

ÍNDICE

	páginas
LISTA DE ABREVIATURAS	viii
LISTA DE CUADROS	x
LISTA DE FIGURAS	xi
RESUMEN	xii
CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN	1
1.1 ANTECEDENTES	3
1.1.1 Aspectos generales sobre la embriogénesis somática	3
1.1.2 La embriogénesis somática en <i>Coffea spp.</i>	4
1.1.3 La expresión genética durante la embriogénesis somática	6
1.2. LA UBIQUITINA Y SU FUNCIÓN	12
1.2.1 Características generales de la Ubiquitina	12
1.2.2 Función de la Ub en la proteólisis dependiente de ATP	14
1.2.3 Mecanismos de la poliubiquitinación	14
1.2.4 Degradación de proteínas poliubiquitinadas	16
1.2.5 Control del ciclo celular por proteólisis dependiente de Ub.	17
1.3. HIPÓTESIS	20
1.4. OBJETIVOS	21
1.4.1 Objetivo del proyecto	21
1.4.2 Objetivos particulares	21
CAPITULO 2: DISEÑO EXPERIMENTAL	22
2.1. MATERIALES Y MÉTODOS	23

2.1.1 Material vegetal	23
2.1.2 Preparación del medio de cultivo	23
2.1.3 Extracción de ADN genómico	24
2.1.3.1 Digestión del ADN genómico y transferencia Southern	25
2.1.4 Obtención del plásmido que contiene la sonda UBI 9	25
2.1.4.1 Obtención y purificación de la sonda UBI 9	28
2.1.4.2 Marcaje de la sonda UBI 9	28
2.1.4.3 Hibridación y detección	29
2.1.5 Extracción de ARN total	30
2.1.5.1 Dot blot	31
2.1.6 Extracción y cuantificación de proteínas	32
2.1.6.1 SDS-PAGE	33
2.1.6.2 Transferencia	33
2.1.6.3 Electroenfoque	34
2.1.6.3.1 Precipitación del extracto proteico	34
2.1.6.3.2 Desarrollo de la electroforesis	34
2.1.6.3.3 Tratamiento del gel para el cargado de las proteínas para transferir	34
2.1.6.3.4 Transferencia	35
2.1.7 Análisis de inmunomarcaje (Wenstern blot)	35
CAPITULO 3: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	36
CAPITULO 4: CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	47
BIBLIOGRAFÍA	50

ANEXO I

Componentes del medio de Yasuda	56
---------------------------------	----

ANEXO II

Soluciones empleadas para el análisis de Southern y Dot blot	57
--	----

ANEXO III

Protocolo para la elaboración de dos geles al 15% para SDS-PAGE	59
---	----

ANEXO IV

Protocolo para la elaboración de dos geles para electroenfoque	61
--	----

ANEXO V

Protocolo para la tinción de un gel de electroenfoque	62
---	----

RESUMEN

La embriogénesis somática (ES) fue descubierta en zanahoria (*Daucus carota*), en la década de los 50's y desde entonces, ha sido el modelo más empleado para estudios bioquímicos y moleculares. Debido a su importancia económica y dado que la ES en el cafeto (*Coffea spp.*) se obtuvo desde 1970, puede ser un buen modelo de estudios en plantas tropicales perennes. Uno de los objetivos de este proyecto fue el de establecer un sistema controlable de ES en *Coffea canephora*. Para esto se realizaron varios experimentos de inducción de la ES, observándose que esta especie respondió favorablemente. El preacondicionamiento de las plántulas empleadas como fuentes de explante tuvo un efecto positivo sobre el número total de embriones y el desarrollo de éstos.

Se determinó que la ubiquitina está codificada por un solo gen en el genoma de *C. canephora*, aunque no se descarta la posibilidad de existencia de otras copias arregladas en tandem. Con el fin de obtener el patrón de expresión genético se utilizó la técnica de dot blot, que mostró un aumento en los niveles de expresión de la UBI 9 (fragmento clonado con alta homología al gen de la ubiquitina) al inicio y al final de la inducción de la ES (días 4 y 20), lo que nos hace pensar que en el cafeto, como en otros modelos, los genes de la Ub están altamente regulados, debido a la importancia que juega en el desarrollo y progresión del ciclo celular. Se constató la presencia de varias proteínas ubiquitinadas mediante estudios de Western blot.