

## ÍNDICE

	Página
RESUMEN	
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I	3
1. ANTECEDENTES	3
1.1 TAXONOMÍA Y BOTÁNICA	3
1.1.1 Clasificación taxonómica de <i>Coffea canephora</i> según Chevalier, citado por Ramírez en 1971.	3
1.1.2 Descripción Botánica de <i>C. canephora</i> .	3
1.2 ECOLOGÍA DEL CAFETO.	4
1.3 EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA	5
1.4 TRANSCRIPCIÓN	8
1.5 FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN	9
1.6 WUSCHEL	9
1.7 ADN	10
1.8 PCR	11
1.8.1 Técnica	11
1.8.2 Aplicaciones de la PCR	12
1.9 TAQ POLIMERASA	13
1.10 CLONACIÓN	13
1.11 ENZIMAS DE RESTRICCIÓN Y ADN LIGASAS	14
1.12 VECTORES DE CLONACIÓN	14

	Página
1.13 PLÁSMIDOS	15
1.14 TRANSFORMACIÓN	15
1.15 DIGESTIÓN DE ADN	16
1.16 ELECTROFORESIS	16
1.17 SECUENCIACIÓN DE ADN	18
1.17. 1. Breve descripción del método automático de secuenciación	18
 CAPÍTULO II	 20
2. OBJETIVOS	20
2.1 OBJETIVO GENERAL	20
2.2 OBJETIVOS PARTICULARES	20
 CAPÍTULO III	 21
3. DISEÑO EXPERIMENTAL	21
 CAPÍTULO IV	 22
4. MATERIALES Y MÉTODOS	22
4.1 MATERIAL BIOLÓGICO	22
4.1 .1 OBTENCIÓN DE PLÁNTULAS DE <i>Coffea canephora</i>	22
4.2 MÉTODOS	22
4.2.1 COMPARACIÓN COMPUTACIONAL DE SECUENCIAS	22
4.2.2 EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DIRECTA.	23
4.2.3 PRODUCCIÓN Y PURIFICACIÓN DE TAQ POLIMERASA	24

	Página
4.2.4 EXTRACCIÓN DE ARN DE EMBRIONES DE <i>C. canephora</i> EN SUSPENSIÓN.	24
4.2.5 DETECCIÓN DE ARN OBTENIDO DE EMBRIONES DE <i>Coffea canephora</i> .	25
4.2.6 REACCIÓN DE TRANSCRIPTASA REVERSA	26
4.2.7 AMPLIFICACIÓN DE ADN POR PCR (REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA)	26
4.2.8 ELECTROFORESIS EN GEL AGAROSA PARA DETERMINAR LA IDENTIDAD DE LOS PRODUCTOS OBTENIDOS POR PCR	27
4.2.9 REACCIÓN DE LIGACIÓN (CLONACIÓN)	27
4.2..10 PRODUCCIÓN DE CELULAS COMPETENTES	28
4.2..11 TRANSFORMACIÓN	29
4.2.12 MINIPREPS	29
4.2.13 DIGESTIÓN DE ADN	30
4.2.14 MAXIPREPS	30
4.2.15 SECUENCIACIÓN	31
 CAPÍTULO V	 32
5. RESULTADOS Y DISCUSIONES	32
5.1 SECUENCIAS COMPARADAS COMPUTACIONALMENTE	32
5.2 PLÁNTULAS DE <i>Coffea canephora</i>	60
5.3 EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA	60

	Página
5.4 PURIFICACIÓN Y ESTANDARIZACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE TAQ POLIMERASA	62
5.5 ESTANDARIZACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE CLORURO DE MAGNESIO	64
5.6 ESTANDARIZACIÓN DE TEMPERATURA PARA PCR	65
5.7 EXTRACCIÓN DE ARN DE CELULAS DE <i>Coffea canephora</i> EN SUSPENSIÓN	67
5.8 RT PCR (TRANSCRIPCIÓN REVERSA-REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA)	68
5.9 PCR (REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA)	69
5.10 REACCIÓN DE LIGACIÓN (CLONACIÓN)	69
5.11 TRANSFORMACIÓN	70
5.12 MINIPREPS	71
5.13 DIGESTIÓN	72
5.14 MAXIPREPS	72
5.15 SECUENCIACIÓN DEL ADN OBTENIDO	73
5.16 SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE WUS <i>Coffea canephora</i>	76
5.17 SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE <i>arabidopsis</i>	77
5.18 COMPARACION COMPUTACIONAL DE SECUENCIAS DE AMINOÁCIDOS DE WUS DE <i>arabidopsis</i> y <i>C. canephora</i>	77
6. CONCLUSIONES	79
7. BIBLIOGRAFÍA	80
8. ANEXOS	86

## RESUMEN

La embriogénesis somática provee un modelo útil para el estudio del desarrollo embrionario en plantas, ya que en contraste con la embriogénesis cigótica, puede ser observada fácilmente, los medios de cultivo pueden ser controlados y se obtienen grandes cantidades de embriones. (Kawahara and Komamine.,1995).

Durante la embriogénesis somática varios genes se encienden debido a la expresión de secuencias de mRNA específicas que aparecen y decaen en ciertos tiempos, indicando que la actividad de estos genes es controlada por signos específicos.

Uno de los genes que se expresa durante este periodo de embriogénesis somática es Wuschel, el cual define y mantiene un grupo de células indiferenciadas (Mayer *et al*,1998).

No se han realizado estudios sobre el gen WUSCHEL (factor de transcripción) durante embriogénesis somática teniendo como modelo *Coffea canephora* y siendo indispensable en los meristemos de brote y floración, es importante saber más sobre este gen y aún más en una planta como *Coffea* cuya importancia económica en nuestro país y en el mundo es muy extensa.

En este trabajo se aisló al gen Wuschel (el cual codifica para un factor de transcripción) durante embriogénesis somática en *Coffea canephora*, posteriormente fue clonado y secuenciado a través de técnicas de biología molecular.