

ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**ESTANDARIZACIÓN Y OPTIMIZACIÓN DE TÉCNICAS
MOLECULARES PARA LA DETECCIÓN DE *Botrytis
cinerea*, *Ralstonia solanacearum* Y CMV (*Cucumber mosaic
cucumovirus*) EN RUBROS AGRÍCOLAS DE INTERÉS
PARA EL INIAP.**

Previa a la obtención de Grado Académico o Título de:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

ELABORADO POR:

JOHANNA LISETH BUITRÓN BUSTAMANTE

SANGOLQUÍ, Julio de 2012

RESUMEN

El objetivo principal de esta investigación fue estandarizar y optimizar técnicas de detección molecular para *Botrytis cinerea*, *Ralstonia solanacearum* y CMV que inciden en rubros agrícolas de interés para el Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP). Las técnicas empleadas se basaron en la extracción de los ácidos nucleicos del patógeno y su detección mediante PCR y sus variantes. La detección de *B. cinerea* se realizó en plantas de mora de castilla y rosas, mediante una extracción de ADN a partir de aislamientos del hongo, seguido de una PCR empleando *primers* específicos reportados. La presencia del patógeno se determinó por la amplificación de un fragmento de 750 pb, observándose un límite de detección de 0,025 ng/ μ L de ADN del patógeno en la reacción. Sin embargo, el sistema no permitió la detección del hongo a partir de ADN genómico de plantas inoculadas y asintomáticas de mora de castilla. Para la detección de *R. solanacearum*, se realizó la extracción de ADN de la bacteria aislada a partir de plantas de musáceas muestreadas en la Amazonia, seguido de una PCR con *primers* específicos reportados. La presencia de la bacteria se determinó con la amplificación de un fragmento de 553 pb y se observó un límite de detección de 0,1 ng/ μ L de ADN. Para la detección de CMV, se realizó el diseño de *primers* específicos a partir de la secuencia que codifica para la proteína de la cápside del virus. Se detectó eficientemente la presencia del virus realizando reacciones de RT y *Hemi-Nested* PCR en plantas asintomáticas, ofreciendo al sector bananero una alternativa diagnóstica de la enfermedad. La estandarización y optimización de los métodos de detección de estos fitopatógenos constituyen una herramienta para el sector agrícola, debido a que estas técnicas demostraron que ofrecen grandes ventajas en cuanto a sensibilidad y especificidad.

Palabras clave: PCR, RT-PCR, *Hemi-Nested*-PCR, límite de detección, *B. cinerea*, *R. solanacearum*, CMV

ABSTRACT

The main goal of this research was to standardize and optimize molecular techniques for the detection of *Botrytis cinerea*, *Ralstonia solanacearum* and CMV, which affect agricultural areas of interest to the INIAP (Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias). The techniques used were based on nucleic acids isolation from these pathogens and their detection through PCR and its variants. *B. cinerea* detection was performed in castilla blackberry plants (*Rubus glaucus*) and rosebushes by DNA extraction from isolates of fungus. It was followed by a PCR using reported specific primers. The pathogen presence was determined by the amplification of a 750 pb fragment, and the system's detection limit was 0,025 ng/ μ L of DNA. Unfortunately, this system was not able to detect fungus from the genomic DNA of inoculated and asymptomatic castilla blackberry plants. In order to detect *R. solanacearum*, ADN extraction from the isolate bacterium was performed in *Musa* plants, the samples of which were collected in the Amazon Region, followed by a PCR with reported specific primers. The bacterium presence was determined by the amplification of a 553 pb fragment, and it was observed a detection limit of 0,1 ng/ μ L of DNA. In order to detect CMV, specific primers were designed based on the sequence that codifies a viral capsid protein. The virus presence was detected efficiently by performing RT and Hemi-Nested PCR reactions in asymptomatic plants, which provides the banana field with an alternative diagnosis of the illness. The standardization and optimization of methods for the detection of these phytopathogens is a useful tool to the agricultural sector, since these techniques have shown to be favorable in terms of sensitivity and specificity

Keywords: PCR, RT-PCR, *Hemi-Nested*-PCR, detection limit, *B. cinerea*, *R. solanacearum*, CMV.