

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS



CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

“VARIABILIDAD DE LA REGIÓN ITS2 EN POBLACIONES DE *Tetranychus urticae* Koch EN EL CULTIVO DE *Arracacia xanthorrhiza* Bancr.”

**DOCUMENTO FINAL DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN COMO
REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE INGENIERO AGRÓNOMO**

AUTOR:

KAREN ANDREA ISABUCHE ISABUCHE

TUTORA:

PhD Marta Dávila Ponce

CEVALLOS-ECUADOR

2019

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

El suscrito, KAREN ANDREA ISABUCHE ISABUCHE, portador de la cédula de identidad: 180436096-2, libre y voluntariamente declara que el Informe Final del Proyecto de investigación titulado: “VARIABILIDAD DE LA REGIÓN ITS2 EN POBLACIONES DE *Tetranychus urticae* Koch EN EL CULTIVO DE *Arracacia xanthorrhiza* Bancr.”; es original, auténtico y personal. En tal virtud, declaro que el contenido es de mí sola responsabilidad legal y académica, excepto donde se indican las fuentes de información consultadas.

KAREN ANDREA ISABUCHE ISABUCHE

DERECHO DE AUTOR

Al presentar este Informe Final del Proyecto de Investigación: “VARIABILIDAD DE LA REGIÓN ITS2 EN POBLACIONES DE *Tetranychus urticae* Koch EN EL CULTIVO DE *Arracacia xanthorrhiza* Bancr.”, como uno de los requisitos previos para la obtención del título de grado de Ingeniero Agrónomo 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.

KAREN ANDREA ISABUCHE ISABUCHE

**“VARIABILIDAD DE LA REGIÓN ITS2 EN POBLACIONES DE
Tetranychus urticae Koch EN EL CULTIVO DE *Arracacia xanthorrhiza*
Bancr.”**

REVISADO POR:

.....
PhD. Marta Dávila Ponce

TUTORA

.....
PhD. Carlos Vásquez Freytez

BIOMETRISTA

APROBADO POR LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE GRADO

FECHA

.....
Ing. Mg. Hernán Zurita Vásquez

PRESIDENTE DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN

.....
PhD. Carlos Vásquez Freytez

MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN

.....
PhD. Liliana Lalaleo Córdova

MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN

Agradecimientos

Doy gracias a Dios por cumplir esta meta en mi vida por siempre bríndame paz, sabiduría y fortaleza, conjuntamente con mi abuelita desde el cielo.

Doy gracias a mi madre Irene por siempre estar a mi lado, por nunca soltar mi mano en este camino, a la vez a mis hermanos Gianfran y Samuel que son el motor de mi vida.

A ti mi compañero que siempre estuvo ahí para apoyarme en este recorrido,
Christian.

Agradecimiento especial a la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato por abrirme las puertas, a cada docente que me brindo sus conocimientos para subir a cada escalón y ver esta meta alcanzada, en especial al Ing. Alberto Gutiérrez por ser una gran persona.

A la Dra. Marta Dávila por ser una excelente docente y tutora en este proyecto, sobre todo por la calidad de persona que es, amable, respetuosa, responsable y comprometida con su trabajo.

Al Dr. Carlitos Vásquez por ser más que docente un amigo, por bríndame confianza, conocimientos, apoyo; ya que entre risas y consejos siempre tuvo tiempo para ayudarme a culminar este proyecto.

Gracias Dra. Marta y Dr. Carlitos por estar a la cabeza de este proyecto y a la Ing. Nataly Paredes por su ética profesional y su compromiso conmigo ayudándome a sacar este proyecto adelante, que Dios les bendiga.

A la Dra. Liliana Lalaleo asesora de redacción técnica por brindarme su apoyo en mi trabajo de investigación.

Mis sinceros agradecimientos a mis amigos que hice en este camino en especial a ustedes, Karolayne y Paola.

En general agradezco a cada persona que me ayudó a cumplir este objetivo.

Dedicatoria

El tiempo de Dios es perfecto, este logro es por su bendición.

En memoria de mi abuelita quien no está conmigo físicamente pero su cariño siempre lo he sentido, lo logré viejita.

A mi mamita Irene que por ella nunca me rendí, este logro es más de ella que mío, ya que con solo su presencia y gran ejemplo me hiso una mujer de bien. Ella es mi amiga, mi consejera, mi apoyo, mi mayor tesoro, te amo.

A mis dos hombrecitos, mis hermanos por los cuales sigo adelante porque son el motor de mi vida, los que con simples palabras o gestos me enseñan día a día el amor fraternal. Mi Samuel su ternura e inocencia es algo que llena mi alma de felicidad y mi Gianfran el que me enseña a ser mejor hermana.

A mi compañero en este camino, al que llego de la nada y se quedó conmigo para apoyarme y aconsejarme, a ti Christian que sabes que no fue fácil, pero que fuiste en muchos momentos mi apoyo.

A algunos familiares que desde niña le apoyaron a mi madre y a mi tanto económicamente como moralmente para salir a delante.

A mis amigas, Karolayne la que siempre escucha sin reproches y Paola la que me enseñó que una amistad puede ser una hermandad, la que escucha, aconseja, la chistosa y a veces difícil de entender, pero de gran corazón. Ustedes, demás personas y amigos que conocí aportaron en mi vida enseñanza de diferente manera.

“La vida se trata de hacer el bien, de ser transparente, de disfrutar triunfos y afrontar problemas, pero sobretodo de ser gratos y leales con quienes confían en uno. Mantener el control de uno mismo forma parte del crecimiento intelectual pues las palabras sabias y la fortaleza las da Dios”.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	vii
ÍNDICE DE GRÁFICOS	x
ÍNDICE DE TABLAS	xi
CAPÍTULO I.....	14
INTRODUCCIÓN.....	14
CAPÍTULO II	16
MARCO TEÓRICO.....	16
2.1 ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS	16
<i>Arracacia xanthorrhiza</i> Bancr.	16
<i>Tetranychus urticae</i> Koch.....	19
<i>Tetranychus urticae</i> Koch. dentro del ITS2	20
2.2 CATEGORÍAS FUNDAMENTALES.....	22
2.2.1 Variable independiente: Marcadores Moleculares (Región ITS2)	22
2.2.2 Variable dependiente: Cultivo de zanahoria blanca (<i>A. xanthorrhiza</i> Bancr.).....	23
Origen	23
Distribución geográfica de producción internacional.....	23
Distribución geográfica de producción en Ecuador.....	24
Importancia económica del cultivo de <i>A. xanthorrhiza</i>	25
Usos y descripción general de la planta de arracacha.....	26
Morfología de la planta de arracacha	26
2.2.1 Unidad de análisis: Ácaro (<i>T. urticae</i>)	29
Distribución de la plaga a nivel mundial.....	29
Características del ácaro.....	29
Alimentación y daño a la planta	30
Ciclo biológico del ácaro	30
CAPÍTULO III.....	35

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	35
3.2 HIPÓTESIS.....	35
3.3 OBJETIVOS	36
Objetivo general:.....	36
Objetivos específicos	36
CAPÍTULO IV	37
MATERIALES Y MÉTODOS	37
4.1 UBICACIÓN	37
4.1.1 Investigación.....	37
4.1.2 Material Vegetal	37
4.2 CARACTERÍSTICAS DEL LUGAR	37
4.2.1 Clima	37
4.3 EQUIPOS Y MATERIALES.....	39
4.3.1 Equipos	39
4.3.2 Materiales	39
4.4 FACTOR ES EN ESTUDIO	41
4.5 TRATAMIENTOS.....	42
4.6 DISEÑO EXPERIMENTAL	42
4.7 VARIABLES RESPUESTA	42
Reconocimiento del ácaro	42
Recolección	43
Mantenimiento de las muestras	44
Extracción de ADN	44
Amplificación de ADN.....	46
Protocolo ITS2 Barcode Tetranychus	46
Determinación la variabilidad genética de <i>T. urticae</i> mediante ITS2 ...	47
CAPÍTULO V.....	48
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	48

CAPÍTULO VI.....	53
CONCLUSIONES, BIBLIOGRAFÍA Y ANEXOS	53
6.1 CONCLUSIONES.....	53
6.2 BIBLIOGRAFÍA.....	54
CAPÍTULO VII.....	63
PROPUESTA.....	63
7.1. TÍTULO	63
7.2. DATOS INFORMATIVOS	63
7.3. ANTECEDENTES DE LA PROPUESTA.....	63
7.4. JUSTIFICACIÓN.....	64
7.5. OBJETIVOS	64
7.6. ANÁLISIS DE FACTIBILIDAD	64
7.7. FUNDAMENTACIÓN	65
7.8. METODOLOGÍA, MODELO OPERATIVO	65
7.9. ADMINISTRACIÓN	66
7.10. PREVISIÓN DE LA EVALUACIÓN	66

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Figura 1. Mapa físico de América del Sur; países productores de <i>A. xanthorrhiza</i> Colombia, Ecuador, Venezuela, Perú y Brasil.	24
Figura 2. Callejón interandino del Ecuador; provincias de Imbabura, Pizhinchá, El Oro, Loja y Tungurahua.....	25
Figura 3. Cultivos de <i>A. xanthorrhiza</i> de tres pisos altitudinales	26
Figura 4. Descripción morfológica de la planta de <i>A. xanthorrhiza</i>	26
Figura 5. Diferentes raíces de <i>A. xanthorrhiza</i>	28
Figura 6. Huevos de <i>T. urticae</i> en hojas de <i>A. xanthorrhiza</i> observados desde el estereoscopio	31
Figura 7. Larvas <i>T. urticae</i> en hojas de <i>A. xanthorrhiza</i> observados desde el estereoscopio	31
Figura 8. A.- Protoninfa (PN) de <i>T. urticae</i> en hojas de <i>A. xanthorrhiza</i> , B.- Deutoninfa (DN) de <i>T. urticae</i> en hojas de <i>Fragaria vesca</i>	32
Figura 9. Adultos de <i>T. urticae</i> en hojas de <i>A. xanthorrhiza</i>	32
Figura 10. Protocrisalida de <i>T. urticae</i> en hojas de <i>A. xanthorrhiza</i>	33
Figura 11. Reproducción sexual de <i>T. urticae</i> en hojas de <i>A. xanthorrhiza</i>	34
Figura 12. Montaje del ácaro para identificación de la especie.	43
Figura 13. Visita y recolección de las muestras vegetales (hojas maduras) infectadas por el ácaro <i>T. urticae</i>	43
Figura 14. Realización de las arenas de los diferentes pisos altitudinales en hojas maduras de <i>A. xanthorrhiza</i> para conservación de las poblaciones de <i>T. urticae</i>	44
Figura 15. Realización del protocolo de extracción de ADN	45
Figura 16. Observación de las bandas de ADN de <i>T. urticae</i> de los diferentes pisos altitudinales	45
Figura 17. Observación de las bandas de ITS2 mediante el número de pares de bases	46
Figura 18. Observación y corte de las bandas de la región ITS2 en el respectivo gel de agarosa. Muestras de las bandas de las localidades colocadas en tubos eppendorf para ser secuenciadas	47
Figura 19. Muestra con el gel de agarosa que contiene la banda ITS2 para enviar a secuencias	47
Figura 20. Composición de bases nitrogenadas de los fragmentos ITS2	50

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación Taxonómica <i>A. xanthorrhiza</i>	23
Tabla 2. Coloración de las hojas de zanahoria blanca de diferentes zona del Ecuador	27
Tabla 3. Condiciones de desarrollo de cultivo de zanahoria blanca	28
Tabla 4. Descripción taxonómica del acaro <i>T. urticae</i>	29
Tabla 5. Localidades de la provincia de Tungurahua, Ecuador.....	38
Tabla 6. Condiciones de laboratorio para la cría de <i>T. urticae</i>	38
Tabla 7. Indicadores moleculares para PCR.....	41
Tabla 8. Secuencias de ADN con 277 (pb) pares de bases (Adenina=A; Timina=T; Citocina=C y Guanina=G) de <i>Tetranychus urticae</i> hospedando a plantas de <i>A. xanthorrhiza</i> procedentes de Baños (B); Quinchicoto (QCH) y Querochaca (Q) de la provincia de Tungurahua, Ecuador.....	49
Tabla 9. Sustituciones de las bases nitrogenadas encontradas en la secuencia del fragmento de ITS2 del ácaro <i>T. urticae</i> en comparación con las tres localidades de la provincia de Tungurahua.....	51
Tabla 10. Datos provenientes del Banco de Genes (GENEBANK) comparando las secuencias obtenidas de <i>Tetranychus urticae</i> de las diferentes localidades de Tungurahua.....	52
Tabla 11. Reporte emitido por parte de GenBank al ingresar las secuencias	52

RESUMEN

En el presente estudio se determinó la variabilidad de la Región ITS2 en poblaciones de *T. urticae* Koch. colectados en *A. xanthorrhiza* Bancr. en diferentes zonas geográficas. Este estudio fue realizado en el laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato.

Se recolectaron hojas maduras de *A. xanthorrhiza* infectadas por *T. urticae* de tres pisos altitudinales provenientes de la provincia de Tungurahua, Quinchicoto (QCH) – Cantón Tisaleo a 3.260 m.s.n.m., Barrio la “Pampa” – Cantón Baños (B) a 1.947 m.s.n.m. y la Granja Experimental Docente “Querochaca” (Q) a 2.865 m.s.n.m. El estudio de la variabilidad genética se realizó mediante la amplificación por PCR del fragmento ITS2, donde al ser secuenciadas las muestras de las tres poblaciones de *T. urticae* mostró un total de 277 pares de bases (pb), encontrándose un porcentaje de divergencia de nucleótidos de 8,66% y 91,34% de similitud. A la vez, las comparaciones entre las secuencias de las tres localidades indicaron 24 sustituciones totales coincidiendo la relación Baños (B) - Quinchicoto (QCH) con la similitud general de 91,34%, la relación Baños (B)- Querochaca (Q) con 18 sustituciones representando el 93.3% y la mayor similitud hallada entre Quinchicoto (QCH) - Querochaca (Q) con 6 sustituciones representando el 97,83%. La composición de las bases nitrogenadas para cada localidad fue mayor en Adenina (A) con 36.28% (B), 35.86 % (QCH) y 36.75 % (Q) y Timina (T) con 42.19% (B), 40.92% (QCH) y 41.77% (Q); contrariamente la menor composición fue para C (Citosina) con 18.56 % (B), 20,67 % (QCH) y 19,4 % (Q) y G (Guanina) con 19.83 % (B), 19.83% (QCH) y 18.98% (Q); existiendo las siguientes relaciones A+T: B= 78,47%; QCH= 76,78%; Q= 78,52% para los tres pisos altitudinales.

Palabras claves:

T. urticae, *A. xanthorrhiza*, región ITS2, variabilidad genética

SUMMARY

This present study aimed to determine the variability of the ITS2 Region in *T. urticae* Koch populations collected from *A. xanthorrhiza* Bancr. from different geographical areas. This study was carried out in the Molecular Biology laboratory of the Faculty of Agricultural Sciences of the Technical University of Ambato.

Mature leaves of *A. xanthorrhiza* infected by the *T. urticae* were collected from three altitudinal levels from the province of Tungurahua, Quinchicoto (QCH) - Canton Tisaleo at 3,260 meters above sea level, Barrio la "Pampa" - Cantón Baños (B) at 1,947 meters above sea level and the Experimental Teaching Farm "Querochaca" (Q) at 2,865 meters above sea level. The study of the genetic variability was carried out by PCR amplification of the ITS2 fragment. Sequenation of the three *T. urticae* populations showed a total of 277 base pairs (bp), with a percentage of divergence of 8.66% and 91.34% similarity. At the same time, the comparisons between the sequences of the three localities indicated 24 total substitutions, thus coinciding the Baños (B) - Quinchicoto (QCH) ratio with the general similarity of 91.34%, the ratio Baños (B) - Querochaca (Q) with 18 substitutions representing 93.3% and the greatest similarity found between Quinchicoto (QCH) - Querochaca (Q) with 6 substitutions representing 97.83%. The composition of the nitrogenous bases for each locality was higher in Adenine (A) with 36.28% (B), 35.86% (QCH) and 36.75% (Q) and Thymine (T) with 42.19% (B), 40.92% (QCH) and 41.77% (Q); conversely lower composition was observed to C (Cytosine) with 18.56% (B), 20.67% (QCH) and 19.4% (Q) and G (Guanine) with 19.83% (B), 19.83% (QCH) and 18.98 % (Q); existing the following A+T ratios: B = 78.47%, QCH = 76.78%, Q = 78.52% for the three altitudinal levels.

Keywords:

T. urticae, *A. xanthorrhiza*, ITS2 region, genetic variability

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

La *Arracacia xanthorrhiza* Bancr. es una especie originaria de los andes, de este modo ha sido domesticada en el continente americano, cultivada y consumida desde la época pre-incaica. Se cree que la mayor producción de este cultivo fue en el norte de los andes de Sudamérica. La adaptación del mismo a diferentes zonas geográficas, ha permitido su distribución desde Venezuela, Ecuador hasta Bolivia América Central, llegando a cultivarse en el Caribe, Estados Unidos y Australia, ampliando de esta manera su mercado; aun así, su biología es poco conocida (Muñoz et al, 2015).

Para que existan estrategias de control de plagas es importante conocer su diversidad, avance evolutivo y filogenético dentro de las 1200 especies diferentes de la familia Tetranychidae se considera a *Tetranychus urticae* Koch. como una plaga agrícola. Para la caracterización molecular de *T. urticae* Koch, se realiza un estudio genético con hembras adultas y la identificación de la especie a través de la forma de su aedago en el macho adulto (Vera y Johannes, 2007).

Yao et al. (2010) manifestaron que el ITS2 (*Internal Transcribed Spacer* - Espaciador Transcrito Interno) es un codificador con gran capacidad de semejanza analítica en la sistemática molecular, ya que provee información delimitada a nivel de caracterización taxonómica debido a la variabilidad característica que presenta cada especie, aportando de esta manera con claridad más acertada al restablecimiento de árboles filogenéticos.

Se lo puede considerar al ITS2 como un código de barras del ADN, el mismo que dispone de regiones establecidas y/o almacenadas para la creación de cebadores universales pues la habilidad que posee respecto a su amplificación es complementaria

con la variabilidad para la diferenciación de especies que en ocasiones son muy conexas (Yao et al, 2010).

La presente investigación tuvo como objetivo determinar la variabilidad de la región ITS2 en poblaciones de *T. urticae* Koch en el cultivo de *A. xanthorrhiza* cultivadas en diferentes pisos altitudinales de la provincia de Tungurahua, Ecuador.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS

Arracacia xanthorrhiza Bancr.

La extensa cordillera de los Andes, con una cadena de montañas con longitud de 6.000 Km cubre más de 2 millones de km² y ha determinado la existencia de un alto número de nichos ecológicos, propicios para el desarrollo de una variada vegetación. Según la Academia Nacional de Ciencias de Estados Unidos, se pronosticó que hasta 31 especies andinas pudieran tener un impacto de importancia al nivel del mundo (NRC 1989). Izquierdo y de La Riva (2002) indicaron que los escenarios agrícolas andinos, particularmente en Bolivia, Chile, Ecuador, Perú y Venezuela, son reservorios importantes de recursos alimenticios que reforzarían las políticas de seguridad alimentaria, así como de desarrollo sustentable con especies como la *A. xanthorrhiza* Bancroft.

El género *Arracacia*, pertenece a la familia Apiaceae (Umbelliferae) e incluye de 10 a 12 especies en Suramérica (Constance 1949), es principalmente nativo de los andes, con especies originarias de México (Constance y Affolter 1995). Se presume que su domesticación es precedente a la de la papa y que su mayor área de cultivo está confinada a este continente. Fuera de la región andina, se conoce de su cultivo en las Antillas, América Central, África, Sri Lanka y en grandes áreas comerciales en Brasil (Pickersgill 2007).

Esta especie es posiblemente el cultivo andino con la data de domesticación más antigua (Hermann y Heller 1997), sin embargo, hay factores que han influido negativamente en su producción y consumo. La negativa de las poblaciones urbanas hacia el reconocimiento de las bondades de las raíces y tubérculos andinos; por falta de gusto, conocimiento o costumbre, ha sido otro factor que ha actuado en contra del

consumo de la zanahoria blanca (Barrera et al. 2004). Al contrario de las poblaciones rurales. Vidaurre et al. (2006) señalaron que la etnia Quechua, la cual representa el 30% de la población de Bolivia, cultiva la zanahoria blanca, entre otros tubérculos y granos andinos en los valles interandinos del país. Vásquez et al. (2004) indicaron que, en Colombia, la arracacha es sembrada por las tribus indígenas como un cultivo secundario desde la frontera ecuatoriana hasta Venezuela y la costa Caribe cerca de Santa Marta. Bristol (1988) reportó que entre las 240 especies de plantas y cultivares, integrados en el agroecosistema de Sibundoy (Colombia), había 13 clones de *A. xanthorrhiza*, la mayoría de ellos sólo conocidos en este valle, incluyendo a *Neonelsonia acuminata* Benth, especie estrechamente emparentada, ubicada actualmente como sinónimo de *Arracacia acuminata* Benth (Tropicos 2016) la cual es llamada “arracacha salvaje”.

A grandes rasgos, se reconocen tres formas hortícolas: amarilla, blanca y púrpura, siendo la última muy frecuente en las colecciones peruanas. Características relevantes de su material genético como, coloración de las hojas que va desde verde, verde-morado a morado oscuro, así también como el color de sus raíces (amarilla y blanca) con la presencia o no de un anillo morado en el centro, hacen que esta raíz tenga un interés agronómico y que dichas tipologías sean influenciadas por su rango altitudinal de siembra ya que la cosecha puede prolongarse 9 (2300 msnm.) a 12 meses (2800 msnm.) (Muñoz et al., 2015; Gaona y Ochoa, 2010). Así mismo, dentro de un estudio realizado de la coloración de *A. xanthorrhiza* Bancr. de tres localidades en Tungurahua- Ecuador determinaron la influencia altitudinal dentro de los tres germoplasmas existiendo una variación genética del 75,25% (Quilapanta et al., 2018). Barrera et al. (2004), indicaron que las variedades que se conocían en tiempos anteriores, tendieron a desaparecer debido a ciertas características que no las hacían competitivas en el mercado.

La variedad de raíz amarilla de *A. xanthorrhiza*, también ha sido estudiada en cuanto a sus características como materia prima como excipiente de la industria farmacéutica. Rodríguez et al. (2005), concluyeron que el almidón de esta variedad, es recomendable como agente aglutinante por sus características de bajo contenido de amilasa y alto de amilo pectina, su reducido tiempo de desintegración, el cual refleja una posible

capacidad para actuar como desintegrante y su baja voluminosidad y comportamiento de fluidez que permite considerarlo como posible diluyente.

Las propiedades químicas y bromatológicas de algunas variedades de zanahoria blanca (amarilla, blanca y morada) establecieron en el material vegetal blanco un alto contenido de vitamina C y la variedad amarilla es aparentemente un poco más rica en proteínas (Palacios et al. 2011). En consecuencia, la composición química entre formas hortícolas es variable pues el contenido de Calcio, Fosforo y Hierro en Arracacha blanca es más elevado (20.00, 58.00 y 1.20 mg) que en Arracacha morada (26.00, 52.00 y 0.90 mg) (Jiménez, 2005).

En Ecuador, se mencionó la importancia relativa del consumo tradicional de la zanahoria blanca (Espinoza et al. 1997). Estos autores apuntaron que las variedades de este cultivo cambiaron con el tiempo, aumentando la tendencia hacia la siembra y consumo de la variedad de raíz blanca por su sabor menos fuerte, relegando las variedades de pulpa amarilla y morada de mayor follaje y troncos abundantes para la alimentación de ganado. Caso contrario al de Venezuela, donde se consume la raíz amarilla (Matos, 2015). La caracterización molecular de *Arracacia* fue hecha en bancos de germoplasmas de Ecuador (Morillo et al. 2004, Morillo & Second 2016). Morillo & Second (2016) indicaron que, a partir de los resultados de análisis de polimorfismos con AFLP y regiones no codificantes de cloroplasto, se podría establecer una hipótesis a favor de la domesticación de la zanahoria blanca en Ecuador a partir de especies silvestres relacionadas. Estos autores indicaron que existen dos grupos de cultivares que se pueden distinguir claramente a nivel molecular. Así mismo, Vásquez et al. (2004), evaluaron 62 clones de *A. xanthorrhiza* en el estado de Tolima - Colombia y llegaron a la misma conclusión, la amplitud de la base genética de esta especie para su mejoramiento.

En Perú, Blas et al. (2008) seleccionaron 28 caracteres morfológicos considerados discriminantes para la identificación de las especies de *Arracacia* de Perú, estos mismos caracteres, junto a el uso de marcadores AFLP, les permitieron reagrupar entradas que antes eran consideradas como *A. equatorialis* con *A. xanthorrhiza*. Previamente, Valderrama & Seminario (2004) establecieron una colección ex situ de

cuatro raíces y tubérculos andinos, 126 entradas de arracachas fueron sembradas y se mantuvieron durante 15 meses sin cosechar.

En la literatura se reconoce que el cultivo de *A. xanthorrhiza* está limitado por los largos ciclos de producción comparado con la papa y otros tubérculos, la lignificación de la raíz en su madurez, la labilidad postcosecha de las raíces.

***Tetranychus urticae* Koch.**

Cerna et al. (2009) reportaron que *T urticae* Koch. data de los años 30's, causando daños como disminución del vigor de las plantas, manchas en las hojas provocando su caída, deshidratación del follaje; siendo su larva hexápoda de color blanco, pasando a sus estados de ninfa con un par de patas adicional de un color verde y en su adultez mostrando sus dos manchas más definidas. La pérdida en la producción a causa se esté acaro han sido muy evidente debido a su nivel reproductivo alto y ciclo de vida corto (Soto, 2011).

Páramo et al.,1986; Cerna et al. (2009) manifestaron que la hembra *T urticae* al procrear mediante partenogénesis producirá un alto número de ácaros machos, en cambio al ser copulas engendrará machos y hembras en una proporción ideal 2:1. En un estudio realizado por (Páramo et al, 1986) en el cultivo *Rosa sp.* con temperatura (23°C) y humedad relativa (85%) controladas, manifestó que el tipo de reproducción de *T urticae* puede incidir en el ciclo de vida, ya que las hembras al ser copuladas tienen un promedio de vida de 19.8 días y mayor oviposición (4.35 huevos/día) y al ser vírgenes 25.5 días y menor oviposición (3.8 huevos/día), manteniendo un metabolismo acelerado en las hembras fecundadas.

Igualmente, en una investigación elaborada por (Telenchana, 2008) en condiciones de laboratorio indicó que el nivel reproductivo del ácaro puede ser variable, pues en cultivos como pepino, frijol y camote la oviposición fue de 96, 89 y 44 huevos, respectivamente con una temperatura de 26°C y humedad de 76%. De todos modos, el mal uso de los productos para combatirlo ha permitido su resistencia a los mismos,

incluyendo a esto las diferentes condiciones climáticas de desarrollo, la planta hospedante y factores propios de la especie hacen que este acaro se convierta en una plaga de importancia agrícola (Telenchana, 2008; Cerna et al, 2009)

***Tetranychus urticae* Koch. dentro del ITS2**

El segmento ITS2 permite la identificación de fragmentos en genotipos, separando las características minuciosamente entre las especies (Ben-David et al.,2007). En base a la difícil identificación de ácaros por su similitud fenotípica entre ellos, se ha considerado a los marcadores moleculares dentro del género *Tetranychus* como un instrumento para la adquisición de rasgos filogenéticos y de clasificación, teniendo como ventaja la evolución rápida de la región ITS2 (Mohankumar et al, 2014). Varios autores a través de investigación respaldan el uso evolutivo de este fragmento y los resultados alentadores con el mismo. Mediante esto, Ben-David et al. (2007) en un estudio mostraron que la discriminación de rasgos entre 16 especies del género Tetranychidae recolectadas en Israel fue del 2% para 14 especies mientras que para *T. urticae* Koch y *Tetranychus turkestanii* obtuvo 1.1 – 1.5% de divergencia.

La determinación de variabilidad geográfica en secuencias de ITS2 en *T. urticae* Koch de 18 plantas recolectadas en diferentes localidades y otras cuatro especies del género *Tetranychus* (*T. kanzawai*, *T. mcdanieli*, *T. pacificus* y *T. neocaledonicus*) ha encontrado divergencias del 1.3% entre *T. urticae* y *T. kanzawai*, del 14.1-16.1% entre *T. neocaledonicus* y las otras especies, con una longitud secuencial de 480 pb en los genomas; lo que establece homogeneidad en las secuencias y mostrando falta de variación intraespecífica, puesto que el ITS2 es un secuenciador de evolución no de regresión (Navajas et al., 1998).

Arimoto et al, (2013) estudiaron a 14 especies de *Tetranychus* de diferentes países, donde se secuenciaron 15 poblaciones en las cuales se evaluó el polimorfismo en la longitud de restricción existente mediante la ampliación por PCR donde *T. urticae* y *T. turkestanii* (especie estudiada) mostraron similitud entre ellas, a su vez, la

homogeneidad de sus patrones en la secuenciación fragmentada de ITS2 fue resaltante, aunque esté distribuida en distintos puntos geográficos la especie. Lo que explica la evolución del ITS2 en población de *T. urticae* Koch (Navajas et al, 1998).

En la investigación sobre el perjuicio de Wolbachia en el ADNr para 4 poblaciones de *T. urticae* Koch, se recolectaron 80 hembras adultas (40 infectadas y 40 no infectadas) en berenjena (*Solanum melongena* L.) donde a través de 80 secuenciaciones de ITS2-PCR se obtuvo un promedio del 50.4 % de infección de las poblaciones (> 60 %; < 27.5 %) manifestando la estabilidad de la población pese a la infección por esta bacteria que no modificó al ADNr (Hong-Hua et al., 2012).

Gotoh et al. (1998) por los caracteres morfológicos y biológicos entre *Tetranychus pueraricola* Ehara et Gotoh y *Tetranychus urticae* Koch se las ha considerado como especies hermanas, mediante esto se realizó un análisis para la discriminación de dos especies en el que 5.8s y 28s fueron las regiones flanqueantes encontrando espacios homólogos y en las secuencias del ITS2 ampliadas por PCR expresaron un nivel de similitud del 98,3% con 483 y 481 pb respectivamente para cada especie.

Yao et al. (2010) Para la evaluación a nivel de género entre plantas y animales la tasa de éxito fue menos del 97%; donde a nivel de especie en la región ITS2 se secuenciaron 12.221 muestras de animales con una correcta identificación del 91,9% y 50.790 muestras de plantas como: dicotiledones (76,1%), monocotiledones (74,2%), gimnospermas (67.1%), helechos (88.1%) y musgos (77.4%); ocupando las longitudes de secuencia que se encontraban entre 195 – 510 pb (pares de bases) pues las de menos de 100 pb fueron excluidas (especies no identificadas) pudiendo tener menos variabilidad entre las especies que dentro de ellas.

2.2 CATEGORÍAS FUNDAMENTALES

2.2.1 Variable independiente: Marcadores Moleculares (Región ITS2)

La aparición de la Biología Molecular ha servido como una herramienta tecnológica para el análisis de procesos correspondientes a la herencia (Castaño y Bilbao, 1996), gracias al descubrimiento del ADN, ARN y la síntesis de proteínas que sirvió de base para invención de estas técnicas, con lo cual se han podido realizar estudios filogenéticos más exactos (Aguilar, 2002).

Por otra parte, los marcadores moleculares han sido una innovación utilizada para la identificación de fragmentos de ADN involucrados caracteres específicos y a la vez únicos de cada individuo (Rocha, 2003). Aguilar (2002) recalca que la influencia del ambiente sobre el genotipo incide sobre los rasgos fenotípicos de los individuos, lo cual es un factor de suma importancia en el planteamiento de estudios filogenéticos viables y eficaces procesos.

Uno de los marcadores con gran exactitud para identificación a nivel molecular es el ITS2, pues la capacidad de discriminación entre especies es muy alta, debido a que son fragmentos no codificantes de baja evolución (Yao et al., 2010; Rocha, 2003). Dicha información, proporciona un mejor análisis a nivel taxonómico y precisión para las reconstrucciones filogenética (Yao et al., 2010, Aguilar 2002). Ubicado entre los genes flanqueantes 5.8s y 28s del ARNr el ITS2 es una de las regiones altamente conservadas, permitiendo que los datos extraídos sean confiables (Caisová et al., 2011).

2.2.2 Variable dependiente: Cultivo de zanahoria blanca (*A. xanthorrhiza* Bancr.)

Tabla 1. Clasificación Taxonómica *A. xanthorrhiza*

TAXONOMÍA	
Reino:	Plantae
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Orden:	Apiales
Familia:	Apiaceae (alt. Umbelliferae)
Género:	Arracacia
Especie:	<i>Arracacia xanthorrhiza</i> Bancrof

Fuente: Tropicos (2018)

Origen

El género *Arracacia*, pertenece a la familia Apiaceae (Umbelliferae) e incluye de 10 a 12 especies en Suramérica (Constance 1949), es principalmente nativo de los Andes, con especies originarias de México (Constance y Affolter 1995). *Arracacia xanthorrhiza*, conocida en español como arracacha, racacha, zanahoria blanca, apio criollo, virraca, rikacha; en inglés: arracacha, white carrot, Peruvian parsnip; en portugués: batata baroa, mandioquinha, batata salsa, batata cenoura, es la única umbelífera domesticada en Suramérica (Hermann 1997).

Distribución geográfica de producción internacional

La arracacha en la actualidad se cultiva en Colombia, Ecuador, Venezuela (Gaona y Ochoa, 2010) y Perú llegando hasta Brasil donde esta especie es industrializada como alimento para bebés y sopas instantáneas (Jiménez, 2005).



Figura 1. - Mapa físico de América del Sur; países productores de *A. xanthorrhiza* Colombia, Ecuador, Venezuela, Perú y Brasil.

Fuente: Instituto Geográfico Militar y Ministerio de Defensa Nacional. (2005).

Distribución geográfica de producción en Ecuador

La zanahoria blanca se produce en todo el callejón interandino del Ecuador; siendo las provincias de Imbabura, Pichincha, El Oro, Loja (figura 2) donde principalmente se siembra. Con el paso del tiempo, en algunas de estas provincias, ha habido cambio en los sistemas de producción, con mayor énfasis en ganadería. Tungurahua permanece como mayor zona de producción de este cultivo en el último censo agropecuario. (Higuera y Prado, 2009).

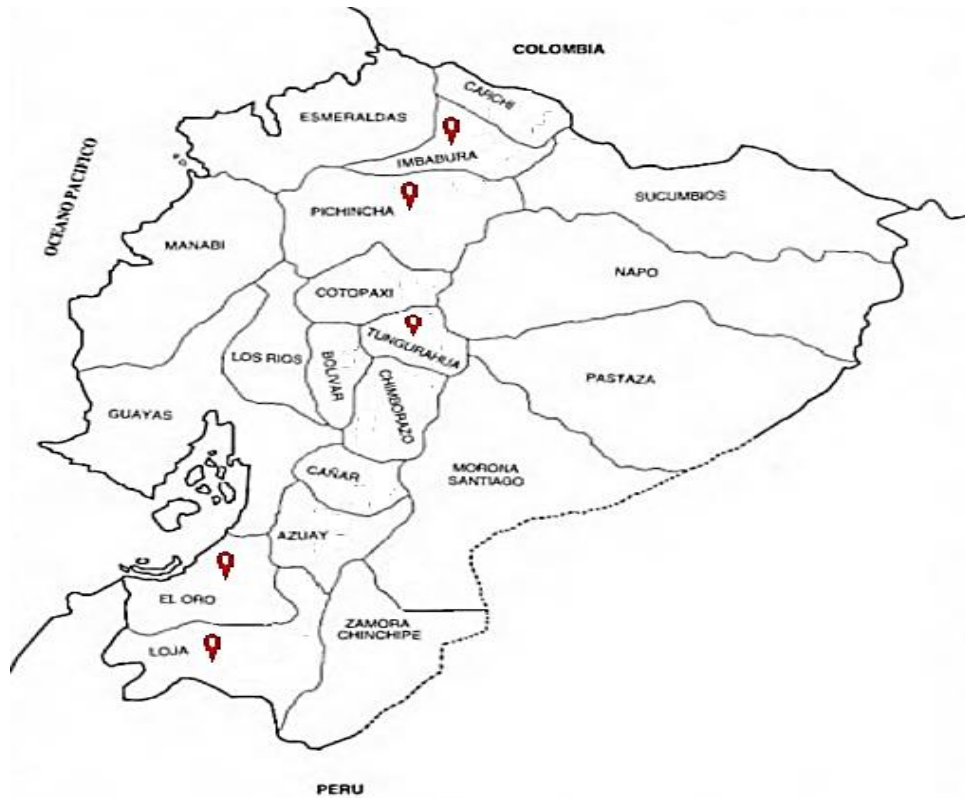


Figura 2. Callejón interandino del Ecuador; provincias de Imbabura, Pichincha, El Oro, Loja y Tungurahua

Fuente: Mazón et al. (1996).

Importancia económica del cultivo de *A. xanthorrhiza*

Palacios et al. (2011). consideran que *A. xanthorrhiza* está dentro de la canasta básica familiar de algunas zonas rurales siendo cultivada en minifundio, no así en las zonas urbanas donde el consumo es limitado.

Barrera et al. (2004) indica que hasta 1995 el gobierno ecuatoriano reporto estadísticas oficiales en la producción de zanahoria blanca las cuales aumentaron de 524 t a 1.507 t entre 1987 y 1995. Estos autores también señalan que puede haber una interpretación errada de la información debido al hecho de que estos cultivos crecen en áreas pequeñas generalmente asociados con otros cultivos más importantes. La base de datos del MAGAP de arracacha para el 2002 reporta una producción de 505 tn. lo cual muestra claramente una disminución en la producción desde 1995.

Usos y descripción general de la planta de arracacha

A. xanthorrhiza al ser de buen sabor y alto valor nutricional ha servido como alimento en sopas, ensaladas, guisos. Su principal parte comestible de son las raíces, que se consumen cocidas. En Ecuador, la zanahoria blanca es una variante hortícola importante del cultivo, ya que, en otros países como Perú y Venezuela, la importancia radica en las formas morada y amarilla respectivamente Gaona y Ochoa. (2010)



Figura 3. Cultivos de *A. xanthorrhiza* de tres pisos altitudinales, A.- Planta de *A. xanthorrhiza* procedente de Quinchicoto – Tisaleo, B.- *A. xanthorrhiza* procedente de la Granja Experimental Docente “Querochaca”, C.- *A. xanthorrhiza* procedente del Barrio la “Pampa” – Baños, provincia de Tungurahua, Ecuador

Morfología de la planta de arracacha

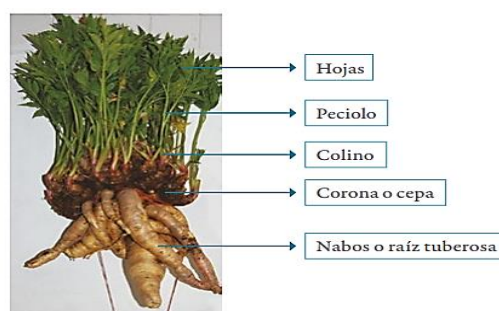


Figura 4. - Descripción morfológica de la planta de *A. xanthorrhiza*

Fuente: Rivera et al. (2015).

Hábito: Según Rivera et al. (2015) establecen que la planta de zanahoria blanca alcanza una altura promedio de entre 50 y 120 cm con carácter herbáceo.

Hojas: Quilapanta et al. (2018) manifestaron que posee hojas compuestas con hasta siete folíolos que se desprenden de su largo peciolo, brotando entre 55 y 95 hojas por planta. A su vez (Quilapanta et al., 2018; Gaona y Ochoa., 2010) argumentan que las hojas de arracacha tienen características propias de las diferentes formas hortícolas existentes, pues la coloración del follaje que varía entre verde, verde-morado y morado oscuro incluyendo el color de las nervaduras y peciolo, han sido relacionados por efectos de las antocianinas acumuladas en la epidermis foliar.

Tabla 2. Coloración de las hojas de zanahoria blanca de diferentes zona del Ecuador (Tisaleo, Píllaro y Baños, respectivamente) según (Quilapanta et al., 2018).



Hoja color morada



Hoja color verde – morada



Hoja color verde

Corona o cepa: Para (Rivera et al., 2015) se trata de un de un tronco cilíndrico vertical, de donde a partir de estos brotes dará origen a los colinos (parte aérea de la planta) y a las raíces tuberosas.

Colinos: El número de colinos por planta es aproximadamente de 10 a 30 los cuales son utilizados para la propagación vegetativa de la planta (Rivera et al, 2015).

Raíces fibrosas y tuberosas: La raíz es la parte comestible de la planta de color y forma variable (Higuera y Prado. 2013) las cuales son ovoides, cónicas o fusiformes con una longitud de 5 a 25 cm y con un diámetro entre 3 y 8 cm (Rivera et al, 2015), dependiendo del lugar de siembra de la especie.

Las características en cuestión del color de las raíces que contiene *A. xanthorrhiza* Muñoz et al. (2015) señalaron que varían entre blancas y amarillas algunas presentando o no una forma de anillo en el centro o vasos de aceite de la raíz (gris, morado o incoloro).



Figura 5. – Diferentes raíces de *A. xanthorrhiza*. Centro Internacional de la papa.

Tabla 3. Condiciones de desarrollo de cultivo de zanahoria blanca

Factores	Condiciones	Observaciones
Ph	6,3 – 6,8	Requerido
Temperatura (°C)	14 – 21	A menores temperaturas la maduración es tardía. No resiste heladas y es poco tolerable a temperaturas largas sobre los 25°C.
Precipitación Anual (m.m.)	700 – 1500	Requerimiento no excesivo
Altitud (m.s.m.n.)	1200 – 2900	En climas fríos como: 3000 – 3200 ocurre un incremento de cosecha
Tipo de Cultivo	Perenne	Largo ciclo de vida
Suelo	Suelos sueltos y profundos, con buen contenido de MO (3 – 3,5%)	Poco desarrollo en suelos arcillosos y pesados
Inicio Cosecha	9 – 12 meses	Influye la altitud de siembra

Fuente: Quilapanta et al. (2018); Gutiérrez y Reinoso (2011).

2.2.1 Unidad de análisis: Ácaro (*T. urticae*)

Tabla 4. Descripción taxonómica del acaro *T. urticae*.

TAXONOMÍA	
Reino:	Animalia
Filo:	Arthropoda
Clase:	Arachnida
Subclase:	Acari
Orden:	Prostigmata
Familia:	Tetranychidae
Género:	<i>Tetranychus</i>
Especie:	<i>T. urticae</i> Koch (1836)

Fuente: (Sá Argolo, 2012).

Distribución de la plaga a nivel mundial

Tetranychus urticae es una plaga polífaga distribuida en todo el mundo en más de 900 plantas hospedadoras, de las cuales aproximadamente 150 especies son de importancia económica incluyendo hortalizas, frutales, silvestres, ornamentales (Cerna et al. 2009; Gugole. 2012). Esta especie es considerada como una plaga debido que por su alta capacidad reproductiva y ciclo de vida corto es capaz de producir disminución de la producción de hasta 80% (Soto, 2011).

Características del ácaro

El ácaro de dos manchas, *T. urticae*, fue descrito por primera vez por Koch en 1836, puede medir de 0,2 a 0,6 mm (Gugole. 2012) llegando hasta 0,8 mm la hembra adulta y 0,6 mm el macho adulto, este ácaro fitófago se distribuye en colonias que forma a través de densas telas que teje para protegerse y reproducirse donde a su vez se encuentra sus estadios de desarrollo (Gaviola. 2015). La coloración de esta especie, según Gugole (2012), son de tonalidades verdes que se encuentran en climas fríos y

templados y tonalidades rojas que se localizan en climas cálidos y subtropicales, así mismo por la alimentación, planta hospedera o estado desarrollo.

Alimentación y daño a la planta

El ácaro de dos manchas ataca a las hojas maduras especialmente en la nervadura central del envés y alimentándose de la savia con su aparato bucal succionador en forma de estilete que ocasiona la ruptura del mesófilo quedándose las células en ocasiones completamente vacías cuando su población aumenta (Gugole, 2012; Telenchana, 2008; Velasco, 2018). Los síntomas de la alimentación se caracterizan por pequeños conjuntos de manchas cloróticas en el haz y envés de la hoja que afectan la superficie foliar causando disminución de la fotosíntesis, crecimiento y respiración e incrementa de la transpiración de la planta (Forero, 2008; Gugole, 2012; Telenchana, 2008). En consecuencia, se producirá disminución del vigor, caída de las hojas a causa de necrosis, deshidratación del follaje y en algunos casos muerte de las plantas (Cerna, 2009).

Ciclo biológico del ácaro

Los ácaros tetraníquidos pasan por cinco etapas de desarrollo para completar su ciclo de vida (huevo, larva, protoninfa, deutoninfa y adulto) así también entre cada fase activa presentan una etapa inactiva o de quiescencia (protocrisalida, deutocrisalida y teliocrisalida) (Gugole, 2012; Mendoza, 2016; Páramo et al. 1986). En cada una de estas etapas el ácaro crea una cutícula que es mudada después de cada fase inactiva dejando una exuvia para aumentar de tamaño hasta llegar a su estado final adulto (Gugole, 2012; Mendoza, 2016).

Huevo: el color inicial es perla y a medida que pasa el tiempo se cristaliza llegando a tonalidades cafés claro o amarillo claro con forma redonda (Cerna et al., 2009).

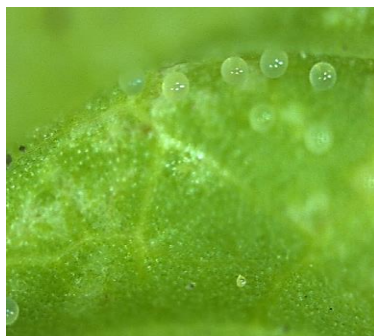


Figura 6. Huevos de *T. urticae* en hojas de *A. xanthorrhiza* observados desde el estereoscopio.

Una hembra puede ovipositar en toda su vida un promedio de 100 a 300 huevos dependiendo de factores como planta hospedadora, humedad y temperatura que favorecen tanto el desarrollo de la plaga como su reproducción (Cerna et al, 2009; Gugole, 2012).

Larva: posee tres pares de patas y al inicio presenta color blanco que luego se torna verde (sus dos manchas y sus ojos color rojos son más resaltantes) por su alimentación (Freire, 2018; Velasco, 2018). Su promedio de duración en este estadio es de 1,9 días en hojas de *rosa sp* a $23 \pm 2^\circ\text{C}$ y $85 \pm 5\%$ HR (Páramo et al. 1986).



Figura 7. Larvas *T. urticae* en hojas de *A. xanthorrhiza* observados desde el estereoscopio.

Protoninfa y deutoninfa: presentan cuatro pares de patas, siendo las dos machas en el dorso muy visibles, el tamaño de la especie aumenta, en el estadio de deutoninfa la identificación entre hembra y macho es evidente (Freire, 2018). Su tiempo promedio en estos estadios es de 1,5 y 1,7 días, respectivamente (Páramo et al. 1986).



Figura 8. A.- Protoninfa (PN) de *T. urticae* en hojas de *A. xanthorrhiza*, B.- Deutoninfa (DN) de *T. urticae* en hojas de *Fragaria vesca*. Observados desde el estereoscopio.

Adulto: las características en este estadio son evidentes, presentando entre los dos sexos un dimorfismo sexual (Gugole. 2012), la hembra presenta cuerpo ovalado siendo de mayor tamaño, su color y las dos manchas más definidas; el macho es de menor tamaño que la hembra (Freire, 2018). Según Mendoza (2016), el idiosoma del ácaro macho es piriforme con las patas más largas y el color es más opaco; cada uno contiene ocho patas, el tiempo de vida dependerá de factores bióticos y abióticos.



Figura 9. Adultos de *T. urticae* en hojas de *A. xanthorrhiza*. A.- Macho, B.- Hembra. Observados desde el estereoscopio.

Estados de quiescencia

Estados de inmovilidad del ácaro (protocrisalida, deutocrisalida y teliocrisalida) donde no se alimenta, se cubre con la exuvia hasta que se desprende de ella (Gugole. 2012), pasando de protocrisalida a protoninfa, deutocrisalida a deutoninfa y teliocrisalida a adulto, en un tiempo promedio de permanecía en los estadios de 1,6; 1,5 y 1,8, respectivamente (Páramo et al., 1986).



Figuras 10. Protocrisalida de *T. urticae* en hojas de *A. xanthorrhiza*. Observados desde el estereoscopio.

Reproducción

Sexual: se reproducen mediante la cópula entre los dos sexos dando lugar a hembras y machos en una proporción (H:M) de 2:1 (Freire, 2018; Gugole, 2012). Teniendo claro que un macho puede fecundar a diferentes hembras (Velasco, 2018).

Asexual: se reproduce mediante partenogénesis arrenotóquica (Gugole, 2012), dando lugar a machos de huevos no fertilizados haploides y hembras de huevos fecundados diploides en una proporción (H:M) de 1:9 (Freire, 2018).



Figura 11. Reproducción sexual de *T. urticae* en hojas de *A. xanthorrhiza*. Observados desde el estereoscopio.

Condiciones de desarrollo

Según Mendoza (2016), el tiempo de eclosión de los huevos de *T. urticae* es de 3 días a 25 °C en el día y 18°C en la noche. Adicionalmente Páramo et al., (1986) manifestaron que a $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y $85 \pm 5\%$ HR pueden eclosionar a los 7,4 días y el período para cada estadio es entre 1,5 y 1,8 aproximadamente en hojas de frejol (*Phaseolus vulgaris*) desarrollándose en 17,4 días. A su vez a temperaturas bajas de 18° C es de 19 días en hojas de manzana (*Malus domestica*) y 16,5 días en hojas de algodón (*Gossypium herbaceum*); mientras que a 21°C el desarrollo varía de 13 y 15 días, respectivamente y a 27°C es de 8,2 días en hojas de pimiento (*Capsicum annuum*) favoreciendo estas temperaturas para un rápido desarrollo de la plaga (Gugole. 2012).

CAPÍTULO III

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.2 HIPÓTESIS

H_a: La variabilidad de la región ITS2 en poblaciones de *T. urticae* Koch proporcionará información secuencial específica y veraz en el cultivo de *A. xanthorrhiza*.

H₀: La Variabilidad de la región ITS2 en poblaciones de *T. urticae* Koch proporcionará insuficiente información secuencial específica y veraz en el cultivo de *A. xanthorrhiza*.

3.3 OBJETIVOS

Objetivo general:

Determinar la variabilidad de la región ITS2 en poblaciones de *T. urticae* Koch en el cultivo de *A. xanthorrhiza*.

Objetivos específicos

Establecer diferencias específicas en las longitudes del segmento ITS2 para diferentes poblaciones de *T. urticae*.

Determinar las secuencias de pares de bases en los segmentos de ITS2 para poblaciones de *T. urticae* en el cultivo de *A. xanthorrhiza*.

Relacionar a las poblaciones de *T. urticae* con diferencias en los segmentos ITS2, para establecer relaciones genéticas entre ellas.

CAPÍTULO IV

MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 UBICACIÓN

4.1.1 Investigación

La investigación se llevó a cabo en la Granja Experimental Docente “Querochaca” en el laboratorio de investigación de Biología Molecular y laboratorio de Docencia de Botánica perteneciente a la Universidad Técnica de Ambato, Facultad de Ciencias Agropecuarias, ubicada en el cantón Cevallos, provincia de Tungurahua.

4.1.2 Material Vegetal

Las muestras de zanahoria blanca (*Arracacia xanthorrhiza* Bancr) fueron recolectadas en: Quinchicoto, Cantón Tisaleo; Barrio la “Pampa”, Cantón Baños y Granja Experimental Docente “Querochaca”, Cantón Cevallos; provincia de Tungurahua, representando tres pisos altitudinales.

4.2 CARACTERÍSTICAS DEL LUGAR

4.2.1 Clima

El presente estudio fue realizado en dos ambientes de trabajo:

Condiciones ambientales en campo

La recolección del material para la presente investigación fue de tres pisos altitudinales de la provincia de Tungurahua, Ecuador.

Tabla 5. Localidades de la provincia de Tungurahua, Ecuador

Localidad	Altitud	Coordenadas geográficas
Quinchicoto, Cantón Tisaleo	3.260 m.s.n.m.	Este: 0760653 Norte: 9847125
Barrio la "Pampa" – Cantón Baños	1.947 m.s.n.m.	Este: 0783144 Norte: 9844240
Granja Experimental Docente "Querochaca" Cantón Cevallos	2.865 m.s.n.m.	Este: 1°21'58,9" Norte: 783625

Condiciones de laboratorio

Parte del experimento se llevó a cabo en el laboratorio de Docencia de Botánica perteneciente a la Universidad Técnica de Ambato, Facultad de Ciencias Agropecuarias, especialmente para la cría del ácaro (*T. urticae*), permitiendo tener continua descendencia para el ensayo.

Tabla 6. Condiciones de laboratorio para la cría de *T. urticae*

Localidad	Temperatura	Humedad	Altitud	Coordenadas geográficas
Querochaca, Cantón Cevallos	18,3°C	67,5%	2865 m.s.n.m.	1°21'58,9" 783625

4.3 EQUIPOS Y MATERIALES

4.3.1 Equipos

Cámara de electroforesis
Fuente de poder
Microcentrifugadora
Termociclador
Transiluminador UV
Baño María
Vortex
Estereoscopio con cámara
Incubadora
Microscopio con cámara
Cámara de flujo laminar
Estufa
Autoclave
Microondas
Refrigerador
Destilador de agua
Balanza digital
Agitador magnético
Multiparamétrico de mesa
GPS
Hidrotermómetro
Set de micro pipetas desde 0,2 ml a 1,5 ml

4.3.2 Materiales

Hojas maduras de zanahoria blanca (*A. xanthorrhiza* Bancr.)
Ácaros hembras de especie *T. urticae* Koch
Bolsas plásticas con cierre hermético

Papel absorbente
Pincel 000
Tijera
Marcador de tinta indeleble
Etiquetas
Lupa
Pinzas
Almohadilla de poliuretano de 1cm de espesor
Algodón
Piseta con agua destilada
Líquido de PVA permanente.
Porta y cubre objetos
Esferos de distintos colores
Cuaderno grapado de 100 hojas
Tubos eppendorf
Tris-HCL
NaCl
EDTA
Varilla de vidrio
Proteinasa K
RNasa K
Fenol
Cloroformo
Alcohol isoamílico
Etanol
CTAB
Syber
Ladder
Loading
Buffer TBE (25 Mm KCL, 10 Mm Tris-HCL, pH 8.3)
Bromuro de etilo (BrEth) 1 %.
Frasco autoclavables de rosca (100, 500 y 1000 ml)
Probeta de (10, 50, 100) ml
Vaso de precipitación (50, 500,100) ml

Aguja de disección
 Alfileres con cabeza de colores
 Caja de guantes de látex
 Bolsa con 1000 tubos eppendorf de 1,5 ml y PCR de 0,2ml
 Puntas amarillas, azules y blancas.
 SDS
 Agua ultrapura
 Imanes
 Papel filtro
 Funda de ligas
 Papel aluminio
 Agar pure
 Cinta masking
 Frascos ámbar
 Espátula
 Papel parafilm
 Gradilla para tubos eppendorf
 Cubeta
 Iniciadores

Tabla 7. Indicadores moleculares para PCR

Nombre del iniciador	Secuencia (5' - 3')
Forware	5'-ATATGCTTAAATTCAGCGGG-3'
Reverse	5'-GGGTCGATGAAGAACGCAGC-3'

4.4 FACTORES EN ESTUDIO

Los factores de estudio que esta investigación se va a tomar en cuenta son los siguientes:

- a. Segmentos variables de ADN.
- b. Poblaciones de *T. urticae* Koch.
- c. Relaciones genéticas entre las poblaciones de distintos pisos altitudinales de *A. xanthorrhiza*.

4.5 TRATAMIENTOS

Este estudio se realizó a través de un muestreo aleatorio simple, recolectando hojas maduras de *A. xanthorrhiza* infectadas por el ácaro *T. urticae* directamente de los cultivos de los agricultores en las tres zonas geográficas de la Provincia de Tungurahua: Quinchicoto (Cantón Tisaleo), Barrio la “Pampa” (Cantón Baños) y Granja Experimental Docente “Querochaca” (Cantón Cevallos).

4.6 DISEÑO EXPERIMENTAL

Dado que se realizó un muestreo aleatorio no implicó la realización de un diseño experimental.

4.7 VARIABLES RESPUESTA

Reconocimiento del ácaro

La identificación de *T. urticae* fue mediante visitas en campo observando el daño ocasionado a las hojas maduras de zanahoria blanca a través de las telas de arañas que forma en el envés de la lámina foliar. Se recolectó folíolos los cuales fueron llevados para ser observados estereoscópicamente, donde las características principales para la hembra adulta de esta especie fue su tamaño grande, cuerpo redondo y sus resaltantes dos manchas en el dorso, lo contrario para el macho adulto pues su tamaño es menor al de la hembra, su cuerpo en forma de “V” y poca visibilidad de las dos manchas.

Para la identificación de la especie de *T. urticae* en el laboratorio se realizó mediante el montaje del ácaro macho en placas portaobjeto para observación al microscopio usando líquido de PVA para determinar la forma del edeago en forma de “yunque”.



Figura 12. A.- Ácaro macho observado en el estereoscopio

Recolección

La recolección se realizó mediante visitas a las plantaciones de *A. xanthorrhiza* en la Granja “San Martin Quinchicoto, Cantón Tisaleo; Barrio la “Pampa”, Cantón Baños y Granja Experimental Docente “Querochaca”, Cantón Cevallos; de las cuales se extrajo varias hojas maduras infectadas y sanas, posteriormente fueron colocadas en bolsas plásticas de cierre hermético con la debida identificación.



Figura13. Visita y recolección de las muestras vegetales (hojas maduras) infectadas por el ácaro *T. urticae*. A.- Zona de Quinchicoto, Tisaleo, B.- Zona de la Granja experimental Docente “Querochaca”, C.- Zona de Baños barrio “La Pampa”.

Mantenimiento de las muestras

La conservación de las poblaciones de ácaros se realizó mediante la cría en laboratorio a través de la recolección in situ, la identificación y la separación de *T. urticae* de otras especies. Se llevó a cabo la realización de arenas, colocando dentro de una caja Petri una esponja redonda de poliuretano de 1 cm de espesor; seguidamente para la realización de los discos de hoja se procedió a ubicar una lámina foliar dispuesta en el envés con algodón humedecido en el borde evitando la salida de los ácaros y deshidratación de las hojas en la superficie de cada esponja. De esta manera se obtuvo una población homogénea para la investigación.



Figura 14. Realización de las arenas de los diferentes pisos altitudinales en hojas maduras de *A. xanthorrhiza* para conservación de las poblaciones de *T. urticae*.

Extracción de ADN

En la extracción de ADN se utilizó el método descrito por Doyle y Doyle, (1990) con modificaciones menores, consiste en aumentar la cantidad de buffer de extracción y usar isopropanol para la precipitación. Se pulverizó la muestra de ácaros hembra en un mortero y se colocó en un tubo para micro centrifuga, se le agregaron 800 μ l de solución de extracción recién preparado y se incubó a 65°C en baño María.

Se centrifugó a 14.000 rpm (máxima velocidad) durante 10 min, y se transfirió la fase acuosa (superior) a un tubo nuevo. Inmediatamente se agregó un volumen igual de

cloroformo–alcohol isoamílico y se mezcló por inversiones suaves. Se volvió a centrifugar a 14.000 rpm por 10 min y se separó nuevamente la fase superior en un tubo nuevo.

Para la eliminación de ARN se trató con ARNasa (10 mg/ml) incubando durante 30 min. a 37°C. En seguida se agregaron 800 µl de isopropanol a -20°C, y se colocó una hora en el congelador para precipitar el ADN. Para formar la pastilla de ADN, se centrifugó nuevamente a 14.000 rpm por 10 min. Se tiró el sobrenadante, se lavó la pellet con 400 µl de solución de lavado una y otra vez, con 400 µl de etanol al 70%. Se dejó secar a temperatura ambiente y se re suspendió en una cantidad 1:1 de solución TBE 1X.

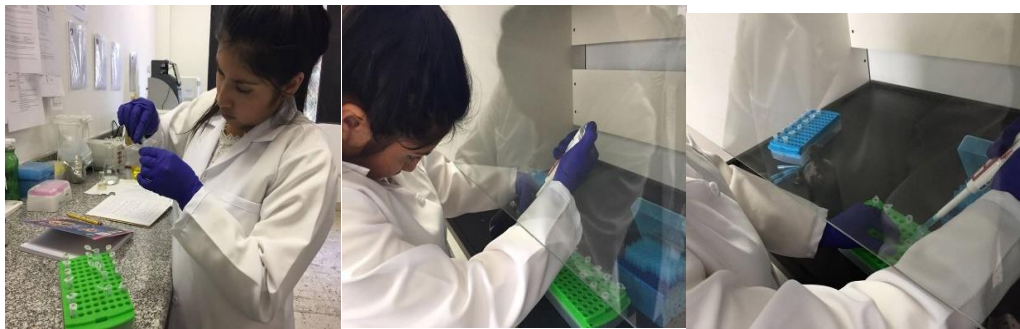


Figura 15. Realización del protocolo de extracción de ADN

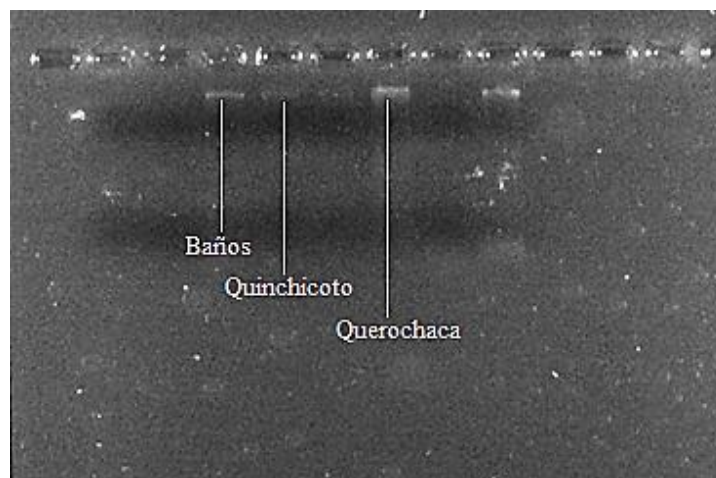


Figura 16. Observación de las bandas de ADN de *T. urticae* de los diferentes pisos altitudinales.

Amplificación de ADN

Para la amplificación de ADN se utilizó el método descrito por Vásquez et al. (2011), el ADN se estimó en 20 ng por métodos de comparación y amplificado usando PCR, siguiendo la metodología señalada por Osakabe et al. (2000), usando el ADN en 10 μ l de Phusion Taq, 5 μ l agua ultrapura, mezcla de Primer Mix ITS2

Protocolo ITS2 Barcode Tetranychus

La PCR se realizó en un termociclador (Perkin Elmer Gene Amp PCR System 2400), bajo las siguientes condiciones: pre-desnaturalización a 94 °C por 4 min, seguido de 35 ciclos, de desnaturalización 94 °C 30 seg., alineación 51 °C por 40 seg. y acoplamiento 72 °C por 40 seg., post acoplamiento 72 °C por 10 min y preservación a 4 °C hasta su utilización.

La separación del ADN amplificado de cada muestra se ejecutó mediante electroforesis en geles de agarosa 2 %, con solución TBE.

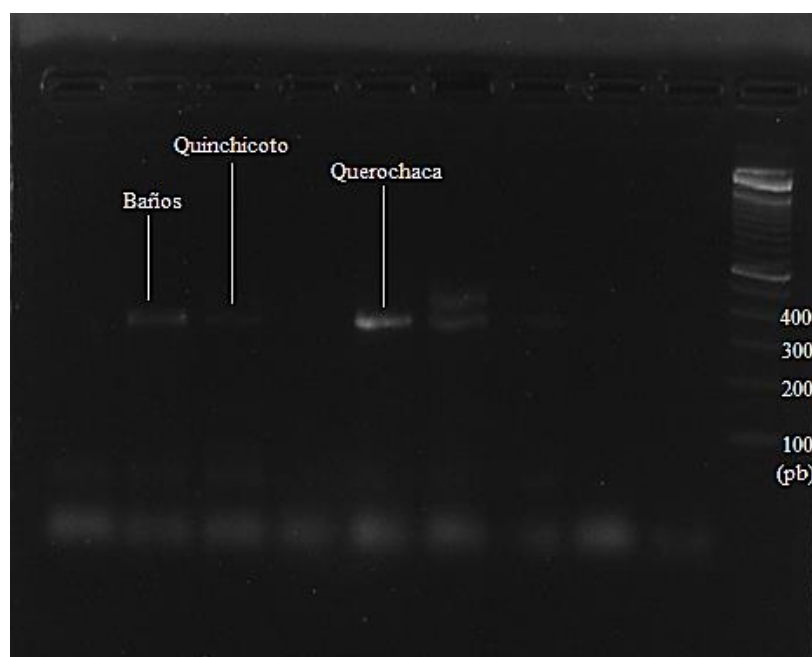


Figura 17. Observación de las bandas de ITS2 mediante el número de pares de bases.

Determinación la variabilidad genética de *T. urticae* mediante ITS2

Se secuenció los productos de amplificación de PCR, usando los servicios de la compañía MACROGEN, con el ITS2 como primer. Las secuencias fueron comparadas cualitativamente y se establecieron los porcentajes de similitud entre las diferentes poblaciones. Las muestras para secuenciadas fueron enviadas con los siguientes códigos: ZQ 2008-Querochaca, ZQH 2008-Quinchicoto y ZB 2008-Baños.



Figura 18. Observación y corte de las bandas de la región ITS2 en el respectivo gel de agarosa. Muestras de las bandas de las localidades (ZQ 2008-Querochaca, ZQH 2008-Quinchicoto y ZB 2008-Baños) colocadas en tubos eppendorf para ser secuenciadas



Figura 19. Muestra con el gel de agarosa que contiene la banda ITS2 para enviar a secuencias

CAPÍTULO V

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la **tabla 8** se pudo observar las amplificaciones del fragmento ITS2 provenientes de las poblaciones de los tres pisos altitudinales; Baños (B); Quinchicoto (QCH) y Querochaca (Q), las cuales arrojaron 277 pares de bases (pb) existiendo un 91,34% de similitud con el 8,66% de divergencia entre las bases de los tres pisos altitudinales la cual coincide con la similitud entre Baños (B) y Quinchicoto (QCH).

Ben-David et al. (2007) mencionaron que las divergencias en los rasgos de los genomas habitualmente son mayores entre las especies que dentro de los mismos. Considerando que las tres poblaciones de *T. urticae* recolectadas indistintamente de las tres zonas geográficas mencionadas pertenecen a una misma especie, la relación filogenética señalada por el autor coincide con el porcentaje de similitud encontrada en la secuenciación del fragmento de nuestras poblaciones. A la vez, la baja variabilidad genética entre poblaciones geográficas de la especie, la cual ha sido discutida por Navajas et al. (2002) que estudiaron la estructura genética en poblaciones de invernadero de *T. urticae*, con marcadores microsatelites y concluyeron que durante periodos de alta reproducción y por lo tanto alto aumento poblacional de los individuos, la heterocigocidad de la población no tendió a aumentar, observándose que no hubo una alta diferenciación genética entre las muestras estudiadas en el tiempo ni en el espacio. De la misma manera, se puede observar que está influenciada por el ámbito geográfico muestreado, como también por la longitud en el tiempo de muestreo. Estos autores recomiendan ampliar ambos factores, así como estudiar, la cantidad en la cual cada copia ITS puede variar, lo cual estuvo fuera del alcance de nuestros objetivos.

Tabla 8. Secuencias de ADN con 277 (pb) pares de bases (Adenina=A; Timina=T; Citocina=C y Guanina=G) de *Tetranychus urticae* hospedando a plantas de *Arracacia xanthorrhiza* procedentes de Baños (B); Quinchicoto (QCH) y Querochaca (Q) de la provincia de Tungurahua, Ecuador.

LOCALIDAD	SECUENCIAS																																							
Baños (B)	A	T	A	T	G	C	A	T	G	A	A	T	C	T	T	G	A	T	G	T	T	A	T	G	C	A	T	G	A	A	T	C	T	T	G	A	T	G	T	T
Quinchicoto (QCH)	A	T	A	T	G	C	A	T	G	A	A	T	C	T	T	G	A	T	G	T	T	A	T	G	C	A	T	G	A	A	T	C	T	T	G	A	T	G	T	T
Querochaca (Q)	A	T	A	T	G	C	A	T	G	A	A	T	C	T	T	G	A	T	G	T	T	A	T	G	C	A	T	G	A	A	T	C	T	T	G	A	T	G	T	T
	T	T	A	T	T	C	C	T	T	T	T	C	T	T	A	A	T	T	G	C	A	A	T	C	T	T	G	A	T	G	T	G	C							
	T	T	A	T	T	C	C	T	T	T	T	C	T	T	A	C	C	T	G	C	A	A	C	T	T	G	T	G	T	G	C									
	T	T	A	T	T	C	C	T	T	T	T	C	T	T	A	A	T	T	G	C	A	A	C	T	T	G	T	G	T	G	C									
	A	A	A	T	T	A	G	T	A	A	G	G	A	G	A	A	T	C	A	A	A	T	C	T	A	C	T	T	G											
	A	G	A	T	T	A	G	T	A	A	G	G	A	G	A	A	T	C	A	A	A	T	C	T	A	C	T	T	G											
	A	G	A	T	T	A	G	T	A	A	G	G	A	G	A	A	T	C	A	A	A	T	C	T	A	C	T	T	G											
	T	T	T	C	A	C	A	T	G	A	T	A	A	A	T	T	T	T	G	T	G	T	A	C	A	A	T	G	C	A										
	T	T	T	C	A	C	A	T	A	A	G	A	A	A	T	T	T	T	G	T	G	T	A	C	A	A	T	G	C	T										
	T	T	T	C	A	C	A	T	A	A	T	A	A	A	T	T	T	T	G	T	G	T	A	C	A	A	T	G	C	T										
	T	A	T	T	T	C	A	T	C	T	G	C	A	A	G	C	A	G	T	A	T	A	T	A	T	G	A	T	A	G										
	T	A	T	T	T	C	A	T	C	T	G	C	A	A	A	C	A	G	T	A	T	A	T	A	T	G	T	A	G											
	T	A	T	T	T	C	A	T	C	T	G	C	A	A	A	C	A	G	T	A	T	A	T	A	T	G	T	A	G											
	A	T	A	C	T	A	G	C	A	T	T	G	A	G	A	T	T	C	T	A	A	G	G	T	T	A	G	T	C	G										
	A	T	A	C	T	A	G	C	A	T	T	G	A	G	G	T	T	C	T	A	A	G	G	T	T	A	G	T	C	G										
	A	T	A	C	T	A	G	C	A	T	T	G	A	G	A	T	T	C	T	A	A	G	G	T	T	A	G	T	C	G										
	C	C	T	A	T	C	T	G	A	T	A	T	C	T	G	A	C	G	A	C	G	C	T	A	A	A	A	G	T	C										
	C	C	T	A	T	C	T	G	A	T	A	T	C	T	G	A	C	G	A	C	G	C	T	A	A	A	A	G	T	C										
	C	C	T	A	T	C	T	G	A	T	A	T	C	T	G	A	C	G	A	C	G	C	T	A	A	A	A	G	T	C										
	G	A	C	G	C	T	A	A	A	G	T	C	G	T	A	T	T	G	C	C	A	G	A	T	A	A	C	T	A	A										
	G	A	C	G	C	T	A	A	A	G	T	C	G	T	A	T	T	A	C	C	A	G	A	T	A	A	C	A	A	A										
	G	A	C	G	C	T	A	A	A	G	T	C	G	T	A	T	T	A	C	C	A	G	A	T	A	A	C	A	A	A										
	T	G	G	T	G	A	T	C	A	A	T	T	A	A	C	T	G	A	T	G	A	A	T	C	T	T	C	T	T	G										
	T	G	G	T	G	A	T	C	T	C	C	T	A	A	A	T	T	A	T	G	A	A	T	C	C	T	C	C	T	G										
	T	G	G	T	G	A	T	C	T	C	C	T	A	A	A	T	G	A	T	G	A	A	T	C	T	T	C	C	T	G										
	C	A	C	T	T	G	T	A	T	A	A	A	T	C	G	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-										
	C	A	C	T	T	G	T	A	G	T	A	A	A	C	A	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-										
	C	A	C	T	T	G	T	A	G	T	A	A	A	C	A	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-										

BAÑOS (B)
 QUINCHICOTO (QCH)
 QUEROCHACA (Q)

Como se indica en la **figura 20**, las bases nitrogenadas en las diferentes poblaciones mostraron resultados poco variables para A (Adenina) con 36.28% (B), 35.86 % (QCH) y 36.75 % (Q) y para T (Timina) con 42.19% (B), 40,92% (QCH) y 41.77% (Q); manteniendo rangos similares, pero la mayor cantidad de T fue en la población de Baños. Sin embargo, los índices porcentuales para C (Citosina) con 18.56 % (B), 20,67 % (QCH) y 19,4 % (Q) y para G (Guanina) con 19.83 % (B), 19.83% (QCH) y 18.98% (Q) fueron menores que los de A y T, alcanzando la mayor cantidad de C en las poblaciones de Querochaca. Además, la existencia de la relación entre G+C con 38.39% (B), 40% (QCH) y 38.39% (Q). La proporción A+T (B= 78,47%; QCH= 76,78%; Q= 78,52%) concuerda con la reportada por Navajas et al. (1996) (74,8% y 76,4%) con lo cual aparentemente el polimorfismo en las posiciones de nucleótidos de nuestras poblaciones se asemeja de las reportadas en otros países (Hinamoto et al. 2001).

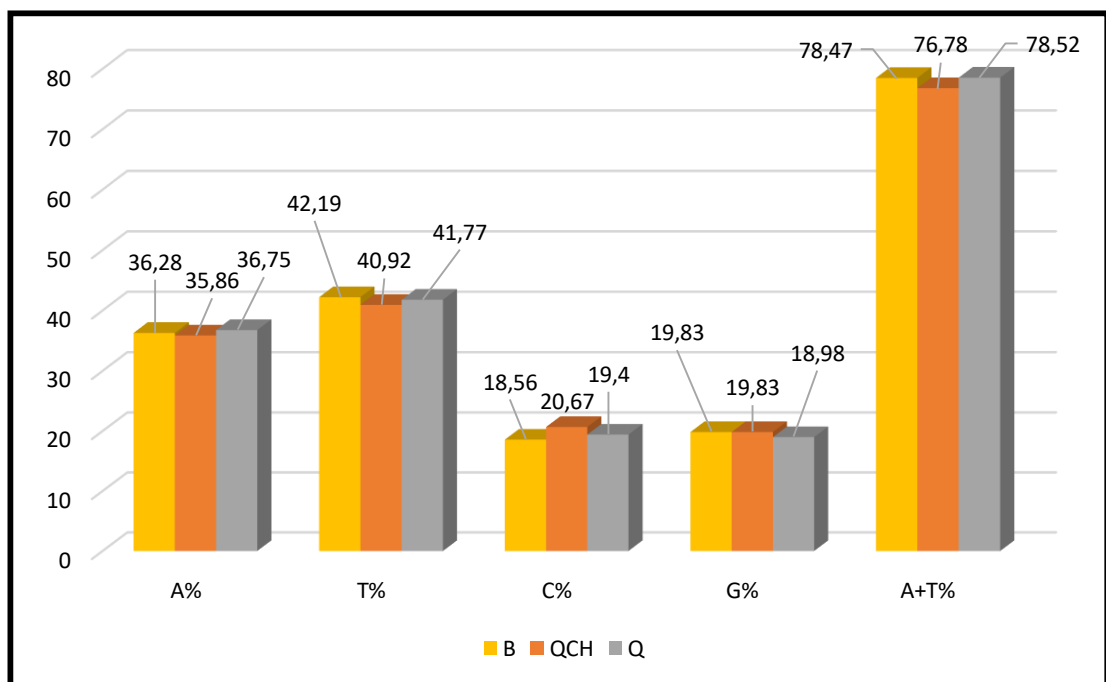


Figura 20. Composición de bases nitrogenadas de los fragmentos ITS2, amplificados a partir de ácaros (*T. urticae*) en *Arracacia xanthorrhiza*, de tres localidades de Tungurahua (B= Baños, QCH= Quinchicoto, Q= Querochaca)

Al realizar la secuencia de ITS2 de las 3 poblaciones de *T. urticae* el número de sustituciones de nucleótidos como indica la **tabla 9**, obtuvo un total de 24 representando el 91,34 % de las 277 pb. Se encontró que en la relación entre las poblaciones de B-QCH las muestras completaba en su totalidad con las 24 sustituciones (8,66% de divergencia), así también entre las poblaciones de B-Q las muestras indicaron 18 sustituciones (6,7% de divergencia) por lo que fueron similares entre las dos relaciones y las secuencias entre las poblaciones de QCH-Q mostraron 6 sustituciones (2,17% de divergencia). El flujo genético que pueden presentar las diferentes poblaciones de *T. urticae* podría ser determinante para la diferenciación en ciertos rasgos genéticos ya sean estas resistencias a acaricidas, especificidad en plantas huésped (Xie et al., 2006), así como resistencia a la infección por la bacteria *Wolbachia* (Hong-Hua et al., 2012).

Tabla 9. Sustituciones de las bases nitrogenadas encontradas en la secuencia del fragmento de ITS2 del ácaro *T. urticae* en comparación con las tres localidades de la provincia de Tungurahua (B= Baños, QCH= Quinchicoto, Q= Querochaca).

Nombre	No de sustituciones	%Similitud
B-QCH	24	91.34
B-Q	18	93.3
QCH-Q	6	97.83
Total de sustituciones		24

Las secuencias de las 3 poblaciones geográficas de *T. urticae* obtenidas en este estudio fueron comparadas con secuencias de la misma especie en el GeneBank. En la **tabla 10**, se muestra el reporte encontrado en el GeneBank relacionado con la secuencia del LOCUS MK167207 de *T. urticae*, el cual se estudió con un fragmento ITS2. Esta secuencia resalta, al introducir nosotros las secuencias obtenidas en nuestro estudio. Más aun, como se observa en la **tabla 11** pudimos determinar que existe un 87% de similitud entre las secuencias reportadas en esta investigación y la que se encuentra en el GeneBank.

Tabla 10. Datos provenientes del Banco de Genes (GENEBANK) comparando las secuencias obtenidas de *Tetranychus urticae* de las diferentes localidades de Tungurahua

LOCUS	MK167207	614 bp	DNA	linear	INV 19-NOV-2018
DEFINITION	<i>Tetranychus urticae</i> voucher UAS-B:2480 5.8S ribosomal RNA gene and Internal Transcribed Spacer 2, partial sequence.				
ACCESSION:	MK167207				
VERSION:	MK167207.1				
KEYWORDS					
SOURCE:	<i>Tetranychus urticae</i> (two-spotted spider mite)				
ORGANISM	<u><i>Tetranychus urticae</i></u>				
	Eukaryota; Metazoa; Ecdysozoa; Arthropoda; Chelicerata; Arachnida; Acari; Acariformes; Trombidiformes; Prostigmata; Eleutherengona; Raphignathae; Tetranychoidae; Tetranychidae; Tetranychus.				
REFERENCE	1 (bases 1 to 614)				
AUTHORS:	Srinivas,N., Rakesh,H. and Chinnamadegowda,C.				
TITLE:	Genetic diversity in <i>T. urticae</i> populations across hosts and locations				
JOURNAL:	Unpublished				

Tabla 11. Reporte emitido por parte de GeneBank al ingresar las secuencias de este estudio.

	<i>Tetranychus urticae</i> voucher UAS-B:2480 5.8S ribosomal RNA gene and Internal Transcribed Spacer 2, partial sequence 87% de similitud
--	--

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES, BIBLIOGRAFÍA Y ANEXOS

6.1 CONCLUSIONES

Al concluir la investigación de “Variabilidad de la región ITS2 en poblaciones de *Tetranychus urticae* Koch en el cultivo de *Arracacia xanthorrhiza* Bancr.” se llegó a las siguientes conclusiones:

1. Se determinó la variabilidad genética existente en tres poblaciones de *T. urticae* Koch del cultivo de *A. xanthorrhiza* de tres pisos altitudinales de la provincia de Tungurahua,

Quinchicoto (QCH), Cantón Tisaleo a 3.260 m.s.n.m.

Barrio la “Pampa”, Cantón Baños (B) a 1.947 m.s.n.m.

Granja Experimental “Querochaca”(Q), Cantón Cevallos a 2.865 m.s.n.m.

Mostrando una divergencia de nucleótidos total del 8,66% y 91,34% de similitud en la región ITS2 secuenciada.

2. Las diferencias en las longitudes del segmento ITS2 indicaron en su totalidad 277 pares de bases (pb), con un promedio de 77,92 % para A+T entre los tres pisos altitudinales.
3. Las secuenciaciones de los segmentos de ITS2 indicaron 24 sustituciones en las bases nitrogenadas para los tres pisos altitudinales, pues la relación entre B-QCH mostró 24 sustituciones con 91,34% de similitud, entre B-Q mostró 18 sustituciones con el 93,3% de similitud y entre QCH-Q mostró un rango poco alejado de las anteriores con 6 sustituciones y 97,93% de similitud. Estableciendo que las poblaciones de Quinchicoto y Querochaca son las de menor divergencia genética

6.2. BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar, J.** (2002). Especiación recombinacional y relaciones filogenéticas en *Satureja macrostema* var. *leavigata* (tesis doctoral). Universidad de Colima, Tecomán, Colima, México.
- Arimoto, M., Satoh, M., Uesugi, R. y Osakabe, M.** (2013). PCR-RFLP Analysis for Identification of *Tetranychus* Spider Mite Species (Acari: Tetranychidae). *Journal of Economic Entomology*, 106(2), 661-668.
- Barrera, V., C. Tapia y A. Montero.** (2004). Raíces y tubérculos andinos: Alternativas para la conservación y uso sostenible en el Ecuador. Serie: Conservación y usos de la biodiversidad de raíces y tubérculos andinos: Una década para la investigación y el desarrollo (1993-2003). No.4 Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias, Centro Internacional de la Papa, Agencia Suiza para el desarrollo y Cooperación. Quito, Ecuador - Lima, Perú. 176p.
- Ben-David, T., Melamed, S., Gerson, U. y Morin, S.** (2007). ITS2 sequences as barcodes for identifying and analyzing spider mites (Acari: Tetranychidae). *Springer Science+Business Media B.V*, 41, 169–181.
- Blas, R., Glislain, M., Herrera, M., & Baudoin, J. P.** (2008). Genetic diversity analysis of wild *Arracacia* species according to morphological and molecular markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, (55), 625–642. Recuperado de <http://doi.org/10.1007/s10722-007-9269-7>
- Bristol, M.** (1988). Edible arracachas of the Sibundoy. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, (16), 107-110.
- Caisová, L., Marin, B. y Melkonian, M.** (2011). A close-up view on ITS2 evolution and speciation - a case study in the Ulvophyceae (*Chlorophyta*, *Viridiplantae*). *BMC Evolutionary Biology*, 11(262), 1-24.

- Castaña, L. y Bilbao, J. (1996).** Introducción a la biología molecular y aplicación a la pediatría (1): Conceptos básicos. *Anales Española de Pediatría*, 453, 15-320.
- Cerna, E., Landeros J., Ochoa, M., Luna, J., Vázquez, O. y Ventura, O. (2009).** Tolerancia del ácaro *Tetranychus urticae* Koch a cuatro acaricidas de diferente grupo toxicológico. *Investigación y Ciencia*, 17(44), 4-10.
- Constance, L. (1949).** The South American Species of Arracacia (Umbelliferae) and some Related Genera. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, 76(1):39-52.
- Constance, L. & Affolter, J. (1995).** Three new species and a new combination in Arracacia Bancroft (Umbelliferae/Apiaceae). *Brittonia*, 47(3): 320–327.
- Doyle, J., Doyle J.L (1990).** Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, v.12, p.13-15, 1990
- Espinoza, P. y Crissman. C. (1997).** Raíces y tubérculos andinos, cultivo, consumo, aceptabilidad y procesamiento. CIP-Quito, Departamento de Ciencias Sociales. Recuperado de: http://www.academia.edu/19716962/RAICES_Y_TUBERCULOS_ANDINOS_Consumo_aceptabilidad_y_procesamiento
- Freire, V. (2018).** Parámetros biológicos de *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) sobre cultivares de mora (*Rubus glaucus*) (tesis de pregrado). Universidad Técnica de Ambato, Cevallos, Ecuador.
- Forero, G., Rodríguez, M., Cantor, F., Rodríguez, D. y Cure, J. (2008).** Criterios para el manejo de *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) con el ácaro depredador *Amblyseius (Neoseiulus) sp.* (Acari: Phytoseiidae) en cultivos de rosas. *Agronomía Colombiana*, 26(1), 78-86.

- Gaona, A. y Ochoa, L. (2010).** Tecnologías locales de producción de arracacha (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft) en el municipio de Boyacá, departamento de Boyacá. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 13 (1), 125-133.
- Gaviola, J. (2015).** Manual de producción de zanahoria. Recuperado de: http://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-inta__cap_6__plagas_de_la_zanahoria_y_su_manejo.pdf
- Gotoh, T., Gutiérrez, J. y Navajas, M. (1998).** Molecular Comparison of the Sibling Species *Tetranychus pueraricola* Ehara et Gotoh and *T. urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). *Entomological Science*, 1(1), 55-57.
- Gugole, M. (2012).** Manejo Integrado de la plaga *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) en cultivos de frutilla del Cinturón Hortícola Platense (tesis doctoral). Universidad Nacional de La Plata, Buenos Aires, Argentina.
- Gutiérrez, J. & Reinoso, V. (2011).** Desarrollo de una fórmula para sopa instantánea con valor nutricional a partir de harina de zanahoria blanca (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft). Recuperado de: https://www.google.com.ec/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=7&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwjXq6Hr5trUAhVFFz4KHWBwDrQQFghBMAY&url=https%3A%2F%2Fwww.dspace.espol.edu.ec%2Fbitstream%2F123456789%2F15967%2F1%2FTESIS_1_2_3_4.docx&usg=AFQjCNHC-Zi0LffSe7ShBTo3Dac5muR5OQ
- Hermann, M., y Heller, J. (1997).** Andean roots and tubers: Ahipa, arracacha, maca and yacon Andean roots and tubers: Ahipa, arracacha, maca. Roma: *International Plant Genetic Resources Institut*.
- Higuera, M. y Prado, R. (2009).** Determinación de los parámetros óptimos de proceso para la elaboración de snacks a partir de zanahoria blanca (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft) (tesis de pregrado). Universidad Técnica del Norte, Ibarra, Ecuador.

Hinomoto N., Osakabe, Mh., Gotoh, T. y Takafuji A. Phylogenetic analysis of green and red forms of the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae), in Japan, based on mitochondrial cytochrome oxidase subunit I sequences. *Applied Entomology Zoology*, 36 (4), 459–464.

Hong-Hua, S., Feng, J., Ming-Zhi, Y., Xian-Ming, Y., Yi-Zhong, Y. y Xiao-Yue, H. (2012). Effects of *Wolbachia* on rDNA-ITS2 variation and evolution in natural populations of *Tetranychus urticae* Koch. *Systematic & Applied Acarology*, 17(1), 45–52.

Instituto Geográfico Militar y Ministerio de Defensa Nacional. (2005). Mapa físico de América del Sur. Recuperado de: <http://recursos.educarecuador.gob.ec/phocadownload/motivar/sociales/pdf/Am%C3%A9rica%20del%20Sur.pdf>

Izquierdo, J. y La Riva, A. (2000). Plant biotechnology and food security in Latin America and the Caribbean. *EJB Electronic Journal of Biotechnology*, 3(1), 1-8. <http://www.ejb.org/content/vol3/issue1/full/1/>. Acceso 12/07/2015.

Jiménez, J. (2005). Características nutricionales de la arracacha (*Arracacia Xanthorrhiza*) y sus perspectivas en la alimentación. Recuperado de: <https://docplayer.es/19747925-Caracteristicas-nutricionales-de-la-arracacha-arracacia-xanthorrhiza-y-sus-perspectivas-en-la-alimentacion-faviola-jimenez.html>

Matos, E., Marcano, M., Azócar, C., y Mora, A. (2015). Establecimiento y multiplicación in vitro de cinco cultivares de apio (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft) colectados en Venezuela. *Bioagro*, 27(2), 121-130.

Mazón, N., Castillo, R., Hermann, M. y Espinoza, P. La zanahoria blanca (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft) en Ecuador. Recuperado de: <http://repositorio.iniap.gob.ec/bitstream/41000/2696/1/iniapscpm67.pdf>

- Mendoza, D.** (2016). Control de ácaros mediante la aplicación de *Bacillus subtilis* en el cultivo de fresa (*Fragaria vesca*) (tesis de pregrado). Universidad Técnica de Ambato, Cevallos, Ecuador.
- Ministerio de Agricultura y Ganadería** e Instituto Nacional de Estadísticas y Censos. (2002). Proyecto CICA. Recuperado de: <http://www.ecuadorencifras.gob.ec/compendio-estadistico/>.
- Mohankumar, S.,** Balakrishnan, N., y Samiyappan, R. (2014). Biotechnological and Molecular Approaches in the Management of Non-Insect Pests of Crop Plants. *Revista Elsevier*, 337-369.
- Morillo, E.** y Second G. (2016). Tracing the domestication of the Andean Root crop arracacha (*Arracacia xanthorrhiza* Bancr.): a molecular survey confirms the selection of a wild form apt to asexual reproduction. *Plant Genetic Resources*, 1–8. doi:10.1017/S1479262116000046. Acceso 15/06/2016.
- Morillo, E.,** Second, G. y Pham, J. (2004). Development of DNA microsatellite markers in the Andean root crop arracacha: *Arracacia xanthorrhiza* Banc. (Apiaceae). *Molecular Ecology Notes*, 680-682 doi: 10.1111/j.1471-8286.2004.00783.x.
- Muñoz, A;** Alvarado, A & Almanza, P. (2015). Caracterización preliminar del cultivo de arracacha *Arracacia xanthorrhiza* Bancroft en el departamento de Boyacá. *Revista de Ciencias Agrícolas*, 32 (1), 3 – 11.
- National Research Council.** (1989). Lost crops of the Incas Little known plants at the Andes with promise far worldwide cultivation. Recuperado: <https://www.nap.edu/read/1398/chapter/1>
- Navajas, M.,** Gutierrez, J., Lagnel, J. y Boursot, P. (1996) Mitochondrial cytochrome oxidase I in tetranychid mites: a comparison between molecular phylogeny and

changes of morphological and life history traits. *Bulletin of Entomological Research*, 86: 407–417.

Navajas, M., Lagnel, J., Gutierrez, J. y Boursots, P. (1998). Species-wise homogeneity of nuclear ribosomal ITS2 sequences in the spider mite *Tetranychus urticae* contrasts with extensive mitochondrial COI polymorphism. *Heredity*, 80, 742-752.

Navajas, M., Perrot-Minnot, M., Lagnel, J., Migeon, A., Bourse, T., y Cornuet, J. (2002). Genetic structure of a greenhouse population of the spider mite *Tetranychus urticae*: spatio-temporal analysis with microsatellite markers. *Insect Molecular Biology*, 11(2), 157–165.

Osakabe, M., Hinomoto, N., Toda, S., Komazaki, S. y Goka, K. (2000). Molecular cloning and characterization of a microsatellite locus found in an RAPD marker of a spider mite, *Panonychus citri* (Acari: Tetranychidae). *Experimental y applied ácarology*, 24(5-6), 385-395.

Palacios, R., Morales, M. y Arias, G. (2011). Evaluación químico bromatológica de tres variedades de *Arracacia xanthorrhiza* “arracacha. *Ciencia e Investigación*, 14(2), 12-14.

Páramo, G., Sánchez, M., y Corredor, D. (1986). Tabla de vida y parámetros poblacionales fundamentales de *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) sobre Rosa sp. en condiciones de laboratorio. *Revista Agronomía Colombiana*, 3(1-2), 83-96.

Pickersgill B. (2007). Domestication of Plants in the Americas: Insights from Mendelian and Molecular Genetics. *Annals of Botany*, 100: 925–940.

Quilapanta, R. (2016). Análisis morfométrico de cultivares de zanahoria blanca (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft) de la provincia de Tungurahua (tesis de pregrado). Universidad Técnica de Ambato, Cevallos, Ecuador.

- Quilapanta, R.,** Dávila, M., Vásquez, C. y Frutos, V. (2018). Morfotipos de *Arracacia xanthorrhiza* Bancr. (Zanahoria blanca) de Ecuador, como fuente de variabilidad del germoplasma. *Scientia Agropecuaria*, 9 (2), 281 – 286.
- Rivera, J.,** Garnica, J., Rubio, S., Lozano, M., Rosero, J., Trujillo, L., y Herrera, Y. (2005). Recomendaciones tecnológicas para la producción de semilla de calidad de arracacha (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft): manejo fitosanitario de la semilla vegetativa de arracacha. Recuperado de: <https://docplayer.es/80169913-Recomendaciones-tecnologicas-para-la-produccion-de-semilla-de-calidad-de-arracacha-arracacia-xanthorrhiza-bancroft.html>
- Rocha, P.** (2003). Marcadores moleculares, una herramienta útil para la selección genética de palma de aceite. *PALMAS*, 24 (2), 11-25.
- Rodríguez D.,** Espitia, M. y Caicedo, Y. (2005). Caracterización de algunas propiedades fisicoquímicas y farmacotécnicas del almidón de arracacha (*Arracacia xanthorrhiza*). *Revista Colombiana de Ciencias Químico Farmacéuticas*, 34 (2), 140-146.
- Sá Argolo, P.** (2012). Gestión integrada de la araña roja *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae): optimización de su control biológico en clementinos. Recuperado de: <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/17804/tesisUPV3987.pdf>
- Soto, A.,** Oliveira, H. y Pallini, A. (2011). Integración de control biológico y de productos alternativos contra *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 14(1): 23 – 29.
- Telenchana, J.** (2008). Oviposición de *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) en tres cultivos hospederos en Zamorano, Honduras. Recuperado de: <https://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/5471/1/CPA-2008-T068.pdf>

Trópicos. (2016). *Arracacia xanthorrhiza* Bancroft. Recuperado de: <http://www.tropicos.org/Name/1700587?projectid=2>

Valderrama & Seminario, J. 2004. Origen de las Raíces Andinas (1). En: J. Seminario (ed.). Raíces Andinas: Contribuciones al conocimiento y a la capacitación. Serie: Conservación y uso de la biodiversidad de raíces y tubérculos andinos: Una década de investigación para el desarrollo (1993-2003) No. 6. Universidad Nacional de Cajamarca, Centro Internacional de la Papa, Agencia Suiza para el Desarrollo y la Cooperación. Recuperado de: <http://www.asocam.org/sites/default/files/publicaciones/files/1b63cd8cee69ef5aca9a4e9f418d6c95.pdf>

Vásquez, C., Castillo, G., Dávila, M., y Hernandez, A. (2011). Idiosomal setae and genetic analysis in *Oligonychus punicae* and *Oligonychus biharensis* (Acari: Tetranychidae) populations from State of Lara. Venezuela. *Journal of Entomology*, 8(4), 341-352.

Vásquez N., C. Medina y M. Lobo. (2004). Caracterización morfológica de la colección colombiana (Tolima, Huila, Boyacá, Cauca) de arracacha (*Arracacia xanthorrhiza*). En: Seminario, J. (ed.). Raíces Andinas: Contribuciones al conocimiento y a la capacitación. Serie: Conservación y uso de la biodiversidad de raíces y tubérculos andinos: Una década de investigación para el desarrollo (1993-2003) No. 6. Universidad Nacional de Cajamarca, Centro Internacional de la Papa, Agencia Suiza para el Desarrollo y la Cooperación. Lima, Perú. Pp 66-76.

Velasco, D. (2018). Efecto de los extractos etanólicos de dos especies de anonáceas sobre los parámetros biológicos de *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) del cultivo de babaco (*Vasconcellea heilbornii*) in vitro (tesis de pregrado). Universidad Técnica de Ambato, Cevallos, Ecuador.

- Vera, R y Johannes, B.** (2007). Spider mite (Acari: Tetranychidae) mitochondrial COI phylogeny reviewed: host plant relationships, phylogeography, reproductive parasites and barcoding. *Springer Science+Business Media B.V.* 42, Pág.239–262.
- Vidaurre, P., Paniagua, N. y Moraes, M.** (2006). Etnobotánica en los Andes de Bolivia. *Botánica Económica de los Andes Centrales.* 224-238.
- Xie, L., Hong, X. y Xue, X.** (2006). Population Genetic Structure of the Twospotted Spider Mite (Acari: Tetranychidae) from China. *Annals of the Entomological Society of America*, 99(5), 959-965.
- Yao, H., Song, J., Liu, C., Luo, K., Han, J.** (2010) Use of ITS2 Region as the Universal DNA Barcode for Plants and Animals. *PLOS ONE* 5(10): e13102. doi:10.1371/journal.pone.0013102

CAPÍTULO VII

PROPUESTA

7.1. TÍTULO

“Estudio de la variabilidad de los fragmentos ITS en poblaciones de *Tetranychus urticae* Koch en el cultivo de *Arracacia xanthorrhiza* Bancr.” en diferentes zonas geográficas del Ecuador”

7.2. DATOS INFORMATIVOS

Los responsables serán el personal de investigación y docentes la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato, así también personal de investigación de otras instituciones agrícolas que corroboren con el desarrollo de la ciencia, conjuntamente con la asesoría técnica de ingenieros agrónomos.

7.3. ANTECEDENTES DE LA PROPUESTA

La propuesta tiene como base la obtención de mejores resultados previo a los que se encontraron mediante el proyecto de investigación sobre “Variabilidad de la región ITS2 en poblaciones de *Tetranychus urticae* Koch en el cultivo de *Arracacia xanthorrhiza* Bancr.” donde se obtuvo 24 sustituciones de un total de 277 pb que representa el 8,66% divergencia de las secuencias de ITS2 entre los tres pisos altitudinales de zonas geográficas. Por lo mismo se recomienda realizar otras investigaciones en diferentes partes del Ecuador ampliando los fragmentos ITS a estudiar, para así observar de mejor manera la existencia de variabilidad en distintas zonas geográficas.

7.4.JUSTIFICACIÓN

La gran distribución geográfica que posee el “acaró de dos manchas” acompañando de su ciclo de vida corto y gran capacidad para reproducirse permite que sea hospedante de más de 150 plantas de importancia agrícola (Cerna et al. 2009; Gugole. 2012 y Soto, 2011). Al estudiar la variabilidad genética de la especie *T. urticae* permitirá establecer los diferentes factores que influyen en la divergencia de nucleótidos de la especie entre una de estas y la más frecuente según (LIN et al., 2006) es la resistencia que esta plaga adquiere sobre los acaricidas.

7.5. OBJETIVOS

Investigar el comportamiento de las poblaciones de *T. urticae* en diferentes zonas geográficas del Ecuador dentro de los fragmentos ITS.

Determinar la inestabilidad de la divergencia en las poblaciones de *T. urticae*.

7.6.ANÁLISIS DE FACTIBILIDAD

La aplicación de esta propuesta es factible, debido a que el estudio con los diferentes fragmentos ITS mostrara resultados más verídicos, así mismo, uno de estos fragmentos como es el ITS2 ha tenido resultados satisfactorios en el género *Tetranychus* lo cual ha sido evidenciado en estudios anteriores ya que guarda información propicia y con la evolución de esta región el nivel de discriminación que nos proporciona entre especies relacionadas ya está escrito por varios autores. Además, que el material vegetal como las poblaciones de ácaros para el estudio están disponible en diferentes zonas de Ecuador, así mismo la Universidad Técnica de Ambato en la Facultad de Ciencias Agropecuarias cuenta con laboratorios equipados para el desarrollo investigativo.

7.7.FUNDAMENTACIÓN

La variabilidad de la región ITS2 estudiada en tres pisos altitudinales de la provincia de Tungurahua en el cultivo de *A. xanthorrhiza* establece información con datos referentes a diferencia genética, por lo mismo la utilización de marcadores moleculares determina cambios genéticos manifestados por los fenotípicos poblacionales ya que de esta manera la identificación de los genomas será posible.

7.8.METODOLOGÍA, MODELO OPERATIVO

Comportamiento de acaro.

Estudio del comportamiento del ácaro en diferentes zonas donde esta plaga es huésped frecuente.

Síntomas de daño a la planta.

Observación de la incidencia del ácaro *T. urticae* mediante síntomas manifestados con pequeñas manchas cloróticas en el envés de las hojas maduras específicamente en la nervadura principal donde forman grandes colonias entre telas de araña.

Recolección de muestras vegetales

Realización de los muestreos y recolección de hojas infectadas y sanas in situ para conservación de las poblaciones en laboratorio mediante la elaboración de arenas en cajas petri.

Extracción ADN y secuenciación de ITS.

Preparación de materiales, equipos y reactivos de laboratorio para la extracción de ADN y las secuencias de las regiones ITS mediante un protocolo aprobado, llegando a encontrar la divergencia de nucleótidos en las zonas geográficas.

7.9. ADMINISTRACIÓN

Se realizará con la colaboración de los agricultores propietarios de las plantaciones de zanahoria blanca, así también con investigadores, docentes de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato y demás técnicos agrícolas de los diferentes sectores.

7.10. PREVISIÓN DE LA EVALUACIÓN

Se dará a conocer la propuesta de “Variabilidad de los fragmentos ITS en poblaciones de *Tetranychus urticae* Koch en el cultivo de *Arracacia xanthorrhiza* Bancr.” en diferentes zonas geográficas del Ecuador mediante socializaciones con las autoridades e instituciones interesadas tanto con resultados antepuestos a la propuesta a través de material informativo como artículos o revistas científicas con argumentos sustentados. También se realizará encuestas a los agricultores como igualmente a las autoridades de las instituciones las cuales determinarán cuan aplicable puede ser esta propuesta.