

CONTENIDO

	Pág.
LISTA DE FIGURAS.....	iii
LISTA DE CUADROS.....	iv
RESUMEN	v
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	4
2.1 CAFÉ.....	4
2.1.1 HISTORIA.....	4
2.1.2 PRODUCCIÓN MUNDIAL.....	4
2.1.3 EL CAFÉ EN MÉXICO.....	5
2.1.4 BIOLOGÍA DEL CAFÉ	9
2.1.4.1 Taxonomía	9
2.1.5 PLAGAS Y ENFERMEDADES DEL CAFÉ.....	10
2.1.6 PROBLEMÁTICAS DEL CAFÉ.....	11
2.2 CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES.....	14
2.2.1 HISTORIA.....	14
2.2.2 MEDIO DE CULTIVO.....	16
2.2.3 CULTIVO DE CALLOS	19
2.2.4 CULTIVO DE CÉLULAS EN SUSPENSIÓN.....	20
2.2.4.1 Inducción, establecimiento y desarrollo del cultivo de células en suspensión.....	20
2.2.4.2 Sistemas de cultivo para células en suspensión.....	21
2.3 PROTOPLASTOS.....	23
2.3.1 HISTORIA.....	23
2.3.2 MATERIAL INICIAL PARA LA OBTENCIÓN DE PROTOPLASTOS....	25
2.3.2.1 Material de campo.....	25
2.3.2.2 Brotes de cultivos in vitro.....	25
2.3.2.3. Suspensiones celulares.....	26
2.3.3 AISLAMIENTO DE LOS PROTOPLASTOS.....	26
2.3.3.1 Plasmólisis.....	26
2.3.3.2 Métodos mecánicos.....	27
2.3.3.3 Métodos enzimáticos.....	28
2.3.4 PURIFICACIÓN DE LOS PROTOPLASTOS AISLADOS.....	29
2.3.5 VIABILIDAD DE LOS PROTOPLASTOS.....	30
3. OBJETIVOS.....	32
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	33
4.1 MATERIALES.....	33
4.1.1 MATERIAL BIOLÓGICO.....	33
4.2 DISEÑO EXPERIMENTAL.....	33
4.3 MÉTODOS.....	33
4.3.1 PREPARACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO.....	33
4.3.2 ESTERILIZACIÓN DEL MATERIAL.....	34

4.3.3 OBTENCIÓN DE PLÁNTULAS CIGÓTICAS ASÉPTICAS DE <i>C. arabica</i> VARIEDAD CATUAI.....	35
4.3.4 INDUCCIÓN DEL CULTIVO DE CALLO DE <i>C. arabica</i>	35
4.3.5 INDUCCIÓN DEL CULTIVO DE CÉLULAS EN SUSPENSIÓN DE <i>C. arabica</i>	36
4.3.6 OBTENCIÓN DE PROTOPLASTOS A PARTIR DE HOJAS <i>in vitro</i> DE <i>C. arabica</i>	36
4.3.7 OBTENCIÓN DE PROTOPLASTOS A PARTIR DE CÉLULAS EN SUSPENSIÓN DE <i>C. arabica</i>	39
4.3.8 MEDICIÓN DE LA VIABILIDAD DE LOS PROTOPLASTOS.....	41
4.3.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	42
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	43
5.1 OBTENCIÓN DE PLÁNTULAS CIGÓTICAS DE <i>C. arabica</i> VARIEDAD CATUAI.....	43
5.2 OBTENCIÓN DE CALLOS Y CÉLULAS EN SUSPENSIÓN.....	43
5.3 OBTENCIÓN DE PROTOPLASTOS A PARTIR DE HOJAS <i>in vitro</i>	45
5.4 OBTENCIÓN DE PROTOPLASTOS A PARTIR DE CÉLULAS EN SUSPENSIÓN DE <i>C. arabica</i>	48
5.5 VIABILIDAD DE LOS PROTOPLASTOS.....	54
6. CONCLUSIONES	57
7. RECOMENDACIONES	58
REFERENCIAS	59
ANEXOS	62

RESUMEN

Con el fin de superar las barreras genéticas que impiden el mejoramiento de la especie del cafeto mediante el cultivo tradicional, que es la base para su realización, se dirigieron las expectativas hacia una herramienta del cultivo de tejidos vegetales: el cultivo de protoplastos como una poderosa alternativa para llevar a cabo este objetivo.

Debido a la gran importancia económica del café como pieza fundamental en las exportaciones de nuestro país, la presente investigación se llevó a cabo para desarrollar una metodología en la obtención y aislamiento de protoplastos de *Coffea arabica* L. a partir de hojas y células en suspensión, con el fin de incrementar la variabilidad genética de la especie y para la transferencia de información genética.

Para el desarrollo de los experimentos se emplearon plántulas cultivadas *in vitro* y suspensiones celulares de *Coffea arabica* variedad Catuai desarrollados de acuerdo a los protocolos ya existentes en el Centro de Investigación Científica de Yucatán. En hojas *in vitro* no se obtuvo liberación de protoplastos en ninguna mezcla enzimática ni aún sometiendo a la planta a un tratamiento previo sin sacarosa y en oscuridad para debilitar la pared celular. Mientras que a partir de suspensiones celulares de 5 días de edad incubadas en una mezcla de celulasa Onozuka R10 (2%), macerozima R10 (0.8%) y driselasa (0.5%) fue posible liberar 2×10^6 protoplastos mL^{-1} por gramo de peso fresco de tejido, después de un tiempo de digestión enzimática de 8 horas. La incubación se llevó a cabo en la oscuridad, a 30°C y 50 rpm.

Con la obtención de una metodología para el aislamiento de protoplastos a partir de células en suspensión de *Coffea arabica* variedad Catuai, se logró dar un paso importante en una serie de trabajos de investigación que en un futuro conllevarán a contribuir notablemente en el mejoramiento genético de esta especie.