

ÍNDICE

	Pag.
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
CAPITULO I. ANTECEDENTES	4
1.1 Descripción y composición de <i>Capsicum chinense</i> Jacq.	4
1.2 Importancia económica y beneficios.	4
1.3 Usos, aplicaciones y propiedades.	4
1.4 Adaptación de <i>Capsicum chinense</i> Jacq.	5
1.5 Plagas y enfermedades.	5
1.6 Enzimas que permiten la manipulación del ADN.	7
1.7 Vectores de clonación.	8
1.7.1 Vectores co-integrativos.	8
1.7.2 Vectores binarios.	8
1.8 Los genes reporteros.	9
1.8.1 Uso de genes reporteros.	10
1.8.2 Ventajas del uso de los genes reporteros.	10
1.8.3 El ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil β -glucuronico (x-gluc).	10
1.9 Transformación de plantas.	11
1.9.1 Transformación genética de plantas.	12
1.10 Métodos de transformación genética.	12
1.10.1 Electroporación.	12
1.10.2 Biobalística.	13
1.10.3 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .	13
1.11 Estructura del plásmido Ti.	14
1.12 Transferencia de genes mediadas por <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .	15
1.13 Método de cocultivo.	16
1.14 Justificación.	17
CAPITULO 2. OBJETIVO	18
2.1 Objetivo general.	18
2.2 Objetivos Específicos.	18
Diseño experimental	19
CAPITULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS	20
3.1 Materiales.	20
3.2 Equipos.	20

3.3 Material Biológico.	20
3.4 Reactivos.	22
3.5 Métodos	22
3.5.1 Minipreparación de DNA plasmídico de <i>E. coli</i> mediante absorción de sílica.	
3.5.2 Transformación de <i>E. coli</i> por medio de choque térmico.	23
3.5.3 Transformación de <i>E. coli</i> con el pTriPlex (gen PR10)	24
3.5.4 Transformación estable con la construcción de pCAMex::PR10.	24
3.5.5 Purificación del gen de la esterasa y del plásmido pCAMex del gel de agarosa por método de QIAEX II.	24
3.5.6 Transformación estable de explantes de tabaco.	25
3.5.7 Transformación de chile habanero (<i>Capsicum chinense</i>).	26
3.5.8 Prueba histoquímica de GUS	27
3.5.9 Transformación de hipocotilos de chile habanero por medio de aplicación por presión.	27
3.5.10 Transformación estable de tabaco (<i>Nicotiana tabacum</i>).	27
3.5.11 Proceso por el cual se logró la regeneración de plántulas de tabaco. (pCAMex::PR10)	28
3.5.12 Transformación de tabaco mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .	28
3.5.13 Prueba histoquímica de GUS	28
3.5.14 Tinción histoquímica de GUS	28
CAPITULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	29
4.1 Subclonación del gen PR10 del vector pTriplEx2 hacia el vector binario pCAMex.	29
4.2 Subclonación del gen de la Esterasa de <i>Capsicum chinense</i> al vector pCAMex.	37
4.2.1 Transformación de células competentes de <i>E. coli</i> , con el plásmido pCAMex y pTriplEx2::Est.	37
4.2.2 Minipreparación del ADN plasmídico de <i>Escherichia coli</i> mediante absorción de sílica.	38
4.2.3 Digestión del plásmido pTriplEx2::Est con las enzimas <i>Xba</i> I y <i>Kpn</i> I	38
4.2.4 Digestión de los plásmidos pTriplEx2::Est y pCAMex con las enzimas <i>Sac</i> I, <i>Xba</i> I y <i>Kpn</i> I.	40
4.2.5 Ligación directa del gen de la Esterasa en el vector binario pCAMex, inactivando las enzimas de restricción.	40
4.2.6 Plásmidos extraídos de células transformadas de la ligación del vector pCAMex y el gen de la Esterasa.	41
4.2.7 Escisión del plásmido pCAMex::Est con las enzimas <i>Xba</i> I y <i>Kpn</i> I.	41

4.2.8 Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> con el plásmido pCAMex::Est y pCAMex	42
4.2.9 Verificación de la transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> con el plásmido pCAMex::Est	43
4.2.10 Reacción de escisión del gen de la Esterasa y linearización del vector pCAMex	44
4.3 Transformación de cepas de <i>A. tumefaciens</i> con los vectores binarios conteniendo los genes de interés.	45
4.4 Transformación de Chile habanero con el gen PR10	46
4.4.1 Transformación de tabaco con el gen PR10	47
4.4.2 Transformación de chile habanero y tabaco con el gen de la esterasa.	48
4.4.3 Regenerantes de tabaco con el plásmido pCAMBIA.	49
4.4.4 Transformación estable de tabaco con la construcción pCAMex::PR10.	50
CONCLUSIONES	51
ANEXOS	52
Inoculación de bacterias	52
Material de resguardo pCAMex y pCAMBIA2301	52
Preparación de células competentes <i>E.coli</i>	52
Preparación de células competentes de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	53
Medio LB líquido (Luria-Bertani Médium) <i>Escherichia coli</i> .	53
Medio LB sólido (Luria-Bertani Médium) <i>Escherichia coli</i> .	53
Componentes del medio YEB	54
Medios de cultivo para chile habanero “ <i>in vitro</i> ”	54
Medios de cultivo para tabaco “ <i>in vitro</i> ”	55
Componentes del medio M9	55
Componentes del medio S.O.C.	55
Hormonas utilizadas para adicionar en medios de tabaco	56
Lista de antibióticos utilizados como agentes selectivos.	56
Asepsia de semillas de chile habanero	56
Desinfestación de semillas de tabaco	57
Transformación de la bacteria de <i>E.coli</i> con el vector pCAMex y/o pCAMBIA2301	57
Componentes de geles de agarosa para electroforesis.	57
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

ÍNDICE DE FIGURAS	Pag.
Figura 1. Vector pTriplEx2	20
Figura 2. Vector binario pCAMex	21
Figura 3. Vector pCAMBIA	21
Figura 4. Plásmido pTriPlEx2::PR10 aislado de diferentes colonias de <i>E.coli</i>	29
Figura 5. Digestión de los plásmidos con diferentes enzimas de restricción.	30
Figura 6. Análisis de la integridad de los vectores receptores	31
Figura 7. Digestión de los vectores donador y receptor para la subclonación del gen PR10 de chile habanero.	32
Figura 8. Purificación de los fragmentos de interés	32
Figura 9. Digestión de los plásmidos donador y receptor	33
Figura 10. Generación del plásmido pCAMex::PR10	34
Figura 11. Verificación de la subclonación del gen PR10 al vector binario pCAMex	35
Figura 12. Comprobación de la construcción del plásmido pCAMex:: PR10.	36
Figura 13. Representación de la integración del ADNc del gen PR10 en el plásmido pCAMex de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .	36
Figura 14. Plásmidos pCAMex y pTriPlEx2::Est.	38
Figura 15. Doble digestión de pCAMex y pTriPlEx2::Est. con <i>Xba I</i> y <i>Kpn I</i> .	39
Figura 16. Digestión de los plásmidos pCAMex y pTriPlEx2::Est. con las enzimas <i>Xba I</i> y <i>Kpn I</i> y <i>Sac I</i>	40
Figura 17. Aislamiento de plásmidos recombinantes	41
Figura 18. Digestión de los plásmidos aislados con <i>Xba I</i> y <i>Kpn I</i>	42
Figura 19. Plásmidos extraídos de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	43
Figura 20. Plásmidos extraídos de <i>E. coli</i> por Minipreparación por absorción de sílica.	44
Figura 21. Escisión de los plásmidos pCAMex::Est y pCAMex con las enzimas <i>Xba I</i> y <i>Kpn I</i>	44
Figura 22. Representación esquemática lineal del vector pCAMex::Est integrado en <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	45
Figura 23. Representación del crecimiento de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> y <i>E. coli</i> en cajas petri.	45
Figura 24. Transformación genética de <i>Capsicum chinense</i> por infiltración en la vena de la hoja con jeringa de insulina y por	46

presión

Figura 25. Transformación genética de <i>Nicotiana tabacum</i> con el plásmido pCAMex y la construcción pCAMex::PR10.	47
Figura 26. Transformación genética de <i>Capsicum chinense</i> con pCAMex::Est y <i>Nicotiana tabacum</i>	48
Figura 27. Crecimiento de brotes de tabaco	49
Figura 28. Transformación estable de tabaco con la construcción pCAMex::PR10	50

RESUMEN

Con relación a las plantas susceptibles al ataque de diversos patógenos como son los virus, hongos y bacterias, se ha visto la necesidad de tener plantas que sean resistentes a dichos ataques, en las cuales se ha observado la actividad de genes relacionados con la patogénesis como son la proteína PR10 y la esterasa, cuya actividad inhibitoria de apresorios también participa en la defensa contra el ataque de hongos. Se ha observado que las plantas activan sus genes de defensa al ser atacados por patógenos.

La clonación de los genes PR10 y esterasa en el vector binario pCAMex son de gran interés con el propósito de introducirlos y hacer que se sobreexpresen, con el objetivo de conferir a las plantas transformadas mayor tolerancia contra los patógenos, proporcionando todo lo necesario para su expresión eficiente en las plantas.

Para la transformación de plantas se ha venido utilizando a la bacteria *A. tumefaciens*, que se ha demostrado que penetra los tejidos vegetales lesionados introduciendo así los genes que se desean en las células vegetales.