

ÍNDICE

	Pag.
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO 1 ANTECEDENTES	
1.1 Modelo de estudio	2
1.2 Usos del cocotero	3
1.3 Agentes dañinos	4
1.4 Interacción planta-patógeno	5
1.4.1 Muerte celular programada	6
1.4.2 Resistencia sistémica adquirida	8
1.4.3 Resistencia específica o interacción gen-gen	10
1.4.4 Proteínas relacionadas con la patogénesis (proteínas PR)	11
1.4.5 Interacción no específica	13
1.5 Inductores	13
1.5.1 Quitina	15
1.5.2 Quitosano como inductor de las respuestas de defensa	15
1.6 Análisis de la expresión génica diferencial	17
1.6.1 Transcripción génica	17
1.6.2 Inicio de la transcripción por la RNA polimerasa II	19
1.6.3 Regulación de la expresión genética	20
1.6.4 Factores de la transcripción	21
1.6.5 Procesamiento del ARNm	23
1.6.6 La adición del casquete al precurso del ARNm	24
1.6.7 La poliadenilación del ARNm	24
1.6.8 El “splicing” o empalme del ARN mensajero	25
1.7 Síntesis de proteínas y traducción	26
1.7.1 El código genético	26
1.7.2 El ARN de transferencia	27

1.7.3 Los ribosomas	28
1.7.4 Eventos en la traducción	29
1.8 Métodos para el estudio de la expresión de genes	30
1.8.1 Despliegue diferencial	32
1.9 Justificación	34
1.10 Objetivo	35
Objetivos generales	35
Objetivos específicos	35

CAPITULO 2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Materiales	36
2.1.1 Material biológico	36
2.1.2 Medio de cultivo	36
2.1.3 “Paquete” de biología molecular	37
2.2 Métodos	37
2.2.1 Preparación del inductor (quitosano)	37
2.2.2 Tratamiento de los callos con el inductor quitosano	39
2.2.3 Extracción de ARN total	41
2.2.4 Síntesis del ADNc por la transcriptasa reversa	43
2.2.5 Amplificación del ADNc por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	44
2.2.6 Fraccionamiento de las muestras de ADNc por electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida	45
2.2.7 Tinción del gel de poliacrilamida	46
2.2.8 Análisis y reamplificación por PCR de las bandas diferenciales	46
2.2.9 Ligación de los fragmentos de ADNc, transformación de bacterias y clonación de los mismos	47
2.2.10 Verificación de la presencia del inserto en el plásmido	49
2.2.11 Análisis de las secuencias clonadas	49

CAPITULO 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

3.1 Extracción de ARN total	50
3.2 Síntesis de la primera cadena de ADNc	53
3.3 Amplificación del ADNc	55
3.4 Electroforesis en geles denaturalizantes de poliacrilamida	55
3.5 Tinción con plata	55
3.6 Análisis de las bandas diferenciales	57
3.7 Reamplificación por PCR de las bandas diferenciales	59
3.8 Transformación bacteriana, clonación de fragmentos y mini preparación plasmídica	62
3.9 Reamplificación por PCR con cebadores universales M13	63
3.10 Secuenciación y análisis de los ADNc clonados	64
3.10.1 Clona G1-a.	65
3.10.2 Clona G5-a	68
3.10.4 Clona G1-c	70
CONCLUSIONES	74
BIBLIOGRAFÍA	75
ANEXOS	81

RESUMEN

Muchos han sido los estudios sobre los mecanismos de defensa de las plantas y sobre el cómo éstos son activados al estar en contacto con bacterias, virus, con nematodos y con otros animales.

Cuando un microorganismo causa una enfermedad en el hospedero se dice que ambos tienen una interacción compatible; de lo contrario, si la planta hospedadora activa una batería de defensas impidiendo la multiplicación del microorganismo, se dice que tienen una interacción incompatible. En una relación de incompatibilidad entre la planta y el patógeno se establecen diversos mecanismos inducibles, algunos ejemplos son la respuesta de hipersensibilidad y la respuesta sistémica adquirida, así como la síntesis de proteínas de resistencia y la formación de papilla en la pared celular que impide el paso del patógeno.

Flor demostró en 1971 que la resistencia del lino ante el hongo patógeno *Melampsora lini* es consecuencia de la interacción del producto de un gen R de la planta y el producto de un gen *Avr* del patógeno, a esta hipótesis se le conoce actualmente como interacción gen a gen (Staskawicz et al 1995).

Muchas plantas han sido utilizadas como modelo de estudio como por ejemplo arroz y tabaco; sin embargo, hasta ahora no se ha reportado ninguno de los eventos moleculares que se presentan al interaccionar algún patógeno del ambiente con el cocotero, el cual es una planta del trópico de gran importancia económica pero con una gran lista de enfermedades causada por los patógenos del ambiente.

El presente trabajo, está comprendido dentro de un proyecto global cuyos objetivos incluyen la identificación de genes que participen en la detección de patógenos o en las respuestas de defensa. Para ello se estableció un modelo de inducción en el cual se adicionó el elicitor quitosano (un inductor de origen fúngico) a callos de cocotero para evaluar los cambios en la expresión génica mediante la técnica del despliegue diferencial. Entre los resultados obtenidos se encuentra la identificación de secuencias correspondientes a una alfa-tubulina, a una oxidasa alternativa y a una proteína cinasa putativa, los correspondientes transcritos se acumulan como respuesta a la presencia del quitosano y se sugiere que de alguna forma participan en la respuesta de defensa de la planta por ser inducidos por el inductor fúngico.