



**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



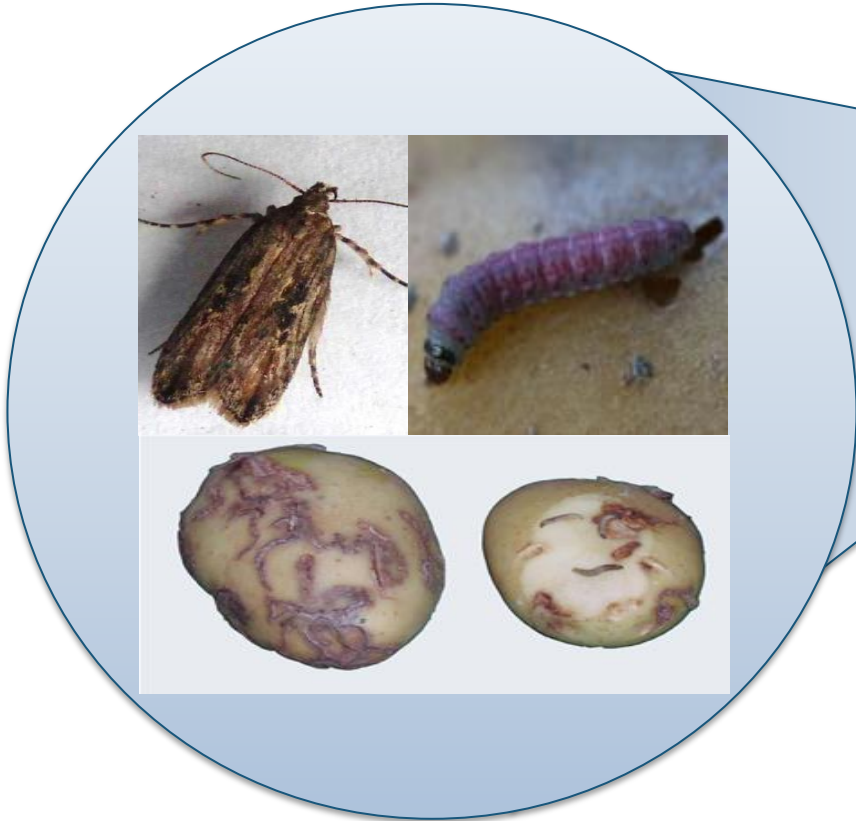
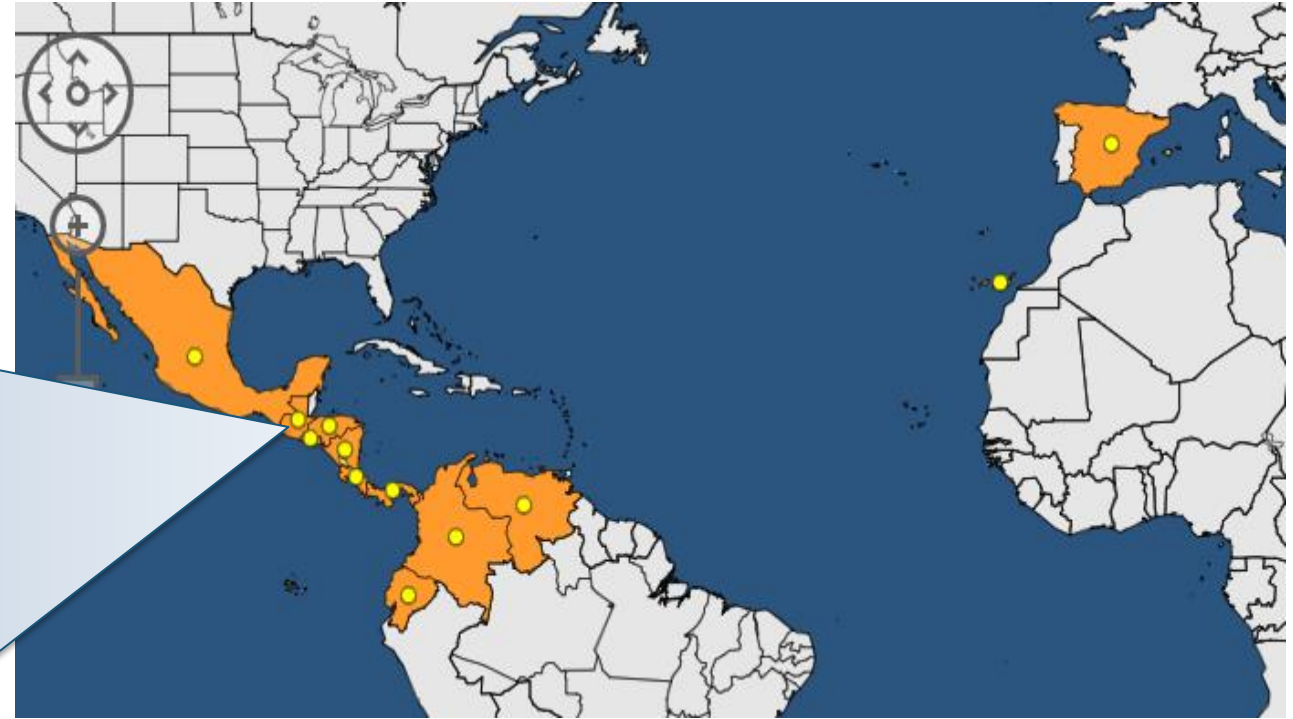
Insectos plaga

- 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





## Nematodos entomopatógenos (NEPs)

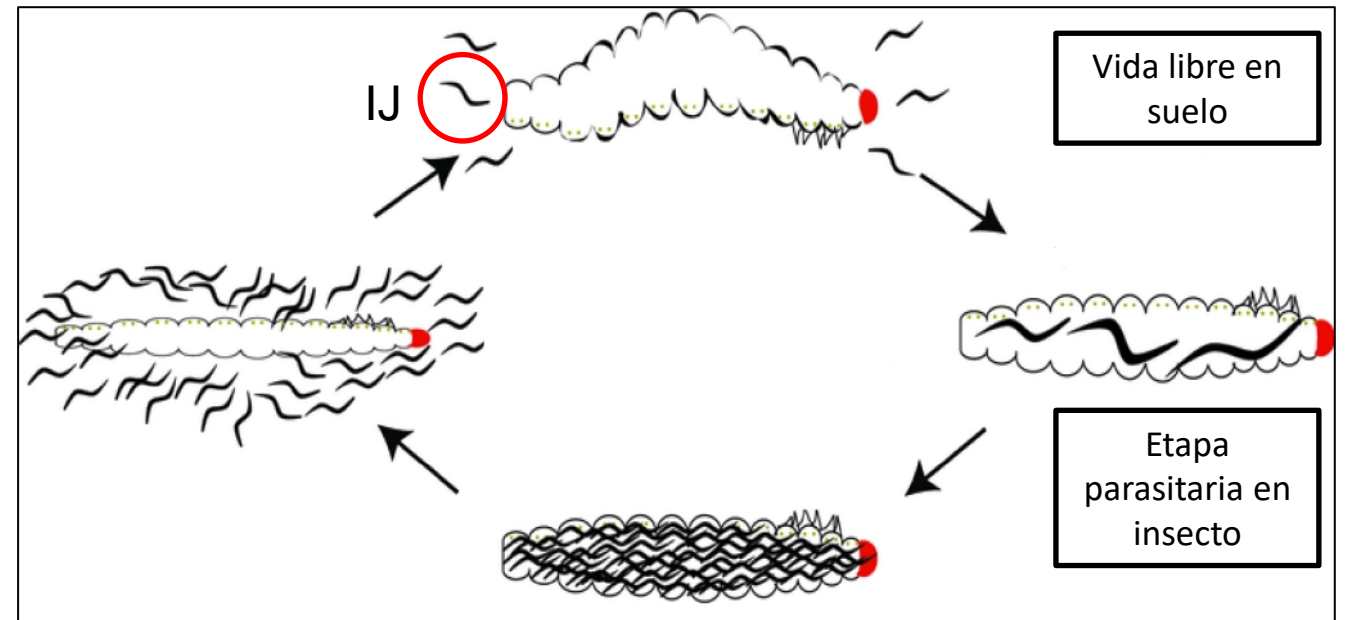
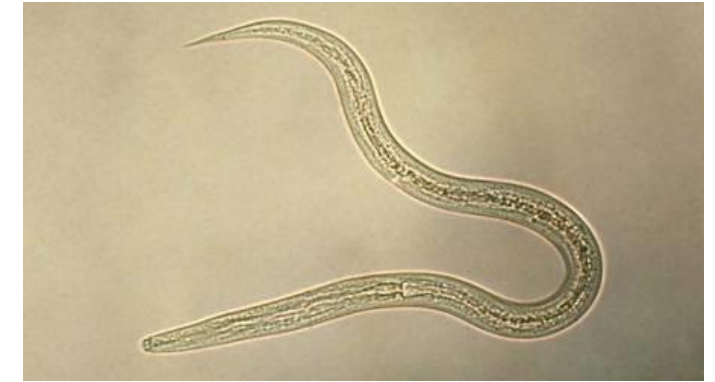
Gusanos redondos  
no segmentados

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





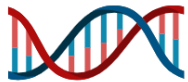
## Objetivo General

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

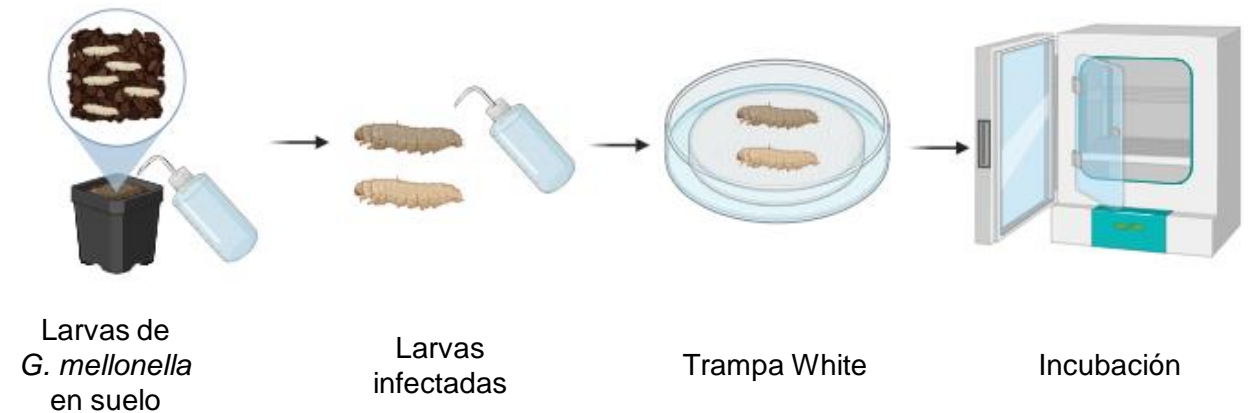
- Departamento Nacional de Biotecnología (DNB)



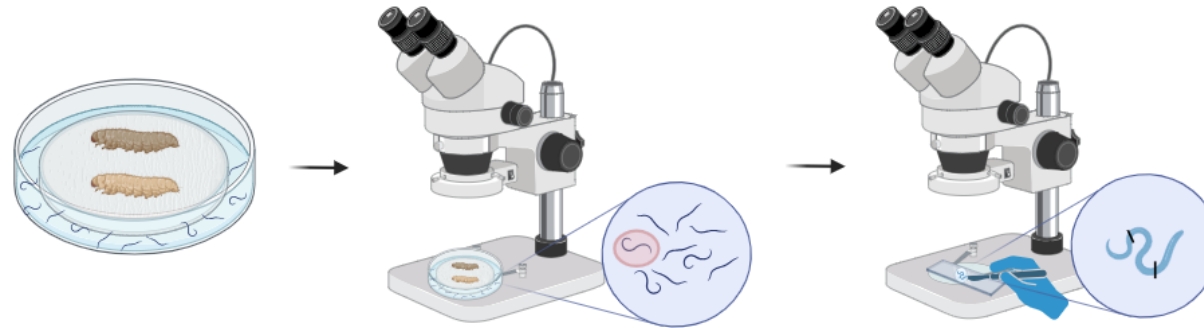
## Aislamiento de NEPs del suelo

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

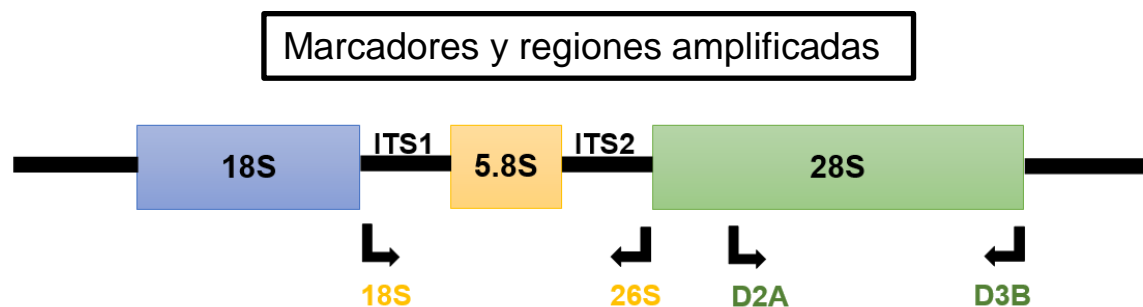
Amplificación de ADN: Subbotin et al. (2005) y Lulamba & Serepa-Dlamini (2020)

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 <sub>2</sub>	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	

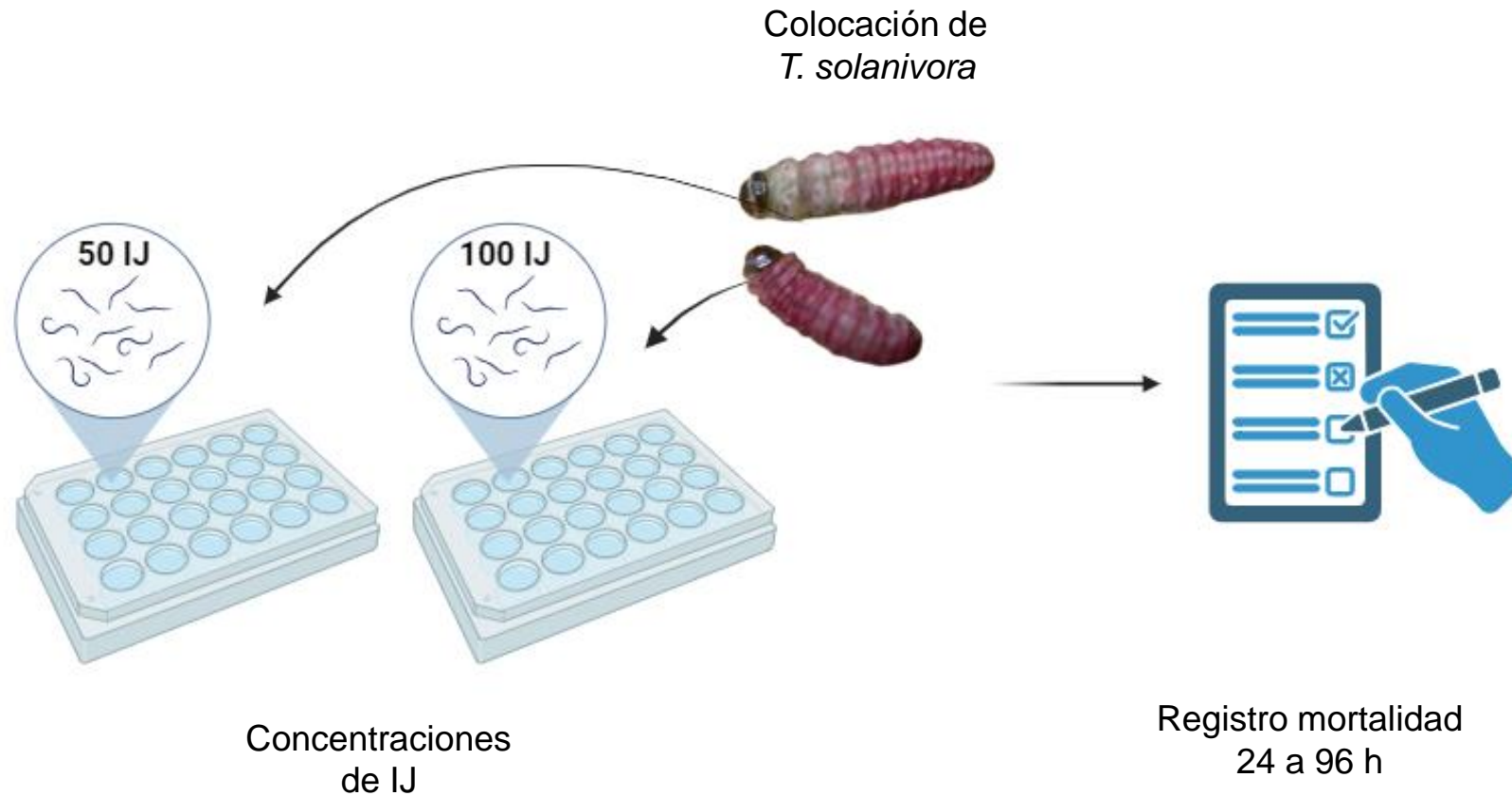
Nota. MgCl<sub>2</sub>: Cloruro de magnesio, dNTPs: desoxirribonucleótidos trifosfatos, µM: micromolar, mM: milimolar, U: unidad de actividad enzimática

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 <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

### 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

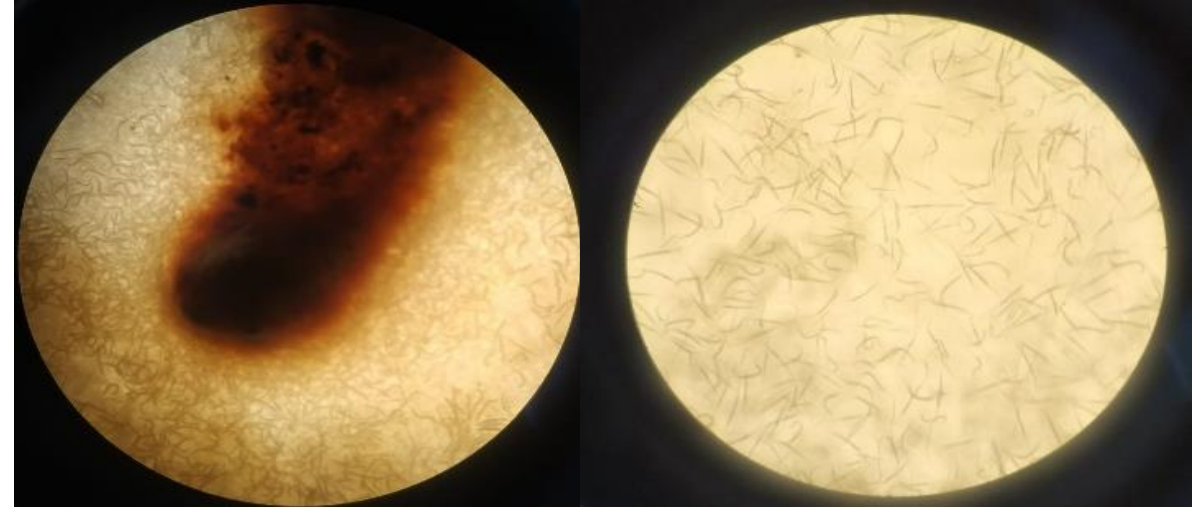
*Galleria mellonella* infectadas por NEPs



Cambio de coloración, cadáveres hinchados (Poinar, 1979)

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

Trampa White

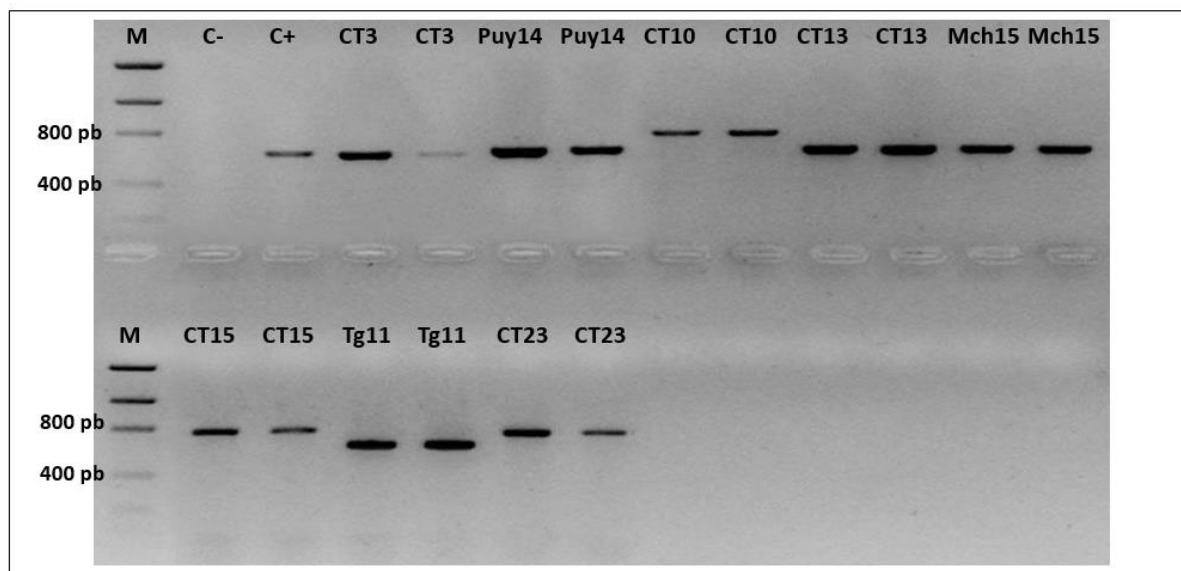


NEPs en suspensión de trampa White después de siete a 15 días (Campos-Herrera et al., 2020)

Tamaño microscópico (Singh et al., 2022)

## Identificación molecular – Amplificación de ADN

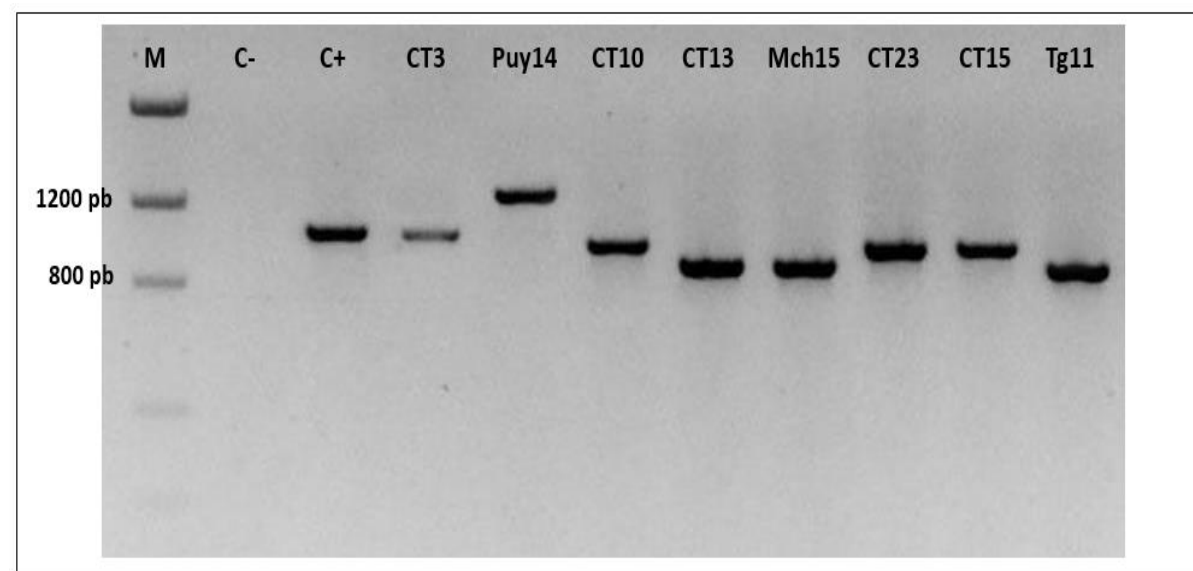
### Región D2/D3



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

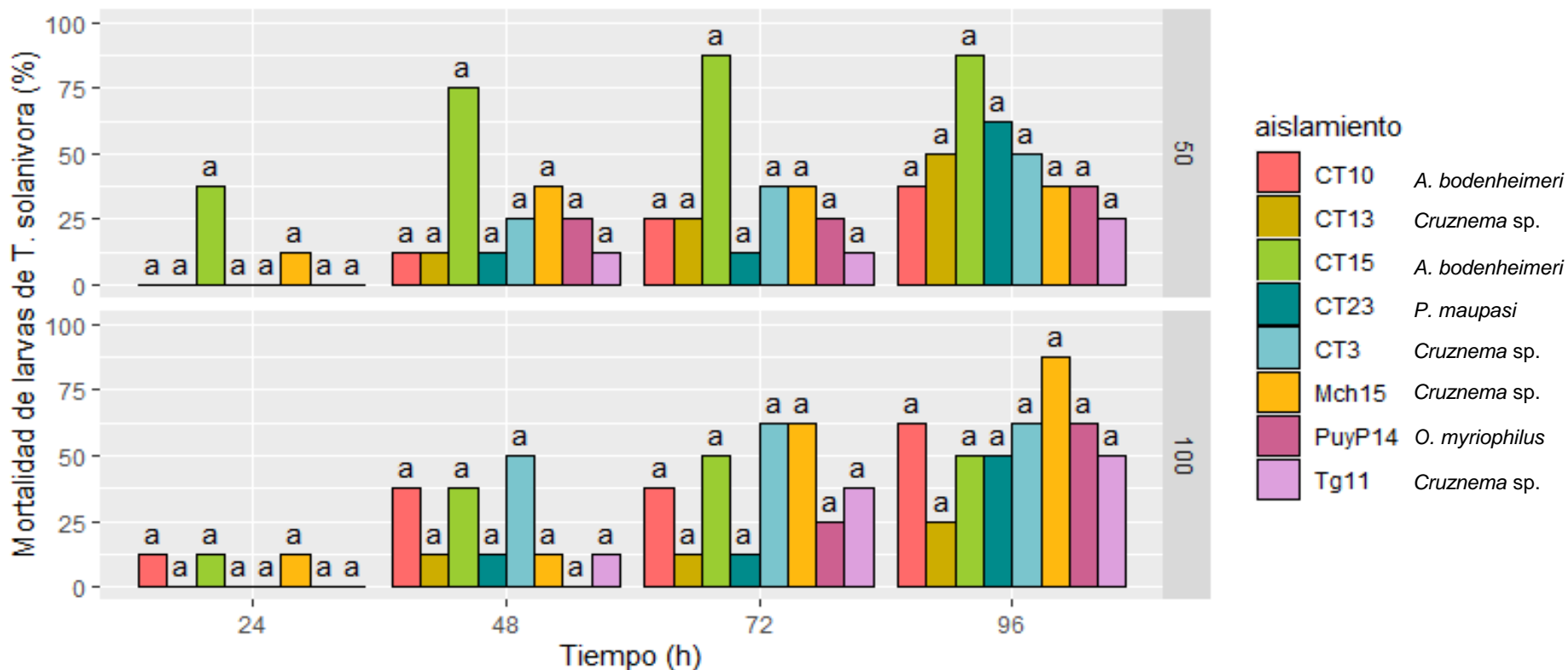
### Pruebas de patogenicidad *in vitro*

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, *Acroboloides 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 (DL<sub>50</sub>) 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**