

## ÍNDICE

### Página

#### RESUMEN

#### INTRODUCCIÓN

1

#### I. ANTECEDENTES

3

##### 1.1 GENERALIDADES

3

###### 1.1.1 PRODUCCIÓN MUNDIAL

3

###### 1.1.2 EL CAFÉ EN MÉXICO

4

##### 1.2 TAXONOMÍA Y BOTÁNICA

6

###### 1.2.1 TAXONOMÍA

6

###### 1.2.2 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

7

##### 1.3 PROPAGACIÓN DEL CAFÉ

11

##### 1.4 EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA

11

##### 1.5 WUSCHEL

13

##### 1.6 PROTEÍNA DE FLUORESCENCIA VERDE

14

##### 1.7 PROTEÍNA DE FLUORESCENCIA ROJA

15

##### 1.8 MEJORAMIENTO GENÉTICO DEL CAFETO

17

##### 1.9 TRANSFORMACIÓN GENÉTICA MEDIADA POR

###### *Agrobacterium tumefaciens*

17

###### 1.9.1 *Agrobacterium tumefaciens*

18

###### 1.9.2 PROCESO DE INFECCIÓN DE *Agrobacterium tumefaciens*

18

##### 1.10 TRANSFORMACIÓN GENÉTICA POR INFILTRACIÓN AL

###### VACÍO

22

##### 1.11 PLÁSMIDOS

22

##### 1.12 PROMOTORES

23

##### 1.13 PCR

24

##### 1.14 SOUTHERN

25

<b>II. OBJETIVOS</b>	<b>27</b>
2.1 OBJETIVO GENERAL	27
2.2 OBJETIVOS PARTICULARES	27
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>28</b>
3.1 MATERIAL BIOLÓGICO	28
3.1.1 OBTENCIÓN DE PLÁNTULAS DE <i>Coffea canephora</i> Pierre ex Froehner	28
3.1.2 EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DIRECTA	28
3.2 PROPAGACIÓN DE BACTERIAS	29
3.3 PRODUCCIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES	29
3.4 PROTOCOLOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR	29
3.4.1 PURIFICACIÓN DE ADN POR COLUMNA	30
3.4.2 ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA	30
3.4.3 DIGESTIÓN DE PLÁSMIDOS	31
3.4.4 EXTRACCIÓN DE ADN EN GEL DE AGAROSA	32
3.4.5 REACCIÓN DE KLENOW	32
3.4.6 REACCIÓN DE DESFOSFORILACIÓN	32
3.4.7 REACCIÓN DE LIGACIÓN	33
3.4.8 TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS	33
3.4.9 MINIPREPS	33
3.4.10 AMPLIFICACIÓN DE ADN POR PCR	34
3.4.11 SOUTHERN	35
3.5 TRANSFORMACIÓN GENÉTICA CON <i>Agrobacterium tumefaciens</i> POR INFILTRACIÓN AL VACÍO	35
3.6 DETERMINACIÓN MICROSCÓPICA DE FLUORESCENCIA	37
3.7 DIAGRAMA DE LA ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	38

<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>39</b>
4.1 PLÁNTULAS DE <i>Coffea canephora</i> Pierre ex Froehner <sup>a</sup>	39
4.2 EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA	39
4.3 VERIFICACIÓN DE LA INTEGRIDAD DEL PLÁSMIDO BINARIO	40
4.4 TRANSFORMACIÓN DE EMBRIONES DE <i>Coffea canephora</i> Pierre ex Froehner POR INFILTRACIÓN AL VACÍO	42
4.4.1 COMPARACIÓN FENOTÍPICA	43
4.4.2 COMPARACIÓN MICROSCÓPICA	45
4.5 PCR	46
4.6 SOUTHERN	47
<b>V. CONCLUSIONES</b>	<b>49</b>
<b>VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>50</b>
<b>VII. APÉNDICE</b>	<b>57</b>

## RESUMEN

La embriogénesis somática tiene un enorme potencial para la propagación de especies de importancia económica, como es el caso del género *Coffea*. Las ventajas del proceso, como son el control de las condiciones de cultivo, la facilidad observacional del proceso, la disponibilidad del tejido y los elevados rendimientos en la producción de embriones hacen de la embriogénesis somática un sistema ideal para realizar estudios a nivel morfohistológico, fisiológico, bioquímico y molecular.

Los métodos de transferencia génica asexual, como la transformación, son una alternativa viable para introducir características ausentes en bancos genéticos de *Coffea* o para el mejoramiento genético de aquellos cultivares no adecuados para el mejoramiento por cruza convencionales.

A la fecha existen diferentes protocolos de transformación de *Coffea* que utilizan diferentes sistemas de cultivo *in vitro*, sin embargo no existe ningún reporte que indique la transformación de embriones de *Coffea* mediante infiltración al vacío.

En este proyecto se obtuvo el vector binario pER10W-35-Mor capaz de expresar *Wuschel* y proteína de fluorescencia roja, y se generó un sistema eficiente de transformación en *Coffea canephora* Pierre ex Froehner, tomando en cuenta las propiedades de embriogénesis somática que se conocen y la técnica de infiltración al vacío, posteriormente se determinó los efectos del plásmido binario pER10W-35-Mor en la transformación con *A. tumefaciens* y la infiltración al vacío en *Coffea canephora* Pierre ex Froehner.