UNIVERSIDAD FRANCISCO DE PAULA SANTANDER
BIBLIOTECA EDUARDO COTE LAMUS

RESUMEN – TESIS DE GRADO

AUTORES: ANDRES DURAN JARAMILLO

FACULTAD: CIENCIAS AGRARIAS Y DEL AMBIENTE

PLAN DE ESTUDIOS: INGENIERÍA DE PRODUCCIÓN BIOTECNOLÓGICA

DIRECTOR: JORGE EVELIO ÁNGEL DIAZ

TITULO DE LA TESIS: DETECCIÓN Y CUANTIFICACION ABSOLUTA DE *Ralstonia solanacearum* MEDIANTE LA TECNICA DE REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA EN TIEMPO REAL (PCR REAL-TIME) EN CULTIVOS DE PLATANO (*Musa* sp.)

RESUMEN:

Se logró aislar la *Ralstonia solanacearum* a partir de muestras de plátano provenientes de zonas donde se ha reportado infecciones de la bacteria. Se detectó la presencia de *Ralstonia solanacearum* mediante iniciadores especie-específicos y se logró clonar la región del ADNr 16s de 282 pb., correspondiente a la muestra estudiada. Por último se estandarizó una metodología de detección y cuantificación rápida de la bacteria, obteniendo resultados en corto tiempo y aumentando el flujo de muestras con fines de diagnostico.

CARACTERÍSTICAS:

PAGINAS: 116 PLANOS: ILUSTRACIONES: CD-ROM: 1

DETECCIÓN Y CUANTIFICACION ABSOLUTA DE *Ralstonia solanacearum* MEDIANTE LA TECNICA DE REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA EN TIEMPO REAL (PCR REAL-TIME) EN CULTIVOS DE PLATANO (*Musa* sp.)

ANDRES DURAN JARAMILLO

UNIVERSIDAD FRANCISCO DE PAULA SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS Y DEL AMBIENTE
PLAN DE ESTUDIOS DE INGENIERÍA DE PRODUCCIÓN BIOTECNOLÓGICA
SAN JOSÉ DE CÚCUTA
2010

DETECCIÓN Y CUANTIFICACION ABSOLUTA DE *Ralstonia solanacearum* MEDIANTE LA TECNICA DE REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA EN TIEMPO REAL (PCR REAL-TIME) EN CULTIVOS DE PLATANO (*Musa* sp.)

ANDRES DURAN JARAMILLO

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

Director
JORGE EVELIO ÁNGEL DIAZ
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
2010

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

ACTA DE SUSTENTACION DE UN TRABAJO DE GRADO

FECHA: 22 DE FEBRERO DE 2010 **HORA:** 02:00 P.M.

LUGAR: SALA N°04 DEL EDIFICIO CREAD

PLAN DE ESTUDIOS: INGENIERIA DE PRODUCCIÓN BIOTECNOLÓGICA

TITULO DE LA TESIS: " DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN ABSOLUTA DE *Ralstonia solanacearum* MEDIANTE LA TÉCNICA DE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA EN TIEMPO REAL (PCR REAL – TIME) EN CULTIVOS DE PLÁTANO (*Musa* sp)

MODALIDAD: INVESTIGACIÓN

JURADOS: CHRISTIAN CHACIN ZAMBRANO
GERMÁN LUCIANO LÓPEZ BARRERA
ARIADNA HAZEL VERGEL SUAREZ

DIRECTOR: JORGE EVELIO ANGEL DIAZ

NOMBRE DEL ESTUDIANTE	CODIGO	CALIFICACION
ANDRES DURAN JARAMILLO	0610385	4.7

OBSERVACIONES:
MERITORIO

FIRMA DE LOS JURADOS:

Christian Chacin _____ _____ _____

Vo.Bo. Coordinador Comité Curricular _____

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

AGRADECIMIENTOS

El autor expresa sus agradecimientos a:

Instituto Colombiano Agropecuario, seccional Cundinamarca, por facilitar el desarrollo del presente estudio.

Doctor Jorge Evelio Ángel Díaz, director del Laboratorio Nacional de Diagnostico Fitosanitaria y Análisis Molecular (LANDFAM), ICA-Tibaitatá, por su dirección, enseñanzas, compromiso y apoyo para cumplir cada una de las metas trazadas.

Ingeniera Luz América Córdoba, por su gran apoyo en los momentos difíciles y brindarme todos sus conocimientos valiosos para mi formación.

Ingeniero Manuel Moreno, por sus conocimientos para el desarrollo de esta investigación.

Yexila Ortiz, por brindarme todos sus conocimientos para el desarrollo de esta investigación.

Doctora Beatriz Macías, por la información y conocimientos suministrados sobre la técnica de PCR REAL TIME.

CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCIÓN	18
1. CULTIVO DE PLÁTANO	21
1.1 MORFOLOGÍA Y TAXONOMÍA DEL CULTIVO	22
1.2 ENFERMEDAD DEL MOKO DEL PLÁTANO	23
1.2.1 Microorganismo causal	25
1.2.2 Razas y biovares	26
1.3 EPIDEMIOLOGÍA	27
1.4 MEDIDAS DE CONTROL PARA *Ralstonia solanacearum*	28
1.5 SISTEMAS DE DIAGNOSTICO PARA *Ralstonia solanacearum*	29
1.5.1 Medios de cultivo semiselectivo	29
1.5.2 Pruebas bioquímicas	29
1.5.3 Pruebas serológicos	31
1.5.4 Técnicas moleculares	32

2. MATERIAL VEGETAL Y AISLAMIENTO DEL PATÓGENO 33

2.1 AISLAMIENTO DEL PATÓGENO 34

2.1.1 Obtención de cultivos puros 35

2.2 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LOS AISLAMIENTOS 36

2.2.1 Caracterización macroscópica 36

2.2.2 Caracterización microscópica 37

2.3 DESCRIPCION PRUEBA IMMUNOSTRIP PARA *Ralstonia solanacearum* 37

2.4 PRUEBAS BIOQUIMICAS PARA GÉNERO 1 38

2.5 ANÁLISIS MOLECULAR INICIAL DE *Ralstonia solanacearum* 39

2.5.1 Extracción de acido desoxirribonucleico (ADN) 39

2.5.2 Detección mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional 40

2.6 CONSERVACIÓN DE LOS AISLAMIENTOS OBTENIDOS 41

2.7 CLONACION DEL FRAGMENTO DE 282 pb. DEL GEN 16S ADNr DE *Ralstonia solanacearum* 42

2.7.1 Ligación del fragmento de 282 pb 42

2.7.2 Transformación 42

2.7.3 Extracción de DNA plasmidico 42

2.7.4 Confirmación de los transformantes 43

2.8 REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA EN TIEMPO REAL (PCR REAL- TIME) 47

2.8.1 Estandarización de la técnica de Real-Time PCR 47

2.8.2 Establecimiento de la curva estándar en el tiempo real para la cuantificación de *Ralstonia solanacearum* 48

2.8.3 Detección y cuantificación absoluta de *Ralstonia solanacearum* 49

2.8.4 Detección y cuantificación absoluta de *Ralstonia solanacearum* directamente de tejido vegetal 49

3. RESULTADOS 50

3.1 RESULTADOS DEL MATERIAL VEGETAL Y AISLAMIENTO DEL PATÓGENO 50

3.1.1 Resultado de aislamiento y obtención de cultivos puros 50

3.2 RESULTADO CARACTERIZACIÓN MORFOLOGICA DE LOS AISLAMIENTOS 51

3.2.1 Resultados caracterización macroscópica 51

3.2.2 Resultados caracterización microscópica 51

3.3 RESULTADOS PRUEBA IMMUNOSTRIP PARA *Ralstonia solanacearum* 52

3.4 RESULTADOS PRUEBAS BIOQUIMICAS PARA GÉNERO 2 53

3.5 RESULTADOS ANALISIS MOLECULAR FINAL DE *Ralstonia solanacearum* 59

3.5.1 Resultados extracción de acido desoxirribonucleico (ADN) 59

3.5.2 Resultados detección mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional 60

3.6 RESULTADOS DE CONSERVACION DE LOS AISLAMIENTOS OBTENIDOS 61

3.7 RESULTADOS CLONACION DEL FRAGMENTO DE 282 pb. DEL GEN 16S ADNr DE *Ralstonia solanacearum* 62

3.7.1 Resultados ligación y transformación 63

3.7.2 Resultados extracción de DNA plasmidico 64

3.7.3 Resultados confirmación de los transformantes 67

3.8 RESULTADOS REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA EN TIEMPO REAL (PCR REAL TIME) 73

3.8.1 Resultados estandarización de la técnica de Real Time PCR 73

3.8.2 Resultados establecimiento de la curva estándar de referencia en tiempo Real para la cuantificación de *Ralstonia solanacearum* 75

3.8.3 Resultados detección y cuantificación absoluta de *Ralstonia solanacearum* 78

3.8.4 Resultados detección y cuantificación absoluta de *Ralstonia solanacearum* directamente de tejido vegetal 80

4. DISCUSION DE RESULTADOS 83

5. CONCLUSIONES 87

6. RECOMENDACIONES 89

BIBLIOGRAFÍA 90

ANEXOS 92