

## INDICE GENERAL

	Página
<b>INDICE DE CUADROS</b>	<b>i</b>
<b>INDICE DE GRAFICOS</b>	<b>ii</b>
<b>INDICE DE FIGURAS</b>	<b>iii</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>vii</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>viii</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>4</b>
<b>2.1. Objetivo general</b>	<b>4</b>
<b>2.1.1. Objetivos específicos</b>	<b>4</b>
<b>3. HIPÓTESIS</b>	<b>6</b>
<b>4. REVISION DE LITERATURA</b>	<b>7</b>
<b>4.1. Las bibliotecas genómicas</b>	<b>7</b>
<b>4.1.1. Establecimiento y utilización en plantas de bibliotecas que contienen insertos de gran tamaño</b>	<b>7</b>
<b>4.1.1.1. Construcción de bibliotecas genómicas</b>	<b>7</b>
<b>4.1.1.2. Número de clonas requeridas para tener una biblioteca representativa</b>	<b>9</b>
<b>4.1.3. Vectores BAC y BIBAC</b>	<b>9</b>
<b>4.1.3.1. Vectores de tipo cromosoma bacteriano artificial (BAC)</b>	<b>9</b>
<b>4.1.3.2. Vectores de tipo cromosoma bacteriano artificial binario</b>	<b>10</b>
<b>4.1.3.3. El vector pCLD04541</b>	<b>12</b>

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

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

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

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