

|   |  |        |             |
|---|--|--------|-------------|
|  | GESTIÓN DE RECURSOS Y SERVICIOS BIBLIOTECARIOS | Código | FO-SB-12/v0 |
|   | ESQUEMA HOJA DE RESUMEN                        | Página | 1/105       |

## RESUMEN TRABAJO DE GRADO

AUTOR(ES): JESSICA BLANCO MANZANO

FACULTAD: INGENIERÍA

PLAN DE ESTUDIOS: INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA

DIRECTOR: LILIANA YANET SUÁREZ

TÍTULO DEL TRABAJO: “CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL FITOPATÓGENO Moniliophthora royeri, UTILIZANDO MARCADORES ISSR, EN NORTE DE SANTANDER, COLOMBIA.”

### RESUMEN

Las regiones del departamento de Norte de Santander, Colombia, cultivadoras de cacao presentan la enfermedad más grave que es la moniliasis causada por el hongo fitopatógeno *Moniliophthora royeri*. Se evaluó la caracterización molecular de 3 aislamientos realizados en el municipio del Zulia. Inicialmente se llevó a cabo el protocolo de desinfección en la mazorca enferma, se llevó a cabo la siembra en agar PDA (papa dextrosa), agar PDA modificado (gentamicina y pulpa de cacao) y agar Extracto de malta, incubándolos por 10 días a una temperatura de 15°C, mostrando mejor crecimiento en agar PDA. Después se continuó con la extracción de ADN, posteriormente se ratificó la efectividad de muestras conservadas de monilia aisladas en los municipios de El Zulia, Cúcuta, Tibú, Puerto Santander, Bucarasica, El Tarra, Teorama y Sardinata de Norte de Santander, una vez comprobada la presencia de ADN por electroforesis en gel de agarosa, se seleccionaron 24 muestras, luego se estandarizó la técnica de ISSR (inter secuencias repetidas); para el cual se obtuvo patrones de bandas en la mayoría de las 27 muestras con los primer 823, 880, 890 y 891, mientras que con el cebador 816, 874 y 885 generaron muy pocas bandas. El promedio de contenido de información de polimorfismo (PIC) fue de 0.15 indicando una baja variación de polimorfismo. Se le realizó la secuenciación a 2 muestras aisladas del hongo y arrojó: para el hongo HFa007 con un porcentaje de identidad del 97,08% para *Diaporthe pseudomangiferaem* con el empleo de ITS 5 y para el hongo HFa009 un porcentaje de 99,29% de identidad para ITS 4 *Diaporthe melonis*. Se ejecutó el análisis estadístico, donde se obtuvo un dendrograma basado en el coeficiente de Dice, el cual mostro las relaciones existentes para las 28 muestras estudiadas. La muestra 6d-17 proveniente de Sardinata se agrupo de forma independiente.

PALABRAS CLAVE: Cacao, Moniliasis, hongo, protocolo, desinfección, siembra, electroforesis, muestra.

CARACTERÍSTICAS:

PÁGINAS: 105 PLANOS: \_\_\_ ILUSTRACIONES: \_\_\_ CD ROOM: \_\_1\_\_

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL FITOPATÓGENO *Moniliophthora roreri*,  
UTILIZANDO MARCADORES ISSR, EN NORTE DE SANTANDER, COLOMBIA.

JESSICA BLANCO MANZANO

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

2019

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL FITOPATÓGENO *Moniliophthora roreri*,  
UTILIZANDO MARCADORES ISSR, EN NORTE DE SANTANDER, COLOMBIA.

JESSICA BLANCO MANZANO

Trabajo de grado presentado como requisito para optar el título de  
Ingeniero biotecnológico

Directora:

LILIANA YANET SUÁREZ

Licenciada en Biología Química

Maestría en Biología énfasis Genética

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

2019

**ACTA DE SUSTENTACION DE UN TRABAJO DE GRADO**

**FECHA:** 20 AGOSTO DE 2019

**HORA:** 10:00 A.M

**LUGAR:** SB 302

**PLAN DE ESTUDIOS:** INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA

**TITULO:** "CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL FITOPATOGENO *Moniliophthora roreri*, UTILIZANDO ISSR, EN NORTE DE SANTANDER, COLOMBIA"

**MODALIDAD:** TRABAJO DIRIGIDO

**JURADO:** GERMAN LUCIANO LÓPEZ BARRERA  
ALBA YULI MARULANDA ECHEVERRI  
NELSON ALFONSO VEGA CONTRERAS

**ENTIDAD:** UFPS

**DIRECTOR:** LILIANA YANETH SUÁREZ CONTRERAS

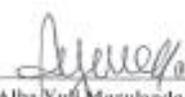
| NOMBRE DE LOS ESTUDIANTE | CODIGO  | CALIFICACION |
|--------------------------|---------|--------------|
| Jessica Blanco Manzano   | 1610947 | 4.3          |

**OBSERVACIONES:** APROBADO.

**FIRMA DE LOS JURADOS**



German Luciano López Barrera



Alba Yuli Marulanda Echeverri



Nelson Alfonso Vega Contreras

**Va.Bo Coordinador Comité Curricular**



Yaneth Asparó Muñoz Peñalosa

## Resumen

Las regiones del departamento de Norte de Santander, Colombia, cultivadoras de cacao presentan la enfermedad más grave que es la moniliasis causada por el hongo fitopatógeno *Moniliophthora roreri*. Se evaluó la caracterización molecular de 3 aislamientos realizados en el municipio del Zulia. Inicialmente se llevó a cabo el protocolo de desinfección en la mazorca enferma, se llevó a cabo la siembra en agar PDA (papa dextrosa), agar PDA modificado (gentamicina y pulpa de cacao) y agar Extracto de malta, incubándolos por 10 días a una temperatura de 15°C, mostrando mejor crecimiento en agar PDA. Después se continuó con la extracción de ADN, posteriormente se ratificó la efectividad de muestras conservadas de monilia aisladas en los municipios de El Zulia, Cúcuta, Tibú, Puerto Santander, Bucarasica, El Tarra, Teorama y Sardinata de Norte de Santander, una vez comprobada la presencia de ADN por electroforesis en gel de agarosa, se seleccionaron 24 muestras, luego se estandarizó la técnica de ISSR (inter secuencias repetidas); para el cual se obtuvo patrones de bandas en la mayoría de las 27 muestras con los primers 823, 880, 890 y 891, mientras que con el cebador 816, 874 y 885 generaron muy pocas bandas. El promedio de contenido de información de polimorfismo (PIC) fue de 0.15 indicando una baja variación de polimorfismo. Se le realizó la secuenciación a 2 muestras aisladas del hongo y arrojó: para el hongo HFa007 con un porcentaje de identidad del 97,08% para *Diaporthe pseudomangiferaem* con el empleo de ITS 5 y para el hongo HFa009 un porcentaje de 99,29% de identidad para ITS 4 *Diaporthe melonis*. Se ejecutó el análisis estadístico, donde se obtuvo un dendograma basado en el coeficiente de Dice, el cual mostro las relaciones existentes para las 28 muestras estudiadas. La muestra 6d-17 proveniente de Sardinata se agrupó de forma independiente.

## Abstract

The regions of the department of Norte de Santander, Colombia, cocoa growers have the most serious disease that is the moniliasis caused by the phytopathogenic fungus *Moniliophthora roreri*. The molecular characterization of 3 isolates performed in the municipality of Zulia was evaluated. Initially the protocol of disinfection was carried out in the diseased ear, sowing was carried out in PDA agar (potato dextrose), modified PDA agar (gentamicin and cocoa pulp) and malt extract agar, incubating them for 10 days at a temperature of 15 ° C, showing better growth in PDA agar. After DNA extraction was continued, the effectiveness of conserved samples of isolated monilia in the municipalities of El Zulia, Cúcuta, Tibú, Puerto Santander, Bucarasica, El Tarra, Teorama and Sardinata de Norte de Santander, was later confirmed. the presence of DNA by agarose gel electrophoresis, 24 samples were selected, then the ISSR technique (repeated inter sequences) was standardized; for which band patterns were obtained in most of the 27 samples with the first 823, 880, 890 and 891, while with primer 816, 874 and 885 they generated very few bands. The average content of polymorphism information (PIC) was 0.15 indicating a low variation of polymorphism. Sequencing was performed on 2 isolated samples of the fungus and yield: for the fungus HFa007 with a percentage of identity of 97.08% for *Diaporthe pseudomangiferae* with the use of ITS 5 and for the fungus HFa009 a percentage of 99.29% of identity for ITS 4 *Diaporthe melonis*. The statistical analysis was executed, where a dendogram based on the Dice coefficient was obtained, which showed the existing relationships for the 28 samples studied. The 6d-17 sample from Sardinata was grouped independently.

## **Dedicatoria**

Admito que llegar hasta aquí no fue fácil, fue un camino lleno de muchos retos y nuevas experiencias por la cual le doy gracias a Dios, sé que este trabajo de grado no hubiese sido posible sin el apoyo de mi familia, por lo cual le dedico este trabajo:

A mis padres, Gerardo Blanco y Yulieth Manzano porque me enseñaron a que si el camino es difícil es porque voy en la dirección correcta, gracias a ellos por formarme con buenos principios y valores, también por su apoyo emocional y económico.

A mis hermanas, porque ellas fueron mi motivación para seguir adelante y no rendirme en los momentos más difíciles, porque me demuestran que vale la pena seguir adelante enriqueciéndome con nuevos conocimientos.

A mi mejor amigo Sergio Pérez, porque siempre me acompaño sin importar las circunstancias, por motivarme, brindarme alegría y apoyo incondicional.

## **Agradecimientos**

La autora expresa sus agradecimientos a:

A mis padres y familiares por su apoyo incondicional.

A la Universidad y Plan de Estudios de Ingeniería Biotecnológica por el apoyo en el transcurso de toda la carrera.

A la Directora de tesis Msc. Liliana Suárez por confiar en mí y por permitirme trabajar con ella.

A la ingeniera Lady Suarez asistente de laboratorio Banco de Cepas, por brindarme todo su apoyo y colaboración.

Al ingeniero Ricardo Alarcón asistente de laboratorio de Biología Molecular, por su colaboración prestada e indicaciones para la ejecución de esta investigación.

A Feliz Ángel Fuentes propietario finca la esmeralda, por su hospitalidad.

Al ingeniero Alexandro Barbosa en especial, por toda la asesoría brindada.

A mis compañeros y amigos por cada experiencia compartida.

## Contenido

|                                 |    |
|---------------------------------|----|
| Introducción                    | 17 |
| 1. Problema                     | 19 |
| 1.1. Título                     | 19 |
| 1.2. Planteamiento Del Problema | 19 |
| 1.3. Problema                   | 20 |
| 1.4. Justificación              | 20 |
| 1.5. Objetivos                  | 22 |
| 1.5.1. Objetivo General.        | 22 |
| 1.5.2. Objetivos Específicos    | 22 |
| 1.6. Alcances Y Limitaciones    | 22 |
| 1.6.1. Alcances.                | 22 |
| 1.6.2. Limitaciones.            | 23 |
| 1.7. Delimitaciones             | 23 |
| 1.7.1. Delimitación Espacial.   | 23 |
| 1.7.2. Delimitación Temporal.   | 23 |
| 1.7.3. Delimitación Conceptual. | 23 |
| 2. Marco Referencial            | 24 |
| 2.1. Antecedentes               | 24 |

|  |    |
|--|----|
| 2.2. Marco Teórico   | 26 |
| 2.2.1. Características Generales De <i>Moniliophthora roreri</i> . | 26 |
| 2.2.2. Morfología De <i>M. roreri</i> .                            | 27 |
| 2.2.3. Características Generales De La Enfermedad.                 | 28 |
| 2.2.4. Origen Y Distribución Geográfica.                           | 29 |
| 2.2.5. Caracterización Molecular.                                  | 32 |
| 2.3. Marco Conceptual  | 33 |
| 2.3.1. Origen Del Cacao.   | 33 |
| 2.3.2. Moniliasis.   | 33 |
| 2.3.3. Cebadores.  | 33 |
| 2.3.4. Microsatélites O Secuencias Simples Repetidas (SSR)         | 33 |
| 2.4. Marco Contextual  | 34 |
| 2.5. Marco Legal   | 34 |
| 3. Diseño Metodológico   | 36 |
| 3.1. Tipo De Investigación   | 36 |
| 3.2. Población Y Muestra   | 36 |
| 3.2.1. Población.  | 36 |
| 3.2.2. Muestra.  | 36 |
| 3.3. Hipótesis   | 36 |
| 3.4. Variables   | 36 |

|  |    |
|--|----|
| 3.4.1 Variables Dependientes.  | 36 |
| 3.4.2. Variables Independientes.   | 37 |
| 3.4.3. Variables Intervinientes.   | 37 |
| 3.5. Fases De La Investigación.  | 37 |
| 3.5.1. Reactivación De Monilia Conservada En El Laboratorio.                         | 37 |
| 3.5.2. Recolección De Muestra.   | 39 |
| 3.5.3. Método De Desinfección Empleada En El Fruto De Cacao Enfermo.                 | 41 |
| 3.5.4. Medios De Cultivo Empleados En La Siembra.                                    | 41 |
| 3.5.5. Replicas Empleadas Para Obtener El Hongo Puro.                                | 42 |
| 3.5.6. Extracción De ADN Fúngico.  | 42 |
| 3.5.7. Electroforesis En Gel De Agarosa.   | 43 |
| 3.5.8. Ensayo Con El Marcador Molecular ISSR 880.                                    | 44 |
| 3.5.9. Estandarización De La Técnica Molecular, ISSR (Inter Simple Sequence Repeat). | 46 |
| 4. Resultados Y Discusiones  | 48 |
| 4.1. Cepas Conservadas En Papel Filtro.  | 48 |
| 4.2. Cepas Conservadas En Solución Salina.   | 51 |
| 4.3. Cepas Conservadas En Tubo Con Agar Inclinado.                                   | 52 |
| 4.4. Cepas Conservadas En Cajas De Petri.  | 54 |
| 4.5. Recolección De Fruto De Cacao Enfermo.  | 56 |

|  |     |
|--|-----|
| 4.6. Siembra Del Hongo En Medio De Cultivo                     | 57  |
| 4.7. Extracción Y Visualización Del ADN.                       | 64  |
| 4.8. Efectividad De Muestras De ADN                            | 66  |
| 4.9. PCR (Reacción En Cadena De La Polimerasa).                | 77  |
| 4.10. Ensayo Con El Cebador 880.                               | 77  |
| 4.11. Estandarización De La Técnica Molecular ISSR.            | 78  |
| 4.12. Análisis De La Secuenciación Realizada Al Hongo Aislado. | 88  |
| 4.13. Análisis Estadístico De Los Resultados De ISSR.          | 89  |
| Conclusiones   | 94  |
| Recomendaciones  | 95  |
| Referencias Bibliográficas                                     | 96  |
| Anexo  | 104 |