



UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
CARRERA INGENIERÍA AGRONÓMICA

Proyecto de Investigación previo
a la obtención del título de
Ingeniero Agrónomo.

Título del Proyecto de Investigación:

**“OPTIMIZACIÓN DE UN MÉTODO PARA LA EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS
DE CACAO (*Theobroma cacao* L.) PARA SU EMPLEO EN ANÁLISIS
PROTEÓMICO”**

Autor:

Jefferson Fernando Herrera Torres

Director de Tesis:

Dr. Hayrón Fabricio Canchignia Martínez

Quevedo – Los Ríos - Ecuador.

2015

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

Yo, **Jefferson Fernando Herrera Torres**, declaro que el trabajo aquí descrito es de mi autoría; que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

La Universidad Técnica Estatal de Quevedo, puede hacer uso de los derechos correspondientes a este trabajo, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su Reglamento y por la normatividad institucional vigente.

f. _____

Jefferson Fernando Herrera Torres

CERTIFICACIÓN DE CULMINACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

El suscrito, **Dr. Hayrón Fabricio Canchignia Martínez**, Docente de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, certifica que el estudiante **Jefferson Fernando Herrera Torres**, realizó el Proyecto de Investigación de grado titulado “**Optimización de un Método para la Extracción de Proteínas de Cacao (*Theobroma cacao* L.) para su Empleo en Análisis Proteómico**”, previo a la obtención del título de **Ingeniero Agrónomo**, bajo mi dirección, habiendo cumplido con las disposiciones reglamentarias establecidas para el efecto.

f. _____

Dr. Hayrón Fabricio Canchignia Martínez

DIRECTOR DE TESIS

CERTIFICADO DEL REPORTE DE LA HERRAMIENTA DE PREVENCIÓN DE COINCIDENCIA Y/O PLAGIO ACADÉMICO

URKUND

Document	PROY.INV. JEFFERSON HERRERA 03.12.2015.docx (D16537415)
Submitted	2015-12-03 14:07 (-05:00)
Submitted by	rgaibor@uteq.edu.ec
Receiver	rgaibor.uteq@analysis.orkund.com
Message	PROY.INV. JEFFERSON HERRERA 03.12.2015 Show full message

9% of this approx. 21 pages long document consists of text present in 1 sources.

URKUND

Urkund Analysis Result

Analysed Document:	PROY.INV. JEFFERSON HERRERA 03.12.2015.docx (D16537415)
Submitted:	2015-12-03 20:07:00
Submitted By:	rgaibor@uteq.edu.ec
Significance:	9 %

Sources included in the report:

Tesis Herrera 01.12.2015.docx (D16500902)

Instances where selected sources appear:

1

f. _____

Dr. Hayrón Fabricio Canchignia Martínez
DIRECTOR DE TESIS



UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Título:

Optimización de un método para la extracción de proteínas de cacao (*Theobroma cacao L.*) para su empleo en análisis proteómico

Presentado a la Comisión Académica como requisito previo a la obtención del título de
Ingeniero Agrónomo.

Aprobado por:

PRESIDENTE DEL TRIBUNAL DE TESIS

Ing. Ignacio Sotomayor Herrera

MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE TESIS

Ing. Ludvick Amores Puyotaxi

MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE TESIS

Ing. Cesar Varas Menza

QUEVEDO – LOS RIOS – ECUADOR

2015

AGRADECIMIENTO

Este proyecto es el resultado del esfuerzo conjunto de todos los que formamos el grupo de trabajo. Por esto agradezco a mi Director de Investigación, Dr. Hayrón Canchignia Martínez, y Codirector Dr. Jaime Morante Carriel, y demás personas que contribuyeron para la presente investigación, quienes a lo largo de este tiempo han puesto a prueba sus capacidades y conocimientos en el desarrollo de este trabajo el cual ha finalizado llenando todas nuestras expectativas.

A mis Padres Rubén y Narciza, mi Hermanita Kimberly, quienes a lo largo de toda mi vida han apoyado y motivado mi formación académica, creyeron en mí en todo momento y no dudaron de mis habilidades. A mi Primo y Colega Ronald Villamar por todo el apoyo brindado.

A mis profesores a quienes les debo gran parte de mis conocimientos, gracias a su paciencia y enseñanza. Finalmente un eterno agradecimiento a esta prestigiosa Universidad, la cual abrió puertas a jóvenes para prepararlos hacia un futuro competitivo y formándolos como personas de bien.

Jefferson Herrera Torres

DEDICATORIA

Dedico mi tesis a Dios a quien amo y admiro; a mis extraordinarios Padres, Rubén y Narciza, por su noble dedicación y amor, por ser mis amigos, mis consejeros, y por siempre guiarme y ser la voz y bendición de Dios como prioridad en mi vida. A mi Hermanita Kimberly, por ser mí apoyo fundamental e incondicional en todo momento.

Jefferson Herrera Torres

RESUMEN

La presente investigación se llevó a cabo a fin de desarrollar un nuevo protocolo (Método) de extracción de proteínas totales. Fue ejecutada con el objetivo de visualizar la calidad en geles de poliacrilamidas y la mayor cantidad de proteínas de cacao.

El trabajo fue realizado en el laboratorio de biotecnología de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, utilizando el diseño completamente al azar con arreglo factorial de 2x2x2 en 3 repeticiones, y la prueba de Tukey al 95% de probabilidad para la comparación de medias.

Las mazorcas y hojas fueron trituradas con nitrógeno líquido, obteniendo un polvo muy fino para así realizar los respectivos pasos de lavados para la obtención de proteínas limpias y de calidad.

Una vez obtenidas las proteínas se colocó buffer de carga para ser visibles en el gel de poliacrilamidas al 12,5%. Realizado el gel se efectuó la fijación, luego la tinción con plata, así por lo consiguiente el revelado para la visualización de las proteínas en el gel.

Palabras Claves: Extracción de proteínas, Gel de poliacrilamida, Proteómica, Protocolos.

ABSTRACT

The present investigation was carried out in order to develop a new protocol (Method) of extraction of entire proteins. It was executed by the target to visualize the quality in gels of polyacrylamide and the biggest quantity of proteins of cocoa.

The work was done in the biotechnology laboratory of the State Technical University of Quevedo, using a completely randomized design with a factorial arrangement of 2x2x2 in 3 repetitions, and the Tukey test at the 95% probability for comparison of means.

Cobs and leaves were crushed with liquid nitrogen getting a very fine powder to make the respective steps of washes for obtaining proteins clean and of quality.

Once obtained the proteins placed buffer of load to be visible on the gel of polyacrylamide to 12.5 %. Made the gel is made the mounting, then the silver stain, so therefore the revealed for the display of proteins in the gel.

Keywords: Protein extraction, Polyacrylamide gel, Proteomics, Protocols.

TABLA DE CONTENIDO

Portada.....	i
Declaración de autoría y cesión de derechos.....	ii
Certificación de culminación del proyecto de investigación.....	iii
Certificado del reporte de la herramienta de prevención de coincidencia y/o plagio académico.....	iv
Certificación de aprobación por tribunal de sustentación.....	v
Agradecimiento.....	vi
Dedicatoria.....	vii
Resumen.....	viii
Abstract.....	ix
Tabla de contenido.....	x
Índice de figuras.....	xiii
Índice de tablas.....	xiv
Índice de anexos.....	xiv
Código Dublin.....	xv
Introducción.....	1
CAPÍTULO I: CONTEXTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN.....	3
1.1. Problema de investigación.....	4
1.1.1. Planteamiento del problema.....	4
1.1.2. Formulación del problema.....	5
1.1.3. Sistematización del problema.....	5
1.2. Objetivos.....	5
1.2.1. Objetivo General.....	5
1.2.2. Objetivos Específicos.....	5
1.3. Justificación.....	5
CAPÍTULO II: FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN.....	8

2.1.	Marco conceptual.....	9
2.1.1.	Cultivo de cacao	9
2.1.2.	Proteómica	9
2.1.3.	Electroforesis en poliacrilamida	10
2.1.4.	Gel de electroforesis	10
2.2.	Marco referencial.....	11
2.2.1.	Características del cultivo de cacao.....	11
2.2.2.	Morfología y taxonomía	11
2.2.2.1.	Planta.....	12
2.2.2.2.	Sistema radicular	12
2.2.2.3.	Hojas.....	12
2.2.2.4.	Flores	12
2.2.2.5.	Fruto	13
2.2.2.6.	Semillas	13
2.2.3.	Exigencias en clima y suelo.....	13
2.2.3.1.	Agua	13
2.2.3.2.	Viento	13
2.2.3.3.	Sombreamiento.....	14
2.2.4.	Importancia económica y alimenticia.....	14
2.2.5.	Enfermedades del cacao	16
2.2.5.1.	Moniliasis	16
2.2.5.2.	Mazorca negra	17
2.2.5.3.	Roselinia (<i>Rosellinia pepo</i>)	17
2.2.5.4.	Ceratocystis o mal de machete (<i>Ceratocystis cacaofunesta</i>)	17
2.2.5.5.	Antracnosis (<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>)	17
2.2.6.	Análisis proteínico	18
2.2.7.	Extracción de proteínas	19
2.2.8.	Electroforesis de proteínas.....	20
2.2.9.	Resistencia a enfermedades en las plantas	22
2.2.10.	Enfermedades en plantas	23

2.2.11. SDS-PAGE Determinación de pesos moleculares.	24
CAPÍTULO III: METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN	25
3.1. Localización.....	26
3.2. Tipo de investigación.....	26
3.3. Métodos de investigación	26
3.4. Fuentes de recopilación de información	26
3.5. Diseño de la investigación	26
3.5.1. Factores.....	27
3.5.2. Tratamientos	27
3.6. Instrumentos de investigación	28
3.7. Tratamiento de los datos	28
3.8. Recursos humanos y materiales	29
CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
4.1. Resultados.....	31
4.1.1. Consideraciones sobre protocolos de extracción	31
4.1.2. Interacción protocolos/accesiones.....	31
4.1.3. Interacciones material vegetal/accesiones.....	32
4.1.4. Interacción protocolos/material vegetal	32
4.1.5. Interacción protocolos/material vegetal/accesiones.....	33
4.2. Discusión	35
CAPITULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	38
5.1. Conclusiones.....	39
5.2. Recomendaciones.	40
CAPITULO VI: BIBLIOGRAFÍA.....	41
6.1. Literatura citada.....	42
CAPITULO VII: ANEXOS	47

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de la moniliasis causada por <i>Moniliophthora roreri</i> en cacao.	16
Figura 2. Interior de una cámara de electroforesis vertical en operación: Durante la colocación de la muestra en el pocillo del gel, Después de aplicar un voltaje determinado el cual genera el empacamiento uniforme de las proteínas, las proteínas migran hacia el ánodo y se distribuyen en el gel a manera de bandas.	22
Figura 3. Perfiles de bandas del marcador de peso molecular no teñido en SDS-PAGE.	24
Figura 4. Cuantificación de proteínas totales de cacao en la interacción protocolos (LAB-WM, Wang y Sellés)/accesiones (resistentes y susceptibles). Laboratorio de Biotecnología, UTEQ 2015.	31
Figura 5. Cuantificación de proteínas totales de cacao en la interacción accesiones (resistentes y susceptibles)/material vegetal (mazorcas y hojas). Laboratorio de Biotecnología, UTEQ 2015.	32
Figura 6. Cuantificación de proteínas totales de cacao en la interacción protocolos (LAB-WN, Wang y Sellés)/material vegetal (mazorcas y hojas). Laboratorio de Biotecnología, UTEQ 2015.	33
Figura 7. Cuantificación de proteínas totales de cacao en la interacción protocolos (Wang y Sellés)/material vegetal (mazorcas y hojas)/accesiones experimentales (resistentes y susceptibles). Laboratorio de Biotecnología, UTEQ 2015.	34

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Combinación de tres factores establecidos en doce tratamientos.....	27
Tabla 2. Esquema del ADEVA (Análisis de varianza)	28

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexos 1. Selección de muestras hojas y mazorcas en accesiones (Finca La Represa).	48
Anexos 2. Proceso de trituración con nitrógeno líquido de la mazorca y hojas de cacao.	49
Anexos 3. Proceso de elaboración del gel de poliacrilamida y corrido de la muestras.....	50
Anexos 4. Tinción del gel de poliacrilamida y visualización de bandas de proteínas.	51

CÓDIGO DUBLIN

Título:	Optimización de un método para la extracción de proteínas de cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.) para su empleo en análisis proteómico.				
Autor:	<u>Herrera Torres, Jefferson Fernando</u>				
Palabras clave:	Proteómica	Protocolos	Gel de Poliacrilamida	Extracción de proteínas	
Fecha de publicación:					
Editorial:	Quevedo: UTEQ, 2015.				
Resumen:	<p>Resumen.- La presente investigación se llevó a cabo a fin de desarrollar un nuevo protocolo (Método) de extracción de proteínas totales. Fue ejecutada con el objetivo de visualizar la calidad en geles de poliacrilamidas y la mayor cantidad de proteínas de cacao.</p> <p>El trabajo fue realizado en el laboratorio de biotecnología de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, utilizando el diseño completamente al azar con arreglo factorial de 2x2x2 en 3 repeticiones, y la prueba de Tukey al 95% de probabilidad para la comparación de medias.</p> <p>Las mazorcas y hojas fueron trituradas con nitrógeno líquido, obteniendo un polvo muy fino para así realizar los respectivos pasos de lavados para la obtención de proteínas limpias y de calidad.</p> <p>Una vez obtenidas las proteínas se colocó buffer de carga para ser visibles en el gel de poliacrilamidas al 12,5%. Realizado el gel se efectuó la fijación, luego la tinción con plata, así por lo consiguiente el revelado para la visualización de las proteínas en el gel.</p> <p>Abstract.- The present investigation was carried out in order to develop a new protocol (Method) of extraction of entire proteins. It was executed by the target to visualize the quality in gels of</p>				

	<p>polyacrylamide and the biggest quantity of proteins of cocoa.</p> <p>The work was done in the biotechnology laboratory of the State Technical University of Quevedo, using a completely randomized design with a factorial arrangement of 2x2x2 in 3 repetitions, and the Tukey test at the 95% probability for comparison of means.</p> <p>Cobs and leaves were crushed with liquid nitrogen getting a very fine powder to make the respective steps of washes for obtaining proteins clean and of quality.</p> <p>Once obtained the proteins placed buffer of load to be visible on the gel of polyacrylamide to 12.5 %. Made the gel is made the mounting, then the silver stain, so therefore the revealed for the display of proteins in the gel.</p>
Descripción:	67 hojas: dimensiones, 29,7 x 21 cm + CD-ROM
URI:	

Introducción

Theobroma cacao L. (*Malvaceae*) es una especie leñosa perenne preferentemente hecha con origen geográfico en América del sur y varias series en las regiones de Amazonas y Guyana. La especie se cultiva en los continentes americano, africano y asiático, y muchos países del mundo están involucrados en el consumo, comercialización y producción de cacao. El árbol de cacao es explorado comercialmente para semilla producción porque las semillas se fermentan, secado y molido para producir licor y grasa.

Este trabajo sirve de base para iniciar experimentos de análisis funcional de proteínas asociadas a la resistencia y susceptibilidad a enfermedades que permitan a futuro plantas tolerantes a enfermedades comunes en distintas cultivares de cacao.

Actualmente se han están desarrollado una serie de herramientas de naturaleza bioquímica que permitan incidir en estudios avanzados para un gran número de enfermedades. Es así, que el desarrollo de la proteómica juega un papel muy importante, puesto que el proteoma de un organismo es un elemento altamente dinámico, ya que sus componentes varían dependiendo del tejido, célula o compartimiento celular que se estudie y estos, a su vez, pueden cambiar debido a alteraciones en su ambiente, como situaciones de estrés, acción de fármacos, requerimientos energéticos, o su estado fisiológico (normal o patológico).

Estos factores incrementan de forma considerable la complejidad del proteoma, como consecuencia de la activación o supresión de la expresión de genes, las alteraciones en la intrincada pauta de interacciones intracelulares entre las proteínas, o los cambios en sus modificaciones postraduccionales.

El desarrollo de métodos eficientes para la extracción de proteínas es necesario para realizar ensayos proteómicos, que permitan analizar cultivos agronómicos importantes. Hasta la fecha se han desarrollado metodologías estándar para varios tipos de muestras, sin embargo, las particularidades de muchos de estos métodos requieren el uso de protocolos específicos, optimizados de acuerdo con el objetivo de la investigación, el tipo de tejido y la complejidad de la especie.

En el caso particular, el cacao es una especie recalcitrante con alto nivel de interferencia por la abundante presencia de carbohidratos, polisacáridos y compuestos fenólicos, lo que explica la ausencia de datos en la literatura para la obtención de proteínas de calidad.

Siendo necesario el desarrollo de un protocolo eficiente para la extracción de proteínas de diferentes órganos y tejidos de cacao que puedan ser empleadas en análisis proteómico.

Los protocolos utilizados en este trabajo fueron: Wang *et al* 2003 en este protocolo las proteínas se las obtiene por un proceso de maceración a las muestras, utilizando buffer de lavados para obtener proteínas de alta calidad. Sellés *et al* 2008 en este protocolo se obtuvieron proteínas por la elaboración de extracto de las muestras las cuales se obtenían unas proteínas de alta calidad pero con un déficit de pureza. El protocolo de más eficiencia en esta investigación es LAB-WM ya que en la cual se desarrolla procesos de maceración y destrucción de la célula para así realizar lavados abundantes y rescatar las proteínas de alta calidad y pureza del gel de poliacrilamidas.

En este sentido, este trabajo consistió en desarrollar un método eficiente para la extracción de proteínas totales de cacao para su empleo en análisis proteómico. Estos análisis servirán para validar proteínas asociadas a la resistencia y susceptibilidad del cacao frente a monilla y a otras enfermedades asociadas al cultivo.

CAPÍTULO I

CONTEXTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

1.1. Problema de investigación

1.1.1. Planteamiento del problema

Las enfermedades son un problema de importancia económica para la producción de cacao de todo el mundo, produciendo pérdidas de cosechas anuales del 30 y 40%, (Wood and Lass, 1985, Aime and Phillips-Mora, 2005). En Ecuador, el cacao es uno de los cultivos agrícolas de mayor importancia, sin embargo, presenta graves problemas de producción debido a un inadecuado manejo agronómico, uso de materiales genéticos de baja productividad y alta susceptibilidad a enfermedades, siendo estas últimas, las que ocasionan pérdidas en producción hasta un 80% (Quiróz & Amores, 2002).

La mayoría de plantaciones cacaoteras del país son manejadas de forma integral, incluyendo las labores sanitarias, las mismas que si no se realizan a tiempo, comprometen la producción hasta en un 90% por el ataque de enfermedades (Sánchez, 2011).

Habitualmente los mayores problemas del agricultor están ligados a las enfermedades y a sus esfuerzos por combatirlas. Las enfermedades más importantes de cacao en Centro y Sudamérica son; la mazorca negra o *Phytothpthora*, mal del machete o *Ceratocystis*, bubas o agallas, Moniliasis, Escoba de bruja, *Rosellinia* o llaga estrellada y el insecto *Monalonium* (Sánchez, 2011).

No obstante, el desconocimiento de algunas prácticas agronómicas (falta de poda y recolección y posterior eliminación de frutos infectados), la inadecuada selección de material genético y la avanzada edad de los cultivos, favorecen e incrementan la incidencia de enfermedades causadas por hongos, entre ellos la moniliasis. Las condiciones de alta humedad ambiental y temperatura favorecen el desarrollo del hongo que afecta varios órganos y puede llegar a producir la muerte de planta (Phillips, 2012).

Los síntomas externos aparecen después de 40 a 80 días de infección con pequeñas manchas oscuras en la superficie de las mazorcas; es decir que las mazorcas infectadas son asintomáticas (sin lesiones visibles) en las primeras etapas de la infección (Amores, 2013).

1.1.2. Formulación del problema

La presente investigación pretende desarrollar un método eficiente para la extracción de proteínas totales de cacao (*Theobroma cacao L.*) para su empleo en análisis proteómico. Las proteínas aisladas serán la base para estudios relacionados con la resistencia/susceptibilidad de plantas de cacao a Moniliasis.

1.1.3. Sistematización del problema

¿Cuáles son los métodos de extracción de proteínas en plantas que puedan adaptarse a tejidos recalcitrantes de cacao?

¿Qué mejoras deben realizarse a métodos convencionales descritos para la optimización de una nueva metodología que permita aislar proteínas de cacao de alta calidad?

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo General

Optimizar un método eficiente para la extracción de proteínas de cacao (*Theobroma cacao L.*) para su empleo en análisis proteómico.

1.2.2. Objetivos Específicos

- Desarrollar un método para la extracción de proteínas totales de cacao.
- Cuantificar y analizar la pureza de proteínas mediante comparación electroforética en geles
- Analizar el perfil proteómico mediante electroforesis en geles SDS-PAGE (Electroforesis en geles de poliacrilamida).

1.3. Justificación

La monilla ataca a las mazorcas de cacao en cualquier estado de su desarrollo, produciendo diferentes síntomas. En mazorcas menores de dos meses el síntoma más frecuente es la formación de “jorobas”, en frutos de entre dos y cuatro meses. El síntoma está determinado por la presencia de puntos verdes-oscuros, y en mazorcas mayores de cuatro meses se

presentan puntos aceitosos (Durán, 2010). Los síntomas típicos se presentan únicamente en aquellas porciones de tejidos donde el hongo alcanza desarrollo adulto, lo que sugiere presencia de alteraciones fisiológicas en los tejidos como consecuencia de la actividad patogénica del organismo (Suárez, 1971).

El desarrollo de los síntomas primarios da lugar a manchas de color café oscuro, sobre las cuales aparece posteriormente el micelio del hongo, el cual adquiere una tonalidad crema cuando aparecen sobre él las conidias; las cuales al ser diseminadas por el viento, el agua o el hombre, infectan nuevas mazorcas. Todas las mazorcas infectadas antes de los cien días de edad presentan pérdida total de almendras (Durán, 2010).

La moniliasis ataca únicamente a los frutos del cacao. Sin embargo, su efecto es con frecuencia tan severo que se considera que la enfermedad sea uno de los factores limitantes de mayor importancia en la producción de esta planta. En estudios previos, se ha informado pérdidas de producción en el Ecuador que alcanzan hasta el 80%. Su efecto dañino en la producción, es por tanto, comparable al de la mazorca negra. El hecho de que en Ecuador la monilla sea una de las enfermedades más severas del cacao, sugiere el desarrollo de investigaciones que apunten a la identificación de nuevos genes o proteínas relacionadas con la resistencia-susceptibilidad a esta enfermedad (Morante, 2014).

La optimización de un método de extracción y purificación de proteínas de cacao de alta calidad permitirá descubrir, el descubrimiento de genes y proteínas relacionadas con la resistencia/susceptibilidad a monilla y su mapeado en el ya secuenciado genoma del cacao (Argout, y otros, 2011). Estos estudios servirán para correlacionarlos con marcadores moleculares actualmente conocidos (Loor, y otros, 2012), así como con aquellos que se vayan desarrollando en el futuro, y de esta manera potenciar el desarrollo de programas de mejora de la resistencia del cultivo a la moniliasis en Ecuador. Al mismo tiempo, permitirá garantizar la producción de nuevos conocimientos mediante la aplicación de tecnologías de vanguardia que permitan generar soluciones a los problemas agrícolas de la región y el país.

La presente investigación está orientada a desplegar un método eficiente para la extracción de proteínas totales de Cacao (*Theobroma cacao* L.) y su empleo a futuro en análisis proteómico para la búsqueda de proteínas y genes correspondido con la

resistencia/susceptibilidad de plantas de cacao a Moniliasis, enfermedad que se conoce también con el nombre de monilla, pudrición acuosa, helada, mancha ceniza o enfermedad de Quevedo, causada por el hongo *Moniliophthora roreri* (Wang, y otros, 2009).

CAPÍTULO II

FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN

2.1. Marco conceptual

2.1.1. Cultivo de cacao

El cacao (*Theobroma cacao* L.) es una planta originaria de los trópicos húmedos de América, su centro de origen se cree estar situado en el noroeste de América del sur, en la zona amazónica (Enríquez, 1987). Este cultivo es de importancia relevante en la economía del Ecuador, por ser un producto de exportación y que constituye una fuente de empleo para un alto porcentaje de habitantes de los sectores rurales y urbano (Quiróz, 2006).

En el Ecuador existe un tipo de cacao fino de aroma único en el mundo, denominado como “Nacional”, que por muchos años se lo ha considerado como un tipo de cacao Forastero, debido a la morfología de la mazorca, aunque en la actualidad se cree que este tipo de cacao se encuentra en el país desde antes de la conquista española (Enríquez, 2004).

Se conoce que el cacao se divide genéticamente en tres grandes grupos: criollos, forasteros y trinitarios. Los criollos actualmente hay muy pocos árboles, sin embargo estos dominaron el mercado a mediados del siglo XVIII. El grupo de los forasteros, presenta un amplio grupo de variedades cultivadas ya sean silvestres o semi-silvestres, de las cuales, la variedad amelonada es la más cultivada; este grupo incluye variedades como: Amelonado en África Occidental, Común en Brasil, el cacao arriba o cacao nacional del Ecuador y el Matina o Cylán de México y Costa Rica. El grupo trinitario es una variedad resultado de una mezcla entre Criollos y Forasteros, cultivado inicialmente en Trinidad y esparcido a Venezuela hasta llegar a Ecuador, Samoa, Sri Lanka, Papúa, Camerún y Nueva Guinea (PROECUADOR, 2013).

2.1.2. Proteómica

El término proteóma fue acuñado en 1994 para definir a todas las proteínas que son expresadas por un genoma en un tejido o en una célula. El proteóma de un organismo es un elemento altamente dinámico, ya que sus componentes varían dependiendo del tejido, célula o compartimiento celular que se estudie y estos, a su vez, pueden cambiar debido a alteraciones en su ambiente, como situaciones de estrés, acción de fármacos, requerimientos energéticos, o su estado fisiológico (normal o patológico). El crecimiento en el número de proyectos de investigación orientados al estudio de los genomas de forma

sistemática, ha dado lugar a la aparición de nuevas tecnologías a gran escala (tipo “high throughput”) que, en el caso de las proteínas, se denomina Proteómica. Esta puede dividirse en proteómica de expresión, que tiene como objetivo la descripción del proteoma total de un tejido, fluido, tipo celular u organelo y las mediciones cuantitativas de los niveles de expresión proteínica, y proteómica funcional, que se encarga del estudio de la función de proteínas dentro de sistemas biológicos (relaciona cambios de expresión con una función determinada) y la regulación de su expresión, incluyendo las interacciones proteínas-proteína, proteínas-ADN, proteínas-ARN y las modificaciones post-traduccionales (Pando & Ferreira, 2007).

2.1.3. Electroforesis en poliacrilamida

Las proteínas del extracto se separan mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE). En primer lugar, las proteínas, se revisten con carga negativa, mediante la acción del detergente Do-decilsulfato Sódico (SDS), así las proteínas, se pueden separar en el gel según su tamaño (SDS-PAGE) (Towbin, Staehelin, & Gordon, 1979).

2.1.4. Gel de electroforesis

Si se requieren condiciones naturales para que el anticuerpo pueda detectar el epítipo, en la electroforesis no se añadirá SDS ni en el gel ni en el tampón de electroforesis. En esta situación, también conocida como PAGE nativo, las proteínas mantienen su estructura tridimensional y la migración en el gel depende de su masa: relación de carga de la proteína por encima de su tamaño. Sin embargo, la mayoría de ensayos Western-Blot, se realizan en geles de poliacrilamida conteniendo SDS (SDS-PAGE) en condiciones desnaturizantes. Bajo estas condiciones desnaturizantes y de reducción, las proteínas cargadas negativamente, cuando se someten a un campo eléctrico, migran al electrodo positivo. Debido a que el SDS iguala la carga en todas las proteínas, la tasa de migración viene determinada por su peso molecular. Las moléculas más pequeñas migran más rápidamente que aquellas con pesos moleculares mayores (Towbin, Staehelin, & Gordon, 1979).

2.2.Marco referencial

2.2.1. Características del cultivo de cacao

Enriquez (1987), señala que el cultivo de cacao cuyo nombre científico es *Theobroma cacao*, es originario de las selvas de Suramérica y América Central, *Theobroma* en griego significa “comida de los dioses”.

Dependiendo de las condiciones agroclimáticas así como de la variedad, el cultivo tarda de cuatro a cinco años para producir frutos, mientras que para alcanzar su máxima producción demora entre ocho a diez (PROECUADOR, 2013).

El cacao es una fruta de origen tropical. Dependiendo del tipo de cacao pueden ser de color amarillo, blanco, verde o rojo. El grano está cubierto de una pulpa rica en azúcar con la que se puede hacer jugo y el grano transformado en chocolate tiene un agradable sabor (PROECUADOR, 2013).

El cacao fue domesticado hace más de 2000 años por poblaciones mesoamericanas, quienes cultivaron una variedad de cacao de alta calidad aromática denominado Criollo, probablemente originario de la parte norte de Suramérica (Motamayor, y otros, 2002).

Después de la colonización de los españoles, para satisfacer el incremento de la demanda europea, la producción de la variedad Criollo se dispersó por Suramérica y regiones del Caribe (Marcano, y otros, 2007).

Actualmente el cultivo de cacao se extiende desde el sur de México hasta Brasil y Bolivia, en América, aunque también se produce en el Caribe, África, Asia y Oceanía. A pesar de que su centro de origen es América, al presente África es el continente donde más se produce cacao; siendo Costa de Marfil y Ghana los países más productores (FAO, 2004).

2.2.2. Morfología y taxonomía

El cacao pertenece al Orden Malvales, a la familia esterculiácea, al género *Theobroma* y la especie cacao (Solís, 2009).

2.2.2.1. Planta

Presenta un tamaño mediano de 5 a 8 metros, sin embargo puede alcanzar una altura de 20 m en condiciones de intenso sombreado, de tal manera que mientras menor es la luminosidad mayor es la altura y viceversa, la corona redondeada, densa, de 7 a 9 metros de diámetro, el tronco es recto y de forma variada, dependiendo de las condiciones ambientales (Batista, 2013).

2.2.2.2. Sistema radicular

En plantas reproducidas por semillas el sistema radicular está compuesto por una raíz principal denominada raíz pivotante o raíz primaria, la cual crece hacia abajo de forma recta. A partir de la raíz pivotante, inmediatamente debajo del cuello, se desarrollan la mayoría de las raíces secundarias a unos 15 a 20 cm de profundidad en la porción superior de la capa de humus. Éstas se extienden en forma horizontal a 5 y 6 metros del tronco del árbol, con raíces laterales que se dividen repetidamente. Las raíces secundarias que se encuentran en la parte inferior de la raíz pivotante, tienen un crecimiento hacia abajo en dirección a la roca madre o hacia la capa freática (Batista, 2013).

Las plantas que son reproducidas por medios vegetativos oasexuales no desarrollan raíz pivotante, pero sí raíces primarias y secundarias, de crecimiento horizontal, según se describe en el párrafo anterior. La forma y desarrollo de las raíces del cacao dependen principalmente de la textura, estructura y consistencia del suelo así como del modo de reproducción. En suelos profundos bien aireados su crecimiento puede alcanzar hasta 2 metros de profundidad; en suelos pedregosos su crecimiento es tortuoso. Cuando el suelo es de una estructura granular uniforme y detextura arcillosa, la raíz crece erecta o derecha (Batista, 2013).

2.2.2.3. Hojas

Presenta hojas enteras de coloración verde variable y de peciolo corto (ANACAFÉ, 2004).

2.2.2.4. Flores

Desde el punto de vista botánico, la inflorescencia del cacao es una cima decasiforme, la cual se forma directamente en la madera más vieja del tronco y de las ramas adultas del árbol y, de manera muy específica, en la base de una hoja, alrededor de la cicatriz y de la

yema axilar que queda al caer la hoja. La inflorescencia, en su proceso de formación y crecimiento, se transforma en una masa densa que conforme se desarrolla forma un cojín que agrupa entre 40 a 60 flores. Existe una marcada diferencia en el número de flores presentes en diferentes cojines de diferentes árboles, lo cual obedece a caracteres genéticos (Batista, 2013).

2.2.2.5. Fruto

Los frutos, dependiendo de la variedad, presentan una coloración amarilla, blanca, verde o roja, que oscurecen al madurar, son leñosos de forma alargada, que crecen debajo de las ramas así como sobre la copa de los árboles; pueden llegar a medir entre 10 a 32 cm de largo y 7 a 10 cm de diámetro, de peso aproximado de 0,2 a 1 Kg, que en su interior puede contener de 20 a 60 semillas (Solís, 2009).

2.2.2.6. Semillas

El cacao posee semillas de forma plana alargada o redondeada, de pulpa gelatinosa y azucarada, cuando los frutos alcanzan su madurez fisiológica, se corta y se extraen las semillas para luego fermentarlas retirando la baba para posteriormente secar el grano. La coloración interna del grano es marrón oscura y de agradable sabor (PROECUADOR, 2013).

2.2.3. Exigencias en clima y suelo

2.2.3.1. Agua

El cultivo de cacao presenta sensibilidad a periodos secos, pero el exceso de agua también afecta al desarrollo de las plantas provocando asfixia en las raíces y la muerte en poco tiempo, por lo cual los suelos óptimos para este cultivo son aquellos con buen drenaje. El rango de precipitación es de 1500 a 2500 en zonas bajas cálidas y de 1200 a 1500 mm en áreas frescas y valles altos (ANACAFÉ, 2004).

2.2.3.2. Viento

El viento tiene un efecto notable en el cultivo, cuando los vientos son constantes pueden llegar afectar a las hojas, provocando desecamiento, caída y muerte de las hojas, por lo tanto es recomendable la colocación de cortavientos o de barreras vivas colocando

diferentes especies ya sean madereras o frutales alrededor de la huerta a fin de disminuir los daños causados por el viento (Álvarez, 2010).

2.2.3.3. Sombreamiento

El cultivo de cacao deberá poseer una sombra de aproximadamente el 50% durante los primeros cuatro años de edad, se identifican dos tipos de sombras: temporal y permanente (Álvarez, 2010).

Sombra temporal o transitoria: Es aquella que proporciona sombra en el inicio del establecimiento de un cacaotal por un corto tiempo (3 años) y sirve para proteger a las plantas jóvenes del exceso de luminosidad que afecta a los tejidos en crecimiento, también sirve como fuente de ingresos al productor, para solventar costos de mantenimiento del cultivo. Las especies más recomendadas son: plátano, banano, papaya e higuera (Wil, 2013).

Sombra permanente es aquella destinada a proporcionar la sombra definitiva al cacao, tiene como propiedad regular factores como: temperatura, humedad y luminosidad. Es decir, protege a las plantas de cacao contra la acción directa de los rayos solares y los vientos fuertes, aportan con materia orgánica y mantienen la humedad de los suelos. Las especies recomendadas son árboles de la familia de las leguminosas, entre las que tenemos: guabo de bejuco machete y mico, guachapelí, palo prieto que se recomienda para zonas inundables, e higuera para zonas, más secas (Wil, 2013).

2.2.4. Importancia económica y alimenticia

Su importancia económica radica en que el cacao, en el 2010, fue el quinto producto más exportado por el Ecuador, dentro de las exportaciones no petroleras, después del banano, pescados, crustáceos, preparaciones de carne y flores.

Del total de cacao en grano, el 90% es de tipo nacional y el 10% restante es CCN51, aunque en los últimos años la aparición de esta nueva variedad en las exportaciones ha ido en ascenso, con el 3% (2300 TM) en el 2004, hasta 37500 TM que simboliza al 23% en el año 2011, infiriéndose que al menos hay sembradas actualmente en el país una 40000 Ha, de cacao CCN51, asumiendo un rendimiento promedio de 1TM/Ha, comprensivamente sin considerar aquel volumen que se exporta como semielaborados (Manteca, licor, polvo,

etc.). Dicho comportamiento se mantiene casi con los mismos porcentajes cuando se analiza el valor monetario de las exportaciones tanto del cacao tipo nacional como el CCN51 (Revista_ElAgro, 2013)

De las semillas de cacao se pueden obtener varios productos como el cacao en grano tostado, además de los cuatro productos intermedios como el licor de cacao, manteca de cacao, pasta de cacao y cacao en polvo, y el chocolate como producto terminado. El mercado que absorbe la producción de cacao a nivel mundial es la industria chocolatera, sin dejar atrás el uso de productos como: el polvo y la manteca de cacao.

Dentro de los productos semielaborados del cacao se destacan los siguientes: El licor de cacao: es una pasta fluida que se obtiene del cacao a partir de un proceso de molienda. Se utiliza como materia prima en la producción de chocolates y de algunas bebidas alcohólicas. Al someterse al proceso de prensado, puede convertirse en:

- **Manteca:** Es la materia grasa del cacao. Se conoce también como aceite de *theobroma*. Es usada en la producción de cosméticos y farmacéuticos.
- **Torta:** Es la fase sólida del licor de cacao. Se utiliza en la elaboración de chocolates.
- **Polvo:** La torta puede ser pulverizada y convertirse en polvo de cacao. El cacao en polvo se usa básicamente para dar sabor a galletas, helados, bebidas y tortas. Así mismo, se emplea en la producción de coberturas para confitería y en postres congelados. El cacao en polvo se consume en la industria de bebidas, por ejemplo en la preparación de batidos de chocolate.

Los productos derivados de un proceso de industrialización o elaboración artesanal del cacao en grano se los considera elaborados del cacao. Por lo general, se refiere al chocolate, que puede ser: barras, tabletas, bombones, coberturas, blanco, en polvo, relleno, y un sinnúmero de manufacturas más, obtenidos a partir de mezclas con otros productos o frutos secos¹². Además de los usos tradicionales en la producción de chocolate y confitería, helados, sorbetes, la manteca de cacao se utiliza también en la producción de tabaco, jabón y cosméticos (AECACAO, 2015).

2.2.5. Enfermedades del cacao

2.2.5.1. Moniliasis

Moniliophthora roreri es un organismo del dominio Eukaryota, reino Fungi, filum Basidiomycota, clase Basidiomycetes, subclase Agaricomycetidae, orden Agaricales, familia Tricholomataceae, género *Moniliophthora* y especie *M. roreri*.

Es un hongo que causa la enfermedad que se conoce con los nombres de moniliasis o monilla, que afecta la mazorca en el cultivo de cacao (*Theobroma cacao*), con pérdidas hasta del 60% de la cosecha. Infecta exclusivamente a frutos jóvenes de cacao y de otras especies afines y destruye las semillas que son el producto comercial (Krauss, y otros, 2003).

Su rápida diseminación y los graves daños que ha causado en once países tropicales han incrementado la preocupación por su diseminación a otros continentes. A pesar de su importancia, hasta hace pocos años se ignoraban aspectos básicos del hongo como su sitio de origen, el nivel de distribución de la diversidad genética, la taxonomía, la forma de reproducción, entre otros, los cuales son clave para reforzar los controles cuarentenarios, dentro y entre países, para diseñar estrategias de combate más efectivas y duraderas y para afinar la búsqueda de nuevas fuentes de resistencia y organismos antagonistas para biocontrol (Philips, 2007).

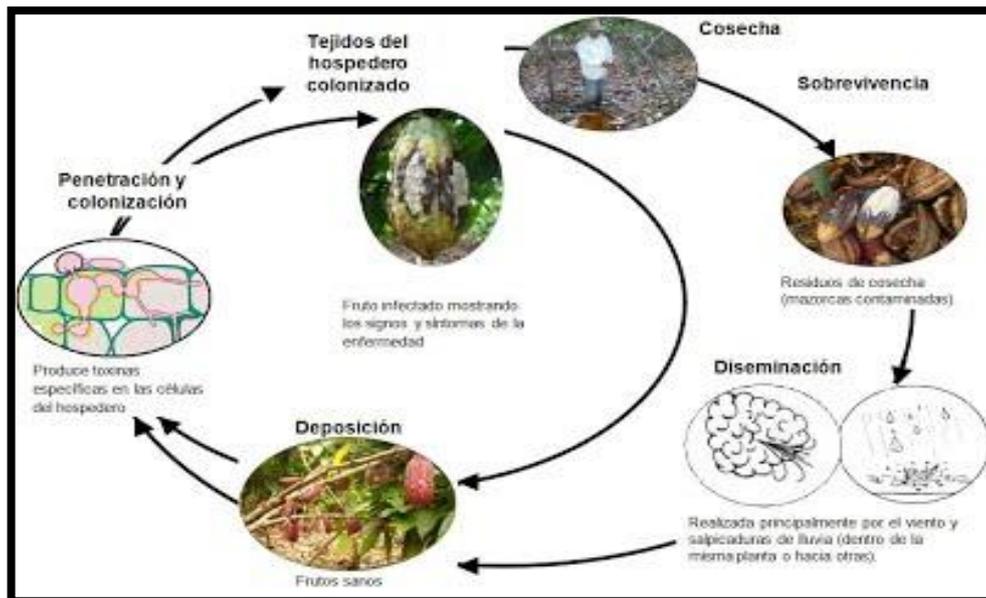


Figura 1: Ciclo de la moniliasis causada por *Moniliophthora roreri* en cacao.

2.2.5.2. Mazorca negra

Causada por *Phytophthora palmivora* y en algunos países de la región también por *P. Capcisi*. Esta enfermedad ataca varias partes de la planta pero los daños más importantes se dan en los frutos, particularmente en los cercanos a la madurez. Produce una mancha café de borde regular y de crecimiento rápido que llega a cubrir al fruto en pocos días. Internamente, causa una pudrición café (Philips, 2007).

2.2.5.3. Roselinia (*Rosellinia pepo*)

El principal daño de esta enfermedad se produce en el sistema radicular y la base del tallo, produciendo que el follaje se ponga amarillento, se seque y caiga progresivamente. Posteriormente se produce el secado de ramas, que termina en la muerte de la planta. Esta enfermedad se presenta en parches que avanzan rápidamente, matando las plantas de cacao y algunas otras especies usadas como sombra o como cultivos asociados al cacao (Philips, 2007).

2.2.5.4. Ceratocystis o mal de machete (*Ceratocystis cacaofunesta*)

El hongo crece en los tejidos conductores internos del tronco y ramas, provocando obstrucción en el paso de nutrientes y agua; en consecuencia produce la marchites y posteriormente la muerte de la planta. Esta enfermedad se puede presentar de forma esporádica y dispersa en la huerta, sin embargo puede convertirse en una problemática grave cuando el material sembrado es muy uniforme genéticamente o no está injertado sobre patrones resistentes a enfermedades del suelo (Philips, 2007).

2.2.5.5. Antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*)

Esta enfermedad ataca los brotes tiernos, las hojas y los tallos más expuestos al sol, particularmente los que se encuentran en la copa del árbol, disminuyendo el desarrollo y la producción de las plantas. Causa lesiones secas con borde amarillo que normalmente avanzan del borde hacia adentro de las hojas hasta dañarlas completamente, tras lo cual las hojas se caen dejando las ramas desnudas. Esto estimula la emisión de nuevas ramas que también son infectadas, dando finalmente la apariencia de pequeñas escobas (Philips, 2007).

En el vivero causa lesiones similares y defoliación, así como lesiones hundidas en el tallo. Los daños en mazorcas no son económicamente importantes y se distinguen por la aparición de lesiones de color café hundidas en mazorcas de distintas edades. Sobre las lesiones aparece un micelio blanco que se vuelve rosado al producirse las esporas del hongo. Las mazorcas enfermas se ennegrecen y mueren (Philips, 2007).

2.2.6. Análisis proteínico

El proteoma está formado con todas las proteínas que se expresan a partir del genoma de un organismo (Wilkins, y otros, 1996). La diferencia entre el número de genes y el número de proteínas se debe a que los genes no expresan necesariamente una sola proteína; se sabe que por procesamiento alternativo de los transcritos de ARNm (maduración y empalme alternativo) se pueden generar diversas proteínas a partir de un gen único. De modo adicional, las proteínas presentan más de 300 tipos de modificaciones postraduccionales, incluidas fosforilación, glucosilación, acetilación, desaminación, miristilación, etc (ABRF, 2009).

La proteómica es una rama de la genómica que estudia los proteomas, es decir, la identificación de las proteínas, el conocimiento de su estructura primaria (secuencia de a-a), la identificación de sus modificaciones postraduccionales, su localización y la cuantificación de la expresión proteica (proteómica cuantitativa) (Hanash, 2003).

Existen tres ramas en la proteómica que tratan de caracterizar el proteoma estudiando distintos aspectos del mismo:

- La proteómica de expresión se encarga del estudio de la abundancia relativa de las proteínas y de sus modificaciones postranscripcionales
- La proteómica estructural se encarga de la caracterización de la estructura tridimensional de las proteínas
- La proteómica funcional se encarga de la localización y distribución subcelular de proteínas y de las interacciones que se producen entre las proteínas y otras moléculas con el fin de determinar su función

La proteómica permite identificar, categorizar y clasificar las proteínas con respecto a su función y a las interacciones que establecen entre ellas. De este modo, se pueden

caracterizar las redes funcionales que establecen las proteínas y su dinámica durante procesos fisiológicos y patológicos.

2.2.7. Extracción de proteínas

Las proteínas son las moléculas orgánicas más exuberantes en la célula, que constituyen más del 50% del peso seco de la célula. Cada tipo celular, tiene un rol específico explícito por su composición proteica. Con la posibilidad de que 20 (o 22) aminoácidos diferentes puedan estar unidos en cualquier orden para conformar polipéptidos de cientos de aminoácidos, tienen el extraordinario potencial de originar una gran cantidad de variantes en su conformación. Esta variedad genera funciones tan refinadas como las enzimas que están involucradas en el metabolismo celular. Una bacteria puede tener cerca de 1000 proteínas diferentes, en una célula humana puede haber más de 10.000 clases de proteínas distintas (Lomas, 2008).

La expresión de proteínas puede expresarse por ejemplo, mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida. Para esto, es preciso extraer primero las proteínas a partir de las células que constituyen los tejidos u órganos (Lomas, 2008).

Al momento de elegir el protocolo a seguir para lograr el extracto crudo, es importante tener en cuenta tanto el material de partida como su posterior utilización:

Material biológico de partida-tipo de organismo: En el caso de órganos u otros tejidos animales, es necesario disgregarlos antes de proceder a la lisis celular, ya que las células se hallan rodeadas de tejido conectivo. En general estas técnicas involucran la utilización de enzimas (como por ejemplo colagenasa) y/o una ruptura mecánica grosera. Para esto pueden utilizarse morteros, homogeneizadores eléctricos, tijeras o tamices metálicos (mesh), entre otros (Lomas, 2008).

Cuando el material es un cultivo celular, la extracción puede ejecutarse adicionando un detergente, realizando un shock osmótico, o por sonicación (Lomas, 2008).

Finalidad del extracto proteico: esto establecerá el buffer de extracción que se utilizará dependiendo si desea o no que las proteínas almacenen su actividad biológica, su conformación nativa, su interacción con otras proteínas u otras moléculas. Algunos protocolos son tan violentos que involucran la ruptura de todas las membranas; otros en

cambio permiten fraccionar y obtener, distintos componentes sub-celulares (núcleos, mitocondrias, etc) (Lomas, 2008).

La extracción de proteína empieza por la ruptura celular o lisis, los métodos más utilizados se establecen en la homogenización del tejido y la destrucción de los límites celulares.

Luego de la lisis, suelen emplear sucesivos pasos de separación y purificación de los componentes celulares. Como primera medida, puede realizarse una centrifugación diferencial para obtener fracciones sub-celulares o para aislar organelas específicas. En este caso, las proteínas asociadas a membrana quedarán en el pellet (precipitado que queda en el fondo del tubo luego de una centrifugación) y las solubles en el sobrenadante (Lomas, 2008).

En general, el extracto obtenido es sometido a tratamientos que separan las proteínas en diferentes fracciones basados en algunas propiedades tales como tamaño o carga, proceso denominado *fraccionamiento*. Las primeras fases en este proceso suelen utilizar diferencias en la solubilidad de las proteínas (Lomas, 2008).

Existen diversos factores que afectan esta solubilidad; en particular, la composición en aminoácidos (una proteína rica en aminoácidos polares es en general más soluble que una rica en aminoácidos hidrofóbicos); la estructura tridimensional (las proteínas fibrosas son en general menos solubles que las globulares) y el entorno de la propia proteína. Respecto a las condiciones del entorno de las proteínas, los principales factores que pueden afectar su solubilidad son la temperatura; la constante dieléctrica del medio; el pH del mismo; y la fuerza iónica (Lomas, 2008).

2.2.8. Electroforesis de proteínas

En el proceso de la electroforesis se ejecuta la separación de las proteínas a analizar, de acuerdo a su peso molecular. Dicha repartición dependerá de la concentración del gel de resolución con el que se esté trabajando (Yábar, 2003).

Sumergir el sistema conteniendo los geles polimerizados en un tanque conteniendo buffer de electroforesis o de resolución para proteínas 1X. Dicho tanque lleva dos electrodos: uno positivo y otro negativo (frecuentemente representados por colores rojo y negro, respectivamente) que serán conectados a una fuente poder. Al momento de empapar los

geles en el tanque, asegurarse que los pocillos del gel estén totalmente cubiertos por el buffer (Yábar, 2003).

Mediante el uso de puntas se procede a colocar cuidadosamente la muestra en los pocillos evitando la contaminación del pocillo contiguo. Considerar el uso de un marcador estándar de proteínas para la medición del peso molecular de la muestra.

Una vez finalizada la colocación de las proteínas en cada pocito del gel, se cubre el tanque con la tapa y se conectan los cables correspondientes de los electrodos en la fuente de poder. Se enciende la fuente de poder y se procede a seleccionar el voltaje y amperaje correspondientes (Yábar, 2003).

Para el cálculo del voltaje es importante conocer la distancia en centímetros del gel desde la parte superior hasta la parte inferior de la matriz. La distancia multiplicada por voltios (8V - 15 V) permitirá determinar el voltaje total. El voltaje óptimo dependerá de la naturaleza de la proteína que se piensa separar (Yábar, 2003).

El valor del amperaje o corriente eléctrica (medida en amperios o miliamperios) dependerá de la fuerza iónica del buffer. En el caso de trabajar con buffer Tris-Glicina 1X, el valor recomendado es de 25 a 30 miliamperios (Yábar, 2003).

Realizar la electroforesis hasta que el frente de corrida (visualizado como una línea azul por el colorante del buffer) haya llegado a los límites de la parte inferior del gel. Cumplida la electroforesis se procede al desmontaje del equipo empezando con desconectar los electrodos de la fuente de poder ya apagada y se mueve el sistema que contiene el gel de poliacrilamida (Yábar, 2003).

Levantar lentamente uno de los espaciadores de tal manera que se vaya ejecutando la separación de los vidrios que contienen el gel. Separar el gel de empacamiento del gel de resolución realizando un corte transversal. Hacer una pequeña muesca en una de las esquinas del gel, a fin de que sirva de orientación para ubicar el orden en que fueron cargadas las muestras (Yábar, 2003).

Remover el gel. Para realizar este proceso se pretende de mucho cuidado pues el gel es muy frágil y puede romperse con facilidad especialmente cuando se seca o es de baja concentración. Para desprender el gel del vidrio remojarlo nuevamente con buffer de electroforesis o agua destilada y usar uno de los espaciadores a manera de espátula para

levantarlo por una de las puntas. Coger el gel cuidadosamente (usar guantes) y luego sumergirlo en un envase conteniendo el colorante azul brillante de coomasie (Fig. 2) (Yábar, 2003).

El buffer de electroforesis puede ser devuelto a su frasco original para su posterior uso, pudiendo ser reconsiderado hasta cinco veces, después de los cuales se deberá preparar una nueva solución dado que puede afectar el tiempo de corrida de la prueba.

Los vidrios, los espaciadores y el tanque deberán ser lavados con abundante agua y detergentes especiales que puedan ser fácilmente removidos. Posteriormente, enjuagarlos con agua destilada y secarlos a temperatura ambiente o en una estufa a 37°C (Yábar, 2003).

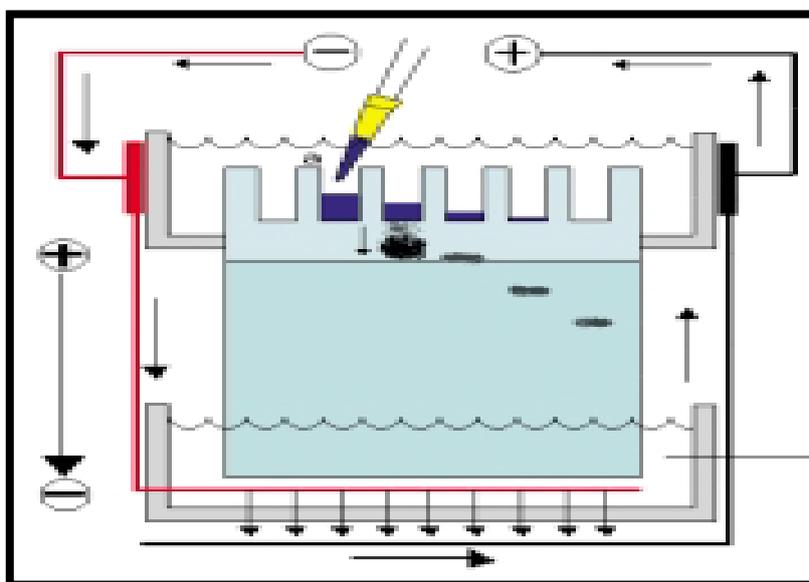


Figura 2: Interior de una cámara de electroforesis vertical en operación: Durante la colocación de la muestra en el pocillo del gel, Después de aplicar un voltaje determinado el cual genera el empacamiento uniforme de las proteínas, las proteínas migran hacia el ánodo y se distribuyen en el gel a manera de bandas.

2.2.9. Resistencia a enfermedades en las plantas

La FAO (1986), estima que en América Latina y el Caribe la incidencia combinada de plagas y enfermedades reduce la productividad de los cultivos a nivel de campo en un 30%.

En los trópicos, la afectación por las enfermedades es mucho mayor que en las zonas templadas (10-15 veces más). Esto se debe en gran parte de la destreza que tienen los parásitos, en estas zonas de crecer, perpetuarse y modificarse, sin interrupciones durante todo el año (por falta de los períodos de bajas temperaturas, por la constante presencia de hospederas primarios o colaterales, donde sobrevivir), por reducido trabajo profundo (arado) de los suelos y la disminución de práctica de rotación de cultivos (Malaguti, 1997).

Se define como resistencia el atributo genéticamente regulado en la planta que le permite restringir el crecimiento y/o la reproducción del patógeno en ella y, consecuentemente, el desarrollo de la enfermedad que ésta le puede ocasionar.

La resistencia a las enfermedades de las plantas puede estudiarse desde toda una diversidad de aspectos, tales como:

- Su especificidad
- Su expresión o fenotipo
- La forma en que está regulada genéticamente
- Su interacción con las variantes patogénicas del patógeno
- Sus efectos epidemiológicos
- Su estabilidad cuando se utiliza agrícolamente
- Las estrategias de utilización agrícola que optimizan sus efectos y estabilidad
- Los mecanismos o factores mediante los cuales tiene lugar (Jiménez,1992).

2.2.10. Enfermedades en plantas

Los agentes que causan enfermedades en las plantas se caracterizan por ser infecciosos (bióticos o vivos) y no infecciosos (abióticos o no vivos). Los agentes infecciosos incluyen las bacterias, hongos, micoplasmas, nematodos y virus. Los agentes no infecciosos incluyen, desbalances nutricionales, estrés ambiental y toxicidad química (causada por plaguicidas y contaminantes del aire (Almodóvar, 1996).

Los agentes patógenos más comunes en las plantas son los hongos, aunque las bacterias y los nematodos también son importantes. Las enfermedades causadas por micoplasmas y virus no se registran a menudo, mayormente porque son muy difíciles de detectar (Almodóvar, 1996).

Hay muchos factores que influyen el desarrollo de enfermedades. Sin embargo, las enfermedades no pueden ocurrir a menos que estén presentes los siguientes elementos: una planta susceptible, un patógeno y un ambiente favorable (Almodóvar, 1996).

Algunas enfermedades no ocurren si no hay un vector que las transmita, lo que es común en las enfermedades causadas por virus, las cuales pueden transmitirse por insectos o nematodos (Almodóvar, 1996).

El diagnóstico de enfermedades no puede hacerse basándose solamente en los síntomas, aunque pueden hacerse algunas generalizaciones. Los síntomas causados por agentes infecciosos (hongos, bacterias, virus, nematodos) y no infecciosos (deficiencias nutricionales, toxicidades, exceso o escasez de agua, contaminantes ambientales, acidez o alcalinidad del suelo) son similares. Un diagnóstico preciso solo puede hacerse luego de evaluar la planta afectada por observación directa o cultivar los patógenos en medios específicos (Almodóvar, 1996).

2.2.11. SDS-PAGE Determinación de pesos moleculares

La separación de los complejos SDS-proteína es proporcional sólo a la masa de la proteína pues todas tienen la misma carga por unidad de masa (fig.3).

Se puede determinar el peso molecular aparente de cualquier proteína por comparación con un patrón de proteínas de pesos moleculares conocidos (UNIZAR, 2011)

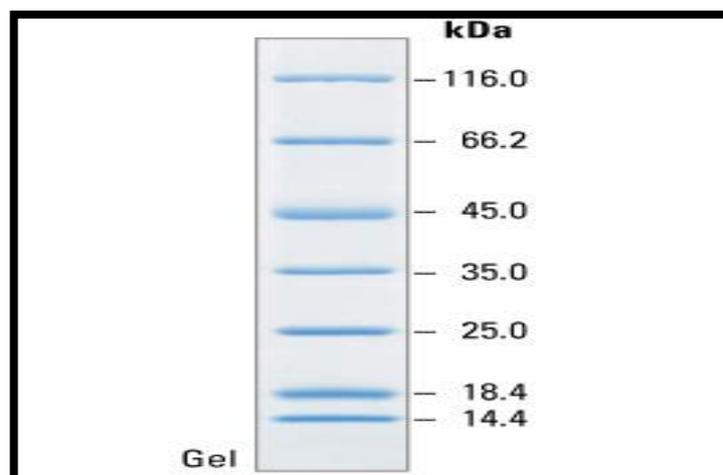


Figura 3. Perfiles de bandas del marcador molecular no teñido en SDS-PAGE

CAPÍTULO III

MÉTODOLÓGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

3.1. Localización

La investigación se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo (UTEQ), ubicado en el Campus Universitario “Ing. Manuel Haz Álvarez” Km 1 ½ vía Quevedo -Santo Domingo de los Tsáchilas. Las coordenadas geográficas son 01°0'43,71" de latitud Sur y 79°28'9,55" de longitud Oeste. Las muestras biológicas experimentales se recolectaron en la Finca Experimental “La Represa”, localizada en el Recinto Fayta Km. 7½ vía Quevedo – Babahoyo, cantón Quevedo, provincia de Los Ríos, cuyas coordenadas geográficas son 01°03'18" de latitud Sur y 79°25'24" de longitud Oeste.

3.2. Tipo de investigación

Se realizó una investigación de tipo experimental en la cual se evaluaron diferentes materiales vegetales, protocolos de extracción, purificación de proteínas y accesiones de *T. cacao*

3.3. Métodos de investigación

Se utilizó el método comparativo y analítico partiendo de los resultados obtenidos en cada proceso de extracción de proteínas totales con el objetivo determinar el efecto concreto de los métodos sobre las accesiones y las muestras biológicas.

3.4. Fuentes de recopilación de información

En esta investigación se recopiló información de fuentes secundarias (textos, revistas científicas, documentos y otros) con el fin de obtener datos de proteínas actualizados que permitan inferir o comparar los resultados generados en este trabajo. Además, se consultó fuentes primarias basada en la observación directa en geles de poliacrilamida.

3.5. Diseño de la investigación

Se utilizó un diseño completamente al azar con arreglo factorial de 2x2x3 en 3 repeticiones.

3.5.1. Factores

Se estudiaron tres factores:

- **Factor A:** Material Vegetal (Hojas – Mazorca)
- **Factor B:** Protocolos (Protocolo de Wang 2006 – Protocolo de Sellés 2008 – Protocolo LAB-WM)
- **Factor C:** Accesiones (Resistente L8H12 – Susceptible L15H31)

3.5.2. Tratamientos

Tabla 1. Combinación de tres factores establecidos en doce tratamientos

Tratamientos	Material Vegetal	Protocolos	Accesiones
1	Hoja	Wang <i>et al</i> 2006	Resistente L8H12
2	Hoja	Wang <i>et al</i> 2006	Susceptibles L15H31
3	Hoja	Sellés <i>et al</i> 2008	Resistente L8H12
4	Hoja	Sellés <i>et al</i> 2008	Susceptibles L15H31
5	Hoja	LAB-WM	Resistente L8H12
6	Hoja	LAB-WM	Susceptibles L15H31
7	Mazorca	Wang <i>et al</i> 2006	Resistente L8H12
8	Mazorca	Wang <i>et al</i> 2006	Susceptibles L15H31
9	Mazorca	Sellés <i>et al</i> 2008	Resistente L8H12
10	Mazorca	Sellés <i>et al</i> 2008	Susceptibles L15H31
11	Mazorca	LAB-WM	Resistente L8H12
12	Mazorca	LAB-WM	Susceptibles L15H31

3.6. Instrumentos de investigación

Los instrumentos de investigación empleados en este trabajo se basaron en procedimientos experimentales validados por electroforesis en geles de agarosa, análisis de datos mediante la aplicación de software estadísticos y registro de datos, en función del diseño experimental aplicado.

3.7. Tratamiento de los datos

El tratamiento de los datos se realizó con el análisis de varianza y se empleó la prueba de Duncan al 95 % de probabilidad para establecer la diferencia entre las medias de los factores y tratamientos. Para el análisis estadístico se utilizó el programa Infostat.

Tabla 2. Esquema del ADEVA (Análisis de varianza)

Fuentes de Variación	Grados de libertad
Material Vegetal	1
Protocolos	2
Accesiones	1
M. Vegetal*Protocolo	2
M. Vegetal*Accesiones	1
Protocolo*Accesiones	2
M. Vegetal*Protocolo*Accesiones	2
Error	24
Total	35

3.8. Recursos humanos y materiales

La presente investigación se llevó a cabo con la dirección del Dr. Fabricio Canchignia Martínez, y colaboración del Dr. Jaime Morante Carriel y Dra. Ascensión Martínez Márquez. Los gastos derivados de esta investigación se enmarcan en el proyecto “Aplicación DIGE (Difference Gel Electrophoresis) para la búsqueda de proteínas diferenciales relacionadas con la resistencia a moniliasis en cultivos de *Theobroma cacao* L. (cacao) de Ecuador”, dirigido por el Dr. Jaime Morante Carriel, Profesor de la Facultad de Ciencias Ambientales e Investigador del área de Biotecnología de la UTEQ.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Resultados

4.1.1. Consideraciones sobre Protocolos de Extracción

En base en las experiencias de investigaciones anteriores realizadas por Wang *et al* (2006), Sellés *et al* (2008) que realizaron diferentes protocolos de extracción de proteínas, los cuales fueron probados en hojas y mazorcas, siendo el protocolo establecido por Wang el que mejor se destacó obteniendo una alta cantidad de proteínas en algunos cultivos, sin embargo en el cultivo de cacao no se llega a estos resultados por lo cual se lo modificó para obtener una mayor cantidad de proteínas en este cultivo. Los resultados observados de los protocolos de extracción son los siguientes:

4.1.2. Interacción protocolos/accesiones

El protocolo de Wang modificado mostró mayor cantidad de proteínas totales para accesiones resistentes (15,8 µg) y susceptibles (15 µg), siendo estadísticamente superior a las demás interacciones.

Por otra parte, al comparar la cantidad de proteínas totales obtenida con los protocolos de Wang (no modificado) y Sellés, no se observaron diferencias estadística significativa, sin embargo, el método de Wang no modificado proporcionó un ligero incremento en la concentración de proteína en accesiones susceptibles (Fig. 4).

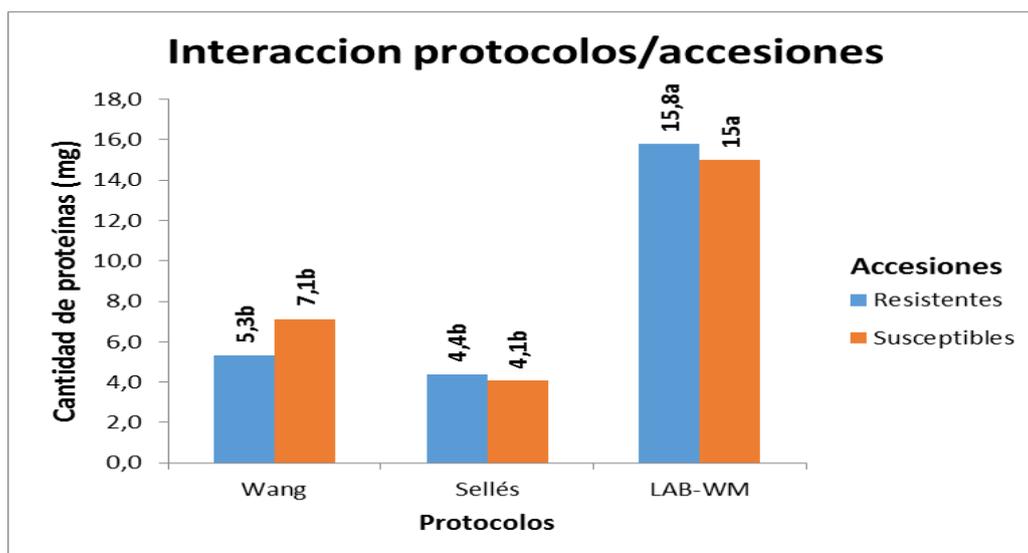


Figura 4. Cuantificación de proteínas totales de cacao en la interacción protocolos (LAB-WM, Wang y Sellés)/accesiones (resistentes y susceptibles). Laboratorio de Biotecnología, UTEQ 2015.

4.1.3. Interacciones material vegetal/accesiones

Usando mazorcas resistentes de cacao se obtuvo mayor cantidad de proteínas totales (9,6 mg), en igualdad estadística con mazorcas susceptibles (9,5 mg), hojas resistentes (8 mg) y hojas susceptibles 7,4 mg, respectivamente (Fig. 5).

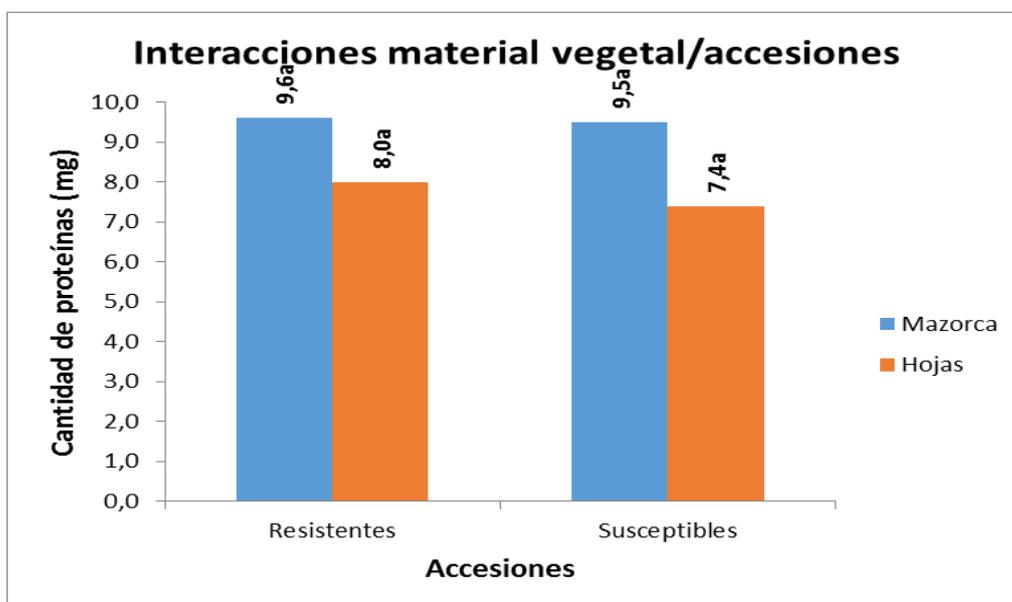


Figura 5. Cuantificación de proteínas totales de cacao en la interacción accesiones (resistentes y susceptibles)/material vegetal (mazorcas y hojas). Laboratorio de Biotecnología, UTEQ 2015.

4.1.4. Interacción protocolos/material vegetal

El protocolo de Wang modificado, presentó mayor cantidad de proteínas totales para mazorcas (16,7 mg) y hojas (14,1 mg), siendo estadísticamente superior a las demás interacciones. Por su parte, la cantidad de proteínas obtenidas con el protocolo de Sellés fue muy similar en cuanto a mazorca (4,4 mg) y hoja (4,1 mg), el cual no arrojó diferencia estadística. Sin embargo, el método de Wang no modificado fue ligeramente superior al de Sellés, alcanzando 7,5 mg de proteínas para mazorca y 4,9 mg para hojas (Fig.6).

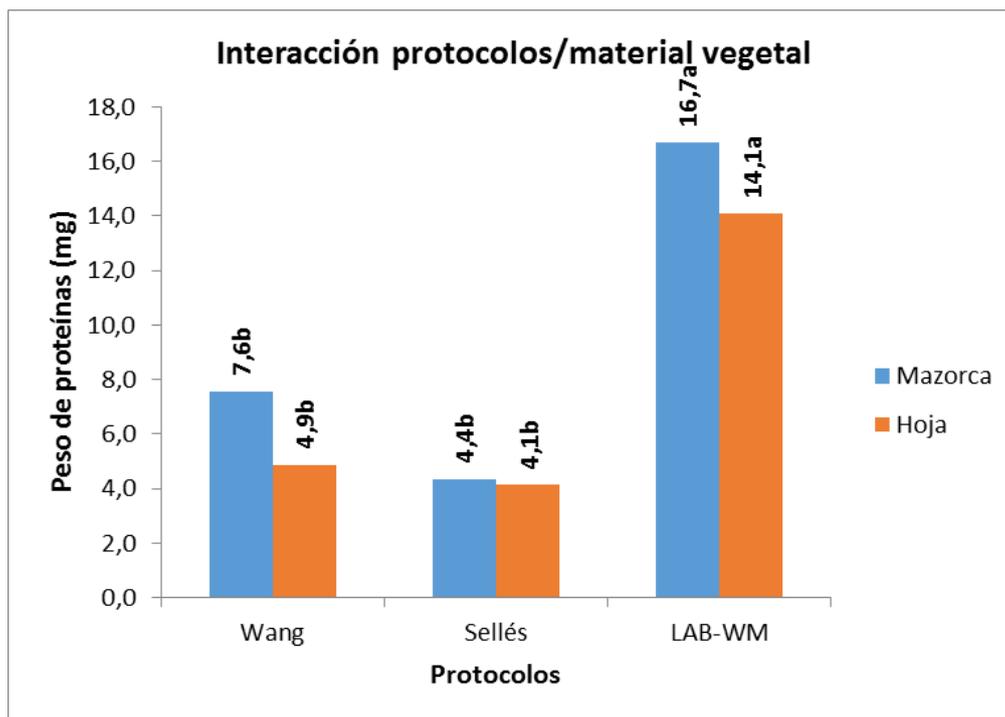


Figura 6. Cuantificación de proteínas totales de cacao en la interacción protocolos (LAB-WN, Wang y Sellés)/material vegetal (mazorcas y hojas). Laboratorio de Biotecnología, UTEQ 2015.

4.1.5. Interacción protocolos/material vegetal/accesiones

Utilizando el protocolo Wang modificado para mazorcas y hojas, se alcanzó mayor significancia estadística a diferencia del protocolo de Sellés y de Wang sin modificar. Así mismo, con el protocolo de Wang modificado se obtuvo mayor cantidad de proteínas totales en mazorcas resistentes y susceptibles, con promedios de 17,5 y 15,8 mg, respectivamente. En hojas, se alcanzaron promedios de 14 mg para resistentes y 14,1mg para susceptibles, resultando superior numéricamente a las demás interacciones.

Por otra parte, los protocolos de Sellés y de Wang no modificado no mostraron significancia estadística en la extracción de proteínas totales de cacao para las dos accesiones (mazorcas y hojas). El promedio de proteínas aisladas con estos dos protocolos está en un rango de 3,8 y 8,2 mg (Fig. 7).

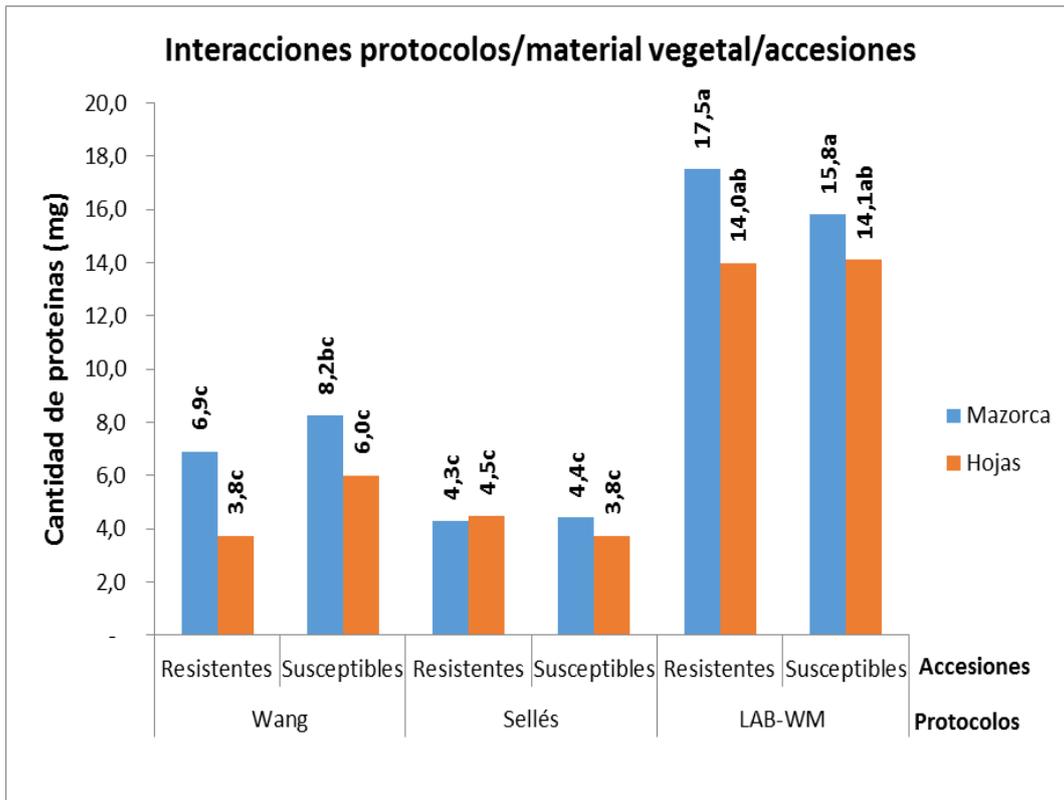


Figura 7. Cuantificación de proteínas totales de cacao en la interacción protocolos (Wang y Sellés)/material vegetal (mazorcas y hojas)/accesiones experimentales (resistentes y susceptibles). Laboratorio de Biotecnología, UTEQ 2015.

4.2. Discusión

La extracción de proteínas vegetales es un proceso complejo debido a la estructura de la célula vegetal, comparada con los tejidos animales y las células bacterianas, tiene menor contenido de proteínas y contienen en sus vacuolas peptidasas, alcaloides y compuestos polienólicos. Estos compuestos, pueden interferir en la actividad proteica. En consecuencia, la estrategia de extracción depende de las características específicas de la proteína en estudio y de su localización (Michaud & Asselin, 1995).

El uso de plantas medicinales en Asia representa una larga historia de interacciones humanas con el medio ambiente. Las plantas utilizadas para la medicina tradicional contienen una amplia gama de sustancias que se pueden utilizar para tratar enfermedades crónicas, así como enfermedades infecciosas (Duraipandiyan *et al.*, 2006, Edeoga *et al.*, 2005) en humanos. En plantas, la mayor aplicación de la Proteómica ha estado orientada a generar mayor esfuerzo por desarrollar nuevos fármacos, identificar nuevas proteínas asociadas a la resistencia a enfermedades.

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), existen cerca de 20.000 plantas medicinales en 91 países, entre ellos 12 países mega-biodiversos. Los pasos principales para el estudio de las proteínas a partir de recursos vegetales son la extracción y caracterización de dicho producto. En este documento se proporcionan detalles en la extracción y cuantificación de proteínas totales de cacao de alta calidad para su empleo en ensayos proteómicos.

La diversidad de proteínas involucradas en procesos de crecimiento, desarrollo y defensa impide la formulación de un procedimiento de extracción universal que permita recuperar todas las proteínas de un tejido vegetal. La extracción de proteínas de alta calidad proporciona una serie de oportunidades para el descubrimientos de nuevos fármacos (Cosa *et al.*, 2006, Akinyemi *et al.*, 2006).

Al comparar los protocolos de Wang no modificado y Sellés no se observaron diferencias significativas, sin embargo con el método de Wang modificado se apreció un notable incremento de 9,2 mg por encima del protocolo de Wang, lo que se puede atribuir a al número de lavado de las muestras que influye en la calidad de la proteínas, concordando con Saravanan & Rose (2004) que sostienen que mientras mayor es el número de lavados de muestras más puras son las proteínas obtenidas debido a menor presencia de agentes

contaminantes; En cuanto a la cantidad de proteínas estos resultados corroboran lo expuesto por Damerval *et al* (1986), al sostener que el tiempo de imbibición es primordial para la obtención de la cantidad de proteínas, de tal manera que mientras mayor es este, aumenta el número de proteínas contenidas en el gel de poliacrilamida.

Utilizando mazorcas se obtuvo 1,8 mg, por encima de la cantidad de proteínas obtenidas con hojas, confirmando lo expresado por Saravanan & Rose (2004), y Wang *et al* (2003) que sostienen que los frutos maduros contienen altos niveles de proteínas en comparación con aquellos tejidos jóvenes de las plantas.

La extracción de proteínas totales es un método complejo. El éxito en la extracción depende en muchos casos de la complejidad del tejido que se desea estudiar. Unido a esto, los tampones o soluciones descritas no siempre son de carácter universal, su uso o aplicación puede verse limitado por la pureza de los reactivos que se usen para este fin.

En cuanto a la resistencia del material vegetal no se presentó diferencia significativa, sin embargo, con la susceptible se obtuvo una ligera diferencia 0.2 mg por encima de la resistencia de lo cual se puede deducir que indistintamente de la resistencia que presentan las plantas a determinada enfermedad la cantidad de proteínas obtenidas es similar.

El hecho de no presentarse significancia estadística entre el material vegetal y las accesiones utilizadas refleja que la cantidad de proteínas totales aisladas con los diferentes métodos, no depende de la interacción entre material vegetal y accesiones, sino que está fuertemente condicionada por la capacidad extractiva de los diferentes métodos utilizados de forma independiente en esta investigación.

En lo correspondiente a las interacciones protocolos/material vegetal, tanto para mazorcas así como para hojas con el protocolo LAB-WM, se obtuvo un notable incremento en la cantidad de proteínas con respecto con las demás interacciones, específicamente mayor número de proteínas concentradas en un gel de poliacrilamidas mediante la utilización de mazorcas que obviamente al estar maduras permiten una mayor cuantificación proteómica. La calidad de las proteínas evidentemente fue mejor debido a la mayor concentración de TCA que permitió mayor eliminación de contaminantes de acuerdo con Wang *et al* (2006) quienes demostraron que con una mayor concentración de TCA al momento de lavado mejoro la calidad y cantidad en un gel de poliacrilamida al 12,5%, en diferentes ensayos con uva, bambú, kiwi, tabaco, limón, caña de azúcar.

De igual manera, relacionando el material vegetal con las accesiones se puede puntualizar que se obtiene mayor concentración de proteínas en un gel de poliacrilamidas a partir de mazorcas indiferentemente de su resistencia o susceptibilidad a monilla. Mientras que al relacionar las accesiones con los protocolos se pudo corroborar que los resultados obtenidos con las diferentes accesiones no difirieron significativamente entre ellas sino más bien están relacionadas proporcionalmente con el protocolo utilizado, como anteriormente se expresó que con el protocolo mejorado se obtienen mejores resultados que con los otros estudiados. Mientras en lo que a la calidad respecta en aquellas interacciones del protocolo LAB-WM se registró una evidente mejora en la calidad en las proteínas obtenidas.

El bajo rendimiento en la extracción de proteínas totales de cacao con la aplicación directa de estos métodos, se deba posiblemente a la presencia de abundantes compuestos polifenólicos, azúcares, peptinas y otras sustancias que generan interferencia con los tampones de extracción empleado por los autores en cada uno de estos métodos.

Finalmente al relacionar los tres factores en estudio se puede puntualizar que la cantidad de proteínas está estrictamente relacionada con el protocolo y material vegetal utilizado indistintamente de la resistencia de las plantas de donde se extrajo las muestras; notándose mayor calidad y cantidad de proteínas al adoptar el protocolo mejorado en mazorcas ya sea susceptibles y resistentes.

CAPITULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

- El protocolo de Wang con modificaciones fue significativamente superior a los protocolos de Sellés y Wang sin modificar. Es decir, la cantidad de proteínas aisladas por Wang modificado es en promedio tres veces superior a los otros métodos, indistintamente de la accesiones resistentes y susceptibles.
- Al comparar las interacciones entre material vegetal y accesiones, no se logró evidenciar significancia estadística. Sin embargo, se logró obtener mayor cantidad de proteínas totales en mazorcas (resistentes y susceptibles).
- El protocolo de Wang con modificaciones fue significativamente superior a los protocolos de Sellés y Wang sin modificar. Es decir, la cantidad de proteínas aisladas por Wang modificado es en promedio tres veces superior a los otros métodos en mazorcas y hojas.
- Al comparar las interacciones protocolos, material vegetal y accesiones se destaca al protocolo Wang modificado por la mayor obtención de proteínas, en promedio tres veces superior a Sellés y Wang sin modificar. Sin embargo, se logró obtener mayor cantidad de proteínas totales con mazorcas (resistentes y susceptibles) y hojas (resistentes y susceptibles).
- El método desarrollado en este trabajo es repetitivo y puede ser ensayado en diferentes tejidos y órgano vegetal.

5.2. Recomendaciones

- Emplear el método de Wang modificado para la extracción de proteínas totales de tejidos que contienen altos contenidos de polisacáridos, carbohidratos, peptinas y polifenoles. Estos elementos dificultan la extracción y purificación de proteínas convirtiendo al tejido en un material recalcitrante.
- Incluir varios pasos de lavado para eliminar residuos celulares, peptinas, carbohidratos y fenoles que puedan impedir la correcta función del tampón de lisis.
- Fragmentar el tejido (material vegetal) completamente hasta conseguir un polvo muy fino. En muchas ocasiones, el éxito en la extracción de proteínas depende en gran medida de la fineza del tejido.
- Emplear tinción con plata para el revelado de las proteínas. Al ser la plata un material sensible, se mejora la resolución de las bandas y por tanto, la cuantificación de las mismas se facilita en gran medida.

CAPITULO VI

BIBLIOGRAFÍA

6.1. Literatura citada

- ABRF, (. d. (2009). Base de datos de las proteínas.
- AECACAO. (2015). *Un producto emblemático del Ecuador*. Obtenido de <http://www.anecacao.com/es/quienes-somos/cacao-nacional.html>
- Almodóvar, W. (1996). *Enfermedades en las plantas Organismos Patógenos, Identificación y Diagnóstico*. Obtenido de <http://uprm.edu/agricultura/sea/clinica/CLDIAEnfPlan.pdf>
- Álvarez, C. (2010). *Condiciones de clima y suelo para el cacao*. Obtenido de <http://agricultura-tropical-ecuador.blogspot.com/2010/11/condiciones-de-clima-y-suelo-para-el.html>
- Amores, F. (2013). *Moniliasis del Cacao*. Obtenido de CropLife: <http://www.croplifela.org/es/plaga-del-mes.html?id=472>
- Amores_et_al. (2009). *EET 575 y EET 576 nuevos clones de cacao nacional para la zona central de Manabí. Boletín divulgativo N 346. Estación Experimental Tropical "Pichilingue"*. Quevedo-Ecuador: Boletín divulgativo N 346.
- ANACAFÉ. (julio de 2004). *portal.anacafe.org*. Obtenido de <http://portal.anacafe.org/Portal/Documents/Documents/2004-12/33/7/Cultivo%20de%20Cacao.pdf>
- Anecacao. (2006). Manual del cultivo de cacao. *Asociacion Nacional de exportadores de cacao*, 15-18.
- Argout, X., Loor, R., Fouet, O., Lemainque, A., Pavek, S., Boccara, M., . . . Lanaud, C. (2011). Insight into the wild origin, migration and domestication history of the fine flavour Nacional Theobroma cacao L. variety from Ecuador 2011.
- Batista, L. (2013). *Morfología de la planta de cacao*. Obtenido de <http://www.fundesyram.info/biblioteca/displayFicha.php?fichaID=3096>
- Cosa, P., Vlietinck, A., Berghe, D., & Maes, L. (2006). Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept' J Ethnopharmacol. 290–302.
- Crespo Del Campo, E., & Crespo, F. (1997). *Cultivo y beneficio del cacao CCN-51*. Quito, Ecuador: El Conejo.
- Durán, R. F. (2010). Cultivo y Explotación del Cacao. *Primera*, 7-12. Colombia.
- Enríquez. (1987). Manual Del cacao para agricultores. *Catie, Acric, Euned.*, 150.
- Enríquez, G. (1987). *Manual del cacao para agricultores*. San José, Costa Rica.

- FAO. (1986). *Las plagas en la agricultura. Defensa ambiental y productividad. ¿Objetivo en pugna?* Chile.
- FAO, (. d. (2004). *Perspectivas a plazo medio de los productos básicos agrícolas. Proyecciones al año 2010.* Obtenido de <http://www.fao.org/docrep/007/y5143s/y5143s00.htm>
- González, K., & Ruiz. (2009). *Valoración económica y financiera de la sustitución de cultivos de cacao nacional Theobroma cacao L. por un tipo de clon de cacao denominado CCN-51.* Guayaquil, Ecuador.
- Hanash, S. (2003). Disease proteomics.
- Hardy. (1961). *Manual de cacao.* San José, Costa Rica.
- Hebbar, P. (2007). Cacao Diseases : A global perspective from an industry point of view. *Phytopath*, 97, 1658 - 1663.
- Jhonson, J., & Bonilla, J. (2008). *Manual de manejo y producción del cacaotero.* Leon, Nicaragua.
- Kim_et_al. (2010). Sex and ethnic differences in 47 candidate proteomic markers of cardiovascular disease: the Mayo Clinic proteomic markers of arteriosclerosis study. *PLoS ONE*.
- Krauss, U., Hoopen, M., Hidalgo, E., Martínez, A., Arroyo, C., García, J., . . . V., S. (2003). *Manejo integrado de la moniliasis (Moniliophthora roreri) del cacao (Theobroma cacao) en Talamanca, Costa Rica.* Costa Rica: Agroforesteria en las Americas.
- Lander_et_al. (2001). *Initial sequencing and analysis of the human genome.* Nature.
- Lomas, J. (2008). *TP2: Extracción y cuantificación de proteínas.* Obtenido de <https://ibcmunq.files.wordpress.com/2008/05/tp2.pdf>
- Loor, R., Fouet, O., Lemainque, A., Pavék, S., Boccara, M., Argout, X., . . . and Lanaud, C. (2012). Insight into the wild origin, migration and domestication history of the fine flavour Nacional Theobroma cacao L. variety from Ecuador.2012.
- MAGAP, (. d., & FAO, (. d. (2010). Ecuador the land of fine cocoa “Arriba”. Proyecto: Calidad de los alimentos vinculada con el origen y las tradiciones en America Latina, "Diagnostico de la cadena de valor del Cacao en el Ecuador". 408-413.
- Malaguti, G. (1997). *Apuntes acerca de las enfermedades de plantas, causa y control.* Venezuela.

- Marcano, M., Pugh, T., Cros, E., Morales, S., Páez, E., & Courtiois, B. 2. (2007). Adding value to Cacao (*Theobroma cacao* L.) germplasm information with domestication history and admixture mapping. *Theoretical Applied Genetic*, 114. (877-884, Ed.)
- Mayr_et_al. (2007). Proteomics and metabolomics combined in cardiovascular research. *Trend Cardiovasc Med*.
- Michaud, D., & Asselin, A. (1995). Application to plant proteins of gel electrophoretic methods. *J. Chromatogr. A* 698. 263-279.
- Morante, J. (2014). Aplicación DIGE (Difference Gel Electrophoresis) para la búsqueda de proteínas diferenciales relacionadas con la resistencia a Moniliasis en cultivos de *Theobroma cacao* L. (cacao) de Ecuador.
- Motamayor, J., Risterucci, A., Lopez, P., Ortiz, C., Moreno, A., & Lanaud, C. (2002). Cacao domestication I: the origin of the cacao cultivated by the Mayas. 89, 380-386.
- Pando, V., & Ferreira, C. (2007). Proteómica: hacia el entendimiento del lenguaje de las proteínas. En *Biotecnología VI4* (págs. 98-108).
- Philips, M. (2007). Aislamiento de microorganismos para control biológico de *Moniliophthora roreri*. Costa Rica.
- Phillips. (2012). *Catalogo de clones de cacao seleccionados por el Catie para siembra comercial*. Costa Rica.
- Pro-Amazonica. (2003). *Caracterización de las zonas productoras de cacao en el Perú y su competitividad*. Lima-Peru.
- PROECUADOR. (2013). *Análisis sectorial de cacao y elaborados*. Obtenido de http://www.proecuador.gob.ec/wp-content/uploads/2013/08/PROEC_AS2013_CACAO.pdf
- PROECUADOR. (2015). Obtenido de Estudio de cacao y sus elaborados: http://www.proecuador.gob.ec/wp-content/uploads/2015/02/PROECU_PPM2012_CACAO_ALEMANIA.pdf
- Quiróz. (2006). *Avances en la selección de clones de cacao nacional adaptadas a las condiciones ambientales de la península de Santa Elena. Memoria de reunión técnica*. Guayas, Ecuador.
- Quiroz, J., & Amores, F. (2002). Manejo Integrado de Plagas Rehabilitación de plantaciones tradicionales de cacao en Ecuador. (63), 73-80. Costa Rica.
- Reuck. (1997). Monilia del cacao. ¿Una amenaza semejante a la escoba de bruja? *Cafe y Cacao*, 1-2.

- Revista_ElAgro. (2013). *Factores para obtener 90% en tasa de parición*. Obtenido de <http://www.revistaelagro.com/2013/03/20/el-cacao-en-la-economia-del-ecuador/>
- Sánchez, M. (2011). Cuantificación de enfermedades en mazorcas de cacao (*Theobroma cacao* L.) en la zona central del Litoral Ecuatoriano. *Memorias del VIII Simposio Internacional de Recursos Genéticos para América Latina y El Caribe*, 15-16.
- Schnell. (2005). Retrospective determination of the parental population of superior cacao (*Theobroma cacao* L.) seedlings and association of microsatellite alleles with productivity. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, 181-190.
- Solís. (2009). Mejoramiento genético para resistencia, rendimiento y calidad agroindustrial del cacao (*Theobroma cacao* L.) en México. *Memorias de la IV Reunión Nacional de Innovación Agrícola y Forestal.*, 142.
- Suárez. (1971). Estudio del mecanismo de penetración y del proceso de infección de *Monilia roleri* cif y par en frutos de cacao (*Theobroma cacao* L.). *Tesis de Grado*, 10-12.
- Suárez, C., & Delgado, J. (1993). Moniliasis del cacao Documento Técnico N°10. EET Pichilingue, INIAP. *FUNDAGRO.*, 18.
- Towbin, H. e. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76(9):4350-4. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76(9):4350-4.
- Towbin, H., Staehelin, T., & Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA*, 76(9):4350-4. Obtenido de <http://www.ecogen.com/upfiles/A56009.pdf>
- UNIZAR. (2011). *Electroforesis en gel de poliacrilamida y electrotransferencia*. Obtenido de [http://www.unizar.es/innovacion/convocatorias2011/documentos/184Electroforesis%20proteinas%20presentacion%20pp%20\[Modo%20de%20compatibilidad\].pdf](http://www.unizar.es/innovacion/convocatorias2011/documentos/184Electroforesis%20proteinas%20presentacion%20pp%20[Modo%20de%20compatibilidad].pdf)
- UNQ, U. N. (05 de 2008). *Introducción a la Biología Celular y Molecular*. Obtenido de <https://ibcmunq.files.wordpress.com/2008/05/tp2.pdf>
- Wang, Z., Marti, J., Abubucker, S., Yin, Y., Gasser, R., & Mitreva, M. (2009). Systematic analysis of insertions and deletions specific to nematode proteins and their proposed functional and evolutionary relevance.

- Wil, A. (2013). *Sombreamiento en el cultivo de cacao*. Obtenido de <http://agropecuarios.net/sombreamiento-en-el-cultivo-de-cacao.html>
- Wilkins, M., Sanchez, J., Gooley, A., Appel, R., Humphery Smith, I., & Hochstrasser, D. (1996). Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *13*, 19-50.
- Yábar, C. (2003). *MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE ELECTROFORESIS PARA PROTEÍNAS Y ADN*. Obtenido de <http://www.ins.gob.pe/insvirtual/images/otrpubs/pdf/Manual%20Electroforesis%2038.pdf>

CAPITULO VII

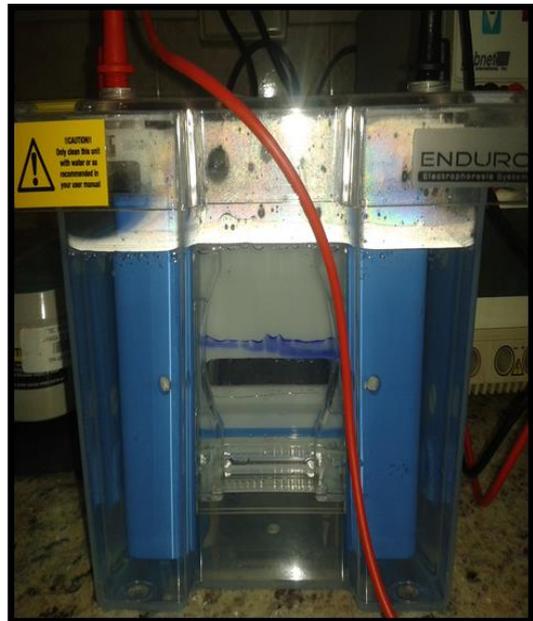
ANEXOS



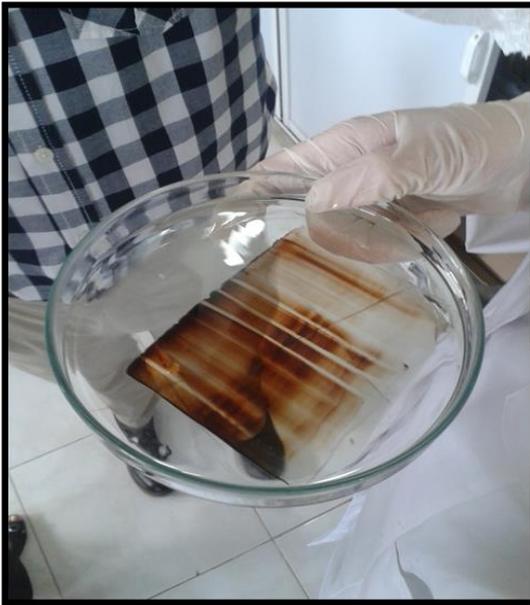
Anexos 1. Selección de muestras hojas y mazorcas en accesiones (Finca La Represa).



Anexos 2. Proceso de trituración con nitrógeno líquido de la mazorca y hojas de cacao.



Anexos 3. Proceso de elaboración del gel de poliacrilamida y corrido de la muestras.



Anexos 4. Tinción del gel de poliacrilamida y visualización de bandas de proteínas.