



RESUMEN – TESIS DE GRADO

AUTOR: MANUEL GUILLERMO MORENO PÉREZ

FACULTAD: CIENCIAS AGRARIAS Y DEL AMBIENTE

PLAN DE ESTUDIOS: INGENIERÍA DE PRODUCCIÓN BIOTECNOLÓGICA

DIRECTOR: JORGE EVELIO ÁNGEL DÍAZ

TITULO DE LA TESIS: DISEÑO E IMPLEMENTACIÓN DE OLIGONUCLEOTIDOS ESPECIFICOS COMO DESARROLLO DE UN SISTEMA DE DETECCIÓN MOLECULAR DE LOS VIRUS RNA PVX, PVY Y PLRV EN PAPA (*Solanum tuberosum*) MEDIANTE TRANSCRIPCIÓN REVERSA Y REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (RT-PCR)

RESUMEN:

El presente trabajo aborda el área de la biología molecular aplicada a la detección de virus RNA, donde se muestra por primera vez en Colombia la utilización de herramientas biotecnológicas, como la bioinformática, para el diseño de iniciadores específicos, que se implementaron en la detección molecular de los virus PVX, PVY y PLRV en papa (*Solanum tuberosum*), mediante la técnica Transcripción Reversa y Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR).

CARACTERÍSTICAS:

PAGINAS: 161

PLANOS:

ILUSTRACIONES:

CD-ROM: 1

DISEÑO E IMPLEMENTACIÓN DE OLIGONUCLEOTIDOS ESPECIFICOS COMO
DESARROLLO DE UN SISTEMA DE DETECCIÓN MOLECULAR DE LOS VIRUS
RNA PVX, PVY Y PLRV EN PAPA (*Solanum tuberosum*) MEDIANTE
TRANSCRIPCIÓN REVERSA Y REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA
(RT-PCR)

MANUEL GUILLERMO MORENO PÉREZ

UNIVERSIDAD FRANCISCO DE PAULA SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS Y DEL AMBIENTE
PLAN DE ESTUDIOS DE INGENIERÍA DE PRODUCCIÓN BIOTECNOLÓGICA
SAN JOSÉ DE CÚCUTA
2005

DISEÑO E IMPLEMENTACIÓN DE OLIGONUCLEOTIDOS ESPECIFICOS COMO
DESARROLLO DE UN SISTEMA DE DETECCIÓN MOLECULAR DE LOS VIRUS
RNA PVX, PVY Y PLRV EN PAPA (*Solanum tuberosum*) MEDIANTE
TRANSCRIPCIÓN REVERSA Y REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA
(RT-PCR)

MANUEL GUILLERMO MORENO PÉREZ

Proyecto 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
2005



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: 19 DE ABRIL DE 2005

HORA: 02:00

LUGAR: 3 PISO EDIFICIO CREAD

PLAN DE ESTUDIOS: INGENIERIA DE PRODUCCION BIOTECNOLOGICA

TITULO DE LA TESIS: "DISEÑO E IMPLEMENTACION DE OLIGONUCLEOTIDOS ESPECIFICOS COMO DESARROLLO DE UN SISTEMA DE DETECCIÓN MOLECULAR DE LOS VIRUS RNA, PVX, PVY Y PLRV EN PAPA (*Solanum tuberosum*) MEDIANTE TRANSCRIPCION REVERSA Y REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (RT-PCR).

JURADOS: LILIANA Y. SUAREZ C.
YANETH ADRIANA RINCON T.
ANA MILENA GOMEZ SOTO

DIRECTOR: ING. JORGE EVELIO ANGEL

NOMBRE DEL ESTUDIANTE	CODIGO	CALIFICACION
MANUEL GUILLERMO MORENO	610033	4.8

OBSERVACIONES:
TESIS MERITORIA

FIRMA DE LOS JURADOS:

Liliana Y. Suarez C. Yaneth Adriana Rincon T. Ana Milena Gomez S.

Vo.Bo. Coordinador Comité Curricular

Jorge Evelio Angel

Al Creador, que nos dio sabiduría para comprender que la manipulación de la vida es el acto mas responsable que debe tener el hombre.

A mi madre, que con su gran amor me acompaña por el camino de la vida para llegar a ser una persona integra.

A mi familia, que son mi fuerza interna de cada día, en especial a mi tia Milena y mis abuelos Lilia y Ulpiano por su constante apoyo.

A mis amigos, que le dan alegría a cada momento de mi vida.

A usted que toma en sus manos este trabajo y con discernimiento le da vida a cada palabra en él.

Manuel Guillermo

AGRADECIMIENTOS

El autor del presente proyecto de grado expresa sus agradecimientos a:

Los integrantes del Laboratorio Nacional de Análisis Molecular ICA- Tibaitatá, por su constante apoyo intelectual y emocional.

Doctor Jorge Evélio Ángel Díaz PhD., director del Laboratorio de Análisis Molecular ICA-Tibaitatá, por su ardua colaboración y empeño para la culminación de cada uno de los objetivos.

Los integrantes del Laboratorio Nacional de Semillas, especialmente al Doctor José de Jesús Nieves PhD., por el préstamo del laboratorio para la realización de los análisis inmunológicos.

Los profesores de la facultad de ciencias agrarias y del ambiente, por formarme como profesional y persona.

La ingeniera Hazel Vergel Suárez, por su total colaboración en el desarrollo de este trabajo y su constante apoyo sentimental.

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	21
1. PROBLEMA	24
1.1 TITULO	24
1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	24
1.3 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	26
1.4 OBJETIVOS	26
1.4.1 Objetivo general	26
1.4.2 Objetivos específicos	26
1.5 JUSTIFICACIÓN	26
1.6 ALCANCES Y LIMITACIONES	28
1.6.1 Alcances	28
1.6.2 Limitaciones	28
1.7 DELIMITACIONES	29
1.7.1 Delimitación espacial	29

1.7.2 Delimitación temporal	29
1.7.3 Delimitación conceptuales	29
2. MARCO DE REFERENCIA	30
2.1 ANTECEDENTES	30
2.1.1 Virus X de la papa (PVX)	30
2.1.2 Virus Y de la papa (PVY)	30
2.1.3 Virus del enrollamiento de la hoja de la papa (PLRV)	31
2.2 MARCO CONCEPTUAL	31
2.2.1 El cultivo de papa	31
2.2.2 Virus agentes patógenos en plantas	34
2.2.3 Virus de la papa	34
2.2.4 Diagnóstico de virus	42
2.2.5 Optimización de la mezcla madre	47
2.3 MARCO CONCEPTUAL	52
2.3.1 Localización	52
2.4 MARCO LEGAL	52
2.4.1 Decreto 1946 de agosto 30 de 1989	52

2.4.2 Decreto 2141 de 1992	53
2.4.3 Decreto 1840 de 1994	54
2.4.4 Resolución 2501 (10 Set 2003)	54
3. METODOLOGIA	60
3.1 TIPO DE INVESTIGACIÓN	60
3.2 HIPOTESIS	60
3.3 FASES DE LA INVESTIGACIÓN	60
3.3.1 Recolección de muestras y ensayo inmuno-enzimático ELISA	62
3.3.2 Búsqueda de secuencias moleculares de los virus PVX, PVY y PLRV	64
3.3.3 Análisis de secuencias de los virus PVX, PVY Y PLRV	64
3.3.4 Diseño de Oligonucleótidos específicos (Iniciadores) para los virus PVY, PVX Y PLRV	64
3.3.5 Extracción de RNA total	65
3.3.6 Análisis del RNA total	66
3.3.7 Síntesis de DNA Complementario cDNA por Transcripción Reversa (RT)	66
3.3.8 Amplificación del DNA Complementario (cDNA) por la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	66

3.3.9 Estandarización de condiciones PCR para los marcadores moleculares reportados	66
3.3.10 Estandarización de condiciones de PCR para los iniciadores (Oligonucleótidos) diseñados	67
3.3.11 Análisis de resultados de PCR por electroforesis	67
3.3.12 Documentación y análisis de los resultados	67
4. RESULTADOS	68
4.1 MUESTRA	68
4.2 RESULTADOS DE ESTANDARIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN DE RNA	69
4.2.1 Análisis del RNA extraído	70
4.3 RESULTADOS DE RT-PCR CON LAS CONDICIONES E INICIADORES ESPECÍFICOS REPORTADOS EN LA LITERATURA	71
4.3.1 Resultados de RT-PCR para el virus PVY	71
4.3.2 Resultados de RT-PCR para el virus PVX	72
4.3.3 Resultados de RT-PCR para el virus PLRV	74
4.4 RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN DE CALIDAD Y ESPECIFICIDAD DE LOS INICIADORES REPORTADOS EN LA LITERATURA	76
4.4.1 Resultados de evaluación de calidad de los iniciadores propuestos para los virus PVY, PVX y PLRV	76

4.4.2 Resultados de evaluación de especificidad de los iniciadores propuestos para los virus PVY, PVX Y PLRV	76
4.5 RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS MOLECULARES DE LOS VIRUS PVX, PVY Y PLRV PARA EL DISEÑO DE INICIADORES ESPECÍFICOS PARA LA RT-PCR	79
4.5.1 Secuencias moleculares del virus	79
4.5.2 Secuencias moleculares del virus PLRV	80
4.5.3 Secuencias moleculares del virus PVY	80
4.6 RESULTADOS DEL DISEÑO DE INICIADORES ESPECÍFICOS PARA LOS VIRUS PVX, PVY Y PLRV	81
4.6.1 Iniciadores específicos diseñados para el virus PVX	81
4.6.2 Iniciadores específicos diseñados para el virus PVY	82
4.6.3 Iniciadores específicos diseñados para el virus PLRV	82
4.7 RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN DE CALIDAD Y ESPECIFICIDAD DE LOS INICIADORES DISEÑADOS PARA LOS VIRUS PVX, PVY Y PLRV	83
4.7.1 Resultados de evaluación de calidad de los iniciadores diseñados para los virus PVY, PVX y PLRV	84
4.7.2 Resultados de evaluación de especificidad de los iniciadores diseñados para los virus PVY, PVX y PLRV	84
4.8 RESULTADOS DE LA ESTANDARIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE RT-PCR PARA LOS INICIADORES DISEÑADOS	86
4.8.1 Resultado de la estandarización en la transcripción reversa (RT)	86

4.8.2 Resultados de especificidad de los iniciadores PVXF1 y PVXR1 para el virus PVX	87
4.8.3 Resultado de especificidad de los iniciadores PVYF1 y PVYR1 para el virus PVY	88
4.8.4 Resultado de especificidad de los iniciadores PLRVF1 y PLRVR1 para el PLRV	89
4.8.5 Resultado de la optimización de MgCl ₂ para el virus PVX	90
4.8.6 Resultado de la optimización de MgCl ₂ para el virus PVY	91
4.8.7 Resultado de la optimización de MgCl ₂ para el virus PLRV	92
4.8.8 Resultado de optimización de la enzima Taq Polimerasa para el virus PVX	93
4.8.9 Resultado de optimización de la enzima Taq Polimerasa para el PVY	94
4.8.10 Resultado de optimización de la enzima Taq Polimerasa para el PLRV	95
4.8.11 Resultados de concentraciones promedio y diluciones de RNA	96
4.8.12 Resultados del ensayo de sensibilidad para PVX	97
4.8.13 Resultados de ensayo sensibilidad PVY	98
4.8.14 Resultados de ensayo sensibilidad PLRV	98
4.9 RESULTADOS DE REPRODUCIBILIDAD DE LA RT-PCR PARA LOS VIRUS PVX, PVY Y PLRV CON LOS INICIADORES DISEÑADOS	99
5. DISCUSIONES	102

5.1 MUESTRA	102
5.2 EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL	103
5.3 ESTANDARIZACIÓN DE LA RT-PCR CON LOS INICIADORES ESPECÍFICOS Y CONDICIONES REPORTADOS EN LA LITERATURA	105
5.3.1 RT-PCR para el virus PVY con los iniciadores y condiciones recomendadas	105
5.3.2 RT-PCR para el virus PVX con los iniciadores y condiciones recomendadas	107
5.3.3 RT-PCR para el virus PLRV con los iniciadores y condiciones	110
5.4 DISEÑO DE INICIADORES (OLIGONUCLEÓTIDOS) ESPECÍFICOS PARA RT-PCR, DE LOS VIRUS PVX, PVY Y PLRV	111
5.5 ESTANDARIZACIÓN DE LA RT-PCR CON LOS INICIADORES ESPECÍFICOS Y CONDICIONES REPORTADOS EN LA LITERATURA	113
6. CONCLUSIONES	117
7. RECOMENDACIONES	119
BIBLIOGRAFÍA	121
ANEXOS	125