



UADY
FACULTAD DE
QUÍMICA

**“SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE UNA
BIBLIOTECA DE ADN COMPLEMENTARIO A PARTIR
DE CALLOS DE *Cocos nucifera* L. TRATADOS CON
UN INDUCTOR FÚNGICO”**

TESIS

**PRESENTADA POR
MANUEL JESÚS VALENCIA TEJERO**

**EN OPCIÓN AL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

MÉRIDA, YUCATÁN, MÉXICO

2006

BIBLIOTECA CICY

ÍNDICE	PÁGINA
RESUMEN	
INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES	
Generalidades del cocotero (<i>Cocos nucifera</i> L.).....	2
Origen y distribución.....	2
Importancia económica.....	3
Enfermedades.....	6
Estudios moleculares.....	8
Tipos de bibliotecas.....	10
Características de las bibliotecas de ADNc.....	10
OBJETIVOS	
Objetivo general.....	11
Objetivos particulares.....	11
DIAGRAMA EXPERIMENTAL.....	12
METODOLOGIA	
Inducción de callos de <i>Cocos nucifera</i> L. con quitosano.....	13
Extracción de ARN total de callos de <i>Cocos nucifera</i> L.....	13
Homogenización.....	13
Separación.....	13
Precipitación.....	14
Lavado	14
Almacenamiento.....	14
Cuantificación e integridad del ARN total.....	14
Síntesis de ADN complementario (primera cadena).....	15

	PÁGINA
Síntesis de ADN complementario de doble cadena y amplificación por reacción en cadena de la polimerasa de larga distancia (LD-PCR).....	16
Verificación de la integridad y el tamaño del ADNc.....	17
Digestión del ADNc con la enzima <i>Sfi</i> I.....	17
Fraccionamiento del ADNc de doble cadena de <i>Cocos nucifera</i> L. por cromatografía de exclusión molecular.....	18
Precipitación del ADNc de <i>Cocos nucifera</i> L. fraccionado por cromatografía de exclusión molecular con acetato de sodio	18
Ligación del ADNc al vector de clonación λ TriplEx2	19
Empaquetamiento del λ TriplEx2 contenido al ADNc de <i>Cocos nucifera</i> L. a la cápside del fago lambda (fago- λ).....	20
Titulación a las ligaciones de la biblioteca de ADNc.....	20
Transfección.....	21
Amplificación de la biblioteca de ADNc de <i>Cocos nucifera</i> L.....	22
Titulación de la biblioteca amplificada de ADNc	23
Transfección.....	23
Análisis del tamaño de los insertos contenidos en la biblioteca de ADNc de callos de <i>Cocos nucifera</i> L. mediante el ensayo de reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	23
Transformación de clonas fágicas de la biblioteca de ADNc a clonas plasmídicas mediante el procedimiento de escisión <i>in vivo</i>	26
Digestión de los plásmidos recombinantes con enzimas de restricción <i>Eco</i> RI y <i>Hind</i> III.....	27

	PÁGINA
RESULTADOS	
Extracción de ARN total de callos de <i>Cocos nucifera</i> L. tratados con quitosano.....	28
Síntesis de ADNc (primera cadena) de callos de <i>Cocos nucifera</i> L.....	29
Síntesis de ADN complementario de doble cadena de <i>Cocos nucifera</i> L., amplificación por reacción en cadena de la polimerasa de larga distancia (LD-PCR) y verificación de su integridad y el tamaño del ADNc.....	30
Fraccionamiento del ADNc de doble cadena de <i>Cocos</i> <i>nucifera</i> L. por cromatografía de exclusión molecular.....	31
Digestión del ADNc de doble cadena con la enzima de restricción <i>Sfi</i> I y fraccionamiento por cromatografía de exclusión molecular.....	33
Ligación del ADNc de <i>Cocos nucifera</i> L. al vector de clonación pTriplEx2, su empaquetamiento al fago lambda (fago- λ) y determinación del título para ambas ligaciones de la biblioteca	34
Transformación de clonas fágicas de la biblioteca de ADNc a clonas plasmídicas mediante el procedimiento de escisión <i>in vivo</i>	39
Secuencia nucleotídica de la muestra 5-1.....	41
Secuencia deducida de aminoácidos.....	43
Comparación de la secuencia 5-1 con otras cinco secuencias reportadas en un banco de datos.....	44
Alineamiento de la secuencia deducida de aminoácidos de la clona 5-1.....	45

	PÁGINA
DISCUSIONES.....	46
CONCLUSIONES.....	48
PERSPECTIVAS.....	49
ANEXO I.....	50
ANEXO II.....	51
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54

RESUMEN

Dado que los mecanismos de resistencia al ataque por patógenos en *Cocos nucifera* L., no se conocen; se generó una herramienta valiosa, como es el caso de la síntesis y caracterización de una biblioteca de ADNc que nos permita de ser posible, entender en el nivel molecular cuáles podrían ser los procesos que se activan o desencadenan dentro de las células de callo de cocotero, una vez que es percibida la presencia extracelular de productos derivados de microorganismos patógenos, de ahí la importancia de utilizar como inductor fúngico un compuesto semejante que tienen los insectos y hongos y que simula un ataque por patógenos en el presente modelo de estudio como lo es el quitosano.

Una vez obtenida la síntesis de dicha biblioteca de ADNc, se analizó utilizando las unidades formadoras de placa de lisis que se obtuvieron al hacer la titulación de la biblioteca, mediante la técnica de PCR se obtuvieron y seleccionaron los fragmentos de más de 1,000 pares de bases para su posterior transformación, de clonas fágicas a clonas plasmídicas mediante el procedimiento de escisión *in vivo* y una vez obtenidos los plásmidos recombinantes, purificarlos y mandarlos para su secuenciación; De esta biblioteca que se analizó, se obtuvo una secuencia nucleotídica que codifica a una proteína denominada fosfatasa del tipo 2C, aún cuando no sabemos cuál es la función de esta proteína en el metabolismo del cocotero, hay indicios en otros sistemas de las funciones de este tipo de proteínas; por ejemplo, la fosforilación y desfosforilación de una proteína sirve a menudo como encendido y apagado en la regulación de las actividades celulares y tal vez debido a que guarda cierta similitud con otras especies, podría inferirse que esta función la podría estar llevando a cabo el cocotero.