



**RESUMEN – TESIS DE GRADO**

AUTORES: LUIS MIGUEL SOLANO LUNA

FACULTAD: CIENCIAS AGRARIAS Y DEL AMBIENTE

PLAN DE ESTUDIOS: INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA

DIRECTOR: JORGE EVELIO ANGEL DIAZ

TITULO DE LA TESIS: DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN ABSOLUTA DEL VIRUS DE LA TRISTEZA DE LOS CÍTRICOS (CTV) MEDIANTE LA TÉCNICA DE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA EN TIEMPO REAL (REAL-TIME) PCR

RESUMEN:

Se analizó la calidad del RNA total extraído de diferentes tejidos de cítricos. Se estandarizó el protocolo de transcripción reversa (RT) para la obtención de DNA complementario (cDNA). Así mismo, se detectó mediante indicadores específicos la presencia del virus de la tristeza de los cítricos (CTV) en el material genético extraído. Además, se clonó el fragmento amplificado de la secuencia del gen de la cubierta proteica (CP) del virus. Por último, se estandarizó la metodología para la cuantificación absoluta del virus de la tristeza de los cítricos (CTV), mediante la técnica del PCR en tiempo real.

CARACTERÍSTICAS:

PAGINAS: 104

PLANOS:

ILUSTRACIONES:

CD-ROM: 1

DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN ABSOLUTA DEL VIRUS DE LA TRISTEZA DE  
LOS CÍTRICOS (CTV) MEDIANTE LA TÉCNICA DE REACCIÓN EN CADENA DE  
LA POLIMERASA EN TIEMPO REAL (REAL-TIME) PCR

LUIS MIGUEL SOLANO LUNA

UNIVERSIDAD FRANCISCO DE PAULA SANTANDER  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS Y DEL AMBIENTE  
PLAN DE ESTUDIOS DE INGENIERIA BIOTECNOLOGICA  
SAN JOSE DE CUCUTA  
2010

DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN ABSOLUTA DEL VIRUS DE LA TRISTEZA DE  
LOS CÍTRICOS (CTV) MEDIANTE LA TÉCNICA DE REACCIÓN EN CADENA DE  
LA POLIMERASA EN TIEMPO REAL (REAL-TIME) PCR

LUIS MIGUEL SOLANO LUNA

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

Director:  
JORGE EVELIO ANGEL DIAZ  
Biólogo

UNIVERSIDAD FRANCISCO DE PAULA SANTANDER  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS Y DEL AMBIENTE  
PLAN DE ESTUDIOS DE INGENIERIA BIOTECNOLOGICA  
SAN JOSE DE CUCUTA  
2010



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

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

**FECHA:** 22 DE DICIEMBRE DE 2009

**HORA:** 04:00 P.M.

**LUGAR:** SALA N° 03 DEL EDIFICIO CREAD

**PLAN DE ESTUDIOS:** INGENIERIA BIOTECNOLÓGICA

**TITULO DE LA TESIS:** "DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN ABSOLUTA DEL VIRUS DE LA TRISTEZA DE LOS CÍTRICOS (CTV) MEDIANTE LA TÉCNICA DE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA EN TIEMPO REAL (REAL-TIME) PCR"

**MODALIDAD:** INVESTIGACIÓN

**JURADOS:** FABIAN GALVIS SERRANO  
CHRISTIAN CHACIN ZAMBRANO  
ARIADNA HAZEL VERGEL SUAREZ

**DIRECTOR:** JORGE EVELIO ANGEL DIAZ

<b>NOMBRE DEL ESTUDIANTE</b>	<b>CODIGO</b>	<b>CALIFICACION</b>
LUIS MIGUEL SOLANO LUNA	1610274	4.8

**OBSERVACIONES:**  
MERITORIO

**FIRMA DE LOS JURADOS:**

Vo.Bo. Coordinador Comité Curricular

*A mis hermanos, Andrés Higinio Solano y Daniel Esteban Solano, gracias por su constante apoyo y por ser el estímulo permanente para el desarrollo de mis metas.*

**Luis Miguel**

## **AGRADECIMIENTOS**

El autor expresa sus agradecimientos a:

Doctor Jorge Evelio Ángel Díaz, director del Laboratorio Nacional de Diagnóstico Fitosanitario y Análisis Molecular (LANDFAM), ICA-Tibaitatá, por sus enseñanzas, consejos, compromiso y ardua colaboración para cumplir cada una de las metas trazadas.

Doctora Silvia Ambrós, por su asesoría científica incondicional durante el desarrollo de este trabajo de grado.

Ingeniera Linda Gómez, por su aporte en conocimientos valiosos para mi formación y desarrollo de esta investigación.

Los integrantes y compañeros del Laboratorio de Diagnóstico Fitosanitario y Análisis Molecular por hacerme sentir en un segundo hogar.

Instituto Colombiano Agropecuario – ICA, Seccional Cundinamarca, Centro de Investigación Tibaitatá.

## CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCION	16
1. GENERALIDADES	19
1.1 LOS CITRICOS	19
1.1.1 Origen	20
1.1.2 Clasificación y taxonomía	20
1.1.3 Variedades	23
1.2 LOS CITRICOS EN COLOMBIA	26
1.2.1 Producción	26
1.2.2 Problema fitosanitario	29
1.3 LOS VIRUS	30
1.3.1 Virus fitopatógenos	31
1.3.2 Closterovirus	34
1.4 LA TRISTEZA DE LOS CITRICOS (CTV)	35
1.4.1 Síntomas	36

1.5 CONTROL	48
1.6 LOCALIZACION	50
1.7 GENERALIDADES DE LAS ZONAS EVALUADAS	51
2. BÚSQUEDA Y ANÁLISIS DE INDICADORES APTOS PARA EL TRABAJO EN TIEMPO REAL	52
2.1 DETECCION Y CUANTIFICACION DEL VIRUS	52
2.1.1 Búsqueda y análisis de iniciadores aptos para PCR en tiempo real	54
2.1.2 Extracción de RNA total (tRNA)	54
2.1.3 Amplificación de un fragmento de la secuencia del gen de la CP	55
2.1.4 Clonación	58
2.1.5 Estandarización de la técnica de Real-Time PCR	62
2.1.6 Establecimiento de la curva estándar de referencia en tiempo real para la cuantificación de CTV	63
2.1.7 Detección y cuantificación absoluta de la infección de CTV	63
3. RESULTADOS	64
3.1 DETECCION Y CUANTIFICACION DEL VIRUS	64
3.1.1 Búsqueda y análisis de de iniciadores aptos para la PCR en tiempo real	64
3.1.2 Extracción de RNA total (tRNA)	65



3.1.3 Amplificación de un fragmento de la secuencia del gen de la CP	65
4. DISCUSIONES	84
5. CONCLUSIONES	87
6. RECOMENDACIONES	88
BIBLIOGRAFIA	89
ANEXOS	92