



UNIVERSIDAD FRANCISCO DE PAULA SANTANDER
BIBLIOTECA EDUARDO COTE LAMUS



RESUMEN – TESIS DE GRADO

AUTORES: LEIDI YOHANA YAÑEZ MONTAÑO

FACULTAD: CIENCIAS AGRARIAS Y DEL AMBIENTE

PLAN DE ESTUDIOS: INGENIERIA DE PRODUCCION BIOTECNOLOGICA

DIRECTOR: JORGE EVELIO ANGEL DIAZ

TITULO DE LA TESIS: DETECCION Y CARACTERIZACION MOLECULAR DE UN FITOPLASMA ASOCIADO CON ASH YELLOWS EN URAPAN (*Fraxinus chinensis*) EN BOGOTA

RESUMEN:

Se realizó una prospección visual en un total de 38 árboles, en los cuales se registro la ausencia/presencia de síntomas característicos de Ash Yellows. Se estandarizaron las técnicas de extracción de DNA total a partir de plantas de Urapán con síntomas de Fitoplasma. Se estudió la presencia de estos Fitoplasmas utilizando ensayos moleculares basados en la prueba de reacción en cadena de la polimerasa y polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción y secuenciación.

CARACTERÍSTICAS:

PAGINAS: 102

PLANOS:

ILUSTRACIONES:

CD-ROM: 1

DETECCION Y CARACTERIZACION MOLECULAR DE UN FITOPLASMA
ASOCIADO CON ASH YELLOWS EN URAPAN (*Fraxinus chinensis*) EN
BOGOTA

LEIDI YOHANA YAÑEZ MONTAÑO

UNIVERSIDAD FRANCISCO DE PAULA SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS Y DEL AMBIENTE
PLAN DE ESTUDIOS DE INGENIERIA DE PRODUCCION BIOTECNOLOGICA
SAN JOSE DE CUCUTA
2008

DETECCION Y CARACTERIZACION MOLECULAR DE UN FITOPLASMA
ASOCIADO CON ASH YELLOWS EN URAPAN (*Fraxinus chinensis*) EN
BOGOTA

LEIDI YOHANA YAÑEZ MONTAÑO

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

Director
JORGE EVELIO ANGEL DIAZ
Ph.D Biología Molecular

UNIVERSIDAD FRANCISCO DE PAULA SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS Y DEL AMBIENTE
PLAN DE ESTUDIOS DE INGENIERIA DE PRODUCCION BIOTECNOLOGICA
SAN JOSE DE CUCUTA
2008



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

ACTA DE SUSTENTACION DE UN TRABAJO DE GRADO

FECHA: 15 DE FEBRERO DE 2008

HORA: 2:00 P.M.

LUGAR: SALA 3 EDIFICIO CREAD

PLAN DE ESTUDIOS: INGENIERIA DE PRODUCCIÓN BIOTECNOLÓGICA

TITULO DE LA TESIS: " DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE UN FITOPLASMA ASOCIADO CON ASH YELLOWS EN URAPAN (*Fraxinus Chinensis*) EN BOGOTA "

MODALIDAD: INVESTIGACIÓN

JURADOS: CRISTHIAN CHACIN ZAMBRANO
ERWIN JACOME CASTILLA
CLAUDIA ELIZABETH DIAZ CASTAÑEDA

DIRECTOR: JORGE EVELIO ANGEL DÍAZ

NOMBRE DEL ESTUDIANTE
LEIDI YOHANA YAÑEZ MONTAÑO

CODIGO
0610374

CALIFICACION
4,5

OBSERVACIONES:
MERITORIO

FIRMA DE LOS JURADOS:

Christhian Chacin Z

Erwin Jacome Castilla

Claudia Elizabeth Diaz Castañeda

Vo.Bo. Coordinador Comité Curricular

Jorge Evelio Angel Díaz



Avenida Gran Colombia N°12E-96 B. Colsag Tel.-5751253 Fax(0975)772204
e-mail: facuagra@motilon.ufps.edu.co
CUCUTA-COLOMBIA

A mis padres, Jesús Yañez y Ligia Montaña, mis hermanos, Julian Camilo Yañez, Isabel Cristina Yañez y Juan Pablo Yañez, quienes son parte fundamental de mi vida y que con su amor incondicional me dan siempre la fuerza para luchar por mis sueños por su apoyo, comprensión y sobre todo por su paciencia.

Yohana

AGRADECIMIENTOS

La autora del presente trabajo de grado expresa sus agradecimientos a:

Laboratorio de Análisis Molecular LANAM sede Tibaitata Mosquera, por ser una escuela que fomenta el desarrollo de la investigación y permitió que realizara una formación de pregrado de alta calidad.

Instituto Colombiano Agropecuario ICA Bogotá, por su apoyo financiero para la realización de este trabajo.

Dr. Jorge Evelio Ángel Díaz, por la dirección y por compartir sus conocimientos conmigo.

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	18
1. CARACTERIZACION MOLECULAR DE UN FITOPLASMA	22
1.1 URAPAN (FRAXINUS CHINENSIS)	22
1.1.1 Origen	22
1.1.2 Taxonomía y morfología de Urapán	23
1.1.3 Descripción botánica	24
1.1.4 Distribución geográfica	24
1.1.5 Plagas del Urapán	24
1.1.6 Sintomatología	24
1.2 EL INSECTO PLAGA DEL URAPAN	27
1.3 TRANSMISIÓN DE FITOPLASMAS POR INSECTOS VECTORES	28
1.3.1 Transmisión	29
1.3.2 Adquisición y transmisión de fitoplasmas por insectos	29
1.3.3 Efecto del fitoplasma sobre el vector	30

1.3.4 Distribución del fitoplasma en el árbol	31
1.4 LOS FITOPLASMAS	32
1.4.1 Origen	32
1.4.2 Clasificación y características	32
1.4.3 Clasificación de los mollicutes	33
1.4.4 Justificación de la pertenencia de los fitoplasmas a la clase mollicute	34
1.4.5 Características específicas de los fitoplasmas	34
1.4.6 El gen 16S rRNA	35
1.4.7 Caracterización molecular de los fitoplasmas	36
1.4.8 Huésped de los fitoplasmas	36
1.4.9 Sintomatología	37
1.4.10 Medidas de control	37
1.4.11 Enfermedades causadas por fitoplasmas	38
1.5 TECNICAS PARA LA DETECCIÓN DE FITOPLASMAS	39
1.5.1 Observación microscópica	39
1.5.2 Hibridación de ácidos nucleicos o dot.blot	39
1.5.3 Detección del fitoplasma mediante PCR	39

1.5.4 Secuenciación	41
1.5.5 Polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción RFLP's	41
2. MATERIALES Y METODOS	42
2.1 DIAGRAMA METODOLOGICO	42
2.2 POBLACION DE ESTUDIO	42
2.2.1 Colecta y conservación de las muestras	42
2.2.2 Formato de las planillas elaboradas para el registro de datos en campo	44
2.3 ESTANDARIZACION DE LA EXTRACCIÓN DE ADN DE TEJIDO VEGETAL	45
2.3.1 Almacenamiento de ADN	46
2.3.2 Secado, resuspensión y pipeteo del ADN	46
2.4 ELECTROFORESIS DE ADN	47
2.5 REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	47
2.5.1 Detección de fitoplasmas en diferentes partes de la planta	49
2.6 SECUENCIACION DE REGIONES 16S rRNA RIBOSOMAL	51
2.6.1 Análisis de la secuencia	51
2.7 CONDICIONES PARA LA AMPLIFICACIÓN DE MUESTRAS DE ADN EN PRUEBAS DE RFLP	51

2.7.1 Digestión enzimática de fragmentos amplificados (RFLP`s)	51
3. RESULTADOS Y DISCUSIONES	53
3.1 OBSERVACIÓN DE LA SINTOMATOLOGÍA	53
3.1.1 Recolección de muestras	58
3.2 ESTANDARIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN DE MUESTRAS DE ADN DE TEJIDO VEGETAL	65
3.2.1 Extracción y cuantificación de ADN a partir de diferentes partes de la planta	67
3.3 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA PCR	68
3.3.1 Inespecificidad de los iniciadores	68
3.3.2 Niveles de PCR primaria con iniciadores universales	69
3.3.3 Niveles de PCR y NESTED PCR	70
3.3.4 Análisis por PCR a partir de muestras de diferentes tejidos de la planta	72
3.3.5 Relación entre expresión de síntomas y detección por PCR	73
3.4 POLIMORFISMO EN LA LONGITUD DE LOS FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN (RFLP`S)	75
3.5 SECUENCIACIÓN DE ADN	76
4. CONCLUSIONES	80

5. RECOMENDACIONES	81
BIBLIOGRAFIA	83
ANEXOS	85