



UNIVERSIDAD FRANCISCO DE PAULA SANTANDER  
BIBLIOTECA EDUARDO COTE LAMUS



## RESUMEN - TESIS DE GRADO

**AUTORES:** MARIA FERNANDA PAZ OCHOA

**FACULTAD:** CIENCIAS AGRARIAS Y EL AMBIENTE

**PLAN DE ESTUDIOS:** INGENIERIA DE PRODUCCIÓN BIOTECNOLOGIA

**DIRECTOR:** JORGE EVELIO ANGEL DIAZ

**TITULO DE LA TESIS:** DETENCIÓN MOLECULAR DE *ROSELLINIA pepo* y *rosellinia bunodes* MEDIANTE ANALISIS DE SECUENCIASA DE OLIGONUCLIOTIDOS A PARTIR DE AMPLIFICACIONES DE REGIONES ITS<sub>1</sub> E ITS<sub>2</sub>

### RESUMEN

El presente trabajo de grado se desarrollo basándose en un diagnostico molecular fitosanitario para el manejo de enfermedades que afectan cultivos de cacao y café como lo son “La llaga estrellada ” y “la llaga negra ” causadas respectivamente por los hongos *Rosellinia pepo* y *Rosellinia bunode* y en las cuales se probaron iniciadores específicos que permitieron detectar y diferenciar estas dos especies tanto en material vegetal infectado como en suelo infestado artificialmente. En este estudio se aplicó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), y utilizando los iniciadores específicos para *Rosellinia pepo* (Rsl\_pepo2- Rsl\_pepo8) , (Rsl\_pepo2-Rsl\_pepo ) y para *Rosellinia bunodes* (Rsl\_bun4-Rsl\_bun5) obtenidos a partir de de amplificaciones de regiones ITS<sub>1</sub> e ITS<sub>2</sub>.

### CARACTERISTICAS

PAGINAS 81 PLANOS 0 ILUSTRACIONES 24 CD ROOM 1

DETENCIÓN MOLECULAR DE *Rosellinia pepo* y *Rosellinia bunodes* MEDIANTE  
ANÁLISIS DE SECUENCIAS DE OLIGONUCLEÓTIDOS A PARTIR DE  
AMPLIFICACIONES DE REGIONES ITS<sub>1</sub> E ITS<sub>2</sub>

MARIA FERNANDA PAZ OCHOA

UNIVERSIDAD FRANCISCO DE PAULA SANTANDER  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS Y DEL AMBIENTE  
PLAN DE ESTUDIOS DE INGENIERÍA DE PRODUCCIÓN BIOTECNOLÓGICA  
SAN JOSÉ DE CÚCUTA  
2006

DETENCIÓN MOLECULAR DE *Rosellinia pepo* y *Rosellinia bunodes* MEDIANTE  
ANÁLISIS DE SECUENCIAS DE OLIGONUCLEÓTIDOS A PARTIR DE  
AMPLIFICACIONES DE REGIONES ITS<sub>1</sub> E ITS<sub>2</sub>

MARIA FERNANDA PAZ OCHOA

Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de  
Ingeniera en producción Biotecnológica

Director:  
JORGE EVELIO ANGEL DIAZ  
Msc. Ph. D

UNIVERSIDAD FRANCISCO DE PAULA SANTANDER  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS Y DEL AMBIENTE  
PLAN DE ESTUDIOS DE INGENIERIA DE PRODUCCION BIOTECNOLOGICA  
SAN JOSÉ DE CÚCUTA  
2006



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:** 6 DE SEPTIEMBRE DE 2006

**HORA:** 03:00 P.M.

**LUGAR:** SALA 3 EDIFICIO CREAD

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

**TITULO DE LA TESIS:** "DETECCIÓN MOLECULAR DE *Rosellinia pepo* y *Rosellinia bunodes* MEDIANTE ANALISIS DE SECUENCIAS DE OLIGONUCLEOTIDOS OBTENIDOS A PARTIR DE AMPLIFICACIONES DE REGIONES ITS<sub>1</sub> E ITS<sub>2</sub>".

**JURADOS:** LILIANA Y. SUAREZ CONTRERAS  
FABIAN GALVIS SERRANO  
YANETH A. MUÑOZ PEÑALOZA

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

NOMBRE DEL ESTUDIANTE	CODIGO	CALIFICACION
MARIA FERNANDA PAZ OCHOA	610245	4.50

**OBSERVACIONES:**  
MERITORIA

**FIRMA DE LOS JURADOS:**

Vo.Bo. Coordinador Comité Curricular

En memoria de mi abuela Ida Maria Sánchez de Ochoa (Tata) quien fue como una segunda madre para mi.....gracias por todas tus enseñanzas.

A mis padres , Germán Alberto Paz montes , Ofelia Ochoa Sánchez, y mi hermana Maria Claudia , por ser mi gran apoyo , brindarme su confianza y acompañarme en este duro camino. Sin su ayuda no hubiese sido posible cumplir este sueño.

Maria Fernanda paz Ochoa

## **AGRADECIMIENTOS**

Expreso mis más sinceros agradecimientos a:

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

La Universidad Francisco de Paula Santander por toda la formación académica proporcionada.

Doctor Jorge Evelio Ángel Díaz, Ph.D., Director de la Unidad Fitosanitaria de Diagnóstico Molecular, ICA-Tibaitatá, por su dirección y apoyo.

Javier Andrés López por ser mi guía, brindarme su asesoría y conocimiento.

Yudtanduly Acuña Monsalve porque estuvo conmigo siempre, brindándome su amistad y apoyo incondicional.

## CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCION	18
1. TITULO	19
1.2 PROBLEMA	19
1.2 FORMULACION DEL PROBLEMA	19
1.3 OBJETIVOS	20
1.3.1 Objetivo General	20
1.3.2 Objetivos Específicos	20
1.4 JUSTIFICACION	20
1.5 ALCANCES Y LIMITACIONES	21
1.5.1 Alcances	21
1.5.2 Limitaciones	21
1.6 Delimitaciones	22

1.6.1 Delimitación Espacial	22
1.6.2 Delimitación Temporal	22
1.6.3 Delimitación Conceptual	22
2. MARCO REFERENCIAL	23
2.1 ANTECEDENTES	23
2.2 MARCO TEORICO	24
2.2.1 Cultivo de café en Colombia	24
2.2.2 cultivo de Cacao en Colombia	25
2.2.3 Biología del genero Rosellinia	27
2.2.4 Etiología de la Enfermedad	28
2.2.5 Sintomatología	29
2.2.6 Epifitologia	30
2.2.7 Control	32
2.2.8 hospederos	35
2.2.9 Biología Molecular	35

2.3 MARCO CONTEXTUAL	38
2.4 MARCO LEGAL	38
2.4.1 Decisión 391, 2 julio de 1996	38
2.4.2 Decreto 1946 de agosto 30 de 1982	39
2.4.3 Decreto 2141 de 1992	39
2.4.4 Decreto 1840 de 1994, Artículo 2	40
3. DISEÑO METODOLOGICO	41
3.1 TIPO DE INVESTIGACIÓN	41
3.2 POBLACION Y MUESTRA	41
3.2.1 Población	41
3.2.2 Muestra	41
3.3 HIPOTESIS	41
3.4 FASES DE LA INVESTIGACIÓN	41
3.4.1 Recolección y recepción de muestras	41
3.4.2 Aislamiento del patógeno	43

3.4.3 Caracterización morfológica	44
3.4.4 Cultivo en medio Sólido	44
3.4.5 Cultivo en medio líquido	44
3.4.6 Extracción del ADN del patógeno	44
3.4.7 Condiciones para la ampliación del ITSs	44
3.4.8 Visualización	45
3.4.9 Iniciadores específicos para Rosellinia y R.bunodes propuestos por (López, 2004)	45
3.4.10 Extracción de ADN de suelo u amplificadores con los indicadores específicos para cada especie	47
4. RESULTADOS	48
4.1 AISLAMIENTO OBTENIDOS	48
4.1.1 Cultivo de hongos en medio líquido	50
4.2 EXTRACCIÓN DE ADN DE Rosellinia pepo y R. Bunodes	51
4.3 AMPLIFICACIÓN DE ESPACIADORES INTERNOS DE TRANSCRITOS (ITS A E ITS B) DE Rosellinia pepo y Rosellinia bunodes.	53
4.4 DESARROLLO Y ESTANDARIZACIÓN DE LAS METODOLOGIAS DE DIAGNOSTICOS PARA Rosellinia pepo y R Bunodes	54

4.4.1 Selección de los iniciadores que generan productos de amplificación	54
4.4.2 Estandarización de las condiciones de PCR	56
4.5 AMPLIFICADORES CON INICIADORES ESPECIFICOS PARA Rosellinia Pepo y R bunodes	57
4.6 EXTRACION DE ADN DE LOS SUELOS	62
4.7 AMPLIFICACIONES EN EL SUELO CON INDICADORES ESPECIFICOS PARA Rosellinia Pepo y R bunodes	63
5. DISCUSIONES	65
6. CONCLUSIONES	68
7. RECOMENDACIONES	70
BIBLIOGRAFIA	71
ANEXOS	74