



UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL
UNIDAD DE POSTGRADO INVESTIGACIÓN Y
DESARROLLO.
MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR.

TESIS PRESENTADA COMO REQUISITO PREVIO A LA OBTENCIÓN
DE GRADO ACADÉMICO DE MAGISTER EN
BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR.

"Evaluación de la expresión de proteínas relacionadas con la resistencia
en hojas de cacao (*Theobroma cacao* L.) frente al patógeno *Monilia*
(*Moniliophthora roreri*)"

TUTORA: Ing. DAYNET SOSA DEL CASTILLO Ph. D
COTUTORA: Dra. NARDY DEL VALLE DIEZ GARCIA Ph. D
AUTORA: PAOLA DENNISE CRUZ JARAMILLO

GUAYAQUIL-ECUADOR
JUNIO -2016

REPOSITORIO NACIONAL EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA		
FICHA DE REGISTRO DE TESIS		
“Evaluación de la expresión de proteínas relacionadas con la resistencia en hojas de cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.) frente al patógeno <i>Monilia</i> (<i>Moniliophthora roreri</i>)”		
AUTOR: Paola Dennise Cruz Jaramillo	TUTOR: Ing. Daynet Sosa del Castillo Ph. D.	
	REVISORES: Ing. Sisiana Chávez Chica, Mg.	
INSTITUCIÓN: UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL	FACULTAD: Unidad de Posgrado, Investigación y Desarrollo	
CARRERA: Maestría en Biotecnología Molecular		
FECHA DE PUBLICACIÓN: Junio 2016	No. DE PÁGS: 97	
TÍTULO OBTENIDO: Ingeniera Agrónoma.		
ÁREAS TEMÁTICAS: Proteómica Agrícola.		
PALABRAS CLAVE: Extracción de proteínas, Proteínas del Cacao, Protocolo de extracción, Gel de poliacrilamida.		
RESUMEN: A nivel taxonómico la familia de las Malvaceas, reúne a un grupo de plantas herbáceas, arbustivas y leñosas, en la cual se encuentra el Cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.), conocido como la pepa de oro en los países de latinoamericanos, también está representada por el ataque de fitopatógenos que arrazan con el cultivo, Ecuador con una extensión de cultivo de 200 a 300 ha/año y una pérdida del 64.76 % cifras registradas en el año 2008, nos dan una pauta para identificar y analizar la resistencia natural a <i>Moniliophthora roreri</i>, lo que nos permite iniciar esta investigación, en hojas adultas con presencia y ausencia de patologías en sus frutos, que fueron visualmente observadas en geles de A/bis poliacrilamida de una y dos dimensiones, el cual se llevo a cabo mediante un protocolo modificado, descrito dentro del laboratorio CIBE, en el que registramos la utilización de Acetona fría al 100% y TCA 10% /acetona para la eliminación de pigmentos y contaminantes, Buffer Fenol y Buffer SDS para la ruptura de pared celular y obtención de proteínas, Metanol / AcNH₄ 0.1 normal para precipitación de proteínas, y por ultimo Acetona 100% y Metanol al 100% para lavar el pellet, para la resuspensión se utilizó Buffer de Corrida (geles unidimensionales), y para geles bidimensionales se utilizó buffer de hidratación el cual permite una excelente disolución de las muestras. En cuanto a los análisis de los geles nos permitió identificar bandas entre los 28kDa y 6kDa y una sobre expresión en plantas con presencia de sintomatología.		
No. DE REGISTRO (en base de datos):		No. DE CLASIFICACIÓN:
DIRECCIÓN URL (tesis en la web):		
ADJUNTO PDF:	SI	NO
CONTACTO CON AUTOR/ES	Teléfono: 0984526004	E-mail: pc138_8@hotmail.com
CONTACTO EN LA INSTITUCIÓN:	Nombre: ESPOL CIBE	
	Teléfono:	
	E-mail:	

CERTIFICADO DEL TUTOR

CERTIFICADO DEL TUTOR

En mi calidad de tutor del Programa de Maestría en Biotecnología Molecular, nombrado por el Director General de la Unidad de Posgrado, Investigación y Desarrollo, **CERTIFICO:** que he analizado la Tesis presentada, como requisito para optar el grado académico de Magister en Biotecnología Molecular titulada "**Evaluación de la expresión de proteínas relacionadas con la resistencia en hojas de cacao (*Theobroma cacao L.*) frente al patógeno *Monilia (Moniliophthora roreri)***" la cual cumple con los requisitos académicos, científicos y formales que demanda el reglamento de posgrado.



Ing. Daynet Sosa del Castillo Ph. D.
C.I. 0957500071

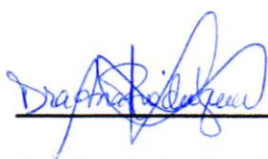
Guayaquil, 30 de Junio de 2016

CERTIFICACIÓN DE REDACCIÓN Y ESTILO

Dra. Ana Luisa Rodríguez Méndez, Magister en Docencia Superior, con el registro del SENESCYT No. **1018-13-86034144**, por medio del presente tengo a bien **CERTIFICAR**: Que he revisado la redacción, estilo y ortografía de la tesis de grado elaborada por la Srta. **PAOLA DENNISE CRUZ JARAMILLO**, con C.I. # **010529563-8**, previo a la obtención del título de **MAGISTER EN BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR**.

TEMA DE TESIS: "EVALUAR LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS RELACIONADAS CON LA RESISTENCIA EN HOJAS DE CACAO (*THEOBROMA CACAO*) FRENTE AL PATÓGENO MONILIA (*MONILIOPHTHORA RORERI*)"

Trabajo de investigación que ha sido escrito de acuerdo a las normas ortográficas y de sintaxis vigentes.



Dra. Ana Luisa Rodríguez Méndez.

C.I. # 0907876361.

NUMERO DE REGISTRO: **1018-13-86034144**.

NUMERO DE TELÉFONO CELULAR: 0984756128.

CORREO: arodriguez@uagraría.edu.ec

Guayaquil, 30 de Junio de 2016

DECLARACIÓN JURADA DEL AUTOR

DECLARACIÓN JURADA DEL AUTOR

Yo, Paola Dennise Cruz Jaramillo, declaro bajo juramento ante la Dirección de Posgrado de la Universidad de Guayaquil, que el trabajo aquí descrito, así como sus resultados, conclusiones y recomendaciones presentadas es de mi autoría y exclusiva responsabilidad, que es inédito y no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional.

La reproducción total o parcial de esta tesis en forma idéntica o modificada, no autorizada por los editores transgrede los derechos de autor. Cualquier utilización debe ser previamente solicitada a la Universidad de Guayaquil, a través de la Dirección de Posgrados o al autor.



Paola Cruz Jaramillo.
C.I. 010529563-8

A G R A D E C I M I E N T O S

Un agradecimiento especial al Dr. Andrés Yarzábal que nunca dudo en apoyarme fuera y dentro de la institución donde labora.

Al Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador CIBE de la Escuela Superior Politécnica del Litoral por permitirme ser parte de su prestigiosa institución y apoyarme sin medida en cuanto a sus instalaciones.

A la Directora del CIBE, y tutora de tesis, a la Dra. Naynet Sosa del Castillo por su apoyo brindado.

A mi cotutora de tesis la Dra. Nardy Diez del Valle y al Ing. Jeffry Vargas por su paciencia, dedicación, y entrega, hacia mi persona.

DEDICATORIA

A Dios por ser mi guía en momentos de adversidad, por darme la fortaleza necesaria para seguir cada día emprendiendo mis sueños, a mis padres, hermanos, abuelita, a mi ángel por ser el motor para llegar lejos, y a mi familia en general por ser ese pilar que siempre necesité y nunca me dejaron, para las personas que día a día encuentro en el camino, y siempre me tendieron la mano con su ayuda o con sus buenos consejos.

No puedo olvidar a personas como Tammy y Sammy que día a día luchamos en casa para salir adelante, a mis amigos de fórmula Edna, Kary, Johan, Julio y sin duda a Juan José que me permitieron aprender de sus conocimientos y a esa personita que llevo en el corazón que con su apoyo y fortaleza me empujó para alcanzar mi meta. Para mi Dr. Vintimilla que me enseñó a perseguir mis sueños por más altos que estos fueran.

Dedicado a la memoria de mi padre por ser quien desde el cielo me guía y siempre será mi ejemplo a seguir, de lucha, entrega, humanidad, y sobre todo humildad.

ÍNDICE GENERAL

REPOSITORIO NACIONAL EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA	II
CERTIFICADO DEL TUTOR	III
CERTIFICACIÓN DE REDACCIÓN Y ESTILO	IV
DECLARACIÓN JURADA DEL AUTOR.....	V
AGRADECIMIENTOS	VI
DEDICATORIA	VII
ÍNDICE GENERAL	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS	X
ÍNDICE DE TABLAS	XI
RESUMEN	XII
ABSTRACT	XIV
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I.....	3
1.1.2. Objetivos específicos	3
1.2.1. Hipótesis alternativa	3
1.2.2. Hipótesis nula	3
CAPÍTULO II.....	4
2. EL CACAO Y SU INFLUENCIA A NIVEL MUNDIAL Y EN ECUADOR	4
2.1. CULTIVO DE CACAO	4
2.1.1. Grupos genéticos de Cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.)	5
2.2. MECANISMO DE INFECCIÓN FITOPATÓGENA	6
2.2.1. Adherencia del patógeno al hospedante	6
2.2.2. Penetración directa del patógeno	7
2.2.3. Sustancias químicas que interviene en la infección	7
2.2.4. Enzimas de degradación	8
2.3. SÍNTOMAS CAUSADOS POR FITOPATÓGENOS	10
2.3.1. Sintomatología de moniliasis (<i>Moniliophthora roreri</i>)	11
2.4. MECANISMOS DE DEFENSA DE CIERTAS PLANTAS	12
2.4.1. Barreras estructurales o físicas de las plantas	12
2.4.2. Barreras químicas preformadas	14
2.5. EVOLUCIÓN DE LAS ENFERMEDADES	14
2.5.1. Evolución de la Moniliasis (<i>Moniliophthora roreri</i>)	16
2.5.2. Ciclo de la enfermedad y epidemiología	17
2.6. CONTROL DE LA MONILIASIS (<i>Moniliophthora roreri</i>) EN ECUADOR	18
2.6.1. Convencional	18

2.6.2.	Control químico	18
2.6.3.	Biológico	19
2.6.4.	Resistencia	19
2.7.	PROTEÍNAS QUE INTERVIENEN EN LA RESISTENCIA A ENFERMEDADES FUNGOSAS EN PLANTAS	21
2.7.2.	Fitoalexinas	22
2.7.3.	Compuestos fenólicos comunes	23
2.7.4.	Ezimas oxidantes del fenol	23
2.7.5.	Resistencia Sistema Adquirido (SAR)	24
2.7.6	Proteínas resistentes a monilia (<i>Moniliophthoralaroreri</i>)	24
2.7.6.1	Defensinas	25
2.8.	TÉCNICAS UTILIZADAS EN LA INVESTIGACIÓN	25
2.8.1.	Proteómica	25
2.9.2.	Cuantificación de proteínas	27
2.9.3.	Descripción de los métodos para determinar la concentración de proteínas.	28
2.9.4.	Cuantificación de proteínas mediante Nanodrop	29
2.9.5.	Geles de poliacrilamida PAGE	30
2.9.6.	Tipos de electroforesis	33
CAPÍTULO III.....		37
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	37
•	LOCALIZACIÓN	37
•	MATERIALES Y EQUIPOS DE LABORATORIO PARA LA REALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN.	37
3..1.	Material físico	37
•	MÉTODOS	38
3..1.	Material experimental.....	38
3.2	Esquema de análisis estadístico	40
3.3	MANEJO DE LA INVESTIGACIÓN	40
3.4.1.	Extracción de proteínas de cacao (<i>Theobroma cacao L.</i>)	40
3.3.3	Cuantificación de las proteínas con la técnica de Bradford	50
3.3.4	Preparación del gel de acrilamida	50
3.3.5	Electroforesis (BIO-RAD POWER BASIC 300 V, 400 MA, 78W)	52
3.3.6	Tinción del abis/poliacrilamida	54
3.3.7	Proceso de decoloración del gel de abis/poliacrilamida	54
3.3.8	Preparación del gel de dos dimensiones 2 SDS PAGE	55
RESULTADOS		58
CONCLUSIONES.....		75
RECOMENDACIONES		76
BIBLIOGRAFÍA		77
ANEXOS.....		94

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1: Proceso de adherencia de las moléculas de SDS en las proteínas y su desnaturalización.....	¡Error! Marcador no definido.
FIGURA 2: Proceso del sistema de electroforesis.¡Error! Marcador no definido.	
FIGURA 3: Curva de titulación del aminoácido Glicina e Histidina. ..	¡Error! Marcador no definido.
FIGURA 4: Electroforesis 1 SDS-PAGE de proteínas totales de la hoja de cacao (<i>Theobroma cacao</i>). M.M: marcador de peso molecular. Carril 1 muestra sana 1, Carril 2 muestra sana 4, Carril 3 muestra sana 5. Pocillo (25 ul de pellet + 8,33 ul buffer de muestra).....	58
FIGURA 5: Electroforesis 1 SDS-PAGE de proteínas totales de la hoja de cacao (<i>Theobroma cacao</i>). M.M marcador de peso molecular. Carril 1 muestra sana 1, Carril 2 muestra sana 4, Carril 3 muestra sana 5. Pocillo (15 ul de pellet + 5 ul buffer de muestra).....	60
FIGURA 6: Electroforesis 1 SDS-PAGE de proteínas totales de la hoja de cacao (<i>Theobroma cacao</i>). M.M marcador de peso molecular. Carril 1 muestra sana 1, Carril 2 muestra sana 4, Carril 3 muestra sana 4, Carril 5 muestra sana 5. Pocillo (15 ul de pellet + 5 ul buffer de muestra).	61
FIGURA 7: Electroforesis 1 SDS-PAGE de proteínas totales de la hoja de cacao (<i>Theobroma cacao</i>). M.M marcador de peso molecular. Carril 1 muestra sana 1 sin inhibidor de proteasa, Carril 2 muestra sana 1 con inhibidor de proteasa. Pocillo (10 ul de pellet + 3,3 ul buffer de muestra).	63
FIGURA 8: Electroforesis 1 SDS-PAGE de proteínas totales de la hoja de cacao (<i>Theobroma cacao</i>). M.M marcador de peso molecular. Carril 1 y 2 protocolo NUEVO, Carril 3 y 4 protocolo ANTIGUO. Muestra sana 1. Pocillo (10 ul de pellet + 3,3 ul buffer de muestra).....	64
FIGURA 9: Electroforesis 1 SDS-PAGE de proteínas totales de la hoja de cacao (<i>Theobroma cacao</i>). M.M marcador de peso molecular., PROTOCOLO MODIFICADO. Pocillo (10 ul de pellet + 3,3 ul buffer de muestra).....	66
FIGURA 10: Electroforesis 1 SDS-PAGE de proteínas totales de la hoja de cacao (<i>Theobroma cacao</i>). M.M marcador de peso molecular. Resuspensión en Buffer de corrida, Buffer de muestra, Buffer de hidratación. Pocillo (10 ul de pellet + 3,3 ul buffer de muestra).....	68

FIGURA 11: Electroforesis 1 SDS-PAGE de proteínas totales de la hoja de cacao (<i>Theobroma cacao</i>). M.M marcador de peso molecular. Resuspensión en Buffer de Corrida. Tiempos de centrifugación. Pocillo (10 y de 15 ul de pellet + 3,3 ul buffer de muestra).....	70
FIGURA 12: Electroforesis 1 SDS-PAGE de proteínas totales de la hoja de cacao (<i>Theobroma cacao</i>) con presencia y ausencia de sintomatología. M.M marcador de peso molecular. Resuspensión en Buffer de Corrida. Pocillo (15 ul de pellet + 3,3 ul buffer de muestra).	71
FIGURA 13: Electroforesis 2 SDS-PAGE de proteínas totales de la hoja de cacao (<i>Theobroma cacao</i>). M.M marcador de peso molecular. Resuspensión en Buffer de rehidratación. Pocillo (30 ul de pellet). ...	72

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1: Métodos de cuantificación de proteínas para determinar la concentración.....	27
TABLA 2: Métodos de cuantificación de proteínas sus ventajas y desventajas.	29
TABLA 3: Gel upper. Soluciones para geles de acrilamida.	54
TABLA 4: Gel lower. Soluciones para geles de acrilamida.	55
TABLA 5: Ordenamientos de los datos que se utilizaron para la migración de proteínas de la figura 1.....	59
TABLA 6: Ordenamientos de los datos que se utilizaron para la migración de proteínas de la figura 2.....	60
TABLA 7: Ordenamientos de los datos que se utilizaron para la migración de proteínas de la figura 3.....	62
TABLA 8: Ordenamientos de los datos que se utilizaron para la migración de proteínas de la figura 4.....	63
TABLA 9: Ordenamientos de los datos que se utilizaron para la migración de proteínas de la figura 5.....	65
TABLA 10: Ordenamientos de los datos que se utilizaron para la migración de proteínas de la figura 6.....	67
TABLA 11: Ordenamientos de los datos que se utilizaron para la migración de proteínas de la figura 7.....	69
TABLA 12: Ordenamientos de los datos que se utilizaron para la migración de proteínas de la figura 8.....	70
TABLA 13: Ordenamientos de los datos que se utilizaron para la migración de proteínas de la figura 9.....	72
TABLA 14: Ordenamientos de los datos que se utilizaron para la migración de proteínas de la figura 10.....	73
TABLA 15: Buffer de muestra 3x.....	94
TABLA 16: Solución Lower Tris 4x.....	94
TABLA 17: Solución Upper Tris 4x.....	94

TABLA 18: Buffer de Corrida 5x.....	94
TABLA 19: Buffer de Corrida 5x pH 8,3.....	95
TABLA 20: Buffer de Muestra 3x.....	95
TABLA 21: Buffer Lowe tris 4x.....	95
TABLA 22: Buffer Upper tris 4x.....	95
TABLA 23: Solución de Acrilamida.....	96
TABLA 24: Solución para teñir geles.....	96
TABLA 25: Solución para decolorar geles.....	96

RESUMEN

A nivel taxonómico la familia de las Malvaceas, reúne a un grupo de plantas herbáceas, arbustivas y leñosas, en la cual se encuentra el Cacao (*Theobroma cacao L.*), conocido como la pepa de oro en los países latinoamericanos, también está representada por el ataque de fitopatógenos que arrazan con el cultivo, Ecuador con una extensión de cultivo de 200 a 300 ha/año y una pérdida del 64.76 % cifras registradas en el año 2008, nos dan una pauta para identificar y analizar la resistencia natural a *Moniliophthora roreri*, lo que nos permite iniciar esta investigación, en hojas adultas con presencia y ausencia de sintomatologías en sus frutos, que fueron visualmente observadas en geles de A/bis poliacrilamida de una y dos dimensiones, el cual se llevo a cabo mediante un protocolo modificado, descrito dentro del laboratorio CIBE, en el que registramos la utilización de Acetona fría al 100% y TCA 10% /acetona para la eliminación de pigmentos y contaminantes, Buffer Fenol y Buffer SDS para la ruptura de pared celular y obtención de proteínas, Metanol / AcNH₄ 0.1 normal para presipitación de proteínas, y por ultimo Acetona 100% y Metanol al 100% para lavar el pellet, para la resuspensión se utilizò Buffer de Corrida en geles unidimensionales, y para geles bidimensionales se utilizó buffer de hidratación el cual permite una excelente disolución de las muestras. En cuanto a los análisis de los geles nos permitió identificar bandas entre los 28kDa y 6kDa y una sobre expresión en plantas con presencia de sintomatología.

Palabras claves: Extracción de proteínas, Proteínas del Cacao, Protocolo de extracción, Gel de poliacrilamida.

ABSTRACT

A taxonomic level the family Malvaceae, brings together a group of grasses, shrubs and woody plants, which is the Cacao (*Theobroma cacao*), known as the gold nugget in Latin American countries, is también represented by the attack phytopathogenic that arrazan with cultivation, Ecuador with an extension of cultivation of 200 to 300 ha / year and a loss of 64.76% registered in 2008 figures, give us a guideline to identify and analyze the natural resistance to *Moniliophthora roreri*, the that allows us to start this research in adult leaves with presence and absence of sintomatologías in its fruits, which were visually observed in gels a / polyacrylamide bis of one and two dimensions, which was carried out by a modified protocol described in laboratory CIBE, wherein checked using cold 100% acetone and 10% TCA / acetone for removing pigments and contaminants, Buffer Phenol and Buffer SDS for breaking cell wall and obtaining proteins, Methanol / AcNH₄ 0.1 normal presipitacion protein, and finally Acetone 100% and 100% methanol to wash the pellet, for resuspensión running buffer was used in one-dimensional gels, and dimensional gels buffer hydration which allows excellent solution is utilizó the samples. Regarding the analysis of the gels allowed us to identify the 28 kDa bands and 6kDa between and on expression in plants with the presence of symptoms.

Keywords: Extraction of proteins, Cocoa Protocol extraction polyacrylamide gel.

INTRODUCCIÓN

El Cacao (*Theobroma cacao* L.) es originario de América del Sur y su distribución a América Central se dio por medio del hombre (MOTAMAYOR et al., 2008) es uno de los cultivos más sobresalientes en el ámbito productivo, al generar divisas económicamente altas para un país, dentro de este ámbito se encuentra Ecuador con 327 ha de cultivo sembrado, con una producción de 20-300 kg/ha/año («PROEC_AS2013_CACAO.pdf», s. f.-a) dentro de estas cifras se encuentra la distribución del cacao fino de aroma, (DILLENIDAE, s. f.).

Los problemas relevantes mas sucitados con este cultivo son las plagas y enfermedades que arrazan con el cultivo en un 80% de la cosechas de mazorca (SÁNCHEZ, Gamboa, & Rincón, 2003), el ataque de fitopatógenos como es *Moniliophthora roreri* se da en Ecuador en el años 1917 (Phillips -Mora, Aime, & Wilkinson, 2007) esto ha permitido indagar sobre la posibles resistencia naturales en la plantaciones locales.

A nivel biotecnológico se ha realizado investigaciones sobre ciertos genes que muestra una respuesta de expresión a ciertos patógenos, esto podria ser potencialmente útil para la selección asistida en una posibles resitenicas en cacao, asi pues tenemos 17 grupos de RP, las mas sobresalientes PR1, PR 3, PR4, PR 10, que son mas propensas a estar involucrados en una posible resistencia a *Phytophthora*, y *Colletotrichum* (Fister et al., 2016).

Los trabajos con cacao se han dado en torno a TcNPR1 de cacao muestra como resultado que es un ortólogo funcional de NPR1 es poblamente uno de los represores a infección en cacao (Shi, Maximova, Liu, Verica, & Guiltinan, 2010).

La TcNPR3 se expresa en una gama diversa de tejidos y en diferentes etapas de desarrollo, cabe indicar que los niveles observados entre las respuestas a patógenos no son iguales a la planta modelo, es decir se encuentra un nivel alto en *Arabidopsis thaliana*, en los resultados de TcNPR3 en cacao muestra una drástica resistencia a *Phytophthora capsici* en hojas donde el patógeno redujo su replicación (Shi, Zhang, Maximova, & Guiltinan, 2013).

Las defensinas, también juegan un rol importante en la defensa de agentes microbianos (AMPs), con un peso molecular de 5 a 7 kDa, compuestas por cisteínas, con una longitud de 45 a 55 aa inhiben efectivamente el crecimiento de microorganismos fitopatógenos (Stotz, Thomson, & Wang, 2009).

Basándonos en la bibliografía citada de la respuesta a una resistencia innata de ciertas plantas cultivadas (Castro & Fontes, 2005) se desarrolló la propuesta de investigación denominada "Evaluación de la expresión de proteínas en hojas de cacao con y sin sintomatología frente al patógeno *Moniliophthora roreri*".

CAPÍTULO I.

1. OBJETIVOS E HIPOTESIS

1.1. OBJETIVOS

1.1.1. Objetivo general

“Evaluar la expresión de proteínas relacionadas con la resistencia en hojas de cacao (*Theobroma cacao* L.) frente al patógeno *Monilia* (*Moniliophthora roreri*)”.

1.1.2. Objetivos específicos

Análisis comparativo de los perfiles proteicos de hojas en plantas sanas e infectadas.

Establecer la relación de las proteínas extraídas con los síntomas de la enfermedad.

1.2. HIPÓTESIS

1.2.1. Hipótesis alternativa

El protocolo de extracción investigado es el método eficaz para la obtención de proteínas, para su comparación entre plantas sanas y con sintomatología.

1.2.2. Hipótesis nula

El protocolo de extracción investigado no es el método eficaz para la obtención de proteínas para su comparación entre plantas sanas y con sintomatología.

CAPÍTULO II

2. EL CACAO Y SU INFLUENCIA A NIVEL MUNDIAL Y EN ECUADOR

El Cacao (*Theobroma cacao* L.) es uno de los cultivos perennes, de los bosques húmedos tropicales («PROEC_AS2013_CACAO.pdf», s. f.-a) su origen fue descrito previamente en América Central («Alianza SIDA LC», s. f.). Estudios recientes revelan que con pocos individuos que evolucionaron, el origen se encuentra en América del Sur. (Motamayor et al., 2002).

A nivel mundial el Cacao (*Theobroma cacao* L.), tiene diferentes representantes, los cuales cultivan y exportan, como es el caso de Nigeria (5% de producción), Ghana (19% de producción), Costa de Marfil (38% de producción), Indonesia (13%), Malasia (1% de producción), Camerún (5% de producción), Brasil (5% de producción). («Estadísticas Actuales | Anecacao Ecuador», s. f.).

Ecuador con un 5% de exportaciones, se ubicó en el cuarto puesto a nivel mundial («Estadísticas Actuales | Anecacao Ecuador», s. f.) con una extensión de cultivo sembrado en el año 2011 de 521,091 ha., con una superficie de cosecha de 399,467 con una producción de 224,163 por tonelada métrica («PROEC_AS2013_CACAO.pdf», s. f.-b).

2.1. CULTIVO DE CACAO

El Cacao (*Theobroma cacao* L.), taxonómicamente se encuentra descrito dentro de la familia Malvaceae («Hoja_Botanica_Cacao_2012.pdf», s. f.), sus principales características la denominan como un arbusto perenne (Omaña, 2009), de raíz pivotante de 5 – 6 m (Dumble, 2013), con un tallo de crecimiento horizontal con una altura de 1 - 1,5 m, presenta hojas de tipo mediano muy firmes de color verde brillante, (FUNDESYRAM,

s. f.-b), su estructura floral es S5, P5, E5 + 5, G (5) (Fajardo Rangel et al., 2012), sus frutos presentan una estructura de bayas alargadas, la forma, el color, y la textura, depende de la variedad que se encuentre de cosecha, este fruto envuelve a las almendras, que presentan un tamaño promedio de 20 – 40 cm, la forma plana o redondeada y su sabor dulce o amargo, («Agroalimentacion - Cultivo del cacao», s. f.) es característico de sus cotiledones, los cuales presentan una estructura mucilaginosa propia del cacao (Álvarez, Pérez, & Lares, 2002).

2.1.1. Grupos genéticos de Cacao (*Theobroma cacao* L.)

a) Criollo

Son árboles relativamente bajos y menos robustos, («19_Manual_para_cultivo_de_cacao.pdf», s. f.), su origen se describe en Centroamérica, Colombia y Venezuela, de esta variedad se obtiene el cacao de aroma que es el mas apetecido a nivel mundial.(FUNDESYRAM, s. f.-c).

b) Trinitario

Es el resultado del cruce entre el cacao de tipo Criollo de Trinidad y Forastero, multiplicado en la cuenca del río Orinoco (FUNDESYRAM, s. f.-c). Su calidad es intermedia, abastecen del 10 al 15% de la producción mundial. («19_Manual_para_cultivo_de_cacao.pdf», s. f.).

c) Forastero

Es originario de America del Sur (FUNDESYRAM, s. f.-c), proporciona el 80% de la producción mundial. («19_Manual_para_cultivo_de_cacao.pdf», s. f.).

d) Nacional

El cacao Nacional presenta características del Forastero, sin olvidar que es uno de las variedades que se cultiva en el Ecuador y es el mas apetecible por su sabor y calidad (cacao de aroma) (Roberto, 2010), presenta el 63% de la producción a nivel mundial («Cacao Nacional | Anecacao Ecuador», s. f.).

2.2. MECANISMO DE INFECCIÓN FITOPATÓGENA

Los patógenos al evolucionar, adquirieron cierta destreza para sobrevivir a espensas de sustancias que se encuentran implantadas en los cultivos vegetales (Pineda, 2011a).

Los patógenos en su constante sobrevivir, alcanzan su añorado alimento después de un desdoblamiento de las sustancias para que sean asimilables, penetrando las barreras externas desde la epidermis, cutícula, y la pared celular, el vegetal al ser “atacado” activa mecanimos de defensa como, barreras químicas y estructuras morfológica que, interfiere con el desplazamiento del patógeno (Pineda, 2011a).

Después de la activación de las barreras de la planta, el patógeno debe ser capaz de inactivar las acciones que produce el vegetal, así el hospedante interfiere con una fuerza mecánica (Pineda, 2011a).

2.2.1. Adherencia del patógeno al hospedante

Esta fuerza se ejerce de acuerdo al ablandamiento de la pared celular, esta acción se presenta en algunos nemátodos para lograr el objetivo de infectar a su hospedante (Tafolla-Arellano, González-

León, Tiznado-Hernández, Zacarías García, & Báez-Sañudo, 2013)

Si pues bien encontramos una adherencia del patógeno a la planta, por medio de las hifas y tubos germinativos, el patógeno actúa con enzimas como cutinasas y celulasas para evitar su eliminación («Estructura Vegetal», s. f.).

2.2.2. Penetración directa del patógeno

La penetración directa del patógeno se ve incrementada gracias al apresorio, que se forma mediante la incrementación de los tubos germinativos, gracias a la hifa («Forma que actúan los patógenos sobre las plantas. Célula vegetal. Estructura y composición de la cutícula de células epidérmicas», s. f.).

Esta hifa es la que penetrará por medio de la cutícula y la pared celular, esta penetración es proporcional, si la cutícula por ejemplo es débil esta será fácilmente ingresada, mientras que si la cutícula es permeable, esta tomará tiempo, si esta se interrumpe la hifa se separa del apresorio y no hay infección (*Manual de técnicas para el diagnóstico de las enfermedades de las plantas. Diagnóstico fitosanitario II*, 1997).

La penetración esta siempre presente de enzimas, estas son las que ablandan a las barreras físicas o químicas de la planta (*Manual de técnicas para el diagnóstico de las enfermedades de las plantas. Diagnóstico fitosanitario II*, 1997).

2.2.3. Sustancias químicas que interviene en la infección

a) Enzimas.- estas desintegran la pared celular, las cuales alteran el funcionamiento normal del protoplasto («Fitopatología G.N Agrios 2da Edición», s. f.).

b) Toxinas.- también actúan sobre el protoplasto esta vez afectando su permeabilidad («Fitopatología G.N. Agrios 2da Edición», s. f.).

c) Reguladores de crecimiento.- afectan con el incremento o la disminución de la división celular, lo que no permite el crecimiento normal del vegetal («Lección 7 MECANISMOS DE INFECCIÓN DE LOS HONGOS FITOPATÓGENOS», s. f.).

d) Polisacáridos.- son importantes para defenderse en enfermedades vasculares («Tejidos Vegetales», s. f.).

2.2.4. Enzimas de degradación

a) Degradación de cutícula.- el compuesto principal de la cutícula es la cutinasa, que son esterasas que rompen los enlaces ésteres de las moléculas, en el momento de una infección (Tafolla-Arellano et al., 2013).

b) Degradación de la cera cuticular.- por medio de la fuerza ejercida por los patógenos es suficiente para degradar, dentro de esta etapa, no se encuentran registradas enzimas de degradación (Tafolla-Arellano et al., 2013).

c) Degradación de sustancias pécticas.- se encuentra en la lamina media, su función es mantener a las células en su localización original, forma una sustancia mucilaginosa amorfa que llena los espacios entre las microfibrillas («Mecanismos de resistencia de las plantas», s. f.).

Las sustancias pécticas contienen ácido galacturónico las cuales forman los polisacáridos, las encargados de degradar estas sustancias son las pectinasas o enzimas pectolíticas (*Técnicas aplicadas al estudio de la anatomía vegetal*, 2005)

Así tenemos tres clases de péctinas:

- a) **Metilesterasas** que son la encargada de romper cadenas pécticas e incrementa su solubilidad (*Técnicas aplicadas al estudio de la anatomía vegetal*, 2005).
- b) **Poligalacturonasas** que rompen las cadenas pécticas en el momento de la adición de una molécula de agua («Mejoramiento de plantas mediante transformación genética | Apuntes de Fisiología Vegetal», s. f.).
- c) **Transeliminadas** rompen las cadenas de ácidos poligalacturónicos al momento de la eliminación de una molécula de agua (Zeiger, 2006).

En el momento de una infección patógena, se produce por parte del patógeno la eliminación de monómeros y polímeros de ácido galacturónico, si esto es absorbido por el patógeno se convierte en inductor de síntesis y libera enzimas pectinolíticas, al aumentar considerablemente estos monómeros y polímeros está inhibe la síntesis de enzimas las cuales intervienen en el desarrollo de las enfermedades que comúnmente se conoce como pudrición blanca (Zeiger, 2006).

- d) **Degradación enzimática de la celulosa.**- la celulosa esta compuesta por largas cadenas de glucosas, dentro de ella también se encuentra las microfibrillas y forman el armazón de la pared celular, la degradación de estas enzimas se produce por parte de las celulasas y como resultado tenemos la formación de glucosa (Ramírez & Cocha, 2003).

La celulosa C1 es la que rompe a la celulosa nativa por medio de la eliminación de los enlaces (Ramírez & Coha, 2003).

La celulosa C2 es la que rompe cadenas cortas y da origen a la celobiosa, y esta es degradada por glucosidasa (Ramírez & Coha, 2003).

En resumen se puede decir que las enzimas celulolíticas son las encargadas de ablandar el tejido, mientras produce azúcares que lo alimentan (Ramírez & Coha, 2003).

e) Degradación de hemicelulosa.- para la degradación de la hemicelulosa intervienen las enzimas genéticamente conocidas como hemicelulasas (xilanasas, galactanasa, glucanasa, arabinasa, manasa) que son producidas por algunos hongos fitopatógenos (Mikán & Suárez, 2004).

f) Degradación de la lignina.- es un compuesto tridimensional, ubicado en la epidermis conjuntamente con la laminilla, la ligninasas son las encargadas de degradar a la lignina, se sabe que algunos hongos y bacterias producen ligninasas pero no se sabe si intervienen en la patogenicidad (Ortiz, 2009).

2.3. SÍNTOMAS CAUSADOS POR FITOPATÓGENOS

Las enfermedades son las causantes de difundir y diseminar una acción continua con efectos de deterioro en un individuo, a esto lo conocemos como síntomas, estos pueden ser visibles y arrazan con el cultivo («Fitopatología G.N Agrios 2da Edición», s. f.).

Los síntomas pueden presentarse como:

- a) Manchas foliares.-** manchas necroticas que pueden ser causadas por *Plasmopara viticola*, *Bremia lactucae*, *Alternaria sp.*, *Septoria sp.* («Fitopatología G.N Agrios 2da Edición», s. f.).
- b) Pudriciones en tallo y frutos.-** producidas por *Phytophthora sp.*, *Fusarium sp.*, *Rhizopus sp.*, *Colletotrichum sp.* («Fitopatología G.N Agrios 2da Edición», s. f.).
- c) Momificación y deformaciones de frutos.-** *Monilinia fruticola*, *Taphrina deformans* («Fitopatología G.N Agrios 2da Edición», s. f.).
- d) Costras.-** *Sphaceloma sp.*, *Venturia inaequalis*. («Fitopatología G.N Agrios 2da Edición», s. f.).
- e) Pustulas.-** *Puccinia allii*, *Phomopsis viticola*. («Fitopatología G.N Agrios 2da Edición», s. f.).
- f) Micelios y esporulación.-** *Phytophthora spp.*, *Botritis cinerea*, *Sclerotium rolfsii*. («Fitopatología G.N Agrios 2da Edición», s. f.).

2.3.1. Sintomatología de moniliasis (*Moniliophthora roreri*)

Los síntomas de la Moniliasis del cacao (*Moniliophthora roreri*), son múltiples y asociadas.

- El primer síntoma de infección, es la esporulación externa que facilita la dispersión (Torres de la Cruz, 2010).
- Luego de presentar las primeras sintomatologías se inocula el hongo dentro del fruto y presenta infección de acuerdo a las siguientes características, dependiendo la madurez fisiológica, la susceptibilidad, factores climáticos y el tiempo de cosecha (Sánchez & Garcés, 2012).

- En el estado de infección presenta puntos aceitosos de diámetros pequeños ($< 2 \text{ mm}$), aumentando de tamaño en el transcurso de 10 a 20 días (Correa Álvarez, Castro Martínez, & Coy, 2014a).
- Después de este periodo se presentan necrosis de color café oscuro sobre las lesiones generadas (Shahin et al., 2014).
- Finalmente se desarrolla un micelio, blanquecino con esporas infectivas, siendo éstas las causantes de la transformación en la pigmentación color marrón del fruto, daño en la totalidad y su bajo rendimiento en la calidad del cacao (Phillips -Mora & Wilkinson, 2007).

2.4. MECANISMOS DE DEFENSA DE CIERTAS PLANTAS

Al evolucionar biológicamente cada individuo, con ello desarrollo mecanismo de defensa, en el caso del reino plantae se adquirieron ciertas maneras de eludir a los invasores fitopatógenos (González-Mendoza & Zapata-Pérez, 2008)

2.4.1. Barreras estructurales o físicas de las plantas

Dentro de estas barreras, asumimos la estructura biológica de cada individuo (vegetal), como es la presencia de pelos absorbentes, cera cuticular, grosor de la cutícula, pared celular, composición de la pared celular, forma y tamaño de los estomas y lenticelas, suberificación, tejidos internos de la planta. («Mecanismos de resistencia de las plantas», s. f.).

Como bien mencionábamos algunas plantas como la papa (*Solanum tuberosum*), presenta cierta barrera física, como son sus pelos glandulares que están formado por dictiosomas, los cuales en el momento de un ataque segregan sustancias mucilaginosas como la granuloquina e inmoviliza al virus (Pineda, 2011b).

En el caso de la cera cuticular (compuesta por *n*-alcanos de cadenas largas de acetona, alcoholes, ester, flavonoides, etc), es la encargada de evitar el ataque de hongos fitopatógenos en *Citrus aurentifolia* (Bakker & Alvarado, 2006), (Pineda, 2011b).

Otra barrera física, encontrada en la pared celular, en el momento de una silicación epidérmica, esto ayudara a evitar el paso de fitopatógenos, como se observa en *Piricularia oryza* y *Hermintosporium oryzae* («Lección 7 MECANISMOS DE INFECCIÓN DE LOS HONGOS FITOPATÓGENOS», s. f.).

El tamaño, localización, forma de los estomas y lenticilas, forman otra barrera, en el caso de *Critus nobilis* se observa una abertura estomatica menos densa, esto evita el paso de agentes fitopatógenos, por medio del poro estomático (Pineda, 2011b).

Por ultimo las lenticelas, órganos internos que asegurar el intercambio gaseoso del medio exterior hacia el interior este proceso puede involucrar la entrada fitopatógena, si ocurriese esta acción, las células meristemáticas actuarían y formarían un corcho para evitar la infección (Pineda, 2011b)

En el caso del manzano las lenticielas conforman un diámetro mas pequeño de lo normal, y no permite el paso de agentes fitopatógenos como la *Venturia inaequalis* (Bakker & Alvarado, 2006)

2.4.2. Barreras químicas preformadas

Dentro de esta barrera química encontramos compuestos antimicrobianos que se activan, como pueden ser los fenoles, saponinas etc, en el momento de un ataque fitopatológico (Lopez-Martinez, s. f.).

Un caso puntual y común se encuentra en la cebolla roja (*Allium cepa*), en el momento de un ataque de hongos el ácido protocatéquico y catecol, se activan para formar un fungicida natural (Bakker & Alvarado, 2006).

Así también tenemos la hidrólisis enzimática, esta se activa en la avena (*Avena sativa*) y sorgo (*Sorghum bicolor*), esta acción se desarrolla a nivel de las raíces las cuales contiene glicósidos cianogénicos, ácido protocatéquico y catecol, los cuales liberan HCN y forman un antifungicida (Bakker & Alvarado, 2006).

Al momento de estrés a nivel de campo, se da paso a que la planta sea propensa a ciertos ataques de hongos, por esta razón en las raíces observamos la eliminación de exudados como las fitoanticipinas, los cuales sintetizan otros compuestos antifungicos, en este grupo encontramos las fitoalexinas, compuestos fenólicos, terpenoides. El monoterpeno 1,8 cineol es liberado por la planta modelo (*Arabidopsis thaliana*) para evitar el ataque (Oliveros-Bastidas, Macías, Fernández, Marín, & Molinillo, 2009).

2.5. EVOLUCIÓN DE LAS ENFERMEDADES

Las primeras enfermedades presentadas a nivel mundial se dispersaron tan rápido que el rastreo fue obsoleto.

La evolución de plagas y enfermedades se presentó con el uso del monocultivo, de esta manera el ataque de patógenos incrementan su estabilidad, debido a la alteración de ecosistemas y la susceptibilidad de ciertos vegetales a ellas. («Mecanismos de resistencia de las plantas», s. f.).

Los primeros registros que se obtuvieron fueron en el año 1870, en América Latina y Europa se registró el ataque de escarabajo y a cierta enfermedad en el cultivo de la patata (*Solanum tuberosum*) («Plagas y enfermedades de las plantas : FAO in Emergencies», s. f.).

A partir de esto se obtuvieron controles, y la ley de legislación de insectos destructivos en el año de 1877 en el Reino Unido, para minimizar los efectos dañinos de plagas y enfermedades («FAO :AG :Agricultura de Conservación», s. f.).

Con la Revolución Industrial se consolidó, los mercados para abastecimiento una seguridad alimentaria, y un mercado mundial para los principales controles de enfermedades existentes en esa época («FAO :AG :Agricultura de Conservación», s. f.).

Antes de la Segunda Guerra Mundial, se tuvo una pandemia a nivel del cultivo de cereales, en 1970 se producían 30 millones de toneladas de cereales, lo que proporcionó el aumento de plagas y enfermedades hasta volverles endémicas (Morales, 2010).

En la actualidad el comercio de frutas, como, melón, banana, plátano, vid, manzano y por supuesto el Cacao (*Theobroma cacao* L) (Sánchez & Garcés, 2012) son los causantes del mayor índice de enfermedades como por ejemplo la moniliasis (*Moniliophthora roreri*) que arraza con el 80% de cosecha en el Ecuador (Ortega & Kafuri, 2008).

2.5.1. Evolución de la Moniliasis (*Moniliophthora roreri*)

Diferentes autores señalan que el comienzo de la enfermedad en Ecuador en 1917 se realizaron estudios posteriores que revelan que la enfermedad, ya se encontraba distribuida en los distritos Colombianos como, Santander y Antioquia en 1817, y fueron resgistrados en el años de 1851 (Phillips -Mora et al., 2007).

A partir de la georeferenciación de la Moniliasis, muchos científicos estudiaron la diversidad genética, para obtener resultados contundentes del origen y distribución de la enfermedad (Correa Álvarez, Castro Martínez, & Coy, 2014b).

Esto conduce a la aplicación de técnicas moleculares como fue la AFLP (polimorfismos de fragmentos largos amplificados), ITS (datos de secuencias intergénicas), (Phillips -Mora & Wilkinson, 2007), RAPD (Random Amplified Polymorphism of DNA) y AP-PCR (Arbitrally Primed Polymerase Chain Reaction) en las que se encontró alta diversidad genética, hasta un 95% de los grupos estudiados (Ortega & Kafuri, 2008) lo que aumenta las evidencias para señalar a Colombia como la región de su posible origen. (Phillips-Mora & Wilkinson, 2007).

En las provincias Colombianas, los individuos que se encuentran en las zonas co-este y co-central, ubicadas en las regiones del Magdalena Medio y Santander, respectivamente, siendo esta última donde se presenta la mayor variabilidad genética en las regiones colombianas (Correa Álvarez, Castro Martínez, & Coy, 2014c).

En el Ecuador, el primer registro de infección que se dio por *Moniliophthora roreri* fue en en la provincia de Quevedo provincia de Los Ríos, cabe indicar que el área de ocurrencia en los últimos 40 años ha crecido indiscriminadamente (Correa Álvarez et al., 2014a).

2.5.2. Ciclo de la enfermedad y epidemiología

Las condiciones climáticas y la cantidad de esporas libres son factores determinantes en el ciclo de vida de *M. Roreri* (Torres de la Cruz, 2010).

Para que el hongo pueda dispersarse se inicia el ciclo, en las estaciones secas, en la que se encuentra la mayor cantidad de esporas que ha podido generar el hongo, pero la mayor condición, es que se genere la humedad necesaria para que el hongo comience su infección a una temperatura de 24°C (Contreras, 2006).

La esporulación se puede iniciar antes de los 22 meses, posteriores a la infección, pasado este proceso las hifas del hongo ingresan penetrando la epidermis del fruto, por lo tanto el hongo tiene la capacidad de propagarse inter e intracelularmente así en todos los tejidos subepidérmicos y el exocarpo (Ortega & Kafuri, 2008).

Posteriormente la infección ataca a los tejidos centrales y a las semillas, las cuales presentarían necrosis desde la parte interna hacia la epidermis (FUNDESYRAM, s. f.-a).

Las lesiones presentan una característica aceitosa y ya se encuentran los primeros anillos de color amarillo y marrón en el fruto, esta infección con presencia de coloración se da entre los 10 a 60 días dependiendo de la variedad de clones cultivados (Torres de la Cruz, 2010).

El micelio aparece a los 4 días los cuales se van a desarrollar sobre las lesiones de anillos de coloración amarilla o marrón, y van a tener un aspecto de algodón sobre el fruto, en esta etapa se puede decir que el hongo se desarrolla en su totalidad sobre el fruto de cacao (*Theobroma cacao L.*) (Díaz-Valderrama & Aime, 2016).

2.6. CONTROL DE LA MONILIASIS (*Moniliophthora rorei*) EN ECUADOR

2.6.1. Convencional

En el cual, se recomienda realizando podas para evitar el crecimiento del árbol más de su volumen requerido, y produzca un auto-sombramiento el cual va a reducir su actividad fotosintética, para evitar el desarrollo de microclimas que puedan desarrollar la enfermedad en su interior y producir una infección, otro punto sería el recolectar los frutos con una posible infección, para evitar que la enfermedad ingrese al cultivo, otra de las maneras recomendadas por el autor es evitar la alta humedad excesiva. (MORA. 2012. P 253).

2.6.2. Control químico

Se utiliza principalmente compuestos con oxiclورو de cobre (OC) y Mancozeb (MA) cada 15 días en concentración de 860 y 347 g i.a./ha (Sánchez, Gamboa, & Rincón, 2003).

2.6.3. Biológico

Para el control biológico de moniliasis (*Moniliophthora roreri*), en cacao se a relizado diversos estudios en los que se utiliza microorganismos endófitos como, *Paecilomyces sp* que permite un control del 79.45% , *Trichoderma sp* con un 55% (Contreras, 2006) y una bacteria *Bacillus brevis* que tuvo una efectividad del 89% («Aislamiento de microorganismos para control biologico de *Moniliophthora roreri* - ProQuest», s. f.).

2.6.4. Resistencia

En diferentes estudios se obtiene 5 genotipos de diferentes latitudes que fueron introducidos en diferentes años y épocas en su país de desarrollo. Según (Bonilla et al., 2015) los cinco genotipos en estudio son:

1. UF-273.
2. UF-712 originarios de Costa Rica.
3. EET-75 originario de Ecuador.
4. ICS-95 originario de Trinidad.
5. PA-169 originario de Perú.

Al estudiar estos genotipos se tiene como resultado la obtención de 10 pares de cromosomas, la cual marca el inicio de la secuenciación y se obtiene el 76% de la misma, por la tonto se identifica 28.798 genes de los cuales codifican 23.529 proteínas que se presume es el 82% (Bonilla et al., 2015).

Como resultado los investigadores determinan que la transferencia horizontal de genes es la pauta para determinar la aparición fitopatogénica (mecanismo fitopatógeno del hongo) (Bonilla et al., 2015)

Otros estudios realizados por (Botello & Hernando, 2015) se termina el Patosistema de cacao- Monilia, en el que se determina la resistencia y la tolerancia de algunos materiales vegetales frente a la enfermedad en Colombia en donde se realizó el estudio de 8 especies colombianas de cacao y 5 introducidas las cuales fueron sometidas a la incubación artificial durante 75 días, las cuales determinaron:

- Una huella molecular a partir de polimorfismos, en las que se determinó que FEC 2 y FSV 155 se alejan del resto por su posible característica de resistencias.
- Las tres regiones por medio de Q TLs que se encontraron en los cromosomas 2, 7, y 8 de los 10 que se ratifican en el estudio de (Bonilla et al., 2015).
- Las barreras por medio del cual pasa el patógeno serían la pared celular, glucósidos, saponinas, alcaloides, proteínas antifúngicas, e inhibidores enzimáticos lo que demuestra la capacidad de infección del hongo frente al material vegetal.

Con estos estudios realizados podremos tener las pautas necesarias para desarrollar nuestro trabajo y determinar la expresión de ciertas proteínas en el cacao con respecto a la enfermedad más grave Monilia.

2.7. PROTEINAS QUE INTERVIENEN EN LA RESISTENCIA A ENFERMEDADES FUNGOSAS EN PLANTAS

Dentro de las proteínas estudiadas que tiene relación con la defensa contra hongos verdaderos tenemos a las PR.

2.7.1 Las PR

Se encuentran localizadas en espacios intercelulares, cabe indicar que las proteínas son variables de acuerdo a la especie en la que se encuentra («rchscfaXIII481.pdf», s. f.).

2.7.1.1. Las PR mas conocidas son:

PR 1	PR 4	B-1,3-glucanasas
Quitinasas	Lizosimas	Teina
Proteína rica en cisteína		Proteinasas
Quitosanasas	Proteína rica en glicina	Peroxidasas
Inhibidoras de proteinasas		

2.7.1.2. Dentro de los inductores de las PR tenemos

Ácido salicílico.	Etileno.	Xilanasa.
Sistema polipéptido.	Ácido jasmónico.	

Los inductores actúan en el inicio y reduciendo el nivel de infección, esto se puede dar a nivel de cualquier parte de la planta ya que el transporte de los inductores es sistémico, otro ejemplo es la inhibición de esporas y el fortalecimiento de la pared celular. («Mecanismos_de_defensa_en_la_interaccion_planta_patogeno.pdf», s. f.).

En el grupo de las PR también encontramos a las Quinasas, B-1,3-glutanasas. Estas actúan sobre la pared de algunos fitopatógenos que ayudan en la interacción del patógeno («Puntos de inflexión», s. f.).

En el caso de bacterias tenemos a las lizosimas y al ácido murámico que degradan la glucosamina y a la paredes celulares de bacterias («Puntos de inflexión», s. f.).

2.7.2. Fitoalexinas

Son sustancias tóxicas que se producen a partir del daño mecánico, químico o por el estímulo de una hifa fitopatógena o también por nematodos, o bacterias («vivanco-et-al-2005.pdf», s. f.).

Se pueden aislar a partir de leguminosas, las que pertenecen a los isoflavonoides, y en las solanáceas son terpenoides («vivanco-et-al-2005.pdf», s. f.).

Las fitoalexinas actúan en el momento, en que las células sanas localizadas adiacentementa a las enfermas o muertas, difunden sustancias segregadas por parte de las células con proceso de infección («vivanco-et-al-2005.pdf», s. f.).

Lo que nos llama la atención en el caso de las fitoalexinas, es que se presentan tanto en plantas susceptibles como en plantas resistentes, el porcentaje de concentración es la que permite restringir o inhibir al patógeno, esto quiere decir que en plantas resistentes las fitoalexinas son mayores («vivanco-et-al-2005.pdf», s. f.).

En el caso de las plantas susceptibles las fitoalexinas no son suficientes para vencer a los supresores como los glucanos.

2.7.2.1. Las fitoalexinas se clasifican según su origen.

Faseolotoxina	Fréjol.
Pisatina	Arveja.
Gliceolina	Soya, Alfalfa y trébol.
Risitina	Papa.
Gosipol	Algodón.
Capsidiol	Pimiento («vivanco-et-al-2005.pdf», s. f.)

2.7.3. Compuestos fenólicos comunes

Los compuestos fenólicos como: ácido clorogénico, ácido caféico y ácido ferúlico, aumentan su concentración en el momento de una infección («00b7d529332fb8f009000000.pdf», s. f.)

2.7.3.1. Compuesto fenólicos tóxicos.

Su origen se da a partir de compues fenólicos no tóxicos, que son liberados a partir de enzimas como la glucosidasa, la cual hidroliza algunos compues como los glucósidos no tóxicos, y los trasnforma en en tóxicos para los patógenos («00b7d529332fb8f009000000.pdf», s. f.)

2.7.4. Ezimas oxidantes del fenol

Estas enzimas producen resistencia a la planta, en el momento de una oxidación, los polifenoloxidasas oxidan el fenol en las quinosas las cuales son tóxicas para el patógeno (González-Mendoza & Zapata-Pérez, 2008).

En el caso de las peroxidasas, cumplen un doble propósito, el de oxidar y polimerizar con una mayor velocidad los compuestos similares a las ligninas (Montes-Belmont, 2009).

2.7.5. Resistencia Sistema Adquirido (SAR)

Las sustancias que son inducidas para la resistencia son:

- Ácido salicílico.
- Ácido araquidónico.

Ácido 2,6 dicloroisonicotínico (García L., 2002)

2.7.5.1. Sustancias relacionadas con el SAR

B-1,3-glucanasas.	Proteínas ricas en cisteína.
Quinasas.	Proteínas PR-1.
Peroxidasas.	Lipoxigenasas (García L., 2002)

2.7.5.2. Dentro de los fungicidas que inducen al SAR.

Fosetil (Aliete)	Metaxil (Ridomil)	Trizoles
(García L., 2002)		

2.7.6 Proteínas resistentes a monilia (*Moniliophthorae roerei*)

Se ha realizado diversos estudios en la planta modelo (*Arabidopsis thaliana*) en la que se ha identificado la función del gen NPR1 que es el coactivador de la transcripción, el cual juega un importante rol en la defensa de respuesta a patógenos (Shi et al., 2010). Secuencias de ADN revelaron una región codificante de 4,5 kb que contiene 3 intrones que codifican a 591 aminoácidos (Shi et al., 2010) dentro de este gen.

El TcNPR1 se identificó con un 55% y un 78% de similitud en la planta modelo, como resultados se tiene que el gen ortólogo presta un papel importante en la respuesta de defensa en plantas de cacao (Shi et al., 2010).

Las TcNP3 trabaja simiilarmete que las Npr3 en Arabidopsis, asi mismo su expresion se representa con mayor expresi3n en cuanto a la planta modelo. Resultados de este estudio nos permiten determinar la expresi3n de esta proteina en diversos tejidos y en diferentes etapas de desarrollo, asi tambien TcNPR3 interviene en la reducci3n de la reproducci3n de Phytophthora capsici (Shi et al., 2013).

2.7.6.1 Defensinas

Las defensinas son un grupo de peptidos peque1os de 5 kDa (45-54 aa), su descubrimiento fue en trigo, pero se ha realizado estudios en cuanto a su estructura, asi tenemos proteinas como Rs-AFP que porporcionar un 0,5% de la proteinas total (Shi et al., 2013).

La activaci3n de Rs-AFP se da en el momento de la ruptore de la testa despues de la germinaci3n, se libera un 30% de la proteina y eso es suficiente para contrarestar los efectos fitopat3genos del suelo (Shi et al., 2013).

Las defensinas en su totalidad no son t3xicas ya que interviene en el crecimiento y desarrollo del vegetal (Shi et al., 2013).

2.8. T3CNICAS UTILIZADAS EN LA INVESTIGACI3N

2.8.1. Prote3mica

El t3rmino proteomica fue acu1ado en el a1o de 1994, determinado a partir de **prote3na** y **genoma**, el Ph Marc Wilkins lo denomin3 mientras realizaba sus estudios de doctorado, en los cuales llego a la conclusi3n de que la proteomica estudia la estructura y funci3n de las prote3nas («Prote3mica», 2011).

El proteoma es el estudio de todas las proteínas existentes en una muestra biológica, expresada por un genoma, por medio del proteoma podemos tener una imagen dinámica de todas las proteínas en condiciones de estudio como, estrés de una planta, madurez fisiológica, etc («Proteómica - Medicina molecular», s. f.)

El estudio y comparación sistemática de las proteínas en diferentes situaciones metabólicas (que dan como resultado varias reacciones consecutivas catalizadas por una enzima), o patológicas causada por una enfermedad como es en el caso de la Moniliasis, permite identificar aquellas proteínas cuya presencia, ausencia o alteración se ve reflejada en la correlación con determinados etapas fisiológicas. (MORALES et al., 2006, s. f.)

En el caso del análisis proteómico asociado a patologías concretas, es posible identificar proteínas que permitirían diagnosticar la enfermedad o pronosticar la evolución de la misma (Aldecoa Bedoya & Battilana Guanilo, 2006).

La proteómica también depende de muchas técnicas para evaluar a cada una de las proteínas expresadas, como es la espectrometría de masa, análisis moleculares, separación de péptidos y proteínas a partir de 2D PAGE o la cromatografía líquida, a permitido consolidar a la proteómica como una ciencia para el análisis de individuos (Aldecoa Bedoya & Battilana Guanilo, 2006).

2.9.2. Cuantificación de proteínas

La detección de la concentración de proteínas es una actividad rutinaria que se lleva a cabo dentro del laboratorio, para determinar la pureza de las proteínas extraídas. (CITIUS, 2012)

Dentro de esta técnica se determinaron diferentes tipos de cuantificaciones, con sus ventajas y desventajas, al igual que su nivel de absorción, observar **tabla 1**.

TABLA 1: Métodos de cuantificación de proteínas para determinar la concentración.

Método de Absorción	Rango sensibilidad ug	Coefficiente de extinción
A 280	100-3000	
A 205	3-100	
A 280-A 260	100-3000	PROTEINA (mg/ml) = (1.55 A 280 - 0.76 A 260)
A 235-A 280	25-700	PROTEINA (mg/ml) = (A 35 - A 280)/2.51
A 224-A 236	5-180	PROTEINA (mg/ml) = (A 224 - A 236) / 0.6
A 215-A 225	2.-45	PROTEINA (mg/ml) = 144 (A 15 - A 225)
Método Derivados Colorimétricos.		
Biuret	1000-10000	
Lowry	25-100 a 500 nm 2-30 a 660 nm 1-2 a 750 nm	Usar curva estándar
Bradford	1.-15	E 595 = 81 mL/mg cm
BCA	0.5 -10	Usar curva estándar
Método Derivados.		
o-flalaldehído	1-5 extinción a 340 nm extinción a 475 nm	Usar curva estándar

Fuente: (REYES, s. f.).

2.9.3. Descripción de los métodos para determinar la concentración de proteínas.

- a) **Método de Biuret.**- describe claramente la reacción compleja que se forma entre el Cu y los grupos NH de los enlaces peptídicos.

La intensidad de la coloración es directamente proporcional a la cantidad de proteínas presentes en cada muestra experimental. (REYES, sf).

- b) **Método de Bradford.**- la estimación de la cantidad de proteínas en las muestras según este método, es la unión del colorante Commssie Blue G-250.

El colorante en condiciones de pH ácido, tiene dos tonalidades una azul y uno naranja, al formar el complejo proteína-colorante, esta reacciona y las proteínas se tornan azul. Se destaca la utilización de una curva de calibración formada por suero de albúmina bovina. (REYES, sf).

- c) **Método de BCA.**- este método está conformado por una sal sódica, que al reaccionar con los iones de Cu, forman una coloración púrpura en un medio alcalino. (REYES, sf.)

TABLA 2: Métodos de cuantificación de proteínas sus ventajas y desventajas.

Método	Ventajas	Desventajas
Método de Absorción	No se pierden las muestras	Interfieren muchos compuestos que absorben en el UV
Método Derivados Colorimétricos.		
Biuret	Bastante específico para proteínas. Poca interferencia Es barato	Tiene poca sensibilidad
Lowry	La sensibilidad es buena.	No todas las proteínas tienen las mismas reacciones. Mucha interferencia con los agentes desnaturizantes.
Bradford	Muy sensible	Mucha interferencia con los detergentes.
BCA	Es el método más sensible. Menor interferencia	
Método Derivados.		
o-flalaldehído	Muy sensible	La interferencia de aminos contaminantes en la muestra y las muestras no reacciona igual.

Fuente: (REYES, sf).

2.9.4. Cuantificación de proteínas mediante Nanodrop

Este equipo nos permite medir la concentración de las proteínas mediante la espectrofotometría en un amplio rango de 220-750 nm con gran sensibilidad y reproducibilidad.

Basta colocar entre 10 a 12 µl de muestra en el equipo, para que se realice la espectrofotometría, con la ayuda del Software nos permite medir una concentración y una pureza en los ácidos nucleicos (260 nm), y en el caso de las proteínas (280 nm) (CITIUS, 2012).

Proceso para la cuantificación de proteínas en el equipo nanodrop

Primer paso.- Colocar el volumen de la muestra en el pedestal inferior. Se recomienda utilizar los siguientes volúmenes para la determinación.

- Soluciones acuosas de ácidos nucleicos. 1ul
- Proteínas purificadas. 2ul
- Método de Bradford, BCA o Lowry. 2ul
- Suspensiones celulares. 1-2ul

Segundo paso.- Cerrar el pedestal superior e iniciar el proceso empleando el software adecuado para el equipo (CITIUS, 2012).

2.9.5. Geles de poliacrilamida PAGE

Los geles de poliacrilamida se asemejan a un tamiz molecular, retardando el movimiento de las macromoléculas que contienen un mayor peso molecular, de esta manera quedan retenidas gradualmente en el peso adecuado, mientras tanto las moléculas con menor peso siguen en movimiento hasta ser retenidas. (GARCÍA, 2000).

El término PAGE simbolizado, significa polyacrilamide gel electrophoresis, el cual es generado por un entramado por la polimeración de agentes como bis-acrilamida (N,N,N,N-metilen.bis-acrilamida), de esta manera se genera poros de diferentes tamaños dependiendo de la concentración en la que se elabora el gel. (GARCÍA, 2000).

De acuerdo al poro del gel se puede ejecutar diferentes estudios de separación de proteínas, con un porcentaje de 10-15% obtendremos retención de partículas de 50 KDa estas son de

menor tamaño, mientras que al bajar el porcentaje, menos del 10% se obtendrán proteínas de mayor tamaño. (INS, 2003).

La relación de acrilamida y bis-acrilamida es de 37,5 : 1 (MALDONADO et al., s. f.).

El sistema de polimerización se realiza mediante un redox de catálisis, colocando como autor al TEMED el cual va a generar radicales libres, los cuales van a reaccionar por medio de la ionización del persulfato de amonio APS este actúa como iniciador. (MALDONADO et al., sf).

2.9.5.1. Clasificación de los geles de poliacrilamida

Los geles de poliacrilamida se caracterizan en dos, de acuerdo a las condiciones de procesamiento de las muestras.

- En condiciones nativas (ND-PAGE).
- En condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) (RABILLOUD et al., 2011).

a) En condiciones nativas (ND-PAGE)

Este gel al encontrarse en condiciones nativas, las proteínas no cambian su estructura ni forma tridimensional, tampoco las cadenas estructurales que la forman estas se encuentran unidas.

En el momento de la migración las proteínas van a mantener sus condiciones nativas y serán separadas por su carga eléctrica. (MORALES et al., 2006).

b) En condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE).

Como su nombre lo dice están presentes soluciones desnaturizantes como: reductores, detergentes, caóticos.

En el momento de la aplicación de agentes desnaturizantes como el SDS aniónico, proporcionan a las moléculas una interacción hidrofóbica y posteriormente se desnaturiza. (MORALES et al., 2006).

Ocurrido este proceso las proteínas toman otra forma y estructura "bastones", cargadas con el detergente que proporciona una carga negativa a las moléculas. (MORALES et al., 2006).

La proporción que se integra a cada molécula es de 1 de detergente SDS por 2 residuos de proteínas. Cabe indicar que el SDS enmarca la carga de las proteínas. (MORALES et al., 2006).

Las proteínas cargadas con el SDS presentan un valor carga/masa que es constante por lo tanto en la migración desde el cátodo al ánodo, se separan en bandas y se lo compara con el marcador molecular. (MORALES et al., 2006).

Otro agente reductor o desnaturizante es el 2-mercaptoetanol que reduce los puentes disulfuros (Cys-S-S-Cys) a grupos metilos (Cys-SH). (MALDONADO et al., sf).

Agentes caóticos como la urea rompen los puentes de hidrógeno para asegurar la disociación de las proteínas, se procede a calentar las muestras que contiene el tampón de muestra antes de la colocación en la electroforesis. (ARIZMENDI, 2013).

2.9.6. Tipos de electroforesis

- Electroforesis en gel de agarosa.
- Electroforesis en papel.
- Electroforesis en gel de poliacrilamida.
- Electroforesis capilar.
- Electroforesis bidimensional.
- Isoelectroenfoque. (BIO SCIENCES, s. f.).

2.9.6.1. Electroforesis en geles de poliacrilalmida

Como resultado de la utilización de esta técnica podremos obtener la purificación, el análisis y la caracterización de proteínas.

La técnica se aplica debido a su simplicidad, rapidez, y sensibilidad para la separación de proteínas y ácidos nucleicos (SALMERÓN, 2010).

Para ello, se debe seguir un proceso riguroso con las muestras para fraccionar adecuadamente el material vegetal y proceder a la electroforesis (MORALES et al., 2006).

El término electroforesis se escucho a partir de los años 1907 por Michaelis, para definir el fenómeno por el cual una molécula que contiene una carga neta, se puede desplazar como respuesta, a la ejecución de una carga eléctrica. (INS, 2003).

Para que esta respuesta se presente se identificaron los siguientes parámetros:

- La velocidad de migración.
- La intensidad eléctrica.
- La carga neta.
- Viscosidad y temperatura del medio en el cual las moléculas se mueven.
- Fuerza iónica.
- Tamaño y forma de la muestra.

(GARCÍA, 2000).

2.9.6.2. Sistemas de electroforesis

Dentro de las variantes de electroforesis encontramos dos sistemas: continuo y discontinuo esta diferencia radica en cada uno de los tampones que se emplean para la elaboración de los geles.

a) **Sistema continuo o llamado Weber y Osborn.**- en este sistema se trabaja con un único gel, el cual está conformado por el gel separador, esta variante cumple con un requisito, trabajar con un mismo tampón de corrida y con el mismo tampón en el gel. (MALDONADO et al., sf).

b) **Sistema discontinuo o llamado Laemmli.**- en este sistema se trabaja con dos tipos de geles el cual toma el nombre de gel de concentración, concentrador, empaquetamiento y lower, y el gel separador el que se lo designa como upper, en el gel lower al polimerizar forma poros grandes (restrictivo), en el caso del gel upper son poros mas pequeños. (MALDONADO et al., sf).

Con la ayuda de diferentes tampones, con diferentes pH, y fuerza iónica se trabajó el sistema discontinuo (MALDONADO et al., sf).

c) Movimiento de las partículas en los diferentes sistemas

Gel concentrador.- En este gel las partículas contienen un movimiento intermedio entre la movilidad de los iones de Cl del gel y la movilidad del ión glicina Gly del tampón de muestra. (SALMERÓN, 2010).

Gel separador.- Al contrario, el gel separador al contar con un pH básico esto favorece la ionización de la glicina de forma que sus iones migran a través de la malla de poros, de esta manera migrarán las proteínas separándose por su tamaño. (SALMERÓN, 2010).

2.9.6.3 Electroforesis bidimensional (Isoelectroenfoque + SDS-PAGE)

En geles de poliacrilamida (2D PAGE), es la herramienta que se emplea de forma continua para el análisis de las proteínas en su totalidad obtenidas de un organismo biológico.

Esta técnica nos permitirá obtener y separar de cientos o miles de proteínas ("spots") en un único gel. («BIO-RAD, s.f.)

2.9.6.3. Punto isoelectrico PI.

Se determina como punto isoelectrico de un anfótero cuya carga es neta (cero) (ARIZMENDI, 20013).

Las proteínas como todos bien sabemos contienen grupos de cargas, de ambas polaridades, de esta manera se presenta el pI, que es el valor de la carga neta (z) de las proteínas a un pH determinado, por lo cual, el resultado es inmovilizar a la molécula en un campo eléctrico. (ARIZMENDI, 2013)

El $pI = (pK1 + pK2) / 2$ mientras que para un aminoácido de cadena ácida base el pI es el promedio de los pK entre las especies de carga $+1$ y carga -1 . (ARIZMENDI, 2013).

Observar en la **Figura 3**.

2.9.6.4 Isoelectroenfoque IEF.

Dentro de esta técnica se establece un gradiente de pH muy estable, en adición de anfólitos (urea, tiourea) para que se adhieran a las muestras (proteínas), y se procede a la electroforesis, de acuerdo al pH , las proteínas migrarán dentro del gel con un valor isoelectrónico (INS, 2003).

Durante la migración el gradiente de pH , las proteínas actúan, bien cargando positivamente o negativamente (protones), mientras la proteína migra la carga neta y la movilidad disminuirán para que la proteína se estabilice (ARIZMENDI, 2013).

Cuando la proteína se estabiliza en el punto isoeléctrico en referencia al gradiente de pH , la molécula quedará sin carga y la migración para, en el caso que la proteína tuviese que migrar más la partícula se convierte en protonada y se forzará la migración al cátodo, por medio del campo eléctrico. (ARIZMENDI, 2013).

Si por el contrario se difunde en una zona mayor de pH con referencia a su pI , la proteína llegará a ser cargada negativamente y será impulsada hacia el ánodo. (ARIZMENDI, 2013).

De esa manera las proteínas se condensan en las diferentes bandas, con sus respectivos gradientes de pH y pI . (ARIZMENDI, 2013).

CAPÍTULO III

3. MATERIALES Y MÉTODOS

• LOCALIZACIÓN

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología de la Escuela Superior Politécnica del Litoral ESPOL, ubicado en el campus Gustavo Galindo Velasco Km 30.5 vía perimetral, en el Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador CIBE.

• MATERIALES Y EQUIPOS DE LABORATORIO PARA LA REALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN.

3.1.1. Material físico

a) Equipos:

- Balanza analítica marca Thomas scientific.
- Medidor de pH.
- Refrigeradores -80 °C; -20 °C; -4 °C.
- Rosiadores para alcohol.

b) Herramientas:

- Pipetas digitales de medición en lanchas de 10 ul; 100 ul; 1000 ul.
- Pinzas.
- Bisturis.
- Tijeras.
- Mortero.
- Pistilo.
- Espátulas.

- Guantes.
- Vidrieria.
- Probetas 50 ml; 500 ml.
- Tubos Eppendor 20 ml.
- Tubos Falcon 14 ml; 50 ml.
- Vasos de precipitacion 50 ml; 100 ml; 250 ml.
- Helmer.
- Papel esteril.

c) Material químico

- Nitrógeno líquido.
- Acrilamida / Poliacrilamida.
- Azul de Comassi.
- Aceite mineral.
- Hipoclorito de Sodio (cloro)
- Detergente.
- Etanol.
- Metanol.
- Acetona.

• MÉTODOS

3..1. Material experimental

3..1.1. Material Biológico

El material vegetal utilizado fueron hojas de plantas de cacao (*Theobroma cacao*) con presencia y ausencia de sintomatología, producida por Moniliasis (*Moniliophthora roreri*), las cuales fueron recolectadas en el sector de la Provincia de Naranjal en tres

haciendas denominadas, Finca Sector la Montaña, Sector Huerta Seca, y Sector Huerta Vieja #2, en la provincia del Guayas.

De las cuales se tomaron tres muestras sin sintomatología y tres con presencia del patógeno, por cada hacienda, la presencia del hongo debió verificarse en el fruto de la planta de cacao.

Posteriormente fueron etiquetadas, georreferenciadas, y congeladas inmediatamente con Nitrógeno líquido para evitar necrosis, y degradación de proteínas, fueron transportadas, hacia la Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL), en donde se las procesó inmediatamente en el pulverizador con Nitrógeno líquido y fueron almacenadas a -80°C para su conservación hasta la realización del estudio.

3.1.2 Tratamientos estudiados

Se recurrió al estudio de los siguientes tratamientos:

- Protocolo de extracción de proteínas recalcitrantes + triturado.
- Protocolo de extracción de proteínas recalcitrantes + pulverizado.
- Protocolo de extracción de proteínas recalcitrantes + nitrógeno líquido.
- Protocolo de extracción de proteínas recalcitrantes + protocolo de extracción de proteínas de meristemas de cacao.
- Protocolo de extracción de proteínas modificado + pulverizado.
- Protocolo de extracción de proteínas modificado + hojas jóvenes.
- Protocolo de extracción de proteínas modificado + hojas maduras.

3.1.3 Características de la unidad experimental

Cada unidad experimental fue conformada por un tubo eppendor de 1.5 ul, con 3 repeticiones por cada tratamiento, para su concervacion se guardo a -80 °C, esto le dara las condiciones adecuadas para que las muestras no se necrosen ni se degrade las proteinas.

3.2 Esquema de análisis estadístico

Se relaizò el estudio de la distancia de migraciòn de cada una de las bandas presentes en cada uno de los geles migrados, con cada una de sus variaciones en estudio.

Factor 1.- Protocolo de extracciòn de proteinas.

Factor 2.- Manipulaciòn de la muestra.

3.3 MANEJO DE LA INVESTIGACIÓN

3.4.1. Extracción de proteínas de cacao (*Theobroma cacao* L.)

3.3.2.1 Primer protocolo para la extracciòn de proteínas

Para la extracciòn de proteínas nos basamos en el “**Protocolo rápido y Universal para extracciòn de proteínas de tejidos de plantas recalcitrantes para análisis proteómico**”. (Wang et al., 2006)

El procedimiento llevado acabo, se da con la selecciòn de las hojas a nivel de campo, las hojas seleccionas, tuvieron un tamaño aproximado de 41 cm de largo por 13 cm de ancho, las cuales fueron recolectadas de la parte apical del àrbol de cacao.

Para el pulverizado, se adicionò una solución amortiguadora como es el Nitrógeno líquido, para evitar que las muestras se necrosen y degraden, con la ayuda de un mortero y pistilo se obtuvo la mayor cantidad de muestra triturada.

Para una eficiente pulverización, en cada tubo se coloca rulinanes y se procede a una nueva pulverización en el equipo triturador, marca RESTSCH, modelo MM 400, serie 128061014.

En estas muestras completamente trituradas, se colocò TCA 10% / acetona, hasta llenar el tubo (1ml), la cual nos permitió limpiar los pigmentos de clorofila y residuos que contenia las muestras.

Se procedió a mezclar la muestra con la ayuda de un Vortex para obtener un homogenizado, lo llevamos a la centrífuga a 16 000 x g a una temperatura de 4°C por 3 minutos.

Al obtener las muestras, se eliminó el sobrenadante, y se colocò Metanol al 80% hasta llenar el tubo (1ml), este buffer nos permitió eliminar los residuos de TCA 10% / acetona.

Se procedió a mezclar la muestra con el Metanol al 80% con la ayuda de un vortex, el objetivo, homogenizar la muestra para una mejor centrifugación, la cual se realizó a 16 000 x g a una temperatura de 4°C por 3 minutos.

Después del centrifugado se procedió a la eliminación del sobrenadante con cuidado para evitar que se pierda la muestra o pellet en donde se encuentran las proteínas.

Al obtener las muestras limpias, se adicionò Acetona 80% , se llenò el tubo (1 ml), y se mezcla con la ayuda de un vortex, se centrifugò la muestra a 16 000 x g a una temperatura de 4°C por 3 minutos.

Al cabo de los 3 minutos se eliminò el sobrenadante y se obtuvò el pellet, todavía con contaminantes, este fue lavado, para precipitar las proteínas requeridas.

Se procediò al secado, con la ayuda de un papel filtro se absorviò la acetona, para mayor seguridad del proceso se incubó la muestra a baño maría por 10 minutos a 50°C.

Después que el pellet estuvo seco, se procede a añadir 0,4 / 1gr de muestra de Fenol con un pH de 8.0 para precipitar las proteínas existente.

Centrifugamos a 16 000 x g a una temperatura de 4°C por 3 minutos, al término de este proceso se transfiere 0,2 o 0,4 de la fase superior del fenol a otro tubo.

Se adicionó al tubo 1ml de Metanol que contenia acetato de amonio 1M y se procediò a almacenar a 20°C por toda la noche, el tiempo puede ser prolongado para obtener más cantidad de proteínas.

Despues del tiempo de incubaciòn se procedio a centrifugar, a 16000 x g a una temperatura de 4°C por 5 minutos.

Al término de la centrifugación, se decanta el sobre nadante y se obtiene el pellet visible.

NOTA: Si el pellet se encontrara de color oscuro se procede a la colocación de 100 ul de fenol, se homogeniza y se centrifuga, esto nos permite lavar el pellet para obtener mejores muestras.

Al pellet se le colocò Metanol al 100 % para lavar, se vortea, y se centrifuga a 16 000 x g a una temperatura de 4°C por 3 minutos.

Se procedió a realizar el último lavado con acetona al 80 %, se homogenizo, y centrifugo a 16 000 x g a una temperatura de 4°C por 3 minutos, y se dejo secar.

Posterior al secado se procedió a la resuspención de la muestra, con agua destilada, para ser colocado en el gel para la electroforesis.

Debido a la mala resolución que se tuvo en los geles migrados (figura 1) se procedió a investigar un nuevo portocolo para la extracción, procesamiento y analisis de las muestras de cacao (*Theobroma cacao*)

3.3.2.2 Segundo protocolo para la extracción de proteínas

Este protocolo nos permitió manipular, extraer, procesar, y obtener mejor resolución en cuanto a la migración de bandas en los geles de Abis/poliacrilamida, ya que el protocolo es exclusivo para la extracción de “proteínas de hoja de cacao y meristemas, órganos infectados con *Monilophthora roreri*” el cual fue específico para la investigación (Pirovani et al., 2008).

Se procedió a la trituración de hojas de cacao, con Nitrógeno líquido, y se procedió a la colocación de 150 mg del pulverizado en tubos eppendorf.

Se colocó la primera solución, Acetona fría al 100%, en una cantidad de 1500 ul, esta nos permitió eliminar pigmentos del pulverizado.

Se centrifugó las muestras a una velocidad de 10 000 g por 3 minutos a 4°C.

El pellet obtenido se lavó una vez mas con el mismo volumen de acetona fría, 1 500 ul, y se centrifugó a 10 000 g por 3 mnts a 4 °C.

Seguidamente se seco el pellet a temperatura ambiente por 20 minutos, y se procedió al lavado, con TCA 10 % / acetona (1000 ul) este proceso se repetio durante 4 veces.

Una vez mas centrifugamos a 10 000 g por 3 minutos a una temperature de 4 °C, y realizamos el ultimo lavado con acetona fria (500 ul), pasado este proceso dejamos secar el pellet para su posterior resuspención con 800 ul de buffer de SDS, esta mezcla dejamos incubar por 10 minutos con agitación constante.

Pasado este proceso, se coloco el fenol en una cantidad de 600 ul, y se incubo por 30 minutos en agitación constante, terminado este periodo centrifugamos a 5000 g por 10 minutos a 4 °C.

Para obtener el pellet se procede a tranferir el sobrenadante a un tubo falcon de 14 ml, en el cual se coloco 5 volumenes de AcNH₄ 0,1 molar en metanol al 100 %, este homogenizado se refrigera por 14 h a -20 °C.

Pasadas las 14 h de incubación se procedió a la centrifugación de los tubos eppendor a 20000 por 5 minutos para obtener el sedimento en el que se encuentran las proteínas.

Obtenido el pellet se procedió al lavado, 3 veces con Metanol 80% / acetato de amonio, dos veces con acetone fría al 80% y una vez con etanol al 70%

El pellet de color blanquesino se deja secar a temperatura ambiente por 20 minutos para su posterior resuspensión (buffer de corrida o buffer de migración), migración, electroforesis, y análisis.

El protocolo utilizado y descrito anteriormente no es una opción dentro del laboratorio, la migración que se observó y se observa en la figura 2, no nos permitió una visualización completa de las bandas, por esta razón nos vemos en la obligación de proceder a modificar el protocolo utilizado para obtener resultados satisfactorios.

3.3.2.3 Tercer protocolo utilizado en la investigación

Se procedió a la manipulación de las muestras, el cual consistió en colocar las muestras (hojas) inmediatamente recolectadas en Nitrógeno líquido, esto permitió que las hojas de cacao no se necrosen hasta llegar al laboratorio.

Las muestras congeladas con Nitrógeno líquido se las pulveriza en un mortero, con adición de la solución amortiguadora.

El pulverizado se colocó en tubos eppendorf de 1.5 ml el cual nos permite congelar inmediatamente después de la colocación de los 150 mg de la muestra.

El procesamiento de las muestras se dio con la extracción de proteínas, las cuales fueron colocadas en Acetona fría al 100% en una cantidad de 1500 µl, y procedimos a vortex el homogenizado, esto nos permitió lavar pigmentos que se encontraron en el pulverizado.

Estas muestras se centrifugaron a 10 000 g por 3 minutos a 4 °C, para una mayor limpieza de las muestras se realizó dos lavos con acetona, y se centrifugó a la misma velocidad.

Se secó el pellet obtenido, por un lapso de 20 minutos a temperatura ambiente, para posteriormente lavar el sedimento con 500 µl TCA 10% / acetone por 4 veces, de esta manera obtuvimos un pellet completamente lavado.

Se procedió a centrifugar a 10 000 g por 3 minutos a 4 °C, y se procedió a lavar una vez más con acetona fría al 100%, centrifugamos a la misma velocidad, y dejamos secar el pellet a temperatura ambiente por 20 minutos para seguir con el protocolo.

El pellet se resuspendió en 800 µl de buffer de SDS, el cual fue incubado por 10 minutos en agitación constante.

Al término de la incubación se procedió a la colocación del fenol (que se encuentra lavado con buffer de TE) 600 µl, y se lo dejó incubar por 30 minutos con agitación constante a temperatura ambiente.

Finalizado los 30 minutos se ejecuto la centrifugación a 5 000 g por 10 minutos, esto nos ayudo a obtener más proteínas en el sobrenadante.

Las proteínas desde la fase del fenol fueron extraídas a un nuevo tubo, falcon de 14 ml, (para evitar derrames y contaminación en el laboratorio con fenol).

Estos tubos fueron incubados por 14 horas a -20 °C con 5 volúmenes de AcNH₄ 0.1 molar en metanol 100%.

Pasadas las 14 horas se procedió a centrifugar a 20 000 g por 5 minutos a 4 °C, el pellet obtenido se lavo por 3 veces con metanol al 80% y centrifugamos a 20 000 g por 5 minutos.

Después de la eliminación del metanol, se procedió a lavar el pellet con etanol al 70% y acetona 100%, centrifugamos a 20 000 g por 5 minutos.

Pasado este proceso se dejo secar el sedimento a temperatura ambiente para su posterior resuspensión en buffer de electroforesis 50 ul.

3.3.2.4 Cuarto protocolo utilizado en la investigación

El protocolo que se utilizó, es el tercer protocolo modificado la velocidad de centrifugación el cual nos permitió obtener para proteínas en el sedimento y una mayor concentración, por ende una migración de excelente calidad.

Los procesamientos de las muestras fueron en todo momento con Nitrógeno Líquido, desde su recolección hasta la colocación del primer buffer.

Se procedió a la colocación de 150 mg a 200 mg de muestra de hoja de cacao pulverizada, estas muestras se encontraron en un tubo eppendor de 1.5 ml, los cuales se mantian a -80 °C.

Se colocó 1500 ul de acetona fría 100%, se vorteo para obtener un homogenizado, la acetona nos permitio lavar pigmentos que se encontraron en el pulverizado.

Estas muestras se centrifugaron a 16 000 g por 3 minutos a 4 °C, para una mayor limpieza, se realizó otro lavado con acetona fría 100%, y se centrifugo a la misma velocidad.

Al obtener el pellet se procedio a secar por 20 minutos a temperatura ambiente, para posteriormente lavar el sedimento, por 4 veces con 500 ul TCA 10% / acetona, se realizó vortex para homogenizar bien las muestras, y se centrifugo a 16 000 g por 3 minutos a 4 °C, por último se lavo el pellet con acetona al 100% y dejamos secar a temperatura ambiente.

El pellet se resuspendió en 800 ul de buffer de SDS, y los tubos fueron incubados por 10 minutos en agitación constante.

Al termino de la incubacion se procedio a la colocación del fenol (que se encontro lavado con buffer de TE) 600 ul, y se lo dejo incubar por 30 minutos con agitación constante a temperatura ambiente.

Finalizado los 30 minutos se ejecuto la centrifugación a 20 000 g por 10 minutos a una temperatura de 4 °C, esto nos ayudó a obtener más proteínas en el sobrenadante.

Las proteínas desde la fase del fenol fueron extraídas a un nuevo tubo (falcon de 14 ml).

Al obtener el sobrenadante en el nuevo tubo se procedió a la colocación del buffer de SDS en un porcentaje de 1 volumen.

Estos tubos fueron incubados por 14 horas a -20 °C con 5 volúmenes de AcNH_4 0.1 molar en metanol.

Pasadas las 14 horas se procedió a centrifugar a 20000 g por 5 minutos a 4 °C, el pellet obtenido se lavo con metanol al 100%, y centrifugamos a 16 000 g por 3 minutos a 4 °C.

Después de la eliminación del metanol, se procedio a lavar el pellet con acetona al 100 %, y centrifugamos a 16 000 g por 3 minutos.

Pasado este proceso se dejo secar el sedimento a temperatura ambiente para su posterior resuspención en buffer de corrida 50 ul.

De los 50ul resuspendidos, se extrajo 10 ul en un nuevo tubo eppendorf y se coloco 3,3 ul de buffer de muestras, esto fue migrado en el equipo de electroforesis marca BIO-RAD, modelo Power Pac Basic, serie 04BR63689 el gel se observa en la figura 11.

3.3.3 Cuantificación de las proteínas con la técnica de Bradford

La estimación de la cantidad de proteínas en las muestras se realizó utilizando el kit de Bradford, este proceso se da mediante el cambio de absorción que ocurre cuando el colorante azul de Coomassie se une a la proteína, desplazando el máximo de absorción del colorante de 465 nm a 595 nm.

Para el procedimiento se utilizó un duplicado de las muestras que fueron colocadas en sus respectivos pocillos, con una dosis de 250 μ l de la muestra y 20 μ l del reactivo, como blanco se colocó agua destilada, y se estimó la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro.

Los resultados obtenidos fueron comparados con una curva estándar de albúmina bovina (BSA).

Esta curva de calibración se construyó con cantidades conocidas de BSA en un rango de nueve tubos con una concentración de 0,01 a 0,09 las cuales nos permitieron identificar el rango en el que se encontraron nuestras muestras, para proceder a la dosificación en la electroforesis.

La estimación de las proteínas presentes en nuestras muestras se realizó mediante la ecuación de la recta ($y = mx + b$) las cuales fueron procesadas y se obtuvo X para obtener la cantidad en microgramos (μ g) de las proteínas existentes.

3.3.4 Preparación del gel de acrilamida

Para la realización del gel se necesitan los siguientes equipos y

reactivos.

- Soporte de geles.
- Soporte de cristales.
- Cristales (Separador y superior).
- Peineta.
- Helmer Meyer.
- Pipetas.
- Agua destilada, y soluciones para realizar los geles al 12 % y 4 % .

3.3.4.1 Procedimiento

Tener en cuenta que para la realización del gel en todo momento se debió utilizar guantes para evitar contaminación con acrilamida.

Se procedió a la unión de los dos vidrios (separador y superior), observando la dirección de los cristales, los cuales dejan una abertura de 0.75 mm, estos son colocados en el soporte el cual se engancha con una vincha.

Se procedió a la verificación de filtraciones, este paso se realizó con agua destilada, si no se observa ninguna fuga, se procede a la preparación de la solución al 10 % (**Tabla 4**).

La solución contiene SDS el cual ayuda a mantener la masa constante de las proteínas, el persulfato de amonio es quien inicia la polimerización generando radicales libres, TEMED completa la polimerización del gel, cabe indicar que el gel debe ocupar la $\frac{3}{4}$ parte de su altura.

Las soluciones se las colocó entre los dos vidrios en la abertura de 0,75 mm, podemos hacer uso de la pipeta de 1000 μ l, terminado este proceso se llenó con agua, esto nos permite evitar el contacto con

agentes externo como el aire y evitar la oxidación en el proceso.

Al cabo de 15 minutos se procedió a la eliminación del agua, y se mezcló la solución del gel upper de acrilamida 4% (**Tabla 3**), con esta concentración proporcionamos poros con mayor capacidad de migración.

Se llenó hasta que se eliminen los espacios con aire (burbujas) que se depositan entre los vidrios, se colocó la peineta de plástico el cual va a dar forma a los pocillos, donde se colocará las muestras.

Al paso de 15 minutos se encuentro formado el gel discontinuo y por ende está polimerizado. Se colocó en el equipo de electroforesis que contenia el buffer de corrida (**Tabla 4**) para la culminación de la preparación de las muestras se resuspendio en buffer de corrida (15 ul) y se colocó buffer de muestras (5 ul), se llevo a ebullición por 5 minutos.

3.3.5 Electroforesis (BIO -RAD POWER BASIC 300 V, 400 MA, 78W)

Para la realización de la electroforesis necesitamos los siguientes equipos y reactivos.

- Soporte principal.
- Bandeja donde colocar el tampón de electroforesis.
- Fuente de poder.
- Cristal.
- Tampón de carga
- Marcador molecular.

3.3.5.1 Procedimiento

Retiramos los vidrios del soporte y lo llevamos al equipo de electroforesis, cabe indicar que el soporte principal contenia los electrodos que nos permitio suministrar corriente eléctrica para la

migración.

a) **Tampón de electroforesis**

Una vez en la cubeta se retiró el peine de plástico y se procedió a colocar las muestras que fueron preparadas con anterioridad.

Al momento de la colocación se añade el **Tampón de Carga** que contiene glicerol, este aumento la densidad de la muestra para que esta se deposite en el pocillo, también contenía Azul de Bromofenol, que es un colorante que nos ayudará a identificar la posición exacta de donde fueron colocadas las muestras y su carril al momento de la migración.

No olvidar la colocación del marcador de peso molecular el cual estuvo conformado por LC5677, NuPAGE 4-12% Bis-Tris Gel w/ MES stained with Commassie R-250, el cual nos permite identificar las proteínas en un rango de 200 kDa hasta los 10 kDa.

Colocamos el tampón de electroforesis que contenía (SDS, Glicerina, Tris base), de tal forma que cubra el gel para evitar que la migración sea muy lenta y forzar al equipo.

Procedimos a conectar el equipo a una fuente eléctrica, seleccionamos y verificamos el **voltaje** adecuado e iniciamos la electroforesis.

La electroforesis tiene por objeto migrar las proteínas que se encontraron cargadas negativamente por el SDS así la parte inferior del gel, esto permitió que se separe las proteínas por tamaño (peso molecular).

Al término de la electroforesis se apago el equipo, se eliminó el **Tampón de Electroforesis** y se procedió a la tinción y decoloración del gel de acrilamida.

3.3.6 Tinción del abis/poliacrilamida

Se separó los cristales dejando libre el gel, evitando que se rompa, se sumerge en **Azul de Comasse** que tuvo la capacidad para teñir las proteínas de forma específica, se dejó incubar por 15 minutos en agitación lenta. Pasado este tiempo se retiró el colorante, evitando dañar el gel, y se procedió a la decoloración con **Ácido acético al 10 %**.

3.3.7 Proceso de decoloración del gel de abis/poliacrilamida

Con la ayuda del Ácido acético al 10 % se dejó incubar por 24 horas con agitación lenta, esto nos permitió observar con claridad las bandas formadas por la migración en la electroforesis.

La migración de las proteínas en el interior del gel, fue inversamente proporcional al tamaño, esto quiere decir que las proteínas más pequeñas son las que más migraron, esto se comparó con la ayuda del **Marcador Molecular** (m.m.).

TABLA 3: Gelupper. Soluciones para geles de acrilamida.

STACKING (4%)	2 ml
Agua	1.558
40 % A/bis	0.200
1.25M Tris, pH 8.8	0.200
10% AP	0.020
TEMED	0.0050

Fuente: Laboratorio CIBE - ESPOL

TABLA 4: Gellower. Soluciones para geles de acrilamida.

STACKING (10%)	2 ml
Agua	2.658
40 % A/bis	1000
1.25M Tris, pH 6.8	1000
10% SDS	0.050
TEMED	0.0050

Fuente: Laboratorio CIBE - ESPO L

3.3.8 Preparación del gel de dos dimensiones 2 SDS PAGE

Para la realización del gel de dos dimensiones 2 SDS se necesitaron los siguientes equipos y reactivos.

- Tiras de acrilamida de 10 cm con un pH de 3-7 GNL.
- Buffer de hidratación Bio-Rad
- Buffer de equilibrio Tipo I y II.
- Aceite mineral.
- Nanopure Wader.
- Bandeja para colocar las tiras para su hidratación.
- Bandeja para colocar las tiras en el proceso de equilibrio.
- Fuente de poder para la electroforesis.
- Tampón de carga
- Marcador molecular.

3.3.8.1 Procedimiento

Tener en cuenta que para la realización de esta técnica se debe mantener en todo momento guantes para evitar contaminación con acrilamida. Cabe destacar que las tiras de acrilamida absorben en su totalidad 125 μ l en el proceso de hidratación.

Se procedió a la descongelación de las tiras de acrilamida, durante 10 minutos.

- En una bandeja se colocó el buffer de hidratación en una cantidad de 105 μ l, y 20 μ l de muestra y se procedió a agitar de manera uniforme y continua.
- Se eliminó el plástico de las tiras y se colocó en la bandeja en donde se encuentre el buffer de hidratación y la muestra.
- Se procedió a la colocación del aceite mineral en una cantidad de 1.5 ml, por 16 -18 horas para que la tira absorba la muestra.
- Terminado este proceso se procedió a la colocación en el equipo de IEF en el cual se colocó el papel filtro, con una cantidad de 10 μ l de agua ultra pura, para generar una cadena de electricidad, por último se colocó el aceite mineral en una cantidad de 1.5 ml, se seleccionó el tipo de tira que se encuentre en análisis, el pH, el tipo de gradiente, se etiquetó las muestras y se procedió al análisis.

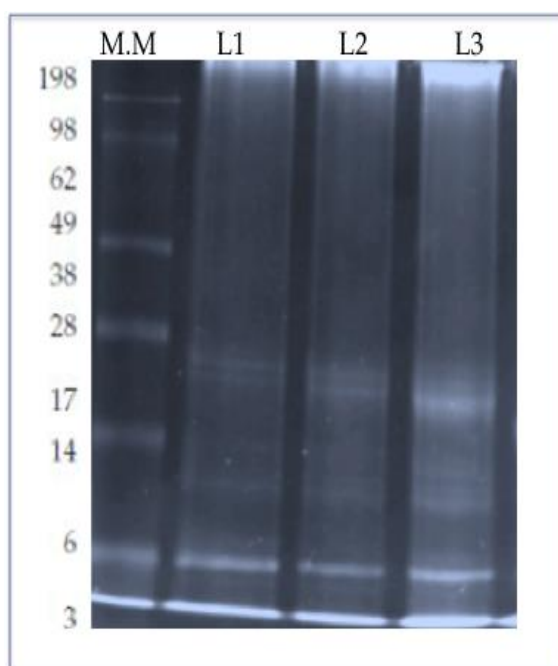
- Pasado el análisis (6 horas aproximadamente), es requerido la equilibración de las tiras con dos tipos de Buffer, el **Buffer 1** (ReadyPrep 2D Starte kit Equilibration buffer I), y el **Buffer 2** (ReadyPrep 2D Starte kit Equilibration buffer II).
- Se coloca el Buffer 1 con una dosis de 400 ul sobre la tira de acrilamida, pasado 15 minutos se procedio con el lavado, y se colocó el siguiente Buffer 2, con una dosis de 400 ul, todo el proceso se debe mantener en agitación de las tiras.
- Para la migración de los spot se utilizó un gel a una concentración al 10% , en este gel se colocó la tira de acrilamida, y se procede a colocar un papel filtro que se encuentre con 5 ul del marcador molecular.
- Para el sellado de la tira en el gel se colocó Agarosa Overlay y se procedió a la electroforesis con tampón de corrida (Anexo 1) a una voltaje de 100 vx durante 2 horas aproximadamente.
- Finalmente los geles se tiñeron con una solución **azul de commassi** y se procedió a la visualización de los spoint, para este trabajo se utilizó el programa ESTELLA el cual nos permitió escanial el gel y observar claramente las proteínas de cuerdo a su peso molecular.

/

RESULTADOS

- Para las evaluaciones, se recurrió a la observación de cada uno de los geles, migrados, unidimensionales SDS-PAGE y de dos dimensiones 2 SDS-PAGE, los cuales nos permitieron determinar, la calidad de extracción de proteínas y la eficacia del protocolo.

FIGURA 1: Electroforesis 1 SDS-PAGE de proteínas totales de la hoja de cacao (*Theobroma cacao* L). M.M: marcador de peso molecular. Carril 1 muestra sana 1, Carril 2 muestra sana 4, Carril 3 muestra sana 5. Pocillo (25 ul de pellet + 8,33 ul buffer de muestra).



Fuente: Autora.

TABLA 5: Ordenamientos de los datos que se utilizaron para la migración de proteínas de la figura 1.

Muestra Sanas	Resuspensión	Buffer de M .
1	25ul H ₂ O destilada	8,33 ul
4	25ul H ₂ O destilada	8 ,33 ul
5	25ul H ₂ O destilada	8,33 ul

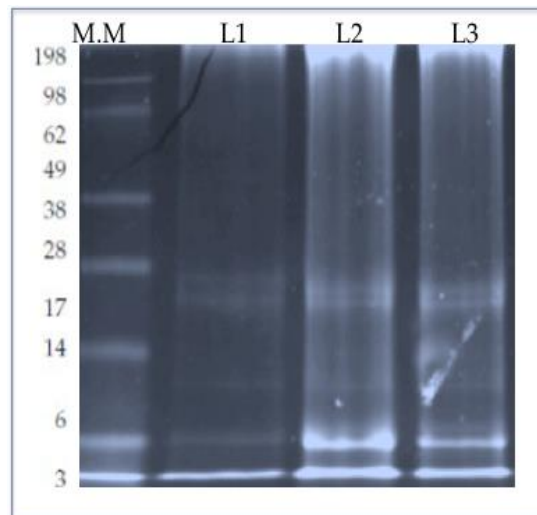
Anàlisis:

En la **Figura 1**. Se observó una mala resolución del gel debido a la degradación de las proteínas.

El número de bandas observadas en el Carril 1 es de 5 se encontraron entre un peso molecular de 28 kDa a 6 kDa, en el Carril 2 es de 5 bandas entre un peso molecular de 28 kDa a 6 kDa, y en el Carril 3 es de 4 bandas entre un peso molecular de 28 kDa a 6 kDa, la visualización de las bandas fue limitada, posiblemente a interferencias como la celulosa, la clorofila, y pigmentos de las hojas.

Las observaciones en el gel nos permitieron determinar una pauta sobre el manejo de la recolección de las muestras a nivel de campo para evitar las posibles degradaciones, en cuanto a la resolución del gel se procedió a aumentar las lavadas con Acetona al 80% y TCA 10% para eliminar las interferencias.

FIGURA 2: Electroforesis 1 SDS-PAGE de proteínas totales de la hoja de cacao (*Theobroma cacao* L.). M.M marcador de peso molecular. Carril 1 muestra sana 1, Carril 2 muestra sana 4, Carril 3 muestra sana 5. Pocillo (15 ul de pellet + 5 ul buffer de muestra).



Fuente: Autora

TABLA 6: Ordenamientos de los datos que se utilizaron para la migración de proteínas de la figura 2.

Muestra sana	Resuspensión	Buffer de M.
1	15ul H ₂ O destilada	5 ul
4	15ul H ₂ O destilada	5 ul
5	15ul H ₂ O destilada	5 ul

Análisis.

En la **Figura 2**. Se observó una degradación de las proteínas del gel debido a las mismas causas susitadas en el gel de la figura 1.

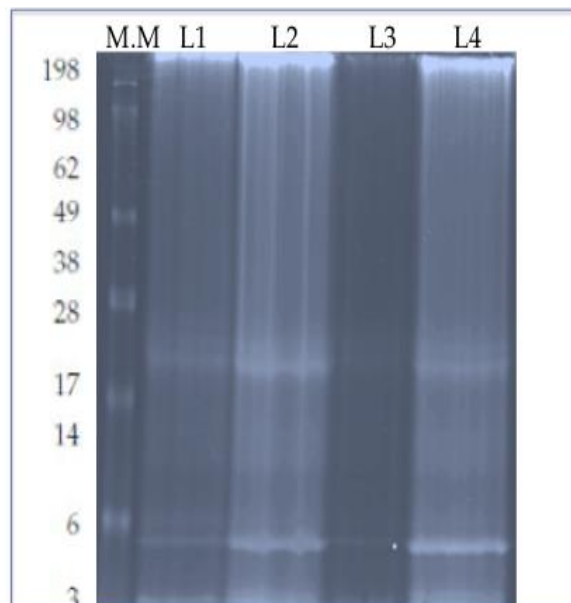
El número de bandas observadas en el Carril 1 es de 4 se encontraron entre un peso molecular de 28 kDa a 6 kDa, en el

Carril 2 es de 4 bandas entre un peso molecular de 28 kDa a 6 kDa, y en el Carril 3 es de 5 bandas entre un peso molecular de 28 kDa a 6 kDa.

La visualización de las bandas fue limitada, posiblemente a interferones, cabe indicar que se procedió a realizar 2 lavadas con Acetona fría al 80%, dos lavados con TCA 10% / acetona, y dos lavados con Metanol al 80%, no se observaron cambios significativos aplicando sucesivamente los lavados.

Lo que nos permitió analizar que las muestras no se encontraban en un estado óptimo para la extracción de proteínas (cadena de frío).

FIGURA 3: Electroforesis 1 SDS-PAGE de proteínas totales de la hoja de cacao (*Theobroma cacao* L). M.M marcador de peso molecular. Carril 1 muestra sana 1, Carril 2 muestra sana 4, Carril 3 muestra sana 4, Carril 5 muestra sana 5. Pocillo (15 μ l de pellet + 5 μ l buffer de muestra).



Fuente: Autora

TABLA 7: Ordenamientos de los datos que se utilizaron para la migración de proteínas de la figura 3.

Muestra Sana	Resuspensión	Buffer de muestra
1	15 uI H ₂ O destilada	5 uI
4	15 uI H ₂ O destilada	5 uI
4	15 uI H ₂ O destilada	5 uI
5	15 uI H ₂ O destilada	5 uI

Análisis:

En la **Figura 3**. Se observó una degradación de las proteínas del gel debido a las mismas causas susitadas en el gel de la figura 2.

El número de bandas observadas en el Carril 1 es de 6 se encontraron entre un peso molecular de 28 kDa a 3 kDa, en el Carril 2 es de 4 bandas entre un peso molecular de 28 kDa a 6 kDa, y en el Carril 3 es de 2 bandas entre un peso molecular de 28 kDa a 6 kDa, en el Carril 4 es de 5 bandas entre un peso molecular de 28 kDa a 6 kDa

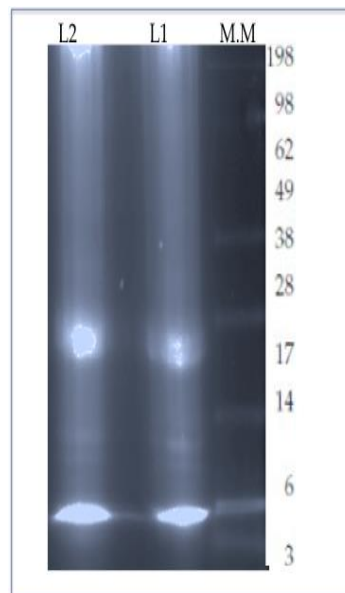
La visualización de las bandas fue limitada, pero en un número mayor con respecto a la figura 2, esto se debio a la incubación por 14 horas en Metanol al 80%.

Las sucesivas lavadas del pellet para la extracción de las proteínas siguen siendo deficiente, ya que se observo interferencias.

Cabe indicar que las muestras fueron manipuladas con nitrógeno líquido desde la pulverización que se la realizó a 300 revoluciones por 30 segundos.

Lo que nos permitio analizar la utilización de proteasas para la eliminación de inteferones que posibelmente sean la causan de la mala resolución en el gel.

FIGURA 4: Electroforesis 1 SDS-PAGE de proteínas totales de la hoja de cacao (*Theobroma cacao L*). M.M marcador de peso molecular. Carril 1 muestra sana 1 sin inhibidor de proteasa, Carril 2 muestra sana 1 con inhibidor de proteasa. Pocillo (10 ul de pellet + 3,3 ul buffer de muestra).



Fuente: Autora

TABLA 8: Ordenamientos de los datos que se utilizaron para la migración de proteínas de la figura 4.

Muestra Sana	Resuspensión	Buffer de muestra
1	10 ul H ₂ O destilada	3,3 ul
1	10 ul H ₂ O destilada	3,3 ul

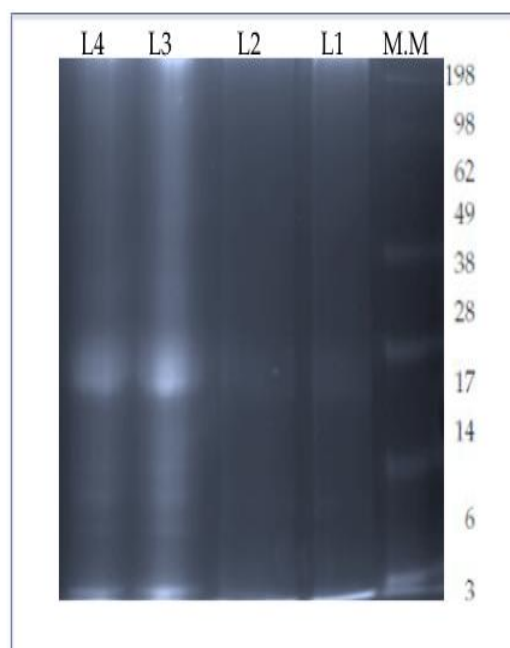
Anàlisis:

En la **Figura 4**. Se observó una degradación de las proteínas del gel debido a las mismas causas susitadas en el gel de la figura 3.

El número de bandas observadas en el Carril 1 es de 3 se encontraron entre un peso molecular de 14 kDa a 3 kDa, en el Carril 2 es de 3 bandas entre un peso molecular de 14 kDa a 3 kDa.

La visualización de las bandas fue limitada, y no se encuentra una diferencia significativa en la utilización de proteasas dentro del protocolo, por esta razón y por no eliminar la interferencia se procede a la utilización del protocolo número 2.

FIGURA 5: Electroforesis 1 SDS-PAGE de proteínas totales de la hoja de cacao (*Theobroma cacao* L). M.M marcador de peso molecular. Carril 1 y 2 protocolo NUEVO, Carril 3 y 4 protocolo ANTIGUO. Muestra sana 1. Pocillo (10 ul de pellet + 3,3 ul buffer de muestra).



Fuente: Autora

TABLA 9: Ordenamientos de los datos que se utilizaron para la migración de proteínas de la figura 5.

Muestra Sana	Resuspensión	Buffer de muestra.
1	10 ul H ₂ O destilada	3,3 ul
1	10 ul H ₂ O destilada	3,3 ul
1	10 ul H ₂ O destilada	3,3 ul
1	10 ul H ₂ O destilada	3,3 ul

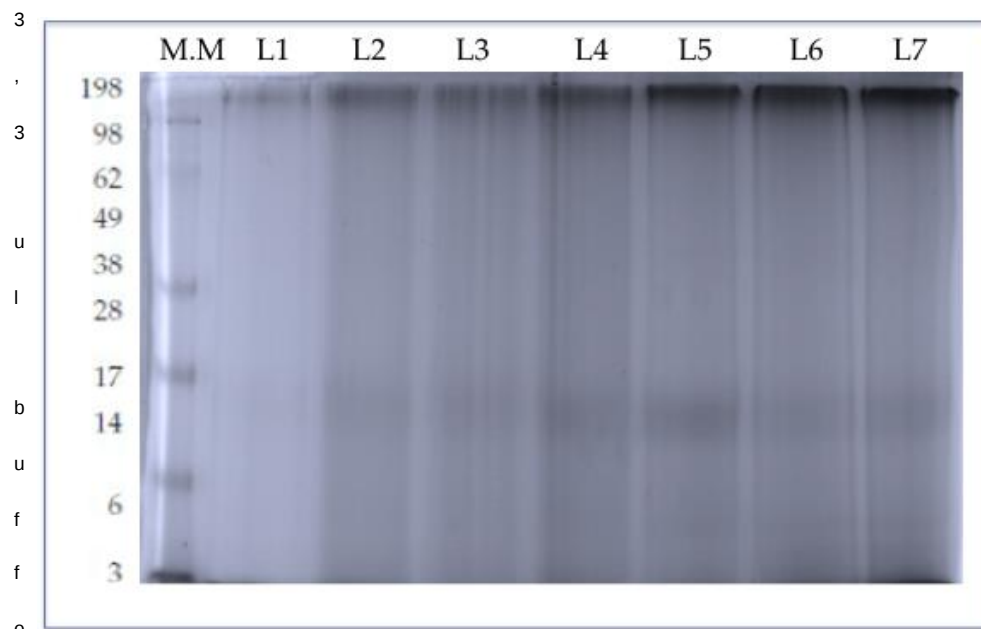
Análisis:

En la **Figura 5**. Se observó una degradación de las proteínas del carril L3 y L4 las mismas causas suscitadas en el gel anteriores, de esta manera confirmo los resultados del protocolo utilizado en primera instancia, en el caso del carril L1 y L2 no se observa una degradación pero si una mala intensidad de bandas.

El número de bandas observadas en el Carril 1 y 2 es de 2 y se encontraron entre un peso molecular de 28 kDa a 6 kDa, en el Carril 3 y 4 es de 4 bandas entre un peso molecular de 28 kDa a 6 kDa.

La **figura 5**, nos permitió resolver la unión del protocolo 1 y del protocolo 2, para obtener como resultado, la eliminación de la degradación de proteínas y la intensidad de bandas sean la correcta.

FIGURA 6: Electroforesis 1 SDS-PAGE de proteínas totales de la hoja de cacao (*Theobroma cacao* L). M.M marcador de peso molecular., PROTOCOLO MODIFICADO. Pocillo (10 ul de pellet +



r de muestra).

Fuente: Autora

TABLA 10: Ordenamientos de los datos que se utilizaron para la migración de proteínas de la figura 6.

Muestra Sana	Resuspensión	Buffer de muestra
5	10 uI H ₂ O destilada	3,3 uI
6	10 uI H ₂ O destilada	3,3 uI
7	10 uI H ₂ O destilada	3,3 uI
8	10 uI H ₂ O destilada	3,3 uI
9	10 uI H ₂ O destilada	3,3 uI
1x	10 uI H ₂ O destilada	3,3 uI
2x	10 uI H ₂ O destilada	3,3 uI

Análisis:

En la **Figura 6**. Se observó una degradación de las proteínas en todos lo carriles migrados.

El número de bandas observadas en el Carril 1 es deficiente, Carril 2, 3, 4, 5, 6, 7 se observò 2 banda entre un peso molecular de 17 kDa a 6 kDa.

La diferencia significativa que se encuentra en este gel unidimensional, es que las muestras de L1, L2, L3, L4, se trabajaron con la primera y tercera fase del primer protocolo, y la segunda etapa se trabajo con el segundo protocolo (Descritos en la metodología), cabe indicar que no se realizo una agitación.

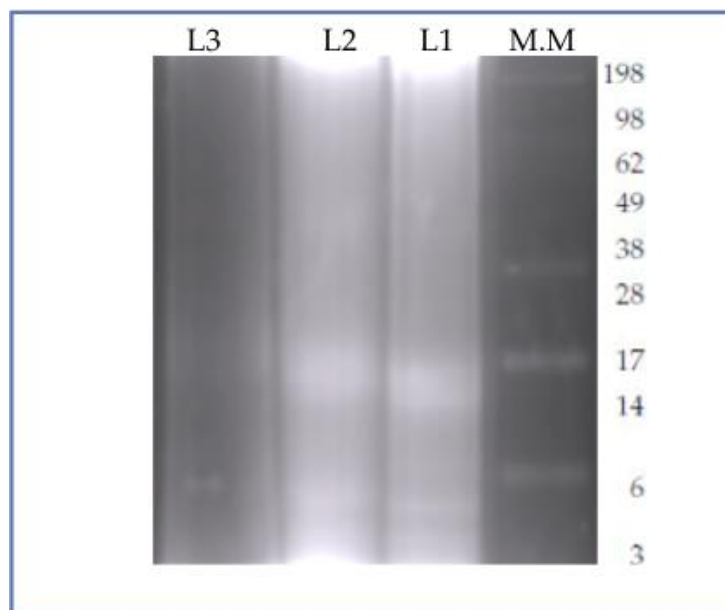
En cuanto al carril L5 se trabajó con la primera y tercera fase del primer protocolo, y la segunda etapa se trabajó con el segundo protocolo más AcNH₄ más Metanol al 100% (Descritos en la metodología).

En el carril L6 y L7 se trabajó en la primera y segunda fase el protocolo 2, y en la tercera etapa se trabajo con el protocolo 1, mas agitación y con una temperatura ambiente.

La incubación con AcNH₄ se realizó por 14 horas.

Como resultados tenemos que el carril L5 mostró una mejor calidad en cuanto a migración, eliminación de pigmentos, y se visualizó menos degradación, se procede a la utilización del protocolo modificado protocolo 3 (descrito en la metodología).

FIGURA 7: Electroforesis 1 SDS-PAGE de proteínas totales de la hoja de cacao (*Theobroma cacao L.*). M.M marcador de peso molecular. Resuspección en Buffer de corrida, Buffer de muestra, Buffer de hidratación. Pocillo (10 ul de pellet + 3,3 ul buffer de muestra).



Fuente: Autora

TABLA 11: Ordenamientos de los datos que se utilizaron para la migración de proteínas de la figura 7.

Muestra Sana	Resuspensión	Buffer de muestra.
1	15 ul Buffer de corrida	3,3 ul
1	15 ul Buffer de muestra	3,3 ul
1	15 ul B. Rehidratación	3,3 ul

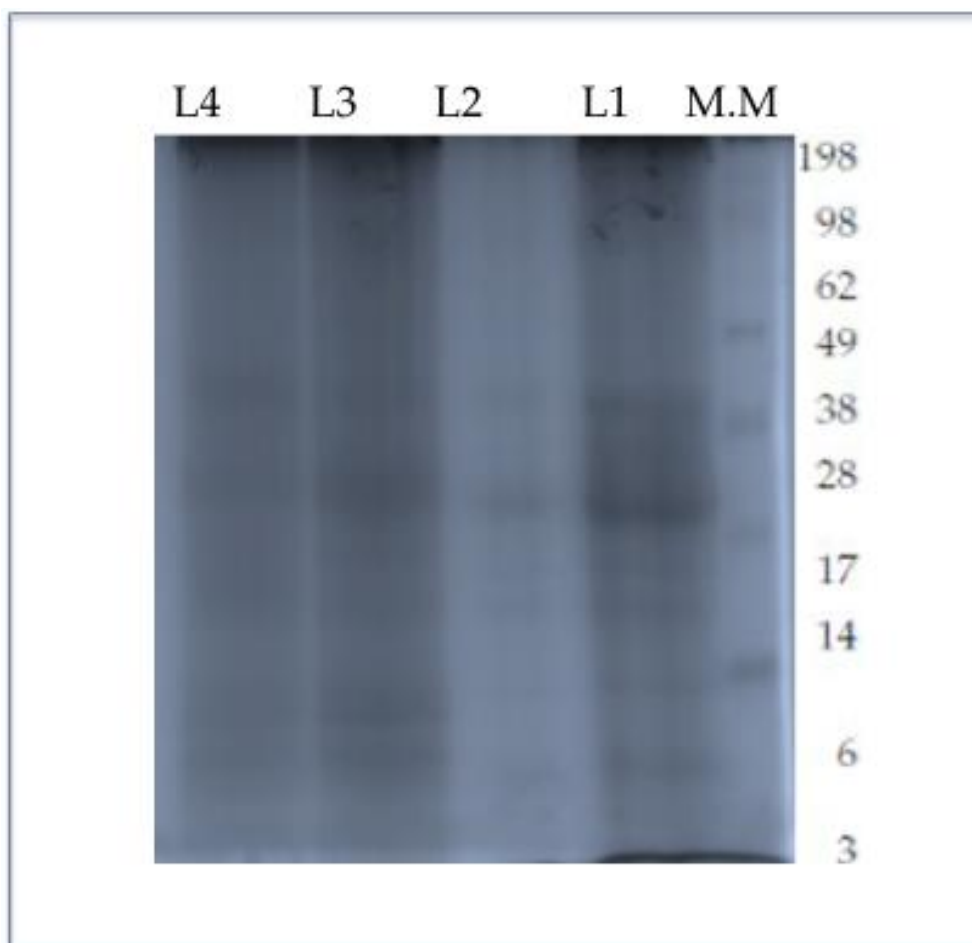
Análisis:

En la **Figura 7** se puede observar la migración de muestras de hojas sanas las cuales se resuspendio en diferentes Buffer para observar la disolución del pellet y corroborar el mejor.

El número de bandas observadas en el Carril 1 es de 2 bandas entre 17 kDa a 3 kDa, Carril 2 es de 2 bandas entre 17 kDa a 3 kDa, Carril 3 es de 1 bandas y se encuentra en los 17 kDa.

La diferencia entre los tres carriles L1, L2, L3, es significativamente alto, la resolución y disolución del pellet que se observa en el carril L1 es mejor, por lo tanto se decidió trabajar con este buffer.

FIGURA 8: Electroforesis 1 SDS-PAGE de proteínas totales de la hoja de cacao (*Theobroma cacao* L). M.M marcador de peso molecular. Resuspensión en Buffer de Corrida. Tiempos de centrifugación. Pocillo (10 y de 15 ul de pellet + 3,3 ul buffer de muestra).



Fuente: Autora

TABLA 12: Ordenamientos de los datos que se utilizaron para la migración de proteínas de la figura 8.

Muestra Sana	Resuspensión	Buffer de muestra.
1	15 ul Buffer de corrida	3,3 ul
1	15 ul Buffer de muestra	3,3 ul
1	15 ul B. Rehidratación	3,3 ul

Análisis:



En la **Figura 8** se puede observar la migración de muestras de hojas sanas con la diferencia en la madures fisiológica.

Los Carriles L1 y L2 se migraron muestras de hojas maduras de 32cm de largo por 13 cm de ancho.

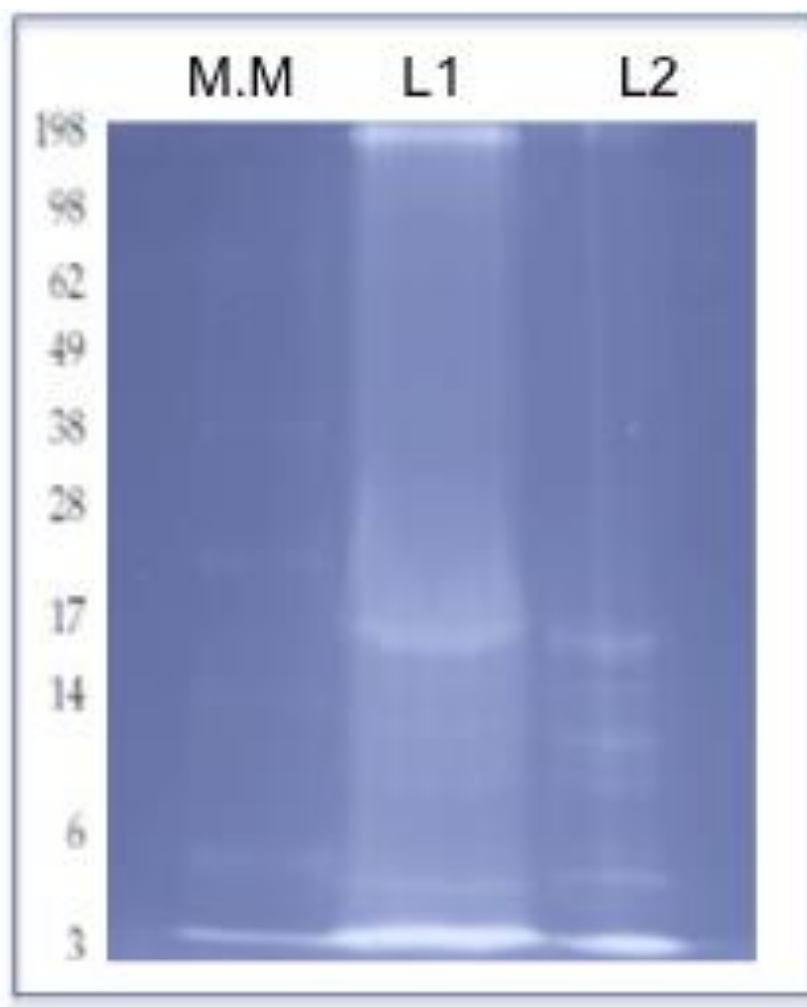
En el Carril L3 y L4 se migraron muestras de hojas tiernas de 15 cm de largo por 7 cm de ancho.

Estos resultados proporcionaron la eficiencia del protocolo con hojas maduran en donde las proteínas son mas abundantes y en una concentración mayor.

En cuanto al gel observado se definen más las bandas con hojas maduras que con hojas tiernas.

En este gel unidimensional también se probó las velocidades con la que se centrífugo la muestra en el momento de la precipitación de proteínas con el Buffer Fenol, se la realizó a 20 000 X g por 10 minutos lo que proporciona una mayor cantidad de pellet con respecto al protocolo 1.

FIGURA 9: Electroforesis 1 SDS-PAGE de proteínas totales de la hoja de cacao (*Theobroma cacao L.*) con presencia y ausencia de sintomatología. M.M marcador de peso molecular. Resuspensión en Buffer de Corrida. Pocillo (15 ul de pellet + 3,3 ul buffer de muestra).



Fuente: Autora

TABLA 13: Ordenamientos de los datos que se utilizaron para la migración de proteínas de la figura 9.

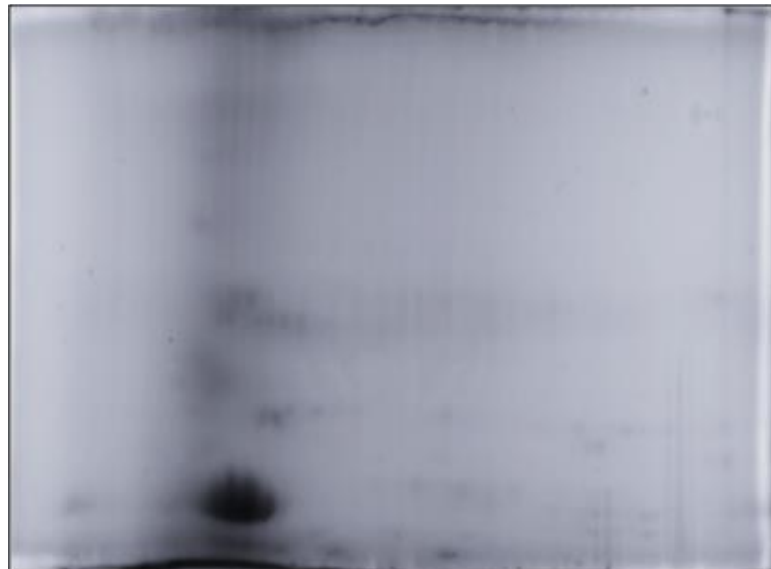
Muestra.	Resuspensión	Buffer de muestra.
1 Sana	15 ul B. Corrida	3,3 ul
1 <i>Monilophthora roreri</i>	15 ul B. Corrida	3,3 ul

Análisis:

En la **Figura 9** se puede observar la migración de muestras de hojas con ausencia y presencia de sintomatología.

Estos resultados proporcionaron la observación de la sobreexpresión de proteínas en el Carril L2 el cual corresponde a plantas de Cacao (*Theobroma cacao* L) con sintomatología en sus frutos se presencia de *Moniliophthora roreri*, al comparar los dos carriles en el cual se encuentra las muestrax migradas se observó otro perfil proteómico.

FIGURA 10: Electroforesis 2 SDS-PAGE de proteínas totales de la hoja de cacao sanas (*Theobroma cacao* L.). M.M marcador de peso molecular. Resuspensión en Buffer de rehidratación. Pocillo (30 ul de pellet).



Fuente: Autora

TABLA 14: Ordenamientos de los datos que se utilizaron para la migración de proteínas de la figura 10.

Muestra.	Resuspensión
1 Sana	30 ul Buffer de Hidra.

Análisis.

En la **Figura 10** se puede observar la migración de muestras de hojas con ausencia de sintomatología.

Estos resultados proporcionaron la observación de un perfil proteómico bajo en proteínas, debido a la concentración de la muestras

CONCLUSIONES.

- Después de lo observado en los resultados se concluye que el protocolo mas eficiente para la extracción de proteínas en el cacao (*Theobroma cacao L.*) es el protocolo modificado dentro de el laboratorio del CIBE.
- Las hojas con una madures fisiológica son mas eficientes en cuanto a concentración y cantidad de pellet requerido.
- Se determino e identifico una sobre expresión de proteínas en los geles unidimensionales en muestras con presencia de sintomatología.
- Las bandas expresadas en muestras de plantas sanas en su mayoría son entre los 17-3 kDa.
- En cuanto a las bandas expresadas en muestras infectadas con *Moniliophthora roreri* se encuentran ubicadas en 17 - 3 kDa, con una mayor cantidad de bandas migradas.
- En el gel de dos dimensiones 2 DSD PAGE se identificaron pocos spot, por el cual no se puede realizar un análisis profundo.

RECOMENDACIONES

- Se recomienda trabajar con hojas adultas desde 32 cm de largo, para obtener una mejor concentración de pellet de proteínas.
- Después de la ruptura de las hojas del peciolo se recomienda inmediatamente colocar en hielo seco o nitrógeno líquido para evitar su degradación en el momento del transporte.
- El transporte de las muestras deben ser inmediato, y su pulverizada también.
- En el momento de la pulverización de las muestras no perder la cadena de frío.
- Pesar las muestras pulverizadas, para la obtención el pellet necesario y optimizar el trabajo.
- Verificar los pH de cada Buffer para evitar problemas en la migración del gel.
- Utilizar tubos estériles para procesar muestra y evitar contaminación e interferencias.
- Mantener las muestras a menos 80 °C para evitar daños y degradación en el pellet.

BIBLIOGRAFÍA

00b7d529332fb8f009000000.pdf. (s. f.). Recuperado a partir de

[https://www.researchgate.net/profile/Valentina_Ruiz-](https://www.researchgate.net/profile/Valentina_Ruiz-Gutierrez2/publication/258841966_Los_compuestos_fenolicos_en_la_autodefensa_de_los_vegetales_1993/links/00b7d529332fb8f009000000.pdf)

[Gutierrez2/publication/258841966_Los_compuestos_fenolicos_en_](https://www.researchgate.net/profile/Valentina_Ruiz-Gutierrez2/publication/258841966_Los_compuestos_fenolicos_en_la_autodefensa_de_los_vegetales_1993/links/00b7d529332fb8f009000000.pdf)

[la_autodefensa_de_los_vegetales_1993/links/00b7d529332fb8f009](https://www.researchgate.net/profile/Valentina_Ruiz-Gutierrez2/publication/258841966_Los_compuestos_fenolicos_en_la_autodefensa_de_los_vegetales_1993/links/00b7d529332fb8f009000000.pdf)

[000000.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Valentina_Ruiz-Gutierrez2/publication/258841966_Los_compuestos_fenolicos_en_la_autodefensa_de_los_vegetales_1993/links/00b7d529332fb8f009000000.pdf)

19_Manual_para_cultivo_de_cacao.pdf. (s. f.). Recuperado a partir de

[http://www.canacacao.org/uploads/smartsection/19_Manual_para_](http://www.canacacao.org/uploads/smartsection/19_Manual_para_cultivo_de_cacao.pdf)

[cultivo_de_cacao.pdf](http://www.canacacao.org/uploads/smartsection/19_Manual_para_cultivo_de_cacao.pdf)

Agroalimentacion - Cultivo del cacao. (s. f.). Recuperado 16 de junio de

2016, a partir de

<http://canales.hoy.es/canalagro/datos/herbaceos/industriales/cacao>

[.htm](http://canales.hoy.es/canalagro/datos/herbaceos/industriales/cacao)

Aislamiento de microorganismos para control biológico de *Moniliophthora*

roreri - ProQuest. (s. f.). Recuperado 21 de junio de 2016, a partir

de [http://search.proquest.com/openview/92920562bce628b32b1582](http://search.proquest.com/openview/92920562bce628b32b1582b8c6712f42/1?pq-origsite=gscholar)

[b8c6712f42/1?pq-origsite=gscholar](http://search.proquest.com/openview/92920562bce628b32b1582b8c6712f42/1?pq-origsite=gscholar)

Aldecoa Bedoya, F., & Battilana Guanilo, C. (2006). Genómica y

proteómica: Un paso más: one further step. *Acta Médica Peruana*,

23(3), 185-192.

Alianza SIDALC. (s. f.). Recuperado 16 de junio de 2016, a partir de

[http://www.sidalc.net/cgi-](http://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=OET.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=005958)

[bin/wxis.exe/?IsisScript=OET.xis&method=post&formato=2&cantida](http://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=OET.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=005958)

[d=1&expresion=mfn=005958](http://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=OET.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=005958)

Álvarez, C., Pérez, E., & Lares, M. (2002). Morfología de los frutos y

características físico-químicas del Mucílago del cacao de tres

zonas del Estado Aragua. *Agronomía Tropical*, 52(4), 497-506.

ARIZMENDI, 2013. (s. f.). Recuperado a partir de

[http://ufq.unq.edu.ar/Docencia-](http://ufq.unq.edu.ar/Docencia-Virtual/BQblog/Electroforesis%202D%20(IEF+SDS-PAGE).pdf)

[Virtual/BQblog/Electroforesis% 202D % 20\(IEF+SDS -PAGE\).pdf](http://ufq.unq.edu.ar/Docencia-Virtual/BQblog/Electroforesis%202D%20(IEF+SDS-PAGE).pdf)

Bakker, M. L., & Alvarado, P. I. (2006). ALCANOS LINEALES DE LA

CERA CUTICULAR DE HOJAS DE POPULUS ALBA, POPULUS

DELTOIDES (SALICACEAE), ROBINIA PSEUDOACACIA

(FABACEAE), ULMUS PUMILA (ULMACEAE) Y FRAXINUS

AMERICANA (OLEACEAE) EN TANDIL, BUENOS AIRES,

ARGENTINA. *Darwiniana, Nueva Serie*, 44(1), 58-63.

<http://doi.org/10.14522/darwiniana.2014.441.120>

BIO-RAD, s.f. (s. f.). Recuperado a partir de [http://www.bio-](http://www.bio-rad.com/LifeScience/pdf/Bulletin_2651.pdf)

[rad.com/LifeScience/pdf/Bulletin_2651.pdf](http://www.bio-rad.com/LifeScience/pdf/Bulletin_2651.pdf)

BIO SCIENCES. (s. f.). Recuperado a partir de
http://www.bu.edu/picf/files/2010/10/2D-Principles-2nd_edition.pdf

Bonilla, S., Luis, J., Zamarripa Colmenero, A., Pecina Quintero, V.,
Garrido Ramírez, E., & Hernández Gómez, E. (2015). Evaluación
agronómica de híbridos de cacao (*Theobroma cacao* L.) para
selección de alto rendimiento y resistencia en campo a moniliasis.
Revista mexicana de ciencias agrícolas, 6(1), 71-82.

Botello, M., & Hernando, D. (2015). Bases conceptuales del mecanismo
de interacción planta-patógeno (patosistema cacao-monilia).
Recuperado a partir de
<http://repository.unad.edu.co/handle/10596/3539>

Cacao Nacional | Anecacao Ecuador. (s. f.). Recuperado 16 de junio de
2016, a partir de <http://www.anecacao.com/es/quienes-somos/cacao-nacional.html>

Castro, M. S., & Fontes, W. (2005). Plant defense and antimicrobial
peptides. *Protein and Peptide Letters*, 12(1), 13-18.

CITIUS, 2012. (s. f.). Recuperado a partir de
<http://servicio.us.es/sgbm citius/images/stories/nanodro2000.%20rev%2000.pdf>

Contreras, L. Y. S. (2006). Aislamiento e identificación de moniliophthora roreri causante de la moniliasis en municipios del nororiente colombiano y ensayos preliminares para su control biológico. *Respuestas*, 11(1), 3-8.

Correa Álvarez, J., Castro Martínez, S., & Coy, J. (2014a). Biology stage of Moniliophthora roreri in Colombia. *Acta Agronómica*, 63(4), 388-399. <http://doi.org/10.15446/acag.v63n4.42747>

Correa Álvarez, J., Castro Martínez, S., & Coy, J. (2014b). Biology stage of Moniliophthora roreri in Colombia. *Acta Agronómica*, 63(4), 388-399. <http://doi.org/10.15446/acag.v63n4.42747>

Correa Álvarez, J., Castro Martínez, S., & Coy, J. (2014c). Biology stage of Moniliophthora roreri in Colombia. *Acta Agronómica*, 63(4), 388-399. <http://doi.org/10.15446/acag.v63n4.42747>

Díaz-Valderrama, J. R., & Aime, M. C. (2016). The cacao pathogen Moniliophthora roreri (Marasmiaceae) possesses biallelic A and B mating loci but reproduces clonally. *Heredity*. <http://doi.org/10.1038/hdy.2016.5>

DILLENDIAE-Sterculiaceae. (s. f.). Recuperado a partir de
[http://www.biologia.edu.ar/diversidad/v/fascIII/9.%20Sterculiaceae.p
df](http://www.biologia.edu.ar/diversidad/v/fascIII/9.%20Sterculiaceae.pdf)

Dumble. (2013, noviembre 20). Agroindustria: CACAO MORFOLOGÍA Y
TAXONOMÍA. Recuperado a partir de [http://fiai-
pe.blogspot.com/2013/11/cacao-morfologia-y-taxonomia.html](http://fiaipe.blogspot.com/2013/11/cacao-morfologia-y-taxonomia.html)

Estadísticas Actuales | Anecacao Ecuador. (s. f.). Recuperado 16 de junio
de 2016, a partir de
[http://www.anecacao.com/index.php/es/estadisticas/estadisticas-
actuales.html](http://www.anecacao.com/index.php/es/estadisticas/estadisticas-actuales.html)

Estructura Vegetal. (s. f.). Recuperado 19 de junio de 2016, a partir de
[http://www.efn.unc.edu.ar/departamentos/biologia/intrbio/planta1.ht
m](http://www.efn.unc.edu.ar/departamentos/biologia/intrbio/planta1.htm)

Fajardo Rangel, M. A., Zavaleta-Mancera, H. A., Córdova-Téllez, L.,
López-Andrade, A. P., Delgado-Alvarado, A., Vidales-Fernández, I.,
& Villegas-Monter, Á. (2012). Anatomía e histoquímica de la semilla
del cacao (*Theobroma cacao* L.) criollo mexicano. *Revista fitotecnia
mexicana*, 35(3), 189-197.

FAO:AG:Agricultura de Conservación. (s. f.). Recuperado 17 de junio de 2016, a partir de <http://www.fao.org/ag/ca/es/11.html>

Fister, A. S., Mejia, L. C., Zhang, Y., Herre, E. A., Maximova, S. N., & Gultinan, M. J. (2016). Theobroma cacao L. pathogenesis-related gene tandem array members show diverse expression dynamics in response to pathogen colonization. *BMC Genomics*, 17(1), 363. <http://doi.org/10.1186/s12864-016-2693-3>

Fitopatología G.N Agrios 2da Edición. (s. f.). Recuperado 16 de junio de 2016, a partir de <https://es.scribd.com/doc/101414914/Fitopatologia-G-N-Agrios-2da-Edicion>

Forma que actúan los patógenos sobre las plantas. Célula vegetal. Estructura y composición de la cutícula de células epidérmicas. (s. f.). Recuperado 19 de junio de 2016, a partir de <http://docplayer.es/2773737-Forma-que-actuan-los-patogenos-sobre-las-plantas-celula-vegetal-estructura-y-composicion-de-la-cuticula-de-celulas-epidermicas.html>

FUNDESYRAM. (s. f.-a). La moniliasis (Moniliophthora roreri). Recuperado 17 de junio de 2016, a partir de <http://www.fundesyram.info/biblioteca.php?id=3742>

FUNDASYRAM. (s. f.-b). Morfología de la planta de cacao. Recuperado 4 de junio de 2016, a partir de <http://www.fundasyram.info/biblioteca.php?id=3096>

FUNDASYRAM. (s. f.-c). Tipos de variedades de cacao. Recuperado 16 de junio de 2016, a partir de <http://www.fundasyram.info/biblioteca.php?id=745>

GARCÍA, 2000. (s. f.). Recuperado a partir de http://www.bvs.sld.cu/revistas/uni/vol1_2_00/uni07200.pdf

García L., A. (2002). Evaluación agro-económica de cinco activadores de las plantas en la Resistencia Sistémica Adquirida (SAR) en el cultivo del tomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill). Recuperado a partir de <http://bdigital.zamorano.edu/handle/11036/2356>

González-Mendoza, D., & Zapata-Pérez, O. (2008). Mecanismos de tolerancia a elementos potencialmente tóxicos en plantas. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, (82), 53-61.

Hoja_Botanica_Cacao_2012.pdf. (s. f.). Recuperado a partir de http://www.botconsult.de/downloads/Hoja_Botanica_Cacao_2012.pdf

INS, 2003. (s. f.). Recuperado a partir de
<http://www.ins.gob.pe/insvirtual/images/otrpubs/pdf/Manual%20Electroforesis%2038.pdf>

Lección 7 MECANISMOS DE INFECCIÓN DE LOS HONGOS
FITOPATÓGENOS. (s. f.). Recuperado 17 de junio de 2016, a
partir de
http://datateca.unad.edu.co/contenidos/30165/contenido_en_linea_exe/30165%20FITOPATOLOGIA/exe%20fitopatologia/leccin_7_mecanismos_de_infeccion_de_los_hongos_fitopatgenos.html

Lopez-Martinez, U. (s. f.). page_12 — ocwus. Recuperado 15 de junio de
2016, a partir de http://ocwus.us.es/produccion-vegetal/sanidad-vegetal/Sanidad_vegetal/Tema%2019_HTML/page_12.htm

MALDONADO et al., sf. (s. f.). Recuperado a partir de
<http://www.uco.es/dptos/bioquimica-biol-mol/pdfs/16%20ELECTROFORESIS%20GELES%20PAA.pdf>

Manual de técnicas para el diagnóstico de las enfermedades de las plantas. Diagnóstico fitosanitario II. (1997). IICA Biblioteca Venezuela.

M e c a n i s m o s _ d e _ d e f e n s a _ e n _ l a _ i n t e r a c c i o n _ p l a n t a _ p a t o g e n o . p d f . (s . f .) .

R e c u p e r a d o a p a r t i r d e

http://datateca.unad.edu.co/contenidos/30165/Material_de_soporte/

M e c a n i s m o s _ d e _ d e f e n s a _ e n _ l a _ i n t e r a c c i o n _ p l a n t a _ p a t o g e n o . p d f

M e c a n i s m o s d e r e s i s t e n c i a d e l a s p l a n t a s . (s . f .) . R e c u p e r a d o 16 d e j u n i o

d e 2016, a p a r t i r d e [http://docplayer.es/6090111-Mecanismos-de-](http://docplayer.es/6090111-Mecanismos-de-resistencia-de-las-plantas.html)

[resistencia-de-las-plantas.html](http://docplayer.es/6090111-Mecanismos-de-resistencia-de-las-plantas.html)

M e j o r a m i e n t o d e p l a n t a s m e d i a n t e t r a n s f o r m a c i ó n g e n é t i c a | A p u n t e s d e

F i s i o l o g í a V e g e t a l . (s . f .) . R e c u p e r a d o a p a r t i r d e

[http://fisiolvegetal.blogspot.com/2012/12/mejoramiento-de-plantas-](http://fisiolvegetal.blogspot.com/2012/12/mejoramiento-de-plantas-mediante.html)

[mediante.html](http://fisiolvegetal.blogspot.com/2012/12/mejoramiento-de-plantas-mediante.html)

M i k á n , J . F . , & S u á r e z , D . E . C . (2 0 0 4) . S c r e e n i n g p a r a e l a i s l a m i e n t o y

c a r a c t e r i z a c i ó n d e m i c r o o r g a n i s m o s y e n z i m a s p o t e n c i a l m e n t e

ú t i l e s p a r a l a d e g r a d a c i ó n d e c e l u l o s a s y h e m i c e l u l o s a s . *R e v i s t a*

C o l o m b i a n a d e B i o t e c n o l o g í a , 6 (1) , 5 8 - 7 1 .

M o n t e s - B e l m o n t , R . (2 0 0 9) . D i v e r s i d a d d e c o m p u e s t o s q u í m i c o s

p r o d u c i d o s p o r l a s p l a n t a s c o n t r a h o n g o s f i t o p a t ó g e n o s . *R e v i s t a*

m e x i c a n a d e m i c o l o g í a , 2 9 , 7 3 - 8 2 .

MORALES et al., 2006. (s. f.). Recuperado a partir de
http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/plataformas_de_proteomica.pdf

Morales, I. (2010, lunes, de diciembre de). Manejo Integrado de las plagas: Unidad #1 HISTORIA DEL CONTROL DE PLAGAS. Recuperado a partir de
<http://manejointegradodelasplagas.blogspot.com/2010/12/unidad-1-historia-del-control-de-plagas.html>

MOTAMAYOR, J. C., Lachenaud, P., Mota, J. W. da S. e, Loor, R., Kuhn, D. N., Brown, J. S., & Schnell, R. J. (2008). Geographic and Genetic Population Differentiation of the Amazonian Chocolate Tree (*Theobroma cacao* L). *PLOS ONE*, 3(10), e3311.
<http://doi.org/10.1371/journal.pone.0003311>

Motamayor, J. C., Risterucci, A. M., Lopez, P. A., Ortiz, C. F., Moreno, A., & Lanaud, C. (2002). Cacao domestication I: the origin of the cacao cultivated by the Mayas. *Heredity*, 89(5), 380-386.
<http://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800156>

Oliveros-Bastidas, A. de J., Macías, F. A., Fernández, C. C., Marín, D., & Molinillo, J. M. G. (2009). Root exudates and their relevance to the allelopathic interactions. *Química Nova*, 32(1), 198-213.
<http://doi.org/10.1590/S0100-40422009000100035>

O maña, D. (2009, miércoles, de abril de). Puro Cacao: morfología y taxonomía. Recuperado a partir de <http://purocacaounesur.blogspot.com/2009/04/morfologia-y-taxonomia.html>

Ortega, S. P. G., & Kafuri, L. A. (2008). Análisis de variabilidad genética en *Moniliophthora roreri* con AP-PCR y RAPD en Antioquia, Colombia. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 9(2), 15-32.

Ortiz, M. L. (2009). Aproximaciones a la comprensión de la degradación de la lignina. *Orinoquía*, 13(2), 137-144.

Phillips -Mora, W., Aime, M. C., & Wilkinson, M. J. (2007). Biodiversity and biogeography of the cacao (*Theobroma cacao*) pathogen *Moniliophthora roreri* in tropical America. *Plant Pathology*, 56(6), 911-922. <http://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2007.01646.x>

Phillips -Mora, & Wilkinson, M. J. (2007). Frosty pod of cacao: a disease with a limited geographic range but unlimited potential for damage. *Phytopathology*, 97(12), 1644-1647. <http://doi.org/10.1094/PHYTO-97-12-1644>

Pineda, I. M. (2011a, marzo 15). FITOPATOLOGIA 2011: TEMA 3: MECANISMOS DE ATAQUE DE LOS FITOPATOGENOS Y DE DEFENSA DE LAS PLANTAS. Recuperado a partir de <http://fitopatologia2011.blogspot.com/2011/03/tema-3-mecanismos-de-ataque-de-los.html>

Pineda, I. M. (2011b, marzo 15). FITOPATOLOGIA 2011: TEMA 3: MECANISMOS DE ATAQUE DE LOS FITOPATOGENOS Y DE DEFENSA DE LAS PLANTAS. Recuperado a partir de <http://fitopatologia2011.blogspot.com/2011/03/tema-3-mecanismos-de-ataque-de-los.html>

Pirovani, C. P., Carvalho, H. A. S., Machado, R. C. R., Gomes, D. S., Alvim, F. C., Pomella, A. W. V., ... Micheli, F. (2008). Protein extraction for proteome analysis from cacao leaves and meristems, organs infected by *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of the witches' broom disease. *Electrophoresis*, 29(11), 2391-2401. <http://doi.org/10.1002/elps.200700743>

Plagas y enfermedades de las plantas : FAO in Emergencies. (s. f.). Recuperado 17 de junio de 2016, a partir de <http://www.fao.org/emergencies/emergencias/plagas-y-enfermedades-de-las-plantas/es/>

PROEC_AS2013_CACAO.pdf. (s. f.-a). Recuperado a partir de

[http://www.proecuador.gob.ec/wp-](http://www.proecuador.gob.ec/wp-content/uploads/2013/08/PROEC_AS2013_CACAO.pdf)

[content/uploads/2013/08/PROEC_AS2013_CACAO.pdf](http://www.proecuador.gob.ec/wp-content/uploads/2013/08/PROEC_AS2013_CACAO.pdf)

PROEC_AS2013_CACAO.pdf. (s. f.-b). Recuperado a partir de

[http://www.proecuador.gob.ec/wp-](http://www.proecuador.gob.ec/wp-content/uploads/2013/08/PROEC_AS2013_CACAO.pdf)

[content/uploads/2013/08/PROEC_AS2013_CACAO.pdf](http://www.proecuador.gob.ec/wp-content/uploads/2013/08/PROEC_AS2013_CACAO.pdf)

Proteómica. (2011, mayo 12). Recuperado a partir de

<https://cienciasomicas.wordpress.com/proteomica/>

Proteómica. (s. f.). Recuperado 23 de junio de 2016, a partir de

<https://www.cnic.es/es/investigacion/proteomica>

Proteómica - Medicina molecular. (s. f.). Recuperado 23 de junio de 2016,

a partir de <http://medmole.es/glosario/75/>

Puntos de inflexión. (s. f.). Recuperado 23 de junio de 2016, a partir de

<http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar/v10n1/gomez.htm>

RABILLOUD, T., & Lelong, C. (2011). Two-dimensional gel

electrophoresis in proteomics: A tutorial. *Journal of Proteomics*,

74(10), 1829-1841. <http://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.05.040>

Ramírez, P., & Cocha, J. M. (2003). Degradación enzimática de celulosa por actinomicetos termófilos: aislamiento, caracterización y determinación de la actividad celolítica. *Revista Peruana de Biología*, 10(1), 67-77.

REYES, sf. (s. f.). Recuperado a partir de <http://www.uco.es/dptos/bioquimica-biol-mol/pdfs/27%20M%C3%89TODOS%20PARA%20LA%20CUANTIFICACI%C3%93N%20DE%20PROTE%C3%8DNAS.pdf>

Roberto. (2010, noviembre 26). Agricultura tropical ecuador: Variedades de Cacao. Recuperado a partir de <http://agricultura-tropical-ecuador.blogspot.com/2010/11/variedades-de-cacao.html>

ROBLES et al., 2007. (s. f.). Recuperado a partir de http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/libro_25_aniv/capitulo_09.pdf

SALMERÓN, 2010. (s. f.). Recuperado a partir de <http://cdigital.uv.mx/bitstream/123456789/32466/1/salmeronparedes.pdf>

SÁNCHEZ, L., Gamboa, E., & Rincón, J. (2003). Control químico y cultural de la moniliasis (*Moniliophthora roreri* Cif & Par) del cacao (*Theobroma cacao* L) en el estado Barinas. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 20(2). Recuperado a partir de <http://www.produccioncientificaluz.org/index.php/agronomia/article/view/12015>

Sánchez, L., Gamboa, E., & Rincón, J. (2003). Control químico y cultural de la moniliasis (*Moniliophthora roreri* Cif & Par) del cacao (*Theobroma cacao* L) en el estado Barinas. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 20(2). Recuperado a partir de <http://www.produccioncientificaluz.org/index.php/agronomia/article/view/12015>

Sánchez, L., & Garcés, F. (2012). *Moniliophthora roreri* (Cif y Par) Evans et al. in the crop of cocoa. *Scientia Agropecuaria*, 3(3), 249-258.

Shahin, Melnick, R. L., Crozier, J., Phillips-Mora, W., Strem, M. D., Shao, J., ... Bailey, B. A. (2014). Successful pod infections by *Moniliophthora roreri* result in differential *Theobroma cacao* gene expression depending on the clone's level of tolerance. *Molecular Plant Pathology*, 15(7), 698-710. <http://doi.org/10.1111/mpp.12126>

Shi, Z., Maximova, S. N., Liu, Y., Verica, J., & Guiltinan, M. J. (2010).

Functional analysis of the *Theobroma cacao* NPR1 gene in
arabidopsis. *BMC Plant Biology*, 10, 248.

<http://doi.org/10.1186/1471-2229-10-248>

Shi, Z., Zhang, Y., Maximova, S. N., & Guiltinan, M. J. (2013). TcNPR3

from *Theobroma cacao* functions as a repressor of the pathogen
defense response. *BMC Plant Biology*, 13, 204.

<http://doi.org/10.1186/1471-2229-13-204>

Stotz, H. U., Thomson, J. G., & Wang, Y. (2009). Plant defensins. *Plant*

Signaling & Behavior, 4(11), 1010-1012.

Tafolla-Arellano, J. C., González-León, A., Tiznado-Hernández, M. E.,

Zacarías García, L., & Báez-Sañudo, R. (2013). Composición,
fisiología y biosíntesis de la cutícula en plantas. *Revista fitotecnica
mexicana*, 36(1), 3-12. *Técnicas aplicadas al estudio de la anatomía
vegetal*. (2005). UNAM.

Tejidos Vegetales: Epidermis. | el moderno prometeo. (s. f.). Recuperado

a partir de [http://elmodernoprometeo.blogspot.com/2014/11/tejidos-
vegetales-epidermis.html](http://elmodernoprometeo.blogspot.com/2014/11/tejidos-vegetales-epidermis.html)

Torres de la Cruz, M. (2010). Progreso temporal y manejo integrado de la moniliais [*Moniliophthora roreri* (Cif y Par.) Evans et al.] del cacao (*Theobroma cacao*) en Tabasco, México. Recuperado a partir de <http://www.biblio.colpos.mx:8080/xmlui/handle/10521/146>

Vivanco-et-al-2005.pdf. (s. f.). Recuperado a partir de <http://www.uv.mx/personal/tcarmona/files/2010/08/vivanco-et-al-2005.pdf>

Wang, W., Vignani, R., Scali, M., & Cresti, M. (2006). A universal and rapid protocol for protein extraction from recalcitrant plant tissues for proteomic analysis. *ELECTROPHORESIS*, 27(13), 2782-2786. <http://doi.org/10.1002/elps.200500722>

Zeiger, E. (2006). *Fisiología vegetal*. Universitat Jaume I.

ANEXOS.

Anexo 1. Soluciones para geles no disociantes.

TABLA 15: Buffer de muestra 3x.

	Buffer de muestra 3x		
Buffer de muestra 3x	10 m l	20 m l	100 m l
G licerol 87 %	3 m l	6 m l	30 m l
Sol. Upper tris 4x	3,75 m l	7,5 m l	37,5 m l
Agua destilada.	10 m l	20 m l	100 m l
Brom ofenol.			

TABLA 16: Soluciòn Lower Tris 4x.

	Buffer Lower	
Buffer lower	500 m l	100 m l
Tris base	113,55 gr	22,71 gr
HCL 4N	24 m l	4,8 m l
Ajustar el pH 8.8		
Agua destilada	500 m l	100 m l

TABLA 17: Soluciòn Upper Tris 4x.

	Buffer Upper	
Buffer Upper	500 m l	100 m l
Tris base	75,7 gr	15,15 gr
Disolver en Agua		
Ajustar el pH 8.8		
Agua bidestilada	500 m l	100 m l

TABLA 18: Buffer de Corrida 5x.

	Buffer de Corrida 5x	
Buffer Corrida 5x	300 m l	600 m l
Tris base 5x	4,5 gr	9,0 gr
Glicina	21,6 gr	43,2 gr
Agua bidestilada	300 m l	600 m l

b). Soluciones para geles disociantes.

TABLA 19: Buffer de Corrida 5x pH 8,3

	Buffer de Corrida 5x pH 8.3	
Buffer Corrida 5x	300 m l	600 m l
Tris base 5x	4,5 gr	9,0 gr
G licina	21,6 gr	43,2 gr
S D S	1,5 gr	3,0 gr
Agua bidestilada	300 m l	600 m l

TABLA 20: Buffer de Muestra 3x.

	Buffer de muestra 3x	
Buffer de muestra 3x	10 m l	20 m l
G licerol 87 %	3 m l	6 m l
Sol. Upper tris 4x	3,75 m l	7,5 m l
M ercaptoetanol	1,5 m l	3 m l
S D S	0,9 gr	1,8 gr
Agua destilada.	10 m l	20 m l

TABLA 21: Buffer Lowe tris 4x.

	Buffer Lower	
Buffer lower	500 m l	100 m l
Tris base	113,55 gr	22,71 gr
HCL 4N	24 m l	4,8 m l
Ajustar el pH 8.8		
S D S 10%	20 m l	4 m l
Agua destilada	500 m l	100 m l

TABLA 22: Buffer Upper tris 4x.

	Buffer Upper	
Buffer upper	500 m l	100 m l
Tris base	75,7 gr	15,14 gr
Disolver en agua		
Ajustar el pH 6,8		
S D S 10%	20 m l	4 m l
Agua destilada	500 m l	100 m l

c). Soluciones para los dos tipos de geles.

TABLA 23: Solución de Acrilamida.

Acrilamida bis/acrilamida (30% - 0,8%)	
Acrilamida	30 gr
Bis-acrilamida	0,8 gr
Agua bidestilada.	100 ml

TABLA 24: Solución para teñir geles.

Solución para teñido de geles.	
Azul de Comassie	1 gr
Metanol	232,5 ml

TABLA 25: Solución para decolorar geles.

Solución para decolorar geles.	
Ácido acético	10%

Anexo 2. Material vegetal de cacao (*Theobroma cacao*) para la investigación.



Anexo 3.- Figuras de geles con problemas de pH en su Buffer.

