

	GESTIÓN DE RECURSOS Y SERVICIOS BIBLIOTECARIOS	Código	FO-SB-12/v0
	ESQUEMA HOJA DE RESUMEN	Página	1/86

RESUMEN TRABAJO DE GRADO

AUTOR(ES): NOMBRES Y APELLIDOS COMPLETOS

NOMBRE(S): GINNA ALEJANDRA APELLIDOS: VILLALOBOS GUZMAN

NOMBRE(S): _____ APELLIDOS: _____

NOMBRE(S): _____ APELLIDOS: _____

FACULTAD: CIENCIAS AGRARIAS Y DEL AMBIENTE

PLAN DE ESTUDIOS: INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA

DIRECTOR:

NOMBRE(S): JOSE LUIS APELLIDOS: HERNANDEZ MENDOZA

NOMBRE(S): _____ APELLIDOS: _____

TÍTULO DEL TRABAJO (TESIS): EFECTO DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS DEL ORÉGANO (*Lippia graveolens* Kunth s.l.) EN FITOPATÓGENOS DEL CULTIVO DEL ARROZ (*Oryza sativa*)

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue aislar e identificar morfológica y molecularmente hongos fitopatógenos del arroz y evaluar el potencial de aceites esenciales del orégano *Lippia graveolens* Kunth s.l. (Orégano Mexicano) como un control fitoquímico. Los fitopatógenos fueron aislados de hoja de arroz, se purificaron. Se identificaron por morfología y posteriormente por métodos moleculares. Para ello se produjo biomasa del hongo y se realizó extracción de Acido desoxirribonucleico (ADN) y luego una PCR utilizando los oligonucleótidos de las regiones de los espaciadores internos transcritos (ITS) ITS15'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' e ITS4 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' (F y R) y se envió para secuenciar, como resultados se identificaron dos hongos como *Bipolaris rostrata* y *Bipolaris cynodontis*.

PALABRAS CLAVE: extractos etanolicos, oregano, *Lippia graveolens* Kunth s.l., Fitopatógenos, cultivo del arroz.

CARACTERÍSTICAS:

PÁGINAS: 86 PLANOS: ____ ILUSTRACIONES: ____ CD ROOM: ____

Elaboró		Revisó		Aprobó	
Equipo Operativo del Proceso		Comité de Calidad		Comité de Calidad	
Fecha	24/10/2014	Fecha	05/12/2014	Fecha	05/12/2014

EFECTO DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS DEL ORÉGANO (*Lippia graveolens* Kunth
s.l.) EN FITOPATÓGENOS DEL CULTIVO DEL ARROZ (*Oryza sativa*)

GINNA ALEJANDRA VILLALOBOS GUZMAN

UNIVERSIDAD FRANCISCO DE PAULA SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS Y DEL AMBIENTE
PLAN DE ESTUDIOS DE INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA
SAN JOSÉ DE CÚCUTA

2018

EFECTO DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS DEL ORÉGANO (*Lippia graveolens* Kunth
s.l.) EN FITOPATÓGENOS DEL CULTIVO DEL ARROZ (*Oryza sativa*)

GINNA ALEJANDRA VILLALOBOS GUZMAN

Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de
Ingeniero Biotecnológico

Director

JOSE LUIS HERNANDEZ MENDOZA

UNIVERSIDAD FRANCISCO DE PAULA SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS Y DEL AMBIENTE
PLAN DE ESTUDIOS DE INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA
SAN JOSÉ DE CÚCUTA

2018

ACTA DE SUSTENTACION DE UN TRABAJO DE GRADO

FECHA: 16 DE MARZO DE 2018

HORA: 08:00 AM

LUGAR: Oficina del Programa

PLAN DE ESTUDIOS: INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA

TITULO: "EFECTO DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS DEL ORÉGANO (LIPPIA GRAVEOLENS KUNTH S.L.) EN FITOPATÓGENOS DEL CULTIVO DEL ARROZ (ORYZA SATIVA)."

MODALIDAD: INVESTIGACIÓN

JURADO: ADRIANA ZULAY ARGUELLO NAVARRO
LILIAN TRINIDAD RAMIREZ
JUAN CARLOS RAMIREZ BERMUDEZ

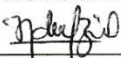
ENTIDAD: (CBG-IPN).

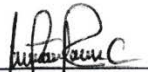
DIRECTOR: JOSE LUIS HERNANDEZ MENDOZA

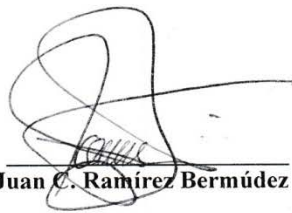
NOMBRE DE LOS ESTUDIANTE	CODIGO	CALIFICACION
GINNA ALEJANDRA VILLALOBOS GUZMAN	1610831	4.2

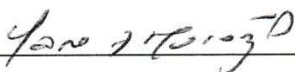
OBSERVACIONES: APROBADO

FIRMA DE LOS JURADOS


Adriana Z. Arguello Navarro


Lilian Trinidad Ramirez


Juan C. Ramirez Bermúdez

Vo.Bo Coordinador Comité Curricular 

Agradecimientos

La autora expresa sus agradecimientos a:

Primero ante todo a mi DIOS por permitirme estar en otro país, para poder seguir creciendo, a mi familia en especial a mi hermana Katherine Villalobos que siempre tengo su apoyo incondicionalmente, ante situaciones difíciles es la que me da fuerza a seguir por ella y por mi angelito Ángel David Villalobos; a todas mis amigas sean del CBG o de mi trabajo en McDonald's en especial mis mejores amigas de casa Roció Mendoza, Paulina Guel García, Paula Elena Fuentes, por apoyarme estar aquí por tolerar mi mal carácter por explicarme lo que no entiendo y por hacerme entender muchas cosas; he crecido al lado de ellas y puedo decir que soy otra persona porque estoy en otra cultura pero aun teniendo, permaneciendo a mis tradiciones.

Al Centro de Biotecnología Genómica del Instituto Politécnico Nacional, por facilitarme el uso de las instalaciones y el manejo del equipo.

A todos los maestros del Laboratorio de Biotecnología Experimental por su colaboración y capacitación ante toda la parte experimental, al Doctor José Luis Hernández Mendoza por toda su paciencia, dedicación mediante la ayuda ante mis prácticas y trabajo de investigación.

Resumen

El arroz es uno de los cultivos de mayor demanda en el mundo. En México se cultiva en varias regiones, centrandose este trabajo en la región sur del estado Tamaulipas donde se obtienen buenas producciones. Este cultivo atrae varios problemas con fitopatógenos; entre ellos los ataques por hongos son los principales. El control químico es el que más se emplea como un manejo integrado de cultivos ante esto es necesario buscar alternativas como un controlador fitoquímico que no cause daños a las plantas ni a las producciones a comercializar. Los aceites esenciales del orégano se caracterizan por presentar olor, sabor y muchas veces propiedades antifúngica, estas sustancias son producidas por plantas aromáticas. El objetivo de este trabajo fue aislar e identificar morfológica y molecularmente hongos fitopatógenos del arroz y evaluar el potencial de aceites esenciales del orégano *Lippia graveolens* **Kunth** s.l. (Orégano Mexicano) como un control fitoquímico. Los fitopatógenos fueron aislados de hoja de arroz, se purificaron. Se identificaron por morfología y posteriormente por métodos moleculares. Para ello se produjo biomasa del hongo y se realizó extracción de Acido desoxirribonucleico (ADN) y luego una PCR utilizando los oligonucleótidos de las regiones de los espaciadores internos transcritos (ITS) ITS15'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' e ITS4 5'- TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' (F y R) y se envió para secuenciar, como resultados se identificaron dos hongos como *Bipolaris rostrata* y *Bipolaris cynodontis*. Por otra parte, al realizar análisis por HPLC (Hewlett Packard System ® Modelo 1100) por columna empleada fue RP- C18, 150 mm de largo y 4,6 mm de diámetro interno; el detector se estableció en una longitud de onda de 280 nm, con un volumen de inyección de 20 µl, el flujo 1,0 ml/min de funcionamiento fue de 15 minutos, lo cual se identificó que los oréganos corresponden al quimiotipo carvacrol, debido a ello se realizó una extracción de aceites esenciales del orégano generando una variabilidad. En este análisis el timol

no fue detectado, es decir, está ausente. Al realizar las pruebas de antagonismo se determinó que los aceites inhiben el crecimiento de los hongos, lo anterior se confirma el uso potencial del aceite esencial de *Lippia graveolens* **Kunth** *s.l.* genera una alternativa como un control ante enfermedades en las plantas, representando la posibilidad de incorporarlo en un manejo integrado de los cultivos, debido a su bajo costo y el menor impacto en el ambiente, dándoles un valor agregado.

Abstract

Rice is one of the most demanded crops in the world. In Mexico it is grown in several regions, focusing this work in the southern region of the state of Tamaulipas where good production is obtained. This crop attracts several problems with phytopathogens; among them fungal attacks are the main ones. Chemical control is the one that is most used as an integrated crop management before this is necessary to look for alternatives such as a phytochemical controller that does not cause damage to the plants or the productions to be commercialized. The essential oils of oregano are characterized by odor, taste and often antifungal properties, these substances are produced by aromatic plants. The objective of this work was to isolate and identify morphologically and molecularly phytopathogenic fungi of rice and evaluates the potential of essential oils of oregano *Lippia graveolens* Kunth s.l. (Mexican Oregano) as a phytochemical control. The phytopathogens were isolated from rice leaf, they were purified. They were identified by morphology and later by molecular methods. For this biomass of the fungus was produced and extraction of deoxyribonucleic acid (DNA) was carried out and then a PCR using the oligonucleotides of the regions of the transcribed internal spacers (ITS) ITS15'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' and ITS4 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' (F and R) and sent to sequence, as results were identified two fungi such as *Bipolaris rostrata* and *Bipolaris cynodontis*. On the other hand, when performing HPLC (Hewlett Packard System ® Model 1100) per column used was RP-C18, 150 mm long and 4.6 mm internal diameter; the detector was set at a wavelength of 280 nm, with an injection volume of 20 µL, the flow 1.0 ml / min of operation was 15 minutes, which was identified that the oreganos correspond to the carvacrol chemotype, due to this an extraction of essential oils of the oregano was made generating a variability. In this analysis, thymol was not detected, that is, it is absent. When performing the

antagonism tests it was determined that the oils inhibit the growth of the fungi, the above confirms the potential use of the essential oil of *Lippia graveolens* Kunth s.l. generates an alternative as a control against diseases in plants, representing the possibility of incorporating it in an integrated management of crops, due to its low cost and the least impact on the environment, giving them an added value.

Contenido

	pág.
Introducción	18
1. Descripción del Problema	20
1.1 Planteamiento del Problema	20
1.2 Formulación el Problema	20
1.3 Justificación	20
1.4 Objetivos	21
1.4.1 Objetivo general	21
1.4.2 Objetivos específicos	21
1.5 Alcances y Limitaciones	21
1.5.1 Alcances	21
1.5.2 Limitaciones	22
1.6 Delimitaciones	22
1.6.1 Espacial	22
1.6.2 Temporal	22
1.6.3 Conceptual	22
2. Referentes Teóricos	24
2.1 Antecedentes	24
2.2 Marco Teórico	27
2.2.1 Generalidades del suelo	27
2.2.2 Microbiología en el suelo	27
2.2.3 Composición química del orégano	28
2.2.4 Características de los hongos fitopatógenos	28

2.2.4.1 Morfología	28
2.2.4.2 Reproducción	29
2.2.5 Ciclo de vida de los hongos	30
2.2.6 Control de enfermedades fungosas de las plantas	30
2.2.7 PCR (Reacción de cadena de polimerasa)	30
2.3 Marco Legal	33
3. Metodología	37
3.1 Tipo de Investigación	37
3.2 Población y Muestra	37
3.2.1 Población	37
3.2.2 Muestra	37
3.3 Hipótesis	37
3.4 Variables	37
3.4.1 Dependientes	37
3.4.2 Independientes	38
3.4.3 Intervinientes	38
3.5 Fases de la Investigación	38
3.5.1 Obtención de muestras, procesamiento de muestras	38
3.5.2 Aislamiento y purificación de hongos fitopatógenos del cultivo de arroz	38
3.5.3 Identificación microscópica y macroscópicamente de hongos fitopatógenos	39
3.5.4 Identificación molecular	39
3.5.4.1 Extracción de ADN	39
3.5.4.2 Reacción de cadena polimerasa (PCR)	40
3.5.4.3 Secuenciación o edición de secuencias	41

3.5.4.4 Identificación de hongos aislados por BLAST del NCBI (Basic Local Alignment Search Tool)	42
3.5.5 Extracción de aceites esenciales de orégano	42
3.5.6 Pruebas in vitro de inhibición de crecimiento por acción de los extractos etanólicos del orégano (Antibiosis)	42
3.5.7 HPLC para determinación de quimiotipos	43
3.5.7.1 Preparación de muestras para realización de HPLC	43
3.5.8 Evaluación en invernadero	43
3.5.8.1 Multiplicación de hongos aislados	43
3.5.8.2 Limpieza y desinfección de semillas	43
3.5.8.3 Inoculación de semillas	44
3.5.8.4 Germinación de semillas de arroz (<i>Oryza sativa</i>)	44
3.5.8.5 Monitoreo de plantas	44
4. Resultados	45
4.1 Aislamiento y Purificación de Hongos Fitopatógenos	45
4.1.1 Solubilizadoras de fósforo	48
4.2 Identificación Microscópica y Macroscópicamente de Hongos Fitopatógenos	49
4.3 Extracción de Aceites Esenciales de Orégano y Pruebas de IN VITRO (Antibiosis)	55
4.3.1 Muestras de orégano y preparación de medios	55
4.4 Determinación de Aceites Esenciales por Hplc y Quimiotipos	63
4.5 Evaluación de Invernadero	64
4.5.1 Multiplicación de hongos e inoculación de semillas de arroz	64
4.5.2 Monitoreo de plantas	65
4.6 Identificación Molecular	69
4.6.1 Extracción de ADN Genómico	69

4.6.1.1 Resultados de visualización del gel de agarosa al 2% en el foto documentador KODAK MOLECULAR IMAGE	71
4.6.1.2 Cuantificación de DNA por NANODROP 2000	71
4.6.2 Reacción de cadena polimerasa (PCR) en AB APPLIED Biosystems Veriti 96 well-TERMOCYCLER	72
4.6.3 Amplificación y tamaño de pb de los productos de PCR con los diferentes pares de iniciadores	73
4.6.4 Limpieza de ExoSAP-IT®	74
4.6.5 Edición, consenso y comparación de secuencias	75
4.6.6 Identificación de bacterias aisladas por BLAST del NCBI ((Basic Local Alignment Search Tool)	76
5. Discusiones	81
6. Conclusiones	83
7. Recomendaciones	84
Referencias Bibliográficas	85