

CONTENIDO

Página

RECONOCIMIENTOS. _____	iv
DEDICATORIAS. _____	v
AGRADECIMIENTOS. _____	vii
ÍNDICE DE CUADROS. _____	xii
ÍNDICE DE FIGURAS. _____	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS. _____	xv
RESUMEN. _____	xvii
SUMMARY. _____	xviii
I. INTRODUCCIÓN. _____	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA. _____	3
2.1. Cafeto. _____	3
2.1.1. <i>Coffea arabica</i> L. _____	3
2.1.2. Producción mundial. _____	5
2.2. El aluminio en el suelo. _____	8
2.2.1. El aluminio en la planta. _____	9
2.2.2. Absorción del aluminio. _____	10
2.2.3. Toxicidad del aluminio en <i>Coffea arabica</i> L. _____	11
2.3. Cultivos <i>in Vitro</i> de tejidos vegetales. _____	13
2.4. Transducción de señales. _____	14
2.5. Fosfolipasas. _____	17
2.5.1. Fosfolipasa C (PLC). _____	18
2.5.2. PLC en plantas. _____	19
2.5.3. PLC en cafeto. _____	22
III. HIPÓTESIS. _____	23
IV. OBJETIVOS. _____	24
4.1. Objetivos generales. _____	24
4.1.1. Objetivos particulares. _____	24
V. MATERIALES Y MÉTODOS. _____	25

5.1. Mantenimiento y cultivo de la línea celular. _____	25
5.1.1. Extracción de ARN total de células en suspensión (línea L2) de café. _____	26
5.2. Síntesis de ADNc por Transcripción Reversa. _____	27
5.2.1. Amplificación por PCR del fragmento de PLC. _____	28
5.3. Electroforesis de ADN en geles de agarosa. _____	30
5.4. Descripción del vector pTYB1. _____	31
5.5. Purificación de ADN en geles de agarosa. _____	33
5.6. Ligación del gen de la PLC con el vector pTYB1. _____	34
5.7. Preparación de células competentes. _____	35
5.7.1. Transformación de la cepa ER2566 con el vector pTYB1. _____	36
5.7.2. Análisis de las células transformadas a través de la amplificación por PCR en colonia. _____	37
5.7.3. Extracción del ADN de plásmido. _____	38
5.8. Expresión del fragmento proteico de la PLC. _____	39
5.8.1. Cuantificación de proteínas. _____	40
5.8.2. Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes. _____	41
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN. _____	43
6.1. Células en suspensión de café (<i>Coffea arabica</i> L.). _____	43
6.2. Transcripción Reversa para la síntesis del ADNc. _____	44
6.3. Fragmento Amplificado por PCR. _____	45
6.4. Secuenciación del fragmento amplificado. _____	48
6.4.1. Búsqueda de la identidad y alineamiento de las secuencias de aminoácidos. _____	51
6.5. Clonación del fragmento de ADN de la PLC de café (CaPLC) en un vector de expresión. _____	54
6.6. Transformación de células competentes. _____	56
6.7. Minipreps de las colonias positivas con pTYB1::CaPLC. _____	59
6.8. Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). _____	60
VII. CONCLUSIONES. _____	63

