

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

ESCUELA PROFESIONAL DE AGRONOMIA



Exploración e Identificación molecular de nematodos entomopatógenos en áreas representativas de bosques de algarrobo (*Neltuma* spp.) en Tumbes

TESIS

PARA OPTAR EL TÍTULO DE INGENIERO AGRÓNOMO

AUTOR

Bach. Joel Michel Riojas Gonzales

TUMBES, 2025

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

ESCUELA PROFESIONAL DE AGRONOMIA



Exploración e Identificación molecular de nematodos entomopatógenos en áreas representativas de bosques de algarrobo (*Neltuma* spp.) en Tumbes

Tesis aprobada en forma y estilo por:

Dr. Faustino Sanjinez Salazar (presidente)

Dr. Jorge Oswaldo Echevarría Flores (secretario).....

Dr. Eber Leopoldo Herrera Palacios (vocal).....

TUMBES, 2025

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES

ESCUELA PROFESIONAL DE AGRONOMÍA



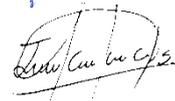
Exploración e Identificación molecular de nematodos entomopatógenos en áreas representativas de bosques de algarrobo (*Neltuma* spp.) en Tumbes

Los autores declaramos que la tesis es original en su contenido y forma:

Bach. Joel Michel Riojas Gonzales (autor) 

Dr. Pedro Saúl Castillo Carrillo (asesor)..... 

ing. Rosa Emelda Cornejo Hidalgo (co-asesor) 

MSc. Jose Stanly Cordova Campos (co-asesor) 

TUMBES, 2025



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
EX FUNDO FISCAL LA CRUZ-CAMPUS UNIVERSITARIO
SECRETARIA ACADÉMICA**



ANEXO VIII

"Año del Bicentenario, de la consolidación de nuestra Independencia, y de la conmemoración de las heroicas batallas de Junín y Ayacucho"

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS VIRTUAL

En Tumbes, a los diecinueve días del mes de diciembre de dos mil veinticuatro, siendo las veinte horas con quince minutos de forma virtual y por la plataforma Google meet, se reunieron el Jurado Calificador, designado con Resolución N° 108-2022/UNTUMBES-VRACAD-FCA-D: **Dr. Faustino Sanjinez Salazar** (Presidente), **Dr. Jorge Oswaldo Echevarría Flores** (Secretario), **Dr. Eber Leopoldo Herrera Palacios** (Vocal), reconociendo en la misma resolución además, al **Dr. Pedro Saúl Castillo Carrillo**, como **Asesor**, y como co-asesores a la **Mag. Rosa Emelda Cornejo Hidalgo** y al **Mag. José Stanly Córdova Campos**, se procedió a evaluar, calificar y deliberar la sustentación de la tesis, **Exploración e identificación molecular de nematodos entomopatógenos en áreas representativas de bosques de algarrobo (*Neltuma spp.*) en Tumbes**, para optar el Título Profesional de Ingeniero Agrónomo, presentado por el **Bach. Riojas Gonzales Joel Michel**. Concluida la sustentación y absueltas las preguntas por parte del sustentante y después de la deliberación, el jurado según el artículo N° 75 del Reglamento de Tesis para Pregrado y Posgrado de la Universidad Nacional de Tumbes, declara al: **Bach. RIOJAS GONZALES JOEL MICHEL aprobado**, por **unanimidad**, con el calificativo de **muy bueno**.

Se hace conocer al sustentante, que deberá levantar las observaciones finales hechas al informe final de tesis, que el jurado le indica, de ser el caso.

En consecuencia, queda **APTO** para continuar con los trámites correspondientes a la obtención del título profesional de Ingeniero Agrónomo, de conformidad con lo estipulado en la Ley Universitaria N° 30220, el Estatuto, Reglamento General de Grados y Títulos, y Reglamento de Tesis de la Universidad Nacional de Tumbes. Siendo las veintiún horas y doce minutos del mismo día, se dio por concluida la ceremonia académica, procediendo a firmar el acta en presencia del público asistente.

Tumbes, 19 de diciembre del año 2024.

Dr. FAUSTINO SANJINEZ SALAZAR DNI: 00361079 CODIGO ORCID: 0000-0001-7032-8122 Presidente	Dr. JORGE OSWALDO ECHEVARRÍA FLORES DNI: 02645807 CODIGO ORCID: 0000-0002-8387-6168 Secretario
Dr. EBER LEOPOLDO HERRERA PALACIOS DNI: 42458218 CODIGO ORCID: 0000-0002-7255-9087 Vocal	

C.C. - JURADOS (03) -ASESOR Y(CO)-INTERESADO-ARCHIVO (Decanato)
S. acad.

Castillo Carrillo Pedro Saúl

Código Orcid : 0000000202651047



TESIS DE NEMATODOS JOEL RIOJAS HOY 14.docx

por Pedro Castillo Carrillo

Fecha de entrega: 14-ene-2025 12:43p.m. (UTC-0500)

Identificador de la entrega: 2564128872

Nombre del archivo: TESIS_DE_NEMATODOS_JOEL_RIOJAS_HOY_14.docx (9.58M)

Total de palabras: 15043

Total de caracteres: 89938

Castillo Carrillo Pedro Saúl

Código Orcid : 0000000202651047



TESIS DE NEMATODOS JOEL RIOJAS HOY 14.docx

INFORME DE ORIGINALIDAD

Castillo Carrillo Pedro Saúl

Código Orcid : 0000000202551047

20%	20%	2%	%
INDICE DE SIMILITUD	FUENTES DE INTERNET	PUBLICACIONES	TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	repositorio.lamolina.edu.pe Fuente de Internet	4%
2	repositorio.unprg.edu.pe Fuente de Internet	3%
3	riaa.uaem.mx Fuente de Internet	2%
4	www.researchgate.net Fuente de Internet	1%
5	repositorio.untumbes.edu.pe Fuente de Internet	1%
6	www.revistas.unitru.edu.pe Fuente de Internet	1%
7	repositorio.uncp.edu.pe Fuente de Internet	1%
8	alicia.concytec.gob.pe Fuente de Internet	1%
9	repositorio.una.edu.ni Fuente de Internet	1%

10	www.scielo.org.pe Fuente de Internet	Castillo Carrillo Pedro Saúl Codigo Orcid : 0000000202651047		<1%
11	repositorio.cinvestav.mx Fuente de Internet			<1%
12	idoc.pub Fuente de Internet			<1%
13	dspace.unitru.edu.pe Fuente de Internet			<1%
14	sedici.unlp.edu.ar Fuente de Internet			<1%
15	pt.scribd.com Fuente de Internet			<1%
16	doczz.es Fuente de Internet			<1%
17	dspace.utb.edu.ec Fuente de Internet			<1%
18	docslib.org Fuente de Internet			<1%
19	Albrecht M. Koppenhöfer, David I. Shapiro-Ilan, Ivan Hiltbold. "Entomopathogenic Nematodes in Sustainable Food Production", <i>Frontiers in Sustainable Food Systems</i> , 2020 Publicación			<1%
20	repositorio.unal.edu.co Fuente de Internet			<1%

21	www.scielo.org.co Fuente de Internet	Castillo Carrillo Pedro Saúl Codigo Orcid : 0000000202651047		<1%
22	repositorio.inia.gob.pe Fuente de Internet			<1%
23	repositorio.serfor.gob.pe Fuente de Internet			<1%
24	repository.usta.edu.co Fuente de Internet			<1%
25	revistas.ucv.edu.pe Fuente de Internet			<1%
26	aulavirtual.agro.unlp.edu.ar Fuente de Internet			<1%
27	tesis.ipn.mx Fuente de Internet			<1%
28	docplayer.es Fuente de Internet			<1%
29	www.coursehero.com Fuente de Internet			<1%
30	8cfe.congresoforestal.es Fuente de Internet			<1%
31	azdoc.site Fuente de Internet			<1%
32	ufdcimages.uflib.ufl.edu Fuente de Internet			<1%

33	www.mef.gob.pe Fuente de Internet	Castillo Carrillo Pedro Saúl Codigo Orcid : 0000000202651047		<1%
34	www.repositorio.usac.edu.gt Fuente de Internet			<1%
35	myslide.es Fuente de Internet			<1%
36	revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe Fuente de Internet			<1%
37	bdigital.unal.edu.co Fuente de Internet			<1%
38	patents.google.com Fuente de Internet			<1%
39	www.mdpi.com Fuente de Internet			<1%
40	reliefweb.int Fuente de Internet			<1%

Excluir citas Activo Excluir coincidencias < 15 words
Excluir bibliografía Activo

Declaración de Originalidad

Yo, Joel Michel Riojas Gonzales, declaro que el presente trabajo de investigación, titulado “Exploración e Identificación molecular de nematodos entomopatógenos en áreas representativas de bosques de algarrobo (*Neltuma* spp.) en Tumbes”, es original y ha sido presentado con el fin de obtener el título de ingeniero Agrónomo. De este modo, aseguro que los resultados presentados no han sido tomados de otros documentos o investigaciones. Por ello, toda información ajena utilizada para complementar y debatir la tesis ha sido correctamente citada y referenciada, respetando los derechos de autor. En consecuencia, este trabajo es el resultado del esfuerzo conjunto entre mi persona y mis asesores en cuanto a su elaboración y redacción para su aprobación.

Br. Joel Michel Riojas Gonzales

DEDICATORIA

Primeramente, dedico este logro a Dios, quien me permite estar con vida y me bendice con una hermosa familia. Él es quien me brinda inteligencia y sabiduría en todo momento, así como la fortaleza para seguir adelante en esta investigación y superar cualquier obstáculo. Siempre con la frente en alto y con humildad, dedico todos mis esfuerzos a mi formación como profesional."

Desde lo más profundo de mi amor y cariño quiero agradecer a Mis padres, Maribel Gonzales García y José Riojas Riojas dedicándoles este logro ya que siempre han estado cada día conmigo, gracias siempre a ustedes por apoyarme en los buenos y malos momentos de mi vida, formándome para ser un buen profesional, dándome todo su amor, siempre estaré agradecido por el enorme apoyo de ustedes mis amados padres.

A mis hermanos Carlos, Marita, Andrea, Ricardo, Josué y Mathías, que siempre me dieron consejos para seguir esforzándome, compartiendo las experiencias de toda mi carrera, me han visto luchar, y seguir venciendo los obstáculos, para poder compartir cada alegría con ustedes durante mi etapa profesional de mi vida, siempre han estado a mi lado apoyándome, de todo corazón gracias.

Dedicarle este logro a mi esposa Marycielo Madrid Ludeñas, que siempre está conmigo apoyándome, dándome aliento para seguir esforzándome y poder cumplir nuestros sueños como profesionales, a mi hija Alaia Cataleya, por darme fuerzas para poder continuar en este proyecto y brindarle un mejor futuro.

AGRADECIMIENTO

En primer lugar, agradezco al todopoderoso y misericordioso Dios por darme el privilegio de cumplir uno de mis más anhelados sueños. Él es quien me brinda inteligencia, guía y cuidado en cada paso que doy, haciendo realidad este sueño tan especial para mí. Siempre estaré profundamente agradecido por sus bendiciones, por permitirme llegar hasta aquí y por cada día de vida que me regala.

En segundo lugar, expreso mi más sincero agradecimiento a mi mentor, el Dr. Pedro Saúl Castillo Carrillo, por su invaluable apoyo como docente. Su visión crítica fue fundamental para la realización de esta investigación, así como su rectitud profesional, sus consejos, conocimientos, experiencia, paciencia y motivación, los cuales contribuyeron significativamente a mi formación como profesional y a alcanzar nuevas metas

Agradezco a mis Co-asesores M. Sc. José Stanly Córdova Campos y M. Sc. Rosa Emelda Cornejo Hidalgo, por su gran dedicación a este trabajo, por los consejos, conocimientos y enorme esfuerzo que me brindaron durante todo el proceso de investigación.

Agradezco al Ing. César Augusto Mogollón Farías por el apoyo que me brindó para poder concretar esta meta.

A mi esposa, Marycielo Madrid, por su apoyo incondicional, siempre dándome fuerza y mucho aliento para seguir adelante en el camino correcto. ¡Gracias a ustedes!

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
I. INTRODUCCIÓN.....	16
II. Antecedentes.....	18
A nivel Internacional.....	18
III. MARCO TEORICO	22
3.1. El algarrobo y sus características.	22
3.1.2. Características de <i>N. pallida</i>	23
3.1.3. Importancia económica y ecológica de <i>N. pallida</i> en el norte del Perú	23
3.2.1. Nematodos entomopatógenos (NEPs)	25
3.2.2. NEP(s) como agentes de biocontrol de plagas agrícolas	31
3.2.3. Caracterización molecular de NEPs	34
IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....	36
4.1. Materiales	36
4.2. Metodología.....	36
4.2.1. Fase de campo.	36
4.2.2. Toma de muestra de suelo en los bosques de algarrobo en la provincia de Tumbes.	38
4.2.3. Fase de laboratorio	40
4.2.4. Crianza de la polilla de la cera <i>G. mellonella</i>	40

4.2.8. Porcentaje de infección y mortalidad de las larvas de <i>G. mellonella</i> causado por NEP	48
4.2.9. Conservación y mantenimiento de las cepas purificadas	48
4.2.10. Desinfección de larvas de <i>G. mellonella</i> que contenían NEPs Puros 48	
4.3. Extracción de ADN, amplificación por PCR, Secuenciación y Análisis Bioinformático	49
4.3.1. Extracción de ADN.....	49
4.3.2. Ampliación por la técnica de reacción en cadena en polimerasa (PCR). 49	
4.3.3. Electroforesis en gel de poliacrilamida	50
4.3.4 Secuenciación y Análisis Bioinformático	50
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	51
VI. CONCLUSIONES	60
VII. RECOMENDACIONES.....	62
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63
ANEXOS.....	69

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Ubicación geográfica de las muestras de los bosques de algarrobo estudiadas e la provincia de Tumbes.	38
Tabla 02. Aislamiento de nematodos entomopatógenos en las localidades de la provincia de Tumbes.	52
Tabla 03. Toma de datos de los 10 puntos de muestreo de NEPs.....	53
Tabla 04. Tamaño de secuencias amplificadas de NEPs purificados....	57
Tabla 05. Identificación molecular de nematodos entomopatógenos de los bosques de algarrobo de Tumbes.....	60

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Región ITS del rDNA, donde se muestra la imagen de las regiones ITS1, 5.8, ITS2 y 28S-LSU. Así como la región D2D3 comprendida en el 28S. Fuente Ortega 2022.....	35
Figura 2. Mapa de Lugares de recolección de las muestras de suelo en los bosques de algarrobo en la región de Tumbes.....	37
Figura 3. Toma de muestras en bosques de algarrobo, A. Selección de los bosques de algarrobo, B. Registro de coordenadas, C. Toma de muestras de suelo, D. Rotulado y acondicionamiento para el transporte de las muestras de suelo.	39
Figura 4. Crianza de larvas de <i>G. mellonella</i> , A. Sistema de crianza del museo de entomología de la UNT. B. Preparación de la dieta nutritiva para la crianza de las larvas de <i>G. mellonella</i> . C. Selección de larvas del V estadio de <i>G. mellonella</i> para capturar nematodos entomopatógenos. .	41
Figura 5. Muestras de suelo con larvas de <i>G. mellonella</i> sanas para infección por NEPs.	41
Figura 6. Aislamiento y conservación de larvas de <i>G. mellonella</i> A. Larva de <i>G. mellonella</i> infectada por nematodos entomopatógenos, B. Toma de alícuota para observar mediante microscopio óptico los NEPs. C. Replicación de trampas White para multiplicación de NEPs. D. almacenamiento de larvas infectadas en el laboratorio a temperatura adecuada. 42	42
Figura 7. Observación en microscopio de nematodos entomopatógenos aislados de los bosques del algarrobo.	43
Figura 8. <i>Cervidellus vexilliger</i> (Cepa 02) NEPs de la localidad de Cerro Blanco. A. Región posterior de la cabeza, B. Región anterior de la cola...	44

Figura 9. <i>Heterorhabditis bacteriophaga</i> (cepa 04) de nematodos entomopatógenos de la localidad de Pampas De Hospital. A. Región posterior de la cabeza, B. Región anterior de la cola.	45
Figura 10. <i>Heterorhabditis indica</i> (cepa 05) de nematodos entomopatógenos de la localidad de Garbanzal. Región posterior de la cabeza, B. Región anterior de la cola.....	47
Figura 11. Cepa 06 de nematodos entomopatógenos de la localidad de Corrales (Facultad de Ciencias Agrarias A. Región posterior de la cabeza, B. Región anterior de la cola.	47
Figura 12. Extracción del ADNg de las cepas de nematodos, en la etapa de centrifugación para la purificación del ADNg.....	49
Figura 13. Amplificación del ADNg de las cepas de nematodos mediante la técnica de PCR.	50
Figura 14. Porcentaje de las muestras con ausencia y presencia nematodos entomopatógeno, 1. Muestras positivas (Color violeta), 2. Muestras negativas (color amarillo).....	51
Figura 15. Porcentajes de infección por nematodos en las diferentes zonas muestreados en los bosques de algarrobo de Tumbes.	54
Figura 16. Bandas de las amplificaciones del ADN en gel de electroforesis. Carril 1 y 8 (Sin presencia de banda amplificada), carril 2 al 6 (hay presencia de bandas), carril 7 (marcador de peso molecular).	55
Figura 17. Cepa 02. Vista bajo un microscopio de nematodo a 100 aumentos, identificado como <i>Cervidellus vexilliger</i>	58
Figura 18. Cepa 04. Vista bajo un microscopio del nematodo a 100 aumentos, identificado como <i>Heterorhabditis bacteriophora</i>	59
Figura 19. Cepa 05, vista bajo un microscopio del nematodo a 100 aumentos , identificado como <i>Heterorhabditis indica</i>	59

Figura 20. Cepa 06. Vista bajo un microscopio del nematodo a 100 aumentos, identificado como *Heterorhabditis indica* 60

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Procedimiento de extracción de ADN en nematodos entomopatógenos del suelo	69
Anexo 2. Extracción de ADN de nematodos con el Kit pawersoil.....	70
Anexo 3. Recolección de huevos de <i>Galleria mellonella</i> , en la Universidad Nacional de Tumbes, facultad de Ciencias Agrarias.....	71
Anexo 4. Colocación de larvas sanas en trampas White	71
Anexo 5. Separación de larvas de <i>Galleria mellonella</i> sanas y con síntomas de infección por NEPs.	72
Anexo 6. Infección de larvas de <i>Galleria mellonella</i> por NEPs.....	72
Anexo 7. Curiosidades en infección de NEPs , en otras larvas , como <i>Metamasius hemipterus</i> , <i>Hermetia illucens</i>	73
Anexo 8. Multiplicación de NEPs.	73
Anexo 9. Trituración de larvas de NEPs, para análisis de extracción molecular. 74	
Anexo 10. Extracción de muestra de NEPs , triturado.	74
Anexo 11. Depósito de ADN en tubos spin filter.	75
Anexo 12. Vortexado de muestra de ADN , de NEPs.	75
Anexo 13. Centrifugado de los tubos a temperatura ambiente a 10,000 xg por 30 segundos.	76
Anexo 14. Análisis de las muestras de ADN.....	76
Anexo 15. Secuencias de adn de nematodos entomopatógenos.....	77

RESUMEN

Los nematodos entomopatógenos (NEPs) se utilizan como agentes potenciales de control biológico para numerosas plagas subterráneas. Según estudios sobre su distribución, estos organismos se encuentran en una amplia variedad de hábitats alrededor del mundo. El presente estudio tuvo como objetivo aislar e identificar NEPs a partir de muestras de suelo provenientes de bosques de algarrobo en el bosque seco de la región Tumbes, Perú. Se recolectaron muestras de suelo de manera aleatoria en 10 zonas de la región con presencia de bosques de algarrobo. Para la obtención de los NEPs, se emplearon larvas de *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) como organismos trampa. Las larvas infectadas se utilizaron para multiplicar, almacenar y posteriormente identificar molecularmente los nematodos mediante la secuenciación del gen ADNr 18S a partir de cepas puras. El estudio logró aislar cuatro cepas de NEPs: *Cervidellus vexilliger* (cepa 02N), *Heterorhabditis bacteriophora* (cepa 04N) y *Heterorhabditis indica* (cepas 05N y 06N), con porcentajes de identidad superiores al 90%. Estos resultados representan el primer reporte de cepas nativas de NEPs en la región, identificadas molecularmente, y que demuestran patogenicidad contra larvas de insectos. Las cepas nativas de NEPs identificadas deben ser evaluadas más a fondo como agentes potenciales de control biológico en el manejo integrado de plagas en la región Tumbes.

Palabras clave: nematodos entomopatógenos, 18S ARNr, algarrobo,

ABSTRACT

Entomopathogenic nematodes (EPNs) are used as potential biological control agents for numerous underground pests. According to studies on their distribution, these organisms are found in a wide variety of habitats around the world. The present study aimed to isolate and identify NEPs from soil samples from carob forests in the dry forest of the Tumbes region, Peru. Soil samples were collected randomly in 10 areas of the region with the presence of carob forests. To obtain the NEPs, *Galleria mellonella* larvae (Lepidoptera: Pyralidae) were used as trap organisms. The infected larvae were used to multiply, store and subsequently molecularly identify the nematodes by sequencing the 18S rDNA gene from pure strains. The study managed to isolate four strains of NEPs: *Cervidellus vexilliger* (strain 02N), *Heterorhabditis bacteriophora* (strain 04N) and *Heterorhabditis indica* (strains 05N and 06N), with identity percentages greater than 90%. These results represent the first report of native strains of NEPs in the region, identified molecularly, and that demonstrate pathogenicity against insect larvae. The identified native NEP strains should be further evaluated as potential biological control agents in integrated pest management in the Tumbes region.

Keywords: Entomopathogenic nematodes, 18S rRNA, ITS, *carob tree*.