

**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS**  
**CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA**



**TEMA:**

**“ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD DE LA REGIÓN ITS2 EN POBLACIONES DE  
*Tetranychus urticae* Koch EN EL CULTIVO DE TAXO (*Passiflora tripartita*)”**

**AUTORA:**

**DINA ELENA SÁNCHEZ SOLÍS**

**TUTOR:**

**Ing. Agr. CARLOS VÁSQUEZ, PhD.**

**CEVALLOS - ECUADOR**

**2021**

## DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

“La suscrita, **SÁNCHEZ SOLÍS DINA ELENA**, portadora de cédula de identidad número: 1803256005, libre y voluntariamente declaro que el Informe Final del Proyecto de investigación titulado: “**ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD DE LA REGIÓN ITS2 EN POBLACIONES DE *Tetranychus urticae* Koch EN EL CULTIVO DE TAXO (*Passiflora tripartita*)**” es original, auténtico 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”.



.....  
Dina Elena Sánchez Solís

## DERECHO DE AUTOR

Al presentar este Informe Final del Proyecto de Investigación titulado “**ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD DE LA REGIÓN ITS2 EN POBLACIONES DE *Tetranychus urticae* Koch EN EL CULTIVO DE TAXO ( *Passiflora tripartita*)**”, como uno de los requisitos previos para la obtención del título de grado de Ingeniero/a Agrónomo/a, 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”.



.....  
Dina Elena Sánchez Solís

**“ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD DE LA REGIÓN ITS2 EN POBLACIONES DE  
*Tetranychus urticae* Koch EN EL CULTIVO DE TAXO ( *Passiflora tripartita*)”**

**REVISADO POR:**



Firmado electrónicamente por:

**CARLOS LUIS  
VASQUEZ  
FREYTEZ**

---

PhD. Carlos Luis Vásquez Freytez  
**TUTOR**

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

FECHA



Firmado electrónicamente por:  
**MARCO OSWALDO  
PEREZ SALINAS**

.....

Ing. Agr. Marco Oswaldo Pérez Salinas PhD.

**PRESIDENTE DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN**



Firmado electrónicamente por:  
**JORGE ENRIQUE  
DOBRONSKI ARCOS**

.....

Ing. Jorge Enrique Dobronski Arcos

**MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN**

20/09/2021



Firmado electrónicamente por:  
**DAVID ANIBAL  
GUERRERO CANDO**

.....

Ing. David Aníbal Guerrero Cando

**MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN**

20/09/2021

## AGRADECIMIENTO

Quisiera empezar agradeciendo a Dios por la vida, la salud, la familia y todo lo que tengo es gracias a él.

Agradezco a mi padre que, aunque está en el cielo, desde mis primeros pasos estaba ahí para ayudarme, sé que donde sea que encuentre se va a sentir orgulloso de todo lo que he logrado.

Gracias a ti madre, por su apoyo constante en querer que sea mejor en todo, por ayudarme a estudiar y cumplir mis sueños, por su lucha incansable para que nunca me falte nada.

Agradezco a toda mi familia, en especial a mis abuelitos por ser un buen ejemplo para mí.

Gracias a ti por ser mi apoyo constante y creer en mí, gracias por caminar junto a mí, Christian.

Agradezco de todo corazón a la Universidad Técnica de Ambato, de manera muy especial a la Facultad de Ciencias Agropecuarias por haberme recibido en las aulas del saber y formarme tanto humana como profesionalmente, aquí hice buenos amigos.

Agradezco a mi tutor PhD. Carlos Vásquez, por ser un gran docente quien me ayudo con sus conocimientos en todo el proceso de mi investigación además de brindarme su amistad sincera.

Agradezco a la Dra. Liliana Lalaleo por su apoyo, por brindarme su confianza y enseñanza en toda la elaboración del trabajo de investigación y por estar siempre comprometida con el proyecto.

Agradezco a la Ing. Nataly Paredes por su amistad, por guiarnos en todo el proceso investigativo a nivel de laboratorio.

Agradezco a todos quienes aportaron con un granito de arena e hicieron posible cumplir este anhelo.

## **DEDICATORIA**

El presente trabajo lo dedico principalmente a DIOS por regalarme la vida y llenarme de gracia y bendiciones.

A mis padres; Azucena por ser mi ejemplo de lucha, por su apoyo, por confiar en mí día a día y por enseñarme a salir adelante ante cualquier circunstancia de la vida y en memoria de mi papito Marcos, por ser el mejor papá del mundo.

A mis abuelitos, esto va por Uds. ángeles del cielo.

## ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
CAPITULO I.....	15
MARCO TEÓRICO.....	15
INTRODUCCIÓN .....	15
1.1.    Antecedentes Investigativos .....	16
1.2.    Objetivos.....	17
1.3.    Categorías Fundamentales.....	17
1.3.1.  Ácaro ( <i>Tetranychus urticae</i> ) .....	17
1.3.2.  Cultivo de taxo ( <i>P. tripartita</i> var. <i>mollissima</i> ) .....	23
1.3.3.  Marcadores moleculares.....	32
CAPITULO II .....	34
METODOLOGÍA .....	34
2.1.    MATERIALES Y EQUIPOS .....	34
2.1.1.  Equipos.....	34
2.1.2.  Materiales.....	34
2.1.3.  Reactivos .....	36
2.1.4.  Iniciadores moleculares.....	36
2.2.    Factores de estudio .....	37
2.3.    Características del Lugar .....	37
2.3.1.  Ubicación del ensayo .....	37
2.3.2.  Condiciones ambientales en campo. ....	37
2.3.3.  Condiciones de laboratorio. ....	38
2.4.    Metodología de la Investigación .....	39
2.4.1.  Especie vegetal a usar .....	39
2.6.1.  Amplificación de ADN .....	39
2.6.2.  Protocolo ITS2 Barcode <i>Tetranychus</i> La PCR .....	40
2.6.3.  Determinación la variabilidad genética de <i>T. urticae</i> mediante ITS2 ..	41
2.7.1.  Reconocimiento del ácaro .....	43
2.7.2.  Recolección.....	43
2.7.3.  Mantenimiento de las muestras.....	44
2.7.4.  Extracción de ADN .....	45

CAPITULO III.....	47
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	47
3.1.    Análisis y discusión de los resultados .....	47
CAPITULO IV.....	52
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	52
4.1.    Conclusiones.....	52
4.2.    Recomendaciones .....	53
CAPITULO V.....	54
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54

## ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

<b>Ilustración 1.</b> Hembra (A), macho (B).....	20
<b>Ilustración 2.</b> Ciclo de vida de <i>T. urticae</i> Koch. ....	21
<b>Ilustración 3.</b> Hojas de taxo mostrando síntomas de alimentación de <i>T. urticae</i> en los cantones Cevallos (A), Ambato (B) y Tisaleo (C). ....	22
<b>Ilustración 4.</b> Planta de <i>P. tripartita</i> (taxo). ....	24
<b>Ilustración 5.</b> Planta de taxo en Ambato. ....	25
<b>Ilustración 6.</b> Tallo de taxo. ....	25
<b>Ilustración 7.</b> Hojas de taxo. ....	26
<b>Ilustración 8.</b> Flor de taxo ( <i>P. tripartita</i> ). ....	26
<b>Ilustración 9.</b> Frutos de taxo. ....	27
<b>Ilustración 10.</b> Planta de taxo. ....	28
<b>Ilustración 11.</b> Preparación de la solución isoamylalcohol ....	40
<b>Ilustración 12.</b> En la imagen que proyecta el trasiluminador se observa el gel de agarosa usando los primers ITS2. ....	41
<b>Ilustración 13.</b> Primers utilizado del fragmento ITS2. ....	42
<b>Ilustración 14.</b> Con el uso del trasiluminador se pudo identificar la sección del gel a cortar que previamente se etiquetó los tubos Eppendorf de la siguiente manera: TISALEO1DINA, CEVALLOS2DINA, AMBATO3DINA. ....	42
<b>Ilustración 15.</b> Fragmentos de ITS2 a partir de ácaros <i>T. urticae</i> amplificados. Las muestras fueron cortadas y envasadas en tubos Eppendorf listos para secuenciar. ...	42
<b>Ilustración 16.</b> Macho (A) y Hembra (B) de <i>T. urticae</i> Koch (10x). ....	43
<b>Ilustración 17.</b> Recolección y conservación de hojas infestadas. ....	44
<b>Ilustración 18.</b> Placas con muestras (A) y Mantenimiento de las muestras (B). ....	45
<b>Ilustración 19.</b> Trituración de ácaros hembras. ....	45

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Clasificación taxonómica de <i>T. urticae</i> Koch. ....	18
<b>Tabla 2.</b> Clasificación taxonómica de la planta de taxo.....	23
<b>Tabla 3.</b> Requerimiento del cultivo.....	28
<b>Tabla 4.</b> Preparación del suelo. ....	29
<b>Tabla 5.</b> Tipos de podas.....	30
<b>Tabla 6.</b> Fertilización.....	30
<b>Tabla 7.</b> Principales plagas que afectan el cultivo de taxo.....	31
<b>Tabla 8.</b> Principales plagas que afectan el cultivo de taxo.....	32
<b>Tabla 9.</b> Iniciadores moleculares para PCR .....	36
<b>Tabla 10.</b> Localidades de la provincia de Tungurahua.....	38
<b>Tabla 11.</b> Condiciones de laboratorio. ....	38
<b>Tabla 12.</b> Secuencias de ADN enviadas por la compañía MacroGen en la cual presenta 545 pares de bases (pb) Adenina, Timina, Citosina y Guanina; en poblaciones de <i>T.urticae</i> Koch hospedante a plantas <i>Passiflora tripartita</i> var. mor. pertenecientes a Ambato(AM), Tisaleo (TI) y Cevallos(CE), de la provincia de Tungurahua, Ecuador. ....	48
<b>Tabla 13.</b> Tabla comparativa entre localidades (AM=Ambato, CE =Cevallos, TI= Tisaleo) que fueron llevadas a secuenciar la región ITS2 del ácaro <i>T. urticae</i> .....	50

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Distribución de las bases nitrogenadas amplificadas del fragmento ITS2 del ácaro <i>T. urticae</i> y la relación existente entre las diferentes localidades.....	49
<b>Figura 2.</b> Árbol filogenético de las poblaciones de <i>T. urticae</i> Koch.....	51

## RESUMEN

*Tetranychus urticae*, también conocido como el ácaro de dos manchas que se encuentra distribuido a nivel mundial, encontrándose en diferentes plantas hospederas; incluyendo fresa, mora, zanahoria blanca. En la presente investigación se estudió la variabilidad genética del fragmento ITS2 en tres poblaciones de *T. urticae* en taxo (*P. tripartita*) en diferentes localidades de la provincia de Tungurahua. Se tomaron muestras de individuos de *T. urticae* Koch en hojas de taxo infestadas en las localidades de Ambato (AM), Cevallos (CE) y Tisaleo (TI). Posteriormente las muestras fueron llevadas al laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato con el fin de amplificar el segundo espaciador interno transcrito (ITS2) mediante técnicas de reacción en cadena de la polimerasa o PCR. Al ser secuenciadas los 545 pares de bases (pb) se obtuvo para T (Timina) con 34.50% (AM), 35.05% (CE), y 34.13% (TI), manteniendo rangos similares entre Ambato y Tisaleo, siendo el mayor Cevallos; y para A (Adenina) con 29.54% (AM), 29.72% (CE) y 28.99 % (TI). De igual manera, los índices porcentuales para C (Citosina) con 17.25% (AM), 16.88% (CE), 17.43% (TI) y para G (Guanina) con 18.17% (AM), 18.17% (CE) y 17.61 % (TI). En la secuenciación se presentaron 13 sustituciones en las bases nitrogenadas para las tres localidades, pues la relación TI-CE mostró 8 sustituciones con 98,17% de similitud y una divergencia del 1,83%, mientras que TI-AM mostró 13 sustituciones con una similitud de 99,45%, y finalmente CE-AM presentó 5 sustituciones con un porcentaje de similitud de 99,82%. Los valores de similitud entre poblaciones de *T. urticae* estudiadas demuestran que existe poca diferenciación desde el punto de vista molecular, lo cual sugiere que ha ocurrido poca variabilidad entre poblaciones.

**Palabras clave:** Región ITS2, divergencia, *T. urticae*, *P. tripartita*

## ABSTRACT

*Tetranychus urticae*, also known as the two-spotted mite, is distributed worldwide, being found in different host plant species, including strawberry, blackberry, white carrot. In this study, the genetic variability of the ITS2 region was determined in populations of *T. urticae* in the culture of *Passiflora tripartita* (banana passionfruit) in different localities of the province of Tungurahua. Samples of *T. urticae* individuals were taken from infested banana passionfruit leaves in three localities: Ambato (AM), Cevallos (CE) and Tisaleo (TI). Subsequently, leaf samples were taken to the Molecular Biology laboratory of the Faculty of Agricultural Sciences of the Technical University of Ambato in order to amplify the ITS2 fragment using PCR techniques. After sequencing, 545 base pairs (bp) it was obtained for T (Thymine) with 34.50% (AM), 35.05% (CE) and 34.13% (TI), for A (Adenine) with 29, 54% (AM), 29.72% (CE) and 28.99% (TI). Similarly, the percentage indices for C (Cytosine) with 17.25%, (AM), 16.88% (CE), 17.43% (TI) and for G (Guanine) with 18.17% (AM), 18.17% (CE) and 17.61% (TI). In the sequencing, 13 substitutions were presented in the nitrogenous bases for the three localities, since the TI-CE relationship showed 8 substitutions with 98.17% similarity and with a divergence of 1.83%, while TI-AM showed 13 substitutions. with a similarity of 99.45% and finally CE-AM presented 5 substitutions with a percentage of similarity of 99.82%. The similarity values between the populations of *T. urticae* studied showed that there is little differentiation from the molecular point of view, which suggests that little variability has occurred between populations.

**Keywords:** ITS2 region, divergence, *T. urticae*, *P. tripartite*.

## CAPITULO I

### MARCO TEÓRICO

#### INTRODUCCIÓN

El cultivo de taxo (*Passiflora tripartita*) es una planta originaria del norte de los Andes de América, y se encuentra distribuida en Colombia, Ecuador, Perú y Bolivia. Perteneciente al orden de Passiflorales y a la familia Passifloraceae. En Ecuador se encuentra en lugares fríos y templados un total de 55 hectáreas, en donde 25 corresponden a la provincia de Tungurahua con Pelileo siendo el cantón que más produce este cultivo con un 62% (**Miranda et al. 2009; Bernal y Díaz 2005**). **Landa (2012) y Tarambis (2012)** manifiestan que el cultivo de taxo es afectado por varias plagas y enfermedades que afectan su desarrollo siendo el ataque de ácaros uno de los más importantes.

El ácaro *Tetranychus urticae* Koch, también conocido como ácaro de dos manchas o araña roja, se coloniza en el envés de las hojas hospederas del cual se alimenta por medio de sus quelíceros estiletiformes; cuando el ataque es severo se observan nidos de telarañas en sus hojas. A nivel mundial se ha reportado daños ocasionados en más de 150 cultivos de gran importancia económica entre ellos están: flores (crisantemos, claveles y gerberas), frutas como berris (zarzamoras, frambuesas y arándanos) y en campo abierto con maíz, algodón, yuca, soya, cítricos y ciruelas (**García y Castillo 2018**).

La población de *T. urticae* Koch posee gran variabilidad genética dentro de varios cultivos, es por ello que se han utilizado marcadores moleculares para revelar la variabilidad del ADN que permite realizar una secuenciación de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que se usa para amplificar el ADN, conocido como primers o cebadores considerados como el punto de partida de replicación de ADN y nucleótidos libres (**Pérez 2019**). Mientras que (**Zapata et al. 2004**) señala que la región espaciadora transcrita interna 2 (ITS2) del ADNr nuclear.

En base a lo anteriormente mencionado, el objetivo de este trabajo es determinar la variabilidad genética de la región ITS2 en poblaciones de *Tetranychus urticae* Koch en el cultivo de *Passiflora tripartita* de la provincia de Tungurahua.

### 1.1. Antecedentes Investigativos

**Freire (2018)**, evaluó los parámetros biológicos de *T. urticae* criado sobre tres cultivares de mora bajo condiciones de laboratorio, donde se tuvo como resultado que en la variedad castilla se observó mayor duración del desarrollo del acaro, seguida de la castilla con espinos, con respecto a la duración del tiempo de incubación, larva, deutoninfa y tiempo total con valores de 19,9; 15,6; 23,1 y 15,2% y fueron menores en la variedad colombiana sin espinos, determinando así que las variedades resistentes son colombiana con espinas y castilla.

En un trabajo realizado por **López (2019)**, señala la variabilidad genética en poblaciones de *T. urticae* en cultivos establecidos de tres variedades de fresa (*Fragaria vesca*) se obtuvo 197 pares de bases nitrogenadas, siendo la relación A+ T con 68,53%, 68,02 en Albión, y 67% en Monterey. Presentando un polimorfismo con 12 sustituciones, sin embargo, en la relación entre Festival y Monterey dieron como resultado 11 sustituciones con el 94,42% de similitud, entre Festival y Albión con 95,43% y Monterey y Albión con 97,97% de similitud.

Al igual que **Isabuche (2019)**, realizó un similar estudio en el cual determinó la variabilidad y divergencia genética en *Tetranychus urticae* en plantas de zanahoria blanca (*Arracacia xanthorrhiza*) en los sectores de Tisaleo- Quinchicoto, Baños-La Pampa, Granja de Querochaca, las mismas muestras fueron secuenciadas y se obtuvo 277 pares de bases y 24 sustituciones. En la relación Baños y Quinchicoto con 91,34% de similitud, en la relación Baños- Querochaca indicó 18 sustituciones con 93,3% de similitud y finalmente Quinchicoto y Querochaca presentaron 6 sustituciones con un 97% de similitud.

## 1.2. Objetivos

### Objetivo General

- Determinar la variabilidad genética de la región ITS2 en poblaciones de *Tetranychus urticae* Koch en el cultivo de *Passiflora tripartita* en la provincia de Tungurahua.

### Objetivos Específicos

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

## 1.3. Categorías Fundamentales

### 1.3.1. Ácaro (*Tetranychus urticae*)

#### Biología y Ecología

Según **Landa (2012)**, las plagas que más afectan al cultivo de *P. tripartita* son: gusanos, nematodos y ácaros. De estos, el ácaro de dos manchas *T. urticae* Koch es un fitófago de alto potencial de daño, el cual se caracteriza por ser de vida corta, con un desarrollo y rápida propagación, perteneciente a Tetranychidae (*Tabla 1*), así como lo describe **Aucejo et al. (2004)** a continuación:

**Tabla 1.** Clasificación 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 1836

(Aucejo et al. 2004)

### Importancia económica

*T. urticae* Koch es una plaga distribuida a nivel mundial que puede alimentarse de una amplia diversidad de especies de plantas, pudiendo causar daños severos (Kheradpir 2007), como reducción del vigor de la planta, puesto que se alimenta de las hojas dejando así manchas grises tanto en el haz como en el envés (Cerna et al. 2009). También es conocida como una plaga fitófaga que se alimenta de la savia de la planta, disminuyendo su vigor y rendimiento (Villegas et al. 2010). Este ácaro es conocido vulgarmente como araña roja de dos manchas, se han reportado entre 60 y 80% de pérdidas por alimentación de este insecto en cultivos ornamentales, hortalizas y frutales, por lo que normalmente se requiere el uso de métodos químicos (Mendoza et al. 2018).

## **Reconocimiento**

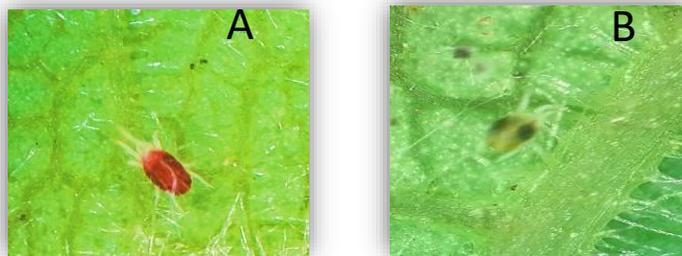
Los adultos pueden presentar coloración variable dependiendo del clima, edad y el sustrato, con dos manchas negras oscuras sobre la superficie dorsal, en estados inmaduros presenta un similar aspecto, pero de menor tamaño, en el caso de los cítricos además de las dos manchas la tonalidad se torna roja intensa (**Casado et al. 2016**).

## **Características morfológicas**

**Argolo (2012)**, menciona que *T. urticae* demuestra diferentes características morfológicas, lo que más se aprecia es el color que puede cambiar según el resultado del régimen alimenticio, planta, hospederos y estados de desarrollo y factores ambientales. Según **Roeder et al. (1996)** los ácaros machos de *T. urticae* se producen por partenogénesis arrenótoca se desarrollan a partir de huevos no fertilizados (haploides) y las hembras se desarrollan a partir de huevos fecundados (diploides). Esta especie se caracteriza por tener mayor proporción en hembras y machos 2:1 (*Ilustración 1*) (**Macke et al. 2011**). Una hembra entre 3 a 5 días puede poner de 100-120 huevos diarios, cifras que pueden cambiar según el tipo de alimento, cantidad y la calidad del alimento, o las condiciones medio ambientales (**Zhang 2003**).

Una característica especial de los huevos es la plasticidad en adaptación como respuesta a cambios fisiológicos o en condiciones de alimento (**Stillwell et al. 2010; Fox et al. 1997**). Cuando llegan a estado adulto alcanzan un tamaño entre 0,4 y 0,6 mm, la hembra se caracteriza por tener una forma redonda globosa, el macho es más pequeño (**Argolo. 2012**) y en forma de triángulo en la parte final del abdomen (**Vázquez, 2019**).

### **Ilustración 1.** Hembra (A), macho (B)



**Elaborado por:** Sánchez, 2021

#### **Ciclo de vida del *T. urticae***

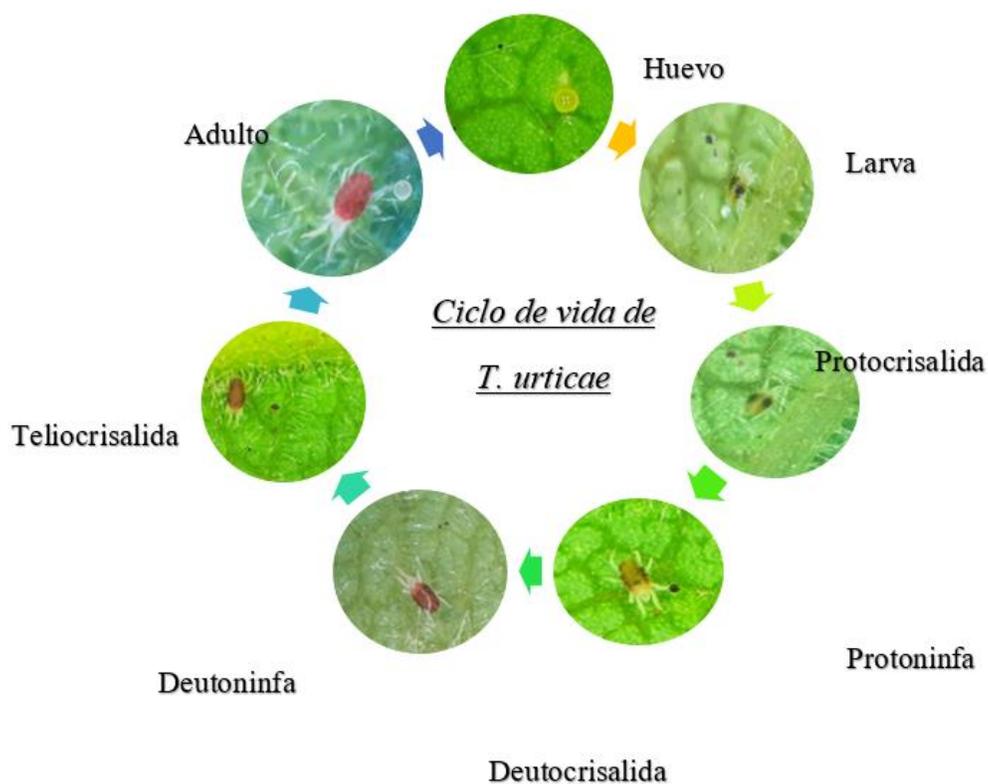
**Morales (2008)** menciona que el ciclo de vida en *T. urticae* Koch es corto caracterizado por las siguientes fases: huevo, larva, protoninfa, protocrisálidas, deutoninfa, deutocrisálidas y adulto (*Ilustración 2*). Se consideran inactivas, o periodo quiescente o de reposo las fases de protocrisálidas y deutocrisálidas, en la cual se desprenden de exuvias por eso es el nombre de crisálidas (**Flechtmann 2008**)

En el inicio del ciclo de oviposición, la hembra deposita huevos de color cristalino, amarillento o anaranjado según sea el sustrato (**Casado et al. 2016**) y de forma globosa, que son cubiertos con finas telarañas para que queden fijadas al sustrato, que con el pasar del tiempo se tornan de color pardo a café antes de que eclosionen el huevecillo (**Cerna et al. 2009**), los huevos se incuban entre 1,5 a 4 días, mientras que la larva dura 1 a 3 días y se caracteriza por ser hexápoda, blanquecina que posteriormente se torna en verde claro, con patas amarillas que pueden ser mayores o iguales al tamaño del cuerpo. Además este autor menciona que el estado de ninfa (tanto protoninfa como deutoninfa) dura entre 1,5 a 5,5 días y presentan cuatro pares de patas y un color verde claro con dos manchas negras definidas, en adultos la coloración es más pálida y las manchas negras casi perfectas.

Finalmente, (**Gallardo et al. 2005**), menciona que el tiempo de vida promedio en hembras del ácaro dos manchas desde el estadio de huevo hasta adulto son de 8,2 días, en condiciones óptimas (~ 30°C) completa su ciclo en 9 días (**Herbert 1981; Carey y Bradley 1982**).

Viven formando densas colonias en el envés de las hojas, para protegerse de enemigos naturales y controles fitosanitarios forman una densa seda, creando un microclima adecuado para la supervivencia y su fácil dispersión hacia nuevas plantas hospedantes (**Casado et al. 2016**).

**Ilustración 2.** Ciclo de vida de *T. urticae* Koch.

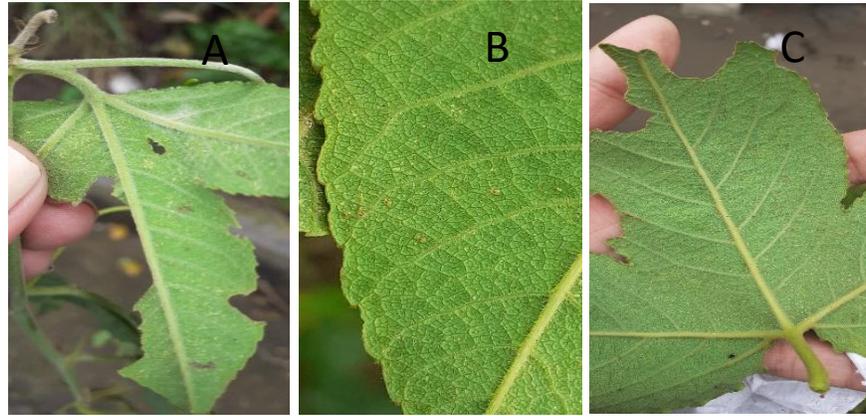


**Elaborado por:** Sánchez, 2021

### **Daños**

Esta plaga se presenta en una gran variedad de plantas debido a que se alimenta al succionar el tejido celular del envés de las hojas ocasionando así un déficit fotosintético dejando manchas grises, esta acción prolongada provoca efectos como la reducción del vigor y debilitamiento (*Ilustración 3-4*) (**Gonzales et al., 1993**).

**Ilustración 3.** Hojas de taxo mostrando síntomas de alimentación de *T. urticae* en los cantones Cevallos (A), Ambato (B) y Tisaleo (C).



**Elaborado por:** Sánchez, 2021

### **Métodos de control**

Para el control de la plaga de *T. urticae* se requiere de varios métodos para poderla controlar:

#### **Control cultural**

Se trata de elaborar técnicas o métodos para prevenir en el ciclo del cultivo y entre ellas incluyen algunas como: deshierbes, uso de variedades resistentes, rotaciones de cultivos, manejo de riegos y fertilización, coberturas de suelo, podas, correcto manejo fitosanitario. (Sánchez, 2021)

#### **Control químico**

Se utiliza Abamectina como Activador del canal cloro, en cambio para inhibir el crecimiento de los ácaros se usa materias activas de: clofentezin, hexitiazox, etoxazol, los productos con ingrediente activo de Propargita se encargan de inhibir la ATP mitocondrial; el aceite agrícola les produce asfixia (**Vademedum agrícola 2016-2017**). La manera correcta de aplicar es en la parte del envés de la hoja porque es ahí donde se localiza la plaga de *T. urticae* en donde forman densas sedas.

## Control biológico

Existen dos formas de control biológico: Control Biológico por Conservación y Control Biológico por Inoculación:

- **Por Conservación**, se trata mediante cubiertas vegetales como *Festuca arundinacea* Schreber (Poaceae) en el cual se refugian fitoseidos o enemigos naturales.
- **Por Inoculación**, se basa en liberar dos tipos de fitoseidos a campo o semicampo *Neoseiulus californicus* (McGregor) y *Phytoseiulus persimilis* Athias-Henriot (Acari: Tetranychidae) para la reducción de *T. urticae* (Abad –Moyano, 2010)

### 1.3.2. Cultivo de taxo (*Passiflora tripartita*)

En 1752, Carlos Linneo clasificó al taxo en el género *Passiflora*, mientras que Jussieu en 1769 reconoció que al sugénero *Tacsonia* el cual se basó en las características morfológicas de un hipantio largo y una corola reducida (Tabla 2) (Bonilla 2014). El taxo tiene su origen al norte de los Andes en Colombia, siendo domesticada en el período prehispánico, sin embargo, encuentra también en África, pero el 90% son endémicas de América. (Bernal 2003)

**Tabla 2.** Clasificación taxonómica de la planta de taxo.

TAXÓN	DENOMINACIÓN
REINO	Vegetal
DIVISIÓN	Angiospermas
CLASE	Dicotiledóneas
ORDEN	Parietales
FAMILIA	Passifloraceae
GÉNERO	<i>Passiflora</i>
ESPECIE	<i>P. tripartita</i>
N. CIENTÍFICO	<i>P. tripartita</i>
N. VULGAR	Taxo

## **Origen del taxón y distribución**

### **Hábitat**

Se distribuye desde los 1800 hasta los 3500 m.s.n.m en regiones de la zona Andina (**Bonilla 2014; Barreno 2013**). Etimológicamente el género *Passiflora* o flor de la pasión, se refiere al término dado por los españoles que encontraron similitud de los órganos florales con los instrumentos de la pasión de Cristo (**Bernal y Díaz 2005**).

**Ilustración 4.** Planta de *P. tripartita* (taxo).



**Elaborado por:** Sánchez, 2021

### **Descripción botánica**

El taxo es una planta leñosa y trepadora de varios metros de altura que posee raíces fibrosas, fasciculadas y profundas; las raicillas secundarias tienen diferente longitud de acuerdo al cuidado y características del suelo, como promedio alcanza 1,5 m de largo (**Mendaño, 2014**).

**Ilustración 5.** Planta de taxo en Ambato.



**Elaborado por:** Sánchez, 2021

El tallo es trepador, cilíndrico, herbáceo a semileñoso (**Bernal, 2005**); de color café, de donde que emergen varias ramas que trepan por medio de zarcillos y a su vez en cada uno de ellos nacen hojas alternas y en las axilas nacen dos tipos de yemas; una vegetativa presenta varias hojas y otra floral presenta una sola punta.

**Ilustración 6.** Tallo de taxo.



**Elaborado por:** Sánchez, 2021

Las hojas son trilobuladas o enteras, alternas y ligeramente serradas, pubescentes o glabras, ovadas u oblongas, de bordes aserrados, su textura va de coriáceas a membranosas; (**Bernal y Díaz 2005**), el tamaño puede variar de pequeñas a grandes; su longitud va de 7 a 10 cm de largo y de 6 a 12 cm de ancho el envés es tomentoso y el haz es vellosos.

**Ilustración 7.** Hojas de taxo.



**Elaborado por:** Sánchez, 2021

La flor presenta una bráctea cilíndrica de color verde, vellosa por fuera y con tres lóbulos. El cáliz es tubuloso, glabro exteriormente, de unos 8 cm de longitud, en su interior es blanco y verde exteriormente, la porción libre es oblonga y una línea saliente en el envés que termina debajo del ápice de un pequeño filamento, los pétalos son rojos, oblongos, cinco estambres soldados longitudinales, anteras oblongas, con polen amarillo, ovario verde, oblongo, tres estilos amarillos cremosos y tres estigmas verdes **(Reina 1995)**.

**Ilustración 8.** Flor de taxo (*P. tripartita*).



**Elaborado por:** Sánchez Solís, 2020

El fruto es una baya de color crema o amarillento en la madurez, suave al tacto, oblongo y la pulpa que rodea la semilla es ovoide a elipsoide de color salmón (**Aguirre 2016**).

**Ilustración 9.** Frutos de taxo.



**Elaborado por:** Sánchez Solís, 2020

La longevidad de este cultivo puede sobrepasar los diez años (**Heredia 2015**), una vez establecido el cultivo se puede cosechar durante todo el año (**Barreno 2013**).

**Importancia económica en el Ecuador**

Este fruto se cultiva en Ecuador, Perú, Colombia, Venezuela y Bolivia. En Ecuador se cultivan en las provincias de Azuay, Imbabura, Chimborazo, Pichincha y Tungurahua (**Barreno, 2013**). Dentro de la provincia de Tungurahua se puede encontrar en Cevallos, Mocha, Patate y Ambato. (**Landa, 2012**).

**Ilustración 10.** Planta de taxo.



**Elaborado por:** Sánchez Solís, 2021

**Requerimientos del cultivo:** Los requerimientos del cultivo se describen en la *Tabla 3*.

**Tabla 3.** Requerimiento del cultivo.

<b>REQUERIMIENTO DEL CULTIVO</b>	
<b>CLIMA</b>	12°C a los 16°C
<b>PRECIPITACIÓN</b>	1000 a 1800 mm
<b>HUMEDAD RELATIVA</b>	70 a 75%
<b>PENDIENTE</b>	> 75%
<b>TEXTURA</b>	Franca con buen drenaje
<b>PH</b>	5 a 6
<b>M.O</b>	<5%

**(Landa 2012)**

### **Propagación**

**Sexual o por semilla,** se pone en remojo la semilla por dos días para acelerar la germinación, la plántula emerge a los 45-60 días dependiendo de las condiciones ambientales (**Ocampo 2014**).

**Asexual**, consiste a través de partes vegetativas de plantas madres con excelentes características, consiguiendo así plantas idénticas a las madres, la desventaja es la reducción de su ciclo de vida, por eso poco empleada (**Bernal 2005**).

### **Preparación del suelo**

Se realizan labores pre-culturales como deshierba, limpieza total del terreno, formación de canteros, colocación de estacas.

**Tabla 4.** Preparación del suelo.

---

<b>Densidad de siembra</b>	Espaldera: 4m x 2m T sencilla: 6m x 3m
<b>Ahoyado</b>	0,40m x 0,40m de profundidad.
<b>Siembra</b>	A los 30 días después de la germinación. de espaldera, el de cama, o el de “T” sencilla
<b>Tutorado</b>	consta madera e hilos de alambre con el fin de sostener todas las estructuras de la planta.

---

**(Angulo 2003; Martínez 1983; Ocampo 2014)**

### **Podas**

Consiste en cortar las ramas, se debe renovar constantemente las estructuras de la planta, estas estructuras al ir produciendo frutos, se lignifican y ya no vuelven a producir, con la poda se estimula la brotación de nuevas ramas, flores y frutos que reemplazarán a las que cumplieron con su ciclo de vida (**Bernal y Díaz 2005**).

**Tabla 5.** Tipos de podas.

<b>TIPOS</b>	<b>CARACTERÍSTICA</b>
<b>FORMACIÓN</b>	Se eliminan los brotes innecesarios para la producción, a medida que la planta va creciendo se deben eliminar todos los brotes por debajo del primer alambre.
<b>PRODUCCIÓN</b>	Se realizan despuntes a todos los brazos que están colgando de las ramas primarias, este despunte se debe realizar a 1 metro de longitud.
<b>SANITARIA</b>	Se erradica ramas débiles, enfermas, secas, hojas amarillas, secas, o con daños de plagas y enfermedades.
<b>DE RENOVACIÓN</b>	Se realiza con el fin de reactivar la producción teniendo en cuenta estado fitosanitario, plagas y enfermedades, fertilidad, edad. Se corta en los brazos laterales.

### **Riego**

Se debe disponer de buen riego para mantener húmedo preferiblemente semanal, evitar excesos y problemas fitosanitarios.

### **Fertilización**

**Tabla 6.** Fertilización.

<b>NUTRIENTE</b>	<b>FUNCIÓN</b>
<b>N</b>	La estructura de las moléculas de la proteína, de aminoácidos, ácidos nucleicos, vitaminas y fosfolípidos, es indispensable para la formación de la molécula de la clorofila, aumenta el vigor de las plantas.

<b>P</b>	Indispensable en los procesos de transformación de energía, estimula el desarrollo de la raíz, interviene en la formación de los órganos de reproducción de las plantas, acelera la maduración de los frutos.
<b>K</b>	Promueve un crecimiento vigoroso y saludable, cataliza el proceso de fotosíntesis, ayuda en el rendimiento, mejora la calidad, incrementa el peso del fruto, fortifica tallos, ayuda a la planta a resistir mejor el estrés.
<b>Ca</b>	Forma parte de las células, ejerce un efecto neutralizador de los desechos orgánicos de la planta, influye en la utilización el magnesio, del potasio y el boro.
<b>Mg</b>	Es el principal componente de la clorofila, interviene en la síntesis de carbohidratos y proteínas, nucleoproteínas y ácido ribonucleico, favorece el transporte de K dentro de la planta.

## Plagas y Enfermedades

**Tabla 7.** Principales plagas que afectan el cultivo de taxo

<b>PLAGA</b>	<b>AGENTE CAUSAL</b>	<b>SÍNTOMA</b>
<b>NEMATODOS</b>	<i>Meloidogyne</i> sp	Atacan las raíces de las plantas produciendo agallas, estos nódulos o agallas se forman por las secreciones que emiten los nematodos al consumir los tejidos radiculares.
<b>SALTAMONTES</b>	<i>Empoasca</i> sp	Picaduras en las hojas para succionar la savia de la planta, amarilleando y secándose los bordes.
	<i>Heteractes</i> sp	Lepidóptero que perfora los tallos.

<b>LARVAS</b>	<i>Hepialus</i> sp	Lepidóptero que algunas se alimentan de las hojas, otras se alimentan de raíces y otras de alimentos subterráneos dentro del tallo o el tronco de la planta hospedera.
<b>GUSANO TROZADOR</b>	<i>Agraulis juno</i>	Causa pérdida del área foliar. En estado de larva se alimenta de hojas nuevas, hojas viejas y botones florales.

**Tabla 8.** Principales enfermedades que afectan el cultivo de taxo.

<b>ENFERMEDAD</b>	<b>AGENTE CAUSAL</b>	<b>SÍNTOMAS</b>
<b>BOTRYTIS</b>	<i>Botrytis cinérea</i>	La hifa de este hongo degrada las paredes celulares por medio de enzimas hidrolíticas para colonizar y crecer las hifas.
<b>OÍDIO</b>	<i>Oidium</i> sp	Esta enfermedad produce necrosis en tallos y hojas en el cual se desarrolla un micelio blanco y fructificaciones asexuales del hongo.

### 1.3.3. Marcadores moleculares

**Xin-Cun et al. (2015)** indican que el código de barras de ADN es un fragmento corto de secuencia de ADN utilizado para la determinación y descubrimiento de especies. La región ITS consta de regiones ITS1 e ITS2. Aquí, se realizó un meta análisis a gran escala para comparar ITS1 e ITS2 a partir de tres aspectos: amplificación de PCR, secuenciación de ADN y discriminación de especies, en términos de presencia de huecos en el código de barras del ADN, eficiencia de discriminación de las especies, distribución de la longitud de la secuencia, distribuciones primer universalidad. En total, 85 345 pares de secuencias en 10 grupos principales de eucariotas, incluyendo ascomycetes, basidiomicetos, hepáticas,

musgos, helechos, gimnospermas, monocotiledóneas, eudicotiledóneas, insectos y peces. En donde se analizaron 611 familias, 3694 géneros y 19 060 especies, se usó métodos basados en la similitud, calculamos eficiencias de discriminación de especies para ITS1 e ITS2 en todos los grupos principales, familias y géneros. Usando el exacto de Fisher. En la prueba, encontramos que ITS1 tiene eficiencias significativamente más altas que ITS2 en 17 de las 47 familias y 20 de los 49 géneros, que son ricos en muestras. Mediante la evaluación de la amplificación de PCR en silico, universalidad del cebador del ITS1 aplicado los cebadores se encontraron superiores a los de ITS2, con menor longitud de producto de amplificación y así se descubrió que el contenido de GC son otras dos ventajas de ITS1 para la secuenciación. La región ITS1 representa una mejor Código de barras de ADN que ITS2 para especies eucariotas.

**Tselila et al. (2007)**, señalan que el uso de códigos de barras de ADN, secuencias cortas de ADN de una región estandarizada del genoma. La región (ADNr-ITS2) discrimina efectivamente entre 16 especies de ácaros (Acari: *Tetranychidae*) de Israel, usando un umbral de 0.02 (2%) para el diagnóstico de especies en nuestro conjunto de datos, 14 de 16 especies reconocidas por criterios morfológicos serían identificadas con precisión y muy baja divergencia, 0.011-0.015 (1.1-1.5%), entre *Tetranychus urticae* y *Tetranychus turkestani*, donde la especiación puede haber ocurrido recientemente. Aun así, estas especies tenían variantes alternativas de rDNA-ITS2, con cinco sustituciones de nucleótidos de diagnóstico.

## CAPITULO II

### METODOLOGÍA

#### 2.1. MATERIALES Y EQUIPOS

##### 2.1.1. Equipos

- Vortex
- Autoclave
- Balanza digital
- Estufa
- Lámpara de alcohol
- Centrifugadora
- Cámara de flujo laminar
- Microondas
- Estereoscopio
- Termociclador
- Cámara de electroforesis
- Transiluminador UV
- Baño María

##### 2.1.2. Materiales

- Hojas maduras de taxo (*P. tripartita*)
- Ácaros hembras de especie *T. urticae* Koch
- Agarosa
- Algodón
- Almohadilla de poliuretano
- Botellas autoclavables de 1000ml
- Cajas Petri

- Cinta de masking
- Cintas para etiquetar
- Cubre y porta objetos
- Envases ámbar
- Erlenmeyer de 500 y 250ml
- Espátula pequeña
- Fundas plásticas Ziploc
- Gradilla de tubos EPPENDORF
- Guantes quirúrgicos
- Iniciadores
- Láminas de esponja de 1cm espesor
- Láminas de papel filtro
- Ligas
- Par de imanes
- PCR de 0,2ml
- Pincel con medida 000
- Piseta
- Probetas entre 10 a 100ml
- Puntas amarillas de 100um
- Puntas azules de 1000um
- Puntas blancas de 1um
- Rapidografos
- Rollo de papel absorbente
- Rollo de papel aluminio
- Rollo de papel Parafilm
- Set de agujas de disección
- Tijeras
- Tubos EPPENDORF de 1,5 ml
- Vasos de precipitación de 100ml
- Vasos de precipitación de 50ml

### 2.1.3. Reactivos

- Agua destilada ultra pura l
- Isoamylalcohol
- Buffer TBE 10x
- Cloroformo
- Solución CTAB 10%
- Solución EDTA 0,001M
- Etanol al 70%
- Isopropanol (frío)
- Ladder TRACKIT 100BP DNA
- Loading gel (10x)
- NaCl 4M
- Proteinasa K
- Kit RNasa A
- SDS
- Syber Safe DNA
- Tris-HCL

### 2.1.4. Iniciadores moleculares

**Tabla 9.** Iniciadores moleculares para PCR

<b>NOMBRE DEL INDICADOR</b>	<b>SECUENCIA (5'-3')</b>
<b>FORWARD (FW)</b>	5'-ATATGCTTAAATTCAGCGGG-3'
<b>REVERSE (RV)</b>	5'-GGGTCGATGAAGAACGCAGC-3'

## **2.2. Factores de estudio**

Para esta investigación los factores de estudio fueron los siguientes:

- a. Poblaciones del ácaro *T. urticae* Koch
- b. Segmentos variables del ADN
- c. Relaciones genéticas entre individuos de las tres localidades

## **2.3. Características del Lugar**

El ensayo se realizó a campo abierto y laboratorio, mismo que presentó características tales como:

### **2.3.1. Ubicación de la investigación**

La presente investigación se dio continuidad en los laboratorios de Acarología, Biología Molecular y Biotecnología Vegetal de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato, localizada en el cantón Cevallos a 2850 msnm con 1°22' 02" de latitud Sur y de longitud Oeste 78°36'22".

### **2.3.2. Factores geográficos en campo.**

Para la presente investigación se recolectaron muestras de hojas de taxo (*P. tripartita*) infestadas por *T. urticae* en los sectores de: la Joya del cantón Ambato; primero de mayo del cantón Cevallos; La Libertad del cantón Tisaleo de la provincia de Tungurahua.

**Tabla 10.** Localidades de la provincia de Tungurahua.

<b>LOCALIDAD</b>	<b>ALTITUD</b>	<b>COORDENADAS GEOGRÁFICAS</b>
<b>LA JOYA, AMBATO PRIMERO DE MAYO, CEVALLOS</b>	2586 m.s.n.m	Este: 762793,33 Oeste: 9855437,79 Este: 1°21'58,9'' Oeste: 783625
<b>LA LIBERTAD, TISALEO</b>	3260 m.s.n.m	Este: 0760653 Oeste: 0947125

### 2.3.3. Factores ambientales en laboratorio

La continuación de la investigación se realizó en los laboratorios de Acarología, Biología Molecular y Botánica de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato (*Tabla 10*), con el fin de continuar con el proceso de cría de los ácaros *T. urticae* para la preservación de la descendencia.

**Tabla 11.** Condiciones de laboratorio.

<b>LOCALIDAD</b>	<b>TEMPERATURA</b>	<b>HUMEDAD</b>	<b>ALTITUD</b>	<b>C. GEOGRÁFICAS</b>
<b>QUEROCHACA, CANTÓN CEVALLOS</b>	18°C	67,3%	2865 m.s.n.m	1°21'58.9'' 783625

## **2.4. Metodología de la Investigación**

### **2.4.1. Especie vegetal a usar**

*Passiflora tripartita*

### **2.4.2. Tratamientos**

El trabajo de investigación se realizó por medio de un muestreo aleatorio simple, en donde se recolectaron hojas maduras de *P. tripartita* (taxo) que se encontraban infectadas con *T. urticae*, que se situaban en linderos o en lotes baldíos en diferentes localidades de la Provincia de Tungurahua: la Joya (cantón Ambato), Primero de Mayo (Cantón Cevallos) y La Libertad (Tisaleo).

## **2.5. Diseño Experimental**

Al realizar un muestreo aleatorio simple, no se necesitó la aplicación de un diseño experimental para este estudio.

## **2.6. Variables respuesta**

### **2.6.1. Protocolo CTAB**

Después de incubar por una hora, seguidamente se usó etanol frío y centrifugado para precipitar el ADN. Los sedimentos del ADN se lavaron con etanol al 70%. Los tubos Eppendorf se colocaron boca abajo para secarse a temperatura ambiente. El ADN se disolvió con Tris-HCL y solución EDTA.

### **Ilustración 11.** Preparación de la solución isoamylalcohol

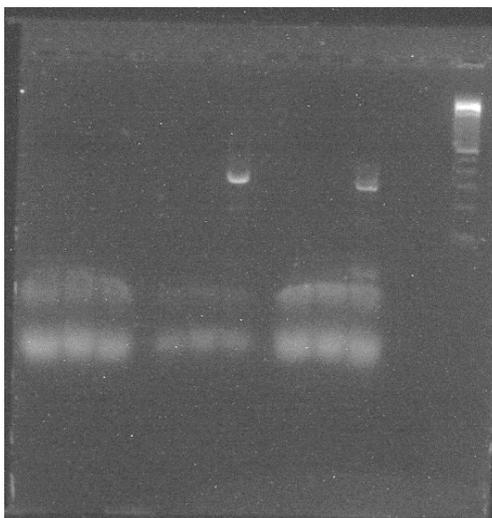


**Elaborado por:** Sánchez, 2021

#### **2.6.2. Amplificación de ADN y protocolo PCR para ITS2**

Se colocó 2ul de ADN en la reacción tampón PCR con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , más solución de reserva,  $\text{MgCl}_2$ , agua destilada estéril. Para ello se realizó un proceso de desnaturalización de 2 a 3 minutos a  $94^\circ\text{C}$ , después se dio 38 ciclos a  $94^\circ\text{C}$ ,  $35^\circ\text{C}$  y  $72^\circ\text{C}$ , finalmente de 5 minutos a  $72^\circ\text{C}$ . Las muestras se colocaron en la cámara de electroforesis usando gel de agarosa al 2% durante dos horas a 80V. El gel de agarosa se tiñó con Ladder. Para la observación se llevó la placa hecha a el trasiluminador para fotografiar bajo luz blanca o ultravioleta.

**Ilustración 12.** En la imagen que proyecta el trasiluminador se observa el gel de agarosa usando los primers ITS2.



**Elaborado por:** Sánchez, 2021

### **2.6.3. Descripción de la variabilidad genética del segmento ITS2 en el ácaro *T. urticae***

Una vez amplificado el ADN mediante PCR fueron cortados los geles y puestos en tubos Eppendorf, para seguidamente ser llevados a secuenciar en la compañía Macrogen, ubicada en Korea. El primer que se utilizó fue ITS2 con la cadena de Reverse 5'GGGTCGATGAAGAACGCACG y de Forward 5'ATATGCTTAAATTCAGCGGG, para ser comparada cualitativamente y poder determinar la similitud y divergencia entre las diferentes poblaciones. Las muestras fueron etiquetadas de la siguiente manera: TISALEO1DINA, CEVALLOS2DINA, AMBATO3DINA.

**Ilustración 13.** Primers utilizado del fragmento ITS2.



**Elaborado por:** Sánchez, 2021

**Ilustración 14.** Con el uso del trasiluminador se pudo identificar la sección del gel a cortar que previamente se etiquetó los tubos Eppendorf de la siguiente manera: TISALEO1DINA, CEVALLOS2DINA, AMBATO3DINA.



**Elaborado por:** Sánchez, 2021

**Ilustración 15.** Fragmentos de ITS2 a partir de ácaros *T. urticae* amplificados. Las muestras fueron cortadas y envasadas en tubos Eppendorf listos para secuenciar.



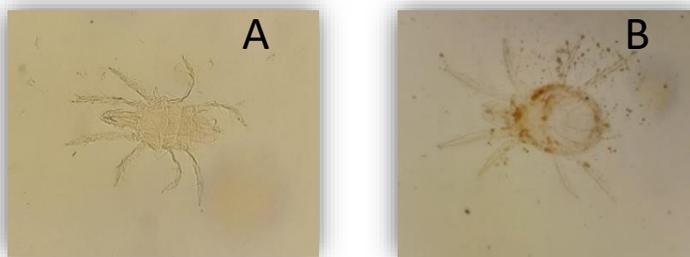
**Elaborado por:** Sánchez, 2021

## 2.7. Manejo del experimento

### 2.7.1. Identificación del ácaro *T. urticae* Koch

*T. urticae* es un ácaro que ocasiona daños en los tejidos celulares del envés de las hojas maduras de taxo (*P. tripartita*). Para una mejor identificación las muestras de hojas infestadas fueron llevadas al laboratorio y mediante el uso del estereoscopio se observó que la hembra en estado adulto tiene el cuerpo redondo, grande y con dos manchas negras claramente diferenciadas en el dorso. La hembra en estado adulto se torna de color rojo, vino a vino intenso. El macho a diferencia de la hembra posee cuerpo pequeño y termina el escudo dorsal en forma de "V". En estado adulto puede presentarse de color amarillo a anaranjado con dos manchas negras que se caracterizan por su tamaño.

**Ilustración 16.** Macho (A) y Hembra (B) de *T. urticae* Koch (10x).



**Elaborado por:** Sánchez, 2021

### 2.7.2. Recolección del ácaro *T. urticae* Koch

Se recolectaron en plantas silvestres de taxo ubicadas en terrenos baldíos, en linderos, cerramientos, también como cercas vivas sobre otras plantas, trepadoras en arboles de lindero. En cada lugar se tomó entre cuarenta a cincuenta foliolos que mostraban síntomas de alimentación por la plaga, caracterizada por una clorosis en las hojas adultas con pequeñas manchas grises, resultado de la pérdida del tejido vegetal del envés. Para confirmar la especie y poder diferenciar las características principales tanto en hembra como en macho, las muestras fueron vistas en el estereoscopio y para

su conservación colocadas en fundas de plásticas con cierre hermético incluida un registro del lugar de identificación.

**Ilustración 17.** Recolección y conservación de hojas infestadas.



**Elaborado por:** Sánchez, 2021

### **2.7.3. Mantenimiento de las muestras.**

Las muestras que fueron recolectadas en campo fueron llevadas a laboratorio para ser identificadas, diferenciadas de otras especies y sacadas aparte sólo hembras adultas de la especie estudiada *T. urticae* Koch. Para la cría de la misma especie se usaron en placas hechas en cajas Petris con una esponja redonda de melamina de 1 cm de espesor, sobre la cual se coloca una hoja sana de taxo (*P. tripartita*) rodeada de algodón con el fin de evitar la fuga de los ácaros, además de mantener la humedad en la superficie de las hojas y esponjas. En cada caja Petri se realizó arenas donde se colocó hembras adultas para su cría y preservación de la descendencia.

**Ilustración 18.** Placas con muestras (A) y Mantenimiento de las muestras (B).



**Elaborado por:** Sánchez, 2021

#### **2.7.4. Protocolo de extracción de ADN**

Mediante el método descrito por **(Doyle y Doyle 1996)** modificado el cual consiste en triturar ácaros hembra con isopropanol en un mortero y colocarlo en un tubo nuevo para agregar en la microcentrífuga y finalmente ponerlo en Baño María a 65°C.

**Ilustración 19.** Trituración de ácaros hembras



**Elaborado por:** Sánchez, 2021

## 2.8. Hipótesis

**$H_a$ :** La determinación de la variabilidad genética de la región ITS2 en individuos de *T. urticae* Koch brindará información secuencial específica en el cultivo de *P. tripartita*.

**$H_0$ :** La determinación de la variabilidad genética de la región ITS2 en individuos de *T. urticae* Koch brindará información secuencial interespecífica en el cultivo de *P. tripartita*.

## CAPITULO III

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1. Análisis y discusión de los resultados

Las amplificaciones del fragmento ITS2 de hembras de *T. urticae* de las diferentes poblaciones se muestran en la **Tabla 12**. Secuencias de ADN con 545(pb) pares de bases (Adenina = A; Timina = T; Citocina = C; y Guanina = V; en poblaciones de *T. urticae* Koch hospedante a plantas *Passiflora tripartita var. mor.* pertenecientes a Ambato (AM), Tisaleo (TI) y Cevallos (CE), de la provincia de Tungurahua, Ecuador.

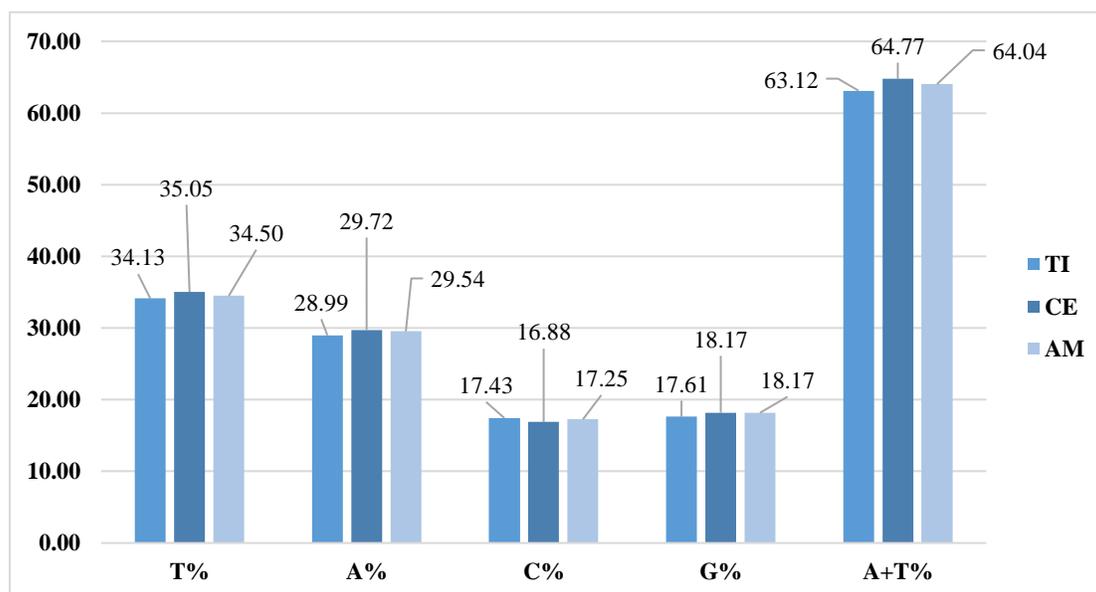
Las poblaciones de *T. urticae* Koch que fueron secuenciadas el fragmento ITS2 perteneciente a las tres localidades presentaron porcentajes similares con lo mencionado por los autores (**Ben- David et al., 2007**) la divergencia que existe entre los rasgos de los genomas es mayores entre especie. En cambio (**Navajas et al (2002)**) señala que la estructura genética de invernadero con marcadores microsatélites con periodos de alta reproducción, no hubo heterocigocidad poblacional y no hubo una alta divergencia genética entre las muestras poblacionales estudiadas tanto en el tiempo ni en el espacio, a lo que se define como una baja variabilidad genética entre poblaciones geográficas de la misma especie.

**Tabla 12.** Secuencias de ADN enviadas por la compañía Macrogen en la cual presenta 545 pares de bases (pb) Adenina, Timina, Citosina y Guanina; en poblaciones de *T.urticae* Koch hospedante en plantas de *Passiflora tripartita* pertenecientes a Ambato (AM), Tisaleo (TI) y Cevallos (CE), de la provincia de Tungurahua, Ecuador.

LOCALIDAD	SECUENCIAS
TISALEO	TAT ACGA ATT TAA GTCGCCCTGTGTCAC ATCCG TCTAAGAGTTGAGAAGT
CEVALLOS	TAT ACGA ATT TAA GTCGCCCTGTGTCAC ATCCG TCTAAGAGTTGAGAAGT
AMBATO	TAT ACGA ATT TAA GTCGCCCTGTGTCAC ATCC TCTAAGAGTTGAGAAGT
	GAAAATAT AA ACT ACAC ACTCAT CAATCCCTGAGAAAC ATTGA ATCTT ATGCTAGAGAT
	GAAAATAT AA ACT ACAC ACTCAT CAATCCCTGAGAAAC ATTGA ATCTT ATGCTAGAGAT
	GAAAATAT AA ACT ACAC ACTCAT CAATCCCTGAGAAAC ATTGA ATCTT ATGCTAGAGAT
	GATATTT ATTTA G GATC TTGAT A GTCTAGICCT C TTCT TAATG CACAAAATTTGTTT CGT
	GATATTT ATTTA C GATC TTGAT A GTCTAGICCT C TTCT TAATG CACAAAATTTGTTT CGT
	GATATTT ATTTA C GATC TTGAT A GTCTAGICCT T TTCT TAATG CACAAAATTTGTTT TTT
	CTTTCAT T TAGTA ACGA GTT TAT CTGCCATAAGT TTGT CCAGT TATCATGCAAAAC TCT T
	CTTTCAT T TAGTA ACGA GTT TAT CTGCCATAAGT TTGT CCAGT TATCATGCAAAAC ACT T
	CTTTCAT T TAGTA ACGA GTT TAT CTGCCATAAGT TTGT CCAGT TATCATGCAAAAC ACT T
	AGAGATT A ATATA TATT TATAT A T CCCTTCCAAT ATAT TTCAC TGCCAGGGGACCCAGAG
	AGAGATT A ATATA TATT TATAT A T TACTTCCAAT ATAT TTCAC TGCCAGGGGACCCAGAG
	AGAGATT A ATATA TATT TATAT A T TACTTCCAAT ATAT TTCAC TGCCAGGGGACCCAGAG
	AATGCTC GTCAAT CTGC CGACGT TAAACTCGAACC GCGCATT A AAATGACCCATAG CCAA
	AATGCTC GTCAAT CTGC CGACGT TAAACTCGAACC GCGCATT A AAATGACCCATAG AAAA
	AATGCTC GTCAAT CTGC CGACGT TAAACTCGAACC GCGCATT A AAATGACCCATAG AAAA
	GGCTTCT C AAACA AATG GGTCT C GATTCCAATTT AAGGTGAAA TGCCTGT AATATT ATAT
	GGCTTCT C AAACA AATG GGTCT C GATTCCAATTT AAGGTGAAA TGCCTGT AATATT ATAT
	GGCTTCT C AAACA AATG GGTCT C GATTCCAATTT AAGGTGAAA TGCCTGT AATATT ATAT
	AT AT TGT C TCTTA TTGT CTTT A T AATCTCCACAATTT AATTA CCTCACTGAACCACTCT
	AT AT TGT C TCTTA TTGT CTTT G T AATCTCCACAATTT AATTA CCTCACTGAACCACTCT
	AT AT TGT C TCTTA TTGT CTTT G T AATCTCCACAATTT AATTA CCTCACTGAACCACTCT
	GT TTGTT T TCCGA ACC T TTTT C G TATACTTTGAT CTCACAGCA CGCTACAGTACAGCTGC
	GT TTGTT T TCCGA ACC T TTTT C C TATACTTTGAT CTCACAGCA CGCTACAGTACAGCTGC
	GT TTGTT T TCCGA ACC A TTTT C C TATACTTTGAT CTCACAGCA CGCTACAGTACAGCTGC
	GT TCTTC ATCGAC CC
	GT TCTTC ATCGAC CC
	GT TCTTC ATCGAC CC

Como se observa en la **figura 1**, las bases nitrogenadas de las siguientes localidades presentaron los siguientes resultados para T (Timina) con 34,50% (AM), 35,05% (CE), y 34,13% (TI), manteniendo rangos similares entre Ambato y Tisaleo, siendo el mayor Cevallos; y para A (Adenina) con 29,54% (AM), 29,72% (CE) y 28,99 % (TI), presentando rangos similares entre Ambato y Cevallos. De igual manera, los índices porcentuales para C (Citosina) con 17,25% (AM), 16,88% (CE), 17,43% (TI) en donde Ambato y Tisaleo mantienen rangos similares o cercanos a diferencia de Cevallos que es menor; y para G (Guanina) con 18,17% (AM), 18,17% (CE) y 17,61 % (TI), siendo Ambato y Cevallos los que mayor porcentaje conservan y Tisaleo con un menor rango. Guanina y Citosina forman tres enlaces los cuales permiten hacer una relación y tener los siguientes resultados; 35,41% (AM), 35,05% (CE), 35,05% (TI). Mientras que la relación Adenina y Timina 64,04%, (AM); 64,77 (CE), 63,12%(TI), que se relaciona con lo mencionado por (**Navajas et al., 1996**) en lo cual el polimorfismo puede existir en las posiciones de los nucleótidos, de uno por otro nucleótido, coincide con reportajes descritos en algunos países (**Hinomoto et al., 2001**).

**Figura 1.** Distribución de las bases nitrogenadas amplificadas del fragmento ITS2 del ácaro *T. urticae* y la relación existente entre las diferentes localidades.



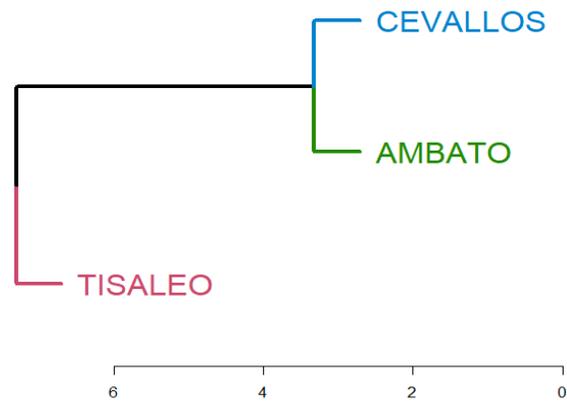
Como resultado de la secuenciación del fragmento ITS2 de las poblaciones de *T. urticae* Koch, presentó los siguientes porcentajes en los nucleótidos y la relación existente entre ellos, como se puede observar en la **Tabla 2**, se obtuvo un total de 13 representado con el 99,82%, de las 545 pb. La primera relación entre las poblaciones fue de TI (Tisaleo)-CE (Cevallos), estas muestras tuvieron 8 sustituciones con 1,83% divergencia, en cambio las poblaciones de TI(Tisaleo)-AM (Ambato) las muestras indicaron 13 sustituciones con una similitud del 99,45% y una divergencia del 0,55%; de igual manera con las muestras de CE-AM presentaron 5 sustituciones, con una similitud del 99,82% y una divergencia del 0,18%. Las diferentes poblaciones de *T. urticae* pueden presentarse un determinante flujo genético para poder diferenciar rasgos filogenéticos ya sean debido a resistencia a acaricidas, especificidad en plantas huésped. (Xie Lin et al. 2006). La biología del ácaro en hojas de manzana a temperatura de 18 a 21°C en un tiempo promedio de 12 a 19 días (Carey et al. 1982). Sin embargo, la composición química de la planta hospedante afecta el tiempo de desarrollo de este ácaro (Van de Boom et al., 2003).

**Tabla 13.** Tabla comparativa entre localidades (AM=Ambato, CE =Cevallos, TI= Tisaleo) que fueron llevadas a secuenciar la región ITS2 del ácaro *T. urticae*.

<b>NOMBRE</b>	<b>N° DE SUSTITUCIONES</b>	<b>% SIMILITUD</b>	<b>% DIVERGENCIA</b>
<b>TI-CE</b>	8	98,17	1,83
<b>TI-AM</b>	13	99,45	0,55
<b>CE-AM</b>	5	99,82	0,18
<b>TOTAL DE SUSTITUCIONES: 13</b>			

Según el árbol filogenético, Ambato y Cevallos se encuentran en el mismo anclaje, evidenciando que las dos localidades de *T. urticae* es muy similar su rango están entre el 99,82% y 99,45 % mientras que el *T. urticae* recolectado en la localidad de Tisaleo tiene una diversidad genética del 98,17% lo cual dista 1,67 puntos entre las dos localidades sugiriendo que hay una variación genética para haberse adaptado a esta localidad.

**Figura 2.** Árbol filogenético de las poblaciones de *T. urticae* Koch



## CAPITULO IV

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 4.1. Conclusiones

Al finalizar la investigación de “Estudio de la variabilidad de la región ITS2 en poblaciones de *Tetranychus urticae* Koch en el cultivo de taxo ( *Passiflora tripartita*)” se llegó a las siguientes conclusiones:

- Se determinó la variabilidad genética que existe en poblaciones de *T. urticae* Koch en el cultivo de *P. tripartita* en las diferentes localidades de la provincia de Tungurahua; en el barrio Primero de mayo, del cantón Cevallos ubicado a 2865 m.s.n.m. presentó un 99,82% de similitud, seguido de la Joya del cantón Ambato ubicado a 2586 m.s.n.m. que obtuvo un 99,45% de similitud, finalmente La Libertad del cantón Tisaleo a 3260 m.s.n.m. presento 98,17% de similitud. Al determinar una diferencia entre los valores presentados, identificamos que el rango de mayor similitud posee Cevallos, seguido de Ambato, esto debido a que presentan condiciones similares de clima y altura favorable para el desarrollo de *T. urticae* Koch y, a diferencia de Tisaleo que está más distante con temperaturas más bajas por lo cual el ácaro debió adaptarse a dichas condiciones.
- La secuenciación del fragmento ITS2 presentó 545 pares de bases (pb), en donde las bases nitrogenadas de las localidades mencionadas anteriormente presentaron los siguientes resultados; para A (Adenina) con 29,54% (AM), 29,72% (CE) y 28,99 % (TI), presentando rangos similares entre Ambato y Cevallos; y para T (Timina) con 34,50% (AM), 35,05% (CE), y 34,13% (TI), para C (Citosina) con 17,25%, (AM), 16,88% (CE), 17,43% (TI) y para G (Guanina) con 18,17% (AM), 18,17% (CE) y 17,61 % (TI). De lo que se observó los valores más altos de (T) Timina son en Cevallos con 35,05%, seguido de Ambato y Tisaleo respectivamente, en el caso de las (A) Adeninas el valor menor de Tisaleo con 28,99 %, siendo Cevallos el mayor con 29,72%. A diferencia de G y C, que presentan valores bajos, Tisaleo es el de

menor valor con 17,61% seguido de Ambato y Cevallos con 18,17%, en cambio para C (Citosina), Ambato es de menor valor con 16,88% superado por 17,25% y Cevallos con 17,43%. Demostrando de esta manera en el árbol filogenético que Ambato y Cevallos se encuentran en un rango cercano de similitud.

- Los nucleótidos de ITS2 secuenciados presentaron 13 sustituciones en las bases nitrogenadas para las tres localidades de la provincia de Tungurahua, pues la relación TI-CE mostró 8 sustituciones con 98,17% de similitud y con una divergencia del 1,83%, en cambio entre TI-AM presentó 13 sustituciones con una similitud de 99,45% y una divergencia de 0,55%, mientras que CE-AM presento 5 sustituciones con un porcentaje de similitud de 99,82% y una divergencia del 0,18%. Tisaleo resulto estar un poco alejado en el rango tanto para Cevallos con 1,28% en similitud y en divergencia, mientras que para la relación TI- AM se presenta aún más alejado con un rango en similitud y divergencia del 1,65%. Estableciendo una relación entre CE-AM los cuales son de menor divergencia genética.

#### **4.2. Recomendaciones**

Para la presente investigación o siguientes investigaciones relacionadas se recomienda como prioridad el reconocimiento preciso de la especie a estudiar, familiarizarse y realizar algunas prácticas de repaso para la perfección del protocolo a seguir, ya que este protocolo requiere de asepsia y un perfecto manejo de materiales y equipos.

## CAPITULO V

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abad-Moyano, R; Urbaneja, A; Schausberger, P. 2010. Intraguild interactions between *Euseius stipulatus* and the candidate biocontrol agents of *Tetranychus urticae* in Spanish clementine orchards: *Phytoseiulus persimilis* and *Neoseiulus californicus*. National Library of Medicine. *Experimental and Applied Acarology* 50(1): 23-34.
- Alarcón, C; Castro, W. 2019. Manejo bio-químico de ácaros (*Tetranychus urticae*) en rosas. Metroflor. La actualidad técnica de la floricultura colombiana.
- Argolo, P. 2012. Gestión integrada de la araña roja *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae): optimización de su control biológico en clementinos. Valencia. Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Valencia. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos. Departamento de Producción Vegetal.
- Becerra, V; Paredes, Carmen Rojo, C; France, A. 2006. RAPD e ITS Detectan Variación Molecular en Poblaciones Chilenas de *Beauveria bassiana*. *Agricultura Técnica* 67(2):115-125.
- Ben-David, T; Melamed, S; Gerson, U; Shai Morin. 2007. ITS2 sequences as barcodes for identifying and analyzing spider mites (Acari: Tetranychidae). *Experimental and Applied Acarology* 41(3):169-81
- Analía A. 2007. Código de barras del ADN y sus posibles aplicaciones en el campo de la Entomología. *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina* 66 (3-4): 15-25
- Cabrera. 2008. Determinación de la utilidad del – ITS2-ADNr - para diferenciación de subpoblaciones de *Triatoma dimidiata*, Jutiapa, Conference: XII Congress of the Mesoamerican Society for Biology and Conservation At: San Salvador, Salvador.
- Cerna. 2009. Tolerancia del ácaro *Tetranychus urticae* Koch a cuatro acaricidas de diferente grupo toxicológico. *Investigación y Ciencia* 44: 4-10.
- Cienfuegos, A; Gómez, G; Córdoba, L; Luckhart, S; Margarita M. Correa, M. 2008. Diseño y evaluación de metodologías basadas en PCR-RFLP de ITS2 para la identificación

- molecular de mosquitos *Anopheles* spp. (Diptera: Culicidae) de la Costa Pacífica de Colombia. *Revista Biomédica* 19 (1). 35-44.
- Cifuentes, A; Rivadeneira, A. 2016. Estudio y análisis de la fruta taxo Amarillo (*Passiflora tarminiana*) y su utilización en manjares elaborados con productos de la Costa ecuatoriana. Guayaquil. Tesis de licenciatura. Universidad de Guayaquil. 102
- Duran, C. 2015. Plan estratégico para la exportación del taxo como producto agrícola no tradicional hacia el mercado de Francia en el período 2016-2021. Guayaquil. Tesis Ing. en Comercio Exterior. Universidad de Guayaquil.123
- Forero, G; Rodríguez, M; Cantor, F; Rodríguez, D; Ricardo, J. 2008. Criterios para el manejo de *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) con el ácaro depredador *Amblyseius (Neoseiulus)* sp. (Acari: Phytoseiidae) en cultivos de rosas. *Agronomía Colombiana* 26(1): 78-86
- Fox C. W., Thakar M. S., Mousseau T. A. 1997. Egg size plasticity in a seed beetle: an adaptive maternal effect? *The American Naturalist* 149 (1): 149-163.
- Gallardo, A; Vasquez, C.; Morales, J; Gallardo, J. 2005. Biología y enemigos naturales de *Tetranychus urticae* en pimentón. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología* 74: 34-40.
- Guo-Qing L.; Xiao-Feng X.; Kai-Jun Z.; Xiao-Yue H. 2010. Identification and molecular phylogeny of agriculturally important spider mites (Acari: Tetranychidae) based on mitochondrial and nuclear ribosomal DNA sequences, with an emphasis on *Tetranychus*. *Zootaxa*. 2647: 1-15
- Lea-Charris E.R.; Wolff M., Castro, LR. 2016. ITS2 for the Identification of Calliphoridae (Diptera: Calliphoridae) of Forensic Importance in Colombia. *Acta Biológica Colombiana*. 21(3):543-553.
- Yao,H.; Song, J., Liu, C., Luo, K.; Han, J., Li, Y.; Pang, X., Xu, H.; Zhu, Y., Xiao, P.; Chen, S. 2010. Use of ITS2 Region as the Universal DNA Barcode for Plants and Animals. *US National Library of Medicine National Institutes of Health*. 5(10): e13102.

- Hurtado, M; Ansaloni, T; Cros-Arteil, S; Jacas, J; Navajas, M. 2008. Sequence analysis of the ribosomal internal transcribed spacers region in spider mites (Prostigmata: Tetranychidae) occurring in citrus orchards in Eastern Spain: use for species discrimination. *Annals of Applied Biology* 153: 167-174.
- Infojardin. 2019. Curuba, Curubas, Taxo, Tumbo, Parcha, Tacso, Granadilla cimarrona. *Passiflora tarminiana*, *Passiflora tripartita* var. *Mollissima*.
- Iturralde, M. 2005. Identificación genética de hongos. Sociedad Micologica de Madrid.
- Shim, J.K., Khaing, T.M., Seo, H.E., Ahn, J.Y., Jung, D.O., Lee, J.H., Lee, K.Y. 2006. Development of species-specific primers for rapid diagnosis of *Tetranychus urticae*, *T. kanzawai*, *T. phaseolus* and *T. truncatus* (Acari: Tetranychidae). *Entomological Research* 46(2): 162-169.
- Carey, J.R.; Bradley J. 1982. Developmental rates, vital schedules, sex ratios and life tables for *Tetranychus urticae*, *T. turkestanii* and *T. pacificus* (Acarina: Tetranychidae) on cotton. *Acarologia* 23(4): 333-345.
- Landa, D. 2012. Diagnóstico situacional del taxo (*Passiflora mollissima* B.H.K) en la provincia de Tungurahua. Tesis de grado, Universidad Técnica de Ambato.
- Xie, L., Hong, X.Y., Xue, A.F. 2006. Population Genetic Structure of the Twospotted Spider Mite (Acari: Tetranychidae) from China. *Annals of the Entomological Society of America* 99(5): 959-965
- Macke, E; Magalhães, S.; Khan, H.D.; Luciano, A., Adrien, F.; Benoît, F.; Olivieri, I. 2011. Sex allocation in haplodiploids is mediated by egg size: evidence in the spider mite *Tetranychus urticae* Koch. *Proceedings of Biological Science* 278 (1708): 1054-1063.
- Matsumoto, Y.; Yanase, T.; Tsuda, T.; Noda, H. 2009. Characterization of Internal Transcribed Spacer (ITS1)-ITS2 Region of Ribosomal RNA Gene From 25 Species of Culicoides Biting Midges (Diptera: Ceratopogonidae) in Japan. *Journal of Medical Entomology* 46(5): 1099-1108.
- Miranda, D; Fischer, G; Carranza, C; Magnitskiy, S; Casierra, F; Piedrahita, W; Flórez, L; 2009. Cultivo, poscosecha y comercialización de las Passifloráceas en Colombia:

- maracuyá, granadilla, gulupa y curuba. Bogotá. Sociedad Colombiana de Ciencias Hortícolas. Bogotá, Colombia.
- Yao, H.; Song, J.; Liu, C.; Luo, K.; Han, J.; Li, Y.; Pang, X., Xu, H.; Zhu, Y.; Xiao, P.; Chen, S. 2010. Use of ITS2 Region as the Universal DNA Barcode for Plants and Animals. Plos One 5(10): e13102.
- Pinero, D. 2008. La variabilidad genética de las especies: aspectos conceptuales y sus aplicaciones y perspectivas en México. vol. I: Conocimiento actual de la biodiversidad. Conabio, México, pp. 415-435
- Roeder, C; Harmsen, R; Mouldey, S.1996. The effects of relatedness on progeny sex ratio in spider mites. Journal of Evolutionary Biology 9: 143-151
- Stillwell R. C., Blanckenhorn W. U., Teder T., Davidowitz G., Fox C. W. 2010. Sex differences in phenotypic plasticity affect variation in sexual size dimorphism in insects: from physiology to evolution. Annual Review of Entomology 55: 227-245
- Tarambis, A. 2012. Estudio de factibilidad para la creación de una microempresa productora y comercializadora de taxo “variedad castilla” en la parroquia los andes, cantón bolívar, provincia del Carchi. Carchi. Tesis de grado. UTN.
- Toapanta, Nelly. 2019. Tesis. Evaluación del nivel de daño agronómico de *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) en variedades de *Fragaria* spp. Provincia de Tungurahua. Tesis Ingeniería Agronómica. Universidad Técnica de Ambato.
- Tselila B; Melamed, S; Gerson S. 2007. ITS2 sequences as barcodes for identifying and analyzing spider mites (Acari: Tetranychidae). Experimental and Applied Acarology 41(3):169-81
- VADEMECUM AGRICOLA 2016-2017. QUICK AGRO. Edicion XIV. Edifarm. [www.edifarm.com.ec](http://www.edifarm.com.ec)
- Van den Boom, C; van Beek, T; Dicke, M. 2003. Differences among plant species in acceptance by spider mite *Tetranychus urticae* Koch. Journal of Applied Entomology. European Journal of Entomology 100: 449-453

Van Veen, F; Belshaw, J; Godfray, C; 2003. The value of the ITS2 region for the identification of species boundaries between *Alloxysta* hyperparasitoids (Hymenoptera: Charipidae) of aphids. *Journal of Applied Entomology* 100(3). 449-453.

Xin-Cun Wang, Chang Liu, liang Huang, Bengtsson, J; Palme, Haimei Chen, Jian-Hui Zhang, Dayong Cai and Jia N-Qin Li. 2015. ITS1: a DNA barcode better than ITS2 in eukaryotes? *Molecular Ecology Resources* 15(3):573–586

Zapata, M; Trujillo, A; Agudelo, O; Quiñones, M; Jake T; Luckhart, S; Correa, M. (2004). PCR-RFLP de secuencias ITS como método de identificación de -especies de *Anopheles* del subgénero *Nyssorhynchus*. *Iatreia* 17(2): 181-182.