ganado vacuno o porcino (Valdiviezo, 2016).

2.2.2.4 Otras especies

Pertenece a la familia de las apiáceas, al igual que la zanahoria (*Daucus carota*) y el apio (*Apium graveolens*) (Roig, 1988).

2.2.2.5 Descripción botánica de la zanahoria blanca

Son plantas anuales o bienales cultivadas como anuales, alógamas auto compatibles de hasta 1,6 m de altura, con la raíz napiforme o fusiforme cilíndrica, cónica o redondeada,

blancuzca, amarillo rojiza o anaranjada, con los tallos solitarios, cilíndricos erectos estriados e hispídos y muy ramificados (Milán, 2016).

Hojas oblongadas (5-15 x 2-7 cm), con los segmentos lineares a lanceolados y pecíolos ensanchados en la base y de 3-10 cm. Foliolos 3-7 pares por segmento más uno terminal, lineal-lanceolado (2-12 x 0,5-2 mm) con el borde entero o denticulado, el ápice agudo mucronado y lampiños a hispídos especialmente en nervaduras y bordes (Méndez, 2017).

Flores con pedicelos de 3-10 mm en umbelas con hasta 20 umbélulas y con pedúnculos hispídos y de 25-60 cm. Involucro de brácteas foliáceas, filiformes de 3-30 mm de longitud y reflejas. Involucelos de bracteolas lineares, acuminadas y ciliadas. Pétalos blancos, amarillos, rosados o purpúreos y acuminados. Mericarpos oblongo-ovoideos, de 3-4 mm de longitud y unos 2 mm de diámetro con costillas cubiertas de espínulas y pelos rígidos (Méndez, 2017).

Semillas ovoideas (2-3,5 x 1-2 x 0,8-1 mm), espinosas y de color amarillo grisáceo o pardo grisáceo. $2n = 18$.

Se cultiva por sus raíces comestibles y también para forrajes. De las raíces se obtiene un colorante para alimentos. Las semillas son aromáticas y puede obtenerse de ellas un aceite esencia, multiplicación por semilla (Méndez, 2017).

2.2.2.6 Ciclo biológico o agronómico de la zanahoria blanca

Es un cultivo que, en condiciones de clima templado se puede cultivar durante todo el año, aunque normalmente se siembra entre febrero y noviembre. En las zonas de Andalucía se suelen realizar siembras escalonadas entre finales de agosto y enero.

En regiones más frías, donde se cultivan variedades de raíz gruesa destinados a la industria o al mercado interior, las siembras se realizan entre marzo y mayo, y la recolección se lleva a cabo a finales de la primavera y mediados del otoño (Burgos & Amaya, 2006).

Los ciclos de las zanahorias son bastante variables, dependiendo de la variedad elegida, pero de forma general, el ciclo se cubre entre 75 y 220 días. Los ciclos más utilizados están en torno a 90-130 días (Burgos & Amaya, 2006).

2.2.2.7 Plagas de la zanahoria blanca

- Mosca de la zanahoria (*Psilarsae* Fab.) es un díptero cuyas larvas producen galerías en la raíz (Lardizabal & Theodoracopoulos, 2007).

Gusanos grises (*Agriotis* spp.): son lepidópteros noctuidos que mordisquea las bases de las plantitas (Lardizabal & Theodoracopoulos, 2007).

- Pulgón de la zanahoria (*Semiaphis dauci* F.): los pulgones producen amarilleamiento, algunos pueden atacar a las raíces (Lardizabal & Theodoracopoulos, 2007).
- Nematodos del suelo (*Heterodera* spp.) que produce abultamientos y deformaciones radiculares (Lardizabal & Theodoracopoulos, 2007).
- El ácaro de las dos manchas (*T. urticae*) produce cambios en la coloración de la hoja, reducción de la tasa de crecimiento, retraso de la floración y disminución en la producción de frutos (Vásquez & Ceballos, 2009).

2.2.2.8 Enfermedades de la zanahoria blanca

- Podredumbre negra de las raíces (*Stemphylium radicinum* Neeg.) producida por un hongo que origina una mohosidad negruzca en la parte superior de la raíz (Theodoracopoulos, 2005).
- *Phoma lingam* Tod.: ataca plantas jóvenes provocando podredumbre en el cuello de la planta, lo que ocasiona la muerte de plántulas. Cuando el ataque ocurre en plantas adultas, produce manchas rojas y debilitamiento de la planta (Theodoracopoulos, 2005).
- *Alternaria dauci* (Jun) Groves et Skolko, si ataca en las primeras fases de desarrollo, puede producir problemas de germinación, mientras que si el ataque

ocurre en plantas más desarrolladas, el daño se evidencia con manchas parduzcas, similares a quemaduras, en los bordes de las hojas (Theodoracopoulos, 2005).

- Mildiu de la zanahoria (*Plasmopara nivea* Schr.), en el haz produce manchas amarillentas y en el envés un micelio afieltrado (Theodoracopoulos, 2005).
- Oidio de las zanahorias (*Leveillula taurica* (Lv) Arn, *Erysiphe umbelliferarum* De By), producen un polvo blanquecino sobre las hojas (Theodoracopoulos, 2005).
- *Sclerotinia sclerotiorum*: produce podredumbres radiculares, con desarrollo de micelios blanquecinos (Theodoracopoulos, 2005).
- Enfermedad de las manchas secas (*Pytium violae* Cherters & Hickman): aparecen manchas secas de color marrón en cavidades redondas u ovaladas. Virus del mosaico de la zanahoria, virus del enanismo, virus de la mosca del apio, amarilleamiento de la zanahoria. Varios virus que ocasionan diversa sintomatología (Theodoracopoulos, 2005).

2.2.3 *Tetranychus urticae*

Los ácaros fitófagos constituyen el grupo más importante dentro de las especies plaga de las plantas cultivadas, después de los insectos (Jeppson., 1975). Comprenden entre un 15 y 20% de las especies plaga de mayor incidencia económica en los cultivos de zanahoria blanca. Dentro de los ácaros plaga se encuentran especies polífagas (en cultivos herbáceos y frutales) y especies monófagas u olífagas (Jiménez., 2016).

2.2.3.1 Taxonomía del Ácaro de dos manchas

Tabla 2. Clasificación Taxonómica del Ácaro

Reino :	Animalia
Filo:	Arthropoda
Subfilo:	Chelicerata

Clase:	Arachnida
Subclase:	Acari
Superorden:	Acariformes
Orden:	Prostigmata
Suborden:	Eleutherengona
Infraorden:	Raphignathae
Superfamilia:	Tetranychoidae
Familia:	Tetranychidae
Género:	<i>Tetranychus</i>
Especie:	<i>T. urticae</i> Koch, 1836

Fuente: (UTE, 2012).

2.2.3.2 Caracteres morfológicos

Estado: Adulto

Tamaño: 0,5 mm

Características: Los machos son de forma aplanada con largas patas, mientras que las hembras son más esféricas. La coloración es variable: rojo anaranjado (hembra) o amarillento (macho), ambos con ocelos rojos. Presentan 2 manchas dorsales laterales oscuras en el interior del cuerpo, que se observan mejor en los individuos de color claro. En sus estados inmaduros presentan la misma forma, aunque inicialmente con 3 pares de patas en lugar de 4, y su cuerpo es de una coloración más pálida (Soto, 2011).

Estado: Huevo

Tamaño: 0,1 mm

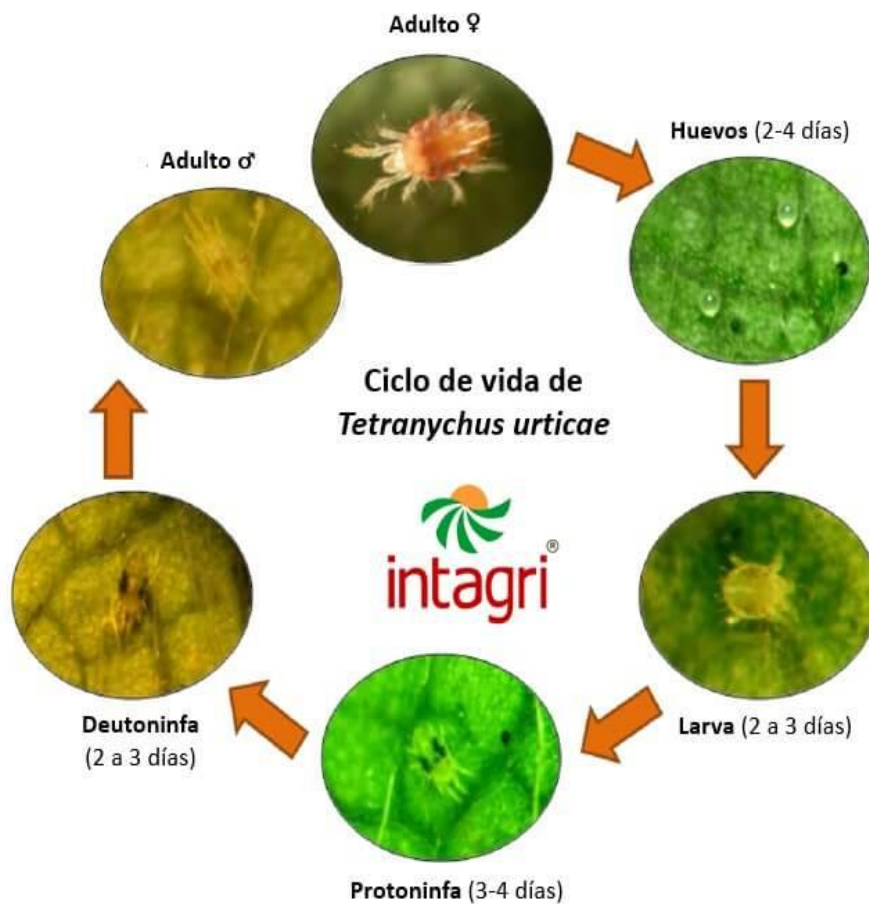
Características: Esférico, liso, transparente, volviéndose anaranjado conforme va evolucionando (Soto, 2011).

2.2.3.3 Ciclo biológico

Comienzan a aumentar sus poblaciones en primavera y en verano completa una generación en poco más de una semana, necesitando más tiempo cuando las temperaturas

son menores. Pueden estar sucediéndose las generaciones ininterrumpidamente durante todo el año en zonas donde el invierno es suave (aunque de una forma más lenta), o bien, invernar como adulto hasta la próxima primavera en las regiones más frías (Forero, 2008).

Figura 1. Ciclo biológico del *Tetranychus urticae*



Fuente: (intagri, 2012).

2.2.3.4 Síntomas / daños

- Hojas: decoloración a causa de las picaduras, que acaban desecando la zona afectada. Ataques intensos pueden llegar a provocar que la planta pierda las hojas de forma prematura, sobre todo si sopla viento seco (Sánchez., 2001).
- En algunos cultivos como los cítricos, se producen abultamientos amarillentos en las hojas (Sánchez., 2001).

- Fruto: en la zona afectada aparecen manchas oscuras, adquiriendo un aspecto como sucio (Sánchez., 2001).
- A simple vista, se observan como pequeños puntos rojizos localizados en el envés de las hojas, formando colonias protegidas por hilos de seda (característica que lo diferencia de otros ácaros como *Panonychus citri*, que no produce seda) (Sánchez., 2001).

2.2.3.5 Control Biológico

Posee varios enemigos naturales, entre ellos los más importantes son: ácaros fitoseidos (*Neoseiulus californicus* y *Phytoseiulus persimilis*), *Conwentzia psociformis*, *Stethorus punctillum*, *Feltiella acarisuga* (Coleoptera: Coccinellidae) y ciertos chinches depredadores como *Nesidiocoris tenuis*. Todos estos organismos contribuyen a reducir las poblaciones de ácaros, pero no acaban de ejercer un control total, especialmente cuando dichas poblaciones experimentan un incremento elevado en poco tiempo, como ocurre en verano (Boller, 2004).

2.2.3.6 Medidas culturales

Esta plaga prefiere un clima cálido y seco. En jardinería doméstica una buena práctica es pulverizar con agua las plantas con el objetivo de elevar la humedad para impedir su desarrollo, además de mantenerlas en un lugar fresco (Gugole, 2012).

2.2.4. Variable dependiente

Las plagas son responsables de gran parte de la disminución en la producción agrícola y su combate se realiza básicamente mediante métodos químicos. Sin embargo, las plantas también son capaces de reaccionar y defenderse por sí solas, utilizando una serie de mecanismos naturales, las interacciones planta-plaga pueden presentar varios tipos de asociaciones, que dependen en gran parte del contenido genético de cada organismo; la resistencia inducida es una forma de defensa activa que involucra la expresión

diferencial de genes y cambios metabólicos que ocurren como consecuencia de un proceso de reconocimiento específico entre la planta y la plaga (Madriz, 2002).

Dentro de los mecanismos de defensa que poseen las plantas se encuentran tanto físicas de las barreras en la superficie de planta (cutina, suberina y cera), protección física en las barreras internas de la planta (formación de tejidos suberizados) y protección química como metabolitos secundarios (terpenos, compuestos fenólicos y compuestos que contienen N) (Madriz, 2002).

El ataque de plagas es una condición desfavorable que generalmente promueve la actividad de algunas enzimas (Peroxidasa, Polifenol Oxidasa) como una serie de mecanismos de defensa en la planta hospedera cuyo fin es detener, aminorar o contrarrestar las infecciones. Las plantas pueden poseer mecanismos constitutivos de defensa que proveen, de forma pasiva, resistencia contra patógenos. Los mecanismos de resistencia constitutiva o "preformada" se pueden dividir en mecanismos de defensa estructurales constitutivos, como por ejemplo la presencia de capas gruesas de cutícula, presencia de tricomas, deposición de ceras, entre otros; y mecanismos de defensa químicos constitutivos, tales como la acumulación de compuestos tóxicos en las células vegetales (Madriz, 2002).

A diferencia de la defensa constitutiva, los mecanismos inducidos de defensa, también llamados como resistencia inducida, se activan solamente como una respuesta al ataque de una plaga, la resistencia inducida es un mecanismo activo de defensa que involucra cambios claros en el metabolismo provocados por la expresión diferencial de genes, por lo tanto, para que ocurra la inducción de la defensa, es necesaria la mediación de sistemas de reconocimiento específico, mediante los cuales la planta reconoce la presencia del patógeno (Madriz, 2002).

2.2.4 Variable independiente

El ácaro de las dos manchas, *Tetranychus urticae*, se caracteriza por presentar una distribución cosmopolita, por su tendencia a agruparse en colonias produciendo densas telas, y por la polifagia de algunas de sus especies, los individuos tienen tamaño pequeño, entre 0,2 y 0,6 mm, y el color del cuerpo puede ser verde o rojo; de acuerdo a la forma verde es generalmente encontrada en climas fríos y templados mientras que la forma roja en zonas cálidas y subtropicales. Existe un marcado dimorfismo sexual entre la hembra y el macho, siendo éste más pequeño y alargado, el ácaro de dos manchas pasa por cinco estados de desarrollo durante su ciclo de vida: huevo, larva, protoninfa, deutoninfa y adulto, con un estado de quiescencia luego de cada estado inmaduro, llamados protocrisálida, deutocrisálida y teliocrisálida, respectivamente; durante este período de inactividad los ácaros forman una nueva cutícula antes de desprender su exuvia, la supervivencia, longevidad y reproducción de *T. urticae* varían en respuesta a diferentes factores tales como la temperatura, la humedad, la planta hospedadora, los plaguicidas utilizados en el cultivo, y factores intrínsecos de cada especie (Guerrero, 2015).

CAPÍTULO III

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1. HIPÓTESIS

El daño por alimentación de *Tetranychus urticae* ayuda a la activación de enzimas oxidativas como mecanismo de resistencia inducida en cultivares de *Arracacia xanthorrhiza* Bancr.

3.2. OBJETIVOS

3.2.1. Objetivo General

- Determinar la resistencia inducida en especies de zanahoria blanca (*Arracacia xanthorrhiza* Bancr) al ataque de *Tetranychus urticae*.

3.2.2. Objetivos Específicos

- Estudiar la duración del ciclo biológico de *T. urticae* en dos cultivares de *A. xanthorrhiza*.
- Estudiar la posible presencia de estructuras morfológicas o anatómicas de la hoja de *A. xanthorrhiza* como mecanismo de defensa al ataque de *T. urticae*.
- Determinar las concentraciones de compuestos derivados de la acción de las enzimas oxidativas (PO y POX) en hojas de *A. xanthorrhiza* como respuesta al ataque de *T. urticae*.

CAPÍTULO IV

MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. UBICACIÓN DEL ENSAYO

La investigación se llevó a cabo en la Granja Experimental Querochaca, de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, de la Universidad Técnica de Ambato, situada en el cantón Cevallos, provincia de Tungurahua, a la latitud de 1° 22'02" S y longitud de 78° 36'22" O, con altitud de 2 850 msnm.

4.2. CARACTERIZACIÓN DEL LUGAR

El estudio fue realizado en dos fases. La primera fase consistió en el estudio de la duración del ciclo biológico de *T. urticae* en dos cultivares de zanahoria blanca, el cual fue conducido en el Laboratorio de Sanidad Vegetal de la FCAGP. El segundo ensayo para la determinación de la respuesta de dos cultivares de zanahoria blanca al ataque de diferentes densidades de *T. urticae* que fue conducido bajo condiciones de invernadero, Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato.

4.3. EQUIPOS Y MATERIALES

Equipo

Estereoscopio
cámara fotográfica
Espectrofotómetro

Materiales

hojas de arracacia
T. urticae
Cajas Petri
Esponja (1cm. de espesor)
Pisetas
Mortero
Algodón grande

Pinceles # 000

Macetas

Sustrato para macetas

Aguja de disección

Sustrato para las enzimas

Hielo en cubos

Papel filtro

Vasos de precipitación

Embudos

Erlenmeyer

Papel aluminio

Toallitas

Reactivos

Peroxidasa

Polifenol – oxidasa

Buffer Tris- HCl

Detergente grado analítico

NaCl

NaOH

HCl

Agua destilada

4.4. FACTORES DE ESTUDIO

4.4.1. Duración del ciclo biológico: Se evaluó el tiempo de desarrollo desde huevo a adulto de *T. urticae* criado en discos de hoja de dos cultivares de arracacia (Quinchicoto y Baños).

4.4.2. Morfología foliar: Se midió el grosor de la cutícula, epidermis, profundidad del parénquima esponjoso y longitud del tricoma simple, en la cara abaxial de la hoja como posible mecanismo de resistencia morfológica en los diferentes cultivares, como respuesta ante el ataque de *T. urticae*.

4.4.3. Respuesta de la planta al ataque de *T. urticae*: En esta fase se determinó la concentración de enzimas oxidativas (polifenol oxidasa y peroxidasa) a las 0, 24, 48 y 72 horas después de la infestación como respuesta al ataque de diferentes densidades de *T. urticae* (0, 2, 4, 6 y 8 ácaros/folículo).

4.5. DISEÑO EXPERIMENTAL

El estudio sobre biología fue conducido en un diseño completamente al azar (DCA). El estudio sobre la respuesta de la planta al ataque del ácaro fue conducido en un diseño completamente al azar con los tratamientos dispuestos en parcelas subdivididas, siendo la parcela principal el cultivar, la sub-parcela representada por la densidad del ácaro y la sub-sub-parcela estará representada por el tiempo de muestreo.

4.6. ESQUEMA DE LA DISPOSICIÓN DEL ENSAYO

4.6.1. Estudio de biología

Tabla 3. Distribución del ensayo en campo

Cultivar “Quinchicoto”	R1	R9	R3	R5	R8	R2	R6	R4	R10	R7
Cultivar “Baños”	R5	R10	R2	R7	R9	R1	R4	R6	R8	R3

4.6.2. Estudio de respuesta de la planta al ataque del ácaro

Factor 1: el tipo de cultivar representó el primer factor, el cual fue denotado con la letra C. Niveles: C1= “Quinchicoto” y C2= “Baños”

Factor 2: la densidad de infestación fue denotada por la letra P. Niveles: P0= 0 ácaros/folículo; P1= 2 ácaros/folículo; P2= 4 ácaros/folículo; P3= 6 ácaros/folículo y P4= 8 ácaros/folículo.

Factor 3: Tiempo de muestreo, denotados por la letra T. Niveles: T0= 0 h después de la infestación; T1= 24 h después de la infestación; T2= 48 h después de la infestación y T3= 72 h después de la infestación.

Tabla 4. Disposición de los tratamientos en el invernadero

		0 h	24 h	48 h	72 h
Cultivar "Quinchicoto"	0 ácaros/folículo	C1P0T0R1	C1P0T1R5	C1P0T2R	C1P0T3R
	2 ácaros/folículo	C1P1T0R3	C1P1T1R	C1P1T2R	C1P1T3R
	4 ácaros/folículo	C1P2T0R2	C1P2T1R	C1P2T2R	C1P2T3R
	6 ácaros/folículo	C1P3T0R4	C1P3T1R	C1P3T2R	C1P3T3R
	8 ácaros/folículo	C1P4T0R5	C1P4T1R	C1P4T2R	C1P4T3R
Cultivar "Baños"	0 ácaros/folículo	C2P0T0R1	C2P0T1R5	C2P0T2R	C2P0T3R
	2 ácaros/folículo	C2P1T0R3	C2P1T1R	C2P1T2R	C2P1T3R
	4 ácaros/folículo	C2P2T0R2	C2P2T1R	C2P2T2R	C2P2T3R
	6 ácaros/folículo	C2P3T0R4	C2P3T1R	C2P3T2R	C2P3T3R
	8 ácaros/folículo	C2P4T0R5	C2P4T1R	C2P4T2R	C2P4T3R

4.7. MANEJO DEL EXPERIMENTO

El proyecto fue conducido en dos fases: la primera fase bajo condiciones de laboratorio (duración del ciclo biológico) mientras que la segunda fase fue realizada bajo cubierta (actividad enzimática). En el laboratorio, los ácaros fueron criados para determinar los aspectos biológicos del ácaro en estudio, mientras que, en el campo, se evaluó la resistencia de dos cultivares de arracacia la cual fue evidenciada en función de la activación de enzimas oxidativas (polifenol oxidasa y peroxidasa) por acción de diferentes densidades de infestación de *T. urticae*.

4.8. VARIABLES RESPUESTA

4.8.1. Duración del ciclo biológico de *T. urticae*.

Los ácaros fueron colectados de plantas de fréjol en el Campus Querochaca (Facultad de Ciencias Agropecuarias-UTA), Cevallos, Provincia de Tungurahua. Las hojas fueron colocadas en bolsas plásticas de cierre hermético, internamente recubiertas con papel absorbente y llevadas al laboratorio de Biología (Facultad de Ciencias Agropecuarias-UTA). En el laboratorio, las hojas fueron examinadas bajo el aumento del microscopio estereoscópico para seleccionar los ácaros tetraníquidos, los cuales fueron montados en láminas microscópicas. La determinación del género fue realizada utilizando la clave taxonómica de (Zurita, 2016), mientras que la especie fue determinada por comparación con la morfología del aedeago (Ochoa, 2014).

Previo al inicio del ensayo, se prepararon cinco unidades de cría para la obtención de individuos de edad homogénea, siguiendo la metodología de (Helle, 1985). Cada unidad de cría consistió en una cápsula de Petri (9 cm de diámetro) que contenía una almohadilla de poliuretano de 1 cm de espesor y humedecida con agua destilada. Sobre cada unidad de cría fueron colocados dos discos de hoja de arracacia (2 cm de diámetro) cultivares Quinchicoto y Baños con el envés hacia arriba, sobre las cuales fueron colocados cinco hembras y dos machos para promover la cópula y asegurar la producción de huevos. Se utilizaron discos de hoja de fresa cultivar Albión, como tratamiento testigo. Después de 24 h las hembras y machos fueron descartados y se registró el número de huevos. Los huevos obtenidos fueron dejados sobre las unidades de cría hasta la emergencia de los adultos, los cuales fueron observados en el estudio de ciclo biológico.

El ciclo biológico fue estudiado bajo condiciones de laboratorio ($28 \pm 3^{\circ}\text{C}$, $70 \pm 10\%$ HR) en unidades de cría similares a las descritas arriba. El estudio fue iniciado con 10 unidades de cría, cada una de ellas conteniendo tres discos de hoja colocados con la superficie abaxial hacia arriba; que fueron rodeados de una banda de algodón humedecida para evitar el escape de los ácaros y mantener la turgencia de la hoja. Sobre cada disco de hoja fueron colocados una hembra y un macho (de aproximadamente 2 días de edad) provenientes de la cría del laboratorio.

Las unidades de cría fueron observadas cada 12 h usando un microscopio estereoscopio para determinar el momento de la oviposición, luego fueron eliminados hembras y machos de cada unidad. La determinación del tiempo de incubación y duración de las

diferentes fases (larva, protocrisálida, protoninfa, deutocrisálida, deutoninfa y teliocrisálida) fueron observados a intervalos de 12 h.

4.8.2. Posible presencia de estructuras morfológicas o anatómicas de la hoja de *A. xanthoriza* como mecanismo de defensa al ataque de *T. urticae*.

El material vegetal utilizado para la caracterización anatómica y fitoquímica consistió en hojas de *A. xanthoriza* de los cultivares Quinchicoto y Baños, en el Campus Querochaca (Facultad de Ciencias Agropecuarias-UTA).

Las muestras fueron tomadas del estrato medio donde están las hojas maduras (Roda, 2013). Todas las plantas tenían aproximadamente 5 meses de edad. Las preparaciones para observaciones al microscopio óptico consistieron en secciones transversales de folíolos de las especies en estudio, montadas en agua. Las variables determinadas fueron: ancho de la cutícula-epidermis abaxial, profundidad del parénquima esponjoso y longitud de tricomas.

Las secciones transversales fueron obtenidas a mano alzada del tercio medio del folíolo, teñidas con una solución acuosa de azul de metileno y Rojo Congo, montadas sobre portaobjeto con agua y selladas con esmalte transparente para uñas (Sivira, 2011).

La vista frontal de ambas epidermis foliares fue obtenida a partir de segmentos de folíolos (2 cm²) que fueron transferidos a una solución de hipoclorito de sodio (70 % v:v) durante 48 h o hasta lograr la separación de las cutículas, lavados con agua destilada, teñidos con una solución azul de metileno y montados de igual manera que la descrita para las secciones transversales (Vázquez, 2015).

Tanto el ancho de la cutícula-epidermis abaxial, profundidad y ancho del mesófilo, como la caracterización de los tricomas fueron determinados en un campo de 400X con un microscopio óptico con cámara incorporada (Motic Image Plus 2.0 ML) y con el programa ImageJ 1.46 64-bit Windows.

4.8.3. Determinación de las concentraciones de compuestos derivados de la acción de las enzimas oxidativas (PO y POX) en hojas de *A. xanthoriza*.

Para determinar las concentraciones de las enzimas, realizamos de acuerdo con Alia et al. (2002), para lo cual se tomaron 5 g de hojas, más 10 ml de acetona fría (-15°C) grado

reactivo, se trituro durante un minuto y se filtró al vacío; el proceso se repitió en dos ocasiones, se dejó secar a temperatura ambiente y se almacenó en un congelador (-20°C). Se tomó el peso del polvo obtenido para determinar la relación peso fresco: peso seco (PF:PS). El filtrado se guardó en refrigeración (entre 2 y 5°C) bajo condiciones de oscuridad total.

- Peroxidasa (PO)

Se pesaron 0,10 g de polvo de acetona los cuales se homogeneizaron en frío con 5 ml de Tris-HCl 0,1 mM (7,1) conteniendo 1% de polivinilpirrolidona (PVP), se centrifugó a 12 000 x g x 30 m a 4°C. El ensayo se realizó de acuerdo a Flurkey y Jen (1978), con las siguientes modificaciones: la mezcla de ensayo tuvo un volumen total de 3 ml, para lo cual se mezclaron 2,6 ml de amortiguador Tris-HCl 100 Mm (pH 7,1), 0,25 ml de guayacol 0,1 M, 0,1 ml de peróxido de hidrógeno 0,25% y 0,05 ml del sobrenadante. Se evaluó el cambio de absorbancia en 1,5 min a 470 nm. La actividad enzimática se reportó como U/g de PF, donde U=Unidad de actividad enzimática y una unidad es igual a la formación de 1 µmol de tetraguaiacol/min. Los ensayos se realizaron a temperatura ambiente.

- Polifenol oxidasa (PPO)

La extracción de PPO es similar a PO. La PPO se evaluó mediante el método propuesto por Laminkara (1995) con modificaciones, la enzima se extrajo a partir de 0,2 g de polvo de acetona con 5 ml de Tris-HCl frío, 100 mM (pH 7,1), que se mezclaron con un homogeneizador de tejidos durante 30 s, posteriormente la mezcla se centrifugó por 20 minutos a 12 000 x g a 4°C, el sobrenadante se utilizó para el ensayo, donde se evaluó el cambio de absorbancia a 420 nm. La mezcla de reacción consistió de 2 ml de catecol (60 mM) +0,05 ml del sobrenadante (se determinó el cambio de absorbancia en un minuto). Los ensayos se realizaron a temperatura ambiente, entre 20-22°C. La actividad enzimática se reportó como U/g de PF, donde U= Unidad de actividad enzimática y una unidad es igual a la formación de 1 µmol de o-benzoquinona/mi. Los ensayos se realizaron a temperatura ambiente.

4.9. PROCESAMIENTO DE LA INFORMACION

Los datos de duración del ciclo biológico, concentración de enzimas oxidativas (polifenol oxidasa y peroxidasa) y las variables morfo-anatómicas fueron sometidos a análisis estadístico (ANOVA) y a prueba de medias mediante el uso del paquete estadístico Statistix versión 10.0.

CAPÍTULO V

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Ciclo biológico de *T. urticae* en dos cultivares de Zanahoria Blanca *Arracacia xanthorrhiza*, comparado con Fresa *Fragaria Vesca*

El ciclo biológico de *T. urticae* mostró diferencias significativas en los diferentes cultivares, siendo más corto el ciclo de su desarrollo en el que fue criado en discos de hoja de *Arracacia xanthorrhiza* (Variedad Quinchicoto), el cual se completó en 20,37 días, mientras que la Variedad Baños completo su ciclo en 26,63 días y este último no mostró diferencias con relación a la duración observada en hojas de fresa (Tabla 5).

Tabla 5. Ciclo biológico de *T. urticae* en dos cultivares de zanahoria blanca (*A. xanthorrhiza*), comparado con fresa (*F. vesca*).

	Quinchicoto	Baños	Fresa
Huevo	5,03±1,45b	6,47±0,86 a	5,10±0,31b
Larva	4,77±0,90b	4,87±0,86b	7,10±0,31 a
PC-PN	4,97±1,62b	6,20±0,89 a	5,60±0,50ab
DC-DN	4,57±1,17b	4,77±0,43b	6,20±0,41 a
TC-Adulto	5,80±0,48 ^a	4,33±0,48c	4,80±0,41b
Huevo-adulto	20,37±3,95c	26,63±2,30b	28,80±1,10a

Valores en una fila seguidos de la misma letra no mostraron diferencias significativas según prueba de medias de Tukey ($p < 0,01$).

A pesar del daño causado por la alimentación de *T. urticae* según estudios e investigaciones previas (Argolo, 2012) manifiesta que el *T. urticae* tiene un ciclo de vida corto que consta de cinco fases de desarrollo (huevo, larva, protoninfa, deutoninfa y adulto). Entre cada fase hay una fase inactiva o período quiescente, en la que adoptan una posición característica, recibiendo el nombre de crisálidas (protocrisálidas, deutocrisálidas y deutocrisálidas). La quiescencia está delimitada por el desprendimiento

de las exuvias (Morales G.J., 2008); (Badii, 2011). *Tetranychus urticae* en condiciones óptimas (~ 30°C) completa su ciclo en 9 días (Carey., 1982).

(Herbert, 1981) Determinó que el tiempo de desarrollo promedio para las hembras criadas en hojas de manzana fue de 19,0 y 12,7 días a 18 y 21°C, respectivamente. Sin embargo, las hembras de esta especie se desarrollaron en 16,5 y 15 días cuando fueron criadas en hojas de algodón a las mismas temperaturas (Carey., 1982). Por otro lado, en hojas de pimiento el tiempo de desarrollo fue de 8,2 días a 27°C y en hojas de *Phaseolus vulgaris* completó su desarrollo en 8,2 ($\pm 0,09$) pero a 25°C (Gallardo & Morales, 2005); (Kavousi, 2009)

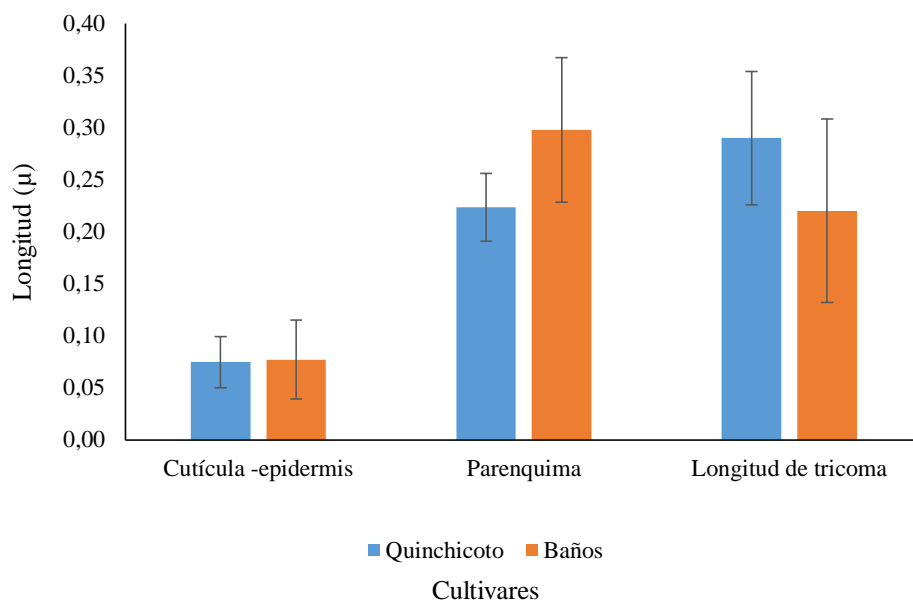
5.2. Estructuras morfológicas o anatómicas de la hoja de *A. xanthorrhiza* como mecanismo de defensa al ataque de *T. urticae*.

Las estructuras morfológicas de la hoja de *A. xanthorrhiza* en las variedades de Quinchicoto y Baños no presenta diferencias significativas tanto en la cutícula-epidermis, parénquima y tricomas. El grosor del estrato cutícula-epidermis varió de 0,07 a 0,08 μm en hojas de los cultivares provenientes de Quinchicoto y Baños, respectivamente (Figura 2). Aunque la profundidad del parénquima fue numéricamente mayor en el cultivar Baños, este no fue significativamente diferente a Quinchicoto, de manera similar, los tricomas simples en hojas de Quinchicoto fueron ligeramente de mayor longitud que en hojas del cultivar Baños, sin embargo, no se detectaron diferencias entre ellos (Figura 2). Los resultados en cuanto a las variables morfo-anatómicas no parecen afectar la alimentación de *T. urticae* en ambos cultivares de arracacia. De acuerdo con (Horn, 2009) y (Reina-Pinto, 2009), la epidermis funciona como estructura de protección y defensa en especies de Arecaceae. Sin embargo, con base en los resultados de (Vasqu ez & al, 2016), éstas no parecen representar una barrera para la alimentación de *Raoiella indica*, puesto que esta especie de  caro se desarrolla y reproduce con éxito sobre los foliolos de *Cocos nucifera*, que presenta el mesófilo a una profundidad comparable al de otras especies de Arecaceae, tales como *Mauritia flexuosa*, *Roystonea oleracea* y *Syagrus schizophylla*, las cuales no han logrado ser explotadas como hospederas por la plaga.

Contrario a lo observado en el presente estudio, estudios previos han demostrado el efecto de las morfo-anatomía de la hoja sobre la alimentación de ácaros fitófagos. Basados en los parámetros de la anatomía foliar, (Balza, 2015) concluyeron que el grosor del estrato

cutícula pared celular de la epidermis abaxial pudo haber imposibilitado la alimentación de *Raoiella indica* sobre los cultivares Guineo y Plátano.

Figura 2. Características de la Morfología de la hoja de zanahoria blanca



Características de la Morfología de la hoja de zanahoria blanca, cultivares Quinchicoto y Baños (cutícula-epidermis: $P= 0,9158$, $gl= 1$; parénquima: $P= 0,0789$; $gl= 1$; longitud de tricoma: $P= 0.2010$, $gl= 1$)

5.3 Determinación de las concentraciones de compuestos derivados de la acción de las enzimas oxidativas (PO y POX) en hojas de *A. xanthorrhiza*

Se observó efecto tanto del tipo de cultivar, como del tiempo de infestación y la densidad del ácaro sobre la expresión de la polifenol oxidasa (Fig. 3). En general, el cultivar Quinchicoto mostró los mayores valores de PPO en comparación al cultivar Baños ($P<0,0082$; $F= 120,47$; $gl= 1$). Con relación al tiempo después de la infestación y densidad del ácaro, los máximos valores de expresión de la PPO fueron observados en plantas infestadas con 6 y 8 ácaros/hoja a las 48 y 72 horas, respectivamente en el cultivar Quinchicoto, mientras que en el cultivar Baños, las plantas infestadas con 6 y 8 ácaros/planta mostraron los mayores incrementos, aunque fue más evidente con la densidad de 6 ácaros/planta ($P< 0,05$; $F= 66.289$; $gl= 9$).

Un comportamiento diferente fue observado con la peroxidasa, puesto que los mayores valores fueron observados en el cultivar Baños a las 24 y 48 h después de la infestación con 4 y 8 ácaros/planta, mientras que el resto de las densidades no provocaron una respuesta consistente a lo largo del período de evaluación. En plantas del cultivar Quinchicoto, la respuesta no mostró diferencias significativas en los diferentes tiempos y densidades evaluadas.

Resultados similares fueron obtenidos por (Liang, 2017) quienes observaron que el mayor incremento en las actividades de la PO y PPO en hojas de *Manihot esculenta* cultivar C1115 después de 1 día de infestación con *Tetranychus urticae* y se mantuvo hasta 8 días. Así mismo, (Trevisan, 2013) demostraron que plantas de lúpulo (*Humulus lupulus* cv. Hallertauer Mittelfruh) infestadas con *T. urticae* mostraron incremento de la actividad de la peroxidasa principalmente en hojas superiores e inferiores, pero no en las hojas medianeras.

De acuerdo con (Walling, 2000) las plantas de tomate muestran incremento en la síntesis de compuestos tales como ácido jasmónico, etileno y ácido salicílico en respuesta a la alimentación de los herbívoros, lo cual se evidencia como la acumulación de los inhibidores de proteínasa, quitinasas, polifenol oxidasa.

Los cambios en el contenido total de proteína y los niveles de enzimas oxidativas se consideran la primera respuesta de la planta a los herbívoros de alimentación (Das, 2001). Estas respuestas bioquímicas están en función de las etapas de crecimiento de la planta y la intensidad del estrés (Constabel, 2008). Según (Smith, 2002), las peroxidasas y las polifenol oxidasas están involucradas en la defensa de plantas contra ácaros e insectos fitófagos, mediante la producción y polimerización de compuestos fenólicos y la lignificación y respuestas hipersensibles en tejidos lesionados.

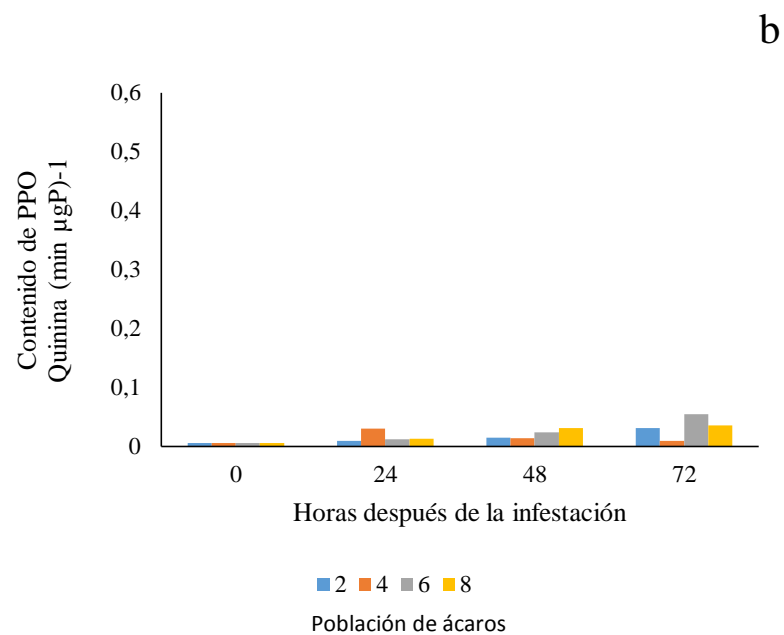
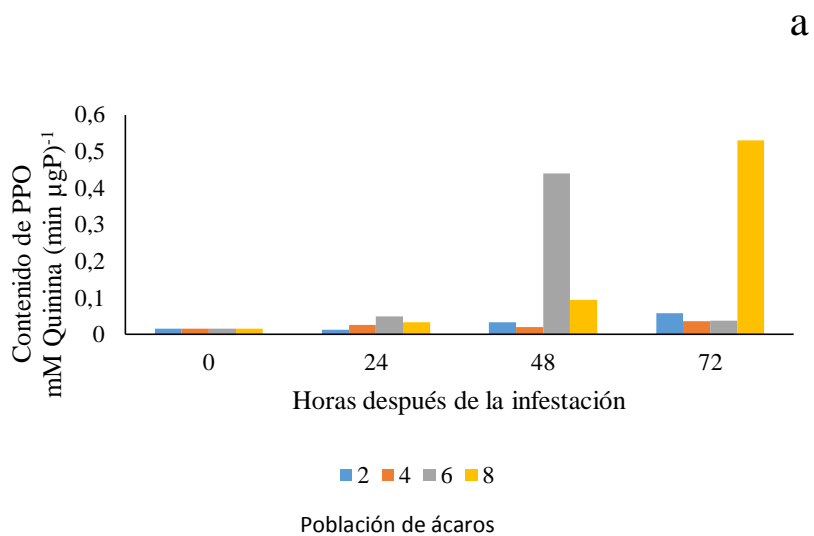
La producción de PPO como respuesta de defensa a los herbívoros implican una secuencia compleja de reacciones que comienza con la expresión génica y luego conduce a la formación y activación de enzimas para la producción de sustrato (Mayer, 2006).

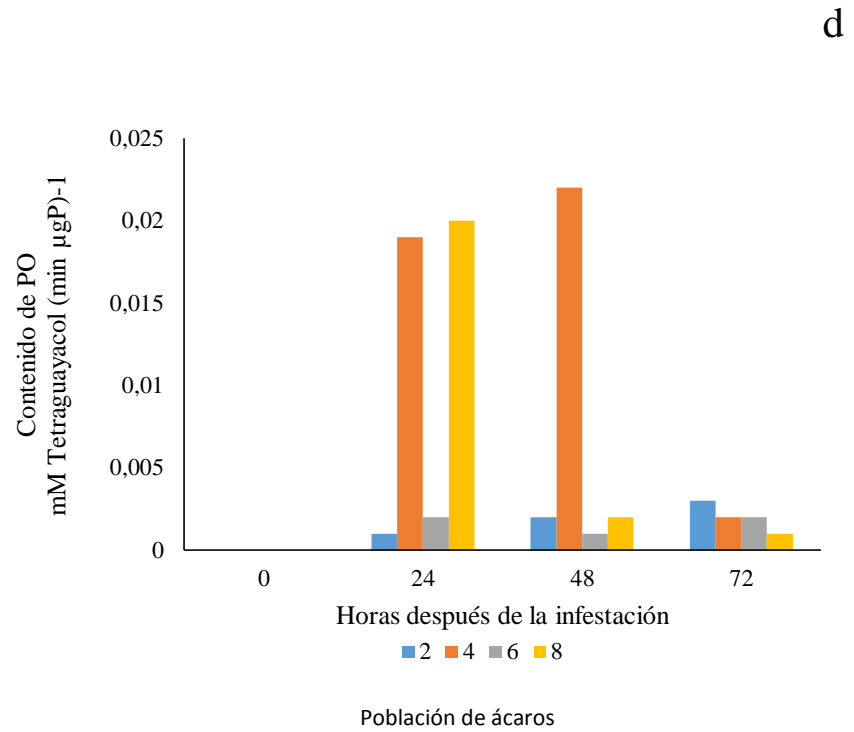
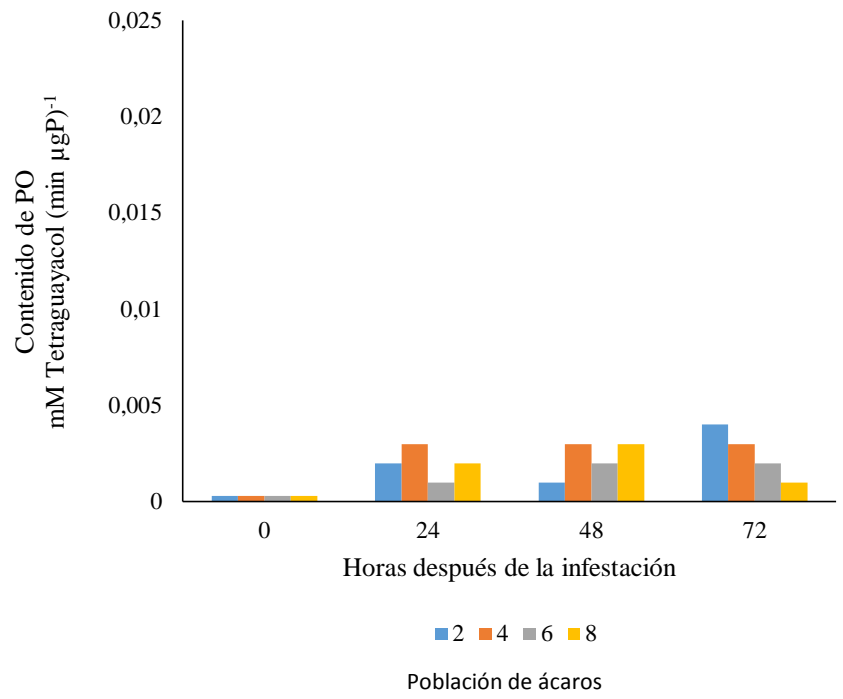
La inducción de actividad fenólica y las enzimas peroxidasa y polifenol oxidasa en respuesta al ataque de insectos podrían no ser evidencia concreta de que estas sustancias participan directamente en los mecanismos de defensa de las plantas (Ramiro, 2006).

De forma similar a la producción de PPO en respuesta a la interacción plantartropoda, las peroxidasas catalizan la síntesis de productos con actividad antimicrobiana en plantas, sugiriendo un papel en la defensa de las plantas al participar en la síntesis de fitoalexina

(Almagro, 2008). De acuerdo con (Kjellbom, 1997), las peroxidasas son también involucrado en la unión de los componentes de la pared celular. La extensina, los compuestos fenólicos y los polisacáridos actúan como una barrera mecánica para la penetración del patógeno, estas barreras mecánicas, formadas como resultado del fortalecimiento de las paredes celulares, se han reportado como un mecanismo de resistencia en el pericarpio (García J. , 2005), y embriones en el grano de (García J. B., 2007), para *Sitophilus zeamais*; (García J. B., 2007), asegura que la oxidación de la quinona en el pericarpio del grano en desarrollo regulado por las peroxidasas puede contribuir a la resistencia de la planta, reduciendo la digestibilidad de las plagas de insectos.

Figura 3. Variación en el contenido de polifenol oxidasa y peroxidasa en plantas de *A. xanthorrhiza* cultivares Quinchicoto (a, c) y Baños (b, d) infestadas con diferentes densidades de *T. urticae*





CAPITULO VI

CONCLUSIONES, BIBLIOGRAFÍA Y ANEXOS

6.1 CONCLUSIONES

- 1 La duración del ciclo biológico de *T. urticae* fue afectado por el cultivar de Arracacia usado, siendo significativa mayor en el cultivar de Baños, lo que sugiere que este podría tener algún mecanismo de resistencia a la plaga.
- 2 Las variables relacionadas con la morfo-anatomía de la hoja no parecen ser barreras físicas para la alimentación de *T. urticae* puesto que no se observaron diferencias entre ambos cultivares. Esto sugiere que tanto las fases juveniles como adultas del ácaro pueden alimentarse sobre hojas de arracacia de los dos cultivares evaluados en este estudio.
- 3 La infestación de las plantas de arracacia con las mayores densidades de *T. urticae* provocó la inducción de la polifenoloxidasa, principalmente en el cultivar Quinchicoto, lo que sugiere que esta enzima pudiera estar relacionada con la resistencia en esta especie de planta. La peroxidasa no mostró un comportamiento consistente a las diferentes densidades del ácaro, de manera que no parece participar como mecanismo de resistencia.

6.2 BIBLIOGRAFIA

- Almagro, L. G.-N. (2008). Class III peroxidases in plant defence reactions. *PublMed*, 145.
- Alvarado, G. Á., & Ochoa, L. (2010). Tecnologías locales de producción de arracacha (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft). *scielo*, 125.
- Argolo, P. (2012). Gestión integrada de la araña roja *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae): optimización de su control biológico en clementinos. 25.
- Badii, M. A. (2011). *Nociones Introductorias de Muestreo Estadístico*. México.
- Balza, V. C. (2015). Una mirada a la investigación formativa de pregrado en el área de operaciones y logística de ingeniería industrial en Colombia. 75.
- Bolland, H. G. (1998). World catalogue of the spider mite family (Acari: Tetranychidae). *Brill Academic Publishers*, 139.
- Boller, E. F. (2004). Ecological Mejora del control biológico de *Tetranychus urticae* Koch (Prostigmata: Tetranychidae) en cítricos a través de la gestión de la cubierta vegetal. *Scielo*, 13.
- Burgos, H., & Amaya, J. (2006). Arracacha (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft). *Scielo*, 342.
- Carey J. R., B. J. (1982). Developmental rates, vital schedules, sex ratios, and life tables for *Tetranychus urticae*, *Tetranychus turkestani* and *Tetranychus pacificus* (Acarina: Tetranychidae) on Cotton. *Scielo*, 345.
- Constabel, C. B. (2008). Defencive roles of polyphenol oxidase in plants. *El Investigador*, 26.
- Cueva, M. (2016). *Recetas creativas de la arracacha y el consumo en el distrito de Huánuco*. Huánuco.
- Das, I. P. (2001). Biotic Stress Resistance in Millets. *El Investigador*, 57.
- Forero, L. R. (2008). Criterios para el manejo de *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) con el ácaro depredador *Amblyseius* (*Neoseilus*) sp (Acari: Phytoseiidae) en cultivos de rosas. *Agronomía Colombiana*, 78.
- Gallardo, A. V., & Morales, J. G. (2005). Biología y enemigos naturales de *Tetranychus urticae* en pimentón. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología*. 34.
- García, J. (2005). The Effect of Earnings Management on the Asymmetric Timeliness of Earnings. *Wiley Online Library*, 55.

- García, J. B. (2007). Programa Integral para reducir pérdidas poscosecha en maíz. . *Scielo*, 65.
- Guerrero, M. (2015). Descripción etológica de la araña roja del cultivo de rosa (*Rosa* sp) en laboratorio. ceasa, Sector Salache, Provincia de Cotopaxi. *Nature*, 9.
- Gugole, F. (2012). Manejo Integrado de la plaga *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) en cultivos de frutilla del Cinturón Hortícola Platense. *sedici*, 34.
- Helle, W. O. (1985). Spider Mites: Their Biology, Natural Enemies and Control . *Investigación y Ciencia*, 331.
- Herbert, H. .. (1981). Biology, life tables, and innate capacity for increase of the twospotted spider mite, *Tetranychus urticae* (Acarina: Tetranychidae). 374.
- Horn, W. F. (2009). Evolution of lamina anatomy in the palm family (Arecaceae). *Scielo*, 96.
- Jeppson L.R., K. H. (1975). Mites injurious to economic plants. University of California. *Scielo*, 648.
- Jiménez, E. (2016). Plagas de cultivos. *MasScience*, 56.
- Jiménez, E. (2016). *Plagas de Cultivos*. Nicaragua.
- Junping, H., & Sumei, C. (2011). Chrysanthemum leaf epidermal surface morphology and antioxidant. *Journal of Plant Physiology*, 688.
- Kavousi, A. C. (2009). Demographic Traits of *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) on leaf disc and whole leaves. 595.
- Kjellbom, P. S. (1997). Oxidative cross-linking of plasma membrane arabinogalactan proteins. *onlinelibrary*, 1189.
- Lardizabal, R., & Theodoracopoulos, M. (2007). Produccion de Zanahoria. *Scielo*, 45.
- Liang, J. B. (2017). Feedback regulation of steady-state epithelial turnover and organ size. *Natura*, 588.
- Madriz, K. (2002). Mecanismos de defensa en las interacciones Planta- Patógeno. *IsGlobal*, 23.
- Mayer, A. (2006). Polyphenol oxidases in plants and fungi. *Publmed*, 31.
- Méndez, K. (2017). *Comportamiento de dos cultivares de zanahoria (*Daucus carota* L), frente a patógenos*. Guayaquil.
- Milán, N. (2016). *Estudio de la diversidad de floa enfocada a la revalorización de los labores ancestrales*. Riobamba.

- Molina, A., & Sánchez, A. (2007). Inmunidad innata en plantas y resistencia a patógenos. *Dialnet*, 46.
- Morales G.J., F. C. (2008). *Manual de Acarologia; acarologia básica e ácaros de plantas cultivadas*. Brasil: Riberao Preto.
- Muñoz, e. a., & Londoño. (2007). Caracterización preliminar del enzima polifenoloxidasas en frutas tropicales. *Dialnet*, 161.
- Ochoa, R. A. (2014). Phytophagous mites of Central America. *researchgate*, 154.
- Poliane, S. A. (2012). *Gestión integrada de la araña roja Tetranychus urticae Koch*. Valencia.
- Ramírez, M., & Rodríguez, A. (2012). Mecanismos de defensa y respuestas de las plantas. *Scielo*, 272.
- Ramiro, A. J. (2006). Role of genomic instability and p53 in AID-induced. *Nature*, 105.
- Reina-Pinto, J. Y. (2009). Surface lipids and plant defences. *Plant Physiol.* . 540.
- Rivas, J., & et al, g. (2008). Determinacion de actividad peroxidasa en extractos crudos. *Scielo*, 4.
- Riveros, A. (2001). Moléculas activadoras de la inducción de resistencia. *Sidalc*, 6.
- Roda, F. a. (2013). Genomic evidence for the parallel evolution of coastal forms in the Senecio lautus complex. *HHS. Public Access*, 543.
- Rodríguez, G., García, H., Camacho, J., Arias, F., Rivera, J., & De la Torre, F. (2007). *Harina de Arracacia*. Colombia.
- Rodríguez, M. E. (2006). *Tecnologías de producción y agroindustria para el desarrollo*. Catalá: Associació Catalana d'Enginyeria Sense Fronteras, editor y autores .
- Roig, J. (1988). *Plantas medicinales, aromáticas o venenosas de Cuba*. Habana-Cuba: Científico-Técnica.
- Sánchez. (2001). Plagas de los cítricos más importantes en la Valenciana. En Sánchez., *Plagas de los cítricos más importantes en la Valenciana* (pág. 13). Valencia:.
- Sivira, A. S. (2011). Toxicity of ethanolic extracts from *Lippia origanoides* and *Gliricidia sepium* to *Tetranychus cinnabarinus* (Boisduval) (Acari: Tetranychidae). *Scielo*, 15.
- Smith, C. (2002). *Plant Resistance to Arthropods*. Manhattan: Springer.
- Soto, A. H. (2011). Integración de control biológico y de productos alternativos contra *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). *Scielo*, 239.

- Stocco, L. (2016). *Obtención de harina de grano fino a partir de la raíz del apio criollo (Arracacia xanthorrhiza)*. Venezuela.
- Suarez, S. R. (2009). "Cultivo De Arracacha". *SCRIBD*, 2.
- Theodoracopoulos, M. (2005). Manual de Producción de Zanahoria . *Virtual Infoagra*, 7.
- Trevisan, R. D. (2013). Peach quality of conventional and integrated production orchards. *Scielo*, 15.
- Valdiviezo, V. (2016). *Elaboración y evaluación nutricional de la harina de zanahoria blanca*. Riobamba.
- Vasquez, C., & al, e. (2016). First report of *Raoiella indica* Hirst (Acari: Tenuipalpidae) in South America. *Scielo*, 5.
- Vásquez, C., & Ceballos, M. (2009). Susceptibilidad de *Tetranychus Urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) a los plaguicidas clorfenapir y abamectina en condiciones de laboratorio. *Scielo*, 45.
- Vázquez, C. E. (2015). Anatomía y química foliar en especies ornamentales de *Arecaceae*: posibles barreras a la alimentación de *Raoiella indica* Hirst (Acari: Tenuipalpidae). *Scielo*, 10.
- Vivanco, J., & Cosio, E. (2005). Mecanismos químicos de defensa en las plantas. *Universida Veracruzana*, 68.
- Walling, L. (2000). The Myriad Plant Responses to Herbivores. *researchgate*, 45.
- Zurita, H. M. (2016). Parámetros biológicos de *Tetranychus gloveri* Banks (Acari: Tetranychidae) sobre hojas de *Cocos nucifera* L. *Scielo*, 32.

6.3 ANEXOS

Anexo 1. Ciclo Biológico del *Tetranychus urticae*

Statistix 10.0

Ciclo total.sx; 02/07/2018; 14:34:49

Completely Randomized AOV for Ciclo

Source	DF	SS	MS	F	P
Cultivo	2	1150.87	575.433	78.13	0.0000
Error	87	640.73	7.365		
Total	89	1791.60			

Grand Mean 25.267 CV 10.74

Homogeneity of Variances	F	P
Levene's Test	13.31	0.0000
O'Brien's Test	12.85	0.0000
Brown and Forsythe Test	5.49	0.0057

Welch's Test for Mean Differences

Source	DF	F	P
Cultivo	2.0	68.22	0.0000
Error	47.7		

Component of variance for between groups 18.9356
 Effective cell size 30.0

Cultivo Mean

1	20.367
2	26.633
3	28.800

Observations per Mean 30
 Standard Error of a Mean 0.4955
 Std Error (Diff of 2 Means) 0.7007

Anexo 2. Morfología de la hoja de *Arracacia xanthorrhiza*

Statistix 10.0

epidermis.sx; 02/07/2018; 15:00:40

Completely Randomized AOV for Cut

Source	DF	SS	MS	F	P
Cultivo	1	0.00001	1.359E-05	0.01	0.9158
Error	9	0.01034	1.149E-03		
Total	10	0.01036			

Grand Mean 0.0762 CV 44.46

Homogeneity of Variances	F	P
Levene's Test	1.19	0.3037
O'Brien's Test	0.82	0.3888
Brown and Forsythe Test	0.52	0.4886

Welch's Test for Mean Differences

Source	DF	F	P
Cultivo	1.0	0.02	0.9051
Error	8.7		

Component of variance for between groups -2.231E-04
Effective cell size 5.1

Cultivo	N	Mean	SE
1	4	0.0748	0.0170
2	7	0.0771	0.0128

Completely Randomized AOV for Parenq

Source	DF	SS	MS	F	P
Cultivo	1	0.01397	0.01397	3.92	0.0789
Error	9	0.03203	0.00356		
Total	10	0.04599			

Grand Mean 0.2706 CV 22.04

Homogeneity of Variances	F	P
Levene's Test	1.15	0.3114
O'Brien's Test	0.89	0.3709
Brown and Forsythe Test	0.76	0.4064

Welch's Test for Mean Differences

Source	DF	F	P
Cultivo	1.0	5.77	0.0401
Error	8.9		

Component of variance for between groups 2.044E-03
 Effective cell size 5.1

Cultivo	N	Mean	SE
1	4	0.2235	0.0298
2	7	0.2976	0.0225

Completely Randomized AOV for Long

Source	DF	SS	MS	F	P
Cultivo	1	0.01243	0.01243	1.90	0.2010
Error	9	0.05880	0.00653		
Total	10	0.07123			

Grand Mean 0.2453 CV 32.95

Homogeneity of Variances	F	P
Levene's Test	1.56	0.2425
O'Brien's Test	0.88	0.3719
Brown and Forsythe Test	0.37	0.5606

Welch's Test for Mean Differences

Source	DF	F	P
Cultivo	1.0	2.29	0.1675
Error	8.2		

Component of variance for between groups 1.159E-03
 Effective cell size 5.1

Cultivo	N	Mean	SE
1	4	0.2897	0.0404
2	7	0.2199	0.0305

Completely Randomized AOV for Cutsq

Source	DF	SS	MS	F	P
Cultivo	1	4.303E-06	4.303E-06	0.01	0.9284
Error	9	4.534E-03	5.038E-04		
Total	10	4.539E-03			

Grand Mean 0.7588 CV 2.96

Homogeneity of Variances	F	P
Levene's Test	1.17	0.3082
O'Brien's Test	0.81	0.3926
Brown and Forsythe Test	0.51	0.4948

Welch's Test for Mean Differences

Source	DF	F	P
Cultivo	1.0	0.01	0.9192

Error 8.7

Component of variance for between groups -9.812E-05
Effective cell size 5.1

Cultivo	N	Mean	SE
1	4	0.7580	0.0112
2	7	0.7593	0.0085

Completely Randomized AOV for Parenqsq

Source	DF	SS	MS	F	P
Cultivo	1	0.00447	4.466E-03	3.83	0.0822
Error	9	0.01051	1.167E-03		
Total	10	0.01497			

Grand Mean 0.8771 CV 3.90

Homogeneity of Variances	F	P
Levene's Test	1.06	0.3303
O'Brien's Test	0.81	0.3909
Brown and Forsythe Test	0.64	0.4440

Welch's Test for Mean Differences

Source	DF	F	P
Cultivo	1.0	5.57	0.0429
Error	8.9		

Component of variance for between groups 6.480E-04
Effective cell size 5.1

Cultivo	N	Mean	SE
1	4	0.8504	0.0171
2	7	0.8923	0.0129

Completely Randomized AOV for Longsq

Source	DF	SS	MS	F	P
Cultivo	1	0.00429	4.295E-03	1.88	0.2039
Error	9	0.02060	2.288E-03		
Total	10	0.02489			

Grand Mean 0.8620 CV 5.55

Homogeneity of Variances	F	P
Levene's Test	1.83	0.2089
O'Brien's Test	1.10	0.3214
Brown and Forsythe Test	0.43	0.5296

Welch's Test for Mean Differences

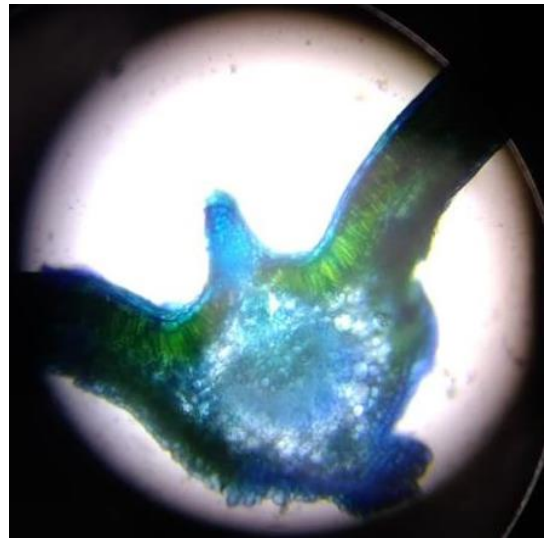
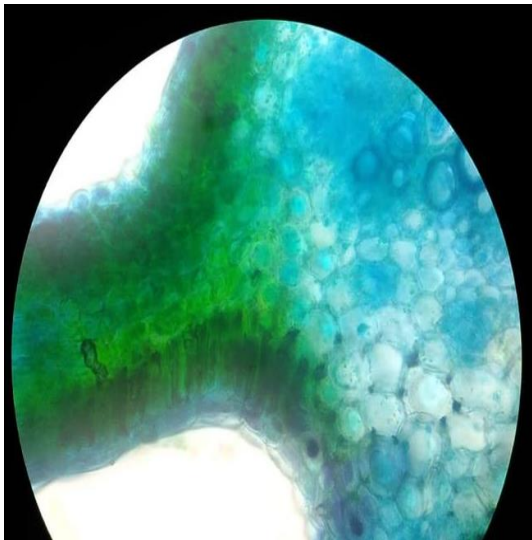
Source	DF	F	P
Cultivo	1.0	2.32	0.1642
Error	8.4		

Component of variance for between groups 3.941E-04
Effective cell size 5.1

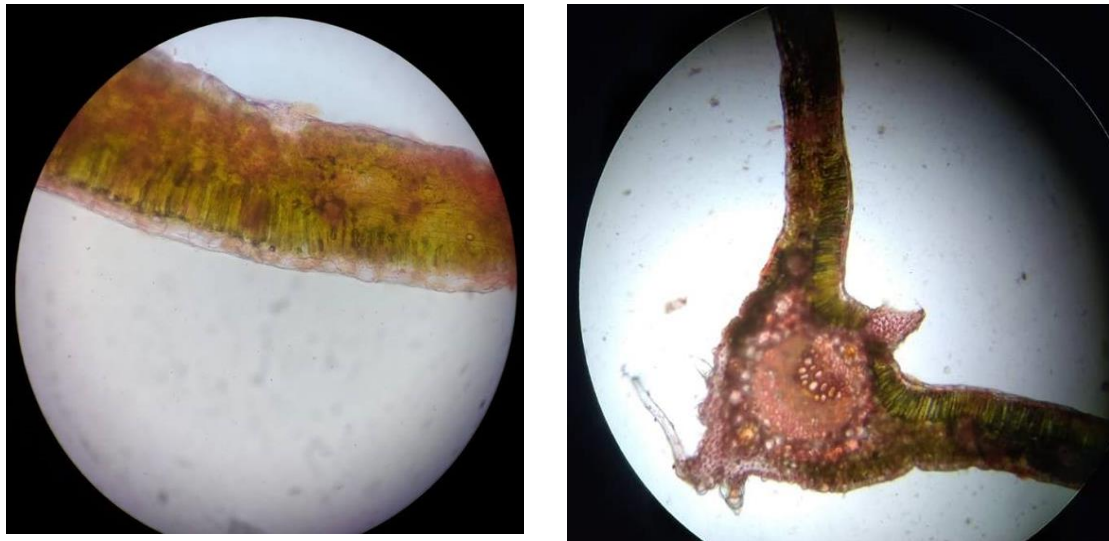
Cultivo	N	Mean	SE
1	4	0.8881	0.0239
2	7	0.8470	0.0181

Anexo 3 Características de la Morfología de la hoja de zanahoria blanca

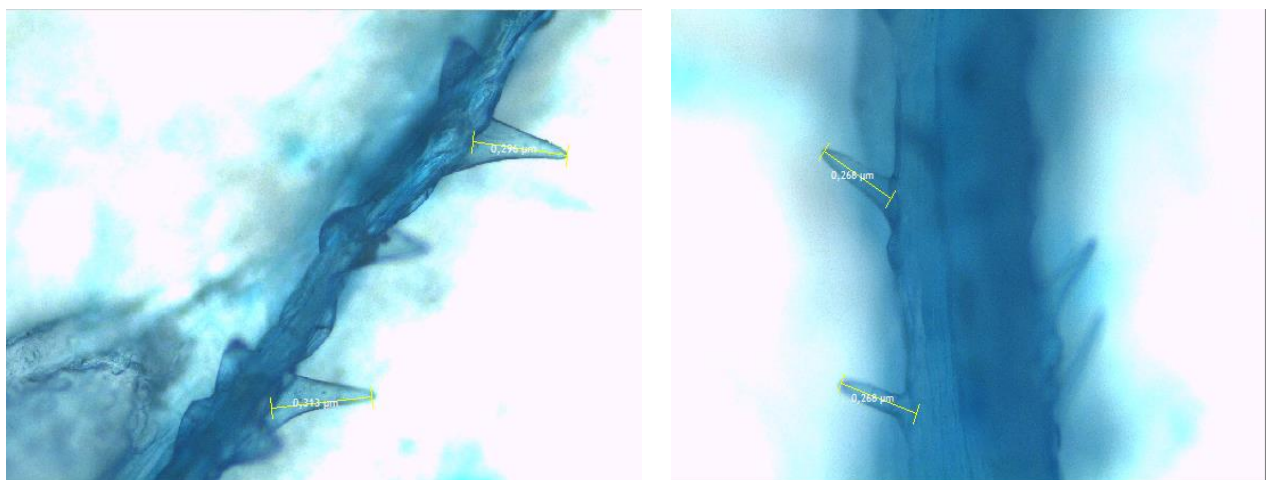
Corte transversal de la hoja de *A. xanthorrhiza* cultivar Baños, en donde podemos observar las estructuras internas (cutícula, epidermis, parénquima).



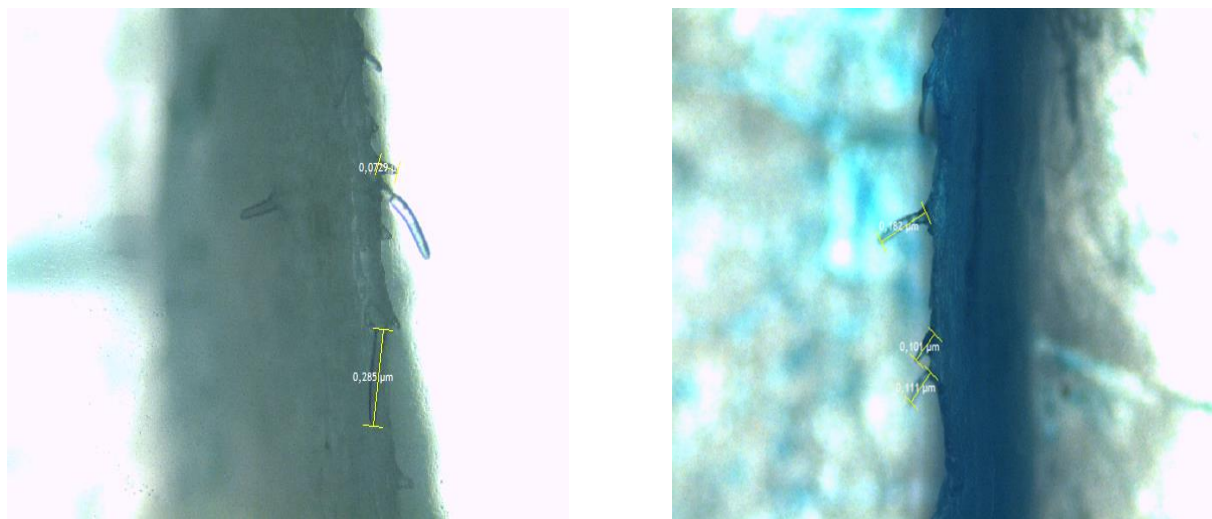
Anexo 4 Corte transversal de la hoja de *A. xanthorrhiza* cultivar Quinchicoto, en donde podemos observar las estructuras internas (cutícula, epidermis, parénquima).



Anexo 5. Hoja de *A. xanthorrhiza* cultivar Baños, en donde podemos observar las estructuras externas (tricoma).



Anexo 6. Hoja de *A. xanthorrhiza* cultivar Baños, en donde podemos observar las estructuras externas (tricoma).



Anexo 7 Determinación de las concentraciones de compuestos derivados de la acción de las enzimas oxidativas (PO y POX) en hojas de *A. xanthorrhiza*

Statistix 10.0

PPO ambos cultivares.sx; 21/08/2018; 11:11:12

Split-split-plot AOV Table for PPO

Source	DF	SS	MS	F	P
Rep	2	0.00855	0.00428		
Cultivar	1	0.13215	0.13215	120.47	
Error Rep*Cultivar		0.0082			
Tiempo	3	0.15406	0.05135	49.35	
Error Rep*Tiempo		0.0000			
Cultivar*Tiempo	3	0.09213	0.03071	29.51	
Error Rep*Cultivar*Tiempo		0.0000			
Dens	3	0.11645	0.03882	61.95	
Error Rep*Dens		0.0000			
Cultivar*Dens	3	0.09279	0.03093	49.36	
Error Rep*Cultivar*Dens		0.0000			
Tiempo*Dens	9	0.37374	0.04153	66.28	
Error Rep*Tiempo*Dens		0.0000			

Cultivar*Tiempo*Dens	9	0.37210	0.04134	65.99
		0.0000		
Error Rep*Cultivar*Tiempo*Dens	48	0.03008	0.00063	
Total	95	1.38674		
Grand Mean		0.0570		
CV(Rep*Cultivar)		58.06		
CV(Rep*Cultivar*Tiempo)		56.55		
CV(Rep*Cultivar*Tiempo*Dens)		43.88		

Statistix 10.0

PPO ambos cultivares.sx; 21/08/2018; 11:11:35

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of PPO for Tiempo*Dens

Tiempo	Dens	Mean	Homogeneous Groups
72	8	0.3013	A
48	6	0.2338	A
48	8	0.0663	B
72	6	0.0482	B
72	2	0.0478	B
24	6	0.0328	B
24	4	0.0295	B
48	2	0.0263	B
24	8	0.0248	B
72	4	0.0243	B
48	4	0.0222	B
0	2	0.0111	B
0	4	0.0111	B
0	6	0.0111	B
0	8	0.0111	B
24	2	0.0110	B

Comparisons of means for the same level of Tiempo

Alpha	0.01	Standard Error for Comparison	0.0145
Critical Q Value	5.907	Critical Value for Comparison	0.0604

Error term used: Rep*Cultivar*Tiempo*Dens, 48 DF

Comparisons of means for different levels of Tiempo

Alpha	0.01	Standard Error for Comparison	0.0156
Critical Q Value	6.451	Critical Value for Comparison	0.0712

Error terms used: Rep*Cultivar*Tiempo and Rep*Cultivar*Tiempo*Dens

There are 2 groups (A and B) in which the means are not significantly different from one another.

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of PPO for Dens

Dens	Mean	Homogeneous Groups
------	------	--------------------

8	0.1009	A
6	0.0815	A
2	0.0241	B
4	0.0218	B

Alpha 0.01 Standard Error for Comparison 7.226E-03
 Critical Q Value 4.647 Critical Value for Comparison 0.0237
 There are 2 groups (A and B) in which the means are not significantly different from one another.

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of PPO for Tiempo

Tiempo	Mean	Homogeneous Groups
72	0.1054	A
48	0.0872	A
24	0.0245	B
0	0.0110	B

Alpha 0.01 Standard Error for Comparison 9.312E-03
 Critical Q Value 5.458 Critical Value for Comparison 0.0359
 There are 2 groups (A and B) in which the means are not significantly different from one another.

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of PPO for Cultivar

Cultivar	Mean	Homogeneous Groups
1	0.0941	A
2	0.0199	B

Alpha 0.01 Standard Error for Comparison 6.761E-03
 Critical Q Value 13.580 Critical Value for Comparison 0.0649
 All 2 means are significantly different from one another.

CAPÍTULO VII

PROPUESTA

7.1 TITULO

Control poblacional de *Tetranychus urticae* KOCH (ACARI: TETRANYCHIDAE), mediante resistencia inducida en Zanahoria blanca (*Arracacia xanthorrhiza*).

7.2 DATOS INFORMATIVOS

La investigación se localizará en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato, conjuntamente con la asesoría técnica de Ingenieros Agrónomos y Entomólogos de la Facultad.

7.3 ANTECEDENTES DE LA PROPUESTA

De acuerdo a los registros del ciclo biológico, presencia de estructuras morfológicas y anatómicas de la hoja de *A. xanthorrhiza* como mecanismo de defensa al ataque de *T. urticae*, y la determinar las concentraciones de compuestos derivados de la acción de las enzimas oxidativas (PO y POX) en hojas de *A. xanthorrhiza* como respuesta al ataque de *T. urticae*, se ha determinado que es importante un estudio previo de la susceptibilidad de la planta para determinar en qué fase del ácaro es más vulnerable y empieza a producir las enzimas oxidativas como defensa.

7.4 JUSTIFICACION

A medida que ha pasado el tiempo se ha observado niveles altos en la incidencia de cáncer debido al uso indiscriminado de productos químicos en la producción agrícola, Con los estudios de la Resistencia inducida en especies de zanahoria blanca (*Arracacia xanthorrhiza* BANCRA) al ataque de *Tetranychus urticae* KOCH (ACARI: TETRANYCHIDAE) se podrá determinar un controlador de ácaros ecológico para disminuir la aplicación de insecticidas químicos creando así conciencia en la repercusión tanto de suelos como de la salud, en donde los beneficiados seamos tanto

el productor al disminuir la compra de productos químicos y nosotros como consumidores, obteniendo productos libres o con niveles bajos en químicos.

7.5 OBJETIVO

- Estudiar las diferentes respuestas de la zanahoria blanca (*Arracacia xanthorrhiza* BANCR) ante el ataque del *Tetranychus urticae* KOCH.

7.6 ANALISIS DE FACTIBILIDAD

Con la aplicación de esta propuesta se podrá disminuir el uso indiscriminado de agroquímicos, aumentar rentabilidad de la producción del agricultor; se reduciría también niveles poblacionales en sus fases biológicas, conservando así las características de la planta hospedera, sin afectar a los ecosistemas. Permitiendo un estudio más completo y puntual sobre la relación ácaro/planta.

7.7 FUNDAMENTACION

La falta de conocimiento de los métodos alternativos para el control de plagas (*T. urticae*) influye en el alto consumo de agroquímicos por parte de los agricultores. En la actualidad el tratamiento de plagas está encaminado a reducir la aplicación de productos químicos mediante el uso de diferentes alternativas para el control de las mismas, entre las cuales podríamos mencionar la resistencia inducida.

7.8 METODOLOGIA

Duración del ciclo biológico de *T. urticae*.

Los ácaros fueron colectados de plantas de fréjol en el Campus Querochaca (Facultad de Ciencias Agropecuarias-UTA), Cevallos, Provincia de Tungurahua. Las hojas fueron colocadas en bolsas plásticas de cierre hermético, internamente recubiertas con papel absorbente y llevadas al laboratorio de Biología (Facultad de Ciencias Agropecuarias-UTA). En el laboratorio, las hojas fueron examinadas bajo el aumento del microscopio estereoscópico para seleccionar los ácaros tetránquidos, los cuales fueron montados en láminas microscópicas. La determinación del género fue realizada utilizando la clave

taxonómica de (Zurita, 2016), mientras que la especie fue determinada por comparación con la morfología del aedeago (Ochoa, 2014).

Previo al inicio del ensayo, se prepararon cinco unidades de cría para la obtención de individuos de edad homogénea, siguiendo la metodología de (Helle, 1985). Cada unidad de cría consistió en una cápsula de Petri (9 cm de diámetro) que contenía una almohadilla de poliuretano de 1 cm de espesor y humedecida con agua destilada. Sobre cada unidad de cría fueron colocados dos discos de hoja de arracacia (2 cm de diámetro) cultivares Quinchicoto y Baños con el envés hacia arriba, sobre las cuales fueron colocados cinco hembras y dos machos para promover la cópula y asegurar la producción de huevos. Se utilizaron discos de hoja de fresa cultivar Albión, como tratamiento testigo. Después de 24 h las hembras y machos fueron descartados y se registró el número de huevos. Los huevos obtenidos fueron dejados sobre las unidades de cría hasta la emergencia de los adultos, los cuales fueron observados en el estudio de ciclo biológico.

El ciclo biológico fue estudiado bajo condiciones de laboratorio ($28 \pm 3^\circ\text{C}$, $70 \pm 10\%$ HR) en unidades de cría similares a las descritas arriba. El estudio fue iniciado con 10 unidades de cría, cada una de ellas conteniendo tres discos de hoja colocados con la superficie abaxial hacia arriba; que fueron rodeados de una banda de algodón humedecida para evitar el escape de los ácaros y mantener la turgencia de la hoja. Sobre cada disco de hoja fueron colocados una hembra y un macho (de aproximadamente 2 días de edad) provenientes de la cría del laboratorio.

Las unidades de cría fueron observadas cada 12 h usando un microscopio estereoscopio para determinar el momento de la oviposición, luego fueron eliminados hembras y machos de cada unidad. La determinación del tiempo de incubación y duración de las diferentes fases (larva, protocrisálida, protoninfa, deutocrisálida, deutoninfa y teliocrisálida) fueron observados a intervalos de 12 h.

Posible presencia de estructuras morfológicas o anatómicas de la hoja de *A. xanthorriza* como mecanismo de defensa al ataque de *T. urticae*.

El material vegetal utilizado para la caracterización anatómica y fitoquímica consistió en hojas de *A. xanthorriza* de los cultivares Quinchicoto y Baños, en el Campus Querochaca (Facultad de Ciencias Agropecuarias-UTA).

Las muestras fueron tomadas del estrato medio donde están las hojas maduras (Roda, 2013). Todas las plantas tenían aproximadamente 5 meses de edad. Las preparaciones

para observaciones al microscopio óptico consistieron en secciones transversales de folíolos de las especies en estudio, montadas en agua. Las variables determinadas fueron: ancho de la cutícula-epidermis abaxial, profundidad del parénquima esponjoso y longitud de tricomas.

Las secciones transversales fueron obtenidas a mano alzada del tercio medio del folíolo, teñidas con una solución acuosa de azul de metileno y Rojo Congo, montadas sobre portaobjeto con agua y selladas con esmalte transparente para uñas (Sivira, 2011)

La vista frontal de ambas epidermis foliares fue obtenida a partir de segmentos de folíolos (2 cm^2) que fueron transferidos a una solución de hipoclorito de sodio (70 % v:v) durante 48 h o hasta lograr la separación de las cutículas, lavados con agua destilada, teñidos con una solución azul de metileno y montados de igual manera que la descrita para las secciones transversales (Vázquez, 2015)

Tanto el ancho de la cutícula-epidermis abaxial, profundidad y ancho del mesófilo, como la caracterización de los estomas fueron determinados en un campo de 400X con un microscopio óptico con cámara incorporada (Motic Image Plus 2.0 ML) y con el programa ImageJ 1.46 64-bit Windows.

Determinación de las concentraciones de compuestos derivados de la acción de las enzimas oxidativas (PO y POX) en hojas de *A. xanthorrhiza*.

- Para determinar las concentraciones de las enzimas, realizamos de acuerdo con Alia et al. (2002), para lo cual se tomaron 5 g de hojas, más 10 ml de acetona fría (-15°C) grado reactivo, se trituro durante un minuto y se filtró al vacío; el proceso se repitió en dos ocasiones, se dejó secar a temperatura ambiente y se almacenó en un congelador (-20°C).
- Se tomó el peso del polvo obtenido para determinar la relación peso fresco: peso seco (PF:PS). El filtrado se guardó en refrigeración (entre 2 y 5°C) bajo condiciones de oscuridad total.
- Peroxidasa (PO)
- Se pesaron 0,10 g de polvo de acetona los cuales se homogeneizaron en frío con 5 ml de Tris-HCl 0,1 mM (7,1) conteniendo 1% de polivinilpirrolidona (PVP), se

centrifugó a 12 000 x g x 30 m a 4°C. El ensayo se realizó de acuerdo a Flurkey y Jen (1978), con las siguientes modificaciones: la mezcla de ensayo tuvo un volumen total de 3 ml, para lo cual se mezclaron 2,6 ml de amortiguador Tris-HCl 100 Mm (pH 7,1), 0,25 ml de guayacol 0,1 M, 0,1 ml de peróxido de hidrógeno 0,25% y 0,05 ml del sobrenadante. Se evaluó el cambio de absorbancia en 1,5 min a 470 nm. La actividad enzimática se reportó como U/g de PF, donde U=Unidad de actividad enzimática y una unidad es igual a la formación de 1 μ mol de tetraguaiacol/min. Los ensayos se realizaron a temperatura ambiente.

- Polifenol oxidasa (PPO)
- La extracción de PPO es similar a PO. La PPO se evaluó mediante el método propuesto por Laminkara (1995) con modificaciones, la enzima se extrajo a partir de 0,2 g de polvo de acetona con 5 ml de Tris-HCl frío, 100 mM (pH 7,1), que se mezclaron con un homogeneizador de tejidos durante 30 s, posteriormente la mezcla se centrifugó por 20 minutos a 12 000 x g a 4°C, el sobrenadante se utilizó para el ensayo, donde se evaluó el cambio de absorbancia a 420 nm. La mezcla de reacción consistió de 2 ml de catecol (60 mM) +0,05 ml del sobrenadante (se determinó el cambio de absorbancia en un minuto). Los ensayos se realizaron a temperatura ambiente, entre 20-22°C. La actividad enzimática se reportó como U/g de PF, donde U= Unidad de actividad enzimática y una unidad es igual a la formación de 1 μ mol de o-benzoquinona/mi. Los ensayos se realizaron a temperatura ambiente.

7.9 PREVISIÓN DE LA EVALUACIÓN

Después de un año se hará una evaluación del alcance de la propuesta en la zona de influencia donde se desarrolló la información, haciendo trabajos conjuntos entre productores e investigadores bajo la supervisión y asistencia técnica de profesionales de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato.