

CONTENIDO

	Pág.
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
ÍNDICE DE CUADROS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS	viii
RESUMEN	ix
I. INTRODUCCIÓN	1
I.1. EL CAFÉ	1
I.1.1. HISTORIA	1
I.1.2. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA Y DESCRIPCIÓN BOTÁNICA DE <i>Coffea arabica</i> .	2
I.1.3. PRODUCCIÓN MUNDIAL	3
I.1.4. IMPORTANCIA ECONÓMICA PARA MÉXICO	4
I.2. CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES	6
I.3. EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA	9
I.3.1 ASPECTOS ESTUDIADOS EN LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA	10
I.4. ELECTROFORESIS	14
II. ANTECEDENTES	18
II.1. Compuestos extracelulares	18
II.2. Compuestos extracelulares de bajo peso molecular	18
II.3. Proteínas extracelulares	20
III. JUSTIFICACIÓN	25
IV. OBJETIVOS	27
IV.1. Objetivo general	27
IV.2. Objetivos Particulares	27
V. DISEÑO EXPERIMENTAL	28
VI MATERIAL Y MÉTODOS	29
VI.1. Material vegetal y Condiciones de cultivo	29
VI.2. Concentración de proteína extracelular	30
VI.3. Cuantificación de proteínas	30

VI.4. Electroforesis en geles de poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes en una dimensión (1D)	30
VI.5. Electroenfoque	31
VI.6. Electroforesis en geles de poliacrilamida en dos dimensiones (2D)	31
VI.7. Tinción con plata	31
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
VII.1 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS PRESENTE EN EL MEDIO DE CULTIVO	32
VII.2 ANÁLISIS DE LOS PATRONES ELECTROFORÉTICOS	34
VII.2.1 Concentración óptima de proteína extracelular total necesaria en los geles de poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes	34
VII.2.2 Análisis de los patrones electroforéticos en una dimensión	34
VII. 3 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS PRESENTE EN EL MEDIO DE CULTIVO POR DOBLE PRECIPITACIÓN	36
VII. 4 ANÁLISIS DE LOS PATRONES ELECTROFORÉTICOS DE LAS PROTEÍNAS EXTRACELULARES SEPARADOS BAJO CONDICIONES DESNATURALIZANTES	41
VII. 5 ANÁLISIS DE PATRONES PROTEICOS POR ELECTROENFOQUE	43
VII.5.1 Patrón electroforético de proteínas estándares separadas por electroenfoque	43
VII. 5.2 Formación del gradiente de pH	43
VII.5.3 Concentración óptima de proteína extracelular total necesaria en los geles de poliacrilamida separadas por electroenfoque en un gradiente de pH de amplio rango	44
VII.5.4 Perfil electroforético de las proteínas extracelulares separadas por electroenfoque	47
VII.6.ANÁLISIS DE PATRONES ELECTROFORÉTICOS EN DOS DIMENSIONES	49
VII CONCLUSIÓN	51
BIBLIOGRAFÍA	54
ANEXOS	64

RESUMEN

La embriogénesis somática es un proceso por el cual las células somáticas se desarrollan a embriones a través de una serie de estadios morfológicos característicos. Entre las observaciones bioquímicas que se realizaron con relación a la embriogénesis somática se vio que se requería de un "factor embriogénico" para coordinar la división celular y la morfogénesis (Warren y Fowler, 1981). Este factor se encontró en el medio de cultivo; desde entonces se ha hecho un importante esfuerzo en determinar el tipo de sustancias que las suspensiones celulares liberan al medio de cultivo. Un amplio número de especies vegetales excretan proteínas al medio de cultivo, y parece ser que algunas de estas proteínas participan en el proceso de la embriogénesis somática. La mayor parte de la información disponible sobre este campo ha sido obtenida con cultivos celulares de *Daucus carota*, por lo que es necesario extender estas áreas de estudio a otros sistemas, como por ejemplo al género *Coffea*. Debido sobre todo a la carencia de información concerniente a la presencia de proteínas extracelulares en los sistemas embriogénicos en medio líquido en *Coffea* y a la importante función durante la embriogénesis somática en otras especies. El propósito de esta investigación, como un paso inicial, fue analizar los perfiles electroforéticos de las proteínas extracelulares de los cultivos embriogénicos en medio líquido para *Coffea arabica*. Para ello fue necesario obtener concentrados proteicos extracelulares durante el crecimiento sin organización y después de la inducción de la embriogénesis somática. Inicialmente en ambas condiciones se detectaron (cuadro 5) proteínas en el medio de cultivo cuyo contenido aumentó conforme avanzó la edad del cultivo. El perfil electroforético extracelular

separado por SDS-PAGE (Figura 6) reveló mínimas diferencias con excepción de una banda con una masa molecular de 27 kDa específica para la condición embriogénica. Cuando las proteínas fueron separadas por electroenfoque (Figura 10) una banda con pI 5.7 fue específica para la condición de embriogénesis. Al igual, se observaron proteínas con pI's ácidos y básicos. Durante la separación de las proteínas por electroforesis en dos dimensiones (Figura 11) una mancha de aproximadamente 27 kDa y pI de entre 9.4-9.7 fue visible durante la inducción de la embriogénesis en los días 16 y 24, pero ausente para el día 12 y la condición de propagación. Esa mancha podría corresponder a la proteína observada en la figura 6 (flecha) que fue específica para la condición de embriogénesis. En este momento, en el género *Coffea* se carece de información sobre la naturaleza de las proteínas extracelulares, con excepción de un trabajo realizado en una suspensión celular bajo condiciones de propagación (Quiroz-Figueroa y Loyola-Vargas, 2001), por ello es necesario identificarlas, ya sea por zimografía o por microsecuenciamiento de las manchas generadas en las separaciones en 2D.