

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN 9

CAPÍTULO I 11

ANTECEDENTES 11

1.1 ORIGEN Y DISTRIBUCIÓN DEL CAFÉ 11

1.2 EMBRIOGÉNESIS SÓMATICA 11

1.3 COMPETENCIA EMBRIOGÉNICA 12

1.4 CAMBIOS MOLECULARES DURANTE EL CULTIVO *IN VITRO* 13

1.4.1 PROTEÍNAS CINASA 14

1.5 CINASA TIPO RECEPTOR DE EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA 1
(SERK1) 15

1.5.1 CINASA TIPO RECEPTOR DE LA EMBRIOGENESIS SOMÁTICA 1
(SERK 1) EN *Coffea canephora* 17

1.6 CLONACIÓN 19

1.6.1 ENZIMAS DE RESTRICCIÓN 21

1.6.2 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) 22

1.6.3 CLONACIÓN DE PRODUCTOS DE PCR 23

1.6.4 VECTORES DE CLONACIÓN 24

1.6.5 LIGACIÓN 24

1.7 EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS HETERÓLOGAS EN *Escherichia coli* 25

1.8 SISTEMA DE PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS HETERÓLOGAS POR
CROMATOGRAFÍA LIQUIDA DE AFINIDAD 27

1.9 INMUNOTRANSFERENCIA 29

CAPÍTULO II 31

JUSTIFICACIÓN 31

OBJETIVOS 32

OBJETIVO GENERAL	32
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
DISEÑO EXPERIMENTAL	33
CAPÍTULO III	34
MATERIALES Y MÉTODOS	34
3.1 CONDICIONES DE LA AMPLIFICACIÓN DEL CDS DE <i>SERK1</i> DE <i>Coffea canephora</i> POR PCR.	34
3.2 CLONACIÓN DEL CDS COMPLETO DE <i>SERK1</i>	35
3.3 DIGESTIÓN DE PLÁSMIDOS CON LAS ENZIMAS DE RESTRICCIÓN EcoRI y XhoI	36
3.4 CEPAS BACTERIANAS DE <i>Escherichia coli</i>	37
3.5 PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO PARA EL CULTIVO DE LAS CEPAS BACTERIANAS DE <i>E. coli</i>	38
3.6 TRANSFORMACIÓN DE LAS CEPAS DE <i>Escherichia coli</i>	38
3.6.1 PREPARACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES	38
3.6.2 TRANSFORMACIÓN DE LAS CÉLULAS COMPETENTES.....	39
3.7 PCR DIRECTO DE COLONIAS	39
3.8 EXTRACCIÓN DE ADN PLASMÍDICO	40
3.9 ANÁLISIS DE CLONAS	41
3.10 EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE <i>SERK1</i> EN CEPAS DE <i>E. coli</i>	41
3.11 PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA <i>SERK1</i>	42
3.12 ELECTROFORESIS	43
3.12.1 ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA	43
3.12.2 ELECTROFORESIS DESNATURALIZANTE EN GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE).....	43

3.13 INMUNOTRANSFERENCIA 44

CAPÍTULO IV 45

RESULTADOS 45

4.1 SUBCLONACIÓN DEL CDS DE *CcSERK1* HACIA UN VECTOR DE EXPRESIÓN EN *E. coli* 45

4.1.1 AMPLIFICACIÓN POR PCR DEL CDS DE *CcSERK1*. 45

4.1.2 DIGESTIÓN DEL VECTOR RECEPTOR (pGEX 4T-2) y DEL INSERTO (CDS DE *CcSERK1*). 46

4.1.3 CLONACIÓN DEL CDS DE *CcSERK1* EN pGEX 4T-2. 48

4.2 EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA *CcSERK1* EN *Escherichia coli*. 51

4.3 PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA DE FUSIÓN GST-*CcSERK1*. 53

CAPÍTULO V 61

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES 61

PERSPECTIVAS 63

CAPÍTULO VI 64

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 64

ANEXO A 69

ANEXO B 80