

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS



CARRERA: INGENIERÍA AGRONÓMICA

“VARIABILIDAD DE LA REGIÓN ITS2 EN POBLACIONES DE *Tetranychus urticae* Koch EN EL CULTIVO DE FRESA (*Fragaria vesca*)”

Documento Final del Proyecto de Investigación como requisito para obtener el grado de Ingeniera Agrónoma

AUTORA:

KAROLAYNE ALEXANDRA LÓPEZ ILLANES

TUTORA:

PhD. MARTA DÁVILA PONCE

CEVALLOS - ECUADOR

2019

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

“La suscrita, LÓPEZ ILLANES KAROLAYNE ALEXANDRA, portadora de cédula de identidad número: 1805201751, libre y voluntariamente declaro que el Informe Final del Proyecto de investigación titulado: “VARIABILIDAD DE LA REGIÓN ITS2 EN POBLACIONES DE *Tetranychus urticae* Koch EN EL CULTIVO DE FRESA (*Fragaria vesca*)” es original, autentico y personal. En tal virtud, declaro que el contenido es de mi sola responsabilidad legal y académica, excepto donde se indican las fuentes de información consultadas”.

Karolayne Alexandra López Illanes

DERECHO DE AUTOR

Al presentar este Informe Final del Proyecto de Investigación titulado “VARIABILIDAD DE LA REGIÓN ITS2 EN POBLACIONES DE *Tetranychus urticae* Koch EN EL CULTIVO DE FRESA (*Fragaria vesca*)”, como uno de los requisitos previos para la obtención del título de grado de Ingeniero Agrónomo, en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato, autorizo a la Biblioteca de la Facultad, para que este documento esté disponible para su lectura, según las normas de la Universidad.

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

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

Karolayne Alexandra López Illanes

“VARIABILIDAD DE LA REGIÓN ITS2 EN POBLACIONES DE *Tetranychus urticae* Koch EN EL CULTIVO DE FRESA (*Fragaria vesca*)”

REVISADO POR:

PhD. Marta Dávila Ponce

TUTORA

PhD. Carlos Vásquez

BIOMETRISTA

APROBADO POR LOS MIEMBROS DE TRIBUNAL DE GRADO:

FECHA

Ing. Mg. Giovanni Velástegui

PRESIDENTE

PhD. Carlos Vásquez

MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE GRADO

PhD. Liliana Lalaleo

MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE GRADO

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios ya que sin Él nada de esto sería posible.

A mi madre y padre por ayudarme a seguir mis sueños y estar siempre a mi lado para poder seguir adelante y convertirme en una profesional. A mis hermanas por brindarme su comprensión y amor.

Mi reconocimiento a la Universidad Técnica de Ambato, de manera muy especial a la Facultad de Ciencias Agropecuarias, por haberme acogido en sus aulas del saber, las mismas que sirvieron para enriquecer mis conocimientos, y brindarme un futuro profesional que será parte de mi vida y cumplir con mi más anhelada meta que es mi carrera profesional de Ingeniera Agrónoma.

A mi tutora PhD. Martha Dávila quién me brindó todo su apoyo y conocimientos para culminar la investigación, como también a los PhD. Carlos Vásquez, Asesor de Biometría PhD, por su ayuda incondicional; y PhD. Liliana Lalaleo, Asesora de Redacción Técnica; quienes supieron en su determinado momento asesorarme para que los resultados alcanzados en el trabajo de investigación sean fructíferos.

A todos mis compañeros de aula con quienes compartimos gratos momentos durante los semestres de estudio.

A Nataly Paredes por su ayuda y asesoramiento en mi trabajo de investigación, por su paciencia en la explicación y por compartir sus conocimientos que me ayudaron mucho en mi trabajo.

A todos un gracias.

DEDICATORIA

La dedicación y el esfuerzo siempre se verán plasmados en los objetivos alcanzados, que se han logrado con el apoyo de mi familia.

A mis padres Jorge López y Rosa Illanes, por permanecer junto a mi cada instante y por el apoyo que me brindaron siempre para seguir con mi carrera, por inculcarme valores para mi desempeño como profesional y sobre todo por brindarme su amor.

A mi esposo Gabriel Proaño por estar a mi lado apoyándome en las buenas y en las malas, por su apoyo en la culminación de mi carrera y convertirme en profesional y por su amor, afecto y comprensión lo cual me ayudó a seguir con mis estudios.

A mis hijos: Dylan Proaño y Sofía Proaño por ser el motor para seguir adelante y terminar mis estudios, por enseñarme que de las mil caídas uno se vuelve a levantar y lo más importante por darme su amor a cambio de nada; los amo.

A mis hermanas: Grace López y Britney López por ser un apoyo incondicional, por enseñarme que la vida hay que disfrutarla cada segundo y siempre hacer lo correcto.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	vii
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	x
ÍNDICE DE TABLAS.....	xi
RESUMEN.....	1
CAPÍTULO I.....	3
INTRODUCCIÓN	3
CAPÍTULO II	5
REVISIÓN DE LITERATURA O MARCO TEÓRICO	5
2.1 ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS	5
2.2 MARCO CONCEPTUAL O CATEGORÍAS FUNDAMENTALES	8
2.2.1. Marcadores moleculares: ITS2 (segundo espaciador transcrito interno)	8
2.2.2. Cultivo de fresa (<i>Fragaria vesca</i>).....	9
2.2.2.1. Taxonomía	9
2.2.2.2. Morfología	9
2.2.2.3 Variedades	10
2.2.3. Taxonomía Ácaros <i>Tetranychus urticae</i> Koch	10
2.2.3.1. Taxonomía	11
2.2.3.2. Morfología	11
2.2.3.3 Ecología.....	12
CAPÍTULO III.....	14
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	14
3.1. HIPÓTESIS.....	14
3.2. VARIABLES DE LA HIPÓTESIS.....	14
3.2.1. Variable independiente.....	14
3.2.2. Variable dependiente.....	14
3.3. OBJETIVOS.....	14

3.3.1. Objetivo General.....	14
3.3.2. Objetivos Específicos	15
CAPÍTULO IV	16
MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
4.1. UBICACIÓN DEL EXPERIMENTO (ENSAYO)	16
4.1.1. Investigación.....	16
4.1.2. Material Vegetal.....	16
4.2. CARACTERISTICAS DEL LUGAR	16
4.2.1. Clima	16
4.2.2. Agua	16
4.2.3. Suelo	17
4.3. EQUIPOS Y MATERIALES.....	17
4.3.1. Materiales.	17
4.3.2. Equipos.	18
4.3.3. Reactivos.	18
4.4. FACTORES EN ESTUDIO	19
4.5. TRATAMIENTOS.....	19
4.6. DISEÑO EXPERIMENTAL	19
4.7. VARIABLES RESPUESTA.....	19
4.7.1. Identificación de las poblaciones de <i>Tetranychus urticae</i>	19
4.7.2. Extracción de ADN de <i>Tetranychus urticae</i> mediante marcadores RAPD .	20
4.7.3. Amplificación de ADN mediante el protocolo de ITS2 para PCR.....	21
4.7.4. Protocolo ITS2 Barcode <i>Tetranychus</i>	21
4.8. PROCESAMIENTO DE LA INFORMACIÓN.....	22
CAPITULO V.....	23
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
5.1. Determinación de la variabilidad genética de <i>Tetranychusurticae</i> mediante marcadores RAPD.	23
5.1.1. Secuencias de ADN	23
5.1.2 Composición de bases nitrogenadas	25

5.1.3. Porcentaje de similitud entre las bases nitrogenadas	26
5.1.4. Datos del banco de genes (GenBank)	27
CAPÍTULO VI	29
CONCLUSIONES, BIBLIOGRAFÍA Y ANEXOS	29
6.1. CONCLUSIONES	29
6.2. BIBLIOGRAFÍA	30
CAPÍTULO VII.....	37
PROPUESTA	37
7.1. DATOS INFORMATIVOS.....	37
7.2. ANTECEDENTES DE LA PROPUESTA.....	37
7.3. JUSTIFICACIÓN.....	37
7.4. OBJETIVOS.....	37
7.5. ANÁLISIS DE FACTIBILIDAD.....	38
7.6. FUNDAMENTACIÓN	38
7.7. METODOLOGÍA, MODELO OPERATIVO.....	38
7.8. ADMINISTRACIÓN.....	38

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Figura 1. Estadíos de desarrollo de <i>Tetranychus urticae</i>	12
Figura 2. Ciclo de vida de <i>Tetranychus urticae</i> con una temperatura promedio de 20 ⁰ C y una humedad relativa de 65%.....	13
Figura 3. Obtención de ADN de <i>Tetanuchus urticae</i> en tres variedades de <i>Fragaria vesca</i> (Albi3n, Festival y Monterrey).....	20
Figura 4. Colocaci3n de ADN de <i>T. urticae</i> de tres variedades de <i>Fragaria vesca</i> en los pocillos del gel preparado en la c3mara de electroforesis para ITS2.....	21
Figura 5. Obtenci3n de ITS2 de <i>Tetanuchus urticae</i> en tres variedades de <i>Fragaria vesca</i> (Albi3n, Festival y Monterrey).....	22
Figura 6. Composici3n de Bases Nitrogenadas en los fragmentos ITS2 amplificados a partir de 3caros (<i>Tetranychus urticae</i> Koch) en Fresa (<i>Fragaria vesca</i>) en diferentes cultivares de “Festival” (F), “Monterrey” (M) y “Albi3n” (A).....	26

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación taxonómica de la planta de fresa.....	9
Tabla 2. Descripción taxonómica de <i>T. urticae</i> Koch.....	11
Tabla 3. Secuencias de ADN; Adennina (A), Citosina (C), Guanina (G), Timina (T) de <i>Tetranychus urticae</i> hospedado en plantas de <i>Fragaria vesca</i> de tres variedades (Albi3n, Monterrey y Festival).	24
Tabla 4. Composici3n de las bases nitrogenadas de los fragmentos de ITS2 amplificados a partir de 3caros (<i>Tetranychus urticae</i> KOCH) en fresa (<i>Fragaria vesca</i>) en diferentes cultivares de “Festival” (F), “Monterrey” (M) y “Albi3n” (A)..	25
Tabla 5. N3mero de sustituciones y porcentaje de similitud de las bases nitrogenadas: Adennina (A), Citosina (C), Guanina (G), Timina (T) de <i>tetranychus urticae</i> , entre las tres variedades de fresa (<i>Fragaria vesca</i>)	27
Tabla 6. Datos provenientes del banco de genes (GenBank) comparando las secuencias obtenidas de <i>T. urticae</i> de las diferentes variedades de fresa (Festival, Monterrey, Albi3n).	28

RESUMEN

El ITS2 es uno de los marcadores más importantes en sistemática molecular y evolución, además muestra una variabilidad de secuencia significativa a nivel de especie o inferior. La presente investigación tuvo por objetivo, determinar la variabilidad de la región ITS2 en fragmentos de ADN de individuos provenientes de poblaciones de *T. urticae* en tres variedades del cultivo de fresa (*F. vesca*) realizándose de este modo el estudio en el laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias. Fueron usadas ácaros hembras para extracción de ADN, amplificación de ADN mediante el protocolo de ITS2 para PCR que se realizó en un termociclador.

Obteniendo las longitudes del fragmento ITS2 para diferentes poblaciones de *T. urticae*, se contabilizaron 197 bases nitrogenadas (A, T, C y G), de las cuales son ricas en A + T, con porcentajes de 68,53% en Festival (F), 67% en Monterrey (M) y 68,02% en Albión (A). En total se encontraron 12 sustituciones en las secuencias de pares de bases con un 6,09%; por tanto, en las diferencias de las secuencias se encontraron 11 sustituciones entre Festival y Monterrey (F – M) con un 5,58% de divergencia y 94,42% de similitud, entre Festival y Albión (F – A), 4,57% de divergencia y 95,43% de similitud, y entre Monterrey y Albión (M – A) 2,03% de divergencia y 97,97% de similitud. Demostrándose que los porcentajes de Bases Nitrogenadas en Monterrey (M) es menor que F y A, debido a factores ambientales externos a la estructura molecular.

Palabras claves:

Bases Nitrogenadas, PCR, ADN, ácaros, fresa.

SUMMARY

The ITS2 is one of the most important markers in molecular systematics and evolution, in addition it shows a significant sequence variability at species level or below. The objective of the present investigation was to determine the variability of the ITS2 region in DNA fragments of individuals from populations of *T. urticae* in three varieties of strawberry cultivation (*F. vesca*), thus carrying out the study in the Biotechnology laboratory of the Faculty of Agricultural Sciences. Female mites were used for DNA extraction, DNA amplification by the ITS2 protocol for PCR that was performed in a thermal cycler.

Obtaining the lengths of the ITS2 fragment for different populations of *T. urticae*, we counted 197 nitrogenous bases (A, T, C and G), of which are rich in A + T, with percentages of 68.53% in Festival (F), 67% in Monterrey (M) and 68.02% in Albion (A). In total, 12 substitutions were found in the sequences of base pairs with 6.09%; therefore, in the differences of the sequences, 11 substitutions were found between Festival and Monterrey (F - M) with 5.58% divergence and 94.42% similarity, between Festival and Albion (F - A), 4, 57% divergence and 95.43% similarity, and between Monterrey and Albion (M - A) 2.03% divergence and 97.97% similarity. Proving that the percentages of Nitrogenous Bases in Monterrey (M) is less than F and A, due to environmental factors external to the molecular structure.

Keywords:

Nitrogenous bases, PCR, DNA, mites, strawberry.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

La fresa (*Fragaria vesca*), pertenece a la familia de las Rosáceas, es una planta herbácea, perenne y precoz de alta producción, contiene vitaminas A y C, y es muy apreciada en el mercado (González, 2012). *Fragaria vesca* posee gran demanda en el Ecuador, no solo por su sabor sino también para la industria en preparación de productos como batidos, helados, mermeladas, yogures (Gordón, 2013). Además, su manejo es factible permitiéndole una alta producción y réditos económicos mayores (Acosta, 2013).

En el Ecuador las provincias con mayor producción de fresa son Pichincha, Tungurahua y Azuay, por lo que se da en zonas desde 1200 hasta 2500 m.s.n.m., con una temperatura diurna que oscila entre 15 a 20°C y nocturna que va de 15 a 16°C; considerando que la fresa tiene un consumo hídrico de 400-600 mm anuales y su humedad relativa óptima es de 60 a 75% (González, 2012). Según Lozada (2011), la producción de fresa es de 5 kg por año.

Tetranychus urticae Koch reduce el rendimiento de la fresa consumiendo la savia de la planta (Cabrera et al, 1996; Klamkowski et al, 2007), y ha desarrollado resistencia (Price et al, 2002; Stumpf y Nauen, 2 002; Herron et al, 2004) a amplia variación genética heredable en la respuesta a acaricidas (Clark et al., 1995; Stumpf y Nauen, 2 002; Wei–Dong et al, 2 003); y su tasa reproductiva es alta (Shaefers y Shanks, 1991).

Las secuencias de ADN son actualmente una herramienta indispensable para delinear e identificar especies (Vogler y Monaghan 2007). Uno de los marcadores más importantes en la sistemática molecular y la evolución, es el ITS2 (Segundo Espaciador Transcrito Interno) que muestra variabilidad significativa de secuencia a nivel de especie (Yao et al, 2010). La disponibilidad de su información estructural permite el análisis a mayor nivel taxonómico, que proporciona información adicional

para mejorar la precisión y robustez en la reconstrucción de los árboles filogenéticos (Keller et al, 2010).

La región ITS2 puede utilizarse como un código de barras eficaz para la identificación de especies vegetales (Chase et al, 2005) y adicionalmente a este, también el locus complementario de la Citocromo oxidasa Subunidad 1 (CO1) para identificar animales (Hebert et al, 2003).

El objetivo de esta investigación fue determinar la variabilidad de la región ITS2 en fragmentos de ADN de individuos procedentes de poblaciones de *T. urticae* en diferentes variedades del cultivo de fresa (*F. vesca*).

CAPÍTULO II

REVISIÓN DE LITERATURA O MARCO TEÓRICO

2.1 ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS

Grisales *et al.* (2010), en su investigación denominada Diferenciación genética de tres poblaciones colombianas de *Triatoma dimidiata* mediante análisis molecular del gen mitocondrial ND4, mencionan que todos los insectos estudiados amplificaron una banda de 614pb, correspondiente a 51 nucleótidos del gen ND4L y 563 del gen ND4. Las secuencias obtenidas del ND4 no mostraron inserciones, deleciones o codones de parada, que es lo esperado para genes codificantes mitocondriales. Todas las secuencias mostraron un alto porcentaje de adenina-timina, con variación entre 1,1% y 1,5% en las poblaciones analizadas. El porcentaje de sitios polimórficos del ND4 fue de 15,27%. Las secuencias de los individuos de Santander mostraron el mayor porcentaje de sitios polimórficos (S) (10,48%), seguido de Cesar (4,97%) y La Guajira (0,53%). El número de mutaciones únicas (Su) y el promedio de cambios nucleotídicos (k) observado fue comparativamente mayor en Santander, que en Cesar y La Guajira. Como era de esperarse en los organismos muy relacionados, el índice promedio de sustitución de nucleótidos para *T. dimidiata* reflejó una fuerte desviación hacia los cambios transicionales con respecto a los de transversión (ts/tv= 2,8). El 74% de los cambios de nucleótidos observados en la secuencia del gen ND4 analizada corresponden a transiciones.

Rodríguez *et al.*, (2011) evaluaron la eficiencia de la extracción del ADN genómico a partir de insectos del Orden Thysanoptera. Como material utilizaron adultos de los géneros *Frankliniella* Karny y *Thrips* Linneaus conservados en etanol al 70%. La eficiencia fue medida a través de la amplificación de la región ITS en una PCR multiplex, utilizando los cebadores ITS1, ITS2, CS249 y CS250. El producto de la PCR fue separado por electroforesis en un gel de agarosa al 1% y se demostró que a partir del protocolo de Aljanabi y Martínez (1997) no hubo amplificación, mientras que con los protocolos de Rugman (2006) y Moritz, et al. (2002) se obtuvieron

patrones de bandas nítidas, lo que demuestra que ambos procedimientos pueden ser utilizados para realizar las extracciones de ADN.

Navajas *et al.*, (1998) compararon los patrones de polimorfismo intraespecífico de dos marcadores con modos de evolución contrastados, ADN ribosomal nuclear (ADNr) y ADN mitocondrial (ADNmt), en el ácaro fitófago *Tetranychus urticae* Koch. El segundo espaciador transcrito interno (ITS2) de rDNA y un fragmento en el gen mtDNA que codifica el citocromo oxidasa I (COI), y amplificaron por PCR y se secuenciaron en muestras de diversos orígenes geográficos distribuidos en todo el mundo. Los 15 haplotipos COI encontrados cayeron en dos linajes filogenéticos principales que difieren en un promedio de 5% de divergencia de nucleótidos. Las muestras de la cuenca mediterránea estaban representadas en ambos linajes y no mostraban estructura filogeográfica. Las otras muestras, de regiones templadas del hemisferio norte, se agruparon en uno de los linajes y mostraron poca variación, lo que indica una reciente colonización de esta región. En contraste, no se encontró ninguna variación en absoluto en el ITS2 en esta especie. Hemos secuenciado tanto el COI como el ITS2 en otras cuatro especies del género *Tetranychus* y encontramos que, a pesar de la ausencia de polimorfismo intraespecífico, el ITS parece evolucionar 2,5 veces más rápido que el COI. Se argumentó que la homogeneidad del ADNr en el rango de especies de *T. urticae* resulta del alto potencial de colonización de esta especie, lo que evita la diferenciación a largo plazo. Los datos preliminares sobre otras dos especies de ácaros con requisitos ecológicos más estrictos y un potencial de colonización más restringido revelaron una diferenciación geográfica sustancial y concordante tanto para ITS2 como para COI.

Navajas *et al.*, (2001), en su investigación Synonymy between two spider mite species, *Tetranychus kanzawai* and *T. hydrangeae* (Acari: *Tetranychidae*), shown by ribosomal ITS2 sequences and cross-breeding experiments, mencionan que la amplificación del segundo espaciador transcrito interno (ITS2) del ADN ribosomal fue utilizada para comparar siete muestras de *Tetranychus kanzawai* Kishida-*T. hydrangeae*. Se utilizó un complejo de ácaros Pritchard y Baker de cinco países diferentes: Australia, el Congo, Indonesia, Japón y los Estados Unidos. No se detectaron diferencias morfológicas entre estos ácaros y sus secuencias ITS2 mostraron una gran similitud, excepto por una pequeña divergencia de nucleótidos de 0.2% en muestras de Australia e Indonesia. Los cruces recíprocos y

retrocruzamientos entre los ácaros que supuestamente son *T. kanzawai* y *T. hydrangeae*, respectivamente, mostraron compatibilidad reproductiva. Las hembras híbridas fértiles se obtuvieron en todos los casos, lo que indica la conspecificidad de los ácaros analizados. Se concluye que *T. hydrangeae* es un sinónimo de *T. kanzawai*. La evidencia sugiere que *T. kanzawai* se originó en el sudeste asiático y probablemente se extendió por todo el mundo en *Hydrangea* spp.

Navajas *et al.*, (1994) en su investigación Intraspecific diversity of the Cassava Green Mite *Mononychellus progresivus* (Acari: Tetranychidae) using comparisons of mitochondrial and nuclear ribosomal DNA sequences and cross-breeding, evaluaron la diversidad intraespecífica en el ácaro verde *Mononychellus progresivus*. Examinaron utilizando individuos recolectados en Benin, el Congo, Colombia y Brasil. Las comparaciones se basaron en secuencias de ADN mitocondrial y ribosomal y los resultados de varios experimentos de cruzamiento. La variación de la secuencia la examinaron en un total de 1139 pares de bases (pb) que constituyen el ADN ribosómico ITS2 (805 pb) y un fragmento del gen del citocromo oxidasa I (COI) (334 pb). La divergencia de secuencia es baja, variando de 0% a 2,1% para COI y de 0% a 0,4% para ITS2. Las comparaciones entre cepas demostraron que las dos poblaciones africanas parecen ser idénticas y similares a la población colombiana, mientras que la población brasileña fue claramente diferente. Los datos apoyan la hipótesis de una introducción única de la especie en las dos poblaciones africanas. Los experimentos de cruce han mostrado una esterilidad híbrida parcial, sugiriendo una incompatibilidad genética consistente con las diferencias detectadas por los datos de secuencia.

Paternina, Verbel y Bejarano (2016) seleccionaron 15 de las 50 garrapatas analizadas para la secuenciación con ambos genes: seis del complejo *R. sanguineus*, cinco de *R. microplus* y cuatro de *D. nitens*. Los haplotipos del gen 16S se encuentran depositados en GenBank bajo los códigos KT906174-KT906176 y los haplotipos encontrados del gen COX1 bajo los códigos KT906177-KT906190. En los árboles filogenéticos observaron que ambos marcadores genéticos serán capaces de diferenciar con gran confiabilidad las tres especies de garrapatas aunque las distancias interespecíficas medias según el modelo de Tamura-Nei con el COX1 siempre fueron mayores a las del gen mitocondrial 16S. El alineamiento de

secuencias evidenció que el gen 16S presentaba 70 sitios variables, todos ellos parsimoniosamente informativos y con divergencias interespecíficas de entre 14,49 y 19,59 %, mientras que el alineamiento de la secuencia del gen COX1 presentaba 171 sitios variables, de los cuales 169 eran parsimoniosamente informativos y con divergencias interespecíficas de entre 16,98 y 22,02 %. A partir de la estimación de la entropía por sitio fue posible notar que los sitios variables del gen COX1 se distribuían a lo largo de la matriz de secuencias, mientras que los sitios variables del gen 16S eran menos frecuentes y se distribuían principalmente hacia la región central y el extremo 3' del fragmento analizado.

2.2 MARCO CONCEPTUAL O CATEGORÍAS FUNDAMENTALES

2.2.1. Marcadores moleculares: ITS2 (segundo espaciador transcrito interno)

Merget et al. (2012) sostienen que el espaciador transcrito interno (ITS) se refiere al ADN espaciador situado entre el ARN ribosomal de subunidad pequeña (rRNA) y los genes de rRNA de subunidad grande en el cromosoma o la región transcrita correspondiente en la transcripción del precursor de rRNA policistrónico.

ITS2 es uno de los marcadores más importantes en sistemática molecular y evolución, ITS2 muestra una variabilidad de secuencia significativa a nivel de especie o inferior (Coleman, 2003). La disponibilidad de su información estructural permite el análisis a un nivel taxonómico superior, que proporciona información adicional para mejorar la precisión y la solidez en la reconstrucción de árboles filogenéticos (Keller et al. 2010). Además, ITS2 es potencialmente útil como un código de barras de ADN estándar para identificar plantas y como un código de barras para identificar animales, insectos y hongos. ITS2 es considerado como uno de los códigos de barras de ADN candidato debido a sus valiosas características; incluida la disponibilidad de regiones conservadas para diseñar cebadores universales, la facilidad de su amplificación y la variabilidad suficiente para distinguir incluso las especies estrechamente relacionadas (Li et al. 2010).

2.2.2. Cultivo de fresa (*Fragaria vesca*)

Zarazúa et al. (2011) mencionan que el género fragaria apareció en estado silvestre en América, Asia y Europa. El cultivo de esta fruta se extendió en Europa hasta el siglo XIX, momento en el cual comenzaron a surgir híbridos entre las especies europeas y americanas con frutos de mayor tamaño llamados fresones.

2.2.2.1. Taxonomía

Tabla 1. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE LA PLANTA DE FRESA.

Taxón	Denominación
Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Rosales
Familia	Rosaceae
Género	<i>Fragaria</i>
Especie	<i>Fragaria vesca</i>

FUENTE: Lozada, 2011.

2.2.2.2. Morfología

Kessel (2012) menciona que la planta de fresa posee sistema radicular fasciculado, que se compone de raíces y raicillas que no sobrepasan los 40 cm. El tallo está constituido por un eje corto de forma cónica llamado corona, en el que se observan numerosas escamas foliares. Las hojas aparecen en roseta y se insertan en la corona, son largamente pecioladas y provistas de dos estípulas rojizas. Su limbo está dividido en tres folíolos pediculados, de bordes aserrados, tienen un gran número de estomas. Las inflorescencias se pueden desarrollar a partir de una yema terminal de la corona o de yemas axilares de las hojas. La ramificación de la inflorescencia puede ser basal es decir flores de similar tamaño o distal con una flor primaria y otras de menor tamaño. La flor tiene entre cinco y seis pétalos, de 20 a 35 estambres y varios cientos de pistilos sobre un receptáculo carnoso. El fruto se origina de un óvulo fecundado de tipo aquenio los cuales están distribuidos por la superficie del receptáculo carnoso, estimulando su crecimiento y coloración.

2.2.2.3 Variedades

Las variedades predominantes en la provincia de Tungurahua son las siguientes:

Albi3n

Su principal característica es su calidad de fruta, tanto por tama1o como por sabor y firmeza de la fruta. Es de f3cil recolecci3n y posee un periodo de vida 3til aceptable durante la pos-cosecha, adem3s tiene mejor sabor y aspecto (Rubio *et al.*, 2014).

Monterrey

Se caracteriza por su gran calidad de fruto, excelente sabor y tama1o. La forma de la planta es m3s compacta y erecta, tambi3n produce menos cantidad de fruta peque1a y por tanto el porcentaje de desecho es menor. El color interno del fruto es m3s claro que otras variedades por lo tanto no es indicado para el procesado, pero por su firmeza si para lo es para el mercado fresco (Masis y Aguilar, 1990).

Festival

Produce fruta abundante y de excelente calidad, tanto para consumo en fresco como para la industria. Es una planta vigorosa de d3a o fotoperiodo cort3, productora en invierno con producci3n temprana, consistente y uniforme, es gran productora de estolones y presenta buen rendimiento. Produce fresa brillante y roja de forma c3nica, de textura firme con excelente sabor. El fruto mantiene un tama1o mediano a grande a lo largo de la producci3n. Es susceptible a antracnosis de fruto (*Colletotrichum aculatum*), pudrici3n de corona (*Colletotrichum gloeosporoides*) y Bacterias (Rodr3guez - Bautista et al. 2012).

2.2.3. Taxonomía 3caros *Tetranychus urticae* Koch

Los miembros de la familia *Tetranychidae* son una plaga que se presenta en una gran diversidad de plantas y ocasionan da1os severos como la disminuci3n del vigor del vegetal, el manchado y la ca3da de las hojas provocado por la alimentaci3n del 3caro (Kheradpir et al. 2007).

El ácaro de dos manchas *Tetranychus urticae* Koch tiene una amplia gama de plantas hospederas, sin embargo, el ácaro no acepta todas las plantas en el mismo grado debido a las diferencias en los componentes nutritivos y tóxicos (Boom, Beek y Dicke, 2003). Ataca a numerosos cultivos de importancia económica, maíz, algodón, rosas, claveles, fresas, cítricos, vid, frutales y ornamentales (Abad et al. 2009).

2.2.3.1. Taxonomía

Aucejo, Gómez y Jacas (2004) detallan la clasificación taxonómica de *T. urticae* Koch:

Tabla 2. DESCRIPCIÓN TAXONÓMICA DE *T. urticae* Koch.

Taxón	Denominación
Reino	Animalia
Filo	Arthropoda
Clase	Arachnida
Subclase	Acari
Orden	Prostigmata
Familia	Tetranychidae
Género	<i>Tetranychus</i>
Especie	<i>T. urticae</i> Koch

2.2.3.2. Morfología

Ferraguty Santonja (1989) mencionan que la opinión de la mayor parte de los taxónomos es que *T. urticae* es una especie cosmopolita y politípica, que presenta un aspecto distinto dependiendo de la distribución geográfica y del clima, y que se encuentra en una fase de diversificación que conducirá a la formación de varias especies diferentes. La separación de *T. urticae* es posible por el examen del edeago del macho, ya que las hembras son semejantes a otras especies. El pomo del edeago es pequeño y presenta dos proyecciones agudas, siendo la anterior, en ocasiones, redondeada. El margen dorsal del pomo es convexo.

Las hembras adultas son de coloración variable, dependiendo del clima, sustrato y edad del animal. Pueden ser amarillentas, verdosas o rojas, con dos manchas oscuras más o menos grandes situadas en las zonas laterales del dorso, el color de los estados inmaduros recuerda al de los adultos, pero siempre tienen una tonalidad más clara, el huevo es esférico, liso y de color ámbar o anaranjado.

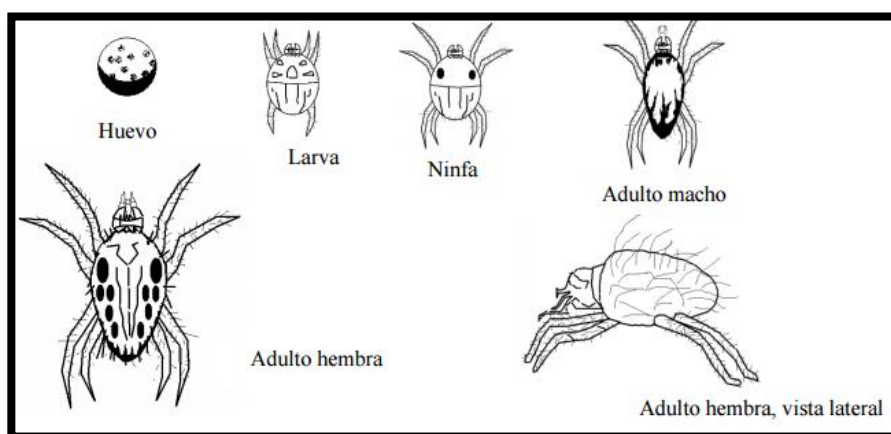


Figura 1. Estadios de desarrollo de *Tetranychus urticae*

FUENTE: Lozada, 2011

2.2.3.3 Ecología

Tetranychus urticae Koch es un ácaro fitófago con alto potencial reproductivo, ciclo de vida corto, tasa de desarrollo rápido y alta capacidad para dispersarse. Su tamaño oscila entre 0,4 y 0,6 mm, en el caso de la hembra adulta, que tiene un aspecto globoso. El macho es más pequeño y aperado. Este ácaro puede presentar diferentes características morfológicas, sobre todo su color puede variar en respuesta a su régimen alimenticio, factores ambientales, planta huésped y estado de desarrollo (Zhang y Jacobson, 2000). Se reproduce mediante partenogénesis de tipo arrenotoca en la que los machos se desarrollan a partir de huevos no fertilizados, mientras que las hembras se desarrollan a partir de huevos fecundados. Esta especie presenta una proporción de sexos entre 2:1 y 9:1 a favor de las hembras (Macke et al. 2011). Es ovípara y pasa por cinco fases de desarrollo: huevo, larva, protoninfa, deutoninfa y adulto, entre cada una de estas hay un período quiescente (fase inactiva) los cuales son conocidos como protocrisis, deutocrisis y teliocrisis; en cada una de estas

fases se da el desprendimiento del exoesqueleto quitinoso para así aumentar de tamaño hasta alcanzar el estadio adulto, producen hilos de ceda en donde vive la colonia. (Argolo, 2012).

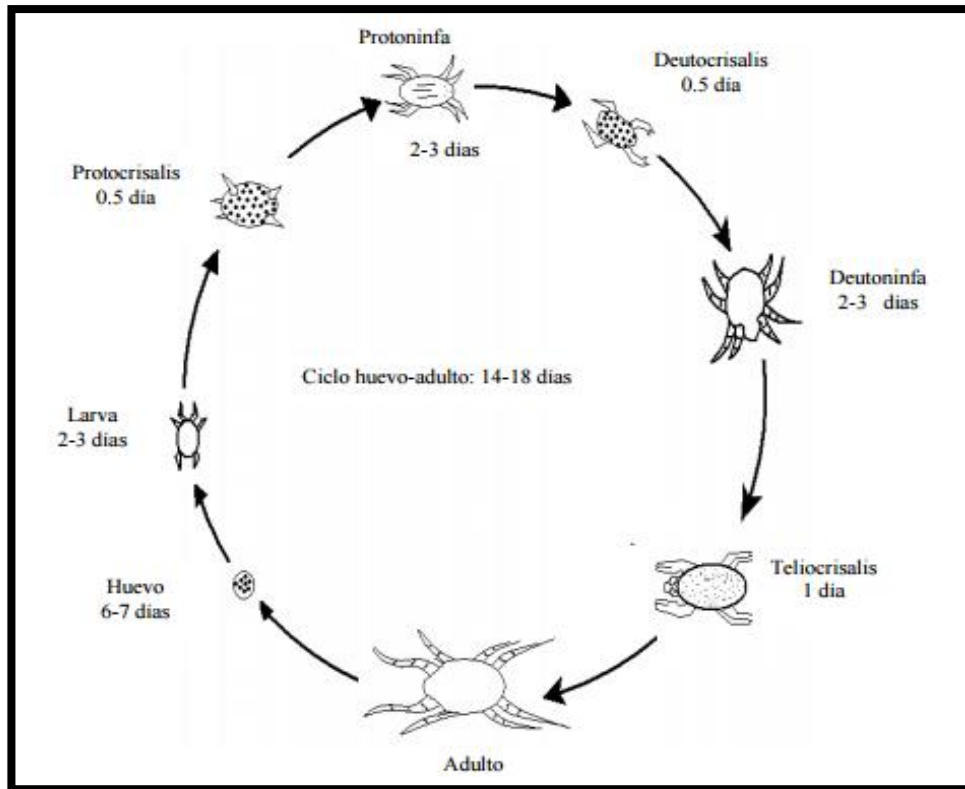


Figura 2. Ciclo de vida de *Tetranychus urticae* con una temperatura promedio de 20 0C y una humedad relativa de 65%.

FUENTE: Lozada, 2011.

CAPÍTULO III

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1. HIPÓTESIS

Hi. La variabilidad de la región ITS2 en poblaciones de *Tetranychus urticae* en el cultivo de fresa, muestra significativa variabilidad de esta secuencia.

Ho. La variabilidad de la región ITS2 en poblaciones de *Tetranychus urticae* en el cultivo de fresa, no muestra significativa variabilidad de esta secuencia.

3.2. VARIABLES DE LA HIPÓTESIS

3.2.1. Variable independiente

- Cultivo de fresa (*Fragaria vesca*)

3.2.2. Variable dependiente

- Variabilidad de la región ITS2 del Ácaro (*Tetranychus urticae*)

3.3. OBJETIVOS

3.3.1. Objetivo General

- Determinar la variabilidad de la región ITS2 en fragmentos de ADN de individuos provenientes de poblaciones de *T. urticae* en diferentes variedades del cultivo de fresa (*F. vesca*).

3.3.2. Objetivos Específicos

- Establecer diferencias específicas en las longitudes del fragmento ITS2 para diferentes poblaciones de *T. urticae* en variedades de *Fragaria vesca*.
- Determinar las secuencias de pares de bases de los segmentos de ITS2 para diferentes poblaciones de *T. urticae* en variedades de *Fragaria vesca*.
- Relacionar a las poblaciones de *T. urticae* con diferencias en los fragmentos ITS2, para establecer relaciones genéticas entre ellas.

CAPÍTULO IV

MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. UBICACIÓN DEL EXPERIMENTO (ENSAYO)

4.1.1. Investigación

El presente trabajo de investigación titulado “VARIABILIDAD DE LA REGIÓN ITS2 EN POBLACIONES DE *Tetranychus urticae* Koch EN EL CULTIVO DE FRESA (*Fragaria vesca*)” se realizó en la Granja Experimental Docente Querochaca, propiedad de la Universidad Técnica de Ambato, Facultad de Ciencias Agropecuarias, ubicada en el sector de El Tambo, parroquia la Matriz, del cantón Cevallos, provincia de Tungurahua. Sus coordenadas geográficas son 1° 21' 02” de latitud Sur y 78° 36' 21” de longitud Oeste, a la altitud de 2 868 msnm. Se hizo uso de los Laboratorios de Botánica, en donde se realizó la cría del ácaro *Tetranychus urticae* Koch y se observaba diariamente mediante el estereoscopio; y Biotecnología, en donde se realizó la extracción de ADN.

4.1.2. Material Vegetal

Las muestras de *Fragaria vesca* se tomó de tres variedades (Albión, Festival y Monterrey) del Invernadero de fresa de la Facultad de Ciencias Agropecuarias.

4.2. CARACTERÍSTICAS DEL LUGAR

4.2.1. Clima

Según el Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología, INAMHI (2 016), el clima está clasificado como templado frío semi-seco con una temperatura media de 14,5°C y la humedad relativa media de 77,25%, registrados en los meses de marzo, abril y mayo del 2016.

4.2.2. Agua

El agua utilizada en la Granja Experimental Docente Querochaca proviene del canal Ambato- Huachi- Pelileo, pH: 7,82, C.E: 0,3 milimhos/cm, alcalinidad: 140,2 mg/l, y una dureza total: 110,2 mg/l. (Cajo, 2 016).

4.2.3. Suelo

El Gobierno Autónomo Descentralizado (GAD) del cantón Cevallos (2014), indica que el suelo del cantón Cevallos es ondulado desde los 2.640 msnm (Río Pachanlica) hasta los 3.040 msnm (Camino Real). El suelo es arenoso, derivado de materiales piro-clásticos poco meteorizados con baja retención de humedad, es pobre en materia orgánica (menor al 3%), seco y con riesgo de stress hídrico por el déficit de agua de riego. Las laderas de la parte baja son áreas muy secas cuyas pendientes varían entre 5 a 50%, de textura arenosa. La mayor parte del territorio cantonal presenta drenaje excesivo, que corresponde al 69.97% del territorio, esta característica implica baja capacidad del suelo para retener el agua influyendo en las actividades agropecuarias.

4.3. EQUIPOS Y MATERIALES

4.3.1. Materiales.

- Micropipetas
- Tubos EPPENDORF
- Puntas de micropipetas
- Tubos para PCR
- Papel parafilm
- Guantes
- Papel toallín
- Vasos de precipitación
- Erlenmeyer
- Probetas
- Ácaros *T. urticae*
- Hojas de fresa
- Bolsas plásticas con cierre hermético
- Pincel 000
- Tijera
- Marcador de tinta indeleble
- Etiquetas
- Almohadilla de poliuretano de 1cm de espesor

- Algodón
- Piseta con agua destilada
- Porta y cubre objetos
- Cuaderno cocido de 100 hojas
- Aguja de disección
- Alfileres con cabeza de colores
- Papel filtro
- Papel aluminio
- Hidrómetro
- Gradilla para tubos eppendorf

4.3.2. Equipos.

- Cámara de electroforesis
- Fuente de poder
- Microcentrifugadora
- Termociclador
- Transluminador UV
- Baño María
- Vortex
- Centrífuga
- Estereoscopio

4.3.3. Reactivos.

- Buffer TBE
- Alcohol
- Etanol
- Agarosa
- Agua destilada
- Primer ITS (directo y reverso)
- Acetato de sodio
- Isopropanol

- Master Mix-DreamTaq
- Cloruro de Magnesio
- Agua Ultrapura

4.4. FACTORES EN ESTUDIO

1. Segmentos variables de ADN.
2. Poblaciones de *Tetranychus urticae* en cultivares de fresa.

4.5. TRATAMIENTOS

Tres variedades de *F. vesca* ('Albi3n', 'Monterrey' y 'Festival')

4.6. DISEÑO EXPERIMENTAL

Se trat3 de un muestreo, no hay diseo experimental.

4.7. VARIABLES RESPUESTA

4.7.1. Identificaci3n de las poblaciones de *Tetranychus urticae*

Se llev3 la muestra de hojas infestadas de las tres variedades (Albi3n, Monterrey y Festival) de *T. urticae* bajo el aumento del estereoscopio, las hojas fueron examinadas para seleccionar los 3caros. Seg3n la clave taxon3mica de Guti3rrez (1985) y Ochoa et al. (1994) la especie fue determinada por comparaci3n con la morfolog3a del aedeago.

4.7.2. Extracción de ADN de *Tetranychus urticae* 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 entre 20 y 30 ácaros hembras por especie y variedad en un mortero y se colocó en un tubo para micro centrífuga, se le agregaron 800 μ l de solución de extracción recién preparado y se incubó a 65°C en baño María por una hora. Se centrifugó a 14.000 rpm (máxima velocidad) durante 10 min, y se transfirió la fase acuosa (superior) a un tubo nuevo. Inmediatamente se agregó un volumen igual (800 μ l) de cloroformo–alcohol isoamílico y se mezcló por inversiones suaves. Se volvió a centrifugar a 14.000 rpm por 10 min y se separó nuevamente la fase superior en un tubo nuevo. Para la eliminación de ARN se trató con ARNasa (10 mg/ml) incubando durante 30 min a 37°C. En seguida se agregaron 800 μ l de isopropanol a -20°C, y se colocó una hora en el congelador para precipitar el ADN. Para formar el pellet de ADN, se centrifugó nuevamente a 14.000 rpm por 10 min. Se tiró el sobrenadante, se lavó el pellet con 400 μ l de etanol al 70%, una y otra vez. Se dejó secar a temperatura ambiente y se añadió solución TBE 1X en una cantidad 1:1, finalmente se colocó en el baño María a 37°C.

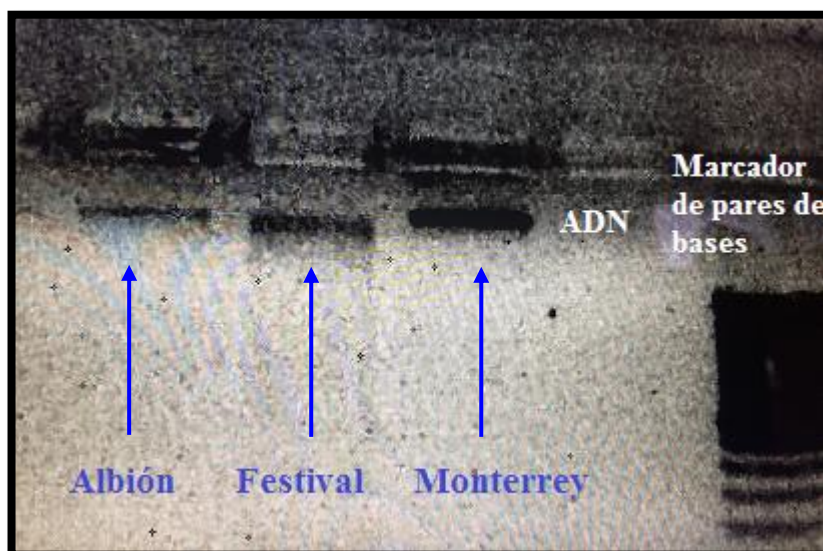


Figura 3. Obtención de ADN de *Tetranychus urticae* en tres variedades de *Fragaria vesca* (Albión, Festival y Monterrey).

Elaborado por: López, 2018

4.7.3. Amplificación de ADN mediante el protocolo de ITS2 para PCR.

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

4.7.4. Protocolo ITS2 Barcode *Tetranychus*

La PCR se realizó en un termociclador (Perkin Elmer Gene Amp PCR System 2400), bajo las siguientes condiciones: pre-desnaturalización a 94 °C por 4 min, seguido de 35 ciclos, de desnaturalización 94 °C 30 seg., alineación 51 °C por 40 seg. y acoplamiento 72 °C por 40 seg., post acoplamiento 72 °C por 10 min y preservación a 4 °C hasta su utilización. La separación del ADN amplificado de cada muestra se ejecutó mediante electroforesis en geles de agarosa 2 %, con solución TBE.

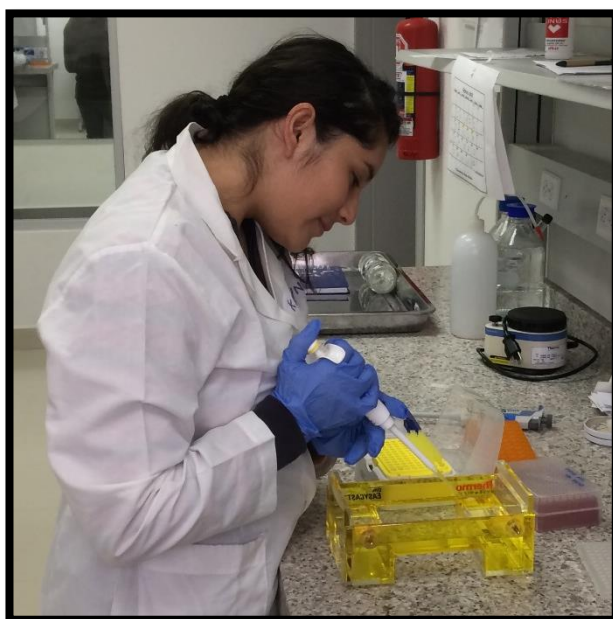


Figura 4. Colocación de ADN de *T. urticae* de tres variedades de *Fragaria vesca* en los posillo del gel preparado en la cámara de electroforesis para ITS2.

Elaborado por: López, 2018

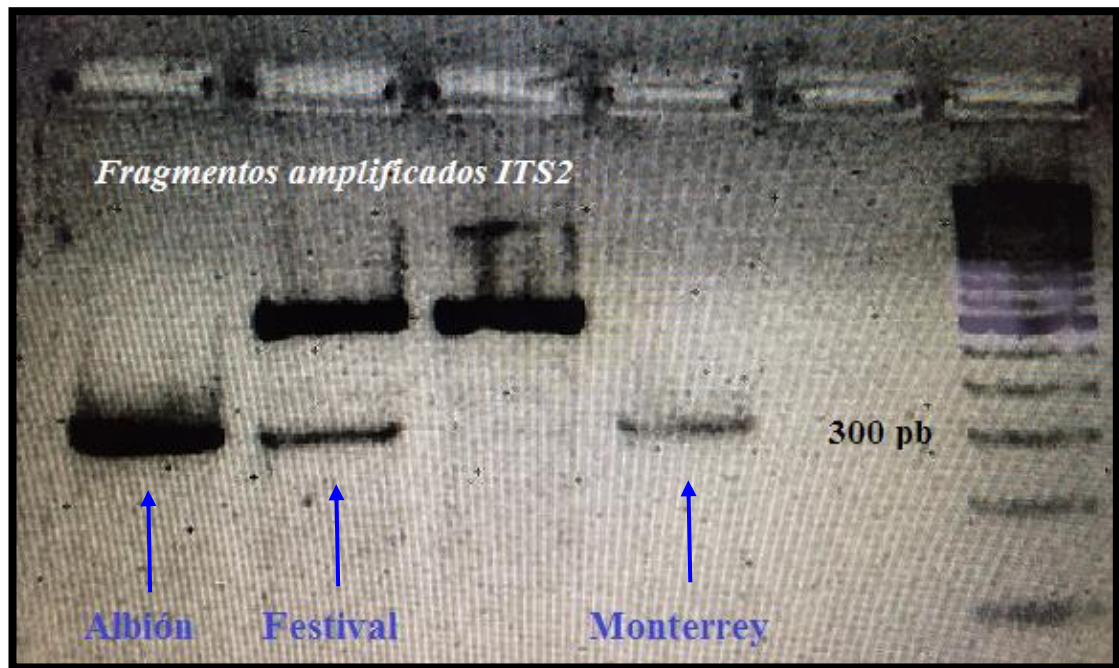


Figura 5. Obtención de ITS2 de *Tetranychus urticae* en tres variedades de *Fragaria vesca* (Albión, Festival y Monterrey).

Elaborado por: López, 2018

4.8. PROCESAMIENTO DE LA INFORMACIÓN

Para el procesamiento de información de la secuenciación de ADN de *T. urticae* se utilizó la plataforma BLAST del NCBI (National Center for Biotechnological Informatics), es un programa libre por internet de análisis de ADN. Los datos se reportaron en relación al porcentaje de similitud del total de bandas amplificadas.

CAPITULO V RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Determinación de la variabilidad genética de *Tetranychus urticae* mediante marcadores RAPD.

5.1.1. Secuencias de ADN

En la secuenciación de ADN de *T. urticae* se encontró 12 polimorfismos en 197 pares de bases nitrogenadas (Adenina, Citosina, Guanina y Timina), por lo que hubo variaciones en la secuencia de un lugar determinado del ADN, encontrándose un porcentaje de diferencia de 6.09%, como se puede observar en la tabla 3.

Según Navajas et al. (1998), en su investigación secuenciaron el ITS2 completo en cinco especies del género *Tetranychus* (*T. urticae*, *T. kanzawai* Kishida, *T. mcdanieli* McGregor, *T. pacificus* McGregor y *T. neocaledonicus* André), la longitud de la secuencia ITS2 fue de \cong 480 pares de bases (pb) en las especies de *Tetranychus* examinadas, encontraron polimorfismos tanto en el ITS2 como COI, siendo más alto para COI que para ITS2.

Por otra parte Hinomoto et al. (2001) reportaron polimorfismos en 36 sitios de la secuencia de ADN (9,5%) de 13 poblaciones de *T. urticae*, de las cuales nueve provenían de Japón y las otras cuatro eran de Italia, Brasil, Tailandia y Taiwán.

Tabla 3. SECUENCIAS DE ADN; ADENINA (A), CITOSINA (C), GUANINA (G), TIMINA (T) DE *Tetranychus urticae* HOSPEDADO EN PLANTAS DE *Fragaria vesca* DE TRES VARIEDADES (ALBIÓN, MONTERREY Y FESTIVAL).

NOMBRE																				
FESTIVAL	G	T	T	G	A	G	A	T	G	T	A	A	A	A	A	T	A	A	T	C
MONTERREY	G	T	T	G	A	G	A	T	G	T	A	A	A	A	A	T	A	A	T	C
ALBIÓN	G	T	T	G	A	G	A	T	G	T	A	A	A	A	A	T	A	A	T	C

A	A	C	C	T	A	C	T	A	C	C	G	G	T	A	C	G	C	A	T
A	A	C	C	T	A	C	T	A	C	C	G	G	T	A	C	G	C	A	T
A	A	C	C	T	A	C	T	A	C	C	G	G	T	A	C	G	C	A	T

A	T	A	T	G	C	A	T	T	G	T	T	T	T	T	T	A	G	A	G	G
A	T	A	T	G	T	A	T	T	G	T	T	T	T	T	G	A	T	A	G	G
A	T	A	T	G	T	A	T	T	G	T	T	T	T	T	G	A	T	A	G	G

A	T	T	G	T	A	G	A	G	G	A	T	T	G	T	A	T	A	T	T
A	C	T	G	T	A	G	A	G	G	A	T	T	G	T	A	T	A	T	T
A	C	G	G	T	A	G	A	G	G	A	T	T	G	T	A	T	A	T	T

T	A	A	A	T	G	C	C	T	T	T	A	A	T	A	T	G	C	A	T
T	A	A	A	T	G	C	C	T	T	T	A	A	T	A	T	G	C	A	T
T	A	A	A	T	G	C	C	T	T	T	A	A	T	A	T	G	C	A	T

G	A	A	T	C	T	T	G	A	T	G	T	T	T	T	A	T	T	C	C
G	A	A	T	C	T	T	G	A	T	G	T	T	T	T	A	T	T	C	C
G	A	A	T	C	T	T	G	A	T	G	T	T	T	T	A	T	T	C	C

T	T	T	T	C	T	T	G	A	A	T	T	G	C	A	A	T	T	C	T
T	T	T	T	C	T	T	G	A	C	C	T	G	C	A	A	C	T	C	T
T	T	T	T	C	T	T	G	A	A	T	T	G	C	A	A	C	T	C	T

A	G	G	T	A	C	C	T	T	T	A	C	G	T	T	G	C	A	A	T
A	G	G	T	A	T	C	T	T	T	G	C	G	T	T	G	C	A	A	T
A	G	G	T	A	T	C	T	T	T	G	C	G	T	T	G	C	A	A	T

T	T	A	G	T	A	A	G	G	A	G	A	A	T	C	T	C	A	A	A
T	T	A	G	T	A	A	G	G	A	G	A	A	T	C	T	C	A	A	A
T	T	A	G	T	A	A	G	G	A	G	A	A	T	C	T	C	A	A	A

T	C	C	T	A	C	T	T	G	T	T	T	C	A	C	A	T	-	-	-
T	C	C	T	A	C	T	T	A	T	G	T	C	A	C	A	T	-	-	-
T	C	C	T	A	C	T	T	A	T	T	T	C	A	C	A	T	-	-	-

Festival (F)

Monterrey (M)

Albión (A)

Elaborado por: López, 2019.

5.1.2 Composición de bases nitrogenadas

En los fragmentos de ADN de *T. urticae*, los porcentajes más altos respecto a la composición de las bases nitrogenadas respecto a la tabla 4, son: Adenina (A) con 29,44% en Festival (F) y Albión (A); Timina con 39.09% en F; Citosina (C) con 15,74% en Monterrey (M); Guanina (G) con 17.26% en Monterrey (M) y Albión (A); y Adenina más Timina (A + T) con 68.53% en Festival (F).

Hinomoto et al. (2001) realizaron el análisis filogenético de las dos formas de *T. urticae* (verde y rojo) en Japón, concluyendo que los dos linajes de *T. urticae* están comprendidas en un solo clúster y que las secuencias son ricas en A + T (entre 74,8% - 76,4%). Al igual la investigación de Navajas et al. (1996) secuenciaron parte del gen de la subunidad I (COI) de la citocromo oxidasa mitocondrial en 20 especies de ácaros fitófagos pertenecientes a nueve géneros y dos familias (Tetranychidae y Tenuipalpidae), las secuencias eran extremadamente ricas en A + T (75%), por lo tanto, parece haber una presión continua en insectos y ácaros para mantener una alta proporción de A + T.

Tabla 4. COMPOSICIÓN DE LAS BASES NITROGENADAS DE LOS FRAGMENTOS DE ITS2 AMPLIFICADOS A PARTIR DE ÁCAROS (*Tetranychus urticae* KOCH) EN FRESA (*Fragaria vesca*) EN DIFERENTES CULTIVARES DE “FESTIVAL” (F), “MONTERREY” (M) Y “ALBIÓN” (A).

Nombre	%A	%T	% C	% G	% A + T
F	29,44	39,09	14,72	16,75	68,53
M	28,93	38,07	15,74	17,26	67
A	29,44	38,58	14,72	17,26	68,02

Elaborado por: López 2019.

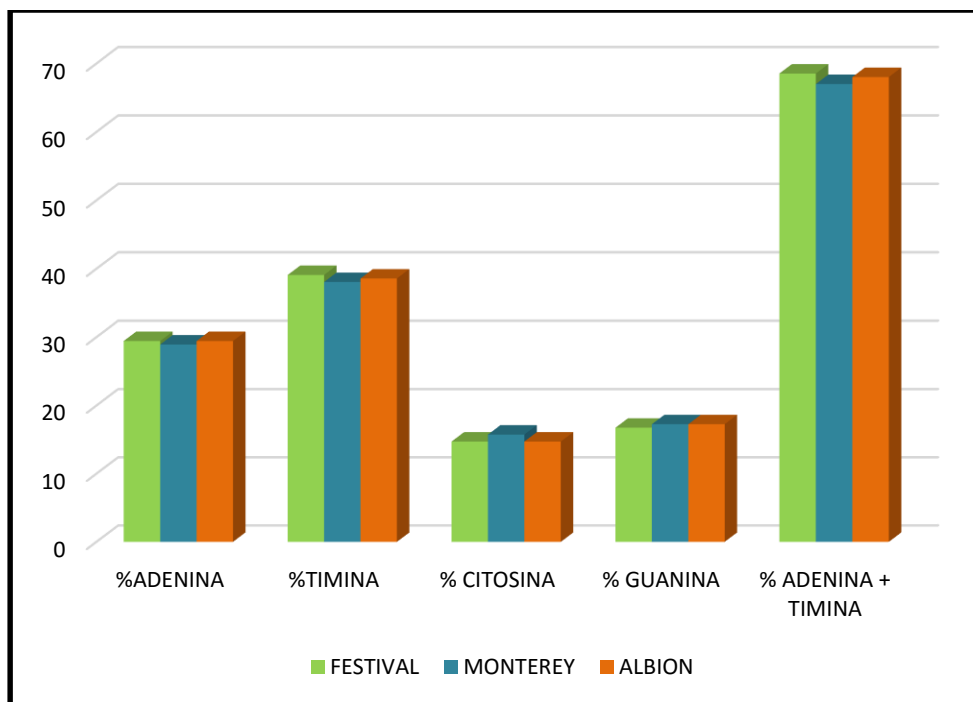


Figura 6. Composición de Bases Nitrogenadas (Adenina (A), Timina (A), Citosina (C), Guanina (G) y Adenina más Timina (A + T)) en los fragmentos ITS2 amplificados a partir de ácaros (*Tetranychus urticae* Koch) en Fresa (*Fragaria vesca*) en diferentes cultivares de “Festival” (F), “Monterrey” (M) y “Albión” (A)

Elaborado por: López 2019.

5.1.3. Porcentaje de similitud entre las bases nitrogenadas

El número de sustituciones se da por el cambio o sustitución de una base por otra en el ADN, en donde se encontraron 12 polimorfismos, de las cuales entre F - M hay 11 sustituciones con un 94,42% de similitud; entre F – A, 9 sustituciones con un 95,43% y entre M – A. 4 sustituciones con un 97,97%, como lo muestra la Tabla 5.

Se pudo observar que entre F – M es el valor más alto de difusión entre las bases nitrogenadas, se alcanza un 5,58%, mientras que en M – A esta diferencia es tan solo del 2.03%.

Los artrópodos han desarrollado dos mecanismos principales de resistencia a pesticidas: mecanismo que disminuye la posición debido a cambios cuantitativos o cualitativos en las principales enzimas detoxificadoras, y mecanismos que disminuyen la sensibilidad debido a cambios en sitios específicos de sensibilidad principalmente por mutaciones puntuales (Feyereisen et al. 2015).

Bajda et al. (2017) reportaron el descubrimiento de una mutación H92R en el complejo I relacionado con la unión de la ubiquinona causante de resistencia a acaricidas en poblaciones de *Tetranychus urticae*. Esta mutación obviamente se originó en las Bases Nitrogenadas del ADN y resultó en un mecanismo de resistencia revelado por estos autores.

Por otra parte, Ros y Breeuwer, (2007) usaron fragmentos de ADNm (mitocondrial) en el estudio de las relaciones filogeográficas entre ácaros Tetranychidae y sus plantas hospederas y reportaron una alta variación intraespecífica posiblemente debido a presiones selectivas externas (ambiente, presencia de parásitos, etc.), sin embargo, no pudieron establecer evidencias constatables de una asociación directa con la planta huésped ni patrones filogeográficos.

Tabla 5. NÚMERO DE SUSTITUCIONES Y PORCENTAJE DE SIMILITUD DE LAS BASES NITROGENADAS: ADENINA (A), CITOSINA (C), GUANINA (G), TIMINA (T) DE *Tetranychus urticae*, ENTRE LAS TRES VARIEDADES DE FRESA (*Fragaria vesca*)

NOMBRE	NUMERO DE SUSTITUCIONES	% SIMILITUD
F – M	11	94,42
F – A	9	95,43
M – A	4	97,97

Elaborado por: López, 2019.

5.1.4. Datos del banco de genes (GenBank)

Según National Center for Biotechnology Information, (2018) al ingresar las secuencias de ADN de la población de *T. urticae*, el porcentaje de identidad es de 75%; es decir, indica la proporción de bases idénticas que comparten dos secuencias que se comparan.

De manera adicional, los datos de secuenciación de ADN de *T. urticae* hospedado en plantas de *Fragaria vesca* de tres variedades de fresa: Festival, Monterrey, Albión

(Tabla 3) fueron comparados con los datos provenientes del Banco de Genes (GenBank) y se reporta en la Tabla 6, determinando que en el GenBank se encuentra depositada al menos una secuencia proveniente de *Tetranychus urticae* para los genes ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, secuencia completa y parcial, cepa: TuG0188, con 819 pares de bases, lo cual nos permite inferir sobre cierta veracidad en nuestros resultados

([https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/AB736035.1?report=genbank&log\\$=nuclalign&blast_rank=1&RID=0N86Z614014](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/AB736035.1?report=genbank&log$=nuclalign&blast_rank=1&RID=0N86Z614014))

Tabla 6.DATOS PROVENIENTES DEL BANCO DE GENES (GenBank) COMPARANDO LAS SECUENCIAS OBTENIDAS DE *T. urticae* DE LAS DIFERENTES VARIEDADES DE FRESA (FESTIVAL, MONTERREY, ALBIÓN).

Tetranychus urticae gene for ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, complete and partial sequence, strain: TuG0188

Sequence ID: AB736035.1 Length: 819 Number of Matches: 1

LOCUS AB736035 819 bp DNA linear INV 05-MAR-2013

DEFINITION *Tetranychus urticae* gene for ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, complete and Partial sequence, strain: TuG0188.

ACCESSION AB736035

VERSION AB736035.1

KEYWORDS .

SOURCE *Tetranychus urticae* (two-spotted spider mite)

ORGANISM *Tetranychus urticae*

Eukaryota; Metazoa; Ecdysozoa; Arthropoda; Chelicerata; Arachnida;

Acari; Acariformes; Trombidiformes; Prostigmata; Eleutherengona;

Raphignathae; Tetranychoidae; Tetranychidae; *Tetranychus*.

REFERENCE 1

AUTHORS Matsuda,T., Fukumoto,C., Hinomoto,N. and Gotoh,T.

TITLE DNA-based identification of spider mites: molecular evidence for cryptic species of the genus *Tetranychus* (Acari: Tetranychidae)

JOURNAL J. Econ. Entomol. 106 (1), 463-472 (2013)

Fuente:National Center for Biotechnology Information, 2018

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES, BIBLIOGRAFÍA Y ANEXOS

6.1. CONCLUSIONES

Se determinó la variabilidad de la región ITS2 en fragmentos de ADN de individuos provenientes de poblaciones de *T. urticae* en tres variedades de *Fragaria vesca* (Festival, Monterrey, Albión); dando como resultado 197 pares de Bases Nitrogenadas (Adenina, Timina, Citosina, Guanina).

Los polimorfismos encontrados en la secuencia de ADN con 197 pares de bases Nitrogenadas, es de 12, es decir hubo variaciones en la secuencia de un lugar determinado del ADN entre los individuos de la población de *T. urticae*; en donde el porcentaje de diferencia es de 6,09%.

Los porcentajes de Adenina (A) y Timina (T) sobresalieron en las tres variedades de fresa (*Fragaria vesca*), mientras que Citosina (C) y Guanina (G) tuvieron menos representación, es decir, estas secuencias de ADN son ricas en A + T, con porcentajes de 68,53% en Festival (F), 67% en Monterrey (M) y 68,02% en Albión (A).

Un polimorfismo puede consistir en la sustitución de una simple base nitrogenada, en nuestro caso se encontraron 12 sustituciones, de las cuales 11 sustituciones fueron encontradas entre Festival y Monterrey (F – M) con un 5,58% de divergencia y 94,42% de similitud, es decir la proporción de bases nitrogenadas semejantes. Entre Festival y Albión (F – A), 4,57% de divergencia y 95,43% de similitud, y entre Monterrey y Albión (M – A) 2,03% de divergencia y 97,97% de similitud.

Mediante un alineamiento de secuencia de ADN de la población de *T. urticae*, a través de la herramienta BLAST de National Center for Biotechnology Information, se obtuvo un porcentaje de identidad es de 75%; es decir indica la proporción de bases idénticas entre Festival (F), Monterrey (M) y Albión (A),

6.2. BIBLIOGRAFÍA

Abad, R., Pina, T., Ferragut, F., y Urbaneja, A. (2009). Comparative life-history traits of three phytoseiid mites associated with *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) colonies in clementine orchards in eastern Spain: implications for biological control. *Experimental and Applied Acarology*, 47(2), 121-132.

Acosta, A. (2013). Aplicación foliar de tres dosis de Calcio y tres dosis de Boro en el cultivo de la fresa (*Fragaria xananassa*. Duch) Cultivar Oso Grande, bajo cubierta (Tesis de pregrado). Universidad Técnica de Ambato, Ambato, EC.

Aljanabi, S., y Martinez, I. (1997). Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Rresearch*, 25(22), 4692-4693.

Argolo, P. 2012. Gestión integrada de la araña roja *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae): optimización de su control biológico en clementinos. Departamento de Producción Vegetal, Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos, Universidad Politécnica de Valencia. Valencia. 140 p.

Aucejo, S., Gómez, A., y Jacas, J. (2004). Effects of NaCl-stressed citrus plants on life-history parameters of *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). *Experimental & Applied Acarology*, 33 (1-2), 55.

Bajda, S., Dermauw, W., Panteleri, R., Sugimoto, N., Douris, V., Tirry, L., y Van Leeuwen, T. (2017). A mutation in the PSST homologue of complex I (NADH: ubiquinone oxido reductase) from *Tetranychus urticae* is associated with resistance to METI acaricides. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 80, 79-90.

Boom, C., Beek, E., y Dicke, M. (2003). Differences among plant species in acceptance by the spider mite *Tetranychus urticae* Koch. *Journal of Applied Entomology*, 127(3), 177-183.

Cabrera, J., Otero, G., Dominguez, B., Delgado, M., y Rodríguez, J. (1996). Rendimiento de la fresa (*Fragaria xananassa*) con varias densidades de *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) en invernadero. *Agrociencia*30: 91–101.

Cajo, A. (2016). Producción hidropónica de tres variedades de lechuga (*Lactuca sativa* L), bajo el sistema NFT, con tres soluciones nutritivas (Tesis de pregrado). Universidad Técnica de Ambato Facultad de Ciencias Agropecuarias. Cevallos, EC.

Chase, M. W., Salamin, N., Wilkinson, M., Dunwell, J. M., Kesanakurthi, R. P., Haidar, N., y Savolainen, V. (2005). Land plants and DNA barcodes: short-term and long-term goals. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 360(1462), 1889-1895.

Clark, J., Scott, J., Campos, F., Blomquist. (1995). Resistance to avermectins: extent, mechanisms, and management implications. *Annual Review of Entomology*. 40: 1–30.

Coleman, A. W. (2003). ITS2 is a double-edged tool for eukaryote evolutionary comparisons. *Trends in Genetics*, 19(7), 370-375.

Doyle, J., y Doyle, J. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12(13), 13-15.

Ferragut, F., y Santonja, M. C. (1989). Taxonomía y distribución de los ácaros del género *Tetranychus* Dufour 1832 (Acari: Tetranychidae), en España. *Boletín de Sanidad Vegetal Plagas*, 15, 271-281.

Feyereisen, R., Dermauw, W., y Van Leeuwen, T. (2015). Genotype to phenotype, the molecular and physiological dimensions of resistance in arthropods. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 121, 61-77.

Gobierno Autónomo Descentralizado (GAD) del cantón Cevallos (2014). DIAGNÓSTICO – SITUACIÓN ACTUAL DEL CANTÓN CEVALLOS, ESTRUCTURA GENERAL. Disponible en: http://app.sni.gob.ec/sni-link/sni/PORTAL_SNI/data_sigad_plus/sigadplusdiagnostico/Diagnostico_GAD%20Cevallos_15-11-2014.pdf

González, L. (2012). Introducción de dos variedades de fresa (*Fragaria vesca*) y técnica de fertirrigación empleando cuatro biofertilizantes líquidos en pablo sexto-Morona Santiago (Tesis de maestría). Universidad Técnica de Ambato. Ambato, EC.

Gordón, J. (2013). Evaluación de la respuesta de la frutilla (*Fragaria dioica*) al sistema del cultivo sehidropónico en el Quinche – Pichicha 2012 (Tesis de pregrado). Universidad Politécnica Salesiana Sede Quito. Quito, EC.

Grisales, N., Triana, O., Angulo, V., Jaramillo, N., Parra-Henao, G., Panzera, F., y Gómez-Palacio, A. (2010). Genetic differentiation of three Colombian populations of *Triatomadimidata* (Heteroptera: Reduviidae) by ND4 mitochondrial gene molecular analysis. *Biomedica*, 30(2), 207-214.

Gutierrez, J. (1985). Systematics. In Helle, W., y Sabelis, M. Eds. Spider mites: their biology, natural enemies and control. Amsterdam, ND, *Elsevier Science*, p. 75-90.

Hebert, P. D., Ratnasingham, S., y de Waard, J. R. (2003). Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 270 (Suppl 1), 96-99.

Herrón, G., Rophail, J., y Wilson. L. (2004). Chlorfenapyr resistance in two-spotted spider mite (Acari: Tetranychidae) from Australian cotton. *Experimental y Applied Acarology*, 34:315–321.

Hinomoto, N., Osakabe, M., Gotoh, T., yTakafuji, A. (2001). Phylogenetic analysis of green and red forms of the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae), in Japan, based on mitochondrial cytochrome oxidase subunit I sequences. *Applied Entomology and Zoology*, 36(4), 459-464.

Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología, INAMHI (2016). Disponible en <http://www.serviciometeorologico.gob.ec/>

Kheradpir, N., Khalghani, J., Ostovan, H., y Rezapanah, M. (2007). The comparison of demographic traits in *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) on five different greenhouse cucumber hybrids (*Cucumis sativus*). *Acta Horticulturae*, 747: 425–429.

Keller, A., Förster, F., Müller, T., Dandekar, T., Schultz, J., y Wolf, M. (2010). Including RNA secondary structures improves accuracy and robustness in reconstruction of phylogenetic trees. *Biology Direct*, 5(4), 1-124.

Kessel Domini, A. (2012). Mejora genética de la fresa (*Fragaria ananassa* Duch.), a través de métodos biotecnológicos. *Cultivos Tropicales*, 33(3), 34-41.

Klamkowski, K., M. Sekrecka, H. Fonyodi, y W. Treder. (2007). Changes in the rate of gas exchange, water consumption and growth in strawberry plants infested with the Two-spotted spider mite. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*, 15: 155–162.

Li, Y., Zhou, X. I. N., Feng, G., Hu, H., Niu, L., Hebert, P. D. y Huang, D. (2010). COI and ITS2 sequences delimit species, reveal cryptic taxa and host specificity of fig-associated *Sycophila* (Hymenoptera, Eurytomidae). *Molecular Ecology Resources*, 10(1), 31-40.

Lozada, A. (2011). Evaluación de productos orgánicos para el control de araña roja (*Tetranychus urticae* Koch) en el cultivo de fresa (*Fragaria vesca*) Tesis de pregrado. Universidad Técnica de Ambato. Ambato, EC.

Macke, E., Magalhaes, S., Khan, HDT, Luciano, A., Frantz, A., Facon, B. y Olivieri, I. (2011). Sex allocation in haplodiploids is mediated by egg size: evidence in the spider mite *Tetranychus urticae* Koch. *Actas de la Royal Society B: Biological Sciences*, 278 (1708). 1054-1063.

Masis, C., y Aguilar, H. (1990). Efecto de la precipitación pluvial sobre la población de *Tetranychus urticae* en tres variedades de fresa. *Agronomía Costarricense*, 14(1), 89–92.

Merget, B., Koetschan, C., Hackl, T., Förster, F., Dandekar, T., Müller, T. y Wolf, M. (2012). The ITS2 database. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (61).

Moritz, G., Paulsen, M., Delker, C., Picl, S., y Kumm, S. (2002). Identification of thrips using ITS-RFLP analysis. In *Thrips and Tospoviruses: Proceedings of the 7th International Symposium on Thysanoptera* (Editors Rita Marullo y Laurence Mound). Australian National Insect Collection, Canberra, Australia (pp. 365-367).

National Center for Biotechnology Information, (2018). Genomas de BLAST. Disponible en https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi#alnHdr_459214678

Navajas, M., Gutierrez, J., Bonato, O., Bolland, H. y y Mapangou, S. (1994). Intraspecific diversity of the cassava green mite *Mononychellus progresivus* (Acari: Tetranychidae) using comparisons of mitochondrial and nuclear ribosomal DNA sequences and cross-breeding. *Experimental & Applied Acarology*, 18(6), 351-360.

Navajas, M., Lagnel, J., Gutierrez, J., y Boursot, P. (1998). Species wide homogeneity of nuclear ribosomal ITS2 sequences in the spider mite *Tetranychus urticae* contrasts with extensive mitochondrial COI polymorphism. *Heredity*, 80(6), 742-752.

Navajas, M., Gutierrez, J., Williams, M., y Gotoh, T. (2001). Synonymy between two spider mite species, *Tetranychus kanzawai* and *T. hydrangeae* (Acari: Tetranychidae), shown by ribosomal ITS2 sequences and cross-breeding experiments. *Bulletin of Entomological Research*, 91(2), 117-123.

Ochoa, R., Vargas, C., y Aguilar, H. (1994). Phytophagous mites of America Central: an illustrated guide. CATIE, Turrialba, Costa Rica, p 234.

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

Paternina, L. E., Verbel-Vergara, D., y Bejarano, E. (2016). Comparison of 16S and COX1 genes mitochondrial regions and their usefulness for genetic analysis of ticks (Acari: Ixodidae). *Biomedica*, 36(2), 295-302.

Price, J., Legard, D., y Chandler, C. (2000). Mite Resistance to abamectin on strawberry and strategies for resistance management. *In: Hietaranta, T., M. M. Linna, P. Palonen, and P. Parikka (eds). Proc. 4th Int. Strawberry Symp. Acta Horticulturae, 567: 683–685.*

Rodríguez, A., Posos, P., Peteira, B., y Suris, M. (2011). Evaluación de tres protocolos de extracción de ADN en insectos del orden Thysanoptera. *Revista de Protección Vegetal, 26(3), 187-190.*

Rodríguez-Bautista, G., Calderón-Zavala, G., Jaen-Contreras, D., y Curiel-Rodríguez, A. (2012). Capacidad de propagación y calidad de planta de variedades mexicanas y extranjeras de fresa. *Revista Chapingo. Serie Horticultura, 18(1), 113-123.*

Rubio, S. A., Alfonso, A. M., Grijalba, C. M., y Pérez, M. M. (2014). Determinación de los costos de producción de la fresa cultivada a campo abierto y bajo macrotúnel. *Revista Colombiana De Ciencias Hortícolas, 8(1), 67-79.*

Ros, V., y Breeuwer, J. (2007). Spider mite (Acari: Tetranychidae) mitochondrial COI phylogeny reviewed: host plant relationships, phylogeography, reproductive parasites and barcoding. *Experimental and Applied Acarology, 42(4), 239-262.*

Rugman-Jones, P. F., Hoddle, M. S., Mound, L. A., y Stouthamer, R. (2006). Molecular identification key for pest species of *Scirtothrips* (Thysanoptera: Thripidae). *Journal of Economic Entomology, 99(5), 1813-1819.*

Shaefers, A., y Shanks, C. (1991). Pest management for strawberry insects. *In: Pimentel, D., and A. Hanson A. (eds). CRC Handbook of Pest Management in Agriculture. Vol. III. CRC Press, Boca Raton, p: 535–552.*

Stumpf, N., y Nauen. R. (2002). Biochemical markers linked to abamectin resistance in *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). *Pesticide Biochemistry Physiology 72: 111–121.*

Vásquez, C., Catillo, G., Dávila, M., y Hernández, A. (2011). Idiosomal setae and genetic analysis in *Olygonychus punicae* and *Olygonychus biharensis* (Acari. Tetranychidae) populaions from State of Lara. Venezuela. *Journal of Entomology, 8(4), 341-352.*

Vogler, A. P., y Monaghan, M. T. (2007). Recent advances in DNA taxonomy. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 45(1), 1-10.

Wei-Dong, Z., Kai-Yun, M., Xing-Yin, J. y Mei-Qin, Y. (2003). Resistance selection by abamectin, pyridaben and fenpropathrin, and changes in the activity of detoxicant enzymes in *Tetranychus urticae*. *Acta Entomologica Sinica*. 46: 788-792.

Yao H, Song J, Liu C, Luo K, Han J, Li Y, et al. (2010) Use of ITS2 Region as the Universal DNA Barcode for Plants and Animals. *PLoSOne* 5(10): e13102.

Zarazúa, J., Almaguer, G., y Márquez, S. (2011). Redes de innovación en el sistema productivo fresa en Zamora, Michoacán. *Revista Chapingo. Serie Horticultura*, 17(1), 51-60.

Zhang, Z., y Jacobson, R. (2000). Using adult female morphological characters for differentiating *Tetranychus urticae* complex (Acari: Tetranychidae) from greenhouse tomato crops in UK. *Systematic and Applied Acarology*, 5(1), 69-76.

CAPÍTULO VII

PROPUESTA

TÍTULO

VARIABILIDAD DE LA REGIÓN ITS2 EN POBLACIONES DE *Tetranychus urticae* Koch EN EL CULTIVO DE ROSA (*Rosa canina* L.)

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 resultados obtenidos de la variabilidad de la región ITS2 de poblaciones de *Tetranychus urticae* en el cultivo de *Fragaria vesca*, es importante un estudio o análisis previo de la secuenciación de ADN de otro cultivo, como por ejemplo en la rosa, que también pertenece a la familia de las Rosáceas y hacer una comparación con los datos obtenidos.

7.3. JUSTIFICACIÓN

Con los resultados de la variabilidad de la región ITS2 de *T. urticae* en fresa, en la secuenciación del ADN encontramos polimorfismos, que es la sustitución de una base nitrogenada, por lo tanto, interesa conocer la variabilidad genética de *T. urticae* en el cultivo de rosa, comparando además la composición de bases nitrogenadas en las secuencias de ADN.

7.4. OBJETIVOS

- Determinar la variabilidad genética de *T. urticae* en el cultivo de rosa, para comparar con los resultados obtenidos en fresa.

7.5. ANÁLISIS DE FACTIBILIDAD

Con la aplicación de esta propuesta se logrará identificar la composición del ADN de *T. urticae*, para conocer la compatibilidad tanto en el cultivo de fresa como en el de la rosa, permitiendo un estudio más completo y puntual sobre los ácaros, además favoreciendo a los productores obtener productos con dirección a un mejor mercado.

7.6. FUNDAMENTACIÓN

Para poder estudiar la variabilidad genética se necesita un estudio previo de la plaga, los análisis de vida, conjuntamente con los genéticos. 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.