



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

Arias Armijos, Sylvana Carolaine

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de titulación, previo a la obtención del título de Ingeniera en Biotecnología

Ing. Flores Flor, Francisco Javier Ph.D.

7 de marzo del 2024



Plagiarism and AI Content Detection Report

AriasC.docx

Scan details

Scan time:  
March 21th, 2024 at 14:41 UTC

Total Pages:  
25

Total Words:  
6196

Plagiarism Detection



Types of plagiarism		Words
Identical	1.1%	68
Minor Changes	0%	0
Paraphrased	5%	312
Omitted Words	0%	0

AI Content Detection



Text coverage		Words
AI text	8.2%	511
Human text	91.8%	5685

[Learn more](#)



Ing. Flores Flor, Francisco Javier Ph.D.

Director



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Certificación

Certifico que el trabajo de titulación: “**Determinación de patogenicidad de nematodos entomopatógenos aislados de suelos de cultivos de papa (*Solanum tuberosum* L.) sobre larvas de polilla guatemalteca (*Tecia solanivora*)**” fue realizado por la señorita **Arias Armijos, Sylvana Carolaine**; el mismo que cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, además fue revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de prevención y/o verificación de similitud de contenidos; razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que se lo sustente públicamente.

Sangolquí, 26 de febrero de 2024



**Ing. Flores Flor, Francisco Javier Ph.D.**

C.C. 1713443479



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Responsabilidad de Autoría

Yo, Arias Armijos, Sylvana Carolaine, con cédula de ciudadanía No. 1726324062, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: "Determinación de patogenicidad de nematodos entomopatógenos aislados de suelos de cultivos de papa (*Solanum tuberosum* L.) sobre larvas de polilla guatemalteca (*Tecia solanivora*)" es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 26 de febrero de 2024

Arias Armijos, Sylvana Carolaine

C.C. 1726324062



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Autorización de Publicación

Yo, Arias Armijos, Sylvana Carolaine, con cédula de ciudadanía No. 1726324062, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: "Determinación de patogenicidad de nematodos entomopatógenos aislados de suelos de cultivos de papa (*Solanum tuberosum* L.) sobre larvas de polilla guatemalteca (*Tecia solanivora*)" en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 26 de febrero de 2024

Arias Armijos, Sylvana Carolaine

C.C. 1726324062

**Dedicatoria**

A Dios, por la guía y fuerza durante todo este camino.

A mis padres, Silvio y Carmen, por todo el amor, apoyo y fortaleza diaria.

A mi hermano, Sergio, por su compañerismo y alegría.

A mi abuelita, Cleotilde, que durante su vida me brindó de su amor y consejos.

Todos mis logros son gracias a ustedes.

Con amor, Carolaine.

## Agradecimientos

A Dios, por toda la fortaleza que encontré en él durante este periodo y a lo largo de mi vida.

A mis padres, Silvio y Carmen, por su amor y sostén en todas las decisiones que he tomado. Son un gran ejemplo a seguir, los admiro mucho. Todo se los debo a ustedes y los recompensaré con cada logro obtenido.

A mi hermano, Sergio, por el acompañamiento que me brindó en esas largas noches de desvelo, por las conversaciones y consejos mutuos. Quiero verte triunfando en cada una de los sueños que me contaste cuando éramos niños. Estoy muy orgullosa de ti.

Al Ingeniero, Pablo Llumiquinga, por impartirme de su conocimiento y guiarme durante este proceso. Gracias por cada consejo, se convirtió en un gran amigo para mí.

Al Ingeniero, Francisco Flores, director de mi tesis por su tiempo, guía y colaboración.

A Felipe, por su apoyo y amor incondicional. Más que mi novio eres mi mejor amigo, en ti encontré paz y mi lugar seguro durante el momento más difícil de mi vida, gracias. Espero seguir celebrando triunfos juntos y cumplir las metas que nos hemos propuesto. Te amo infinitamente.

A Gaby, por su amistad, por esas largas conversaciones en donde nos hemos mostrado vulnerables y por su ayuda tanto en lo académico como en las situaciones de nuestra vida cotidiana. Agradezco a la vida por ponerte en mi camino.

A Daniel, Diego y Nicole por las alegrías compartidas durante toda mi etapa universitaria.

A todas las personas que estuvieron durante este tiempo porque son parte de la persona que soy ahora.

## Índice de Contenidos

Certificación .....	3
Responsabilidad de Autoría .....	4
Autorización de Publicación .....	5
Dedicatoria .....	6
Agradecimientos .....	7
Índice de Contenidos .....	8
Índice de Tablas.....	11
Índice de Figuras .....	12
Listado de Abreviaturas .....	13
Resumen.....	14
Abstract.....	15
Capítulo I: Introducción.....	16
Formulación del problema .....	16
Justificación del problema.....	17
Objetivos de la investigación .....	19
Objetivo General.....	19
Objetivos Específicos .....	19
Hipótesis.....	19
Capítulo II: Marco Teórico .....	20
El cultivo de la papa en Ecuador .....	20
Factores que influyen en el rendimiento del cultivo de papa .....	21
Factores abióticos .....	21
Factores bióticos .....	21
Plagas del cultivo de papa .....	21



Complejo de la polilla de la papa.....	22
Polilla guatemalteca ( <i>Tecia solanivora</i> ).....	23
Mecanismos de control de plagas y <i>T. solanivora</i> .....	26
Control cultural.....	27
Control químico.....	27
Control biológico.....	28
Nematodos entomopatógenos (NEPs).....	29
Características de NEPs.....	30
Ciclo de vida de NEPs.....	30
Aislamiento, multiplicación y almacenamiento de NEPs.....	31
Métodos de Identificación de NEPs.....	32
Método morfológico.....	32
Método molecular.....	33
Capítulo III: Materiales y Métodos.....	34
Participantes.....	34
Zona de estudio.....	34
Materiales, Equipos y Reactivos.....	35
Materiales.....	35
Equipos.....	36
Reactivos.....	36
Metodología.....	37
Factores en estudio.....	37
Tratamientos.....	38
Unidad experimental.....	39
Diseño experimental.....	40
Análisis estadístico.....	40
Análisis funcional.....	40

Variables y métodos de evaluación .....	41
Manejo específico del experimento.....	41
Capítulo IV: Resultados y Discusión .....	47
Aislamiento de NEPs del suelo.....	47
Identificación molecular de NEPs .....	48
Extracción de ADN .....	48
Amplificación de ADN.....	49
Secuenciación .....	51
Pruebas de patogenicidad <i>in vitro</i> .....	53
Capítulo V: Conclusiones .....	56
Capítulo VI: Recomendaciones .....	57
Capítulo VII: Referencias.....	58

## Índice de Tablas

<b>Tabla 1</b> <i>Taxonomía de Tecia solanivora</i> .....	24
<b>Tabla 2</b> <i>Localidades de muestras de suelo de la colección del área de Nematología del DNPV de la EESC-INIAP</i> .....	34
<b>Tabla 3</b> <i>Tratamientos utilizados para evaluar la mortalidad de Tecia solanivora ante la aplicación de NEPs</i> .....	38
<b>Tabla 4</b> <i>Componentes y concentraciones para amplificación de región D2D3</i> .....	43
<b>Tabla 5</b> <i>Condiciones para amplificación de región D2D3</i> .....	44
<b>Tabla 6</b> <i>Componentes y concentraciones para amplificación de región ITS</i> .....	44
<b>Tabla 7</b> <i>Condiciones para amplificación de región ITS</i> .....	45
<b>Tabla 8</b> <i>Valores obtenidos de la cuantificación de ADN extraído de un NEP por aislamiento...</i>	49
<b>Tabla 9</b> <i>Identificación molecular de cada aislamiento</i> .....	52
<b>Tabla 10</b> <i>ANOVA para la evaluación de la mortalidad de Tecia solanivora por dos concentraciones de aislamientos de NEPs</i> .....	54

## Índice de Figuras

<b>Figura 1</b> <i>Complejo de la polilla de la papa</i> .....	23
<b>Figura 2</b> <i>Ciclo de vida de Tecia solanivora</i> .....	26
<b>Figura 3</b> <i>Esquema del experimento factorial en DCA bajo condiciones de laboratorio</i> .....	40
<b>Figura 4</b> <i>Regiones del ADNr amplificadas y sus marcadores</i> .....	43
<b>Figura 5</b> <i>Trampa White con larvas de Galleria mellonella infectadas por NEPs</i> .....	47
<b>Figura 6</b> <i>Nematodos entomopatógenos recuperados en trampa White</i> .....	48
<b>Figura 7</b> <i>Amplificación de la región D2D3 con marcadores universales D2A/D3B</i> .....	50
<b>Figura 8</b> <i>Amplificación de la región ITS con marcadores universales 18S/26S</i> .....	51
<b>Figura 9</b> <i>Mortalidad de Tecia solanivora con dos concentraciones de IJ de los aislamientos hallados</i> .....	55

### Listado de Abreviaturas

ADN:	Ácido Desoxirribonucleico
ADNr:	ADN ribosomal
DNB:	Departamento Nacional de Biotecnología
DNPV:	Departamento Nacional de Protección Vegetal
dNTPs:	Desoxirribonucleótidos fosfatos
EESC:	Estación Experimental Santa Catalina
h:	Hora
Ha:	Hectárea
IJ:	Juvenil infectivo
INIAP:	Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias
ITS:	Espaciador transcrito interno
LSU:	Subunidad grande o 28S
min:	Minuto
mm:	Milímetro
mM:	Millimolar
NEPs:	Nemátodos entomopatógenos
pb:	Pares de bases
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa
s:	Segundo
Tm:	Toneladas métricas
U:	Unidad de actividad enzimática
µL:	Microlitro
µM:	Micromolar

## Resumen

En Ecuador, la papa (*Solanum tuberosum* L.) desempeña un papel fundamental en el desarrollo socioeconómico del sector rural, sin embargo, las plagas son la segunda causa de pérdida del cultivo, siendo la polilla guatemalteca (*Tecia solanivora*), una de las plagas perjudiciales tanto en campo como en el almacenamiento. El principal control de insectos plaga es el uso de insecticidas químicos, cuyos componentes son tóxicos y representa un riesgo para el medio ambiente y la salud humana, por lo que se ha propuesto como alternativa el uso de nemátodos entomopatógenos (NEPs) para reducir la población de plagas. Es así como la presente investigación tiene como objetivo determinar la patogenicidad de NEPs aislados de suelos de cultivos de papa sobre larvas de polilla guatemalteca. Los NEPs se aislaron mediante el uso de *Galleria mellonella* como insecto trampa y su colocación en trampas White. De las trampas, se tomó un juvenil infectivo (IJ) y se realizó su identificación molecular mediante secuenciación del segmento de expansión D2/D3 y de la región ITS. Se realizó pruebas con dos concentraciones para cada aislamiento y se evaluó desde las 24 horas hasta las 96 horas. Se identificó a *Cruznama* sp. en Cotopaxi, Pichincha y Tungurahua, *Oscheius myriophilus* en Tungurahua, *Acroboloides bodenheimeri* en dos localidades de Cotopaxi y *Pristionchus maupasi* en Cotopaxi. El aislamiento CT15, *Acroboloides bodenheimeri*, presentó mayor porcentaje de larvas muertas en menor tiempo y menor concentración, sin embargo, los análisis mostraron que los aislamientos son igual de patogénicos hacia *T. solanivora*.

*Palabras clave:* patogenicidad, nematodos entomopatógenos, *Tecia solanivora*, *Solanum tuberosum* L.

## Abstract

In Ecuador, the potato (*Solanum tuberosum* L.) plays a fundamental role in the socioeconomic development of the rural sector; however, pests are the second cause of crop loss, with the Guatemalan moth (*Tecia solanivora*) being one of the harmful pests both in the field and in storage. The main control of pest insects is the use of chemical insecticides, whose components are toxic and represent a risk to the environment and human health, which is why the use of entomopathogenic nematodes (EPNs) has been proposed as an alternative to reduce the population of pests. This is how the present research aims to determine the pathogenicity of EPNs isolated from potato crop soils on Guatemalan moth larvae. EPNs were isolated by using *Galleria mellonella* as a trap insect and placing them in White traps. From the traps, an infectious juvenile (IJ) was taken and its molecular identification was carried out by sequencing the D2/D3 expansion segment and the ITS region. Tests were performed with two concentrations for each isolate and evaluated from 24 hours to 96 hours. *Cruzinema* sp. was identified in Cotopaxi, Pichincha and Tungurahua, *Oscheius myriophilus* in Tungurahua, *Acrobelloides bodenheimeri* in two localities of Cotopaxi and *Pristionchus maupasi* in Cotopaxi, The CT15 isolate, *Acrobelloides bodenheimeri*, presented a higher percentage of dead larvae in a shorter time and lower concentration; however, the analyzes showed that the isolates are equally pathogenic towards *T. solanivora*.

*Keywords:* pathogenicity, entomopathogenic nematodes, *Tecia solanivora*, *Solanum tuberosum* L.

## Capítulo I: Introducción

### Formulación del problema

El sector agrícola desempeña un papel fundamental en la sustentabilidad y progreso socio-económico de los países en desarrollo (Bula, 2020). El Banco Mundial indica que en el año 2022, en Ecuador, la contribución del sector agrícola al Producto Interno Bruto (PIB) fue del 8,8%. Adicionalmente, el Instituto Nacional de Estadística y Censos (INEC) informa que en el tercer trimestre del año 2023, el 30,9 % de la población ecuatoriana trabaja actividades agrícolas y mineras, consolidándose como la segunda rama de actividad económica con mayor generación de empleo y la primera que concentra la mayor participación de la población rural ocupada (72,0%), quienes con más del 64% de la producción agrícola satisface la demanda interna y externa del país (FAO, 2023).

La papa es el tercer cultivo transitorio que se siembra en el Ecuador, con 19390 Ha sembradas y 17926 Ha cosechadas, de las cuales la región Sierra siembra 19351 Ha con un 43,5% de la producción en la provincia del Carchi, presentándose como base de la economía de sus habitantes. Sin embargo, se registra una pérdida de 200 Ha (180 Ha como cultivo solo y 20 Ha como asociado) ocasionado por plagas, la segunda causa de pérdida del cultivo (INEC, 2023a).

Las plagas afectan al cultivo tanto en el campo como en el almacenamiento de la producción, siendo las larvas las que mayores daños ocasionan ya que penetran en el producto y provocan el ingreso de microorganismos que causan pudriciones secundarias y lo hacen no apto para la venta y el consumo, lo que resulta en grandes pérdidas económicas (Sharaby & Fallatah, 2019).

La polilla guatemalteca (*Tecia solanivora*) es una de las plagas perjudiciales para el cultivo de la papa, tanto en campo como en el almacenamiento de los tubérculos (Fu et al.,



2020). El insecto plaga se encuentra presente en Centroamérica, al norte de Sudamérica (Venezuela, Colombia y Ecuador), las Islas Canarias y la Europa peninsular (EFSA et al., 2018) y genera pérdidas de hasta el 80% (Naqqash, 2022).

El principal método para el control de plagas es el uso de insecticidas químicos (Kroschel et al., 2020). Los agricultores han recurrido por años a su aplicación por la eficacia en el control y la protección de los cultivos (Wuepper et al., 2023). Sin embargo, debido a su composición tóxica, el uso indiscriminado de estos productos ha causado impactos significativos en el medio ambiente y la salud humana (Mdeni et al., 2022).

### **Justificación del problema**

Las pérdidas económicas ocasionadas por las plagas, motivan al agricultor a realizar aplicaciones más frecuentes de fitosanitarios, sin justificación técnica, lo cual representa un riesgo para la salud humana y el medio ambiente debido a los componentes tóxicos de dichos productos (Kumar et al., 2023).

La reducción de la contaminación derivada del uso de pesticidas es una prioridad en la política agrícola a nivel mundial (Möhring et al., 2020), por lo que se ha enfatizado el estudio de métodos alternativos para el control de plagas. Las estrategias basadas en la ingeniería genética ofrecen una solución práctica, sin embargo, conlleva riesgos debido a la posible aparición de genes resistentes en el patógeno (Lahlali et al., 2022), por lo que, como alternativa se ha propuesto el control biológico, que consiste en el uso de depredadores, patógenos, parasitoides para mitigar la densidad poblacional de las plagas (Moore, 2021).

Los nemátodos entomopatógenos (NEPs) son organismos del suelo (Půža & Tarasco, 2023), utilizados como agentes de control biológico en cultivos agrícolas debido a su gran plasticidad fenotípica y a que parasitan a insectos en estados inmaduros provocando su muerte entre 24 y 72 h después su ingreso (Caro-Arias et al., 2021).

Más de 30 familias de nemátodos poseen taxones que parasitan o están asociados con insectos, sin embargo, son siete familias consideradas como potenciales agentes de control biológico: Allantonematidae, Neotylenchidae, Rhabditidae, Sphaerularidae, Mermithidae, Steinernematidae, Heterorhabditidae, siendo las dos últimas las más estudiadas para control biológico (Stock & Hunt, 2005), ya que son parásitos obligados de insectos y presentan un amplio rango de hospederos (Vidaurre et al., 2020).

Debido al gran interés en estos agentes de control biológico, en el Ecuador, el Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) en el año 2004 inició con el estudio de NEPs de los géneros *Steinernema* y *Heterorhabditis* para el control biológico de cutzo (*Phyllophaga* sp.), y en el 2006, para el control del gusano blanco de la papa (*Premnotrypes vorax*) y la polilla de la papa (*Tecia solanivora*). Sumándose a la investigación en el país, Argotti et al. (2010) encontraron mortalidades del 62,2% y 32,7% en *T. solanivora* al emplear nemátodos *Heterorhabditis* y *Steinernema*, respectivamente.

Dichas investigaciones dieron lugar a que el INIAP en el año 2006 y C. Castillo et al. en el 2010 adaptaran y desarrollaran técnicas de laboratorio para el manejo eficiente de NEPs, mientras que el 2011, Asaquibay et al. llevaron a nivel de campo la multiplicación exitosa de NEPs obtenidos en el laboratorio en composteras de fincas, demostrando la efectividad práctica de las investigaciones.

Recientemente, Argotti et al. (2022) aislaron NEPs de 57 muestras de suelo, hallando 28 poblaciones; 13 del género *Heterorhabditis* y 15 del género *Steinernema* para su futuro uso en el manejo integrado de gusano blanco (*Premnotrypes vorax*). Además, en el país se han llevado a cabo tesis que implementan de nemátodos entomopatógenos como método de control biológico de insectos plaga. No obstante, la disponibilidad de información a nivel nacional sobre este tema sigue siendo limitada.

Dada la escasez de los aportes en el Ecuador, este estudio tiene como propósito enriquecer la información a nivel nacional e internacional. Para lograrlo, se aisló nematodos con potencial entomopatogénico a partir de suelos de cultivos de papa (*Solanum tuberosum* L.), se los identificó molecularmente y se estableció su patogenicidad en larvas de polilla guatemalteca (*Tecia solanivora*).

## **Objetivos de la investigación**

### **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 entomopatogénico 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 entomopatogénico sobre larvas de polilla guatemalteca (*Tecia solanivora*).

## Capítulo II: Marco Teórico

### El cultivo de la papa en Ecuador

La papa se originó en la zona Andina de Perú y Bolivia, en la meseta del Collao, cuenca hidrográfica del Lago Titicaca y se diversificó en 16 países de América: México, Estados Unidos, Costa Rica, Guatemala, Honduras, Panamá, Argentina, Bolivia, Brasil, Chile, Colombia, Ecuador, Paraguay, Perú, Uruguay y Venezuela (CIP, 2022) fue llevada y distribuida a Europa en la segunda mitad del siglo XVI (Çalışkan et al., 2022). En la actualidad, la papa se cultiva en aproximadamente 18 millones de hectáreas (Ha) en todo el mundo, con una producción mundial de 376 millones de toneladas (Tm), siendo el cuarto cultivo alimentario más importante del mundo, después del maíz, arroz y trigo, debido a su valor nutricional (FAO, 2023b).

La papa es el tercer cultivo transitorio del Ecuador después del maíz duro seco y el arroz, con una superficie de 19390 Ha sembradas y 17926 Ha cosechadas, una producción de 251433 Tm y un rendimiento de 12,97 Tm/Ha, en el año 2022, además de 74 Tm de papa fresca exportadas, en el año 2023 (INEC, 2023a; MAG, 2023).

El cultivo tiene mayor productividad en las tierras altas andinas, comprendidas en tres zonas: norte (Carchi e Imbabura), centro (Pichincha, Cotopaxi, Tungurahua, Bolívar y Chimborazo) y sur (Cañar, Azuay y Loja), de las cuales, las provincias de Carchi, Cotopaxi, Chimborazo y Tungurahua participan más en la siembra del cultivo, siendo Carchi la que cuenta con mayor producción (43,5%) (INEC, 2023a).

El sector rural del Ecuador es el que más se dedica a la agricultura, ya que es una de las actividades relevantes para su ámbito económico, social y productivo (Basantés et al., 2020). En la producción de la papa se vincula a 82 mil productores en 90 cantones, donde aproximadamente el 50% son pequeños agricultores que dependen del cultivo como tal y

satisfacen el 64% de la demanda nacional (74% para consumo doméstico, 9% consumo industrial y 17% como semilla) (Agro Bayer, 2022).

A pesar que la papa es un ingrediente fundamental para la gastronomía ecuatoriana, el consumo es muy bajo, siendo entre 23 y 24 kilos por persona al año, quedando por debajo en el consumo en Perú (90 kilos) y Colombia (50-55 kilos) (IICA, 2020).

### **Factores que influyen en el rendimiento del cultivo de papa**

El desarrollo y rendimiento del cultivo de papa pueden verse afectados por factores bióticos y abióticos, condiciones que pueden ocasionar daños físicos a la planta y el tubérculo.

#### **Factores abióticos**

La papa es sensible a las variaciones climáticas que van desde las intensas precipitaciones pluviales y granizadas hasta la presencia de sequías y fluctuaciones de temperaturas tanto altas como bajas (heladas); además, su desarrollo se ve afectado por la composición y estructura del suelo, así como la disponibilidad de nutrientes (Arcos et al., 2020).

#### **Factores bióticos**

Entre los factores bióticos que afectan al cultivo se destacan los insectos plaga, las enfermedades causadas por hongos, virus, bacterias y nematodos, además de la presencia de malezas que compiten por espacio, agua y nutrientes (Arcos et al., 2020).

#### **Plagas del cultivo de papa**

Los insectos plaga son uno de los factores bióticos que afectan del 30% al 70% en el rendimiento y calidad de la papa y causan pérdidas de aproximadamente el 16% del cultivo (Devaux et al., 2020). En el 2022, las plagas fueron la segunda razón de pérdida de 180 Ha del cultivo de papa solo y 20 Ha del cultivo asociado (INEC, 2023a).

En Ecuador, las plagas más comunes que atacan al tubérculo son: la polilla común (*Phthorimaea operculella*), la polilla guatemalteca (*Tecia solanivora*), la polilla andina (*Symmetrischema tangolias*) y el gusano blanco (*Premnotrypes vorax*), mientras que las plagas del follaje son: la pulguilla (*Epitrix* spp.), el trips (*Frankliniella tuberosi*) y el minador de la hoja (*Liriomyza huidobrensis*) (Castillo & Cuesta, 2021).

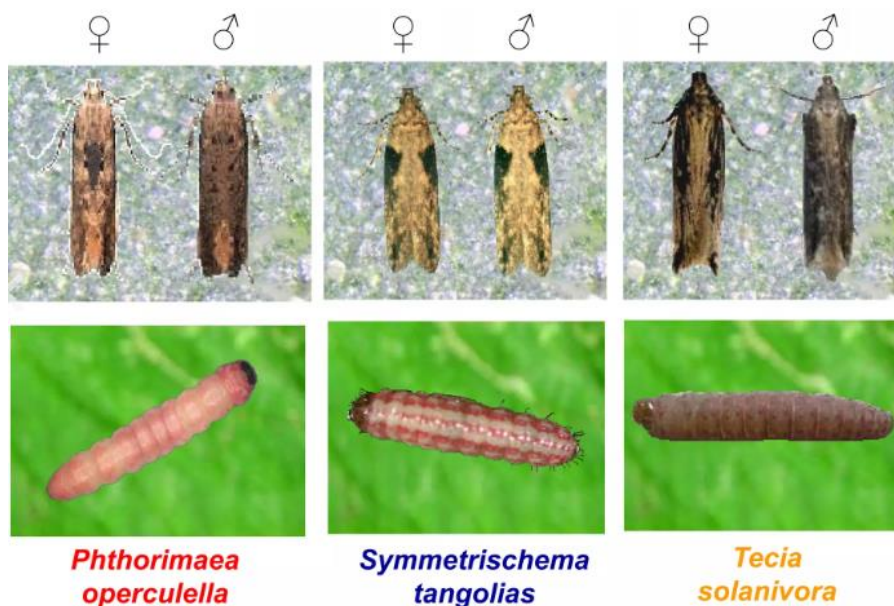
### **Complejo de la polilla de la papa**

El complejo de la polilla de la papa, constituido por tres especies de lepidópteros considerados como insectos plaga que afectan al cultivo, incluye la polilla común (*Phthorimaea operculella*), la polilla guatemalteca (*Tecia solanivora*) y la polilla andina (*Symmetrischema tangolias*) (Naqqash, 2022).

*P. operculella*, procedente de las regiones montañosas tropicales de América del Sur, representa la plaga más común y perjudicial en las zonas tropicales y subtropicales a nivel mundial ya que ocasiona pérdidas de hasta el 70% del rendimiento de la papa; mientras que *S. tangolias*, originaria de Perú y Bolivia se ha extendido a otras regiones del mundo como América del Norte, Australia, Nueva Zelanda e Indonesia, causando pérdidas de hasta el 30% del cultivo; finalmente, *T. solanivora* originaria de Guatemala, se extendió a Venezuela, Colombia, Ecuador, las Islas Canarias y a todo el sur de Europa, ocasiona pérdidas de hasta todo el stock cosechado (Kroschel et al., 2020; Naqqash, 2022).

**Figura 1**

*Complejo de la polilla de la papa*



*Nota.* Tomado de Krosche et al. (2015)

### **Polilla guatemalteca (*Tecia solanivora*)**

*Tecia solanivora* es un lepidóptero perteneciente a la familia Gelechiidae considerada como una de las principales plagas de impacto económico que atacan al cultivo de la papa en Centroamérica y Sudamérica (MAPA, 2018). Es originaria de Guatemala pero por su alto grado de adaptabilidad a nuevas condiciones ambientales se ha establecido en: México, Costa Rica, El Salvador, Honduras, Nicaragua, Panamá, Colombia, Ecuador, Venezuela, España peninsular y las Islas Canarias (EFSA et al., 2018; Rojas-Sandoval, 2023).

**Tabla 1***Taxonomía de Tecia solanivora*

Dominio	Eukaryota
Reino	Metazoa
Filo	Arthropoda
Subfilo	Uniramia
Clase	Insecta
Orden	Lepidoptera
Familia	Gelechiidae
Género	Tecia
Especie	<i>Tecia solanivora</i>

*Nota.* Tomado de Rojas-Sandoval (2023)

**Ciclo de vida**

*T. solanivora* es un insecto con un ciclo holometábolo que dura de 42-200 días, según las condiciones ambientales, y consta de cuatro etapas (Gavara et al., 2023):

- Huevo: Es de forma ovoide con dimensiones que oscilan entre de 0,46-0,6 mm de longitud y 0,39-0,43 mm de ancho, presenta una coloración blanca perlada, recién ovopositado, que con el transcurso del tiempo va tornándose amarillento para finalmente adquirir un color oscuro antes de la eclosión. La incubación puede durar de 5 a 25 días, dependiendo de la temperatura ambiental.
- Larva: Es alargada con tres pares de patas torácicas, cuatro pares de pseudopatas abdominales y un par de pseudopatas anales. El desarrollo larval pasa por cuatro instares que se diferencian por el tamaño y color. El primer estadio dura aproximadamente ocho días, el cuerpo es blanquecino con un tamaño de 1,2-1,4 mm

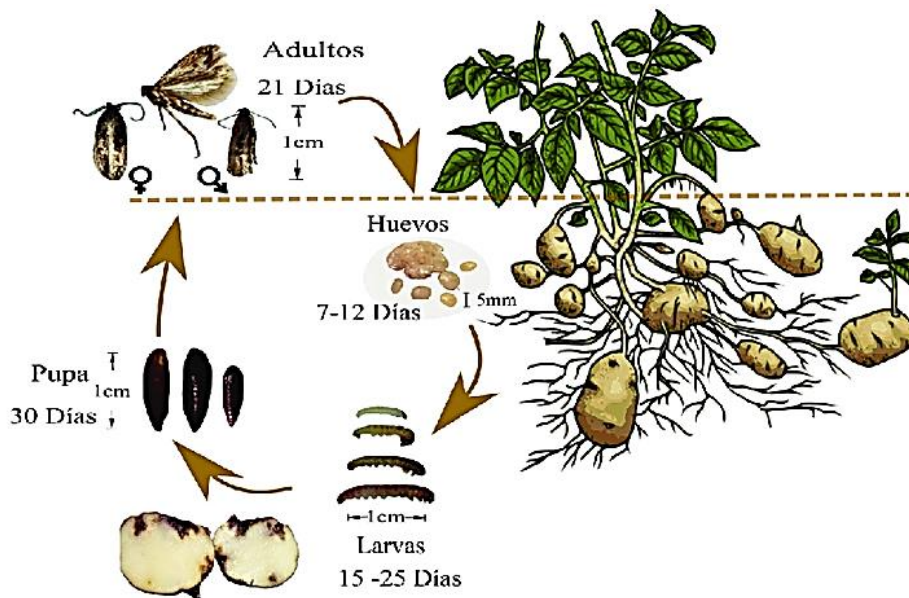


de longitud y la cabeza es marrón oscuro. El segundo estadio dura de cinco a seis días, tiene una longitud de 3,6 mm y una coloración cremosa con puntos café. El tercer estadio dura alrededor de ocho a nueve días, mide entre 3,6 y 15 mm aproximadamente, la larva adopta una de coloración amarillo-verdosa y su escudo protorácico es marrón oscuro. Finalmente, el cuarto estadio dura 6-8 días y alcanza una longitud de 16 mm y la larva adquiere un color azul-verdosa que luego se torna púrpura en el dorso y verde en la parte inferior.

- Pupa: Es obtecta y fusiforme y tiene un tamaño de 7,3-9 mm. Cuando recién se forma, su coloración es verdosa, tornándose color café claro que se va volviendo marrón oscuro con el tiempo. Las pupas que darán hembras suelen medir 8,5 mm mientras que las que darán machos 7,5 mm, sin embargo, depende de las condiciones ambientales y la alimentación.
- Adulto: Son polillas de color café grisáceo que mide aproximadamente 1 cm de largo y de 12 a 15 mm de ancho. A comparación con el macho, la hembra es más grande, con un abdomen más largo y ancho y presenta tres marcas oscuras redondeadas en cada ala anterior, mientras que el macho posee dos. Viven en promedio de 18 a 22 días.

**Figura 2**

*Ciclo de vida de Tecia solanivora*



*Nota.* Tomado de Guerra-Luran & Godoy (2021)

### ***Daños producidos por T. solanivora***

La polilla guatemalteca es considerada como uno de los insectos plaga más importante de la papa a nivel del campo como en el almacenamiento (Rojas-Sandoval, 2023). Los daños son provocados durante el desarrollo larval, ya que se alimenta únicamente del tubérculo, creando galerías externas e internas que pueden destruir a la papa en su totalidad, además que permiten la entrada de microorganismos que provocan pudriciones (Gavara et al., 2023).

### **Mecanismos de control de plagas y *T. solanivora***

El manejo integrado de plagas (MIP) tiene como objetivo la prevención y disminución de poblaciones de plagas mediante la integración de mecanismos de tipo cultural, químico y/o biológico (Dent & Binks, 2020).

## Control cultural

El control cultural consiste en la manipulación del ecosistema para interferir en el desarrollo de la plaga mediante la dispersión de esta, reduciendo la reproducción o la supervivencia (Dent & Binks, 2020), sin embargo, no eliminan la plaga por completo (Gavara et al., 2023). Las técnicas utilizadas en el control cultural son: preparación del suelo mediante el arado, rotación de cultivos, selección de variedades resistentes, control de malezas, elección de fechas de siembra y aporque (Cherlinka, 2022).

La reducción de las poblaciones de *T. solanivora* comienza antes de la siembra mediante el arado profundo del suelo, la selección de la época de siembra evitando los periodos secos y calurosos que propician el agrietamiento del suelo y favorece la puesta de huevos, la selección de las semillas y la siembra a profundidades de 10-15 cm; durante el cultivo, se debe realizar riegos frecuentes y ligeros para evitar las grietas del terreno y el uso de trampas; mientras que en la cosecha debe realizarse una semana después del corte del follaje (Gavara et al., 2023).

## Control químico

El control químico consiste en la aplicación de plaguicidas químicos para la eliminación de plagas o la prevención de su desarrollo (Dent & Binks, 2020). Sin embargo, el empleo excesivo de plaguicidas sintéticos durante varias décadas ha ocasionado problemas en la salud humana, medio ambiente y seguridad alimentaria, provocando un rechazo generalizado hacia el control químico de plagas en la producción agrícola (Viera-Arroyo et al., 2020).

Un método de control químico de *T. solanivora* es el empleo de insecticidas de acción ovicida en el cuello de la planta debido a que la aplicación de fitosanitarios sistémicos en el tubérculo representa un riesgo al consumidor y el uso de insecticidas de contacto se limita puesto que el estado larval se desarrolla dentro de la papa (Gavara et al., 2023).

## **Control biológico**

El control biológico involucra el uso de organismos vivos como hongos, bacterias, nematodos, protozoos y virus o el empleo de sus metabolitos para reducir la densidad poblacional de las plagas y prevenir los daños que causan, presentándose como una alternativa amigable que reemplaza el uso de fitosanitarios que por su abuso, ha generado resistencia en plagas y la presencia de residuos tóxicos y en consecuencia la contaminación al medio ambiente y afecciones a la salud humana (Viera-Arroyo et al., 2020).

### ***Tipos de control biológico***

Según Arrizibita (2019) y Viera-Arroyo et al. (2020), las categorías de control biológico son: i). Clásico, que es la introducción de un enemigo natural para que se establezca de forma permanente y regule a la plaga de manera sostenida en el tiempo, ii). Aumentativo, implica la liberación suplementaria de enemigos naturales mediante descargas iii). Inundativas que consiste en la liberación de muchos individuos, produciendo una reducción rápida del daño de la plaga o incluso una extinción local de la misma o iv). Inoculativas la cual es una liberación periódica, reduciendo el número de individuos por cada evento de liberación, y v). Conservativo que modifica al medioambiente o las prácticas existentes para proteger, aumentar la abundancia y mejorar la actividad de enemigos naturales específicos que ya se encuentran en el área y reduzcan el efecto nocivo de las plagas.

### ***Organismos utilizados en control biológico***

Los organismos usados en el control biológico deben presentar efectividad a bajas concentraciones con un amplio espectro y estabilidad genética, además de ser compatibles con otros productos de uso agrícola (Serrano & Quiñones-Aguilar, 2021), alta especificidad contra el organismo objetivo (Chulze, 2023) y adaptabilidad al medio ambiente (Viera-Arroyo et al., 2020).

Existen una gran variedad de microorganismos como bacterias, virus, hongos, protozoarios y nematodos entomopatógenos (NEPs) potencialmente útiles como agentes de control biológico, entre los más estudiados y con más desarrollo comercial se encuentran *Trichoderma spp.*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis*, *Paecilomyces lilacinus* y *Verticillium lecanii* (Viera-Arroyo et al., 2020).

En el control de *T. solanivora* generalmente se emplea productos comerciales formulados a partir de *Bacillus thuringiensis* y se ha propuesto el uso de *Copidosoma koehleri*, *Trichogramma spp.*, icneumonídeos, baculovirus, nematodos entomopatógenos y ácaros depredadores, dado que los ensayos han mostrado efectividad en la infección de larvas y pupas (Gavara et al., 2023).

### **Nematodos entomopatógenos (NEPs)**

Los nematodos entomopatógenos son organismos que habitan en el suelo de todos los continentes a excepción de la Antártida y son capaces de parasitar insectos plagas es su estado larval o pupal, ya que poseen una relación simbiótica con bacterias de los géneros *Xenorhabdus* y *Photorhabdus*, que ocasionan septicemia al insecto y su muerte entre 24 y 72 h después del ingreso del nematodo en estado infectivo (J3 o IJ) por cavidades naturales del insecto o su cutícula y se establecen en el hemolinfa (Caro-Arias et al., 2021).

Los estudios se han centrado en NEPs de los géneros *Steinernema* y *Heterorhabditis* debido a que son considerados como una de las alternativas con más futuro para el control biológico ya que son muy virulentos, capaces de localizar activamente al hospedero, pueden criarse simple y masivamente de manera *in vitro*, tienen un alto potencial reproductivo, son de fácil aplicación y presentan seguridad tanto para el medio ambiente como para los organismos que no son su objetivo (Caro-Arias et al., 2021).

### **Características de NEPs**

Los nematodos entomopatógenos son gusanos redondos no segmentados de cuerpo blando y son parásitos obligados o facultativos de los insectos (Tofangsazi et al., 2018). Poseen sistemas excretor, nervioso, reproductivo, muscular y digestivo que consta de una boca seguida de la cavidad bucal o estoma, el esófago, el intestino, el recto y el ano; pero carecen de sistemas circulatorio y respiratorio (Singh et al., 2022).

Son de sexo masculino y femenino. El macho suele ser más pequeño que la hembra, con un sistema reproductivo que se abre ventralmente hacia el recto formando una cloaca, dispone de uno o dos testículos y tiene espículas copuladoras; por otro lado, la hembra adulta posee una vulva con uno o dos ovarios ubicada ventralmente y cerca de la mitad del cuerpo y en su útero se puede producir una fecundación interna (Singh et al., 2022).

### **Ciclo de vida de NEPs**

El ciclo de vida de los NEPs consta de una etapa de vida libre y una etapa parasitaria (Sharma et al., 2021). En la forma de vida libre, los NEPs se encuentra en el ambiente en su etapa infectiva, juvenil infectivo (IJ), protegidos por una cutícula externa y con un almacenamiento de lípidos para sobrevivir fuera del huésped (Tarasco et al., 2023). Una vez dentro del insecto, comienza la fase parasitaria, en la cual los IJ pierden su cutícula, se alimentan del cadáver y maduran a juveniles de cuarta etapa (J4) diferenciándose en machos y hembras, comenzando el ciclo reproductivo (Kumar et al., 2022).

La hembra apareada de primera generación (G1) pone los huevos en el huésped o se quedan dentro de ella, de los que eclosionan juveniles de primera etapa (J1) que según la disponibilidad de alimento, mudan a J2 y luego a IJ inmaduros que salen del cadáver y buscan otra fuente de alimento, o si el alimento abunda, los huevos de las hembras (G1) eclosionan a J1 y mudan a J2, J3 y J4 no infectivos que se convierten en adultos de segunda generación

(G2) y comienza un nuevo ciclo produciendo hasta tres generaciones dentro del cadáver (Sharma et al., 2021).

### **Aislamiento, multiplicación y almacenamiento de NEPs**

Los IJ se encuentran en vida libre en el suelo, por lo que el método para aislar NEPs del suelo es mediante la colocación de insectos trampa, como la polilla de la cera (*Galleria mellonella*), en muestras del substrato (Tarasco et al., 2023). Al cabo de dos a tres días, los cadáveres se enjuagan con agua estéril, se colocan en una caja Petri pequeña con papel filtro dentro de una caja Petri más grande con agua (trampa White) y se incuban a 25°C, para después de 10 a 15 días recolectar NEPs en la suspensión de la trampa (Singh et al., 2022).

Otros métodos comunes para la extracción de NEPs son: el embudo de Baermann que consiste en colocar un embudo con una manguera cerrada en un soporte, llenarlo con agua y suspender una bolsa de tela o papel con el suelo, los nemátodos se movilizarán al fondo y serán colectados después de 24 a 48 horas; el tamizado, donde se coloca el suelo en un volumen de agua durante un corto período de reposo para luego verter la suspensión en cribas superpuestas y el suelo retenido en la criba más fina es colectado; y la centrifugación mediante un gradiente de sacarosa, que consiste en mezclar muestras de suelo en una solución de azúcar, centrifugarlas y recuperar los nemátodos por flotación (Abd-Elgawad, 2021).

Una vez aislados, se pueden cultivar *in vivo* e *in vitro*. El método *in vivo* consiste en el uso de insectos del orden Coleoptera, Lepidoptera y Díptera, en su último estadio, e infestarlos con suspensiones de IJ que se encuentran en una placa de Petri con dos papeles de filtro húmedos, donde después de tres a cinco días se recolectan las larvas muertas y se transfieren a trampas White; por otro lado, en el método *in vitro* se usan medios (agar NBTA, agar hígado-riñón y agar lipídico) como fuente de nutrientes para los nematodos y sus bacterias simbiotas (Singh et al., 2022; Tarasco et al., 2023).

Las suspensiones pueden ser almacenadas a una temperatura de 10°C, entre uno a tres meses, en agua destilada con bicarbonato de sodio al 1% para evitar que se peguen entre sí por sus excrementos, o colocarlas en trozos de esponja en una bolsa de plástico herméticamente cerrada (Castillo et al., 2010; Tarasco et al., 2023).

### **Métodos de Identificación de NEPs**

La identificación de nematodos entomopatógenos se realiza de manera complementaria mediante el análisis de imágenes microscópicas y métodos moleculares (Bogale et al., 2020).

### **Método morfológico**

La identificación de NEPs se puede realizar mediante el análisis de caracteres morfológicos y morfométricos que dependen de claves taxonómicas, observadas mediante microscopio de luz, microscopio compuesto o con microscopios electrónicos de barrido (SEM) (Singh et al., 2022), sin embargo, la metodología es efectiva solo para los nematodos que presentan diferencias morfológicas y se requiere de personal capacitado para identificarlas, además que los caracteres pueden verse alterados por factores ambientales (Sharma et al., 2021).

Los parámetros importantes para la identificación morfológica y morfométrica de NEPs incluyen: forma de la cutícula, forma de la región anterior y caudal, presencia o ausencia de campos laterales, longitud del cuerpo (L), ancho del cuerpo (A), distancia desde el extremo anterior al poro excreto (PE), distancia desde el extremo anterior al anillo nervioso (AN), longitud del esófago (ES), longitud de la cola (LC), longitud de la espícula (LE), longitud del gubernáculo (LG), anchura de la cola al nivel del ano (ACA); y los índices: a (L/A), b (L/ES), c (PE/ES), D% (PE/ES x 100), E% (PE/C x 100), GS (LG/LE), SW (LE/ACA) y mucrón (MUC) (Půža et al., 2020; Singh et al., 2022; Trinh et al., 2021).



## **Método molecular**

Los enfoques moleculares se utilizan para la identificación de especies estrechamente relacionadas ya que la caracterización morfológica resulta insuficiente (Tarasco et al., 2023). Entre los métodos moleculares para identificación de NEPs se encuentran: técnicas inmunológicas, patrones de isoenzimas, patrones de proteínas totales, detección de fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLP) dentro del ADN genómico total, amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD), detección de polimorfismos amplificados de secuencias relacionadas (SRAP) y técnicas moleculares basadas en PCR, que permiten el análisis de genes, marcadores de ADN y la evaluación de la diversidad genética (Sharma et al., 2021).

Las regiones utilizadas para la identificación de NEPs son: el ADN nuclear, ribosómico y mitocondrial (Tarasco et al., 2023). El ADN ribosomal (ADNr) contiene tres regiones codificantes conservadas, la subunidad pequeña (SSU) o 18S rRNA, 5.8S y la subunidad grande (LSU) o 28S, y regiones variables no codificantes como el espaciador transcrito interno (ITS; ITS1 e ITS2), el espaciador intergénico (IGS) y el espaciador transcrito externo (ETS), que permiten la identificación de nuevas especies y reconstruir la relación filogenética entre organismos (Bogale et al., 2020).

### Capítulo III: Materiales y Métodos

#### Participantes

El presente estudio fue desarrollado por Sylvana Carolaine Arias Armijos, bajo el respaldo del Ing. Francisco Flores Ph. D., docente de la Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE y director de tesis, y del Ing. Pablo Llumiyinga, Investigador responsable del área de Nematología del Departamento Nacional de Protección Vegetal (DNPV) de la Estación Experimental Santa Catalina (EESC) –INIAP y cotutor del proyecto de titulación.

#### Zona de estudio

El aislamiento de NEPs se realizó en los laboratorios de Nematología del DNPV-EESC a partir de la colección de muestras de suelo de sectores paperos del centro del país, provenientes de las localidades descritas en la Tabla 2. Por otro lado, los ensayos moleculares tuvieron lugar en el Departamento Nacional de Biotecnología (DNB) de la EESC-INIAP.

#### Tabla 2

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

<b>Muestra</b>	<b>Provincia</b>	<b>Cantón</b>	<b>Parroquia</b>	<b>Localidad</b>
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

<b>Muestra</b>	<b>Provincia</b>	<b>Cantón</b>	<b>Parroquia</b>	<b>Localidad</b>
Tg11	Tungurahua	Píllaro	Santiago de Píllaro	La Quinta
Puy14	Tungurahua	Baños de Agua Santa	Río Verde	El Puyal

### **Materiales, Equipos y Reactivos**

Para la implementación del ensayo se utilizaron los materiales, reactivos y equipos que se mencionan a continuación:

#### **Materiales**

- Muestras de suelo
- Tarrinas plásticas
- Cajas Petri de 55 x 8 mm y 94 x 16 mm
- Papel filtro whatman N°1
- Guantes de nitrilo
- Tubos PCR
- Bisturí N°11
- Hojas de bisturí N°3
- Portaobjetos
- Puntas de micropipeta
- Mechero
- Alcohol potable y antiséptico
- Pestaña
- Matraz de Erlenmeyer

- Vaso de precipitación
- Agitador magnético
- Contador análogo
- Cría de *Galleria mellonella*
- Cría de *Tecia solanivora*
- Marcador indeleble
- Pissetas

### **Equipos**

- Incubadora
- Micropipetas
- Burbujeador
- Estereomicroscopio
- Vórtex
- Microcentrífuga
- Cámara de flujo laminar
- Fotodocumentador Labnet ENDURO GDS Touch, Modelo GDST-1302
- Cámara de electroforesis horizontal
- Fuente de poder
- Termociclador
- Plancha de calentamiento con agitación magnética
- Espectrofotómetro Epoch (Biotek Instruments)

### **Reactivos**

- Agua destilada autoclavada
- Agua ultrapura

- Colorless GoTaq® Flexi Reaction Buffer
- Buffer TAE 1X
- SafeView™ Classic
- Green GoTaq™ Flexi Buffer
- GoTaq® Flexi DNA Polymerase
- Proteinasa K (600U/mL)
- MgCl<sub>2</sub>
- dNTPs
- Marcadores universales (D2A, D3B, 18S, 26S)
- Agarosa grado analítico
- GoTaq® Green Master Mix

## **Metodología**

### **Factores en estudio**

Los factores del presente estudio se establecieron bajo condiciones de laboratorio.

#### *Factor A: Aislamientos de NEPs*

Se evaluaron ocho aislamientos de NEPs obtenidos a partir de suelos de cultivos de papa, como se muestra a continuación:

A1: Aislamiento de Cotopaxi, San Pedro (CT3)

A2: Aislamiento de Cotopaxi, San Antonio de Toacaso (CT10)

A3: Aislamiento de Cotopaxi, Cuicuno Sur (CT13)

A4: Aislamiento de Cotopaxi, Isinche (CT15)

A5: Aislamiento de Cotopaxi, Santo Domingo (CT23)

A6: Aislamiento de Pichincha, Anita Lucia (Mch15)

A7: Aislamiento de Tungurahua, La Quinta (Tg11)

A8: Tungurahua, El Puyal (Puy14)

*Factor B: Número de NEPs*

Se evaluó dos concentraciones para cada aislamiento, como se muestra a continuación:

C1: 50 juveniles infectivos (IJ)

C2: 100 juveniles infectivos (IJ)

### **Tratamientos**

Para la evaluación de la mortalidad de *T. solanivora*, los tratamientos resultaron de la interacción de los factores en estudio, además de la evaluación del organismo control, como se visualizan en la Tabla 6.

### **Tabla 3**

*Tratamientos utilizados para evaluar la mortalidad de Tecia solanivora ante la aplicación de NEPs*

<b>Código</b>	<b>Tratamiento</b>
A1C1	50 IJ de CT3
A2C1	50 IJ de CT10
A3C1	50 IJ de CT13
A4C1	50 IJ de CT15
A5C1	50 IJ de CT23
A6C1	50 IJ de Mch15
A7C1	50 IJ de Tg11

<b>Código</b>	<b>Tratamiento</b>
A8C1	50 IJ de Puy14
A1C2	100 IJ de CT3
A2C2	100 IJ de CT10
A3C2	100 IJ de CT13
A4C2	100 IJ de CT15
A5C2	100 IJ de CT23
A6C2	100 IJ de Mch15
A7C2	100 IJ de Tg11
A8C2	100 IJ de Puy14
C <sub>0</sub>	Testigo sin nematodos

### Unidad experimental

La unidad experimental del estudio fue una larva de *T. solanivora* más 250  $\mu$ L de agua destilada con diferentes concentraciones de NEPs más papel filtro, colocados en un orificio de 3,6 cm de diámetro:

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

En la Figura 3 se presenta el esquema del experimento.

Figura 3

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 <sub>0</sub>	CT15 100 IJ	Tg11 50 IJ	Mch15 100 IJ	CT15 100 IJ	CT13 100 IJ	PuyP14 100 IJ	CT23 50 IJ	C <sub>0</sub>
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 <sub>0</sub>	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 <sub>0</sub>	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 <sub>0</sub>	C <sub>0</sub>
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 <sub>0</sub>	CT10 50 IJ	C <sub>0</sub>	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

### Diseño experimental

Los tratamientos se dispusieron en un diseño factorial 2x8 + 1 completamente al azar (DCA) con ocho observaciones.

### Análisis estadístico

El modelo estadístico para el ensayo se muestra en la ecuación 1

$$y_{ij} = \mu + \tau_i + \beta_j + (\tau\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk} \quad (\text{Ec. 1})$$

donde:

$\mu$ : media;  $\tau$ : Efecto de los aislamientos;  $\beta$ : Efecto de la cantidad de NEPs aplicados;  $i= 1, 2, \dots, 8$ ;  $j= 1, 2$ ;  $k= 1, 2, \dots, 16$

### Análisis funcional

Se utilizó el programa informático R 4.3.2 (Posit, 2023) para realizar los análisis estadísticos del estudio. Se comprobó los supuestos del ANOVA mediante los supuestos de



Kolmogorov-Smirnov al 5% para la normalidad y la prueba de Levene al 5% para homocedasticidad. Para determinar si existió patogenicidad de los NEPs se utilizó la prueba ANOVA.

### **Variables y métodos de evaluación**

- **Porcentaje de mortalidad de *T. solanivora* a NEPs.** Se realizó dos concentraciones: 50 o 100 IJ con los aislamientos obtenidos, se colocó en un pocillo de 3,6 cm con papel filtro junto a una larva de *T. solanivora*, se tapó e incubó a 20 °C y se evaluó durante 24, 48, 72 y 96 h.

### **Manejo específico del experimento**

El estudio tuvo tres componentes principales que permitieron la identificación molecular y la evaluación de patogenicidad de los aislamientos de NEPs presentes en el suelo de cultivos de sectores paperos del centro del país.

### ***Identificación molecular***

#### **Aislamiento de NEPs del suelo**

El aislamiento de NEPs del suelo se realizó mediante la metodología propuesta por Bedding & Akhurst (1975) con modificaciones. En las tarrinas con muestras de suelo, se colocaron cinco larvas de *G. mellonella* en la superficie, se humedeció el suelo con agua destilada, se tapó y volteó el recipiente.

Después de una semana, se retiraron las larvas muertas con signos de infección por NEPs, se enjuagaron con agua estéril y se colocaron en una trampa White (Kaya & Stock, 1997) que consiste en colocar los cadáveres de *G. mellonella* sobre un trozo de papel filtro situado en la tapa de una caja Petri de 55 x 8 mm dentro de una placa de Petri de 94 x 16 mm

con 20 mL de agua destilada estéril. Finalmente, las trampas se llevaron a incubación a 15°C por una semana.

### **Extracción de ADN**

La extracción se realizó siguiendo el método propuesto por Subbotin et al. (2000) con modificaciones. Utilizando una pestaña, se capturó un IJ de los aislamientos y se colocó en un portaobjeto que contenía 20 µL de agua ultrapura para posteriormente cortarlo con un bisturí en tres secciones. Se transfirieron 10 µL del agua que contenían los cortes a un tubo PCR, al que se agregaron 18 µL de Mix de extracción (10 µL de agua ultrapura + 8 µL de buffer de extracción), junto con 2 µL de proteinasa K y se llevó al vórtex. Los tubos se incubaron a 65°C por una hora, seguido por 95°C por 10 min. Finalmente se almacenaron a -20°C hasta su utilización.

### **Cuantificación de ADN**

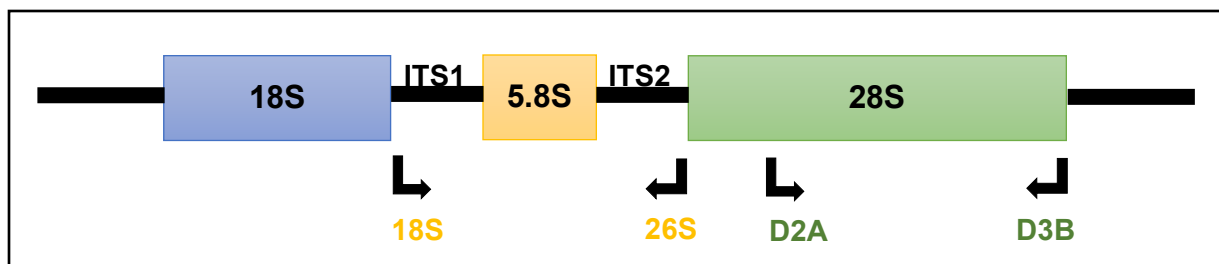
La cuantificación se llevó a cabo en el espectrofotómetro, donde se colocó 2µL de agua libre de nucleasas como blanco y 2 uL de cada muestra. Las lecturas se realizaron con el software Gen5 (BioTek, 2005) a longitudes de onda de 260 y 280 nm para determinar la pureza y la concentración en ng/µL del ADN extraído.

### **Amplificación de regiones ribosomales mediante PCR**

La amplificación de las regiones del ADNr nuclear 28S (segmento de expansión D2/D3) e ITS (ITS1-5.8S-ITS2) se realizó con dos pares de marcadores universales: D2A-D3B y 18S-26S, respectivamente.

**Figura 4**

*Regiones del ADNr amplificadas y sus marcadores*



La región D2/D3 se amplificó mediante el protocolo de Subbotin et al. (2005) con modificaciones. Se utilizó los marcadores universales forward D2A (5'ACAAGTACCGTGAGGGAAAGTTG-3') y reverse D3B (5'-TCGGAAGGAACCAGCTACTA-3'). El volumen final de la reacción fue de 25  $\mu$ L incluidos 1,25  $\mu$ L de ADN, cuyos componentes se describen en la Tabla 4.

**Tabla 4**

*Componentes y concentraciones para amplificación de región D2D3*

Componentes	Concentración final
Buffer	1X
MgCl <sub>2</sub>	2 mM
dNTPs	0,25 mM
Marcador D2A	0,6 $\mu$ M
Marcador D3B	0,6 $\mu$ M
Taq polimerasa	1,5 U

Las condiciones para la amplificación de la región D2D3 se muestran en la Tabla 5.

**Tabla 5***Condiciones para amplificación de región D2D3*

<b>Fase</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Ciclos</b>
Desnaturalización inicial	94	3 min	1
Desnaturalización	94	1 min	
Hibridación	55	30 s	30
Extensión	72	2 min	
Extensión final	72	7 min	1

*Nota.* Adaptado de Subbotin et al., 2005.

La amplificación de la región ITS se realizó mediante el protocolo de Lulamba & Serepa-Dlamini (2020), utilizando los marcadores universales forward 18S (5'-TTGATTACGTCCCTGCCCTTT-3') y reverse 26S (5'-TTTCACTCGCCGTTACTAAGG-3'). La reacción se llevó a cabo a un volumen final de 25  $\mu$ L cuyos componentes están detallados en la Tabla 6. El volumen de ADN colocado fue de 4  $\mu$ L.

**Tabla 6***Componentes y concentraciones para amplificación de región ITS*

<b>Componentes</b>	<b>Concentración final</b>
Master Mix PCR	1X
Marcador 18S	1,2 $\mu$ M
Marcador 26S	1,2 $\mu$ M

Las condiciones para la amplificación de la región ITS se muestran en la Tabla 7.

**Tabla 7***Condiciones para amplificación de región ITS*

<b>Fase</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Ciclos</b>
Desnaturalización inicial	94	4 min	1
Desnaturalización	94	1 min	
Hibridación	55	30 s	35
Extensión	72	2 min	
Extensión final	72	10 min	1

*Nota.* Adaptado de Lulamba & Serepa-Dlamini, 2020.

### **Visualización de productos de amplificación**

Los productos de la amplificación se analizaron mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1,5%. En la cámara de electroforesis se colocó buffer de corrida y en cada pocillo del gel se cargó 5 µL de cada una de las muestras. Finalmente, se corrió el gel por 40 minutos a 100 v y se visualizó las bandas en un fotodocumentador, con el programa Enduro (Labnet, 2020).

### **Secuenciación**

La secuenciación se realizó mediante método Sanger. Los resultados se visualizaron utilizando el software Chromas (Technelysium, 1996), las secuencias se alinearon en el software BioEdit (Informer Technologies, 2023) y se compararon con las secuencias de la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) mediante Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) para identificar la especie de la secuencia obtenida mediante el porcentaje de cobertura e identidad más alto (UnADM, 2020).

***Pruebas de patogenicidad in vitro***

En un pocillo de 306 mm de diámetro, se colocó un trozo de papel de filtro y se inocularon dos concentraciones por cada aislamiento: 50 y 100 IJ en 250  $\mu$ L de agua estéril. En los controles solo se colocó agua estéril. Por último, se puso una larva de *T. solanivora* de cuarto estadio, luego se tapó y se incubó a 20°C. La mortalidad de las larvas se registró cada 24 h hasta las 96 h.

## Capítulo IV: Resultados y Discusión

### Aislamiento de NEPs del suelo

Las larvas de *Galleria mellonella* presentaron hinchamiento y coloraciones café oscuro y anaranjado a la semana de su colocación en las muestras de suelo (Figura 5). Poinar (1979) menciona que los organismos infectados por NEPs presentan cambio de coloración que va desde los ocre, marrones, negros e incluso verdes y los cadáveres presentan hinchamiento, resultados que según Pérez Campos et al. (2019) se observan después de los dos a los siete días realizado el ensayo, características observadas en la investigación.

Campos-Herrera et al. (2020) mencionan que la emergencia de los nemátodos se da desde los siete a los 15 días después de haber colocado las larvas en un plato de cosecha, tiempo que se valida en el ensayo, ya que se logró la recuperación los NEPs de la suspensión una semana después de haber colocado los cadáveres de *G. mellonella* en las trampas White. Además se verificó su presencia en el líquido mediante un estereoscopio debido a su tamaño microscópico, como lo señala Singh et al. (2022) y se evidencia en la Figura 6.

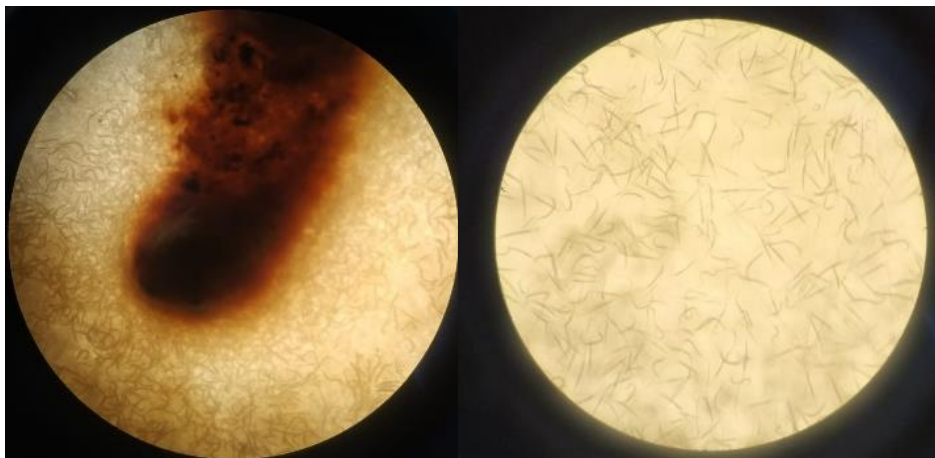
### Figura 5

*Trampa White con larvas de Galleria mellonella infectadas por NEPs*



## Figura 6

*Nematodos entomopatógenos recuperados en trampa White*



*Nota.* Fotografías tomadas bajo estereoscopio

### Identificación molecular de NEPs

Las metodologías aplicadas permitieron la extracción de ADN, la amplificación del segmento D2D3 y de la región ITS y la identificación de las especies mediante la secuenciación de los aislamientos.

### Extracción de ADN

La extracción de ADN aplicando la metodología mencionada por Subbotin et al. (2000) dio como resultado valores entre 18,688 y 88,238 ng/ $\mu$ L de concentración y 0,558 a 0,674 de pureza (Tabla 8). El Departamento de control de calidad del Banco Nacional de ADN (2020) menciona que un valor menor a 1,6 en la relación A260/280, indica que el ADN no tiene una pureza óptima debido a una posible contaminación por compuestos aromáticos como fenoles y proteínas.

Los valores obtenidos indicaron una baja calidad de los ADN extraídos debido a la extracción directa sin pasos de purificación o a posibles residuos de la proteinasa K (Solano et



al., 2009), sin embargo, esto no influyó en la amplificación ya que en la integridad del ADN se mostró una sola banda por cada muestra.

**Tabla 8**

*Valores obtenidos de la cuantificación de ADN extraído de un NEP por aislamiento*

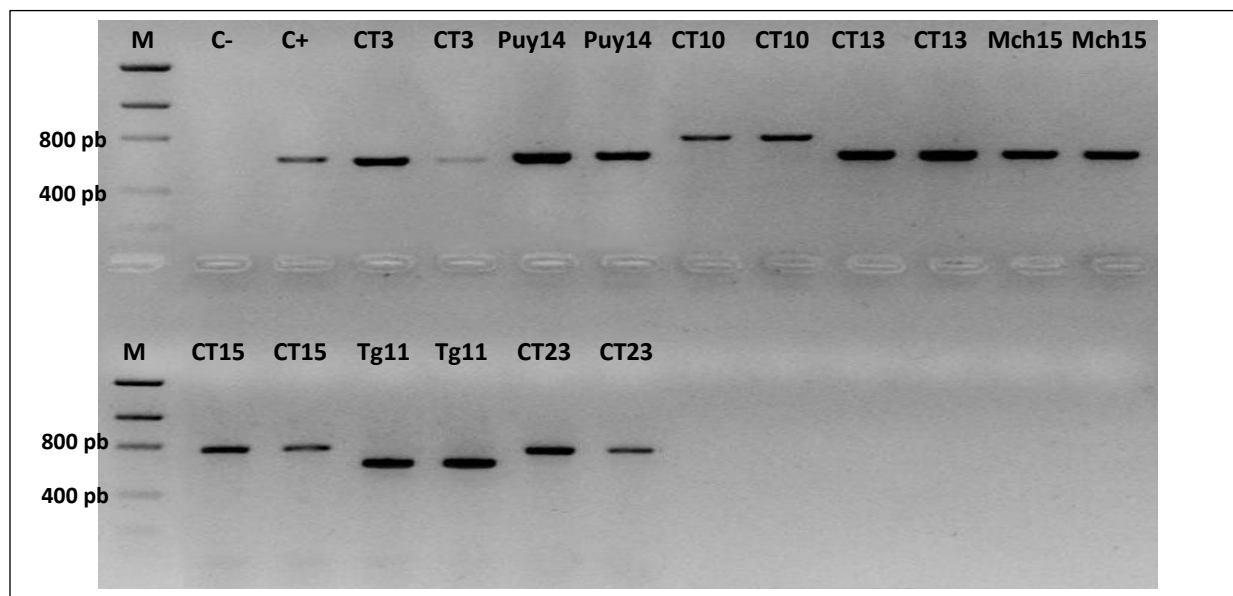
<b>Muestra</b>	<b>260/280</b>	<b>ng/μL</b>
CT3	0,603	18,688
Puy14	0,558	28,386
CT10	0,561	35,612
CT13	0,674	58,234
Mch15	0,56	44,016
CT23	0,634	71,392
CT15	0,575	53,527
Tg11	0,64	88,238

### **Amplificación de ADN**

Los productos PCR de la región D2D3 obtenidos con los marcadores D2A (forward) y D3B (reverse) mostraron bandas de 600 pb para los aislamientos CT3, Puy14, CT13, Mch15 y Tg11 y amplicones de 800 pb para los aislamientos CT10, CT15 y CT23, como se ilustra en la Figura 7. Los resultados fueron similares a los fragmentos de 800 pb obtenidos por de Horta et al. (2021), las bandas de 590 pb reportadas por de Brida et al. (2017), y los amplicones de 614 pb descritos por Lulamba & Serepa-Dlamini (2020), quienes identificaron NEPs de suelos agrícolas mediante el uso de los mismos marcadores en la amplificación de la región D2/D3.

## Figura 7

*Amplificación de la región D2D3 con marcadores universales D2A/D3B*

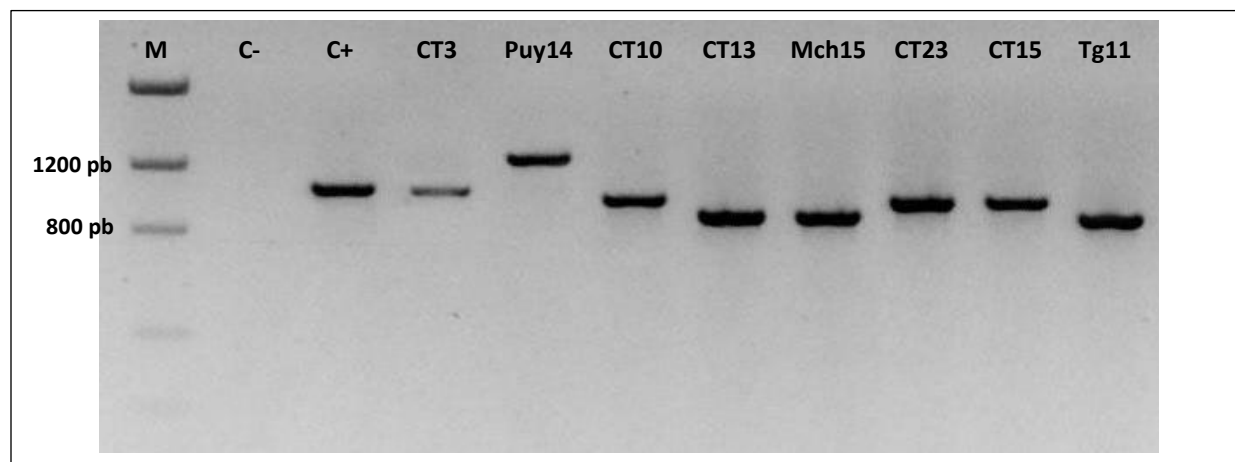


*Nota.* M: Marcador de bajo peso molecular (Invitrogen Low DNA Mass Ladder), C-: Control negativo (sin NEP), C+: Control positivo (NEP)

En la Figura 8 se muestra la amplificación de la región ITS con los marcadores 18S (forward) y 26S (reverse) que resultó en bandas de aproximadamente 900 pb en los aislamientos CT13, Mch15 y Tg11; 1000 pb en CT10, CT23 y CT15; 1050 pb en CT3; y 1250 pb en Puy14. Los valores entre 900 y 1050 pb obtenidos en los aislamientos CT13, Mch15, Tg11, CT10, CT23, CT15 y CT3 fueron similares a los amplicones de 900-1000 pb obtenidos por Bhat et al. (2021), mientras que la banda obtenida en el aislamiento Puy14 fue similar a los fragmentos de  $\approx$  1500 pb reportados por Vrain et al. (1992), en la amplificación de la región ITS de NEPs aislados de campos agrícolas, al emplear los marcadores mencionados.

**Figura 8**

*Amplificación de la región ITS con marcadores universales 18S/26S*



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

**Secuenciación**

En la Tabla 7 se señala la especie identificada, cobertura, identidad y número de accesión de cada aislamiento, datos obtenidos mediante las secuencias consenso alineadas y analizadas en BLAST.

Tabla 9

Identificación molecular de cada aislamiento

Aislamiento	Región D2D3				Región ITS			
	Especie identificada	Cobertura (%)	Identidad (%)	Número de accesión	Especie identificada	Cobertura (%)	Identidad (%)	Número de accesión
CT3	<i>Cruznama</i> sp.	100	99,70	MN108239.1	<i>Cruznama</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>Cruznama</i> sp.	98	99,83	MN108239.1	<i>Cruznama</i> sp.	98	99,49	OR606776.1
Mch15	<i>Cruznama</i> sp.	98	99,47	MN108239.1	<i>Cruznama</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 bodenheimeiri</i>	99	100	DQ145625.1	<i>Acrobeloides bodenheimeri</i>	99	98,58	MW667574.1
Tg11	<i>Cruznama</i> sp.	99	100	MN108239.1	<i>Cruznama</i> sp.	98	99,54	OR606776.1

Los porcentajes de cobertura e identidad en las dos regiones amplificadas fueron entre el 98 y 100 %, valores que según Bae et al. (2010) son confiables para asegurar que se identificó a: *Cruznema* sp. (MN108239.1 y OR606776.1) en los suelos de las provincias de Cotopaxi, Pichincha y Tungurahua, *Acrobeloides bodenheimeri* (DQ145625.1 y MW667574.1) en San Antonio de Toacaso e Isinche, localidades de la provincia de Cotopaxi, *Oscheius myriophilus* (MN389728.1 y MG742125.1) en los suelos de El Puyal, Tungurahua y *Pristionchus maupasi* (KT188863.1 y MG551682.1) en Santo Domingo, provincia de Cotopaxi (Tabla 9).

El segmento de expansión D2D3 de la región 28S y la región ITS del ADNr son variables por lo que se las utiliza para determinar la variabilidad interespecífica e intraespecífica dentro de las especies (Tarasco et al., 2023). Dicho enfoque además de permitir la identificación de distintos individuos, determinó la variabilidad genética en los aislamientos que se determinaron con la misma especie, ya que presentaron diferencias en los porcentajes de identidad y en los tamaños de bandas, como se ilustra en la Figura 8 y Tabla 9.

Los NEPs se distribuyen alrededor de todo el mundo (Hominick, 2002), lo que explica la variedad de especies halladas en las muestras de suelo. Además, el autor mencionan que algunas especies se encuentran en ambientes particulares, lo cual se evidencia en la identificación de NEPs en áreas específicas, mientras que, *Acrobeloides bodenheimeri* y *Cruznema* sp. se encontraron en varias localidades debido a que son de los grupos de nematodos más abundantes y ampliamente distribuidos en diversos ambientes terrestres, según señalan Ferris (2023) y Kim et al. (2021).

### **Pruebas de patogenicidad *in vitro***

La aplicación de los aislamientos sobre larvas de *T. solanivora*, en un ambiente controlado, provocó la muerte de los insectos desde las 24 h, lo que indica la patogenicidad de los aislamientos hacia la plaga, asimismo las pruebas estadísticas demostraron que no existen

diferencias significativas entre los tratamientos a lo largo del tiempo, como se muestra en la Tabla 10.

**Tabla 10**

*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	p	MS	p	MS	p	MS	p
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	

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

Los aislamientos CT10 (100 IJ), Mch15 (50 y 100 IJ) y CT15 (50 y 100 IJ) registraron mortalidades desde las 24 h, mientras que en el resto de tratamientos se observó la mortalidad de las larvas desde las 48 h (Figura 9). Los resultados corroboraron lo mencionado por Caro-Arias et al. (2021) quienes indican que los NEPs ocasionan la muerte del insecto entre 24 a las 72 h.

La mayor mortalidad entre los tratamientos fue de CT15 (50 IJ) correspondiente a *Acrobelloides bodenheimeri* y Mch15 (100 IJ), identificado como *Cruznama* sp., aislamientos que presentaron el 87,5% de larvas muertas (Figura 9). Datos similares fueron obtenidos por Camino et al., (2005) quienes reportaron una mortalidad del 80% de ninfas de grillos a las 60 h debido a *Cruznama lincolnensis*,, asimismo del estudio realizado por Loulou et al. (2023) que

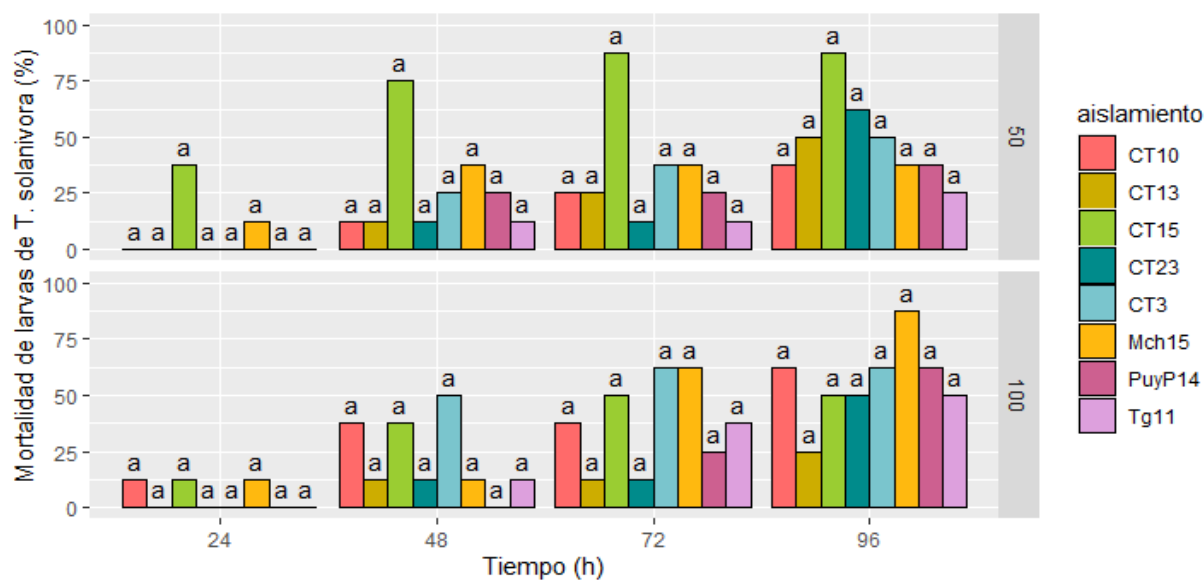
comprobaron la patogenicidad de *Acroboloides bodenheimeri* hacia larvas de *G. mellonella* al obtener un 90% de mortalidad a las 96 h.

Sin embargo, los aislamientos que se identificaron con la misma especie no tuvieron los mismos resultados debido a la variabilidad intraespecífica y a las condiciones ambientales y composición del suelo de donde fueron aislados, factor que según Glazer (2002) influyen en la capacidad de virulencia del nemátodo.

De igual manera, la Figura 9 evidencia que al duplicar la cantidad de IJ, existe un mayor porcentaje de mortalidad de las larvas, sin embargo, en el aislamiento CT15 hay una mayor mortalidad en la concentración de 50 IJ, esto sugiere que a altas concentraciones de este aislamiento surge una competitividad intraespecífica por la necesidad común del recurso limitado (Márquez, 2021).

**Figura 9**

*Mortalidad de Tecia solanivora por dos concentraciones de los aislamientos de NEPs*



*Nota.* Datos con la misma letra no difieren significativamente

## Capítulo V: 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 entomopatogénico 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 *Cruzanema* sp. en las muestras de suelos de las provincias de Cotopaxi, Pichincha y Tungurahua, *Oscheius myriophilus* en Tungurahua, *Acroboloides bodenheimeri* en dos localidades de la provincia de Cotopaxi y *Pristionchus maupasi* en Cotopaxi.

Las mortalidades de las larvas de *T. solanivora* mediante la inoculación de los nematodos identificados fueron variables en el ensayo, siendo el aislamiento CT15, *Acroboloides 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.



## Capítulo VI: Recomendaciones

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 ( $DL_{50}$ ) 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.

## Capítulo VII: Referencias

- Abd-Elgawad, M. M. M. (2021). Optimizing Sampling and Extraction Methods for Plant-Parasitic and Entomopathogenic Nematodes. *Plants (Basel)*, 10(4), 629.  
<https://doi.org/10.3390/plants10040629>
- Agro Bayer. (2022). *Solución para papa*. <https://www.agro.bayer.ec/es-es/cultivos/papa.html#:~:text=La papa es uno de,la alimentación de cada familia>.
- Arcos, J. H., Mamani, H., Barreda, W. L., & Holguin, V. (2020). *Manual técnico: Manejo integrado del cultivo de papa*.  
[https://repositorio.inia.gob.pe/bitstream/20.500.12955/1146/1/MANUAL TÉCNICO - MANEJO INTEGRADO DEL CULTIVO DE PAPA.pdf](https://repositorio.inia.gob.pe/bitstream/20.500.12955/1146/1/MANUAL_TÉCNICO_-_MANEJO_INTEGRADO_DEL_CULTIVO_DE_PAPA.pdf)
- Argotti, E., Gallegos, P., Alcazar, J., & Kaya, H. (2010). Patogenicidad de nemátodos entomopatógenos del género *Steinernema* y *Heterorhabditis* sobre larvas de *Tecia solanivora* en Ecuador. *Boletín Técnico, Serie Zoológica*, 9(6), 162–172.
- Argotti, E., Nuñez, M., Hernandez, C., Gallegos, P., & Cazar, M. (2022). Nematodos entomopatógenos del género *Steinernema* y *Heterorhabditis* para el control biológico de gusano blanco (*Premnotrypes vorax*, Hustache) en cultivos de papa (*Solanum tuberosum* L.) en Ecuador. *Boletín Técnico, Serie Zoológica*, 17, 15–29.  
<https://journal.espe.edu.ec/ojs/index.php/revista-serie-zoologica/article/view/2730>
- Arrizibita, U. (2019). *Control biológico, alternativa ecológica para la gestión de plagas*. Geoinnova. <https://geoinnova.org/blog-territorio/control-biologico-alternativa-ecologica-para-la-gestion-de-plagas/>
- Asaquibay, C., Gallegos, P., & Castillo, C. (2011). *Multiplicación de nematodos entomopatógenos a nivel de finca de agricultores*.

- Bae, C. H., Robbins, R. T., & Szalanski, A. (2010). Secondary structure models of D2-D3 expansion segments of 28S rRNA for Hoplolaiminae species. *Journal of Nematology*, 42(3), 218–229. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3380487/>
- Banco Mundial. (2023). *Agricultura, valor agregado (% PBI) - Ecuador*. <https://datos.bancomundial.org/indicador/NV.AGR.TOTL.ZS?locations=EC>
- Basantes, T., Aragón, J., Albuja, L., & Vázquez, L. (2020). Diagnóstico de los costos, rendimientos de producción y comercialización de papa (*Solanum tuberosum* L.) en la Zona 1 del Ecuador, año 2019. *Revista E-Agronegocios*, 6(2), 103–120. <https://doi.org/https://doi.org/10.18845/ea.v6i2.5103>
- Bedding, R., & Akhurst, R. (1975). A simple technique for the detection of insect parasitic rhabditid nematodes in soil. *Nematologica*, 21(1), 109–110. <https://doi.org/10.1163/187529275X00419>
- Bhat, A. H., Gautum, S., Rana, A., Chaubey, A. K., Abolafia, J., & Půža, V. (2021). Morphological, Morphometrical and Molecular Characterization of *Oscheius siddiqii* Tabassum and Shahina, 2010 (Rhabditida, Rhabditidae) from India with Its Taxonomic Consequences for the Subgenus *Oscheius* Andrásy, 1976. *Biology*, 10(12), 1239. <https://doi.org/10.3390/biology10121239>
- BioTek. (2005). *BioTek Gen5 Software for Imaging & Microscopy*. <https://www.biotek.com/products/software/gen5-microplate-reader-and-imager-software/>
- Bogale, M., Baniya, A., & DiGennaro, P. (2020). Nematode Identification Techniques and Recent Advances. *Plants (Basel)*, 9(10), 1260. <https://doi.org/10.3390/plants9101260>
- Bula, A. (2020). *Puente Académico - Importancia de la Agricultura en el Desarrollo socio-económico*. <https://observatorio.unr.edu.ar/wp-content/uploads/2020/08/Importancia-de-la->

agricultura-en-el-desarrollo-socio-economico.pdf

- Çalışkan, M. E., Yousaf, M. F., Yavuz, C., Zia, M. A. B., & Çalışkan, S. (2022). History, production, current trends, and future prospects. In M. E. Çalışkan, A. Bakhsh, & K. Jabran (Eds.), *Potato Production Worldwide* (pp. 1–18). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822925-5.00016-5>
- Camino, N., Achinelly, M., & Reboredo, G. (2005). Ninfas de grillos (Orthoptera, Gryllidae) parasitadas por nemátodos en la Provincia de Buenos Aires, Argentina. *VI Congreso Argentino de Entomología*. [https://www.conicet.gov.ar/new\\_scp/detalle.php?keywords=&id=20683&congresos=yes&detalles=yes&congr\\_id=6102451](https://www.conicet.gov.ar/new_scp/detalle.php?keywords=&id=20683&congresos=yes&detalles=yes&congr_id=6102451)
- Campos-Herrera, R., Blanco-Pérez, R., & Vicente Díez, I. (2020). Nematodos entomopatógenos en el control biológico de ácaros e insectos. *Revista Técnica de La Consejería de Agricultura, Ganadería, Mundo Rural, Territorio y Población*, 63, 34–39.
- Caro-Arias, A. X., Yépez-Bolaños, D. A., & Soto-Giraldo, A. (2021). Premnotypes vorax Hustache (Coleoptera: Curculionidae) y su control con nematodos entomopatógenos nativos. *Boletín Científico. Centro de Museos. Museo de Historia Natural*, 25(2), 33–42. [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0123-30682021000200033](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-30682021000200033)
- Castillo, C., & Cuesta, X. (2021). La Producción de Papa en Ecuador se Encuentra Amenazada por un Problema Fitosanitario. *Batata Show*, 59, 14–21. [https://www.abbabatatabrasileira.com.br/materias-das-revistas/la-produccion-de-papa-en-ecuador-se-encuentra-amenazada-por-un-problema-fitosanitario/#:~:text=En cuanto a plagas%2C las,hoja \(Liriomyza huidobrensis\) y pulguilla](https://www.abbabatatabrasileira.com.br/materias-das-revistas/la-produccion-de-papa-en-ecuador-se-encuentra-amenazada-por-un-problema-fitosanitario/#:~:text=En cuanto a plagas%2C las,hoja (Liriomyza huidobrensis) y pulguilla)
- Castillo, C., Gallegos, P., Asaquibay, C., & Oña, M. (2010). *Guía de prospección y multiplicación de nematodos entomopatógenos para el control biológico de plagas en*

*Ecuador* (Manual Técnico No. 88.).

Cherlinka, V. (2022). *Manejo Integrado De Plagas: Estrategias Para Su Uso*. EOS Data Analytics. <https://eos.com/es/blog/manejo-integrado-de-plagas/>

Chulze, S. N. (2023). Agentes de control biológico de origen microbiano para reducir el impacto de hongos patógenos y toxicogénicos. *Revista Argentina de Microbiología*, 55(1), 1–2. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2023.02.001>

CIP. (2022). *Wild Relatives of Potato*. Genebank. <https://cipotato.org/genebankcip/potato-wild/>

de Brida, A. L., Rosa, J. M., Oliveira, C. M., Castro, B. M., Serrão, J. E., Zanuncio, J. C., Leite, L. G., & Wilcken, S. R. S. (2017). Entomopathogenic nematodes in agricultural areas in Brazil. *Scientific Reports*, 7(45254). <https://doi.org/10.1038/srep45254>

Dent, D., & Binks, R. (2020). Cultural and Interference Methods. In *Insect Pest Management* (3era ed., pp. 198–223). CABI Publishing.

Departamento de control de calidad del Banco Nacional de ADN. (2020). *Programa de control de calidad de ácidos nucleicos*. <https://www.bancoadn.org/docs/formulario-control-calidad-muestras.pdf>

Devaux, A., Goffart, J., Petsakos, A., Kromann, P., Gatto, M., Okello, J., Suarez, V., & Hareau, G. (2020). Global food security, contributions from sustainable potato agri-food systems. In H. Campos & O. Ortiz (Eds.), *The Potato Crop: Its Agricultural, Nutritional and Social Contribution to Humankind* (pp. 3–35). Springer.

Duarte, F. (2012). El control biológico como estrategia para apoyar las exportaciones agrícolas no tradicionales en Perú: un análisis empírico. *Contabilidad y Negocios*, 7(14), 81–100.

EFSA, Jeger, M., Bragard, C., Caffier, D., Candresse, T., Chatzivassiliou, E., Dehnen-Schmutz, K., Gilioli, G., Gregoire, J.-C., Jaques Miret, J. A., Navarro, M. N., Niere, B., Parnell, S.,

- Roel Potting, Trond Rafoss, € , Vittorio Rossi, Gregor Urek, Ariena Van Bruggen, Wopke Van der Werf, J. W., Winter, S., Gardi, C., Bergeretti, F., & MacLeod, A. (2018). Pest categorisation of *Tecia solanivora*. *EFSA Journal*, *16*(1), e05102.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5102>
- FAO. (2023a). *Ecuador en una mirada*. FAO En Ecuador. <https://www.fao.org/ecuador/fao-en-ecuador/ecuador-en-una-mirada/es/>
- FAO. (2023b). *Production. Crops and livestock products*.  
<https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>
- Ferris, H. (2023). *Cruznema*. Nemaplex. <http://nemaplex.ucdavis.edu/Taxadata/G2210.aspx>
- Fu, Z., Castillo Carrillo, C. I., Rashed, A., Asaquibay, C., Aucancela, R., Camacho, J., López, V., Quimbiamba, V., Yumisaca, F., Panchi, N., & Velasco, C. (2020). Assessing Genetic Diversity of Three Species of Potato Tuber Moths (Gelechiidae, Lepidoptera) in the Ecuadorian Highlands. *Florida Entomologist*, *103*(3), 329–336.  
<https://doi.org/10.1653/024.103.0304>
- Gavara, J., Hernández, E., & Piedra-Buena, A. (2023). *Gestión Integrada de la polilla guatemalteca de la papa. Tecia solanivora*. (Manual Técnico N° 7).  
<https://www.icia.es/icia/download/publicaciones/Tecia.pdf>
- Glazer, I. (2002). Survival biology. In R. Gaugler (Ed.), *Entomopathogenic Nematology* (pp. 169–187). CABI Publishing.
- Guerra-Luran, E., & Godoy, J. A. (2021). Principales microorganismos entomopatógenos de *Tecia solanivora* y sus mecanismos de acción. *Revista Tecnología En Marcha*, *34*(2), 137–146. <https://doi.org/10.18845/tm.v34i2.4981>
- Hominick, W. M. (2002). Biogeography. In R. Gaugler (Ed.), *Entomopathogenic nematology* (pp.

115–143). CABI Publishing.

Horta, A. B., Damascena, A. P., Carvalho, V. R. De, Ribeiro, M. F., Castro, B. M. C., Wilcken, C. F., Zanuncio, J. C., & Wilcken, S. R. S. (2021). *Steinernema diaprepesi* Nguyen & Duncan (Rhabditida: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from Brazil. *Anais Da Academia Brasileira de Ciências*, 93(4). <https://doi.org/10.1590/0001-3765202120190943>

IICA. (2020). *Organizaciones promueven consumo de papa por la salud del Ecuador*.

<https://www.iica.int/es/prensa/noticias/organizaciones-promueven-consumo-de-papa-por-la-salud-del-ecuador>

INEC. (2023a). *Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua- ESPAC 2022*.

[https://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Estadisticas\\_agropecuarias/espac/espac\\_2022/PPT\\_ESPAC\\_2022\\_04.pdf](https://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Estadisticas_agropecuarias/espac/espac_2022/PPT_ESPAC_2022_04.pdf)

INEC. (2023b). *Encuesta Nacional de Empleo, Desempleo y Subempleo - ENEMDU*.

*Indicadores laborales. III trimestre de 2023*.

[https://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/EMPLEO/2023/Trimestre\\_III/2023\\_III\\_Trimestre\\_Mercado\\_Laboral.pdf](https://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/EMPLEO/2023/Trimestre_III/2023_III_Trimestre_Mercado_Laboral.pdf)

Informer Technologies. (2023). *BioEdit*.

<https://bioedit.software.informer.com/download/?lang=es>

INIAP. (2004). *Control del cutzo (Phyllophaga sp.) con Beauveria y Metarhizium sp. en el cultivo de tomate de árbol*.

INIAP. (2006). *Colección, identificación, patogenicidad y caracterización ecológica de nematodos parásitos de insectos en gusano blanco Premnotrypes vorax y polilla guatemalteca Tecia solanivora de la papa en Ecuador*.

Kaya, H., & Stock, P. (1997). Techniques in insect nematology. In L. A. Lacey (Ed.), *Manual of*

*Techniques in Insect Pathology* (pp. 281–324).

Kim, T., Lee, Y., & Park, J.-K. (2021). First report and morphological description of two *Acrobeloides* species (Nematoda: Rhabditida: Cephalobidae) in South Korea. *Journal of Species Research*, 10(4), 405–411.

<https://doi.org/https://doi.org/10.12651/JSR.2021.10.4.405>

Krosche, J., Zegarra, O., & Guvener, S. (2015). *Development of Attract-and-kill for the benefit of small scale potato farmers*. CGIAR. Research Program on Roots, Tubers and Bananas. <https://es.slideshare.net/rtbcgiar/development-of-attractandkill-for-the-benefit-of-small-scale-potato-farmers>

Kroschel, J., Mujica, N., Okonya, J., & Alyokhin, A. (2020). Insect Pests Affecting Potatoes in Tropical, Subtropical, and Temperate Regions. In H. Campos & O. Ortiz (Eds.), *The Potato Crop: Its Agricultural, Nutritional and Social Contribution to Humankind* (pp. 251–306). Springer. <https://link.springer.com/book/10.1007/978-3-030-28683-5>

Kumar, D., Kumari, P., Kamboj, R., Kumar, A., Banakar, P., & Kumar, V. (2022). Entomopathogenic nematodes as potential and effective biocontrol agents against cutworms, *Agrotis* spp.: present and future scenario. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 32(42). <https://doi.org/10.1186/s41938-022-00543-5>

Kumar, D., Sinha, S. N., Rajendra, S., & Sharma, K. (2023). Assessing farmer's exposure to pesticides and the risk for non-communicable diseases: A biomonitoring study. *Science of The Total Environment*, 891.

Labnet. (2020). *Labnet Enduro™ GDS II y Enduro GDS Touch II Sistema de documentación de gel. Manual de instrucciones*.

[https://www.labnetinternational.com/sites/www.labnetinternational.com/files/product-documents/Labnet Enduro GDS Manual de instrucciones ESP.pdf](https://www.labnetinternational.com/sites/www.labnetinternational.com/files/product-documents/Labnet%20Enduro%20GDS%20Manual%20de%20instrucciones%20ESP.pdf)



- Lahlali, R., Ezrari, S., Radouane, N., Kenfaoui, J., Esmaeel, Q., El Hamss, H., Belabess, Z., & Barka, E. A. (2022). Biological Control of Plant Pathogens: A Global Perspective. *Microorganisms*, 10(3), 596. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10030596>
- Lauwerys, R. (1998). Control Biológico. In *Enciclopedia de Salud y Seguridad en el trabajo* (pp. 27.2-27-28). <https://www.insst.es/documents/94886/161958/Capítulo+27.+Control+biológico>
- Loulou, A., Mastore, M., Caramella, S., Bhat, A. H., Brivio, M. F., Machado, R. A. R., & Kallel, S. (2023). Entomopathogenic potential of bacteria associated with soil-borne nematodes and insect immune responses to their infection. *PLOS ONE*, 18(1), 1–19. <https://doi.org/https://doi.org/10.1371/journal.pone.0280675>
- Lulamba, T. E., & Serepa-Dlamini, M. H. (2020). Molecular identification of a Heterorhabditis entomopathogenic nematode isolated from the northernmost region of South Africa. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 30(77). <https://doi.org/10.1186/s41938-020-00279-0>
- MAG. (2023). *Comercio Exterior del Sector Agropecuario y Agroindustrial. Consulta por Producto*. <http://sipa.agricultura.gob.ec/index.php/comext-productos>
- MAPA. (2018). *Tecia solanivora (Polilla guatemalteca)*. [https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/temas/sanidad-vegetal/organismos-nocivos/tecia-solanivora/#:~:text=La polilla guatemalteca \(Tecia solanivora,patata al resto de países.](https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/temas/sanidad-vegetal/organismos-nocivos/tecia-solanivora/#:~:text=La polilla guatemalteca (Tecia solanivora,patata al resto de países.)
- Márquez, A. (2021). *Competencia intraespecífica: qué es, características y ejemplos*. <https://www.ecologiaverde.com/competencia-intraespecifica-que-es-caracteristicas-y-ejemplos-3169.html>
- Mdeni, N. L., Adeniji, A. O., Okoh, A. I., & Okoh, O. O. (2022). Analytical Evaluation of

- Carbamate and Organophosphate Pesticides in Human and Environmental Matrices: A Review. *Molecules*, 27(3), 618. <https://doi.org/10.3390/molecules27030618>
- Möhring, N., Ingold, K., Kudsk, P., Martin-Laurent, F., Niggli, U., Siegrist, M., Studer, B., Walter, A., & Finger, R. (2020). Pathways for advancing pesticide policies. *Nature Food*, 1(9), 535–540.
- Moore, S. D. (2021). Biological Control of a Phytosanitary Pest (*Thaumatotibia leucotreta*): A Case Study. *Int J Environ Res Public Health*, 18(3), 1198. <https://doi.org/10.3390/ijerph18031198>
- Naqqash, M. N. (2022). Insect-pests of potato: importance and management. In M. E. Çalışkan, A. Bakhsh, & K. Jabran (Eds.), *Potato Production Worldwide* (pp. 133–144). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/C2019-0-04360-9>
- Pérez Campos, S. J., Rodríguez Hernández, A., López-Cuellar, M. D. R., Sanjuan-Galindo, R., & Chavarría-Hernández, N. (2019). Producción de nemátodos entomopatógenos en medio líquido, perspectivas y retos a vencer. *Frontera Biotecnológica*, 12, 10–18.
- Poinar, G. O. (1979). *Nematodes for Biological Control of Insects* (Primera Ed).
- Posit. (2023). *RStudio Desktop*. <https://posit.co/download/rstudio-desktop/>
- Půža, V., Campos-Herrera, R., Blanco-Pérez, R., Jakubíková, H., Vicente-Díez, I., & Nermuť, J. (2020). *Steinernema riojaense* n. sp., a new entomopathogenic nematode (Nematoda: Steinernematidae) from Spain. *Nematology*, 22(7), 825–841. <https://doi.org/https://doi.org/10.1163/15685411-00003343>
- Půža, V., & Tarasco, E. (2023). Interactions between Entomopathogenic Fungi and Entomopathogenic Nematodes. *Microorganisms*, 11(1), 163. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11010163>

- Rojas-Sandoval, J. (2023). *Tecia solanivora* (potato tuber moth). *CABI Compendium*.  
<https://doi.org/10.1079/cabicompendium.52956>
- Serrano, L., & Quiñones-Aguilar, E. E. (2021). Control biológico de patógenos de plantas. Interacciones, Estrategias y Mecanismos. *Biotecnología En Movimiento*, 24, 22–24.  
<https://biotecmov.files.wordpress.com/2021/04/btmv24e-numcompletof2.pdf>
- Sharaby, A. M. F., & Fallatah, S. B. (2019). Protection of stored potatoes from infestation with the potato tuber moth, *Phthorimaea operculella* (Zeller)(Lepidoptera: Gelechiidae) using plant powders. *Bulletin of the National Research Centre*, 43(79).  
<https://doi.org/10.1186/s42269-019-0119-5>
- Sharma, H., Rana, A., Bhat, A. H., & Chaubey, A. K. (2021). Entomopathogenic Nematodes: Their Characterization, Bio-Control Properties and New Perspectives. In C. Bellé & T. E. Kaspary (Eds.), *Nematodes - Recent Advances, Management and New Perspectives*.  
<http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.99319>
- Singh, A. K., Kumar, M., Ahuja, A., Vinay, B. K., Kommu, K. K., Thakur, S., Paschapur, A. U., Jeevan, B., Mishra, K. K., Meena, R. P., & Parihar, M. (2022). Entomopathogenic nematodes: a sustainable option for insect pest management. In A. Rakshit, V. S. Meena, P. C. Abhilash, B. K. Sarma, H. B. Singh, L. Fraceto, M. Parihar, & A. K. Singh (Eds.), *Biopesticides* (pp. 73–92). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823355-9.00007-9>
- Solano, G., del Pilar Márquez, M., & Schuler, I. (2009). Optimización de la extracción de ADN de *Passiflora ligularis* para el análisis por medio de marcadores moleculares. *Universitas Scientiarum*, 14(1), 16–22. <https://doi.org/10.11144/javeriana.SC14-1.odle>
- Stock, S. P., & Hunt, D. J. (2005). Morphology and Systematics of Nematodes Used in Biocontrol. In P. S. Grewal, R.-U. Ehler, & D. I. Shapiro-Ilan (Eds.), *Nematodes as Biocontrol Agents* (pp. 3–40).

- Subbotin, S., Crozzoli, R., Moens, M., Sturhan, D., Baldwin, J., Vovlas, N., & Lamberti, F. (2005). Phylogeny of Criconematina Siddiqi, 1980 (Nematoda: Tylenchida) based on morphology and D2-D3 expansion segments of the 28S-rRNA gene sequences with application of a secondary structure model. *Nematology*, 7(6), 927–944.  
<https://doi.org/10.1163/156854105776186307>
- Subbotin, S., Waeyenberge, L., & Moens, M. (2000). Identification of cyst forming nematodes of the genus *Heterodera* (Nematoda: Heteroderidae) based on the ribosomal DNA-RFLP. *Nematology*, 2(2), 153–164.
- Tarasco, E., Fanelli, E., Salvemini, C., El-Khoury, Y., Troccoli, A., Vovlas, A., & De Luca, F. (2023). Entomopathogenic nematodes and their symbiotic bacteria: from genes to field uses. *Frontiers in Insect Science*, 3.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.3389/finsc.2023.1195254>
- Technelysium. (1996). *Chromas*. <https://technelysium.com.au/wp/chromas/>
- Tofangsazi, N., University of California, Riverside, Arthurs, S. P., Giblin-Davis, R. M., & Florida, U. of. (2018). *common name: entomopathogenic nematodes scientific name: (Nematoda: Rhabditida: families Steinernematidae and Heterorhabditidae)*. Featured Creatures.  
[https://entnemdept.ufl.edu/creatures/nematode/entomopathogenic\\_nematode.htm](https://entnemdept.ufl.edu/creatures/nematode/entomopathogenic_nematode.htm)
- Trinh, P. Q., Nguyen, D. T., Le, L. T. M., & Nguyen, T. H. (2021). First report of entomopathogenic nematode *Steinernema surkhetense* and its pathogenic potential to larvae of the Greater Wax Moth (*Galleria mellonella* L.) in Vietnam. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 31(147). <https://doi.org/https://doi.org/10.1186/s41938-021-00496-1>
- UnADM. (2020). *Bioinformática. Análisis computacional de secuencias de ADN*.  
[https://dmd.unadmexico.mx/contenidos/DCSBA/BLOQUE1/BI/07/BIIN/unidad\\_02/descarga](https://dmd.unadmexico.mx/contenidos/DCSBA/BLOQUE1/BI/07/BIIN/unidad_02/descarga)

bles/BIIN\_U2\_Contenido.pdf

- Vidaurre, D., Rodríguez, A., & Uribe, L. (2020). Factores edáficos y nemátodos entomopatógenos en un agroecosistema neotropical de banano. *Revista de Biología Tropical*, 68(1), 276–288. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.15517/rbt.v68i1.37680>
- Viera-Arroyo, W., Tello-Torres, C., Martínez-Salinas, A., Navia-Santillán, D., Medina-Rivera, L., Delgado-Parra, A., Perdomo-Quispe, C., Pincay-Verdezoto, A., Báez-Cevallos, F., Vásquez-Castillo, W., & Jackson, T. (2020). Control Biológico: Una herramienta para una agricultura sustentable, un punto de vista de sus beneficios en Ecuador. *Journal of the Selva Andina Biosphere. Selva Andina Research Society, Bolivia*, 8(2). <https://doi.org/https://doi.org/10.36610/j.jsab.2020.080200128>
- Vrain, T. C., Wakarchuk, D. A., Levesque, A. C., & Hamilton, R. I. (1992). Intraspecific rDNA Restriction Fragment Length Polymorphism in the *Xiphinema americanum* group. *Fundamental and Applied Nematology*, 15(6), 563–573.
- Wuepper, D., Tang, F. H. M., & Finger, R. (2023). National leverage points to reduce global pesticide pollution. *Global Environmental Change*, 78.