

## CONTENIDO

6

Portadilla

Carta de autorización de impresión

Dedicatorias ..... iii

Agradecimientos ..... iv

Contenido ..... v

Índice de tablas ..... viii

Índice de figuras ..... ix

**RESUMEN** ..... x

**ABSTRACT** ..... xi

**I. INTRODUCCIÓN** ..... 1

1.1 generalidades ..... 1

1.2 Objetivos ..... 2

1.2.1 Objetivo general ..... 2

1.2.2 Objetivos particulares ..... 2

1.3 Hipótesis ..... 2

1.4 Justificación ..... 3

1.5 Programa y cronograma ..... 4

**II. REVISIÓN DE LITERATURA** ..... 5

2.1 Antecedentes ..... 5

2.2 Daños por baja temperatura ..... 6

2.3 Principios de clonación molecular ..... 7

2.4 Técnicas de identificación de ácidos nucleicos ..... 8

2.4.1 Sondas de ácidos nucleicos .....	8
2.4.2 Hibridación de ácidos nucleicos .....	8
2.4.3 Hibridación de colonias bacterianas .....	9
2.4.4 Hibridación tipo Dot Blot .....	9
2.4.5 Hibridación tipo Southern blot .....	10
2.5 Diseño experimental .....	11
<b>III MATERIALES Y METODOS .....</b>	<b>12</b>
3.1 Dilución óptima de la biblioteca de ADNc .....	12
3.2 Preparación de la sonda .....	12
3.2.1 Obtención de plásmidos .....	12
3.2.2 Purificación del inserto .....	13
3.2.3 Marcaje de sonda .....	13
3.3 Primera Ronda de Selección de Genes Específicos .....	14
3.3.1 Escrutinio de colonias en cajas de Petri .....	14
3.3.2 Hibridación de ácidos nucleicos utilizando colonias bacterianas .....	14
3.4 Segunda Ronda de Selección de Genes Específicos .....	15
3.4.1 Hibridación de ácidos nucleicos tipo Dot-blot .....	15
3.5 Tercera Ronda de Selección de Genes de específicos .....	16
3.5.1 Hibridación de ácidos nucleicos tipo Southern blot .....	16
3.6 Secuenciación y Análisis Bioinformático .....	17
<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>18</b>
4.1 Determinación de la dilución óptima de la biblioteca de ADNc .....	18

4.2 Hibridación de ácidos nucleicos utilizando colonias bacterianas . . . . .	18
4.3 Hibridación de ácidos nucleicos tipo Dot Blot . . . . .	20
4.4 Hibridación de ácidos nucleicos tipo Southern blot . . . . .	22
4.5 Análisis bioinformático . . . . .	24
<b>V. CONCLUSIONES . . . . .</b>	<b>30</b>
<b>VI. BIBLIOGRAFÍA . . . . .</b>	<b>31</b>
<b>VII. ANEXOS . . . . .</b>	<b>33</b>
7.1 Preparación de medio LB . . . . .	33
7.2 Solución de desnaturalización (1L) . . . . .	33
7.3 Solución de neutralización (1L) . . . . .	33
7.4 Preparación de solución SSC 20X . . . . .	33
7.5 Preparación de TE 1X (1L) . . . . .	33
7.6 Solución de depurinacion (1L) . . . . .	34
7.7 Preparación de TENS . . . . .	34
7.8 Amortiguador de carga 6X (DYE) . . . . .	34
7.9 Preparación de buffer primario (1 Lt) . . . . .	34
7.10 Preparación de buffer secundario (1lit) . . . . .	34
7.11 Preparación de TAE 50X (Tris-acetate) (1L) . . . . .	35
7.12 Amortiguador de hibridación . . . . .	35
7.13 Purificación del inserto mediante el Mini Elute gel Extraction Kit (Qiagen) .	35

## RESUMEN

Los plátanos son plantas cuyo crecimiento requiere de temperaturas cálidas. Es bien conocido que al presentarse un descenso de temperatura, estos cultivos se ven afectados, observándose diferentes alteraciones o desordenes fisiológicos.

En el presente trabajo nos propusimos identificar y aislar genes que se expresan a estas bajas temperaturas a través del escrutinio de una biblioteca de *Musa balbisiana*.

A través de esta biblioteca de ADNc de *Musa balbisiana* y utilizando como sondas los insertos contenidos en el plásmido pGEM-T-Easy; los cuales para los fines de este trabajo se les denominó 32-9, M-68 y M-78, se hizo una identificación de colonias positivas las cuales mostraron señales quimioluminiscentes. Se recuperaron estas colonias para ser sometidas a una hibridación de ácidos nucleicos tipo Dot-blot y posteriormente Southern blot. El escrutinio permitió aislar y secuenciar 9 clones. Las posibles secuencias de los clones aislados no presentaron homología con algún gen en particular involucrado en mecanismos de estrés por frío.