



UNIVERSIDAD FRANCISCO DE PAULA SANTANDER  
BIBLIOTECA EDUARDO COTE LAMUS



## RESUMEN – TESIS DE GRADO

AUTORES: LUZ AMÉRICA CÓRDOBA CASTRO

---

FACULTAD: CIENCIAS AGRARIAS Y DEL AMBIENTE

---

PLAN DE ESTUDIOS: INGENIERÍA DE PRODUCCIÓN BIOTECNOLÓGICA

---

DIRECTOR: JORGE EVELIO ÁNGEL DÍAZ

---

TITULO DE LA TESIS: DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE  
*Phytophthora* spp. A PARTIR DE CULTIVO AGUACATE (*Persea americana*)

---

---

RESUMEN:

Se estandarizó una metodología para la obtención de aislamientos puros de *Phytophthora* spp., a partir de cultivos de aguacate (*Persea americana*). Se caracterizaron morfológicamente los diferentes aislamientos de *Phytophthora* y posteriormente se optimizó la extracción de DNA a partir de los aislamientos obtenidos. Se amplificaron y analizaron secuencias de regiones ITS, para caracterizar e identificar mediante la técnica (RFLP) los aislamientos obtenidos. Por ultimo se estableció la metodología para la identificación de especies de *Phytophthora* en el cultivo de aguacate en los departamentos muestreados.

CARACTERÍSTICAS:

PAGINAS: 117

PLANOS:

ILUSTRACIONES:

CD-ROM: 1

DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE *Phytophthora* spp. A  
PARTIR DE CULTIVO AGUACATE (*Persea americana*)

LUZ AMÉRICA CÓRDOBA CASTRO

UNIVERSIDAD FRANCISCO DE PAULA SANTANDER  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS Y DEL AMBIENTE  
PLAN DE ESTUDIOS DE INGENIERÍA DE PRODUCCIÓN BIOTECNOLÓGICA  
SAN JOSÉ DE CÚCUTA  
2009

DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE *Phytophthora* spp. A  
PARTIR DE CULTIVO AGUACATE (*Persea americana*)

LUZ AMÉRICA CÓRDOBA CASTRO

Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de  
Ingeniero de Producción Biotecnológica

Director  
JORGE EVELIO ÁNGEL DÍAZ  
PhD. Biología Molecular

UNIVERSIDAD FRANCISCO DE PAULA SANTANDER  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS Y DEL AMBIENTE  
PLAN DE ESTUDIOS DE INGENIERÍA DE PRODUCCIÓN BIOTECNOLÓGICA  
SAN JOSÉ DE CÚCUTA  
2009



UNIVERSIDAD FRANCISCO DE PAULA SANTANDER  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS Y DEL AMBIENTE  
INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA

ACTA DE SUSTENTACION DE UN TRABAJO DE GRADO

FECHA: 20 DE FEBRERO DE 2009

HORA: 10:00 A.M.

LUGAR: SALA 3 EDIFICIO CREAD

PLAN DE ESTUDIOS: INGENIERIA DE PRODUCCIÓN BIOTECNOLÓGICA

TITULO DE LA TESIS: "DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE *Phytophthora* spp. A PARTIR DE CULTIVO DE AGUACATE (*Persea americana*)"

MODALIDAD: INVESTIGACIÓN

JURADOS: NESTOR FABIAN GALVIS SERRANO  
ANA MILENA GÓMEZ SOTO

DIRECTOR: JORGE EVELIO ANGEL DÍAZ

NOMBRE DEL ESTUDIANTE	CODIGO	CALIFICACION
LUZ AMERICA CORDOBA CASTRO	0610330	4.8

OBSERVACIONES:  
MERITORIO

FIRMA DE LOS JURADOS:

Vo.Bo. Coordinador Comité Curricular

A mis padres, Rafael Figueredo y Marina Castro, por la confianza depositada en mi, siendo siempre mi apoyo y compañía haciendo de mis proyectos una realidad.

**Luz América**

## **AGRADECIMIENTOS**

El autor expresa sus agradecimientos a:

Instituto Colombiano Agropecuario, seccional Cundinamarca, por facilitar la información del presente estudio.

Doctor Jorge Evelio Ángel Díaz, Laboratorio de Diagnostico Fitosanitario y Análisis Molecular, por su dirección y apoyo en la ejecución de este estudio.

Ingeniero Oscar Enrique Fuentes, por su codirección y su aporte en conocimientos valiosos para mi formación y desarrollo de esta investigación.

Doctora Celsa García de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de Bogotá, Doctora Sonia Jaramillo de la Universidad Nacional sede Medellín, Doctora Silvia Restrepo del Laboratorio de Micología y Fitopatología de la Universidad de los Andes (LAMFU) y la Doctora Luz Edith Argel Roldán, M.Sc. Biotecnología, por la información suministrada en pro de conocimiento del patógeno.

Doctor Leonardo Mariño y al M.Sc. Oscar Camilo Bedoya, de la Unidad de Biología Computacional y Bioinformática del Laboratorio Molecular Vegetal del Centro de biotecnología y bioindustria (CBB) Corpoica, por su colaboración y aportes en los análisis de bioinformática realizados en la investigación.

Yéxila Ortiz, Alejandro Castillo, Walter Turizo, Manuel Moreno y Catalina Botero, equipo de trabajo del Laboratorio Nacional de Diagnostico Fitosanitario y Análisis Molecular, por sus asesorías y cooperación en el uso de herramientas necesarias para el desarrollo de esta investigación.

## CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCIÓN	15
1. ESTUDIO REALIZADO	19
1.1 DETECCIÓN Y AISLAMIENTO DEL PATÓGENO	19
1.1.1 Detección del patógeno	20
1.1.2 Aislamiento y obtención de cultivos puros	23
1.2 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LOS AISLAMIENTOS	25
1.2.1 Caracterización macroscópica	25
1.2.2 Caracterización microscópica	25
1.3 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LOS AISLAMIENTOS	25
1.3.1 Extracción de ácido desoxirribonucleico (DNA)	25
1.3.2 Amplificación y secuenciación de regiones espaciadoras internas transcritas (ITS)	26
1.3.3 Detección e identificación de especies utilizando la técnica de PCR-RFLP	28
1.3.4 Conservación de las cepas obtenidas	34

1.4 LOCALIZACIÓN	34
2. RESULTADOS	36
2.1 DETECCIÓN Y AISLAMIENTO DEL PATÓGENO	36
2.1.1 Detección del patógeno	37
2.1.2 Aislamiento y obtención de cultivos puros	38
2.2 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LOS AISLAMIENTOS	44
2.2.1 Extracción de ácido desoxirribonucleico (DNA)	44
2.2.2 Amplificación de regiones espaciadoras internas transcritas (ITS)	46
2.2.3 Detección e identificación de especies utilizando la técnica de PCR RFLP	53
2.3 METODOLOGÍA PLANTEADA POR COOKE	61
2.3.1 Conservación de las cepas obtenidas	67
3. DISCUSIONES	70
4. CONCLUSIONES	78
5. RECOMENDACIONES	81
BIBLIOGRAFÍA	82
ANEXOS	84



## LISTA DE FOTOS

	pág.
Foto 1. Muestras	19
Foto 2. Método directo para aislamiento de <i>Phytophthora</i> spp	21
Foto 3. Método indirecto con cebos de papaya ( <i>Carica papaya</i> ) para aislar <i>Phytophthora</i> spp	22
Foto 4. Método indirecto con cebos de pera ( <i>Pyrus communis</i> ) suspendidos en agua y suelo para aislar <i>Phytophthora</i> spp	22
Foto 5. Método de trampeo	23
Foto 6. Observación microscópica a 40X de la infección de <i>Phytophthora</i> en los pétalos de clavel ( <i>Dianthus caryophyllus</i> )	37
Foto 7. Obtención de biomasa en caldo V8	39
Foto 8. Observación macroscópica de los cultivos obtenidos de <i>Phytophthora</i> spp	40
Foto 9. Visualización microscópica de esporangio ovoide	41
Foto 10. Visualización microscópica a 100X de esporangio papilado con pedicelos cortos	41
Foto 11. Micelio de los aislamientos de <i>Phytophthora palmivora</i>	42
Foto 12. Oogonio con división celular para formación de oósporas de <i>Phytophthora heveae</i> aislamiento 439	43
Foto 13. Observación en microscopio a 100X	44