



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

Determinación de patogenicidad de nematodos entomopatógenos aislados de suelos de cultivos de papa (*Solanum tuberosum* L.) sobre larvas de polilla guatemalteca (*Tecia solanivora*)

Autor: Sylvana Carolaine Arias Armijos

Director: Ing. Francisco Javier Flores Flor Ph.D.

Codirector: Ing. Pablo Javier Llumiquinga Hormaza

Sangolquí, 07 de marzo 2024



- 1 Introducción
- 2 Objetivos e Hipótesis
- 3 Materiales y Métodos
- 4 Resultados y Discusión
- 5 Conclusiones
- 6 Recomendaciones
- 7 Agradecimientos



- 1 Introducción
- 2 Objetivos e Hipótesis
- 3 Materiales y Métodos
- 4 Resultados y Discusión
- 5 Conclusiones
- 6 Recomendaciones
- 7 Agradecimientos



Cultivo de la Papa (*Solanum tuberosum* L.)



Tercer cultivo transitorio en el Ecuador



50% de pequeños agricultores dependen del cultivo

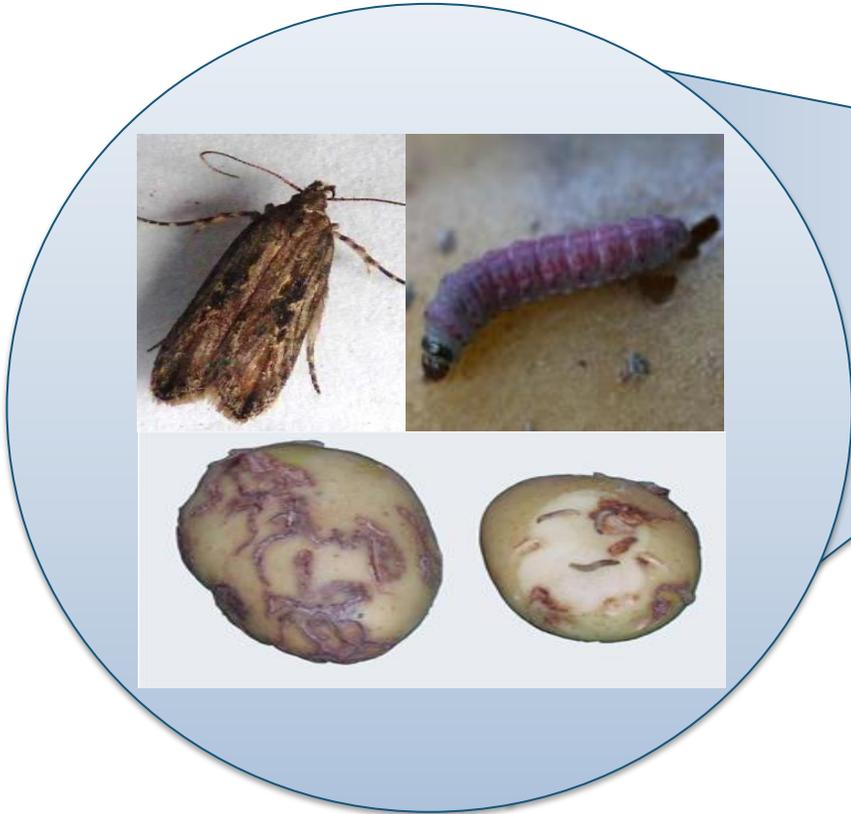
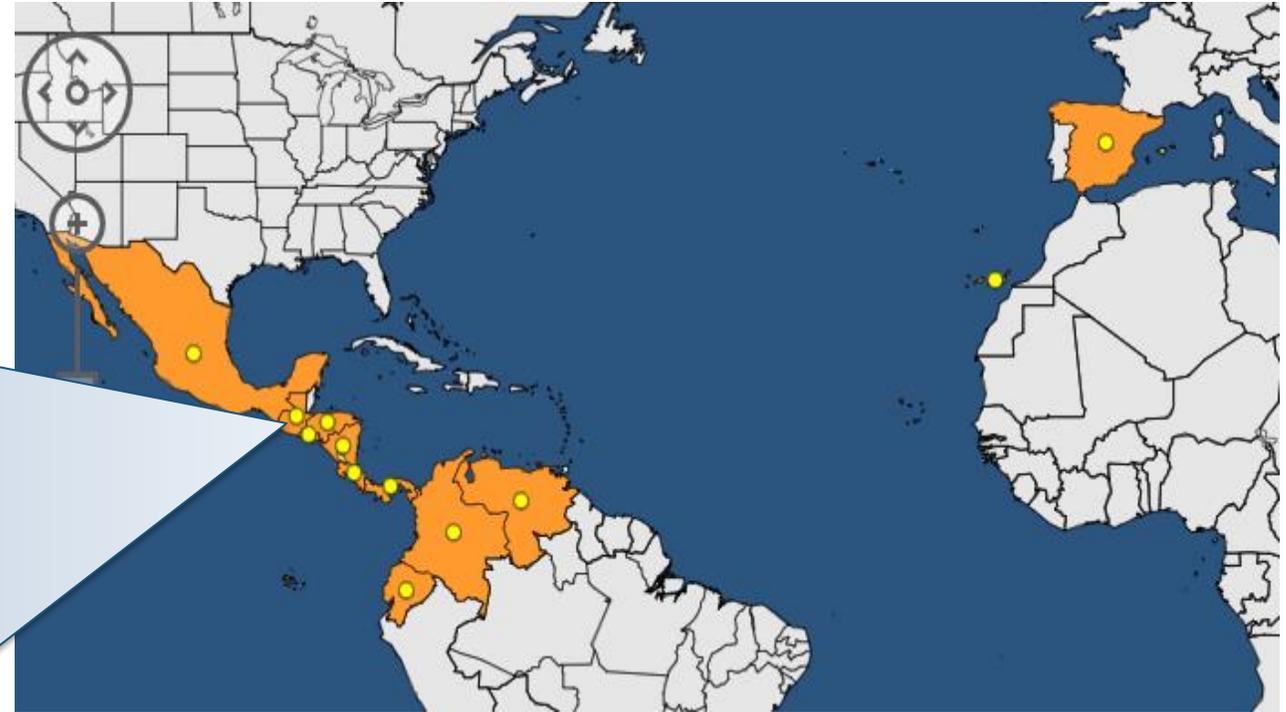


Insectos plaga

- Pérdida del 16% del cultivo
- Afecta 30-70% del rendimiento y calidad

Polilla guatemalteca (*Tecia solanivora*)

| | |
|---------|-------------|
| Orden | Lepidoptera |
| Familia | Gelechiidae |



Gran adaptabilidad

Pérdidas totales

Control de Plagas

Control químico



Control biológico

- Uso de organismos vivos o sus metabolitos



T. solanivora

- productos comerciales *Bacillus thuringiensis*
- Propuesta: icneumonídeos, baculovirus, nematodos entomopatógenos y ácaros depredadores



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

Nematodos entomopatógenos (NEPs)

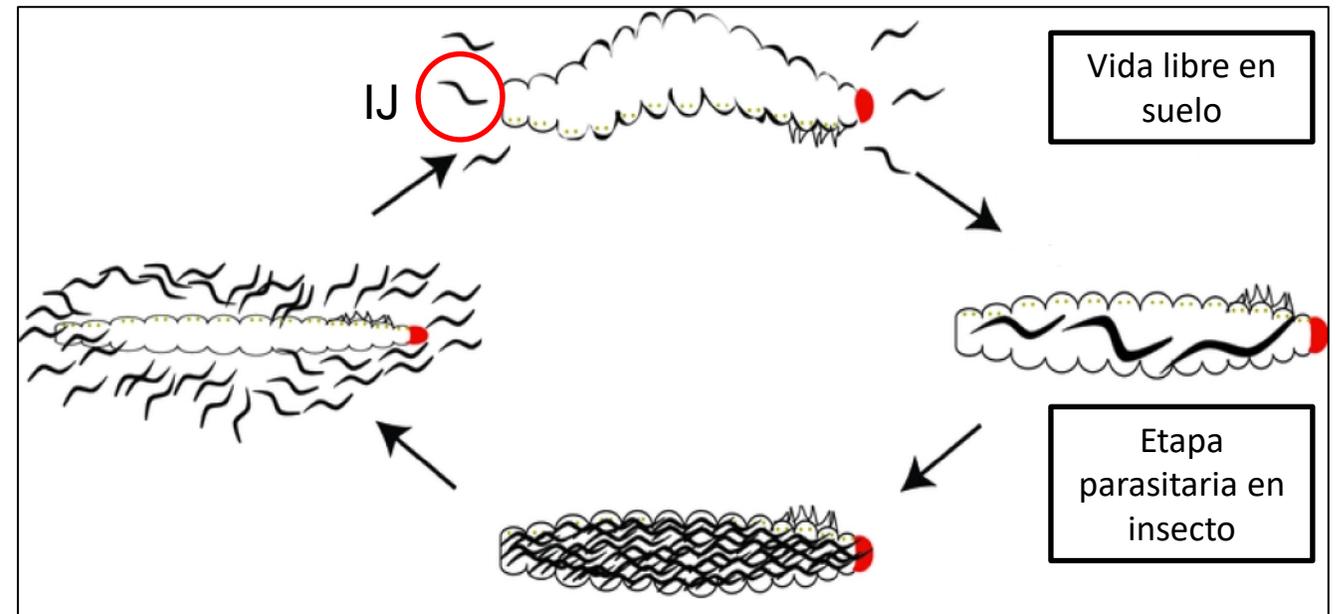
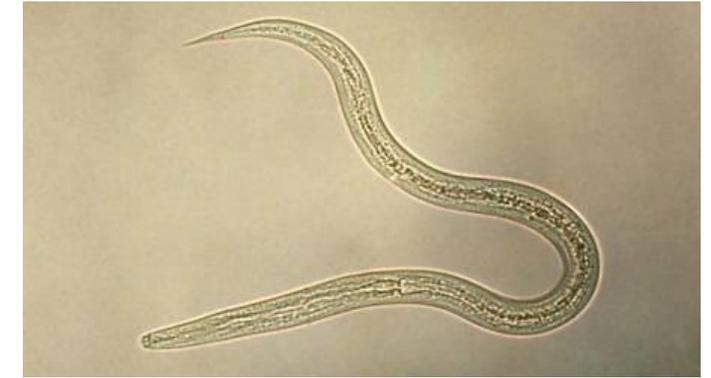
Gusanos redondos
no segmentados

Habitan en suelo

Parasitan insectos

- Asociación con bacterias
- Muerte entre 24 y 72 h

Estudios enfocados
en *Steinernema* y
Heterorhabditis



- 1 Introducción
- 2 **Objetivos e Hipótesis**
- 3 Materiales y Métodos
- 4 Resultados y Discusión
- 5 Conclusiones
- 6 Recomendaciones
- 7 Agradecimientos



Objetivo General

Determinar la patogenicidad de nematodos entomopatógenos aislados de suelos de cultivos de papa (*Solanum tuberosum* L.) sobre larvas de polilla guatemalteca (*Tecia solanivora*).

Objetivos Específicos



- Aislar nematodos con potencial entomopatógeno a partir de suelos de cultivos de papa (*Solanum tuberosum* L.).



- Identificar molecularmente a los nematodos aislados mediante marcadores ribosomales.



- Establecer la mortalidad de larvas de polilla guatemalteca (*Tecia solanivora*) mediante la aplicación de los nematodos identificados.

Hipótesis

Al menos uno de los aislamientos colectados a partir de suelos de cultivos de papa (*Solanum tuberosum* L.) presenta potencial entomopatógeno sobre larvas de polilla guatemalteca (*Tecia solanivora*).



- 1 Introducción
- 2 Objetivos e Hipótesis
- 3 **Materiales y Métodos**
- 4 Resultados y Discusión
- 5 Conclusiones
- 6 Recomendaciones
- 7 Agradecimientos



Zona de estudio



Aislamiento de NEPs

- Laboratorio de Nematología del Departamento Nacional de Protección Vegetal (DNPV)

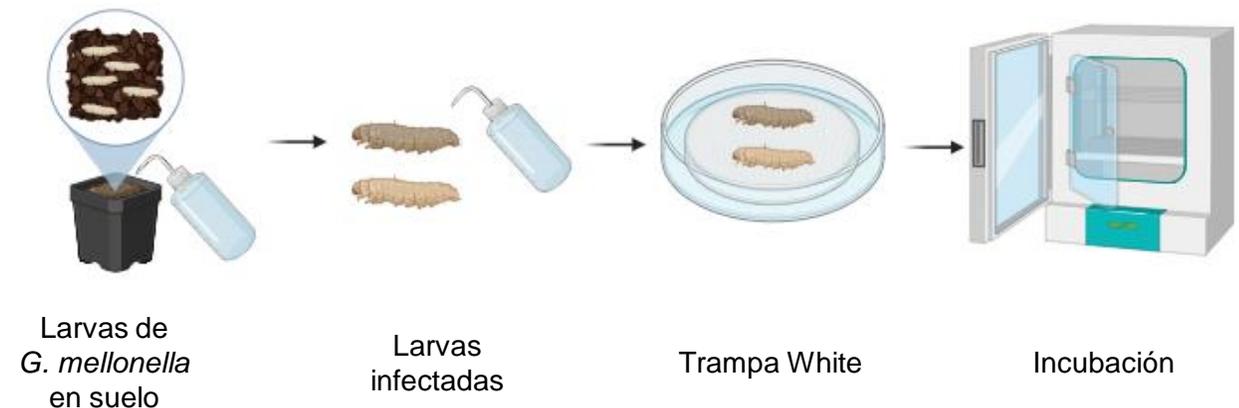
Ensayos moleculares

- Departamento Nacional de Biotecnología (DNB)

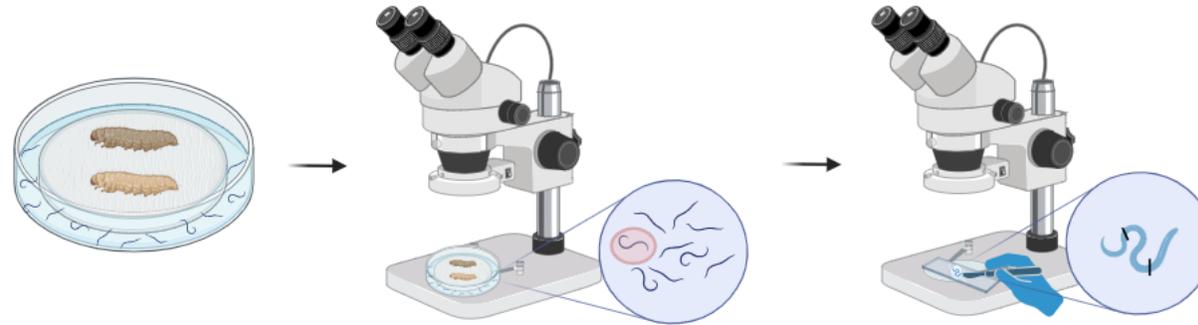
Aislamiento de NEPs del suelo

Localidades de muestras de suelo de la colección del área de Nematología del DNPV de la EESC-INIAP

| Muestra | Provincia | Cantón | Parroquia | Localidad |
|---------|------------|---------------------|---------------------|------------------------|
| CT3 | Cotopaxi | Latacunga | Tanicuchí | San Pedro |
| CT10 | Cotopaxi | Latacunga | Toacaso | San Antonio de Toacaso |
| CT13 | Cotopaxi | Latacunga | Toacaso | Cuicuno Sur |
| CT15 | Cotopaxi | Pujilí | Pujilí | Isinche |
| CT23 | Cotopaxi | Salcedo | Santa Ana | Santo Domingo |
| Mch15 | Pichincha | Mejía | Aloasí | Anita Lucia |
| Tg11 | Tungurahua | Píllaro | Santiago de Píllaro | La Quinta |
| Puy14 | Tungurahua | Baños de Agua Santa | Río Verde | El Puyal |

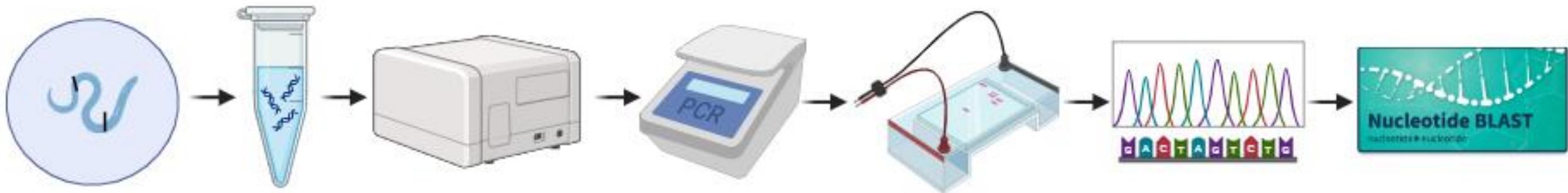


Identificación molecular



Trampa White

Juvenil infeccioso (IJ)



Secciones de IJ

Extracción de ADN: Subbotin et al. (2000)

Cuantificación por espectrofotometría

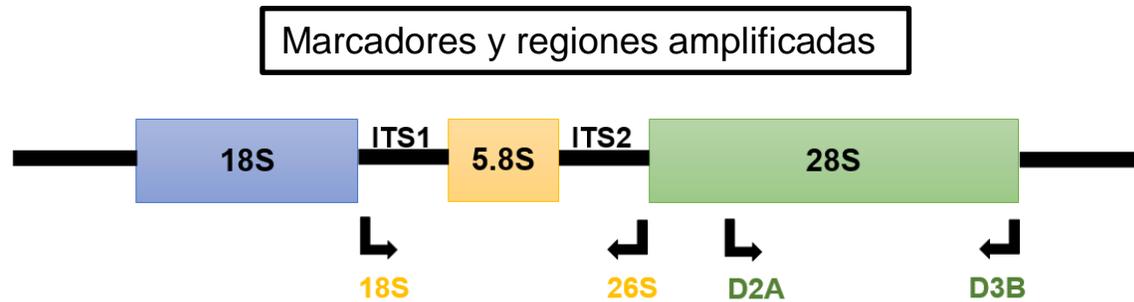
Amplificación de ADN: Subbotin et al. (2005) y Lulamba & Serepa-Dlamini (2020)

Visualización de bandas

Secuenciación

Análisis BLAST

Identificación molecular – Amplificación de ADN



Secuencias de los marcadores para análisis PCR de NEPs

| Región | Marcador | Secuencia del marcador (5'→3') |
|-----------------------------|----------|--------------------------------|
| Segmento de expansión D2/D3 | F: D2A | ACAAGTACCGTGAGGGAAAGTTG |
| | R: D3B | TCGGAAGGAACCAGCTACTA |
| ITS | F: 18S | TTGATTACGTCCCTGCCCTTT |
| | R: 26S | TTTCACTCGCCGTTACTAAGG |

Identificación molecular – Amplificación de ADN

Componentes y concentraciones para amplificación

| Regiones/ Componentes | D2/D3 Concentración final | ITS |
|--------------------------|------------------------------|--------|
| GoTaq® Green Master Mix | | 1X |
| Buffer | 1x | |
| MgCl ₂ | 2 mM | |
| dNTPs | 0,25 mM | |
| Marcador F | 0,6 µM | 1,2 µM |
| Marcador R | 0,6 µM | 1,2 µM |
| Taq polimerasa | 1,5 U | |

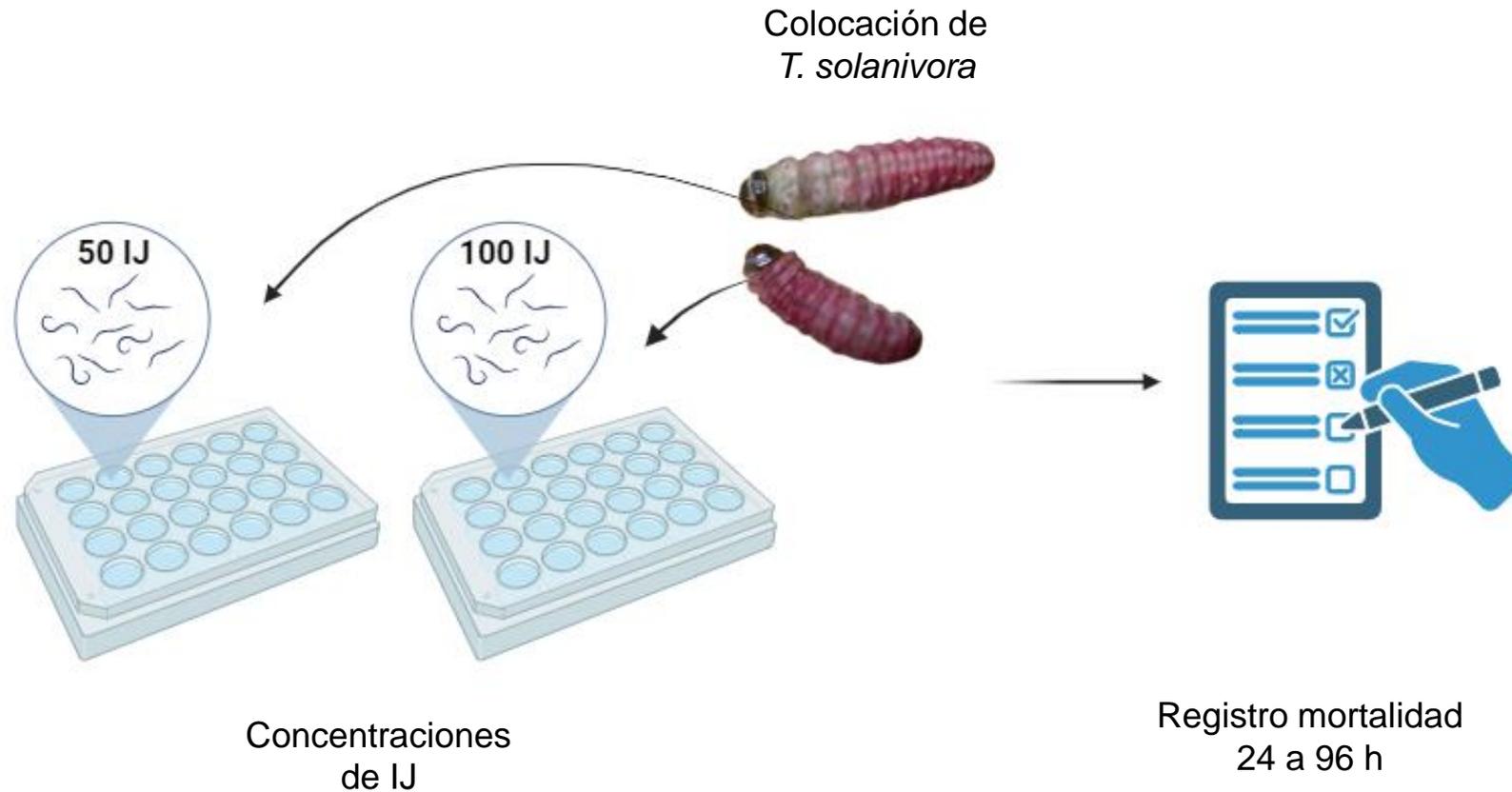
Nota. MgCl₂: Cloruro de magnesio, dNTPs: desoxirribonucleótidos trifosfatos, µM: micromolar, mM: milimolar, U: unidad de actividad enzimática

Condiciones para amplificación de las diferentes regiones

| Regiones/ Fase | D2/D3 | | | ITS | | |
|---------------------------|-------|-------|--------|-----|--------|--------|
| | T | t | Ciclos | T | t | Ciclos |
| Desnaturalización inicial | 94 | 3 min | 1 | 94 | 4 min | 1 |
| Desnaturalización | 94 | 1 min | 30 | 94 | 1 min | 35 |
| Hibridación | 55 | 30 s | 30 | 55 | 30 s | 35 |
| Extensión | 72 | 2 min | 30 | 72 | 2 min | 35 |
| Extensión final | 72 | 7 min | 1 | 72 | 10 min | 1 |

Nota. T: temperatura (°C), t: tiempo

Pruebas de patogenicidad *in vitro*



Pruebas de patogenicidad *in vitro* – Análisis estadístico

Diseño factorial 2x8 + 1 completamente al azar (DCA)

$$y_{ij} = \mu + \tau_i + \beta_j + (\tau\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Esquema del experimento factorial en DCA bajo condiciones de laboratorio

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------------------|----------------|------------------|-----------------|------------------|-----------------|-----------------|----------------|------------------|----------------|------------------|-----------------|----------------|------------------|------------------|----------------|-----------------|
| CT10 100 IJ | CT10 50 IJ | CT3 100 IJ | CT3 100 IJ | CT15 50 IJ | Mch15 50 IJ | Tg11 100 IJ | CT10 50 IJ | C ₀ | CT15 100 IJ | Tg11 50 IJ | Mch15 100 IJ | CT15 100 IJ | CT13 100 IJ | PuyP14 100 IJ | CT23 50 IJ | C ₀ |
| PuyP14 100 IJ | CT23 50 IJ | PuyP14 50 IJ | CT10 50 IJ | PuyP14 100 IJ | PuyP14 50 IJ | Tg11 50 IJ | CT13 100 IJ | PuyP14 100 IJ | C ₀ | CT23 50 IJ | Tg11 100 IJ | CT15 50 IJ | Tg11 100 IJ | CT13 50 IJ | Tg11 100 IJ | Tg11 50 IJ |
| CT10 100 IJ | CT15 100 IJ | CT23 100 IJ | CT10 100 IJ | CT13 100 IJ | PuyP14 50 IJ | CT3 100 IJ | CT13 50 IJ | CT13 50 IJ | CT23 100 IJ | C ₀ | CT23 100 IJ | CT15 100 IJ | CT13 100 IJ | CT13 50 IJ | CT13 50 IJ | Mch15 50 IJ |
| CT3 50 IJ | Mch15 50 IJ | Mch15 50 IJ | CT13 100 IJ | PuyP14 50 IJ | Mch15 100 IJ | CT23 100 IJ | CT23 100 IJ | CT3 50 IJ | Tg11 50 IJ | CT15 100 IJ | CT3 100 IJ | CT13 50 IJ | CT13 100 IJ | Tg11 50 IJ | C ₀ | C ₀ |
| Mch15 100 IJ | CT13 100 IJ | Mch15 50 IJ | CT15 50 IJ | CT3 50 IJ | CT13 50 IJ | Mch15 100 IJ | CT10 50 IJ | CT3 100 IJ | CT3 50 IJ | CT10 50 IJ | CT23 50 IJ | C ₀ | CT10 50 IJ | C ₀ | CT15 100 IJ | Tg11 100 IJ |
| CT13 50 IJ | Mch15 50 IJ | CT15 50 IJ | Mch15 100 IJ | Mch15 50 IJ | PuyP14 50 IJ | CT15 100 IJ | CT15 100 IJ | Tg11 50 IJ | Tg11 50 IJ | CT10 50 IJ | CT10 100 IJ | CT3 100 IJ | PuyP14 100 IJ | CT23 100 IJ | CT23 100 IJ | PuyP14 50 IJ |
| CT15 50 IJ | CT3 50 IJ | Mch15 100 IJ | CT23 50 IJ | CT10 50 IJ | Mch15 100 IJ | CT10 100 IJ | CT23 50 IJ | PuyP14 100 IJ | CT23 50 IJ | PuyP14 100 IJ | Tg11 50 IJ | CT15 50 IJ | CT10 100 IJ | CT10 100 IJ | CT3 50 IJ | Tg11 100 IJ |
| PuyP14 50 IJ | Mch15 50 IJ | PuyP14 100 IJ | CT3 100 IJ | Tg11 100 IJ | Mch15 100 IJ | CT3 100 IJ | CT23 50 IJ | PuyP14 50 IJ | CT10 100 IJ | CT15 50 IJ | CT15 50 IJ | CT23 100 IJ | CT3 50 IJ | Tg11 100 IJ | CT3 50 IJ | CT13 100 IJ |

Factores en estudio

Factor A: Aislamientos de NEPs

Factor B: Número de NEPs

Tratamientos

Interacción de factores en estudio + control

Unidad experimental

una larva de *T. solanivora* + 250 µL de agua destilada con diferentes concentraciones de NEPs + papel filtro en pocillo de 3,6 cm

- Número de aislamientos: 8
- Número de NEPs: 2
- Número de observaciones: 8
- Total de unidades experimentales: 136

Determinar patogenicidad con ANOVA en R 4.3.2



- 1 Introducción
- 2 Objetivos e Hipótesis
- 3 Materiales y Métodos
- 4 Resultados y Discusión
- 5 Conclusiones
- 6 Recomendaciones
- 7 Agradecimientos



Aislamiento de NEPs del suelo

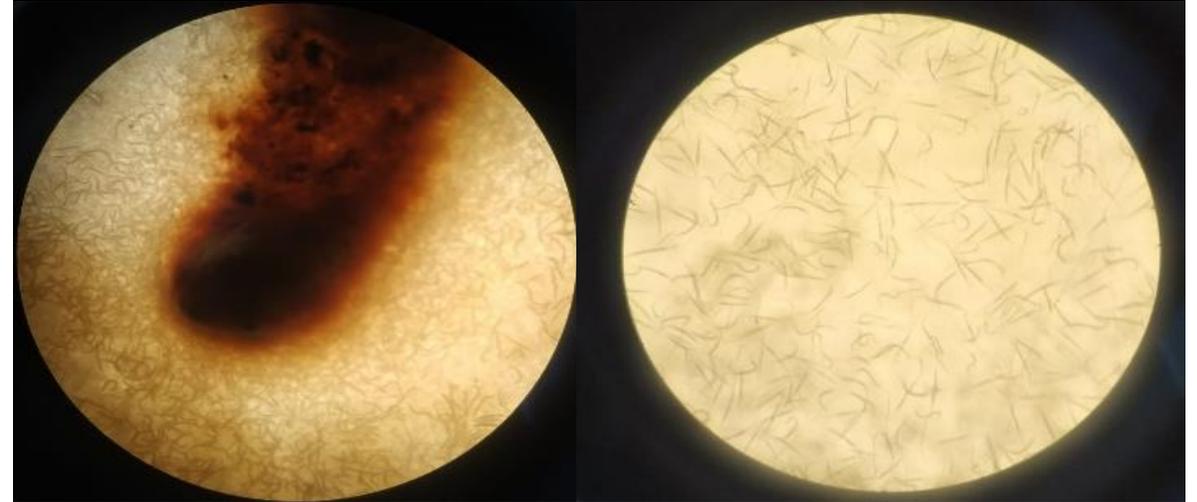
Galleria mellonella infectadas por NEPs



Cambio de coloración, cadáveres hinchados (Poinar, 1979)

Resultados después de dos a siete días (Pérez Campos et al., 2019)

Trampa White

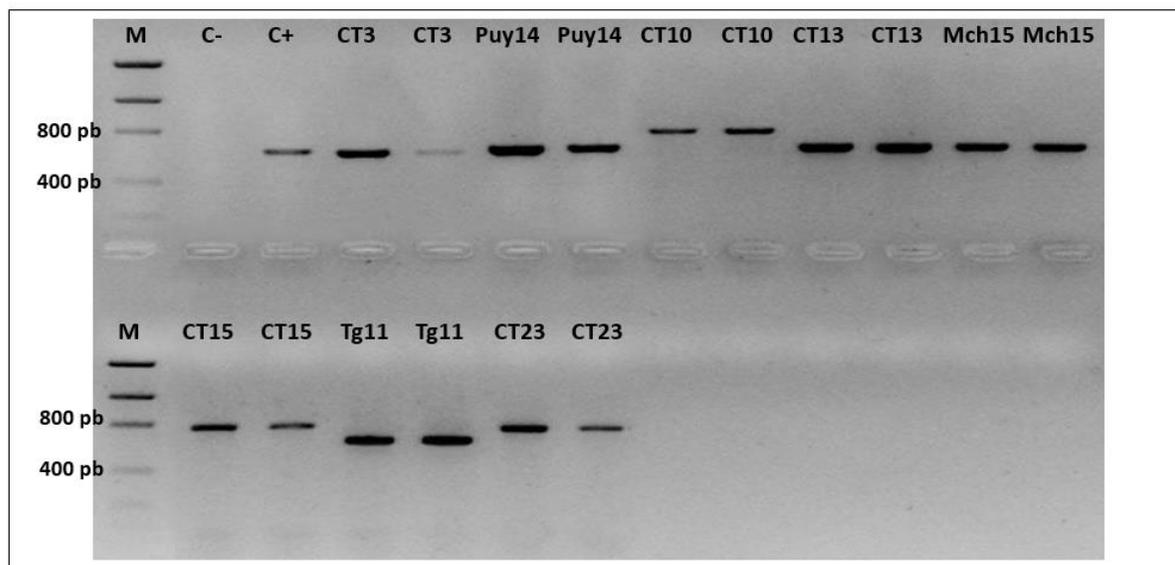


NEPs en suspensión de trampa White después de siete a 15 días (Campos-Herrera et al., 2020)

Tamaño microscópico (Singh et al., 2022)

Identificación molecular – Amplificación de ADN

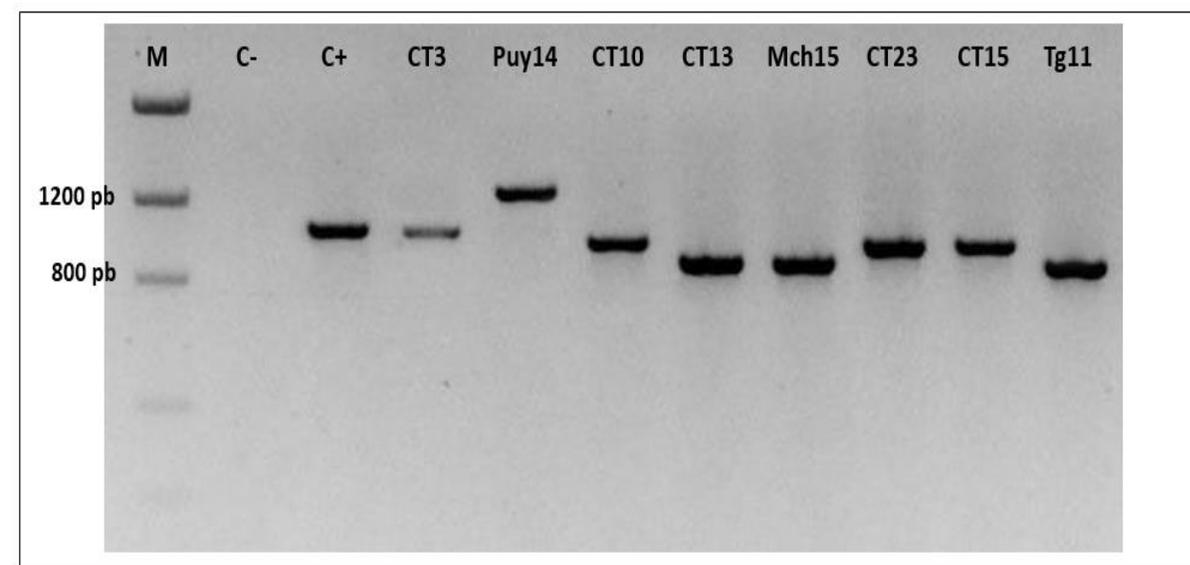
Región D2/D3



Nota. M: Marcador de bajo peso molecular (Invitrogen Low DNA Mass Ladder), C-: Control negativo (sin NEP), C+: Control positivo (NEP)

Identificación de NEPs de suelos agrícolas: fragmentos de 800 pb (Horta et al., 2021), 590 pb (de Brida et al., 2017), 614 pb (Lulamba & Serepa-Dlamini, 2020)

Región ITS



Nota. M: Marcador de bajo peso molecular (Invitrogen Low DNA Mass Ladder), C-: Control negativo (sin NEP), C+: Control positivo (NEP)

NEPs aislados de campos agrícolas: bandas 900-1000 pb (Bhat et al., 2021), ≈ 1500 pb (Vrain et al., 1992)

Identificación molecular – Secuenciación

| Aislamiento | Región D2D3 | | | | Región ITS | | | |
|-------------|----------------------------------|---------------|---------------|--------------------|----------------------------------|---------------|---------------|--------------------|
| | Especie identificada | Cobertura (%) | Identidad (%) | Número de accesión | Especie identificada | Cobertura (%) | Identidad (%) | Número de accesión |
| CT3 | <i>Cruz nema</i> sp. | 100 | 99,70 | MN108239.1 | <i>Cruz nema</i> sp. | 99 | 99,74 | OR606776.1 |
| Puy14 | <i>Oscheius myriophilus</i> | 100 | 100 | MN389728.1 | <i>Oscheius myriophilus</i> | 100 | 99,86 | MG742125.1 |
| CT10 | <i>Acrobeloides bodenheimeri</i> | 98 | 100 | DQ145625.1 | <i>Acrobeloides bodenheimeri</i> | 99 | 99,92 | MW667574.1 |
| CT13 | <i>Cruz nema</i> sp. | 98 | 99,83 | MN108239.1 | <i>Cruz nema</i> sp. | 98 | 99,49 | OR606776.1 |
| Mch15 | <i>Cruz nema</i> sp. | 98 | 99,47 | MN108239.1 | <i>Cruz nema</i> sp. | 98 | 99,52 | OR606776.1 |
| CT23 | <i>Pristionchus maupasi</i> | 99 | 99,72 | KT188863.1 | <i>Pristionchus maupasi</i> | 100 | 99,88 | MG551682.1 |
| CT15 | <i>Acrobeloides bodenheimeri</i> | 99 | 100 | DQ145625.1 | <i>Acrobeloides bodenheimeri</i> | 99 | 98,58 | MW667574.1 |
| Tg11 | <i>Cruz nema</i> sp. | 99 | 100 | MN108239.1 | <i>Cruz nema</i> sp. | 98 | 99,54 | OR606776.1 |

Porcentajes de cobertura e identidad confiables (Bae et al., 2010)

Segmento de expansión D2D3 y región ITS son variables (Tarasco et al., 2023)

NEPs con distribución mundial, especies en ambientes particulares (Hominick, 2002)

Acrobeloides y *Cruz nema* grupos abundantes y distribuidos en diversos ambientes terrestres (Ferris, 2023; Kim et al., 2021).

Pruebas de patogenicidad *in vitro*

ANOVA para la evaluación de la mortalidad de *Tecia solanivora* por dos concentraciones de aislamientos de NEPs

| Fuente de variabilidad | gl | 24h | | 48h | | 72h | | 96h | |
|-------------------------------|-----|--------|----------|--------|----------|--------|----------|--------|----------|
| | | MS | <i>p</i> | MS | <i>p</i> | MS | <i>p</i> | MS | <i>p</i> |
| Aislamiento | 7 | 0,1328 | 0,0109 | 0,4007 | 0,0284 | 0,5882 | 0,0103 | 0,1953 | 0,6014 |
| Concentración | 1 | 0,0078 | 0,6874 | 0,0703 | 0,5224 | 0,0703 | 0,5649 | 0,1953 | 0,3776 |
| Aislamiento: Concentración | 7 | 0,0435 | 0,5039 | 0,2132 | 0,2827 | 0,1953 | 0,4894 | 0,3560 | 0,2001 |
| Residual | 112 | 0,0480 | | 0,1708 | | 0,2109 | | 0,2489 | |

no existen diferencias significativas entre los tratamientos

Nota. gl: grados de libertad, MS: cuadrados medios, *p*: p-valor



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

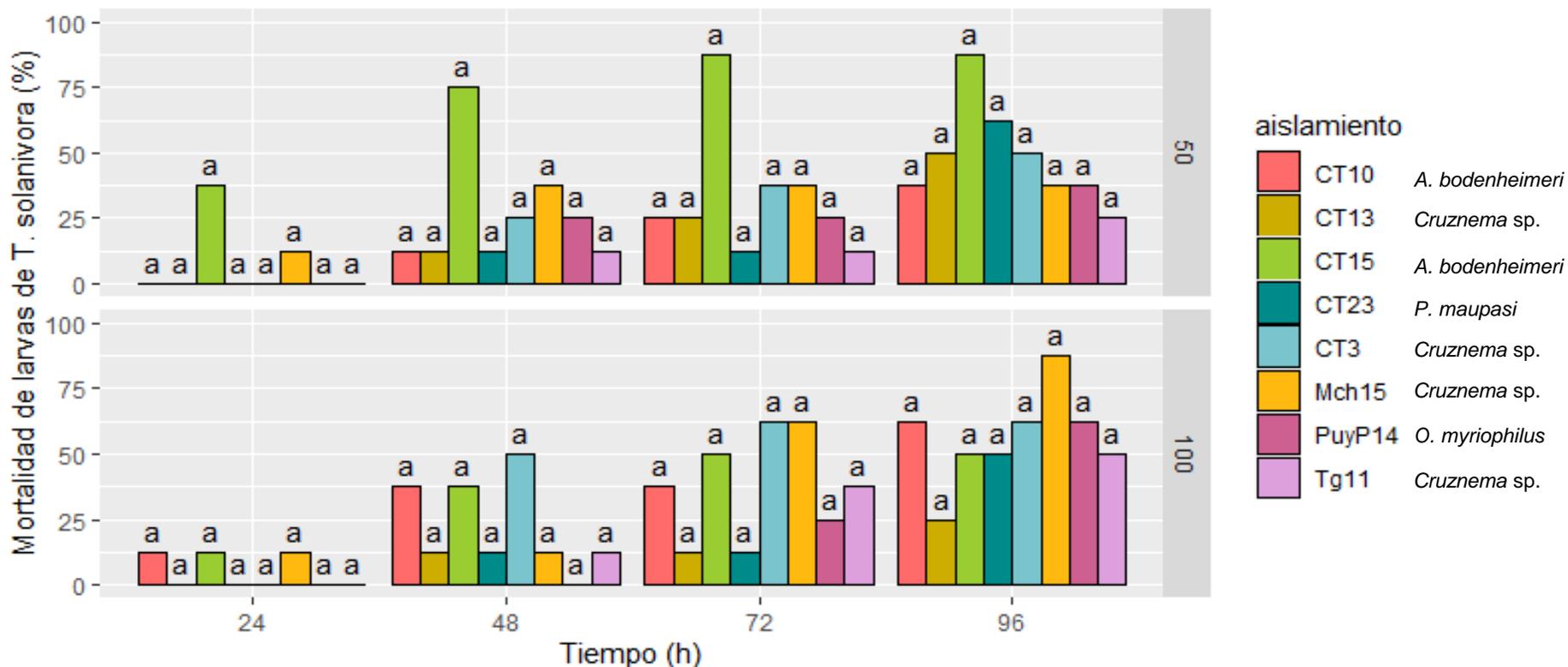
Pruebas de patogenicidad *in vitro*

NEPs ocasionan muerte del insecto entre 24 a 72 h (Caro-Arias et al., 2021)

Mortalidad de 87,5%:
 CT15 (50 IJ), *Acrobeloides bodenheimeri* = mortalidad de larvas de *G. mellonella* a las 96 h (Loulou et al., 2023)
 Mch15 (100 IJ), *Cruzinema* sp. = mortalidad del 80% de ninfas de grillos a las 60 h (Camino et al., 2005)

virulencia de NEP depende de variabilidad intraespecífica y condiciones ambientales y composición del suelo (Glazer, 2002)

competitividad intraespecífica (Márquez, 2021) en CT15



Nota. Datos con la misma letra no difieren significativamente

- 1 Introducción
- 2 Objetivos e Hipótesis
- 3 Materiales y Métodos
- 4 Resultados y Discusión
- 5 Conclusiones
- 6 Recomendaciones
- 7 Agradecimientos



CONCLUSIONES

- Los aislamientos obtenidos de suelos de cultivos de papa presentaron patogenicidad hacia *T. solanivora*, ya que, la aplicación de estos en un ambiente controlado, provocaron mortalidad en las larvas de la polilla.
- La infección por nemátodos con potencial entomopatógeno se visualizó a través de la coloración marrón y ocre de las larvas de *G. mellonella* y se recuperaron de los cadáveres mediante el uso de trampas White.
- La amplificación de las regiones D2D3 e ITS, la secuenciación de los productos PCR y su análisis en BLAST permitió identificar a *Cruznema* sp. en las muestras de suelos de las provincias de Cotopaxi, Pichincha y Tungurahua, *Oscheius myriophilus* en Tungurahua, *Acrobeloides bodenheimeri* en dos localidades de la provincia de Cotopaxi y *Pristionchus maupasi* en Cotopaxi.



CONCLUSIONES

- Las mortalidades de las larvas de *T. solanivora* mediante la inoculación de los nematodos identificados fueron variables en el ensayo, siendo el aislamiento CT15, *Acrobelloides bodenheimeri*, el cual presenta mayor porcentaje de larvas muertas en menor tiempo y menor concentración, sin embargo, las pruebas estadísticas indicaron que no existen diferencias significativas entre los tratamientos.
- Al duplicar la cantidad de IJ se incrementó la mortalidad de las larvas, sin embargo, en el aislamiento CT15 (50 IJ) hay una mayor mortalidad, lo que demuestra que a altas concentraciones de este aislamiento surge una competitividad intraespecífica en ciertos aislamientos.
- La virulencia del nemátodo depende de las condiciones ambientales y composición del suelo de donde fueron aislados, por lo que los aislamientos que se identificaron con la especie no tuvieron los mismos resultados.



- 1 Introducción
- 2 Objetivos e Hipótesis
- 3 Materiales y Métodos
- 4 Resultados y Discusión
- 5 Conclusiones
- 6 Recomendaciones
- 7 Agradecimientos



- Desarrollar pruebas de patogenicidad con los aislamientos encontrados hacia otros insectos plaga para identificar sus espectros.
- Realizar estudios filogenéticos en los aislamientos que presentaron las mismas especies para reconocer la variabilidad genética de los aislamientos de los nematodos.
- Analizar diferentes concentraciones para determinar la dosis letal media (DL₅₀) de los aislamientos.
- Aislar nematodos en diversas provincias, así como suelos de otros cultivos para el incremento de información tanto de la diversidad genética de NEPs en el país como el enriquecimiento de los datos a nivel internacional sobre estos prometedores agentes de control biológico.

- 1 Introducción
- 2 Objetivos e Hipótesis
- 3 Materiales y Métodos
- 4 Resultados y Discusión
- 5 Conclusiones
- 6 Recomendaciones
- 7 Agradecimientos



AGRADECIMIENTOS



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

Ing. Francisco Flores Ph.D.
Director del proyecto

Ing. Pablo Llumiquinga
Codirector del proyecto



FAMILIA Y AMIGOS