

INDICE GENERAL

	Página
INDICE DE CUADROS	i
INDICE DE GRAFICOS	ii
INDICE DE FIGURAS	iii
RESUMEN	vii
ABSTRACT	viii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVOS	4
2.1. Objetivo general	4
2.1.1. Objetivos específicos	4
3. HIPÓTESIS	6
4. REVISION DE LITERATURA	7
4.1. Las bibliotecas genómicas	7
4.1.1. Establecimiento y utilización en plantas de bibliotecas que contienen insertos de gran tamaño	7
4.1.1.1. Construcción de bibliotecas genómicas	7
4.1.2. Número de clonas requeridas para tener una biblioteca representativa	9
4.1.3. Vectores BAC y BIBAC	9
4.1.3.1. Vectores de tipo cromosoma bacteriano artificial (BAC)	9
4.1.3.2. Vectores de tipo cromosoma bacteriano artificial binario	10
4.1.3.3. El vector pCLD04541	12

4.2. Generalidades del género <i>Musa</i>	14
4.2.1. Importancia económica de bananos y plátanos	15
4.2.2. Distribución de la enfermedad Sigatoka negra	16
4.2.2.1. Métodos para el control de la Sigatoka negra	19
4.2.3. Cultivares de bananos resistentes que han sido modificados genéticamente	20
4.3. El papel de los genes de resistencia en plantas	22
4.3.1. Proteínas codificadas por los genes R	22
4.3.2. Organización de los genes R	23
4.3.3. Aislamiento de genes de resistencia a enfermedades	23
5. JUSTIFICACIÓN	25
6. MATERIALES Y MÉTODOS	27
6.1. Material vegetal	27
6.2. Preparación del vector pCLD04541	28
6.2.1. Purificación del vector	28
6.2.2. Corte y desfosforilación del vector	28
6.3. Preparación de células competentes de <i>E. coli</i> DH10B	29
6.4. Aislamiento de núcleos y preparación de ADN de alto peso molecular	29
6.4.1. Preparación de núcleos intactos	29
6.4.1.1. Homogenización del tejido congelado	29
6.4.1.2. Proceso para embeber los núcleos en moldes de agarosa	30
6.5. Generación de grandes fragmentos de ADN	31
6.5.1. Determinación de las condiciones de digestión parcial para generar fragmentos de 100-350 kb	32

6.5.2. Digestión parcial a gran escala del ADN de gran tamaño	
(kilobases) para clonación	33
6.5.3. Selección de tamaños de los fragmentos de ADN restringidos	
de 100 a 350 kb	34
6.5.3.1. Primera selección	34
6.5.3.2. Segunda selección	35
6.5.3.3 Diálisis de la solución de fragmentos de ADN 100-350 kb	36
6.6. Ligación de los fragmentos de ADN seleccionados al vector	
BIBAC	36
6.7. Transformación del ADN ligado al vector en células de <i>E. coli</i>	
por electroporación	36
6.8. Análisis de clonas	37
6.8.1. Procedimiento de la miniprep.	37
6.8.2. Digestión de las clonas con <i>NotI</i>	38
6.9. Organización la biblioteca de Tuu Gia	39
6.10. Determinación de la estabilidad de las clonas	39
6.11. Preparación de membranas	40
6.12. Preparación de las sondas para hibridación	40
6.12.1. Cloroplastos y mitocondrias	41
6.12.2. ADN genómico	41
6.12.3. Fragmentos ESTs de defensa	41
6.12.4. Fragmentos de RGAs	42
6.13. Hibridación de membranas con sondas marcadas con ³⁵S ATP	42
6.14. Exposición de membranas y diferenciación de señales	42

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	44
7.1. Extracción de núcleos de <i>Musa acuminata</i> Tuu Gia e inclusión en moldes de agarosa (plugs)	44
7.2. Obtención de ADN de alto peso molecular	46
7.3. Digestión parcial del ADN de alto peso	47
7.4. Selección de fragmentos de <i>M. acuminata</i> Tuu Gia para ligación	50
7.5. Preparación del plásmido ó vector pCLD04541	55
7.5.1. Linearización y desfoforilación del plásmido pCLD04541	57
7.6. Ligación del vector pCLD04541 con los fragmentos de 100-400 kb	58
7.7. Transformación de las células de <i>E. coli</i>	61
7.8. Análisis de la clonas transformadas	62
7.9. Construcción de la biblioteca BIBAC	67
7.10. Caracterización de la Biblioteca BIBAC	68
7.10.1. Determinación de tamaño promedio de inserto	68
7.10.2. Estabilidad de las clonas BIBAC	69
7.10.3. Determinación de contenido de ADN organelar en la biblioteca BIBAC de Tuu Gia	71
7.10.3.1. Contenido de ADN cloroplastídico	71
7.10.3.2. Contenido de ADN mitocondrial	72
7.10.4. Representación de ADN total	73
7.10.5. Estimación de la representación de la biblioteca en el genoma de plátano	74
7.10.6. Detección de secuencias EST y genes de resistencia en biblioteca BIBAC de Tuu Gia	75
8. CONCLUSIONES	85

9. LITERATURA CITADA	88
10. ANEXOS	96
10.1. Anexo I	96
10.1.1. Preparación de reactivos	96
10.2. Anexo II	99
10.2.1. Análisis estadístico para la determinación de tamaño promedio de inserto	99
10.3. Anexo III	101
10.3.1. Resultados de la secuenciación y comparación de las secuencias obtenidas con las encontradas en la base de datos (BLAST)	101