

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

Facultad de Ciencias de la Vida

Elaboración de un árbol filogenético del picudo de Palma mediante
la identificación de rasgos propios de su secuencia

Proyecto Integrador

Previo la obtención del Título de:

Biólogo

Presentado por:

Andrés Alejandro Alvarez Vega

Dafne Mabel Haro Ayala

Tutor: PhD. María Fernanda Ratti

Guayaquil-Ecuador

Período: 2023-2024

Dedicatoria

El presente proyecto lo dedico primero a Dios que es quien me dio la fuerza para seguir adelante cuando quería abandonar la carrera, mis padres que fueron un pilar fundamental en el transcurso de la carrera de manera emocional y económica, finalmente, a mi primo Jerson Haro por darme sus consejos, y mis mejores amigas Andrea y Dayanna que me enseñaron que no solo es estudiar sino disfrutar el proceso.

Este proyecto se lo dedico sobre todo a mis padres Washington y Helen, que me apoyaron y aconsejaron incondicionalmente, a mis amigos, mis profesores y a cada una de las personas que he tenido el gusto de conocer y que estuvieron conmigo de una u otra forma desde el inicio de mi carrera universitaria hasta el final, desde mis momentos más felices hasta los más oscuros, y de una forma muy particular a mis grandes amigos de la infancia; Nicolás, Anthony, Mario, Diego, Xavier, Santiago, Ricardo, Álvaro, Javier, Pedro, y tantos otros, por enseñarme el valor de la autenticidad que cada uno puede construir y de la trascendental implicación que puede tener una amistad.

Agradecimientos

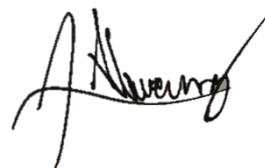
Mi más sincero agradecimiento a nuestra tutora la profesora María Fernanda Ratti, por estar al pendiente de nuestro proyecto apoyando con ideas y correcciones, también a las siguientes asociaciones de Palmicultores del Ecuador ASOPROPAL (Asociación de Producción Agrícola Palmicultores del Sur) y ANCUNPA (Asociación Nacional de Cultivadores de Palma Aceitera). Además de nuestro cordial agradecimiento al CIBE (Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador) por permitirnos usar las instalaciones y los equipos que permitieron la elaboración de este proyecto, y finalmente de forma particular a la Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL) por permitirnos la oportunidad de empezar y concluir nuestros estudios universitarios.

Declaración Expresa

“Los derechos de titularidad y explotación, nos corresponde conforme al reglamento de propiedad intelectual de la institución; Andrés Álvarez y Dafne Haro damos nuestro consentimiento para que la ESPOC realice la comunicación pública de la obra por cualquier medio con el fin de promover la consulta, difusión y uso público de la producción intelectual”



Autor 1
Dafne Haro



Autor 2
Andrés Álvarez

Evaluadores

Ing. Diego Gallardo

Profesor de Materia

PhD. María Fernanda Ratti

Tutor de proyecto

Resumen

Este proyecto se busca estudiar la plaga *Rhynchophorus palmarum* a través del análisis de un árbol filogenético para conocer su identidad, sus variabilidades genéticas y su capacidad de adaptación a cambios en el ambiente con la finalidad de encontrar medidas de mitigación, que sean eficaces para controlar la plaga, causando el menor daño posible a la planta en este caso la palma aceitera. Se desarrolló a base de un trampeo de varias muestras de diferentes provincias del Ecuador analizadas primero por un método PCR y luego pasó por un programa de secuenciación. En los resultados se descubrió que no existe diferencia significativa entre las especies de las diferentes provincias analizadas. Esto es una idea preliminar para a futuro poder desarrollar un perfil genético mayor con más muestras, diferentes marcadores genéticos, otras zonas de análisis, porque Ecuador al ser un país productor de aceite, el daño que causa esta plaga a los cultivos representa muchas pérdidas económicas, entonces al tener un control efectivo se puede establecer un método más rentable que las trampas comúnmente usadas.

Palabras claves: Trampeo, secuencias, árbol filogenético, plaga.

Abstract

This project seeks to study the pest *Rhynchophorus palmarum* through the analysis of a phylogenetic tree to understand its identity, its genetic variabilities, and its ability to adapt to changes in the environment with the aim of finding mitigation measures that are effective to control the pest, causing the least possible damage to the plant in this case the oil palm. It was developed based on trapping several samples from different provinces of Ecuador, first analyzed by a PCR method, and then passed through a sequencing program. In the results, it was discovered that there is no significant difference between the species from the different provinces analyzed. This is a preliminary idea for the future to be able to develop a larger genetic profile with more samples, different genetic markers, other areas of analysis, because Ecuador being an oil producing country, the damage that this pest causes to crops represents many economic losses, then by having effective control a more profitable method can be established than the commonly used traps.

Keywords: Trapping, sequences, phylogenetic tree, plague.

Índice General

Resumen	VI
Abstract.....	VII
Índice General	VIII
Abreviaturas.....	IX
Simbología.....	X
Capítulo 1	1
1.1 Introducción.....	2
1.2 Descripción del Problema	3
1.3 Justificación del Problema.....	3
1.4 Objetivos	3
1.4.1 <i>Objetivo General:</i>	3
1.4.2 <i>Objetivos Específicos:</i>	4
1.5 Marco teórico.....	4
Capítulo 2	7
2.1 Metodología.....	8
2.1.1 Fase de Laboratorio.....	9
Capítulo 3	14
3.1 Resultados.....	15
3.2 Análisis de Datos.....	15
3.3 Análisis de Costos.....	18
Capítulo 4	19
4.1 Conclusiones y recomendaciones.....	20
4.1.1 Conclusiones	20
4.1.2 Recomendaciones.....	20
Referencias.....	22

Abreviaturas

ESPOL	Escuela Superior Politécnica del Litoral
CIBE	Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador
PCR	Reacción de cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction por sus siglas en inglés)
COX 1	Citocromo c oxidasa 1
AIC	Criterio de información de Akaike (Akaike Information Criterion) por sus siglas en inglés
GEA	Granja Experimental Agrícola
FCV	Facultad de Ciencias de la Vida
FADCOM	Facultad de Arte, Diseño y Comunicación
UDLA	Universidad de las Américas

Simbología

NaCl	Cloruro de Sodio
CTAB	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
PVP	Polivinilpirrolidona
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
TrisHCL	Clorhidrato de tris(hidroximetil)aminometano
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Rpm	Revoluciones por minuto
°C	Grados centígrados
A	Amperios
V	Voltios

Capítulo 1

1.1 Introducción

El insecto *Rhynchophorus palmarum*, llamado coloquialmente como “picudo de palma” es un coleóptero de la familia Arecaceae. En América Latina es una plaga muy conocida, porque, impacta económicamente en el cultivo de palma aceitera y en la industria productora de este (Moya, 2019).

Este insecto es un importante vector de nemátodos causantes de la enfermedad del anillo rojo, además de participar de forma significativa en el avance de la enfermedad de la pudrición del cogollo. En ciertas localidades, la pudrición del cogollo estuvo presente en alrededor del 10% de las plantas a principios de los años 2000, lo cual implicó una pérdida fija de unos 8 millones de dólares aproximadamente. (Martinez, 2010).

Además, esta plaga puede ocasionar la muerte del 35% de las palmas de aceite, aumentando el precio de aceite de 0,9 hasta 13,5 dólares por tonelada (Gobierno Ecuatoriano , 2017).

Los síntomas son reconocidos en los tejidos de las nuevas hojas al verse en estado de pudrición, conservando solo las que quedaron antes de la infección. Esto hace que las hojas obtengan un color amarillento, y sean susceptibles a la infección por hongos y posteriormente insectos oportunistas se posan en estas, acelerando así el proceso de pudrición e impidiendo el crecimiento de la planta. (Moisés Ramírez, Edgar Benítez , 2010)

Evitar que esta plaga se propague es importante para que no ocurra un desequilibrio en la economía del país, ya que Ecuador tiene alrededor de 250.000 hectáreas de tierra agrícola, creando 70.000 empleos directos e indirectos; Por ello, en América Latina es considerado el segundo productor más grande de cultivo de aceite. (Figuroa, 2017)

1.2 Descripción del Problema

Este proyecto está orientado al análisis de las variaciones genéticas de los picudos de palma, debido a que es una plaga que está afectando actualmente a la economía del país, y se necesita tener mayor conocimiento de qué tan susceptibles son estos insectos a controladores biológicos o químicos. Por ello, al saber qué tan variables son, se podría obtener una idea de qué tan capaces son de sobrevivir a estrategias de control de plagas. Por lo tanto, nos planteamos la siguiente pregunta: ¿Las poblaciones de picudos de palma que afectan a los cultivos en Ecuador son genéticamente homogéneas en las diferentes provincias que se encargan de la producción de palma aceitera? Los especímenes son recolectados mediante trampeo, gracias a la organización ASOPROPAL (Asociación de Producción Agrícola Palmicultores del Sur) en la zona Sur (Guayas y Los Ríos), por otra parte, también tenemos especímenes de la provincia Esmeraldas, con ayuda de la empresa ANCUNPA (Asociación Nacional de Cultivadores de Palma Aceitera).

1.3 Justificación del Problema

El proyecto es importante porque así nos permite conocer más acerca de la diversidad de picudos en el país, lo cual permitiría sentar las bases para elaborar un plan de acción en donde se establezcan controles o mitigaciones con la finalidad de reducir pérdidas dentro del sector palmicultor debido a la plaga de picudo de palma.

1.4 Objetivos

1.4.1 *Objetivo General:*

Determinar las variaciones genéticas de los picudos de palma ubicados en diferentes zonas palmeras del Ecuador mediante análisis de sus secuencias para la contribución de estrategias de mitigación.

1.4.2 *Objetivos Específicos:*

Analizar la calidad del ADN obtenido de los picudos de palma para el diseño de un árbol filogenético.

Comparar las secuencias de ADN obtenidas para reconocimiento de cambios poblacionales en las diferentes zonas analizadas.

1.5 Marco teórico

En Ecuador, la producción y cultivo de la palma aceitera (*E. guineensis*) es una industria en crecimiento y que representa una parte importante de cuota de mercado dentro del sector agrícola. Este cultivo representa del 4 al 5% del PIB agrícola en el país, con un crecimiento del 8-10% anual desde el año 2010, posicionándose como uno de los siete productos provenientes de la agricultura más exportados del país. Esta industria genera un promedio de US\$ 271 millones únicamente en divisas de exportación, donde los principales destinos incluyen a la Unión Europea y Colombia como sus principales destinos, entre otros (Informe sobre el Sector Palmicultor Ecuatoriano, 2017). Ecuador está posicionado como el séptimo país con más exportaciones de aceite proveniente del cultivo de palma a nivel internacional. La estratificación productiva del cultivo de palma aceitera incluía una participación de más del 85% en productores pequeños, con menos de 50 hectáreas de producción, de entre las 280 mil hectáreas que constituyen la totalidad del cultivo de palma aceitera. Las zonas productoras de aceite proveniente de la palma se ubican en provincias Los Ríos, Guayas, Santo Domingo, Sucumbíos, Esmeraldas y Pichincha.

Al igual que otros cultivos, la palma aceitera sufre de plagas y enfermedades que derivan en el deterioro de la planta y consecuente en una pérdida económica para el sector. Entre los principales padecimientos que puede sufrir un cultivo de palma aceitera, se encuentran la enfermedad del anillo rojo (AR) que causa un debilitamiento general de la

planta y la enfermedad de la pudrición del cogollo (PC), cuyos síntomas varían según el avance de la enfermedad. Ambas enfermedades convergen en una ligera clorosis de las hojas jóvenes, en donde estas pueden llegar a reducir hasta un 30% su tamaño original y los racimos de palma se ven deteriorados cuando la enfermedad llega a un grado más avanzado, llegando los folíolos a mostrar importantes deformaciones e incluso una necrosis, particularmente debido al AR. En ambas situaciones está involucrado un insecto conocido como el picudo de palma, picudo negro o gualpa (*Rhynchophorus palmarum*). El insecto *R. palmarum* es perjudicial de forma particular a las plantas de palma, no solo por el daño fruto de sus larvas, sino también por relacionarse de manera directa a dos enfermedades que causan pérdidas millonarias dentro del sector palmicultor. La morfología del picudo de palma consiste en una cabeza prolongada hacia adelante, un pronunciado pico curvado ventralmente y por tener un tamaño de entre 2 y 5 cm (Barreiro, 2018). Estos insectos pueden vivir entre 3 y 4 meses y causar daños directos e indirectos a las plantaciones de palma, tales como la excavación de galerías dentro de la planta, así como cuando actúa de vector.

Se han realizado estudios en donde se demuestra que las capturas por trampas de feromonas son el medio más usado para controlar al insecto dentro del país, particularmente aquellas que son elaboradas con medidas artesanales. En un estudio elaborado en Santo Domingo, se establece que los métodos de mitigación basados en trampas tienen una funcionalidad y eficiencia media al utilizar feromonas sintéticas más atractivas naturales. En países como Colombia se ha estudiado este insecto con la finalidad de recolectar información genética que pueda ser usada para elaborar un plan de contingencia que pueda disminuir su impacto en las plantaciones de palma aceitera. En Ecuador todavía no ha sido realizado un estudio genético de este tipo a pesar de ser de alto interés económico debido a que estas plagas causan entre 70 y 90 millones de dólares en pérdidas e implica un problema

tanto para la integridad de los cultivos de palma como para el PIB que esta parte del sector agrícola aporta al país.

Capítulo 2

10ml de agua y jabón con la intención de servir como componente adhesivo para que los picudos no logren salir y una mezcla de feromonas de este para que se sientan atraídos y se animen a entrar en el recipiente, se lo ubicó en el suelo de la Granja Experimental Agrícola (GEA) en ESPOL cerca de la facultad de FADCOM. Se recolectaron alrededor de 20 individuos pero solo se usaron 5 para análisis.

2.1.1 Fase de Laboratorio

Una vez capturados, se procedió a conservarlos en -80°C hasta su extracción por medio de un protocolo de CTAB. En donde las muestras fueron trituradas, en este caso se usó solo las patas del insecto, luego se adicionó un buffer de extracción que contiene NaCl, EDTA, TrisHCL, PVP y cloroformo isoamilo, luego de 30 minutos en baño María se procedió a mezclar las muestras dentro de una cámara en donde posteriormente se centrifugaron a 13 000 rpm por 20 minutos y se extrajo el sobrenadante del resultado. Una vez obtenido el sobrenadante, se procedió a precipitarlo utilizando isopropanol y se dejó reposando en el -20 por alrededor de 16 horas. Una vez transcurrido ese tiempo, se realizaría una centrifugación a 13 000 rpm por 1 minuto para poder precipitar todo el pellet y se procedió a lavarlo con etanol al 70%, este paso fue repetido varias veces. Una vez dejado secar el producto con su respectivo pellet, se procedió a diluir las muestras en 50 μl de agua ultrapura y se verificó la concentración y calidad del ADN por medio de espectrofotometría (NANODROP) y se registraron todos los resultados obtenidos.

#	Sample ID	User name	Date and Time	Nucleic Acid	Unit	A260 (Abs)	A280 (Abs)	260/280
1	G1	Admin	6/22/2023 12:06:58 PM	12.7	ng/ μl	0.253	0.143	1.77
2	G2	Admin	6/22/2023 12:08:35 PM	11.2	ng/ μl	0.225	0.116	1.94

3	G3	Admin	6/22/2023 12:09:30 PM	12.5	ng/μl	0.250	0.117	2.14
4	G4	Admin	6/22/2023 12:10:19 PM	3.5	ng/μl	0.070	0.020	3.45
5	G5	Admin	6/22/2023 12:11:02 PM	11.2	ng/μl	0.225	0.125	1.79
6	G6	Admin	6/22/2023 12:11:38 PM	10.7	ng/μl	0.214	0.106	2.02
7	G7	Admin	6/22/2023 12:12:42 PM	12.9	ng/μl	0.258	0.130	1.98
8	G8	Admin	6/22/2023 12:14:10 PM	7.3	ng/μl	0.146	0.055	2.65
9	R1	Admin	6/22/2023 12:15:05 PM	-0.9	ng/μl	-0.018	-0.019	0.97
10	R2	Admin	6/22/2023 12:15:44 PM	-0.2	ng/μl	-0.003	-0.001	4.82
11	R3	Admin	6/22/2023 12:16:26 PM	-0.8	ng/μl	-0.015	-0.010	1.54
12	R4	Admin	6/22/2023 12:17:12 PM	16.3	ng/μl	0.327	0.218	1.50
13	R5	Admin	6/22/2023 12:18:12 PM	9.2	ng/μl	0.183	0.105	1.74
14	R6	Admin	6/22/2023 12:18:49 PM	4.7	ng/μl	0.094	0.051	1.85

Tabla 1. Resultados de la calidad del ADN de las muestras de R. Palmarum de Guayas y Los Rios, obtenidos por el NanoDrop.

Las muestras pertenecen a Guayas-Balzar (G), y de Los Ríos-El Empalme (R), se descartaron las muestras con valores negativos de ácido nucleico, debido a que no presentaban muy buena calidad y no servían para mandar a secuenciar, un factor que pudo afectar a este resultado pudo ser que algunas muestras no llegaron en las condiciones óptimas.

#	Sample ID	User name	Date and Time	Nucleic Acid	Unit	A260 (Abs)	A280 (Abs)	260/280	260/230
1	E1	Admin	8/8/2023 9:44	25.2	ng/μl	0.504	0.275	1.83	2.84
2	E2	Admin	8/8/2023 9:45	52.9	ng/μl	1.058	0.558	1.90	2.04
3	E3	Admin	8/8/2023 9:47	28.3	ng/μl	0.565	0.308	1.83	2.10

4	E4	Admin	8/8/2023 9:48	38.2	ng/μl	0.763	0.401	1.90	1.88
5	E5	Admin	8/8/2023 9:48	365.7	ng/μl	7.313	3.540	2.07	2.36
6	E6	Admin	8/8/2023 9:50	59.5	ng/μl	1.190	0.616	1.93	2.52
7	E7	Admin	8/8/2023 9:51	32.6	ng/μl	0.653	0.333	1.96	3.20
8	G10	Admin	8/8/2023 9:52	175.2	ng/μl	3.505	1.776	1.97	2.12
9	G11	Admin	8/8/2023 9:53	16.9	ng/μl	0.338	0.232	1.46	1.83
10	G12	Admin	8/8/2023 9:55	64.2	ng/μl	1.283	0.856	1.50	1.44
11	G13	Admin	8/8/2023 9:56	25.4	ng/μl	0.507	0.311	1.63	1.93
12	G14	Admin	8/8/2023 9:57	85.6	ng/μl	1.711	0.958	1.79	1.51
13	G15	Admin	8/8/2023 9:58	18.5	ng/μl	0.370	0.242	1.53	1.66
14	G16	Admin	8/8/2023 9:59	103.5	ng/μl	2.070	1.124	1.84	1.89
15	C1	Admin	8/8/2023 10:00	67.2	ng/μl	1.344	0.689	1.95	1.64
16	C1	Admin	8/8/2023 10:00	3.0	ng/μl	0.060	0.053	1.14	1.91
17	C2	Admin	8/8/2023 10:02	3.6	ng/μl	0.072	0.050	1.43	29.40
18	C3	Admin	8/8/2023 10:03	46.0	ng/μl	0.921	0.487	1.89	1.83
19	C4	Admin	8/8/2023 10:04	160.7	ng/μl	3.213	1.630	1.97	2.51
20	C5	Admin	8/8/2023 10:05	385.9	ng/μl	7.719	3.750	2.06	2.18

Tabla 2. Resultados de calidad del ADN de las muestras de R. Palmarum de Guayas y Esmeraldas, obtenidos por el NanoDrop.

Al igual que la tabla anterior estos datos corresponden a las muestras de *R. Palmarum* correspondientes a las provincias de Guayas-El Empalme (G) y Esmeraldas-Quinindé (E) y de GEA (C) se descartaron las muestras menores 10 en ácido nucleico y las muestras con un valor excesivo como 365.7 o 59.5 debido a que puede tratarse de suciedad en la muestra

y no eran un dato concluyente, también se debe tomar en cuenta el parámetro de 260/280 en donde el valor debe estar dentro de un rango de 1.8 a 2.0 para considerarse de buena calidad.

Las muestras que fueron consideradas como viables por medio del análisis por espectrofotometría a través del equipo NANODROP fueron sometidas a una PCR de la región COI (citocromo c oxidasa I) para analizar su presencia en las muestras de insectos de *R. palmarum*. El procedimiento de PCR para la región COX fue de 6 ciclos a 95 °C por 30 segundos, seguido de 1:00 minuto en 45°C para luego pasar por otro minuto a 72°C a lo que posteriormente se añadieron 36 ciclos de 30 segundos a 95°C para continuar con 40 segundos a 51°C y finalizar con un minuto a 72°C. Al finalizar el ciclo se mantuvo a una temperatura de 4°C hasta que las muestras sean retiradas. Una vez concluido el proceso del termociclador, se verificó la calidad de las muestras de ácidos nucleicos a través de un gel de agarosa al 1.5% sometido por 45 minutos en cámara electroforética a 80V con 120A.

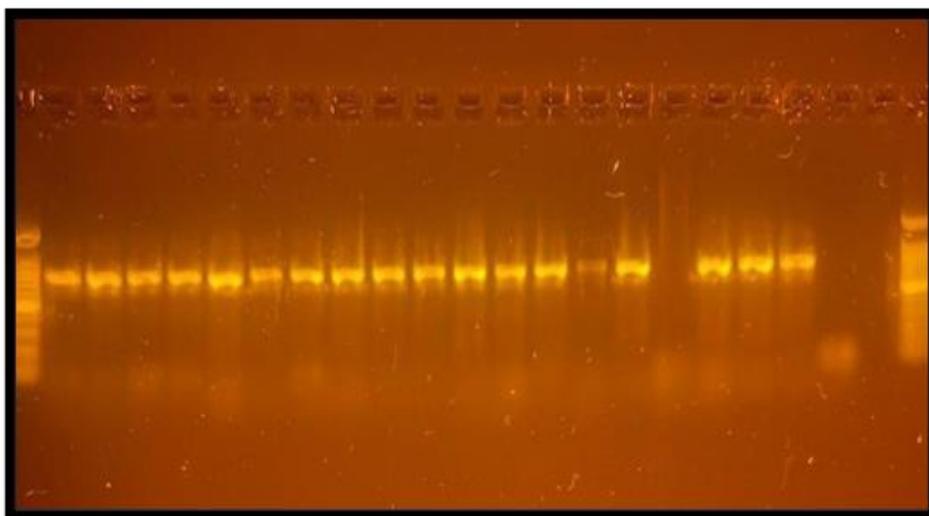


Figura 2: Gel de agarosa (1.5%) con los resultados de la PCR realizada con COI

Los resultados del gel demostraron que 17 de las 19 muestras que fueron analizadas demostraron una viabilidad aceptable; comprendidas entre los 200 y los 300 pares de bases, esto es tomado como el tamaño promedio de este tipo de segmentos que pueden ser

encontrados a través de COX1 en una muestra promedio de ácido nucleico procedente de células eucariotas, de forma particular de insectos.

Capítulo 3

3.1 Resultados

Los resultados de las muestras fueron analizados por nosotros como tesis y la tutora a cargo del proyecto integrador, con lo cual, luego podemos inferir si ayuda o no a poner en práctica a futuro un perfil genético con mayores muestras.

3.2 Análisis de Datos

Las muestras que se obtuvieron con una buena cantidad y calidad de ácidos nucleicos fueron enviadas a secuenciar en la Universidad de Las Américas (UDLA) en Quito, Ecuador. Fueron un total de 17 muestras entre Guayas, Los Ríos, Esmeraldas y GEA. La secuenciación de las muestras tuvo como resultado datos de electroferograma acerca de las secuencias secuenciadas.

Los datos de las secuencias fueron analizados en la herramienta Geneius 10.2.6, en donde se revisaron todos los electroferogramas descartando las secciones de una calidad pobre al igual que realizando arreglos individuales de cada secuencia según la similitud de su tamaño de onda. Una vez que todas las secuencias fueron arregladas, se procedió a realizar un alineamiento múltiple para detectar polimorfismos existentes entre las secuencias.

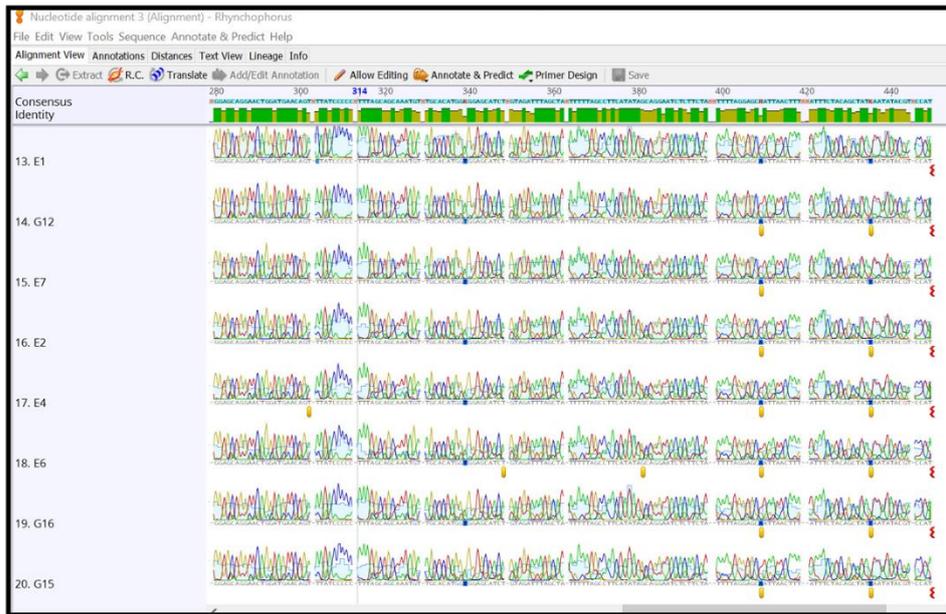


Figura 3: Secuencias de los genomas ya arreglados y alineados en el programa Geneius 10.2.6 para su verificación de polimorfismos.

Una vez concluido el alineamiento, se procedió a trabajar con la herramienta digital MEGA X en donde se seleccionó el modelo estadístico óptimo para realizar el árbol filogenético basándose en el AIC (Akaike Information Criterion) de menor dimensión que arrojaba a Tamura 3 con presencia de sitios invariantes como el modelo que mejor se ajustaba a los datos que se tenían y se determinó dicho modelo como el criterio bajo el cual se procedería a trabajar el árbol filogenético.

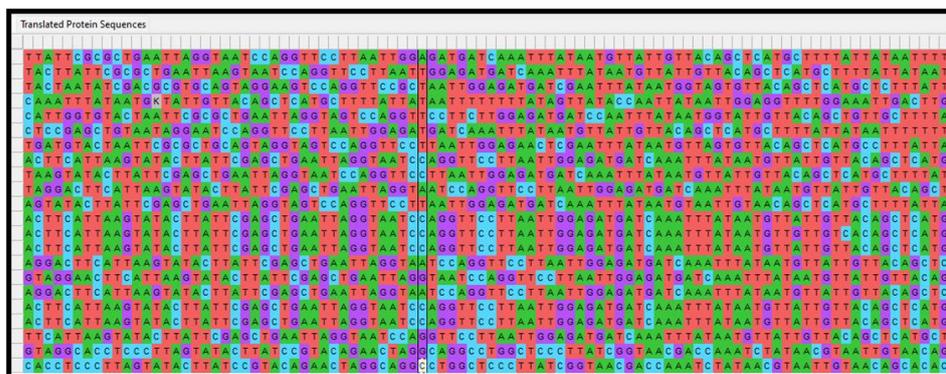


Figura 4: Secuencias alineadas en el programa MEGA X mientras se espera el resultado del AIC sobre el método estadístico que mejor pueda ser usado para elaborar su árbol filogenético

Por lo tanto, la elaboración del árbol filogenético se realizó con el test de Bootstrap usando Tamura 3 con sitios invariantes como el método estadístico y realizando 100 repeticiones.

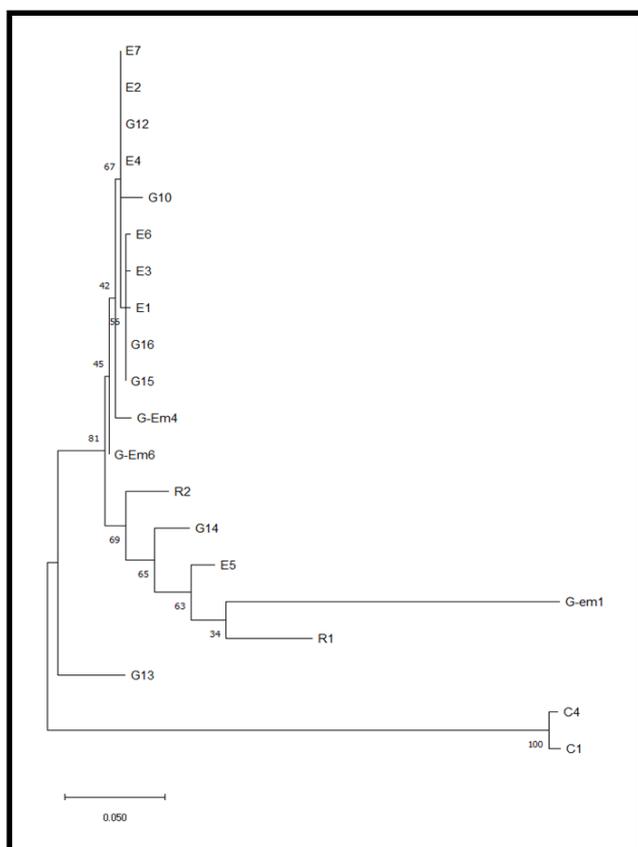


Imagen 5: Árbol filogenético de *R. palmarum* (picudo de palma)

El árbol filogenético resultó en una agrupación de muy pocas diferencias significativas de la mayoría de las secuencias estudiadas de *R. palmarum* y se comparan las diferencias de estas secuencias con el grupo control de *C. sordidus* en la elaboración; una de las ramas del árbol presenta una ligera diferencia comparada con las demás, sin embargo, se atribuye a esta diferencia a la calidad de las secuencias examinadas, pues únicamente 34 de las 100 repeticiones coinciden con el resultado final del árbol, teniendo en cuenta que un resultado

aceptable en el ensamblaje de un árbol filogenético es de 50 replicaciones o más para considerarse como algo sólido.

3.3 Análisis de Costos

Los costos del proyecto pueden ser divididos en las etapas de recolección, laboratorio y análisis de datos. Durante la etapa de recolección tuvo que ser financiada la captura de los especímenes de *R. palmarum* mediante los medios tradicionales; trampas de feromonas, a lo cual el costo de la trampa radica principalmente en lo que cuesten las feromonas; aproximadamente 3.55 USD por cada una de las 10 trampas adquiridas. Los costos de realizar una PCR radican principalmente en el precio del gen COX que se usará para analizar los ácidos nucleicos obtenidos. Durante el procedimiento del análisis de datos se debió tener en cuenta los costos de la secuenciación de las muestras en los laboratorios de la UDLA y en los permisos necesarios para el programa estadístico Geneius 10 que fue utilizado en este proyecto.

Capítulo 4

4.1 Conclusiones y recomendaciones

Gracias a la información verificada a través del árbol filogenético, se puede determinar que la variabilidad genética del picudo de palma (*R. palmarum*) es muy poco significativa entre las zonas geográficas de donde fueron recolectadas las muestras, además, este análisis permite inferir que las poblaciones del picudo de palma poseen un menor rango adaptativo ante un acción de mitigación, lo cual abre la posibilidad de elaborar y contribuir con planes de acción que sean específicos para la plaga sin un peligro considerable a la adaptación debido a la baja variabilidad del insecto estudiado, sin embargo este árbol filogenético elaborado debe de ser pulido con una mayor cantidad de muestras analizadas y una mayor cobertura geográfica.

4.1.1 Conclusiones

La variabilidad genética del picudo de palma fue de un valor poco significativo, indicando que las diferencias genotípicas entre los individuos de la especie analizadas son muy pequeñas entre sí.

Las secuencias extraídas de las muestras proporcionadas y obtenidas permitieron elaborar, a través de programas de bioestadística, un árbol filogenético con sus respectivas ramas y raíz que permiten asegurar la baja variabilidad que presentan las muestras

El árbol filogenético que fue generado permite inferir que la capacidad adaptativa del picudo de palma es muy baja debido a la falta de diversidad genética que existen en los genes de las muestras de las poblaciones analizadas.

4.1.2 Recomendaciones

Para la elaboración de un perfil genético más completo de *R. palmarum*, es sugerible usar cebares adicionales enfocados en insectos de la familia de los *Curculionidae* para obtener información mucho más sólida y en mayor cantidad para la toma de decisiones importantes de

acciones de mitigación, además, también se podría realizar una mayor cantidad de análisis a los cultivos de palma aceitera, al igual que realizar estudios en nuevas áreas que permitan definir de mejor forma el área geográfica en donde el picudo de palma posee la extremadamente baja variabilidad.

Referencias

- Figueroa, F. R. (2017). Incidencia, progresión e intensidad de la Pudrición del Cogollo . *Artículo de Investigación, Centro Agrícola* , Ctro. Agr. vol.44 no.1 Santa Clara.
- Martinez, G. (2010). Pudrición del Cogollo, Marchitez sorpresiva . *Aritculo Cientifico* .
- Moisés Ramírez, Edgar Benítez . (Julio de 2010). *CropLife*. Obtenido de <https://www.croplifela.org/es/plagas/listado-de-plagas/pudricion-del-cogollo#:~:text=%C2%BFQu%C3%A9%20es%20la%20enfermedad%20pudrici%C3%B3n,formaron%20antes%20de%20la%20infecci%C3%B3n.>
- Moya, R. C. (2019). Manejo del Picudo de Palma . *Artículo Cientifico* , Pg 39. Colombia.
- Martinez, G. (2010). Pudrición del cogollo, Marchitez sorpresiva, Anillo rojo y Marchitez letal en la palma de aceite en América. Bogotá, Colombia. Extraído de <https://publicaciones.fedepalma.org/index.php/palmas/article/view/1471>
- Márquez, J. (2005). Técnicas de colecta y preservación de Insectos. Boletín Sociedad Entomológica Aragonesa. Extraído de <http://sea-entomologia.org/PDF/GeneralInsectorum/GE-0056.pdf>
- Aldana, R. (2015). El anillo rojo en la palma de aceite. Bogotá, Colombia.
- Barreiro, F (2018). Eficacia de la feromona sintética sola y asociada con atrayentes naturales para captura del picudo negro. UTEQ. Extraído de <http://repositorio.uteq.edu.ec/handle/43000/3309>
- Gobierno Ecuatoriano. (2017) Informe sobre el sector palmicultor ecuatoriano. Quito, Ecuador. Extraído de <https://www.produccion.gob.ec/wp-content/uploads/2019/06/informe-palma-esp%C3%B1ol-.pdf>