



UNIVERSIDAD FRANCISCO DE PAULA SANTANDER  
BIBLIOTECA EDUARDO COTE LAMUS



### RESUMEN – TESIS DE GRADO

AUTOR:	MARÍA ANDREA ORTEGA
FACULTAD:	CIENCIAS AGRARIAS Y DEL AMBIENTE
PLAN DE ESTUDIOS:	INGENIERÍA DE PRODUCCIÓN BIOTECNOLÓGICA
DIRECTOR:	JORGE EVELIO ÁNGEL DÍAZ
TÍTULO DE LA TESIS:	DESARROLLO DE UN SISTEMA DE IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LOS PATÓGENOS <i>Spongospora subterranea f. sp. subterranea</i> Y <i>Rosellinia sp.</i> EN TUBÉRCULOS Y SUELO AGRÍCOLA APTOS PARA EL CULTIVO DE PAPA.

#### RESUMEN

Se diseñaron sistemas de diagnóstico molecular fitosanitario para el manejo de las enfermedades de papa: sarna polvosa y mortaja blanca, causadas respectivamente por *Spongospora subterranea* y *Rosellinia sp.* Es posible la identificación de los fitopatógenos en suelo y tubérculos, aplicando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), con iniciadores específicos de los espaciadores de transcripción interna (ITSs) del gen de los RNAs ribosomales, cumpliendo con los requisitos de especificidad, sensibilidad y rapidez.

#### CARACTERÍSTICAS

PÁGINAS 160 PLANOS 0 ILUSTRACIONES 55 CD-ROM 1

**DESARROLLO DE UN SISTEMA DE IDENTIFICACIÓN MOLECULAR  
DE LOS PATÓGENOS *Spongospora subterranea f. sp. subterranea* Y *Rosellinia sp.*  
EN TUBÉRCULOS Y SUELO AGRÍCOLA APTOS PARA EL CULTIVO DE PAPA**

**MARÍA ANDREA ORTEGA PABÓN**

**UNIVERSIDAD FRANCISCO DE PAULA SANTANDER  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS Y DEL AMBIENTE  
PLAN DE ESTUDIOS DE INGENIERÍA DE PRODUCCIÓN BIOTECNOLÓGICA  
SAN JOSE DE CÚCUTA  
2004**

**DESARROLLO DE UN SISTEMA DE IDENTIFICACIÓN MOLECULAR  
DE LOS PATÓGENOS *Spongospora subterranea f. sp. subterranea* Y *Rosellinia sp.*  
EN TUBÉRCULOS Y SUELO AGRÍCOLA APTOS PARA EL CULTIVO DE PAPA**

**MARÍA ANDREA ORTEGA PABÓN**

**Proyecto presentado como requisito para optar al título de  
Ingeniero de Producción Biotecnológica**

**Director  
JORGE EVELIO ÁNGEL DÍAZ  
Licenciado en Biología y Química. MSc. PhD.**

**UNIVERSIDAD FRANCISCO DE PAULA SANTANDER  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS Y DEL AMBIENTE  
PROGRAMA DE INGENIERÍA DE PRODUCCIÓN BIOTECNOLÓGICA  
SAN JOSE DE CÚCUTA  
2004**



UNIVERSIDAD FRANCISCO DE PAULA SANTANDER  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS Y DEL AMBIENTE  
INGENIERIA DE PRODUCCION BIOTECNOLOGICA

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

**FECHA:** MAYO 7 DE 2004

**HORA:** 11:00 A.M.

**LUGAR:** AUDITORIO EUSTORGIO COLMENARES B.

**PLAN DE ESTUDIOS:** INGENIERIA DE PRODUCCION BIOTECNOLOGICA

**TITULO DE LA TESIS:** "Desarrollo de un sistema de identificación molecular de los patógenos *Spongospora subterranea f. sp. subterranea* y *Rosellinia sp.* En tubérculos y suelo agrícola aptos para el cultivo de papa."

**JURADOS:** ALINA KATIL SIGARROA RIECHE  
LILIANA YANETH SUAREZ CONTRERAS  
ANA MILENA GOMEZ SOTO

**DIRECTOR:** JORGE EVELIO ANGEL Ph.D

**NOMBRE DEL ESTUDIANTE**  
MARIA ANDREA ORTEGA

**CODIGO**  
610004

**CALIFICACION**  
5.0

**OBSERVACIONES:**  
TESIS LAUREADA

**FIRMA DE LOS JURADOS:**

*Liliana Y. Suarez P.*

*[Signature]*

*Ana Milena Gómez S.*

Vo.Bo. Coordinador Comité Curricular

*Jorge Evelio Ángel*

A todos aquellos que ven las letras A, T, G, C como algo más que consonantes en el abecedario, a los constructores de la biotecnología: a los amantes de la agricultura orgánica, del compostaje y los biofertilizantes, a los seguidores del control biológico y los entomopatógenos, a los generadores de plantas libres de virus y enfermedades, a los ingenieros de bioprocesos y fermentaciones, a los diseñadores de sistemas de tratamiento de residuos sólidos y aguas residuales, a los que les preocupa el ambiente. Pero sobre todo a los que soñamos despiertos.

**María Andrea Ortega**

## AGRADECIMIENTOS

La autora expresa su gesto de gratitud y reconocimiento sincero, por la colaboración y apoyo recibido:

A mis padres por apoyarme siempre en cada una de mis decisiones.

A Liliana cano por ser mi amiga incondicional y enseñarme el valor de la disciplina.

A la Universidad Francisco de Paula Santander por haberme acogido durante mi carrera universitaria.

Al plan de estudios de Ingeniería de Producción Biotecnológica, a toda la planta de profesores, en especial a su gestora, Rosalba Rozo de Acosta, por formarnos como profesionales y darnos las herramientas que nos permitirán, en un futuro, aportar un granito de arena en la construcción de un país mejor.

Al Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) por proporcionarme todo lo necesario para el desarrollo de mi tesis, en especial al **Dr. Jorge Evelio Angel Diaz**, por su dirección y apoyo, por confiar en mis capacidades al permitirme desarrollar un proyecto de vital importancia para el sector agropecuario.

A mis compañeros del Laboratorio Nacional de Análisis Molecular: Javier López, Sandra Rodríguez, Andrés Raba, Carolina Caballero, Manuel Moreno, Edison Chavarro y Julián Martínez porque conformamos un grupo de investigación interdisciplinario donde todos compartimos conocimiento y experiencia.

## **CONTENIDO**

	<b>Pág.</b>
INTRODUCCION	19
1. PROBLEMA	20
1.1 TITULO	20
1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	20
1.3 FORMULACION DEL PROBLEMA	21
1.4 JUSTIFICACION	22
1.5 OBJETIVOS	22
1.5.1 Objetivo general.	22
1.5.2 Objetivos específicos.	22
1.6 ALCANCES Y LIMITACIONES	23
1.6.1 Alcances.	23
1.6.2 Limitaciones.	24
2. MARCO REFERENCIAL	25

2.1 ANTECEDENTES	25
2.1.1 <i>Spongospora subterranea f. sp. Subterranea.</i>	25
2.1.2 <i>Rosellinia sp.</i>	26
2.2 MARCO CONCEPTUAL	27
2.2.1 La Papa.	27
2.2.2 <i>Spongospora subterranea f. sp. Subterranea</i> , agente causal de la roña de la papa.	40
2.2.3 <i>Rosellinia sp.</i> Agente causal de la mortaja blanca.	47
2.2.4 Diagnóstico molecular fitosanitario.	53
2.3 MARCO CONTEXTUAL	61
2.3.1 Localización.	61
2.4 MARCO LEGAL	62
2.4.1 Decisión 391, 2 Julio de 1996: Régimen común sobre acceso a recursos genéticos.	62
2.4.2 Decreto 1946 de Agosto 30 de 1989: Por el cual se crea y organiza el Sistema Nacional de Transferencia de Tecnología Agropecuaria	62
2.4.3 Decreto 1454 de Julio 19 de 2001: por el cual se modifica la estructura del Instituto Colombiano Agropecuario, ICA	63

2.4.4 Decreto 2141 de 1992: Por el cual se reestructura el Instituto Colombiano Agropecuario	64
2.4.5 Decreto 1840 de 1994.	67
3. DISEÑO METODOLOGICO	69
3.1 TIPO DE INVESTIGACION	69
3.2 HIPÓTESIS	69
3.3 FASES DE INVESTIGACION	69
3.3.1 Selección y estandarización de procedimientos de extracción de DNA.	69
3.3.2 Desarrollo y estandarización de las metodologías de diagnóstico para <i>Spongospora subterranea</i> .	72
3.3.3 Desarrollo y estandarización de metodologías de diagnóstico para <i>Rosellinia sp.</i>	83
4. RESULTADOS	90
4.1 SISTEMAS DE DIAGNÓSTICO ESTANDARIZADOS	90
4.1.1 Diagnóstico Molecular Cualitativo de <i>Spongospora subterranea f. sp. subterranea</i> en muestras de suelo.	90
4.1.2 Diagnóstico Molecular Cualitativo de <i>Spongospora subterranea f. sp. subterranea</i> en muestras de papa	91

4.1.3 Diagnóstico Molecular Cuantitativo de <i>Spongospora subterranea f. sp. subterranea</i> en muestras de suelo	92
4.1.4 Diagnóstico Molecular Cualitativo de <i>Rosellinia sp.</i> en muestras de suelo	93
4.1.5 Diagnóstico Molecular Cualitativo de <i>Rosellinia sp.</i> en muestras de papa	94
5. DISCUSIONES	96
5.1 EXTRACCIÓN DE DNA TOTAL DE SUELO	96
5.2 EXTRACCIÓN DE DNA TOTAL DE PERIDERMIS DE PAPA	97
5.3 PURIFICACIÓN DEL DNA	99
5.4 CONCENTRACIÓN DEL EXTRACTO DE DNA	99
5.5 DETECCIÓN DE <i>Spongospora subterranea</i> EN SUELO	99
5.6 DETECCIÓN DE <i>Spongospora subterranea</i> EN TUBÉRCULOS DE PAPA.	101
5.7 DESARROLLO Y ESTANDARIZACIÓN DE LAS METODOLOGÍAS DE DIAGNÓSTICO PARA <i>Rosellinia sp.</i>	102
5.7.1 Estandarización de las condiciones de PCR.	102
5.7.2 Detección de <i>Rosellinia sp.</i> en suelo.	103
5.7.3 Detección de <i>Rosellinia sp.</i> en tubérculo de papa.	105

5.8 ESTANDARIZACIÓN DE LA PCR COMPETITIVA PARA LA CUANTIFICACIÓN DE <i>Spongospora subterranea</i> EN SUELO.	106
5.9. ENSAYOS DE LA APLICACIÓN DE LA PCR COMPETITIVA	113
6. CONCLUSIONES	117
7. RECOMENDACIONES	119
BIBLIOGRAFIA	120
ANEXOS	132