

ÍNDICE

	Pág.
Resumen	v
Introducción	1
CAPÍTULO 1 ANTECEDENTES	
1.1 Origen y Distribución del Cocotero	4
1.2 Importancia económica del Cocotero	6
1.3 Amarillamiento Letal del Cocotero	7
1.4 Interacción Planta-patógeno	8
1.4.1 Sistemas vegetales de defensa contra patógenos	8
1.4.1.1 Defensas previas de las Plantas	9
1.4.1.2 Defensas inducibles por la infección	9
1.4.1.2.1 La respuesta de Hipersensibilidad (HR)	10
1.4.1.2.2 Respuesta Sistémica Adquirida	12
1.4.2 Genes de Defensa	13
1.4.2.1 Genes de Resistencia (genes R)	13
1.4.2.2 Proteínas relacionadas con la Patogénesis (proteínas PR)	14
1.4.3 Estrategias utilizadas por los Patógenos	16
1.5 Inductores	19
1.5.1 Quitina	22
1.5.2 Quitosano como inductor de las respuestas de defensa	22
1.6 Bibliotecas de ADNc	24
1.6.1 Tipos de Bibliotecas	24
1.6.2 Clonación de genes	25
1.6.3 Características de una buena biblioteca de ADNc	26

1.6.4 Estrategia para síntesis de una biblioteca de ADNc	27
1.7 Objetivos	28
Objetivo general	28
Objetivos particulares	28

CAPITULO 2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Materiales	29
2.1.1 Material biológico	29
2.2 Diseño experimental	30
2.3 Métodos	31
2.3.1 Inducción de callos de <i>Cocos nucifera</i> L. con quitosano	31
2.3.2 Extracción de ARN de los callos de <i>Cocos nucifera</i> L. inducidos con quitosano	31
2.3.3 Cuantificación y Comprobación de la Integridad del ARN total	32
2.3.4 Síntesis del ADN complementario (primera cadena)	33
2.3.5 Síntesis de la segunda cadena de ADN y Amplificación por reacción en cadena de la Polimerasa de Larga Distancia (LD-PCR)	34
2.3.6 Verificación de la Integridad y el Tamaño del ADNc de doble cadena	35
2.3.7 Digestión del ADNc con la enzima <i>Sfi</i> I	35
2.3.8 Fraccionamiento del ADNc digerido, mediante cromatografía de exclusión molecular	36
2.3.9 Precipitación del ADNc fraccionado	37
2.3.10 Ligación del ADNc de <i>Cocos nucifera</i> L. al vector de clonación λ TripEx2	38
2.3.11 Empaquetamiento del ADNc recombinante	39
2.3.12 Titulación de las ligaciones de la biblioteca de ADNc	40
2.3.13 Transfección	40

2.3.14	Amplificación de la biblioteca de ADNc	41
2.3.15	Titulación de la biblioteca de ADNc amplificada	43
2.3.16	Análisis del tamaño de los insertos contenidos en la biblioteca de ADNc, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	43
2.3.17	Transformación de clonas fágicas a clonas plasmídicas mediante el procedimiento de escisión <i>in vivo</i>	46
2.3.18	Digestión de los plásmidos recombinantes con las enzimas de restricción <i>Eco RI</i> y <i>Hind III</i>	46
2.3.19	Comparación de las secuencias de ADNc de diferentes insertos y comprobación de la clonación de genes de defensa	48

CAPITULO 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1	Síntesis de la biblioteca de ADNc	49
3.1.1	Extracción de ARN total de callos de <i>Cocos nucifera</i> L. tratados con quitosano	49
3.1.2	Síntesis de ADNC de cadena sencilla de callos de <i>Cocos nucifera</i> L.	50
3.1.3	Síntesis de ADNc por LD-PCR	51
3.1.4	Digestión del ADNc de doble cadena con la enzima de restricción <i>Sfi I</i> y fraccionamiento por cromatografía de exclusión molecular	52
3.1.5	Ligación del ADNc de <i>Cocos nucifera</i> L. al vector de clonación λ Triplex2 y empaquetamiento del ADNc recombinante	53
3.1.6	Titulación de las ligaciones de la biblioteca de ADNc	55
3.2	Caracterización de la biblioteca de ADNc	57
3.2.1	Tamaño promedio de los insertos	57
3.2.2	Presencia de marcos de lectura completos (ORFs)	60
3.2.3	Presencia de secuencias de genes de defensa contra patógenos	62

Conclusiones	66
Referencias Bibliográficas	68
Anexos	74

Resumen

Al igual que otras especies vegetales de importancia económica, *Cocos nucifera* L., comúnmente conocida como coco o cocotero es atacada por múltiples patógenos, entre los que se destacan los fitoplasmas causantes del Amarillamiento Letal (AL).

El estudio de la interacción planta-patógeno en diversas especies ha ayudado a comprender los procesos de defensa que de manera natural ocurren, y de esta manera conocer y llegar a resolver problemas que se presentan en las plantas como consecuencia de la infección. En tal sentido, la utilización de técnicas de Biología Molecular ha demostrado ser una estrategia muy valiosa pues mediante ella se pueden identificar y aislar genes responsables de la infección y de la protección contra las enfermedades.

Las bibliotecas de ADN complementario constituyen la herramienta más poderosa para el aislamiento de genes. En el presente trabajo se sintetizó una biblioteca de ADNc a partir de RNA extraído de callos de *Cocos nucifera* L. tratados con quitosano. Este inductor es empleado para simular un ataque por patógenos, debido a que se ha demostrado que en otros sistemas induce respuestas de defensa. Dicha biblioteca se analizó en busca de genes que pudiesen ser expresados como respuesta al tratamiento con quitosano.