

**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO**

**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS**



**CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA**

**“CICLO BIOLÓGICO DE *Oligonychus coffeae* (Acari: Tetranychidae)  
EN ALISO (*Alnus acuminata*) Y CAFÉ (*Coffea arabica*) Y EL USO DE  
EXTRACTOS ETANÓLICOS COMPLEMENTARIOS PARA SU  
CONTROL”**

**DOCUMENTO FINAL DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN COMO  
REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE INGENIERA AGRÓNOMA**

**SARA NATALY PAREDES CARREÑO**

**TUTORA:**

PhD Marta Dávila Ponce

**Cevallos – 2017**

## **DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD**

La suscrita, SARA NATALY PAREDES CARREÑO, portadora de cédula de identidad número: 180371498-7, libre y voluntariamente declaro que el Informe Final del Proyecto de investigación titulado: “CICLO BIOLÓGICO DE *Oligonychus coffeae* (Acari: Tetranychidae) EN ALISO (*Alnus acuminata*) Y CAFÉ (*Coffea arabica*) Y EL USO DE EXTRACTOS ETANÓLICOS COMPLEMENTARIOS PARA SU CONTROL” es original, auténtico y personal. En tal virtud, declaro que el contenido es de mí sola responsabilidad legal y académica, excepto donde se indican las fuentes de información consultadas.

-----  
**SARA NATALY PAREDES CARREÑO**

## **DERECHO DE AUTOR**

Al presentar este Informe Final del Proyecto de Investigación titulado “CICLO BIOLÓGICO DE *Oligonychus coffeae* (Acari: Tetranychidae) EN ALISO (*Alnus acuminata*) Y CAFÉ (*Coffea arabica*) Y EL USO DE EXTRACTOS ETANÓLICOS COMPLEMENTARIOS PARA SU CONTROL” como uno de los requisitos previos para la obtención del título de grado de Ingeniera Agrónoma en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato, autorizo a la Biblioteca de la Facultad, para que este documento esté disponible para su lectura, según las normas de la Universidad.

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

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

-----  
**SARA NATALY PAREDES CARREÑO**

**“CICLO BIOLÓGICO DE *Oligonychus coffeae* (Acari: Tetranychidae) EN ALISO (*Alnus acuminata*) Y CAFÉ (*Coffea arabica*) Y EL USO DE EXTRACTOS ETANÓLICOS COMPLEMENTARIOS PARA SU CONTROL”**

**REVISADO POR:**

.....  
PhD Marta Dávila Ponce  
**TUTORA**

**APROBADO POR LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE GRADO:**

**FECHA**

-----  
Ing. Mg. Hernán Zurita Vásquez  
**PRESIDENTE**

-----  
PhD. Carlos Vásquez Freites  
**MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE GRADO**

-----  
Ing. Mg. Rita Santana Mayorga  
**MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE GRADO**

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a Dios por guiar mis pasos en el sendero de su ley, por ayudarme a encontrar la felicidad en los pequeños detalles.

A mi madre y padre por siempre apoyarme, brindarme amor y darme la libertad de elegir mi camino. A mis hermanas por recordarnos en tiempos difíciles una y otra vez cuanto nos amamos.

A los docentes de mi escuela y colegio "Unidad Educativa Experimental Pedro Fermín Cevallos" en el que me inicié en el mundo de las ciencias gracias a ellos tuve las bases para llegar hasta aquí.

A la Universidad Técnica de Ambato, Facultad de Ciencias Agropecuarias por acogerme en sus aulas.

A la Dra. Marta Dávila por ser mi guía, soporte, ayudarme a cumplir mis expectativas, enseñarme que siempre se puede ir más lejos, al Dr. Carlos Vásquez por su ayuda incondicional, compartirme sus conocimientos; a ambos por enseñarme que la educación no siempre está ligada al título y que hay cosas que nunca van a ser más importantes que la ética.

A los ingenieros Segundo Curay y Jorge Dobronski por sus saberes e instrucciones impartidos durante la carrera, además de ser excelentes profesionales son profesores de vida, reflejando sus palabras en sus honorables actos.

A los Ingenieros Vanessa Frutos y David Mendoza por su ayuda incondicional en cada momento.

A María José Salazar por su amistad, apoyo y lealtad en el transcurso de la carrera.

Quiero agradecer a todos mis amigos porque sin ellos me hubiese graduado un año antes, pero no con las mismas dichas.

A ti porque si yo tú, si tú yo.

## DEDICATORIA

### **El lobo da fuerza a la manada, Más la manada a él fuerte ha hecho**

A mis abuelos Vidal Carreño y Lucinda Pérez hechos de trigo y caña, que no dormían por vigilar mis sueños, ahora desde el cielo hacen que los cumpla y sonrían cuidando mis pasos.

A mi magre Sara dueña de un corazón de fuego, mujer asertiva e inteligente por traerme a la vida, y llevarme por ella; educarme en la primicia que el camino difícil es el que trae mejores recompensas y que hacer lo correcto siempre será mejor que hacer lo fácil.

A mi pagre Arturo por ser siempre un buen tipo, un hombre noble y humilde, por enseñarme andar por la vida a pie, a bici, a auto, con su esfuerzo por siempre sacarnos adelante.

A mis hermanas: Pamela por su apoyo, nobleza y ternura, por siempre hacer el bien sin mirar a quien, por su viento siempre bueno porque ella es mi suerte, Valentina mi luz, mi aire bueno, amor puro, por demostrarme que el bien llega cuando más lo necesitas y menos lo esperas, Lizbeth por su sabiduría, lucha constante, amor y orgullo, que muchas veces nos ha llevado a no abandonarnos.

Antoine por tu mirada insigne y buena, por entenderme cuando no explico, darme calor cuando necesito, tú eres la grandeza de las cosas pequeñas.

A mis tías por volar, seguir, huir, pensar, defender, ustedes son los verdaderos poderes de ambos clanes, las verdaderas matriarcas, mujeres, bellas, inteligentes y de coraje.

A todxs que siguen queriendo ser diferentes

A ti porque sin ti, yo no.

***SARA NATALY PAREDES CARREÑO***

## ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE CONTENIDO .....	VII
CAPÍTULO I.....	1
INTRODUCCIÓN .....	1
CAPÍTULO II .....	3
REVISIÓN DE LITERATURA O MARCO TEÓRICO .....	3
CAPÍTULO III.....	19
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....	19
3.1. HIPÓTESIS .....	19
3.2. OBJETIVOS.....	19
CAPÍTULO IV .....	20
MATERIALES Y MÉTODOS .....	20
4.1. UBICACIÓN DEL EXPERIMENTO .....	20
4.2. CARACTERIZACIÓN DEL LUGAR.....	20
4.2.1. Investigación.....	20
4.3. EQUIPOS Y MATERIALES .....	21
4.4. FACTORES EN ESTUDIO .....	24
Los factores de estudio sobre la biología del ácaro <i>O. coffeae</i> fueron:.....	24
Ciclo biológico .....	24
Longevidad .....	24
Fecundidad .....	24
Proporción sexual.....	24
Variabilidad genética.....	24
Mortalidad después de control.....	24
4.5. TRATAMIENTOS.....	25
4.6. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	27
4.7. VARIABLES RESPUESTA .....	27
4.8. PROCESAMIENTO DE LA INFORMACIÓN .....	33
CAPÍTULO V.....	34
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	34
5.1. Ciclo biológico de <i>Oligonychus coffeae</i> criado en hojas de aliso y café .....	34

<b>CAPÍTULO VI</b> .....	¡Error! Marcador no definido.
<b>CONCLUSIONES, BIBLIOGRAFÍA Y ANEXOS</b> .....	¡Error! Marcador no definido.
<b>6.1. CONCLUSIONES</b> .....	¡Error! Marcador no definido.
<b>6.2. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>46</b>
<b>6.3. ANEXOS</b> .....	<b>56</b>
<b>CAPÍTULO VII</b> .....	<b>69</b>
<b>PROPUESTA</b> .....	<b>69</b>
<b>7.2. ANTECEDENTES DE LA PROPUESTA</b> .....	<b>69</b>
<b>7.3. JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>69</b>
<b>7.4. OBJETIVOS</b> .....	<b>70</b>
<b>7.5. ANÁLISIS DE FACTIBILIDAD</b> .....	<b>70</b>
<b>7.6. FUNDAMENTACIÓN</b> .....	<b>70</b>
<b>7.7. METODOLOGÍA, MODELO OPERATIVO</b> .....	<b>70</b>
<b>7.8. ADMINISTRACIÓN</b> .....	<b>71</b>



## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Iniciadores moleculares PCR .....	24
<b>Tabla 2.</b> Tratamientos de biología del ácaro .....	25
<b>Tabla 3.</b> Tratamientos de marcadores moleculares .....	25
<b>Tabla 4.</b> Tratamientos de control con extractos .....	26-27
<b>Tabla 5.</b> Duración en días del ciclo biológico de <i>O. coffeae</i> criado en hojas de aliso y café .....	35
<b>Tabla 6.</b> Longevidad de <i>O. coffeae</i> criado en hojas de aliso y café.....	37
<b>Tabla 7.</b> Mortalidad de hembras de <i>O. coffeae</i> . .....	40
<b>Tabla 8.</b> Bandas amplificadas (bps= pares de bases) por electroforesis de los productos de RAPD-PCR obtenidos con los iniciadores OPA01 y OPA03 ADN de <i>O. coffeae</i> .....	42
<b>Tabla 9.</b> Bandas amplificadas (bps= pares de bases) por electroforesis de los productos de RAPD-PCR obtenidos con los iniciadores OPB10 y OPB13 ADN de <i>O. coffeae</i> .....	42

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Ciclo biológico de <i>O. coffeae</i> .....	8
<b>Figura 2.</b> Ácaros de <i>O. coffeae</i> en estadio quiescente .....	9
<b>Figura 3.</b> Larva de <i>O. coffeae</i> .....	9
<b>Figura 4.</b> Ácaro hembra de <i>O. coffeae</i> .....	10
<b>Figura 5.</b> Copulación de <i>O. coffeae</i> .....	11
<b>Figura 6.</b> Ácaro hembra de <i>O. coffeae</i> con larva .....	11
<b>Figura 7.</b> Colonias de <i>O. coffeae</i> .....	12
<b>Figura 8.</b> Aliso en Querochaca .....	13
<b>Figura 9.</b> Planta de café en Palora .....	15
<b>Figura 10.</b> Arenas de hojas de aliso y café para observación de ciclo biológico de <i>O. coffeae</i> .....	28
<b>Figura 11.</b> Huevos de <i>O. coffeae</i> en arenas .....	28
<b>Figura 12.</b> Tesista observando el ciclo en las arenas de <i>O. coffeae</i> .....	29
<b>Figura 13.</b> Cría de ácaros de <i>O. coffeae</i> .....	29
<b>Figura 14.</b> Extractos de aliso y café destilado con papel filtro en Erlenmeyer de 125ml .....	31
<b>Figura 15.</b> Hojas sumergidas 20 segundos para ensayo .....	31
<b>Figura 16.</b> Cámara de electroforesis con gel de muestra de ADN de aliso y café .....	33
<b>Figura 17.</b> Oviposición de <i>O. coffeae</i> criado en hojas de aliso y café.....	38
<b>Figura 18.</b> Electroforesis de muestras de ADN de <i>O. coffeae</i> , amplificadas con el	

iniciador OPAO1 .....	41
<b>Figura 19.</b> Electroforesis de muestras de ADN de <i>O. coffeae</i> , amplificadas con el	
iniciador OPB10 .....	41

## RESUMEN

Para determinar el ciclo de vida, fecundidad, longevidad, proporción sexual, tabla de vida, variabilidad genética de poblaciones en distintos pisos altitudinales y ciclos biológicos de *Oligonychus coffeae*, se realizan estudios de laboratorio en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato.

Los ácaros fueron recolectados de diferentes pisos altitudinales localizados en las provincias de Tungurahua, Pastaza y Morona Santiago. Los estudios de biología se realizaron en hojas aisladas de *Alnus acuminata* y *Coffea arabica*. El tiempo total de desarrollo de *O. coffeae* en hojas de aliso fue de  $41,70 \pm 1,45$  días mientras que en hojas de café fue  $36,48 \pm 1,61$  días siendo más corto en las fases protoninfa y deutocrisálida.

La variabilidad genética de poblaciones se evaluó de crías de ácaros en hojas de aliso y café recolectadas diferentes pisos altitudinales, mediante RAPD-PCR usando los iniciadores OPA01, OPA03, OPB10, OPB13. En el análisis de *O. coffeae* se contabilizaron un total de 112 bandas entre todos los iniciadores y los materiales vegetales usados, de los cuales un 10, 71% resultó polimórfico.

Debido a la importancia del café y aliso en Ecuador el estudio de plagas que atacan a estos cultivos es importante por ende el control lo es aún más. Una de las viables iniciativas para su control es el uso de extractos vegetales. Con el fin de comprobar el efecto de extractos etanólicos de hojas de aliso y café, y probarlos complementariamente se aplicó diferentes dosis a hojas infestadas de ácaros para determinar su mortalidad observándolo a las 24, 48, 72 y 96 horas.

### **Palabras claves:**

*Oligonychus coffeae*, aliso, café, RAPD, biología, extractos, ácaro.

## SUMMARY

To determine the life cycle, fecundity, longevity, sexual proportion, life table, genetic variability of populations in different altitudinal levels and biological control of *Oligonychus coffeae*, laboratory studies were carried out in the Faculty of Agricultural Sciences of the Technical University of Ambato.

The mites were collected from different altitudinal floors located in the provinces of Tungurahua, Pastaza and Morona Santiago. The biology studies were performed on isolated leaves of *Alnus acuminata* and *Coffea arabica*. The total development time of *O. coffeae* in alder leaves was  $41.70 \pm 1.45$  days whereas in coffee leaves it was  $36.48 \pm 1.61$  days being shorter in the protonymph and deutochrysalis phases.

The genetic variability of populations was evaluated from mite hatchlings in alder and coffee leaves collected different altitudinal floors, by means of RAPD-PCR using primers OPA01, OPA03, OPB10, OPB13. In the analysis of *O. coffeae*, a total of 112 bands were counted among all the initiators and the used plant materials, of which 10, 71% were polymorphic.

Due to the importance of coffee and alder in Ecuador, the study of pests that attack these crops is important, therefore control is even more important. One of the viable initiatives for their control is the use of plant extracts. In order to check the effect of ethanolic extracts of leaves and test them in addition, different doses were applied to leaves infested with mites to determine their mortality, observing it at 24, 48, 72 and 96 hours.

### **Keywords:**

*Oligonychus coffeae*, alder, coffee, RAPD, biology, extracts, mite.

## CAPÍTULO I

### INTRODUCCIÓN

El ácaro *Oligonychus coffeae* ha sido reportado en café, es una plaga que ataca durante prologados periodos de sequía en zonas con altitudes menores a 1500m y con temperaturas superiores a 22 °C. No obstante, el potencial biológico de la plaga ha mostrado variaciones dependiendo del cultivar (Giraldo et al. 2011) ha sido encontrado en aliso en zonas con mayor altitud y bajas temperaturas (Vásquez et al. 2017). El daño causado por este ácaro es producido en el sitio de alimentación al romper la superficie de las hojas y destruir las células del mesófilo Gallardo et al. (2005), ocasionando en la hoja una coloración café que se convierte en blanquecina de acuerdo con la severidad del daño y con el avance de la plaga, produciendo la senescencia y muerte de la hoja y posteriormente la de la planta.

El Ecuador es integrante de los países exportadores de café ICO (*International Coffee Organization*), el cultivo origina relevancia en el ámbito: social al generar empleo directo e indirecto a varias familias ecuatorianas, económico al aportar una suma importante de divisas al país, y ecológico al reconocer la amplia adaptabilidad de los cafetales a lo largo del territorio continental y peninsular (COFENAC, 2010; Quiliguango, 2013). Los cafetales de las especies arábica y robusta forman parte de variados sistemas agroforestales (Castillo et al. 2004), componiendo hábitats adecuados para la sobrevivencia de especies de la fauna y flora endémicas por lo tanto cualquier problema que afecte a los cafetales sigue siendo de especial importancia (Bustillo, 2007).

El aliso es un árbol de rápido crecimiento que se ubica en zonas montañosas a riveras de ríos, generando una protección a las cuencas hidrográficas, también actúa como un controlador natural de la erosión del suelo (Marulanda et al. 2006) gracias a sus raíces que opera simbióticamente con el actinomiceto *Frankia* spp hace que sea un fijador de nitrógeno atmosférico, además de asociarse productivamente con cultivos como pasturas y café (Budowski y Russo, 1997). Existen diversos planes de gobierno para reforestar con

especies nativas para recompensar la pérdida de bosques naturales donde el aliso representa uno de los árboles con mayor oferta debido a su amplia adaptabilidad y un aportador natural de materia orgánica por descomposición de hojas, utilizado a su vez en cercas vivas, un sucesor nativo de pinos y eucaliptos agrupado principalmente con plantaciones silvopastoriles (Portilla, 2012 y Añazco, 1996).

Para el estudio de variaciones poblacionales, así como adaptabilidad ecológica se ha recomendado el uso de estudios morfológicos y moleculares (Hillis y Wiens 2000). De acuerdo con Magalhaes et al. (2007), un cambio en la planta hospedera, podría aislar reproductivamente a una especie, ocasionando diversidad en la plaga.

La extracción de ADN y el uso de marcadores moleculares basados en RAPD-PCR (*Random Amplified Polymorphic DNA- Polymerase Chain Reaction*) para facilitar la inferencia en posibles variaciones a nivel molecular en poblaciones de ácaros, ha sido usada con frecuencia, Balza et al. (2015) en la identificación molecular de especies de ácaros. Los marcadores moleculares basados en RAPD han sido usados para escanear amplias regiones de los genomas e inferir la existencia de patrones de dominancia heredables (Choperena et al. 2012).

Para un estudio global de las poblaciones de ácaros se necesitan tablas de vida desarrolladas en laboratorio con estadísticas de los principales estadios vitales de una población. Esta información constituye una herramienta básica para elaborar estrategias de control Fernández y Laurentin, (2015) una de las tácticas más viables y de uso sostenible en el control de poblaciones de ácaros plaga, ha sido la aplicación de extractos etanólicos de plantas (Sarmah et al. 2009).

El objetivo de este trabajo es estudiar el ciclo biológico de *Oligonychus coffeae* en aliso y en café y el efecto de extractos etanólicos complementarios para su control, además de establecer diferencias poblacionales mediante la técnica de RAPD-PCR.

## CAPÍTULO II

### REVISIÓN DE LITERATURA O MARCO TEÓRICO

#### 2.1. ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS

Estudios sobre la biología de distintas especies de ácaros son escasos en Ecuador, por esta razón, existe un vacío en cuanto a los parámetros biológicos de ácaros plaga tanto en plantas silvestres como en diferentes cultivos.

##### 2.1.1. Biología del ácaro

Giraldo et al. (2011) señalaron que existen daños producidos por el ácaro en cafetales colombianos, reportando que el comportamiento del ácaro *Oligonychus yothersi* ya no se restringe a temporadas de sequía y su conducta ha variado en años de extremos climáticos.

El ácaro *Oligonychus coffeae* Nietner (Acari: Tetranychidae) fue reportado en aliso, un árbol utilizado para la reforestación en la serranía ecuatoriana, este ácaro pertenece a una de las plagas más importantes provocando pérdidas en su contenido de clorofila Vásquez et al. (2017) describieron al ácaro de color marrón oscuro y patas de color amarillo naranja. *O. coffeae* es una especie cuyas poblaciones se incrementan durante la estación seca y como resultado de infecciones severas, causan pudrición de las hojas y defoliación en la planta hospedera.

Gallardo et al. (2005), mencionaron que el ácaro *Tetranychus urticae* Koch pertenece a una familia de especies fitófagas de amplio espectro a nivel mundial siendo sus principales hospederos frutales, ornamentales y hortalizas. Su daño a la planta se produce al romper la superficie de la hoja afectando la transpiración y la fotosíntesis, contrariando el crecimiento de plantas y su producción; señalaron también que en hojas de pimentón el



tiempo total de desarrollo del ácaro *T. urticae* fue de un máximo de 8,2 días a una temperatura de  $27 \pm 2$  °C, una humedad relativa de  $70 \pm 10\%$  y un fotoperiodo de 12h:12h (D: N).

En África, Ben Chaaban et al. (2011) reportaron que el ácaro de la palmera, *Oligonychus afrasiaticus* es una plaga seria de las frutas de esta especie, determinado que el tipo de huésped afecta al desarrollo del ácaro.

Reyes y Mesa (2011) argumentaron que *Oligonychus yothersi* es un ácaro de hábito fitófago y polífago. La biología del ácaro se estudió en condiciones controladas ( $26^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$  y  $56\% \pm 3\%$  HR) sobre hojas maduras de aguacate como resultado obtuvieron que el ácaro tiene un alto potencial reproductor y se puede considerar como una plaga en desarrollo en hojas.

Aguilar et al. (2011) destacaron que *Alnus acuminata* ssp. una especie nativa de altitudes elevadas de América tropical, se distribuye desde México hacia el norte de Argentina, especialmente a lo largo de los ríos y que es comúnmente empleada en populares remedios, el uso del tallo de aliso se ha reportado con efectos antiinflamatorios, y como fármaco de sífilis, condiciones reumáticas y enfermedades infecciosas. Proponiendo una dosis positiva de 300 mg / kg.

Los cafetales de las especies arábica y robusta forman parte de variados sistemas agroforestales silvopastoriles, siendo una fuente principal para el desarrollo económico y social ecuatoriano, ayudando a su vez a la sobrevivencia de especies de la fauna y flora endémicas (Castillo et al. 2004)

Bustillo, (2007) señaló que cualquier problema que afecte al café sigue siendo de especial importancia para su buen manejo y productividad; al no utilizar insecticidas de forma irracional se fomenta la preservación de recursos renovables, la protección de la biodiversidad y el mantenimiento del equilibrio biológico. El manejo integrado de plagas

facilita una cadena de nociones sobre control de plagas que se integran para crear una solución ecológica al problema.

Al estudiar el metabolismo de ciertos alcaloides en el desarrollados en las hojas de *Coffea arabica*, la relación con la longitud del día, la temperatura y la luz, aumenta de manera significativa el área foliar, el peso seco, la tasa de fotosíntesis neta siendo más aptas para la extracción de aceites (Fournier, 1988).

### **2.1.2. Estudios moleculares**

Para estimar la variación de poblaciones el procedimiento más seguro es la caracterización molecular de la población, los marcadores moleculares son un instrumento necesario además de utilizarse para aislar y localizar genes de interés. Los RAPD son marcadores que amplifican aleatoriamente segmentos de ADN (Rentarías, 2000).

Vásquez et al. (2014), evaluaron la variabilidad genética de poblaciones del ácaro *Raoiella indica* colectadas de diferentes localidades de Venezuela y EE.UU. Para su comparación; mediante RAPD-PCR usaron los iniciadores OPA10, OPA14, OPL05, OPMO1, OPO01, y OPP17. Estos autores concluyeron que las poblaciones de *R. indica* que fueron recolectadas sobre *Cocos nucifera* y *Musa* sp. fueron más homogéneas que las colectadas sobre *Adonidia merrillii* y *Washingtonia* sp separándolas mediante el análisis morfológico y genético del resto de las poblaciones estudiadas.

Los métodos más utilizados en el análisis molecular son los basados en la reacción de amplificación en cadena de la polimerasa (PCR) Picó y Pérez (2008) describen a los marcadores RAPD (Ampliación aleatoria de ADN polimórfico), también conocidos como rapids, como uno de los sistemas más rápidos y sencillos de identificación de polimorfismos de ADN mediante PCR.

En el análisis con micro satélites de identificación de resistencia a *Mononychellus tanajoa* (Acari: Tetranychidae) realizado por Choperena et al. (2012), reportaron que en la

búsqueda de genes asociados con resistencia a plagas los marcadores facilitan la identificación y que su uso para el manejo integrado de plagas es clave para determinar la resistencia de la planta hospedera.

Guevara et al. (2015) compararon la utilidad de tres métodos de extracción de ADN a partir de garrapatas del complejo *Rhipicephalus sanguineus*, potenciales vectores de enfermedades y establecieron que se requiere la utilización de extractos de ADN de buena calidad para posteriores análisis de ampliación de genes de estos patógenos. En la investigación los métodos de extracción fueron tres: basado en agente caotrópico Tiocianato de Guanidina (método 1), alta concentración de sales (método 2) y un método de extracción establecido en columnas disponible comercialmente (método 3).

Reyes et al. (2015), establecieron que, para la identificación molecular se extrae el ADN a partir de ácaros hembras. Los especímenes se mantuvieron en placas con agua-agar y la identificación morfológica se realizó utilizando claves taxonómicas. Para la identificación molecular, inicialmente se extrajo el ADN y se sintetizaron oligonucleótidos con base en la secuencia ITS2 de *Sancassania mycophaga* y se amplificó mediante la PCR que se purificó utilizando un kit comercial. El fragmento obtenido fue secuenciado y analizado con la homología de las secuencias nucleotídicas en la base de datos del GenBank del NCBI con el programa BLAST.

Matsuda et al. (2014) mencionaron que en la sub-familia de los ácaros Tetranychidae incluye plagas agrícolas. La región espaciadora transcrita interna (ITS) de los genes del ARN ribosómico nuclear y el citocromo oxidasa (ICO) del ADN mitocondrial se han utilizado para la identificación de especies y la reconstrucción filogenética en la sub-familia Tetranychinae, los cuatro géneros (*Oligonychus*, *Tetranychus*, *Schizotetranychus* y *Eotetranychus*) fueron determinados como polifiléticos.

### 2.1.3. Control

En estudios con otro tipo de organismos patógenos a las plantas, se han probado los extractos vegetales como elementos controladores de los daños (Fernández y Laurentin. 2016) destacaron que la alta incidencia del hongo *Fusarium* en ajonjolí potencia a los extractos vegetales como su control, que en general los usos de extractos de la raíz de ajonjolí inhibió el crecimiento y desarrollo del hongo, mientras que los extractos de tallo tendieron a estimular el crecimiento del mismo.

Eamsobhana et al. (2009) expusieron al ácaro *Leptotrombidium chiggers* (Acari: Trombiculidae) durante un máximo de 5 minutos a diferentes aceites de plantas para probar cuál de ellas da mejor resultado para la repelencia y muerte del ácaro. Cuatro de los 13 aceites esenciales fueron repelentes eficaces contra *Niguas imphalum*. El aceite de *Syzygium aromaticum* (clavo) mostró una repelencia al 100% a una concentración del 5% (dilución con etanol absoluto), mientras que el aceite de *Melaleuca alternifolia* (árbol de té) mostró un 100% de repelencia al 40% de concentración demostrando que varios aceites esenciales aromáticos de estas plantas pueden ser útiles como repelente. Los aceites no diluidos de *Zingiber cassamunar* (plai) y glóbulos de *Eucalyptus* (goma azul) exhibieron 100% de repelencia. De los nueve aceites esenciales restantes, sólo el 100% de *Pelargonium graveolens* (geranio) exhibió una repelencia del 50%. El aceite de *Styrax torkinensis* (benzoína) no mostró ninguna repelencia.

Sarmah et al.(2009) evaluaron cuatro extractos acuosos de plantas (EPA): *Acorus calamus* (L), *Xanthium strumarium* (L), *Polygonum hydropiper* (L) y *Clerodendron infortunatum* (Gaertn) a 2,5, 5,0 y 10,0% (p / v ) contra el ácaro de la araña roja del té, *O. coffeae* (Nietner). También se estudió el impacto de los EPA sobre la supervivencia y la alimentación de *Stethorus gilvifrons*, un conocido depredador de *coccinellida* del ácaro. Los parámetros evaluados fueron actividad ovicida y actividad acaricida en el caso de ácaros rojos, actividad alimentaria y mortalidad de adultos para el *coccinelido*. Se observó

una fuerte acción ovicida con *X. strumarium* (87,09%) y *A. calamus* (70,62%), mientras que la menor acción en *P. hydropiper* (30,86%) y *C. infortunatum* (20,58%).

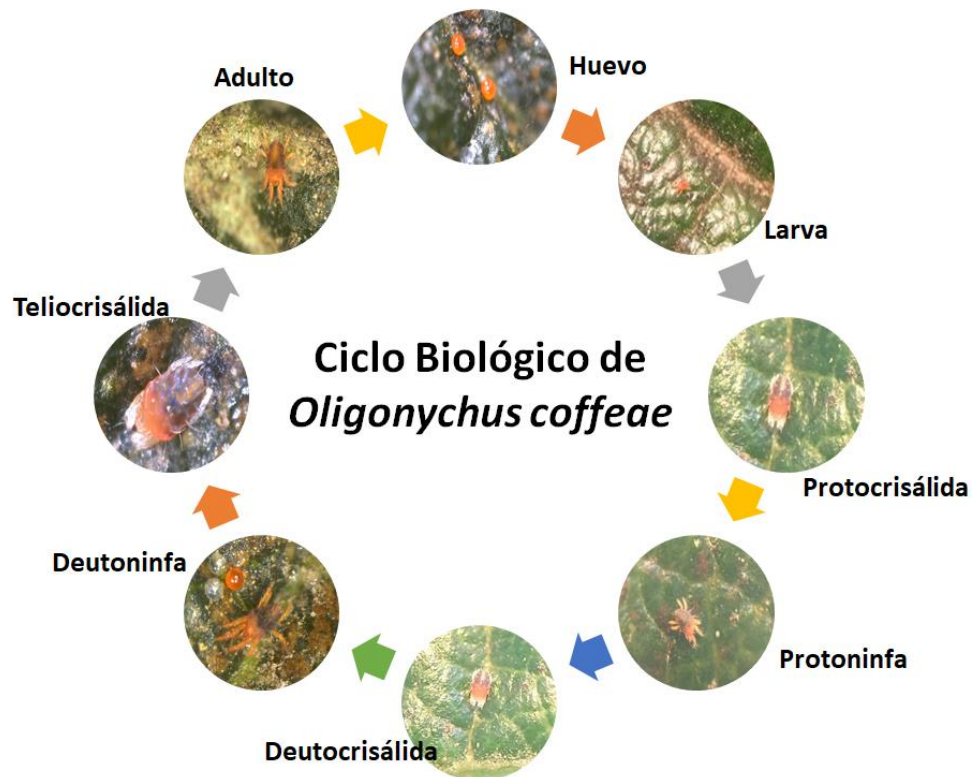
## 2.2. CATEGORÍAS FUNDAMENTALES O MARCO CONCEPTUAL

### Bilología del ácaro

### Taxonomía

*O. coffeae* fue descrito por vez primera por Nietner en 1861 en plantas de café *Coffea arabica* en Sri Lanka (Nietner, 1861). Pertenece al orden Acari y a la familia Tetranychidae, que está formada por un elevado número de especies fitófagas que se alimentan del contenido celular de las hojas (Doreste, 1988).

### Ciclo Biológico



**Figura 1.** Ciclo biológico de *O. coffeae*  
Elaborado por: Paredes, 2017

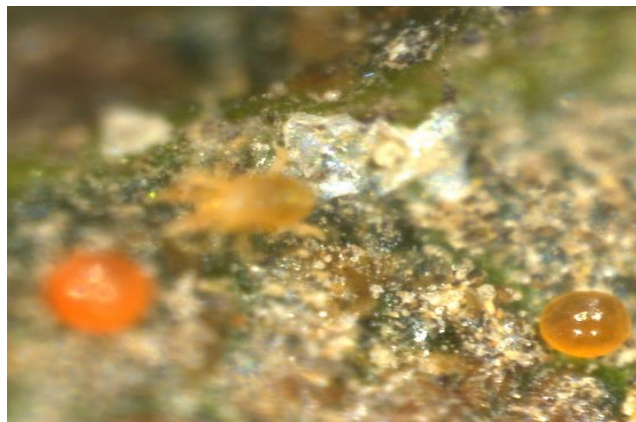
Presenta metamorfosis incompleta que incluye estadios de huevo, larva, protoninfa, deutoninfa y adulto; con tres etapas de quiescencia que se identifican porque el ácaro no se alimenta y permanece inmóvil entre dos etapas continuas fijas Roy et al.(2014) en el caso de los ácaros el primer instar móvil se denomina larva (Giraldo et al.2013)



**Figura 2.** Ácaros de *O. coffeae* en estadio quiescente  
**Elaborado:** Paredes, 2017

Huevo: redondos y brillantes siendo de color rojo sangre pasando a aclararse antes de la eclosión, la oviposición se da en las nervaduras principales.

Larva: eclosionadas con forma de pera y con tres pares de patas.



**Figura 3.** Larva de *O. coffeae*  
**Elaborado:** Paredes, 2017

Dos estados de ninfas donde el ácaro presenta cuatro pares de patas (Giraldo et al.2011), cuerpo oval seguida por la etapa deutoninfa donde ya se puede diferenciar los sexos (Roy et al.2014)

Adulto: Siendo visibles a simple vista, su color varía entre los de matices de naranja a rojo con pintas negras. Diferenciándose entre machos y hembras por el tamaño y forma de su cuerpo (Roy et al.2014)



**Figura 4.** Ácaro hembra de *O. coffeae*

**Elaborado:** Paredes, 2017

Según Das et al. (2012) a una temperatura constante 20 °C en la India el ciclo de vida llegó a un período de hasta a 18,8 días. Sin embargo, en temperaturas altas no mayores de 35°C se puede llegar a completar un ciclo en tan solo 7-10 días (Giraldo et al. 2011)

## **Reproducción**

*O. coffeae* puede reproducirse sexual o asexualmente. Machos y hembras del ácaro son sexualmente maduros desde que emergen; los machos buscan hembras en la etapa deutoninfa. Se conoce también que un solo macho puede fertilizar a más de una hembra (Das, 1959).



**Figura 5.** Copulación de *O. coffeae*

**Elaborado:** Paredes, 2017

La reproducción asexual se da por medio de partenogénesis, es decir, que la capacidad reproductiva de esta especie no está limitada por la presencia de los machos, las hembras originan progenie sin necesidad de cópula donde los huevos no fertilizados dan lugar sólo a machos (Reis et al. 1997)



**Figura 6.** Ácaro *O. coffeae* hembra con larva

**Elaborado:** Paredes, 2017

### **Hábitos de alimentación**

Sintomatología: En *O. yothersi* la sintomatología es la existencia de pequeñas punteaduras en el envés del limbo de la hoja originando una decoloración plateada y se da en sus primeras fases (León, 2003).



El daño a la planta de *O. coffeae* es ocasionado por larvas, ninfas y ácaros adultos, que se nutren de la savia de las hojas y ocasionalmente sobre los pecíolos (Das, 1959). Su ataque es principalmente confinado al haz del follaje maduro. Como resultado de la alimentación, las hojas maduras se convierten en bronce rojizo y, en consecuencia, puede llegar a producir la senescencia de dicho órgano e incluso llegar a secar la planta por completo (Giraldo et al. 2011).

Las colonias de *Oligonychus* se desarrollan en la cara superior de las hojas, junto a nervaduras. Como resultado de su alimentación provocan una decoloración del área afectada la que pierde su coloración verde para volverse café a bronceada (López, 1991).



**Figura 7.** Colonias de *O. coffeae*.  
**Elaborado:** Paredes, 2017

Plantas huésped: *O. coffeae* se distribuye ampliamente en todo el mundo. Esta registrado en 48 países conocida también como una importante plaga en aproximadamente 133 cultivos que incluyen: *Camellia sinensis* (té), *Anacardium occidentale* (anacardo), *Cinnamomum camphora* (laurel alcanfor), cítricos, *Elaeis guineensis* (palma africana), *Eucalyptus globulus* (eucalipto), *Gossypium* sp. (algodón), *Hevea brasiliensis* (caucho), *Magnifera indica* (mango), *Manihot esculenta* (yuca), *Morusalba* (mora), *Vitis vinifera* (vid) (Roy et al.2014). Principalmente reportada en *C. arabica* (café arábigo) y recientemente en *A. acuminata* (aliso) donde se realiza la investigación.

## 2.2.2. Especies vegetales

### 2.2.2.1. Aliso (*Alnus acuminata*) Kunth (1817)

#### Taxonomía

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Fagales

Familia: Betulaceae

Género: *Alnus*

Especie: *Alnus acuminata*



**Figura 8.** Aliso en Querochaca.

**Elaborado:** Paredes, 2017.

## **Origen**

Especie originaria de México y Centroamérica. Se extiende desde el noroeste de México hasta el norte de Argentina y los Andes de Perú, Ecuador y Bolivia introducido satisfactoriamente en el sur de Chile y en Nueva Zelanda (Aguilar et al.2011).

## **Habitat**

El género *Alnus* se puede encontrar en laderas montañosas muy inclinadas con condiciones secas creciendo igualmente en las riberas de los ríos y en pendientes húmedas. Se desarrolla en áreas de nubosidad, con neblina frecuente. Su rango de temperatura va de 4 a 27 °C soportando precipitaciones de 1,000 a 3,000mm o más; suelos limosos, profundos, de textura mediana, rojizo, ricos en materia orgánica (González, 2004).

## **Descripción Botánica**

Árbol perennifolio, crece hasta 30m. Presenta una copa estrecha y piramidal en plantaciones, en bosque denso alcanza una mayor proporción de tronco libre de ramas y nudos por una poda natural con un sistema radical poco profundo, amplio y extendido; es una planta monoica. La hoja donde se aloja el ácaro es ovalada, margen biserrado de consistencia áspera (González, 1989).

## **Importancia económica**

Utilizado como una especie maderable de muy fácil aserramiento y modelado para mueblería fina y artesanías, combustible (leña) Añazco, (1996), además de ser utilizado en Ecuador como una especie nativa para la reforestación en zonas andinas Beltrán et al. (2009) y por su composición de terpenoides utilizado como fármaco antiinflamatorio para la desinflamación Aguilar et al. (2011), igualmente para el tratamiento: sífilis, reumatismo y en la piel enfermedades infecciosas (Martínez, 1984).

### 2.2.2.2 Café (*Coffeae arabica* Linneo 1753)

#### **Taxonomía**

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Gentianales

Familia: Rubiaceae

Subfamilia: Ixoroideae

Género: Coffea

Especie: *Coffea arabica* L.

#### **Origen**

Nativo de África; es la principal especie cultivada para la producción de café y la de mayor antigüedad en agricultura posicionándose como uno de los productos con mayor consumo, datándose su uso a finales del I milenio en la península arábiga (Silvarolla et al. 2004).



**Figura 9.** Planta de café en Palora.

**Elaborado:** Paredes, 2017

## **Hábitat**

El café arábico es cultivado a altitudes entre los 900-2100 m.s.n.m. a una temperatura óptima entre 15-24 °C. Esta especie tiene un potencial para producir cafés con tazas limpias, notas dulces, fructuosas, y con mayor acidez (MacVean, 2003).

## **Descripción Botánica**

Monroy, (2015) señaló que la especie Arábica bajo libre crecimiento puede llegar a medir hasta 6m de alto, con ramas de crecimiento vertical con hojas onduladas, las plantas jóvenes pueden comenzar a tener floración entre los 12-15 meses y producir su primera cosecha en 2 años. Los frutos del cafeto tardan entre 7 a 9 meses en alcanzar su estado óptimo de madurez.

## **Importancia Economica en Ecuador:**

El cultivo de café, en Ecuador, es de gran importancia en lo económico, social y ambiental. En Ecuador existen 105.271 Unidades de Producción Cafetalera donde se ocupan similar número de familias en las actividades de producción y varios miles adicionales, en las labores de transportación, comercialización, procesamiento, industrialización y exportación del grano (Censo Agropecuario, 2000).

### **2.2.3 Marcadores Moleculares**

Los marcadores moleculares nos permiten conocer cómo se encuentran las proporciones de genes en las poblaciones naturales de manera indirecta, o directa con estudios de ADN. Los diferentes tipos de marcadores se distinguen por su capacidad de detectar polimorfismos en loci únicos o múltiples que pueden ser de tipo dominante o co-dominante (Picó y Pérez 2008).

Los análisis genéticos usando marcadores moleculares proporcionan una poderosa herramienta para entender la distribución de las fuentes genéticas en poblaciones (Picó y Pérez 2008).

Los marcadores moleculares son una herramienta necesaria, los de tipo RAPD (*Random amplified polymorphic ADN*), que consisten en un método de detección de polimorfismos en la secuencia de ADN, basado en la reacción en cadena de la polimerasa (Mullis, 1990).

Los RAPDS basan su concepto en la probabilidad estadística de que se presentan sitios complementarios al oligonucleótido de 10 pares de bases a lo largo del genoma, revelando niveles de variación de ADN (Rentarías, 2000).

Los polimorfismos RAPD se heredan de manera mendeliana y pueden aprovecharse para construir mapas genéticos, al mismo tiempo utilizarse para detección de variabilidad. Al no requerir ningún conocimiento previo de la secuencia del organismo con el que se está trabajando los convertía en una alternativa económica y rápida para muchas aplicaciones. (Picó y Pérez 2008).

#### **2.2.4 Extractos Etanólicos**

Los aceites esenciales por ser líquidos volátiles y encontrarse distribuidos en las plantas, pueden ser retirados por destilación con arrastre de vapor de agua; este procedimiento puede ser implementado en la región del Amazonas, por no requerir tecnología sofisticada, pues requiere implementar equipos económicos (González, 2004).

Las defensas naturales de las plantas contra plagas que atacan al follaje consisten la mayoría de veces en mezclas de compuestos relacionados estrechamente con el agente tóxico este fenómeno es una muestra clara de la eficacia de los insecticidas botánicos como los extractos etanólicos (Isman, 1995).

La reproducción de *Oligonychus ilicis* va muy ligada a la aplicación de insecticidas de amplio espectro, a los cuales presenta cierta resistencia y que eliminan la mayor parte de sus depredadores naturales. Así, la aplicación de insecticidas de base piretroides, no acabará con la plaga, por el contrario, producirá un daño generalizado (Reis et al. 1974).

Para aprovechar las sustancias activas de una planta, se recurre frecuentemente a los extractos. El proceso de extracción consiste en incorporar las sustancias activas de una planta a un solvente, que generalmente suele ser agua o alcohol; se puede realizar en frío o en caliente, y el producto resultante puede ser una solución concentrada o espesa en función de la sustancia de origen, o expresarse por propio interés en base a la aplicación que se le vaya a dar (González, 2004).

La utilización de extractos etanólicos de plantas para disminuir la incidencia de microorganismos es una estrategia que ha tenido apogeo en los últimos años, sin embargo, se requiere estudios sobre el patógeno o plaga para determinar su efecto. Los estudios del efecto de extractos de plantas sobre microorganismos son un punto de partida de nuevas destrezas de control y de caracterización de genotipos de plantas que posean moléculas con actividad antimicrobiana, de manera que puedan ser agregados en programas de mejoramiento genético (Fernández y Laurentin, 2016).

## CAPÍTULO III

### HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

#### 3.1. HIPÓTESIS

Las especies de plantas hospederas (aliso y café) así como los extractos vegetales de las mismas inciden sobre el ciclo biológico de *O. coffeae*.

#### 3.2. OBJETIVOS

##### 3.2.1. Objetivo general

Estudiar el ciclo biológico de *O. coffeae* en *A. acuminata* y en *C. arabica* y el efecto de sus extractos vegetales sobre su biología.

##### 3.2.2. Objetivos específicos

Determinar la duración del ciclo de vida (huevo-adulto) de *O. coffeae* cuando se cría en hojas de aliso y café.

Determinar la longevidad de hembras de *O. coffeae* criadas en hojas de aliso y café.

Calcular la fecundidad de hembras de *O. coffeae* criado en hojas de aliso y café.

Evaluar la mortalidad producida por diferentes dosis del extracto etanólico de hojas de aliso y café, sobre hembras adultas de *O. coffeae*.

Determinar la variabilidad genética de *O. coffeae* mediante marcadores RAPD.



## **CAPÍTULO IV**

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **4.1. UBICACIÓN DEL EXPERIMENTO**

##### **4.1.1. Investigación**

La investigación se realizó en el laboratorio de Biotecnología ubicado en la Granja Experimental Docente “Querochaca”, de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, en el cantón Cevallos, provincia de Tungurahua.

##### **4.1.2. Material vegetal**

###### ***Alnus acuminata***

Se tomó muestra de aliso de dos pisos altitudinales en Querochaca, cantón Cevallos, provincia de Tungurahua y en Pasa cantón Ambato, provincia de Tungurahua.

###### ***Coffea arabica***

Las muestras de café se tomaron en Sangay cantón Palora, provincia de Morona Santiago y en Moravia cantón Mera, provincia de Pastaza.

#### **4.2. CARACTERIZACIÓN DEL LUGAR**

##### **4.2.1. Investigación**

Para el experimento se utilizó el laboratorio de Biotecnología que está ubicado en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato en el sector El Tambo, parroquia la Matriz perteneciente del Cantón Cevallos, provincia de Tungurahua.

La localidad se halla a 2850 msnm sus coordenadas geográficas son: 01° 24' 27'' de latitud Sur y a 78° 35' 00'' de longitud Oeste, ubicado a 19,31 km, al Sureste de Ambato.

#### **4.2.2. Material vegetal**

Se trabajó con las especies *Alnus acuminata* obtenidas en Querochaca, cantón Cevallos, provincia de Tungurahua ubicada a una altura de 2850 msnm sus coordenadas geográficas son: 01° 27' 00'' de latitud Sur y a 78° 35' 00'' de longitud Oeste y en Pasa cantón Ambato, provincia de Tungurahua, hallada a una altura de 3100 msnm cuyas coordenadas geográficas son: 01° 16' 00'' latitud Sur y longitud: 78° 43' 50'' Oeste.

*Coffea arabica* recolectado en Sangay cantón Palora, provincia de Morona Santiago localizado a una altura de 880 msnm a una latitud Sur de 1° 48' 00'' y una longitud Oeste de 77° 55' 50'' y en Moravia cantón Mera, provincia de Pastaza situado a una altura de 1100 msnm, coordenadas geográficas: latitud Sur de 1° 28' 50'' y una longitud Oeste de 78° 04' 01''.

### **4.3. EQUIPOS Y MATERIALES**

#### **4.3.1. Equipos**

Estereoscopio con cámara

Incubadora

Microscopio con cámara

Baño María

Cámara de flujo laminar

Estufa

Autoclave

Microondas

Refrigerador

Destilador de agua

Vortex

Balanza digital

Cámara de electroforesis  
Termociclador  
Centrífuga  
Agitador magnético  
Multiparamétrico de mesa  
GPS  
Cámara digital

#### **4.3.2. Materiales**

Hoja de aliso  
Hoja de Café  
Colonia de *O. coffeae*  
Recipientes plásticos  
Bolsas plásticas con cierre hermético  
Papel absorbente  
Capsulas plásticas  
Pincel 000  
Tijera  
Marcador de tinta indeleble  
Etiquetas  
Lupa  
Mortero y pistilo  
Pinzas  
Almohadilla de poliuretano de 1cm de espesor  
Algodón  
Piseta con agua destilada  
Vasos plásticos  
Mortero  
Líquido de Hoyer  
Porta y cubre objetos  
Esferos de distintos colores

Cuaderno grapado de 100 hojas  
Tubos eppendorf  
Tris-HCL  
NaCl  
EDTA  
SDS  
Aguja de disección  
Varilla de vidrio  
Proteinasa K  
RNasa K  
Fenol  
Cloroformo  
Alcohol isoamílico  
Etanol  
CTAB  
Pellet  
Cyber  
Ladder  
Loading  
Buffer TE (25 Mm KCL, 10 Mm Tris-HCL, pH 8.3)  
Bromuro de etilo (BrEth) 1 %.  
Buffer TE (Tris HCl 100mM; EDTA 1mM) pH 7  
Erlenmeyer (125, 250, 500) ml  
Probeta de (10, 50, 100) ml  
Vaso de precipitación (50, 500,100) ml  
Aguja de disección  
Alfileres con cabeza de colores  
Caja de guantes de látex  
Bolsa con 1000 tubos eppendorf de 1,5 ml y de 0,2ml  
Puntas amarillas  
Imanes

Papel filtro  
 Funda de ligas  
 Papel aluminio  
 Hidrómetro  
 Set de micro pipetas desde 0,2 ml a 1,5 ml  
 Agar pure  
 Cinta masking  
 Cápsulas de porcelana  
 Frascos ámbar  
 Espátula  
 Papel parafilm  
 Tubos para PCR  
 Gradilla para tubos eppendorf  
 Cubeta  
 Iniciadores

<i>Nombre del iniciador</i>	<i>Secuencia (5' - 3')</i>
<b>OPA-01</b>	CAGGCCCTTC
<b>OPA-03</b>	AGTCAGCCAC
<b>OPB-10</b>	CTGCTGGGAC
<b>OPB-13</b>	TTCCCCCGCT

**Tabla 1.** Iniciadores moleculares PCR

**Elaborado:** Paredes, 2017

#### **4.4. FACTORES EN ESTUDIO**

Los factores de estudio sobre la biología del ácaro *O. coffeae* fueron:

1. Ciclo biológico
2. Longevidad
3. Fecundidad
4. Proporción sexual
5. Variabilidad genética
6. Mortalidad después de control

## 4.5. TRATAMIENTOS

Los tratamientos constituyen la combinación de los factores en estudio.

### 4.5.1. Biología del ácaro

CULTIVO	REPETICIÓN	H	L	PC	PN	DC	DN	TC	TOTAL
1	30	#	#	#	#	#	#	#	Suma
2	30	#	#	#	#	#	#	#	Suma

**Tabla 2.** Tratamientos de biología del ácaro

**Elaborado:** Paredes, 2017

### Estadio en días

H= Huevo

L= Larva

PC= Protocrisálida

PN= Protoninfa

DC= Deutocrisálida

DN= Deutoninfa

TC= Teliocrisálida

A= Adulto

### Especies vegetales

C1 = Aliso

C2 = Café

### 4.5.2. Marcadores moleculares

CULTIVO	LOCALIDAD	LOCALIDAD
	1	2
1	C1Q1R1	C1A1R1
2	C2P1R1	C2M1R1

**Tabla 3.** Tratamientos de marcadores moleculares

**Elaborado:** Paredes, 2017

## Cultivo

C1 = Aliso

C2 = Café

## Localidad

Q1 = Querochaca

P1 = Pastaza

A1 = Ambato

M1 = Morona

### 4.5.3. Control

#### Tiempo de observación

T1 = 24 h

T2 = 48 h

T3 = 72 h

T3 = 96 h

#### Dosis de aplicación

D1 = Acaricida 5%

D2 = Extracto 5%

D3 = Extracto 10%

D4 = Extracto 20%

Los tratamientos constituyen la combinación de los factores en estudio:

N°	SÍMBOLO	TRATAMIENTO
1	T <sub>1</sub> D <sub>1</sub>	24 horas con acaricida al 5%
2	T <sub>1</sub> D <sub>2</sub>	24 horas con extracto al 5%
3	T <sub>1</sub> D <sub>3</sub>	24 horas con extracto al 10%
4	T <sub>1</sub> D <sub>4</sub>	24 horas con extracto de 20 %
5	T <sub>2</sub> D <sub>1</sub>	48 horas con acaricida al 5%
6	T <sub>2</sub> D <sub>2</sub>	48 horas con extracto al 5%

7	T <sub>2</sub> D <sub>3</sub>	48 horas con extracto al 10%
8	T <sub>2</sub> D <sub>4</sub>	48 horas con extracto de 20 %
9	T <sub>3</sub> D <sub>1</sub>	72 horas con acaricida al 5%
10	T <sub>3</sub> D <sub>2</sub>	72 horas con extracto al 5%
11	T <sub>3</sub> D <sub>3</sub>	72 horas con extracto al 10%
12	T <sub>3</sub> D <sub>4</sub>	72 horas con extracto de 20 %
13	T <sub>4</sub> D <sub>1</sub>	96 horas con acaricida al 5%
14	T <sub>4</sub> D <sub>2</sub>	96 horas con extracto al 5%
15	T <sub>4</sub> D <sub>3</sub>	96 horas con extracto al 10%
16	T <sub>4</sub> D <sub>4</sub>	96 horas con extracto de 20 %

**Tabla 4.** Tratamientos de control con extractos

**Elaborado:** Paredes, 2017

#### 4.6. DISEÑO EXPERIMENTAL

Los resultados de duración de ciclo biológico, longevidad, fecundidad de *O. coffeae* conseguidos fueron procesados mediante un diseño completamente al azar contabilizando individuos obtenidos de cada unidad experimental.

El ensayo fue conducido en un diseño experimental completamente al azar con un arreglo de tratamientos en parcelas divididas, siendo la parcela principal representada por el tiempo de exposición y la sub-parcela por las diferentes dosis de aplicación con cuatro repeticiones.

#### 4.7. VARIABLES RESPUESTA

##### 4.7.1. Identificación de las poblaciones de *O. coffeae*:

Se llevó la muestra bajo el aumento del microscopio estereoscópico, las hojas fueron examinadas para seleccionar los ácaros. Según la clave taxonómica de Gutiérrez (1985) y la especie fue determinada por comparación con la morfología del aedeago.



#### 4.7.2. Determinación del ciclo de vida de *O. coffeae* en hojas de aliso y café:

La unidad de cría o arena consistió en una cápsula de Petri (9 cm de diámetro x 1,5 cm de altura), dentro de la cual se ajustó una almohadilla circular de poliuretano de 1cm de espesor. Seguidamente, se colocó una hoja sana de aliso y café con el haz hacia arriba sobre la almohadilla y fijada con una banda de algodón humedecida de 1 cm de ancho, con el fin de evitar el escape de los ácaros y mantener la turgencia de la hoja. Se prepararon 10 arenas con dos discos de hoja de 4 cm en cada una y sobre cada disco se colocó cinco hembras y dos machos de *O. coffeae*.



**Figura 10.** Arenas de hojas de aliso y café para observación de ciclo biológico de *O. coffeae*

**Elaborado:** Paredes, 2017

Diariamente, las arenas fueron humedecidas dos veces con agua destilada. La toma de datos fue dos veces al día donde se registró el número de huevos depositados por arena. Una vez obtenido un total de 60 huevos, los ácaros, machos y hembras, fueron descartados (Vásquez et al. 2014)



**Figura 11.** Huevos de *O. coffeae* en arenas

**Elaborado:** Paredes, 2017

Cada 12 horas, cada una de las arenas fue observada bajo aumento del microscopio estereoscópico para determinar el tiempo de incubación de la fase de huevo. Una vez emergidas las larvas, estas fueron individualizadas en arenas para determinar el tiempo de desarrollo de las fases subsiguientes hasta la emergencia del adulto.



**Figura 12.** Tesista observando el ciclo en las arenas de *O. coffeae*  
**Elaborado:** Paredes, 2017

#### **4.7.3. Determinación de la proporción sexual de *O. coffeae* en hojas de aliso y café:**

La proporción sexual de la descendencia (PSD) del ácaro fue medida con los datos obtenidos durante el estudio de fecundidad. Se registró la progenie producida por hembra en cada una de las arenas. Seguidamente, la descendencia fue separada por dimorfismo sexual y la PSD se expresa en relación hembra: macho.



**Figura 13.** Cría de ácaros

**Elaborado:** Paredes, 2017.

#### **4.7.4. Determinación del tiempo de preoviposición, oviposición, postoviposición, fecundidad y longevidad de *O. coffeae*:**

Para el estudio de los períodos de preoviposición, oviposición y postoviposición se colocó una hembra y un macho recién emergidos en una arena preparada. El macho fue colocado junto a la hembra durante dos días para promover la cópula y después descartarlo. El número de arenas fue replicado 10 veces.

Diariamente, se registró el número de huevos hembra-1 arena-1 durante su ciclo de vida. La longevidad de la hembra fue graficada con relación al número de huevos puestos diariamente para mostrar la relación existente entre la fecundidad y la edad de la hembra.

#### **4.7.5. Evaluación de la mortalidad producida por diferentes dosis del extracto etanólico de hojas de Aliso y Café, sobre hembras adultas de *O. coffeae*.**

Las hojas maduras obtenidas de plantas de aliso y café usadas para la preparación del extracto crudo fueron colectadas de Pastaza y Tungurahua. Para la preparación de los extractos las hojas fueron secadas en estufa (40 °C durante 72 horas) y posteriormente molidas con un mortero hasta obtener un polvo, se pesó la muestra vegetal húmeda y la muestra seca.

Los extractos orgánicos fueron preparados a partir del polvo de hoja, en etanol 96% (en proporción 1:5 p/v). Esta mezcla fue mantenida en maceración durante 3 días y finalmente fue filtrada usando papel de filtro.



**Figura 14.** Extractos de aliso y café destilado con papel filtro en Erlenmeyer de 125ml  
**Elaborado:** Paredes, 2017.

El solvente remanente de la solución filtrada fue sometido a eliminación en un Baño María a 65°C. Las dosis finales fueron de 5, 10 y 20 % de la solución original en agua destilada. Los discos de hoja fueron expuestos por 20 segundos las respectivas dosis. Se hicieron 4 repeticiones de cada una con 5 ácaros hembras en cada repetición. Se usó el acaricida OMITE al 5% de concentración como control positivo.



**Figura 15.** Hojas sumergidas 20 segundos para ensayo.  
**Elaborado:** Paredes, 2017.

#### **4.7.6. Determinación la variabilidad genética de *O. coffeae* mediante marcadores RAPD.**

En la extracción de ADN se utilizó el método descrito por Doyle y Doyle, (1990) con modificaciones menores, consistentes en aumentar la cantidad de buffer de extracción y

usar isopropanol para la precipitación. Se pulverizó la muestra de ácaros hembra en un mortero y se colocó en un tubo para micro centrifuga, se le agregaron 800 µl de solución de extracción recién preparado y se incubó a 65°C en baño María.

Se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 min, y se transfirió la fase acuosa (superior) a un tubo nuevo. Inmediatamente se agregó un volumen igual de cloroformo–alcohol isoamílico y se mezcló por inversiones suaves. Se volvió a centrifugar a 10,000 rpm por 10 min y se separó nuevamente la fase superior en un tubo nuevo.

Para la eliminación de ARN se trató con ARNasa (10 mg/ml) incubando durante 30 min. a 37°C. En seguida se agregaron 800 µl de isopropanol a -20°C, y se colocó una hora en el congelador para precipitar el ADN. Para formar la pastilla de ADN, se centrifugó nuevamente a 10,000 rpm por 10 min. Se tiró el sobrenadante, se lavó la pastilla con 400 µl de solución de lavado una y otra vez, con 400 µl de alcohol al 70%. Se dejó secar a temperatura ambiente y se re suspendió en una cantidad 1:1 de solución TE 1X.

Para la amplificación de ADN se utilizó el método descrito por Vásquez et al. (2011), el ADN se estimó en 10 ng por métodos de comparación y amplificado usando PCR, siguiendo la metodología señalada por Osakabe et al. (2000), usando 2 ng de los iniciadores OPA 01, OPA 03, OPB 10, OPB 13 (0,1mM) (Operon Technologies) con las secuencias que se muestra en la tabla 1 en 1,5 µl de buffer (25 mM MgCl<sub>2</sub>, 50mM, KCl, 10mM Tris-HCl, pH 8,3), conteniendo desoxinucleótidos (dNTPs) (10mM), Taq polimerasa (5u/µL), gelatina a 0,025 % y el ADN de la muestra.

La PCR fue realizada en un termociclador (Perkin Elmer Gene Amp PCR System 2400), bajo las siguientes condiciones: pre-desnaturalización a 93 °C por 1 min, seguido de 45 ciclos, de desnaturalización 92 °C 1 min, alineación 36 °C por 1 min y acoplamiento 72 °C por 1 min, post acoplamiento 72 °C por 5 min y preservación a 4 °C hasta su utilización. La separación del ADN amplificado de cada muestra se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa 1,5 %, con solución TAE (Tris base 40 mM; acetato de sodio 5mM;

EDTA 7,7 mM) (1X, pH 8). Se utilizó un marcador de 100 pb, y los geles fueron sometidos a 80 volt/1,25 horas. Posteriormente, fueron teñidos en Bromuro de etiidio (BrEth) 1 %. Las bandas obtenidas fueron codificadas en una matriz binaria presencia ausencia.



**Figura 16.** Cámara de electroforesis con gel de muestra de ADN de aliso y café.  
**Elaborado:** Paredes, 2017

#### **4.8. PROCESAMIENTO DE LA INFORMACIÓN**

Los extractos tuvieron dosis de (5, 10, 20) % y un control que es el acaricida OMITE; con parcelas divididas. La parcela principal fue la especie de planta *Alnus acuminata* y *Coffea arabica* por la sub-parcela que es la dosis.

La utilización de marcadores moleculares ADN: se usaron entre 15 y 20 ácaros hembras por especie y localidad. Cada muestra de ADN se amplificó con cuatro iniciadores al azar. Los datos se reportaron en relación al porcentaje de polimorfismos del total de bandas amplificadas.

## CAPÍTULO V

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 5.1. Ciclo biológico de *Oligonychus coffeae* criado en hojas de aliso y café

El ciclo biológico (huevo-adulto) de *O. coffeae* mostró diferencias por efecto del sustrato de cría, siendo significativamente más corto cuando fue criado sobre discos de hoja de *Coffea arabica* (Tabla 5). Estas diferencias fueron principalmente debidas al efecto sobre el tiempo de duración de todas las fases de desarrollo del ácaro, excepto en las fases de protoninfa y deutocrisálida, en las cuales no se detectaron diferencias.

	Aliso	Café
<b>Huevo</b>	14,40 ± 1,52 b (11,00 – 17,00)	12,80 ± 1,51 a (11,00 – 16,00)
<b>Larva</b>	4,15 ± 0,68 b (3,00 – 5,50)	3,22 ± 0,48 a (2,50 – 4,50)
<b>Protocrisálida</b>	2,97 ± 0,56 b (2,00 – 4,00)	2,23 ± 0,47 a (1,50 – 3,00)
<b>Protoninfa</b>	3,27 ± 0,47 b (2,50 – 4,00)	3,13 ± 0,41 b (2,50 – 4,00)
<b>Deutocrisálida</b>	2,07 ± 0,21 b (2,00 – 3,00)	1,80 ± 0,28 b (1,50 – 3,00)
<b>Deutoninfa</b>	3,02 ± 0,53 b (2,00 – 4,00)	3,70 ± 0,45 a (3,00 – 4,00)
<b>Teliocrisálida</b>	2,08 ± 0,23 b (1,50 – 2,50)	1,87 ± 0,22 a (1,50 – 2,00)
<b>Total</b>	41,70 ± 1,45 b (39,00 – 45,00)	36,48 ± 1,61 a (32,00 – 39,00)

Valores seguidos de la misma letra no mostraron diferencias significativas de acuerdo a prueba de medias según Tukey ( $p < 0,001$ ). Los valores son presentados como el promedio proveniente de XX repeticiones seguidos de su desviación estándar. Número entre paréntesis representan los valores mínimos y máximos de cada parámetro

**Tabla 5.** Duración en días ( $\pm$ D.E.) del ciclo biológico (huevo-adulto) de *O. coffeae* criado en hojas de *A. acuminata* y *C. arabica*.

**Elaborado:** Paredes, 2017.

De acuerdo con Beckerman et al. (2006), las variaciones en el tiempo de incubación podrían ser atribuibles a efectos ambientales de la madre, tales como edad de la madre, densidad de cría y la disponibilidad como calidad del alimento donde fue criada.

De estos factores, solo la densidad de cría pudo haber ejercido algún efecto, puesto que en este estudio todas las madres fueron colectadas aleatoriamente en la misma localidad y planta hospedera por lo que estos factores no parecen explicar las variaciones observadas en el tiempo de incubación del huevo en ambas especies de plantas.

Con relación a la duración del ciclo biológico (huevo-adulto) de los ácaros fitófagos, estudios previos han determinado que puede ser influenciado por varios factores, incluyendo la planta hospedera, temperatura (Das et al. 2012). Sin embargo, existe poca información disponible sobre el efecto de estos factores sobre la biología de *O. coffeae*. Podder et al. (2014) determinaron que *O. coffeae* alcanzó el estado adulto en 16,17 días cuando fue criado sobre hojas de té (NC) a 20°C y 65% de humedad relativa.

Aunque Srikumar et al. (2015) observaron que esta especie se desarrolló en 18,03 días sobre hojas de aguacate (*Persea americana*) en la India. Aunque los autores no reportaron la temperatura de estudio, se supone que sea bajo condiciones de clima templado puesto que fue hecho a 1065 msnm.

Con relación al efecto de la temperatura, Das et al. (2012) encontraron que el ciclo biológico se prolonga de 8,06 hasta 18,79 cuando la temperatura disminuyó de 20 a 35 °C. De manera similar, Haque et al. (2007) encontraron que el tiempo de desarrollo de *O. coffeae* criado sobre hojas de *Rosa damascaena* varió desde 5,30 a 12,91 días cuando la temperatura disminuyó desde 30,28 a 19,8 °C. Similar a lo observado en el presente estudio, la fase de deutoninfa no fue afectada por la temperatura en el estudio de Haque et al. (2007).

De acuerdo a los resultados, posiblemente las características morfológicas y/o químicas de las hojas de café pudieron haber favorecido el desarrollo de *O. coffeae* por lo que pudiera producir mayor daño económico sobre este cultivo. Skorupska (1998) y Nukenine et al. (2002) indicaron la importancia de la morfología foliar como elemento de resistencia



al ataque de ácaros. Por una parte, se reportó que la multiplicación de ciertos ácaros está significativamente influenciada por el grosor del parénquima esponjoso y en empalizada, así como por el grosor de la hoja y la pubescencia, siendo más atractivas como hospederas, aquellas especies con mayor parénquima y menor pubescencia (Skorupska, 1998), como es el caso de *C. arabica*.

Una observación de las hojas de *A. acuminata*, indica la presencia de pubescencia en su cara adaxial, donde se hospeda *O. coffeae*. Por otra parte, Nukenine et al. (2002), reportaron que existe igualmente una correlación negativa entre la longitud de los tricomas y el daño ocasionado por el ácaro.

Esto se explica como la existencia de un impedimento mecánico al movimiento y a la alimentación. Adicionalmente a esto, como fue descrito en las características morfológicas de estas especies, la hoja de aliso es coriácea, lo cual representa un impedimento físico de resistencia al ataque de organismos patógenos.

Es bien conocido que las especies de betuláceas, entre las cuales se encuentra el aliso, son ricas en metabolitos secundarios (Stout, 1988). Algunos autores han atribuido una alta capacidad citotóxica a los compuestos aislados de las hojas en especies de *Alnus*, entre los cuales merece destacar triterpenos y/o esteroides, flavonoides y taninos. Igualmente, los extractos de hojas de café, se han caracterizado y muestran contenidos de taninos y glucósidos, con presencia de antraquinonas (Bangkok et al. 2012).

Melo et al. (2006) sugirieron que, en café, la resistencia al ataque de patógenos en general, podría estar relacionada con el potencial oxidativo en el tejido de la hoja en relación con la composición en fenoles más que una actividad elevada del fenol oxidasa (PPO), de manera contraria a lo que se ha señalado en otras especies, donde se atribuyen los niveles de resistencia de las plantas a insectos o patógenos a los niveles de actividad PPO (Li y Steffens, 2002; Shimizu, 2004).

## 5.2. Períodos de pre-oviposición, oviposición, post-oviposición y longevidad de *O. coffeae* criado en hojas de *A. acuminata* y *C. arabica*

Tanto los períodos de pre-oviposición, oviposición y post-oviposición, así como la longevidad de las hembras de *O. coffeae* varió por efecto del sustrato de cría (Tabla 6). En plantas de aliso, los períodos de pre-oviposición, oviposición y post-oviposición fueron de 1,50; 6,00 y 2,83 días, mientras que la pre-oviposición en hembras criadas en café fue 28,0% mayor, así como el período de oviposición y post-oviposición fueron 23,67 y 23,32% menor.

	Aliso	Café
<b>Pre-oviposición</b>	<b>1,50 ± 0,55 b</b> (1,00 – 2,50)	<b>1,92 ± 0,37 b</b> (1,50 – 2,50)
<b>Oviposición</b>	<b>6,00 ± 0,45 b</b> (5,50 – 6,50)	<b>4,58 ± 0,38 a</b> (4,00 – 5,00)
<b>Post-oviposición</b>	<b>2,83 ± 0,26 b</b> (2,50 – 3,00)	<b>2,17 ± 0,52 b</b> (1,50 – 3,00)
<b>Longevidad</b>	<b>10,33 ± 0,75 b</b> (9,00 – 11,00)	<b>8,67 ± 1,03 a</b> (7,50 – 10,50)

Valores seguidos de la misma letra no mostraron diferencias significativas de acuerdo a prueba de medias según Tukey ( $p < 0,001$ ). Los valores son presentados como el promedio proveniente de repeticiones seguidos de su desviación estándar. Número entre paréntesis representan los valores mínimos y máximos de cada parámetro.

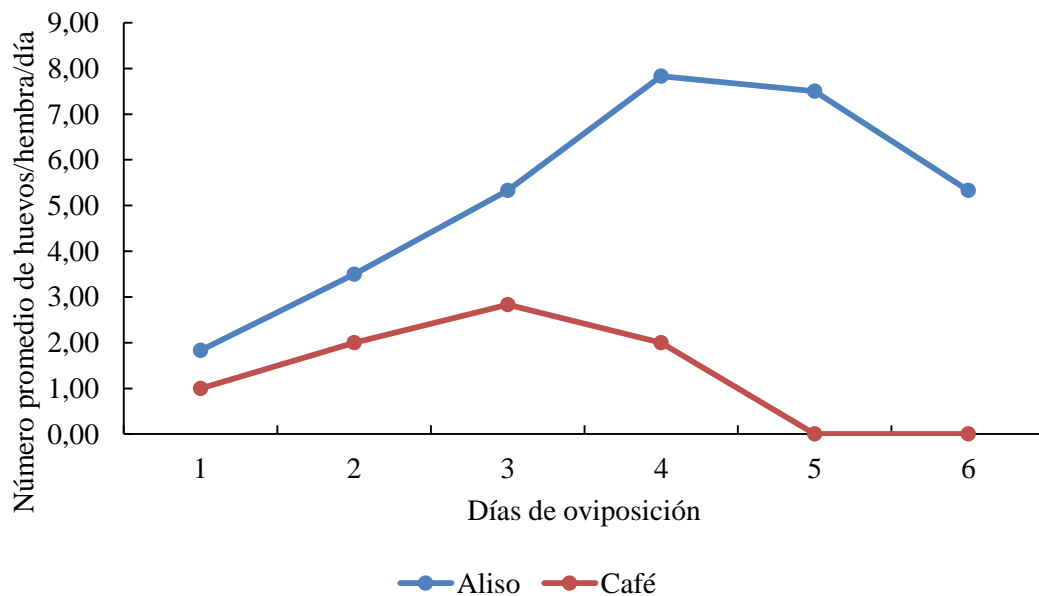
**Tabla 6** Tiempos promedios ( $\pm$ DE) de pre-oviposición, oviposición, post-oviposición y longevidad de hembras de *O. coffeae* criadas en hojas de *A. acuminata* y *C. arabica*  
**Elaborado:** Paredes, 2017.

Con relación a la longevidad, las hembras criadas sobre hojas de aliso vivieron 1,2 veces más que aquellas hembras criadas sobre hojas de café (Tabla 6).

### 5.3. Tasa de oviposición de *O. coffeae* criado en hojas de *A. acuminata* y *C. arabica*

La tasa de oviposición en hembras de *O. coffeae* también fue afectada por el sustrato de cría, siendo superior en hembras criadas en hojas de aliso donde en promedio colocó  $5,32 \pm 2,30$  huevos/hembra/día, para una oviposición total de 31,3 huevos/hembra, mientras que en café la tasa de oviposición fue apenas de  $1,31 \pm 1,16$  huevos/hembra/día, lo cual representó una oviposición total de solo 7,83 huevos/hembra durante su tiempo de vida (Fig. 10). En hojas de aliso, las hembras mostraron una tendencia a incrementar su tasa de oviposición hasta el día 4, cuando alcanzó 7,83 huevos/hembra/día.

Después del cuarto día de oviposición, el número de huevos puesto tendió a decrecer hasta la muerte de las hembras. Contrariamente, las hembras criadas sobre hojas de café la oviposición alcanzaron su máximo número de huevos al tercer día (2,83 huevos) y solo ovipositaron un día más. En una revisión hecha por Roy et al. (2014), una hembra de *O. coffeae* puede ovipositar entre 4 a 6 huevos/día cuando es criada en hojas de té, sin embargo, esto varía de acuerdo al clon usado, temperatura y humedad relativa



**Figura 17.** Oviposición de *O. coffeae* criado en hojas de aliso y café.  
**Elaborado:** Paredes, 2017

Además, estos autores señalan que en general, una hembra es capaz de colocar entre 40-50 huevos, pero este número es sustancialmente mayor (139 huevos) cuando la hembra es criada bajo condiciones óptimas de temperatura (20-30 °C) y humedad relativa (> 49%). De acuerdo con Tabashnik et al. (1981), las variaciones en la tasa de oviposición de un organismo pudieran ser parcialmente explicadas por el efecto tanto de la planta hospedera como por la genética del herbívoro.

Sin embargo, estas variaciones han sido principalmente comprobadas entre poblaciones, quedando aún sin explicar cómo la genética actúa para explicar las variaciones intra-poblacionales de la oviposición (Thompson, 1988). Adicionalmente, bajo condiciones de laboratorio con condiciones controladas de luz y oscuridad, la tasa de oviposición de *O. coffeae* se mantiene constante, mientras que en condiciones de alternabilidad la oviposición muestra mayor variación (Roy et al. 2014).

#### **5.4. Control de extractos de hojas de aliso y café a *O. coffeae*.**

La actividad acaricida de los extractos etanólicos de hojas de aliso y de café, se observa en la Tabla 6. Es bien conocido, que las especies de betuláceas, entre las cuales se encuentra el aliso, son ricas en metabolitos secundarios (Stout, 1988). Algunos autores han atribuido una alta capacidad citotóxica a los compuestos aislados de las hojas en especies de *Alnus*, entre los cuales merece destacar triterpenos y/o esteroides, flavonoides y taninos.

Igualmente, los extractos de hojas de café, se han caracterizado y muestran contenidos de taninos y glucósidos, con presencia de antraquinonas (Bangkok et al.2012). Melo et al. (2006) sugirieron que, en café la resistencia al ataque de patógenos en general, podría estar relacionada con el potencial oxidativo en el tejido de la hoja en relación con la composición en fenoles más que una actividad elevada del fenol oxidasa (PPO), de manera contraria a lo que se ha señalado en otras especies, donde se atribuyen los niveles de

resistencia de las plantas a insectos o patógenos a los niveles de actividad PPO (Mayer, 2006).

El efecto del extracto de aliso al 20% a las 72 horas, tiene un efecto casi del 100% en de mortalidad de los ácaros (4,75 ácaros de un total de 5), incluso más alta que el efecto del control. Es interesante observar como cuando se usan los extractos etanólicos de café sobre los ácaros hospedando aliso, parece haber un efecto inhibitorio mientras mayor es la concentración del extracto desde el primer día de la medición.

Muchos estudios se han realizado con biopesticidas en ácaros Radhakrishnan y Prabhakaran (2014); Roy et al. (2016), con resultados contrastantes de acuerdo a la especie vegetal usada. La especie *C. arábica* tiene un metabolismo bien conocido de síntesis de cafeína y teobromina que, aunque está marcadamente reducido en las hojas adultas, siempre se mantiene en cantidades apreciables (Ashihara et al. 1996), se sabe que el potencial oxidativo en el tejido de la hoja de esta especie, puede contribuir en gran medida a su defensa contra el patógeno (Melo et al. 2006). Es fácil inducir que este efecto puede tener un valor umbral que se manifiesta a bajas concentraciones del extracto.

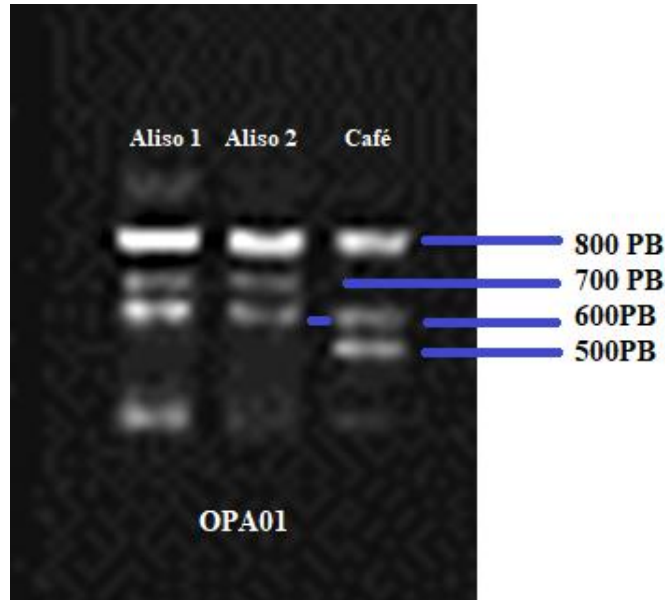
<i>Tratamientos</i>	<i>Concentración</i>	<i>Mortalidad #</i>			
		<b>24 h</b>	<b>48h</b>	<b>72h</b>	<b>96h</b>
<i>Aliso sobre café</i>	<b>5</b>	2,25	2,75	4,00	5,00
	<b>10</b>	2,00	2,50	3,25	4,50
	<b>20</b>	2,75	3,75	4,75	5,00
<i>Café sobre aliso</i>	<b>5</b>	2,25 BCDE	3,25 ABCD	4,50 A	4,75 A
	<b>10</b>	1,00 DE	1,75 CDE	4,00 ABC	5,00 A
	<b>20</b>	0,50 E	2,00 CDE	3,50 ABC	4,50 AB
<i>Control (Propargite al)</i>	<b>5 %sobre aliso</b>	0,75 E	2,00 CDE	4,50 AB	5,00 A
	<b>5% sobre café</b>	2,50	3,25	4,25	4,75
<b>C.V. %</b>					

Valores en promedio de hembras muertas.

**Tabla 7.** Mortalidad de hembras de *O. coffeae*. Número total de hembras por repetición cinco.

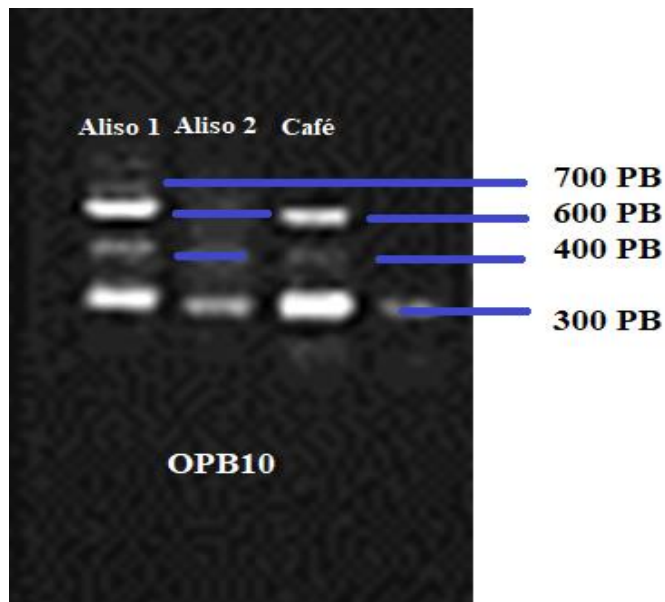
**Elaborado:** Paredes, 2017.

**5.5. Determinación de la variabilidad genética de *O. coffeae* mediante marcadores RAPD.**



**Figura 18.** Electroforesis de muestras de ADN de *O. coffeae* hospedando en Aliso de Querochaca (A1), Aliso de Pasa (A2), Café de Palora (C1), amplificadas con el iniciador OPA01, mediante la técnica RAPD-PCR.

**Elaborado:** Paredes, 2017



**Figura 16.** Electroforesis de muestras de ADN de *O. coffeae* hospedando en Aliso de Querochaca (A1), Aliso de Pasa (A2), Café de Palora (C1), amplificadas con el iniciador OPB10, mediante la técnica RAPD-PCR

**Elaborado: Paredes, 2017**

BANDA(pb)/MUESTRA	OPA01				OPA03				
	A1	A2	C1	C2	A1	A2	C1	C2	
800	Presente	Presente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	
700	Presente	Ausente	Ausente	Ausente	Presente	Ausente	Presente	Presente	
600	Presente	Ausente	Presente	Presente	Presente	Presente	Ausente	Ausente	
500	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Presente	Ausente	Presente	Presente	
400	Presente	Presente	Presente	Presente	Presente	Presente	Ausente	Ausente	
300	Presente	Presente	Presente	Presente	Presente	Ausente	Presente	Presente	
200	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	
TOTAL DE BANDAS = 112									
PORCENTAJE DE BANDAS POLIMÓRFICAS = 10,71									

**Tabla 8.** Bandas amplificadas (bp= pares de bases) por electroforesis de los productos de RAPD-PCR obtenidos con los iniciadores OPA01, OPA03 ADN de *O. coffeae* hospedando Aliso de Querochaca (A1), Aliso de Pasa (A2), Café de Palora (C1) y Café de Pastaza (C2).  
Presente= banda amplificada; Ausente= Banda no amplificada

**Elaborado: Paredes, 2017.**

BANDA(pb)/MUESTRA	OPB10				OPB13				
	A1	A2	C1	C2	A1	A2	C1	C2	
800	Presente	Presente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	
700	Presente	Presente	Presente	Presente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	
600	Presente	Presente	Presente	Presente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	
500	Presente	Presente	Ausente	Ausente	Presente	Presente	Presente	Presente	
400	Ausente	Ausente	Presente	Presente	Presente	Presente	Presente	Presente	
300	Presente	Presente	Presente	Presente	Presente	Presente	Presente	Presente	
200	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Presente	Presente	
TOTAL DE BANDAS = 112									
PORCENTAJE DE BANDAS POLIMÓRFICAS = 10,71									

**Tabla 9.** Bandas amplificadas (bp= pares de bases) por electroforesis de los productos de RAPD-PCR obtenidos con los iniciadores OPB10 y OPB13 ADN de *O. coffeae* hospedando Aliso de Querochaca (A1), Aliso de Pasa (A2), Café de Palora (C1) y Café de Pastaza (C2).  
Presente= banda amplificada; Ausente= Banda no amplificada.

**Elaborado: Paredes, 2017.**

La tabla 8 y 9 muestra el total de las bandas amplificadas con el uso de los cuatro iniciadores seleccionados. Se contabilizaron un total de 112 bandas entre todos los iniciadores y los materiales vegetales usados, de los cuales un 10, 71% resultó polimórfico, es decir, amplificaron diferencialmente para las distintas especies procedentes de las distintas localidades. Estos resultados se pueden observar gráficamente en las figuras 15 y 16. En la figura 15 está representado el resultado obtenido con el

iniciador OPA01 (CAGGCCCTTC), apreciándose claramente la amplificación de cuatro bandas entre 800 y 500 pb, de las cuales, la de 700pb solo está presente en aliso, mientras que la de 500pb solo se observa en la muestra de café. Por otro lado, en la figura 16, los productos de la amplificación con el iniciador OPB10 (CTGCTGGGAC), también resultaron ser polimórficos, entre las dos especies vegetales, siendo más obvio el nivel de heterocigosidad de la población de ácaros presentes en las hojas del aliso procedente de Pasa.

La técnica de RAPD-PCR ha sido usada muy ampliamente desde 1990 (Williams et al. 1990). Esta técnica utiliza marcadores no específicos, que la hace muy útil cuando existe poca información molecular de los individuos a estudiar, particularmente en la inferencia de la variabilidad genética en poblaciones (Rodríguez et al. 2004, Velayutaan et al. 2012; Zhao y Wu, 2012). En *Panonychus citri*, se reportó que los iniciadores OPA01 y OPB10, así como el OPB12 produjeron bandas que denominaron diagnósticas, y que posteriormente se usaron para diseñar unos iniciadores micro-satélites más específicos con los cuales se caracterizaron poblaciones del ácaro en Japón (Okasabe et al.2000).

Bowman y Hoy (2012) estudiaron las diferencias moleculares entre las poblaciones de *Raoellia indica* presentes en la isla de Mauritania (África) y el Sur de la Florida (USA) usando RAPD-PCR concluyendo que existen diferencias genéticas entre las poblaciones, pero sin ser concluyente el resultado en cuanto a una posible diferencia a nivel de especie. Otros autores (Matsuda et al. 2014) señalaron que los estudios moleculares en algunos géneros de Tetranychinae son contradictorios con los estudios morfológicos, sugiriendo que los caracteres morfológicos deben ser reconsiderados.

Guzmán, et al (2017), indicaron que diferentes especies de *Oligonychus* (*O. perseae* y *O. punicae*) muestran una afinidad muy específica por su planta hospedera, a lo cual han llamado DIFERENCIACIÓN ASOCIADA AL HUESPED (*Host Associated Differentiation HAD* en inglés), lo que podría llevar al desarrollo de linajes diferentes de fitófagos, asociados con una especie vegetal en particular, esto último se asocia con nuestros resultados, al observarse una consistencia en las bandas amplificadas en las



poblaciones de *O. coffeae* que hospedan al aliso y que contrastan con las bandas de los ácaros de la misma especie en el cultivo del café.

## CAPÍTULO VI

### CONCLUSIONES, BIBLIOGRAFÍA Y ANEXOS

#### 6.1. CONCLUSIONES

El ciclo biológico (huevo-adulto) de *O. coffeae* mostró diferencias por efecto del sustrato de cría, siendo significativamente más corto cuando fue criado sobre discos de hoja de café *Coffea arabica*.

La longevidad, las hembras criadas sobre hojas de aliso vivieron 1,2 veces más que aquellas hembras criadas sobre hojas de café.

La tasa de oviposición en hembras de *O. coffeae* también fue afectada por el sustrato de cría, siendo superior en hembras criadas en hojas de aliso donde en promedio colocó  $5,32 \pm 2,30$  huevos/hembra/día, para una oviposición total de 31,3 huevos/hembra, mientras que en café la tasa de oviposición fue apenas de  $1,31 \pm 1,16$  huevos/hembra/día.

Se evaluó que los extractos de las especies de betuláceas, entre las cuales se encuentra el aliso, son ricas en metabolitos secundarios han atribuido una alta capacidad citotóxica a los compuestos aislados de las hojas en especies de *Alnus*, entre los cuales merece destacar triterpenos y/o esteroides, flavonoides y taninos.

Se determinó que existe una variabilidad genética de *O. coffeae* es decir se amplificaron diferencialmente para las distintas especies procedentes de las distintas localidades mediante marcadores RAPD, iniciador OPA01 (CAGGCCCTTC) apreciándose claramente la amplificación de cuatro bandas entre 800 y 500 pb, de las cuales, la de 700pb solo está presente en aliso, mientras que la de 500pb solo se observa en la muestra de café. Por otro lado, en la figura 16, los productos de la amplificación con el iniciador OPB10 (CTGCTGGGAC), también resultaron ser polimórficos, entre las dos especies vegetales.

## 6.2. BIBLIOGRAFÍA

Aguilar, M., Reyes E., y Mendoza, P. (2015). Control biológico. Entomología Mexicana Vol. 2: 193-199 (2015). Aislamiento y caracterización morfológica y molecular del ácaro nematófago, 2, 193–199. 011.564634.

Aguilar, M., Rovelo, R., Verjan, G., Illescas, O., Baeza, E., De La Fuente, M., Navarrete, A. (2011). Anti-inflammatory activities, triterpenoids, and diarylheptanoids of *Alnus acuminata ssp. arguta*. *Pharmaceutical Biology*, 49(10), 1052–7. <https://doi.org/10.3109/13880209.2>

Añazco M. 1996. Proyecto Desarrollo Forestal Campesino en los Andes del Ecuador. Aliso. Editorial graficas Iberia. Quito- Ecuador. El aliso 7-22.

Ashihara, H., Monteiro, M., Gillies, M., y Crozier, A. (1996). Biosynthesis of caffeine in leaves of coffee. *Plant Physiology*, 111(3), 747-753.

Bangkok, D., Vallejo, L., Patacsil, M., Apostol, O., Laruan, A., Manuel, J y Gutierrez, M (2012). Detección fitoquímica y actividad antibacteriana de plantas medicinales seleccionadas de Bayabas, Sablan, provincia de Benguet, región administrativa de la Cordillera, Luzón, Filipinas.

Balza, D., Vásquez, C., y Valera, R. (2015). Biological aspects of *Raoiella indica* Hirst (Acari: Tenuipalpidae) on *Musa spp.* cultivars: Possible role of leaf anatomy and chemistry / Aspectos biológicos de *Raoiella indica* hirst (Acari: Tenuipalpidae) sobre cultivares de *Musa spp.*: Posible rol de la a. *Entomotropica*, 30(2015), 181–192.

Beckerman AP, Benton TG, Lapsley CT, Koesters N (2006) How effective are maternal effects at having effects? *Proc R Soc Biol Sci* 273:485–493

Beltrán, K., Salgado, S., Cuesta, F., León-Yáñez, S., Romoleroux, K., Ortiz, E., y Velástegui, A. (2009). Distribución espacial, sistemas ecológicos y caracterización

florística de los páramos en el Ecuador. EcoCiencia, Proyecto Páramo Andino y Herbario QCA. Quito.

Ben Chaaban, S., Chermiti, B., y Kreiter, S. (2011). Comparative demography of the spider mite, *Oligonychus afrasiaticus*, on four date palm varieties in southwestern Tunisia. *Journal of Insect Science (Online)*, 11(136), 136. <https://doi.org/10.1673/031.011.13601>

Bhabesh, D., Azariah, B., Mridul, S. (2017). Bio-Efficacy of Certain Indigenous Plant Extracts against Red Spider Mite, *Oligonychus coffeae*, Nietner (Tetranychidae: Acarina) Infesting Tea, *Journal of Tea Science Research*, 2017, Vol.7, No.4 doi

Blanco, M., Hagggar, J., Moraga, P., Madriz, J. del C., y Pavón, G. (2003). Morfología del café (*Coffea arabica L.*), en lotes comerciales. Nicaragua. *Agronomía Mesoamericana*, 14(1), 97–103.

Bowman, H., y Hoy, M. (2012). Molecular discrimination of phytoseiids associated with the red palm mite *Raoiella indica* (Acari: Tenuipalpidae) from Mauritius and South Florida. *Experimental and applied acarology*, 57(3-4), 395-407.

Budowski, G., y Russo, R. (1997). Nitrogen-fixing trees and nitrogen fixation in sustainable agriculture: research challenges. *Soil Biology and Biochemistry*, 29(5-6), 767-770. ISO 690

Bustillo, Á., (2007). El manejo de cafetales y su relación con el control de la broca del café en Colombia. *Federación Nacional De Cafeteros - CENICAFE*, 32.

Castillo, G., Ecuador, H., Duicela, L., Puyutaxi, A., Marcelo, F., Corral, R., y Zambrano, L. (2004). Selección y difusión de variedades de café arábigo (*Coffea arabica l.*) adaptadas a los principales agrosistemas cafetaleros del Ecuador. Curso: Producción de semillas de café arábigo.

Censo I. I. I Agropecuario (2000). Selección y difusión de variedades mejoradas de café arábigo en los principales ecosistemas cafetaleros del Ecuador. Retrieved from

[http://www.iniap.gob.ec/nsite/images/documentos/Mejora\\_Genética\\_café\\_experiencias\\_Ecuador\(1\).pdf](http://www.iniap.gob.ec/nsite/images/documentos/Mejora_Genética_café_experiencias_Ecuador(1).pdf)

Choperena, E., Ospina, C., Fregene, M., Montoya, J., y Bellotti, C. (2012). Identificación de micro satélites en yuca asociados con la resistencia al ácaro *Mononychellus tanajoa* (acari: Tetranychidae). Revista Colombiana de Entomología, 38(1), 70–75.

COFENAC (Consejo Cafetalero Nacional, EC.). (2010). Influencia de métodos de beneficio sobre la calidad organoléptica del café arábigo. Portoviejo, EC. s.e. 27 p.

Das, G., (1959) Bionomía de la araña roja del té, *Oligonychus coffeae* (Nietner). Bull Entomol Res 50: 265-274

Das, P., Saikia, S., Kalita, S., Hazarika, L. y Dutta, K. (2012). Effect of temperature on biology of red spider mite (*Oligonychus coffeae*) on three different TV clones. Indian Journal of Agricultural Sciences, 82, 255–259.

Dávila, M., Vásquez, C., Lopez, O., Gavilanes, C., Puca, F. (2017). Efecto del extracto etanólico de *Annona cherimola* en el control de *Oligonychus coffeae* (NIETNER, 1861)(ACARI: TETRANYCHIDAE).

Doreste, E. (1988). Ácarología. San José, Costa Rica. ICA, 1988. 410p.

Doyle, J., Doyle J.L (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus, v.12, p.13-15, 1990

Dutta, M. (2015). Morphological resistance of certain tea clones to red spider mite (*Oligonychus coffeae*) in tea. Journal of Entomology and Zoology Studies, 3, 454-457.

Eamsobhana, P., Yoolek, A., Kongkaew, W., Lerdthusnee, K., Khlaimanee, N., Parsartvit, A y Yong, Sen. (2009). Laboratory evaluation of aromatic essential oils from thirteen plant species as candidate repellents against *Leptotrombidium chiggers* (Acari: Trombiculidae), the vector of scrub typhus. Experimental and Applied Ácarology, 47(3), 257–262. <https://doi.org/10.1007/s10493-008-9214-2>

Fernández, P., y Laurentin, H. (2016). Efecto de extractos etanólicos de ajonjolí (*Sesamum indicum L.*) sobre *Fusarium oxysporum f. sp. Sesami*. *Acta Agronomica*, 65(1), 104–108. <https://doi.org/10.15446/acag.v65n1.48384>

Fournier, L. (1988). El cultivo del cafeto (*Coffea arabica L.*) al sol o a la sombra: Un enfoque agronómico y ecofisiológico. *Agronomía Costarricense*, 12(1), 131–146.

Gallardo, A., Vásquez, C., Morales, J., y Gallardo, J. (2005). Biología y enemigos naturales de *Tetranychus urticae* en pimentón. *Manejo Integrado de Plagas Y Agroecología*, (74), 34–40.

Giraldo, M., Galindo, L., y Benavides, P. (2011). La arañita roja del café. *Biología y hábitos*, 8. Retrieved from <http://www.cenicafe.org/es/publications/avt0403.pdf>

González, R. (1989). *Insectos y Ácaros de importancia Agrícola y Cuarentenaria en Chile*. Santiago. Universidad de Chile. 309p.

González, A. (2004). Obtención de aceites esenciales y extractos etanólicos de plantas de las amazonas, 87. <https://doi.org/http://www.bdigital.unal.edu.co/1173/1/angelaandreaconzalezvilla.2004.pdf>

Guevara Vega, M. G., Paternina, L. E., Blanco T, P. B., y Vertel M. V. (2015). Comparación y utilidad de tres métodos de extracción de ADN a partir de potenciales vectores de enfermedades *rickettsiales* (Acari: Ixodidae) en Colombia.

Guzman, S., Santillán, T., Guzmán, W., y Vega, R. (2017). Differential Host Plant-Associated Genetic Variation Between Sympatric Mite Species of the Genus *Oligonychus* (Acari: Tetranychidae). *Environmental entomology*, 46(2), 274-283.

Haque, M., Wahab, A., Naher, N., y Begum, A. (2007). Etapas del desarrollo del ácaro rojo, *Oligonychus coffeae* Neitner (Acari: Tetranychidae) que infesta rosa. *Revista de Zoología de la Universidad de Rajshahi*, 26, 71-72.

ISO 690

Hill, C., y Gutierrez, J. (2003). A method for extraction and analysis of high quality genomic DNA from ixodid ticks. *Medical and Veterinary Entomology*, 17, 224–227. Retrieved from <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365-2915.2003.00425.x/full>

Hillis D., Wiens. J. (2000). Molecules versus morphology in systematics. In: J.J. Wiens (ed.). *Phylogenetic analysis of morphological data*. Smithsonian Institution Press. Washington. pp. 1-19.

Isman, M. (1995). Leads and prospects for the development of new botanical insecticides. *Rev. Pestic. Toxicol.* 3: 1-20.

Kunth, S. (1817). *Urticeae. Nova Genera et Species Plantarum*, 2, 28-50. ISO 690

León, O. (2003). Estudio de los parámetros de vida de *Oligonychus yothersi* McGregor (Acarina: Tetranychidae) en dos cultivares de palta (*Persea americana* Mill.), Hass y Fuerte. Trabajo de grado. Licenciatura en Agronomía. Universidad Austral de Chile.

Li, L., & Steffens, J. C. (2002). Overexpression of polyphenol oxidase in transgenic tomato plants results in enhanced bacterial disease resistance. *Planta*, 215(2), 239-247.

Linnaeus, C. (1753). *Species Plantarum* 1 (1). Laurentius Salvius, Stockholm.

López, E. (1991). El problema de los ácaros (arañitas) en los años secos en hortalizas y frutales. *Empresa y avance agrícola. Chile.* 1(4): 6-8.

MacVean, A. (2003). Comparación de la diversidad florística y las plantas utilizadas por los indígenas kaqchikeles y tz'utuhiles del bosque húmedo montano bajo subtropical de solola. Herbario uval, Instituto de Investigaciones de Universidad del Valle Guatemala. Proyecto no. 29-01.

Magalhães, S., Forbes, M., Skoracka, A., Osakabe, M., Chevillon, C., McCoy, D. (2007). Host race formation in the Acari. *Experimental and Applied Acarology* 42: 225-238.

Martínez, J. (1984). La Flora de Veracruz. México: Ed. El Ateneo, Fascículo no. 20, pp. 128–136.

Marulanda, M., Claro, L., y López, A. (2006). Caracterización molecular de progenies de aliso *Alnus acuminata*, mediante marcadores AFLP. *Scientia et Technica*, 12(32).

Matsuda, T., Morishita, M., Hinomoto, N., y Gotoh, T. (2014). Phylogenetic analysis of the spider mite sub-family tetranychinae (Acari: Tetranychidae) based on the mitochondrial COI gene and the 18S and the 59 end of the that several genera are polyphyletic. *PLoS ONE*, 9(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108672>

Mayer, A. (2006). Polyphenol oxidases in plants and fungi: going places. A review. *Phytochemistry*, 67(21), 2318-2331.

Melo, G., Massao, S. y Mazzafera, P. (2006). Polyphenoloxidase activity in coffee leaves and its role in resistance against the coffee leaf miner and coffee leaf rust. *Phytochemistry*. 67. 277-85. [10.1016/j.phytochem.2005.11.003](https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2005.11.003).

Monroy, H., Gaona, N., Armando, O., Ortiz, E., y Rincón, P. (2015). Estrategias metodológicas para sensibilizar el proceso de renovación cafetera en los estudiantes de las sedes Albania y San Francisco del municipio de Tibacuy mediante el uso de una página web.

Mullis, K. (1990). The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American* April 56-65.

Nietner J. (1861). Observaciones sobre los enemigos del cafeto en Ceilán. Colombo, Ceilán: Ceylon Times. 32p.

Nukenine, E., Dixon, A., Hassan, A. y Zalom, F. (2002). Relaciones entre las características del tricoma de la hoja y la resistencia del campo al ácaro verde de la yuca, *Mononychellus tanajoa* (Bondar). *Ácarología Sistemática y Aplicada*, 7 (1), 77-90.



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

Prabhakaran SK, (2014). Purification and characterization of an esterase isozyme from insecticide resistant and susceptible strains of german cockroach, *Blattella germanica* (L). *Insect Biochem Mol Biol* 1995;25(4):519-24.

Picó, M., y Pérez, M. (2008). Marcadores moleculares basados en PCR: Marcadores RAPD (*Random amplified polymorphic DNA*). Fragmentos de ADN polimórficos amplificados al azar, 1–10.

Podder S.; Biswas H.; Saha G.K., Gupta S.K. 2014. Life cycle of *Oligonychus coffeae* (Acari: Tetranychidae) on tea leaves in Darjeeling, West Bengal, India. *Animal Biology*, 64(4): 395-400.

Portilla, D. (2012). Propagación vegetativa del aliso (*Alnus acuminata* HBK) utilizando dos tipos de sustrato en la parroquia Esperanza. Tesina Tecnólogo Superior en Plantaciones Forestales. Carrera de Ingeniería Forestal. Universidad Técnica del Norte. Ec.

Quiliguango, M., (2013). Influencia de cuatro métodos de beneficio sobre la calidad física y organoléptica del café arábigo (*Coffea arabica* L.) en dos pisos altitudinales del noroccidente de Pichincha.

Radhakrishnan, B., y Prabhakaran, P. (2014). Biocidal activity of certain indigenous plant extracts against red spider mite, *Oligonychus coffeae* (Nietner) infesting tea. *Journal of Biopesticides*, 7(1), 29.

Reis, P., Alves, B., Sousa, O. (1997). Biología do ácaro-vermelho do cafeeiro *Oligonychus ilicis* (McGregor, 1917). *Ciencia e Agrotécologia* 21: 260–266.

Reis, P., Silva, M. Da. y Carvalho, G. de. (1974). Fungicida cúprico atuando como fator de aumento da população do ácaro *Oligonychus (O.) ilicis* (McGregor, 1919) (Acari: Tetranychidae) em cafeeiro. *Fitopatologia*, 9 (2): 67

Rentaría, M. (2000). Breve revisión de los marcadores moleculares. *Blood*, 113, 541–566. <https://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>

Restrepo, G., Bellefleur, P., Restrepo, G. (1996). L'aulne des Andes de Colombie: ecologie et identification. *Bois et Forest des Tropiques*. 247, 53-68.

Reyes, E., Hernández, D., Aguilar, L., Quintero, M., Mendoza, P., y López, M. (2015). Aislamiento y caracterización morfológica y molecular del ácaro nematófago *Sancassania mycophaga* (= *Caloglyphus mycophagus*) (Acari: Acaridae). *ISO 690*

Reyes, J., y Mesa, N. (2011). Biología De *Oligonychus yothersi* (Mcgregor) (Acari: Tetranychidae) sobre aguacate *Persea americana Mill.* Cv. Lorena (Lauraceae). *Caldasia*, 33(1), 211–220. [https://doi.org/33\(1\):211-220](https://doi.org/33(1):211-220). 2011

Rodríguez, V., Gallo, M., Ochoa, R., Childers, C., y Adams, J. (2004). Mitochondrial DNA and RAPD polymorphisms in the haploid mite *Brevipalpus phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae). *Experimental and Applied Ácarology*, 34(3), 275-290.

Roy, S., Muraleedharan, N., Handique, G., Rahman, A., y Barua, A. (2016). Aqueous extracts of *Duranta repens* (Verbenaceae) as an alternative to control tea red spider mite, *Oligonychus coffeae* (Acari: Tetranychidae). *International Journal of Tropical Insect Science*, 36(2), 82-90.

Roy, S., Muraleedharan, N., y Mukhopadhyay, A. (2014). The red spider mite, *Oligonychus coffeae* (Acari: Tetranychidae): its status, biology, ecology and management in tea plantations. *Experimental and Applied Ácarology*, 63(4), 431–463. <https://doi.org/10.1007/s10493-014-9800-4>

Sarmah, M., Rahman, A., Phukan, A. K., y Gurusubramanian, G. (2009). Effect of aqueous plant extracts on tea red spider mite, *Oligonychus coffeae*, Nietner

(Tetranychidae: Acarina) and *Stethorus gilvifrons* Mulsant. African Journal of Biotechnology, 8(3), 417–423. Retrieved from <http://www.academicjournals.org/AJB>

Shimizu, A. (2004). Natural history and behavior of a Japanese parasocial spider wasp, *Machaerothrix tsushimensis* (Hymenoptera: Pompilidae). Journal of the Kansas Entomological Society, 77(4), 383-401.

Silvarolla, M., Mazzafera, P., y Fazuoli, C. (2004). Plant biochemistry: a naturally decaffeinated arabica coffee. Nature, 429(6994), 826-826.

Srikumar K.K., Suresh Kumar B., Radhakrishnan B. 2015. Record of new host plant of red spider mite, *Oligonychus coffeae* (Nietner). Current Biotica, 9(1):98-100: 98-100.

Skorupska, A. (1998). Morphologico-anatomical structure of leaves and demographic parameters of the hawthorn spider mite, *Tetranychus viennensis* Zacher and the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* (Koch) (Acarina, Tetranychidae) on selected scab-resistant apple varieties. Journal of Applied Entomology 122: 493-496.

Stout, R. (1988). Effects of condensed tannins on leaf processing in mid-latitude and tropical streams: a theoretical approach. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 46(7), 1097-1106.

Tabashnik, B.E., Wheelock H., Rainbolt J.D., Watt W.B. 1981. Individual variation in oviposition preference in the butterfly, *Colias eurytheme*. Oecologia, 50(2): 225-230.

Thompson J.N. 1988. Evolutionary ecology of the relationship between oviposition preference and performance of offspring in phytophagous insects. Entomologia Experimentalis et Applicata, 47: 3-14

Vásquez, C., Dávila, M., Pomboza, P. P., y Telenchana, N. (2017). Primer reporte de *Oligonychus coffeae* (Acari: Tetranychidae) sobre *Alnus acuminata* en la región andina. Revista Mexicana de Biodiversidad, 88(1), 256–259. <https://doi.org/10.1016/j.rmb.2017.01.007>

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

Vásquez, C., Rodríguez, G., Hernandez, A., Mendez, N., Dávila, M., Valera, N., y Morales, J. (2014). Variabilidad de poblaciones de *Raoiella indica* (Acari: Tenuipalpidae) evaluada mediante análisis morfológico y molecular en Venezuela. *Entomotropica*, 29(2), 105–120.

Velayutham, V., Shanmugavel, S., Munusamy, A., y Sundaram, J. (2012). Detection of genetic variability in various isolates of cattle tick, *Boophilus microplus* from Tamil Nadu, India using PCR-RAPD analysis. *Experimental and applied acarology*, 56(4), 375-383.

Williams, J., Kubelik, A., Livak, K., Rafalski, J., Tingey, S., (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18(22):6531-5.

Zhao, E., y Wu, P. (2012). RAPD–SCAR marker and genetic relationship analysis of three *Demodex* species (Acari: Demodicidae). *Parasitology research*, 110(6), 2395-2402.

### 6.3. ANEXOS

#### 6.3.1. Ciclo biológico

Café= Cultivo 1

Aliso = Cultivo 2

#### ANAVAR

Statistix 9.0

09/11/2017,

8:19:14

#### Completely Randomized AOV for DC

Source	DF	SS	MS	F	P
Cultivo	1	0.10417	0.10417	1.67	0.2008
Error	58	3.60833	0.06221		
Total	59	3.71250			

Grand Mean 2.0250      CV 12.32

Homogeneity of Variances	F	P
Levene's Test	0.38	0.5411
O'Brien's Test	0.36	0.5482
Brown and Forsythe Test	0.68	0.4137

#### Welch's Test for Mean Differences

Source	DF	F	P
Cultivo	1.0	1.67	0.2011
Error	54.8		

Component of variance for between groups 1.398E-03

Effective cell size 30.0

#### Cultivo      Mean

1 1.9833

2 2.0667

Observations per Mean 30  
Standard Error of a Mean 0.0455  
Std Error (Diff of 2 Means) 0.0644

**Completely Randomized AOV for DN**

Source	DF	SS	MS	F	P
Cultivo	1	7.0042	7.00417	28.93	0.0000
Error	58	14.0417	0.24210		
Total	59	21.0458			

Grand Mean 3.3583 CV 14.65

**Homogeneity of Variances**

	F	P
Levene's Test	0.95	0.3338
O'Brien's Test	0.92	0.3423
Brown and Forsythe Test	0.02	0.8829

**Welch's Test for Mean Differences**

Source	DF	F	P
Cultivo	1.0	28.93	0.0000
Error	56.3		

Component of variance for between groups 0.22540  
Effective cell size 30.0

**Cultivo Mean**

1 3.7000  
2 3.0167

Observations per Mean 30  
Standard Error of a Mean 0.0898  
Std Error (Diff of 2 Means) 0.1270

**Completely Randomized AOV for H**

Source	DF	SS	MS	F	P
Cultivo	1	38.400	38.4000	16.75	0.0001

Error	58	133.000	2.2931
Total	59	171.400	

Grand Mean 13.600      CV 11.13

<b>Homogeneity of Variances</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
Levene's Test	0.00	0.9840
O'Brien's Test	0.00	0.9843
Brown and Forsythe Test	0.19	0.6637

**Welch's Test for Mean Differences**

<b>Source</b>	<b>DF</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
Cultivo	1.0	16.75	0.0001
Error	58.0		

Component of variance for between groups	1.20356
Effective cell size	30.0

**Cultivo      Mean**

1	12.800
2	14.400

Observations per Mean	30
Standard Error of a Mean	0.2765
Std Error (Diff of 2 Means)	0.3910

**Completely Randomized AOV for L**

<b>Source</b>	<b>DF</b>	<b>SS</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
Cultivo	1	13.0667	13.0667	37.12	0.0000
Error	58	20.4167	0.3520		
Total	59	33.4833			

Grand Mean 3.6833      CV 16.11

<b>Homogeneity of Variances</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
Levene's Test	3.73	0.0583
O'Brien's Test	3.60	0.0627
Brown and Forsythe Test	1.94	0.1694

**Welch's Test for Mean Differences**

<b>Source</b>	<b>DF</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
Cultivo	1.0	37.12	0.0000
Error	52.3		

Component of variance for between groups 0.42382  
Effective cell size 30.0

**Cultivo Mean**

1	3.2167
2	4.1500

Observations per Mean 30  
Standard Error of a Mean 0.1083  
Std Error (Diff of 2 Means) 0.1532

**Completely Randomized AOV for PC**

<b>Source</b>	<b>DF</b>	<b>SS</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
Cultivo	1	8.0667	8.06667	30.51	0.0000
Error	58	15.3333	0.26437		
Total	59	23.4000			

Grand Mean 2.6000 CV 19.78

**Homogeneity of Variances**

	<b>F</b>	<b>P</b>
Levene's Test	0.98	0.3260
O'Brien's Test	0.95	0.3345
Brown and Forsythe Test	0.38	0.5418

**Welch's Test for Mean Differences**

<b>Source</b>	<b>DF</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
Cultivo	1.0	30.51	0.0000
Error	56.4		

Component of variance for between groups 0.26008  
Effective cell size 30.0



**Cultivo Mean**

1 2.2333  
2 2.9667

Observations per Mean 30  
Standard Error of a Mean 0.0939  
Std Error (Diff of 2 Means) 0.1328

**Completely Randomized AOV for PN**

Source	DF	SS	MS	F	P
Cultivo	1	0.2667	0.26667	1.36	0.2475
Error	58	11.3333	0.19540		
Total	59	11.6000			

Grand Mean 3.2000 CV 13.81

**Homogeneity of Variances**

	F	P
Levene's Test	0.51	0.4795
O'Brien's Test	0.49	0.4872
Brown and Forsythe Test	0.86	0.3572

**Welch's Test for Mean Differences**

Source	DF	F	P
Cultivo	1.0	1.36	0.2476
Error	57.1		

Component of variance for between groups 2.375E-03  
Effective cell size 30.0

**Cultivo Mean**

1 3.1333  
2 3.2667

Observations per Mean 30  
Standard Error of a Mean 0.0807  
Std Error (Diff of 2 Means) 0.1141

**Completely Randomized AOV for TC**

<b>Source</b>	<b>DF</b>	<b>SS</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
Cultivo	1	0.70417	0.70417	13.58	0.0005
Error	58	3.00833	0.05187		
Total	59	3.71250			

Grand Mean 1.9750      CV 11.53

<b>Homogeneity of Variances</b>		<b>F</b>	<b>P</b>
Levene's Test		0.02	0.8931
O'Brien's Test		0.02	0.8949
Brown and Forsythe Test		0.09	0.7703

**Welch's Test for Mean Differences**

<b>Source</b>	<b>DF</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
Cultivo	1.0	13.58	0.0005
Error	58.0		

Component of variance for between groups      0.02174  
 Effective cell size      30.0

**Cultivo      Mean**

- 1 1.8667
- 2 2.0833

Observations per Mean      30  
 Standard Error of a Mean      0.0416  
 Std Error (Diff of 2 Means) 0.0588

**Completely Randomized AOV for Total**

<b>Source</b>	<b>DF</b>	<b>SS</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
Cultivo	1	408.204	408.204	174.03	0.0000
Error	58	136.042	2.346		
Total	59	544.246			

Grand Mean 39.092      CV 3.92

<b>Homogeneity of Variances</b>		<b>F</b>	<b>P</b>
Levene's Test		0.32	0.5721

O'Brien's Test	0.31	0.5788
Brown and Forsythe Test	0.20	0.6532

**Welch's Test for Mean Differences**

Source	DF	F	P
Cultivo	1.0	174.03	0.0000
Error	57.4		

Component of variance for between groups	13.5286
Effective cell size	30.0

**Cultivo Mean**

1	36.483
2	41.700

Observations per Mean	30
Standard Error of a Mean	0.2796
Std Error (Diff of 2 Means)	0.3954

**Completely Randomized AOV for A**

Source	DF	SS	MS	F	P
Cultivo	1	67.204	67.2042	51.39	0.0000
Error	58	75.842	1.3076		
Total	59	143.046			

Grand Mean	8.6917	CV	13.16
------------	--------	----	-------

**Homogeneity of Variances**

	F	P
Levene's Test	0.39	0.5372
O'Brien's Test	0.37	0.5443
Brown and Forsythe Test	0.08	0.7771

**Welch's Test for Mean Differences**

Source	DF	F	P
Cultivo	1.0	51.39	0.0000
Error	57.5		

Component of variance for between groups	2.19655
--	---------

Effective cell size 30.0

**Cultivo Mean**

1 7.6333

2 9.7500

Observations per Mean 30

Standard Error of a Mean 0.2088

Std Error (Diff of 2 Means) 0.2953

### 6.3.2. Longevidad

Aliso= Cultivo 1

Cafe = Cultivo 2

### ANAVA

#### Completely Randomized AOV for Longevida

Source	DF	SS	MS	F	P
Cultivo	1	8.3333	8.33333	10.20	0.0096
Error	10	8.1667	0.81667		
Total	11	16.5000			

Grand Mean 9.5000 CV 9.51

#### Homogeneity of Variances

	F	P
Levene's Test	0.48	0.5042
O'Brien's Test	0.38	0.5518
Brown and Forsythe Test	0.19	0.6703

#### Welch's Test for Mean Differences

Source	DF	F	P
Cultivo	1.0	10.20	0.0107
Error	9.1		

Component of variance for between groups 1.25278

Effective cell size 6.0

**Cultivo Mean**

1 10.333  
2 8.667

Observations per Mean 6  
Standard Error of a Mean 0.3689  
Std Error (Diff of 2 Means) 0.5217

**Completely Randomized AOV for Oviposici**

Source	DF	SS	MS	F	P
Cultivo	1	6.02083	6.02083	35.24	0.0001
Error	10	1.70833	0.17083		
Total	11	7.72917			

Grand Mean 5.2917 CV 7.81

**Homogeneity of Variances**

	F	P
Levene's Test	0.40	0.5398
O'Brien's Test	0.32	0.5850
Brown and Forsythe Test	0.29	0.5995

**Welch's Test for Mean Differences**

Source	DF	F	P
Cultivo	1.0	35.24	0.0002
Error	9.7		

Component of variance for between groups 0.97500  
Effective cell size 6.0

**Cultivo Mean**

1 6.0000  
2 4.5833

Observations per Mean 6  
Standard Error of a Mean 0.1687  
Std Error (Diff of 2 Means) 0.2386

**Completely Randomized AOV for Postovipo**

Source	DF	SS	MS	F	P
Cultivo	1	1.33333	1.33333	8.00	0.0179
Error	10	1.66667	0.16667		
Total	11	3.00000			

Grand Mean 2.5000      CV 16.33

Homogeneity of Variances		F	P
Levene's Test		2.05	0.1832
O'Brien's Test		1.62	0.2324
Brown and Forsythe Test		0.71	0.4178

**Welch's Test for Mean Differences**

Source	DF	F	P
Cultivo	1.0	8.00	0.0242
Error	7.4		

Component of variance for between groups      0.19444  
Effective cell size      6.0

**Cultivo      Mean**

1 2.8333  
2 2.1667

Observations per Mean      6  
Standard Error of a Mean      0.1667  
Std Error (Diff of 2 Means) 0.2357

**Completely Randomized AOV for Preovipos**

Source	DF	SS	MS	F	P
Cultivo	1	0.52083	0.52083	2.36	0.1556
Error	10	2.20833	0.22083		
Total	11	2.72917			

Grand Mean 1.7083      CV 27.51

Homogeneity of Variances		F	P
--------------------------	--	---	---

Levene's Test	0.62	0.4494
O'Brien's Test	0.49	0.5000
Brown and Forsythe Test	0.17	0.6867

**Welch's Test for Mean Differences**

Source	DF	F	P
Cultivo	1.0	2.36	0.1595
Error	8.9		

Component of variance for between groups 0.05000  
 Effective cell size 6.0

**Cultivo Mean**

1	1.5000
2	1.9167
Observations per Mean	6
Standard Error of a Mean	0.1918
Std Error (Diff of 2 Means)	0.2713

### 6.3.3. Control

- Aliso

**Analysis of Variance Table for Muertos**

Source	DF	SS	MS	F	P
rep	3	1.7969	0.5990		
Trat	3	8.2969	2.7656	3.68	0.0560
Error rep*Trat	9	6.7656	0.7517		
Tiempo	3	55.5469	18.5156	43.89	0.0000
Trat*Tiempo	9	2.0156	0.2240	0.53	0.8423
Error rep*Trat*Tiempo	36	15.1875	0.4219		
Total	63	89.6094			

Grand Mean 3.5781  
 CV(rep\*Trat) 24.23  
 CV(rep\*Trat\*Tiempo) 18.15

**Analysis of Variance Table for Porc**

Source	DF	SS	MS	F	P
rep	3	718.7	239.58		
Trat	3	3318.7	1106.25	3.68	0.0560

Error rep*Trat	9	2706.2	300.69		
Tiempo	3	22218.7	7406.25	43.89	0.0000
Trat*Tiempo	9	806.3	89.58	0.53	0.8423
Error rep*Trat*Tiempo	36	6075.0	168.75		
Total	63	35843.7			

Grand Mean 71.563  
 CV(rep\*Trat) 24.23  
 CV(rep\*Trat\*Tiempo) 18.15

#### Analysis of Variance Table for Vivos

Source	DF	SS	MS	F	P
rep	3	1.7969	0.5990		
Trat	3	8.2969	2.7656	3.68	0.0560
Error rep*Trat	9	6.7656	0.7517		
Tiempo	3	55.5469	18.5156	43.89	0.0000
Trat*Tiempo	9	2.0156	0.2240	0.53	0.8423
Error rep*Trat*Tiempo	36	15.1875	0.4219		
Total	63	89.6094			

Grand Mean 1.4219  
 CV(rep\*Trat) 60.98  
 CV(rep\*Trat\*Tiempo) 45.68

- **Café**

#### Analysis of Variance Table for Muertos

Source	DF	SS	MS	F	P
rep	3	12.047	4.0156		
Trat	3	9.547	3.1823	6.71	0.0113
Error rep*Trat	9	4.266	0.4740		
Tiempo	3	137.672	45.8906	73.63	0.0000
Trat*Tiempo	9	6.641	0.7378	1.18	0.3346
Error rep*Trat*Tiempo	36	22.438	0.6233		
Total	63	192.609			

Grand Mean 3.0781  
 CV(rep\*Trat) 22.37  
 CV(rep\*Trat\*Tiempo) 25.65

#### Analysis of Variance Table for Porc

Source	DF	SS	MS	F	P
rep	3	4818.7	1606.2		
Trat	3	3818.8	1272.9	6.71	0.0113
Error rep*Trat	9	1706.3	189.6		
Tiempo	3	55068.7	18356.2	73.63	0.0000
Trat*Tiempo	9	2656.3	295.1	1.18	0.3346
Error rep*Trat*Tiempo	36	8975.0	249.3		
Total	63	77043.7			

Grand Mean 61.563



CV(rep\*Trat) 22.37  
CV(rep\*Trat\*Tiempo) 25.65

**Analysis of Variance Table for Vivos**

<b>Source</b>	<b>DF</b>	<b>SS</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
rep	3	12.047	4.0156		
Trat	3	9.547	3.1823	6.71	0.0113
Error rep*Trat	9	4.266	0.4740		
Tiempo	3	137.672	45.8906	73.63	0.0000
Trat*Tiempo	9	6.641	0.7378	1.18	0.3346
Error rep*Trat*Tiempo	36	22.438	0.6233		
Total	63	192.609			

Grand Mean 1.9219  
CV(rep\*Trat) 35.82  
CV(rep\*Trat\*Tiempo) 41.08

## **CAPÍTULO VII**

### **PROPUESTA**

#### **TITULO**

Ciclo biológico del *O. coffeae* en diferentes pisos altitudinales y utilización de bio-extractos para su control.

#### **7.1. DATOS INFORMATIVOS**

Se localizará en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato, conjuntamente con la asesoría técnica de ingenieros agrónomos y biólogos.

#### **7.2. ANTECEDENTES DE LA PROPUESTA**

De acuerdo a los registros del ciclo biológico de la plaga del ácaro se ha determinado que es importante un estudio previo de su durabilidad y determinar en qué etapa es más vulnerable para la aplicación de extractos rentables obtenidos de las plantas hospederas, siendo la vía más económica y sustentable.

#### **7.3. JUSTIFICACIÓN**

Con los estudios de ciclo de vida se determina la fragilidad de la plaga y determinar un controlador de ácaros ecológico para la aplicación en los estadios primeros, con esto se pretende disminuir la recesividad de la plaga a insecticidas químicos creando conciencia en la repercusión de los mismos en la salud. Fomentando un control biológico en el cual los beneficiados sean el productor disminuyendo la compra de acaricidas y por ende reducción en costos de producción, promoviendo un cuidado a la naturaleza y por ende un equilibrio ecológico.

#### **7.4. OBJETIVOS**

- Estudiar la adaptabilidad de *Oligonychus coffeae* en diferentes cultivares de la sierra ecuatoriana.

#### **7.5. ANÁLISIS DE FACTIBILIDAD**

Con la aplicación de esta propuesta se podrá disminuir poblaciones de ácaros en todos sus estados biológicos, conservando las características de la planta hospedera y determinar su potencial daño, sin afectar a los ecosistemas. Permitiendo un estudio más completo y puntual sobre el ácaro.

#### **7.6.FUNDAMENTACIÓN**

Para poder utilizar distintos tipos de controles se necesita un estudio previo de la plaga los análisis de vida conjuntamente con los genéticos y controles biológicos nos permite un estudio completo. Utilizando marcadores específicos para detectar cambios poblacionales y resistencia al uso de acaricidas.

#### **7.7. METODOLOGÍA, MODELO OPERATIVO**

- **Observación de incidencia de ácaros en los cultivos de la serranía ecuatoriana**

Visualizar la presencia de ácaros en el haz de las hojas con síntomas de ataques tetraníquidos. Los signos visibles se manifiestan en la nervadura principal de hojas maduras con coloración de color café y presencias de telarañas alrededor.

- **Estudio del ciclo de vida.**

Se determina diariamente el cambio de estado de la plaga.

- **Extracción de ADN y aplicación de marcadores moleculares**

Se toma la muestra y se extrae el ADN con un protocolo probado y se concibe variaciones en las bandas.

## **7.8. ADMINISTRACIÓN**

Se trabajará con los productores e investigadores de cada uno de los sectores. Conjuntamente con la supervisión y asistencia técnica de profesionales de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato.