

ÍNDICE

	Página
Índice de cuadros.....	vii
Índice de figuras.....	viii
Resumen.....	ix
Abstract.....	x
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
2.1 Descripción botánica del género <i>Musa</i>	4
2.1.1 Importancia social y económica del género <i>Musa</i>	4
2.2 Clasificación taxonómica de <i>Mycosphaerella fijiensis</i>	5
2.2.1 Morfología.....	7
2.3 Distribución de la Sigatoka Negra.....	8
2.4 Aspectos de variabilidad genética.....	9
2.5 Interacciones planta-patógeno.....	10
2.5.1 Hipótesis gene-gene.....	11
2.6 Gen, “Unidad de herencia”.....	11
2.6.1 Genoma.....	12
2.6.2 Genes homólogos, ortólogos y parálogos.....	12
2.7 Transportadores ABC (“ATP Binding Cassette”).....	13
2.7.1 Descripción.....	14
2.7.1.1 Estructura.....	14
2.7.2 Funciones de los transportadores ABC.....	16
2.8 La biología molecular como herramienta para el aislamiento de genes.....	17
2.8.1 Aislamiento de los ácidos nucleicos.....	17
2.8.2 PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa).....	18
2.8.3 PCR degenerada.....	21
2.8.4 Electroforesis.....	23
2.8.5 Clonación.....	24
2.8.6 Enzimas de restricción.....	24
2.8.7 Sonda.....	27
2.8.7.1 Sondas homólogas.....	27
2.8.7.2 Sondas heterólogas.....	27
2.9 Southern blot e hibridación.....	27
2.10 Análisis de secuencias de proteínas.....	30
2.11 Secuenciación.....	30

	Página
III. OBJETIVOS	32
3.1 Objetivo general	32
3.2 Objetivos específicos	32
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	34
4.1 Localidad y sitio de trabajo	34
4.2 Material Vegetal	34
4.3 Subcultivos y criopreservación	35
4.4 Extracción de ADN	36
4.5 Obtención de fragmentos de transportadores ABC	37
4.5.1 Estimación de la concentración de los “primers” KV4 y KV5	49
4.5.2 Obtención de fragmentos de transportadores ABC de <i>Mycosphaerella fijiensis</i>	41
4.5.3 Corrida electroforética	41
4.5.4 Selección y clonación de fragmentos amplificados	41
4.5.5 Extracción de plásmidos recombinantes	42
4.5.6 Criopreservación	44
4.6 Digestiones, electroforesis y transferencia	44
4.6.1 Digestión con enzima de restricción <i>Eco</i> RI	45
4.7 Purificación de plásmidos recombinantes para su secuenciación	45
4.8 Análisis de secuencias	46
4.9 Escrutinio de la biblioteca genómica BAC de <i>Mycosphaerella fijiensis</i>	46
4.9.1 Transferencia de ácidos nucleicos tipo southern	49
4.9.2 Exposición	51
4.10 Southern blot con ADNg de <i>M. fijiensis</i>	51
4.10.1 Exposición	52
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	53
5.1 Subcultivos	53
5.2 Extracción de ADN	53
5.3 Selección de “primers”	57
5.4 Obtención de fragmentos de Transportadores ABC de <i>M. fijiensis</i> por PCR degenerada y clonación	61
5.5 Selección de clones positivos, análisis por digestión y purificación del plásmido recombinante para la secuenciación	62
5.6 Secuenciación	65
5.7 Hibridación	68
5.7.1 Extracción de plásmido, digestión y transferencia	69

	Página
VI. CONCLUSIONES.....	73
VII. LITERATURA CITADA	75
VIII. ANEXOS.....	81
Anexo 1. Preparación de medios de cultivo y soluciones.....	81

RESUMEN

La Sigatoka negra es una enfermedad que afecta a los plátanos y bananos de todo el mundo, y ésta es producida por el hongo ascomiceto *Mycosphaerella fijiensis* (Morelet). Este hongo se caracteriza por producir muerte del tejido foliar durante el desarrollo de la enfermedad y en consecuencia disminuye la capacidad fotosintética de la hoja, además ocasiona la madurez prematura de los frutos y por consecuencia las pérdidas pueden alcanzar hasta el 50% de la producción total. Es importante comprender los procesos que se desarrollan a nivel molecular en este hongo y conocer que genes participan durante las etapas de infección y establecimiento. Un grupo de genes que codifican para proteínas y que están involucrados en estos procesos (infección y establecimiento), son los denominados transportadores ABC. En el presente estudio se realizaron subcultivos del hongo *Mycosphaerella fijiensis* línea "Veracruz", se extrajo el ADN genómico y se efectuaron pruebas con la técnica de la Reacción en Cadena de la polimerasa empleando "primers" degenerados hasta estandarizar la PCR, los fragmentos obtenidos, se clonaron en el vector TOPO-TA. Posteriormente a cada clona se le extrajo el plásmido, se purificó y se envió a secuenciar. Por otra parte se realizó un escrutinio de la biblioteca genómica BAC y en el ADN g de *Mycosphaerella fijiensis* para ubicar las clonas positivas en el genoma de dicho hongo. Una vez ubicadas se cultivaron en medio líquido Luria Broth y se les extrajo el plásmido, se digirieron con enzimas de restricción y se inmovilizaron en membranas de Nylon para ser hibridadas. La secuenciación de las clonas obtenidas indicó que se tratan de tres potenciales fragmentos de transportadores ABC. Los resultados obtenidos pueden servir de base para clonar los genes de interés o fragmentos más grandes que los obtenidos en el presente trabajo.