

CENTRO AGRONOMICO TROPICAL DE INVESTIGACION Y ENSEÑANZA
SUBDIRECCION GENERAL ADJUNTA DE ENSEÑANZA
PROGRAMA DE POSGRADO

CARACTERIZACION DE CLONES DE CACAO (Theobroma cacao L.)
RESISTENTES Y SUSCEPTIBLES A LA MONILIASIS (Moniliophthora
roreri [Cif & Par] Evans et al.) MEDIANTE MARCADORES RFLP.

Tesis sometida a la consideración del Comité Técnico Académico del Programa de Estudios de Posgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, para optar al grado de

MAGISTER SCIENTIAE

Por:

VICENTE JOSE FEBRES RODRIGUEZ

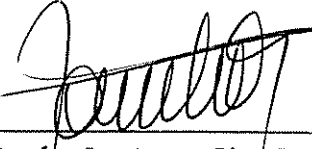
Turrialba, Costa Rica

1990


Esta tesis ha sido aceptada, en su presente forma, por la Coordinación del Programa de Estudios de Posgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales Renovables del CATIE, y aprobada por el Comité Asesor del estudiante como requisito parcial para optar el grado de:

MAGISTER SCIENTIAE

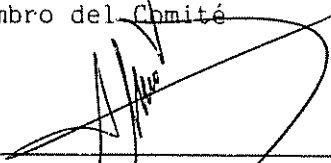
COMITE ASESOR:



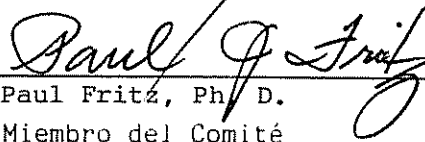
Ramón Lastra, Ph. D.
Profesor Consejero



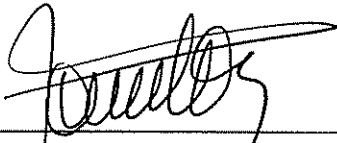
José J. Galindo, Ph. D.
Miembro del Comité




Víctor Villalobos, Ph. D.
Miembro del Comité



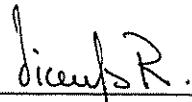
Paul Fritz, Ph. D.
Miembro del Comité



Ramón Lastra Rodríguez, Ph.D.
Coordinador, Programa de Estudios de Posgrado



Dr. José Luis Parisí
Subdirector General Adjunto de Enseñanza



Vicente José Febres Rodríguez
Candidato

DEDICATORIA

A mis padres,
a mis hermanos.

Al cacao.

AGRADECIMIENTOS

El autor desea dejar constancia de su agradecimiento a las siguientes personas e instituciones:

Al Dr. Ramón Lastra, profesor consejero, y a su esposa Ana María por su constante estímulo y apoyo durante estos dos años.

Al Laboratorio de Biología Molecular de Cacao en Penn State University y en especial a: el Dr. Paul Fritz, por su orientación, interés y colaboración a todo lo largo del trabajo. A Teresa Snyder, quién tuvo la paciencia de enseñarme muchas de las técnicas empleadas en este trabajo. A Lauren McHenry, Jennifer Couch, Heeyoung Tai y Hortense Dodo, estudiantes doctorales, quienes suministraron las sondas utilizadas y compartieron mucha de su información antes de ser publicada. A William Flynn y Leon Glicenstein, así como a la señora Lidia Fritz, por su amistad y apoyo durante mi estadía en Pensylvannia.

Al Dr. Victor Villalobos, por darme la oportunidad de trabajar en este proyecto y por su apoyo en el transcurso de esta investigación.

Al Dr. José Galindo, por su interés y recomendaciones en la revisión de este trabajo.

Al Gobierno de Holanda por brindarme el financiamiento

para realizar mis estudios de postgrado.

Al Sr. Eduin Castillo por su colaboración en el trabajo de campo.

A los compañeros del Laboratorio de Cultivo de Tejidos del CATIE: Galván, Juan, Luis, Edgar, Gilbert y William por estar siempre dispuestos a cooperar, por su compañerismo y amistad.

A Ingrid, Lissette, Maritza y Marta por su gran ayuda en la labor secretarial.

A los señores Antonio Salas y Omar Vega, dispuestos en todo momento a lidiar con los trámites administrativos para la compra de reactivos y equipos.

A los señores Domingo Loaiza, Kenneth Royo y Leopoldo Gómez por su colaboración y sugerencias en la presentación del trabajo final, así como al Sr. Francisco "Macho" Solano por la ilustración de esta tesis.

A mis compañeros de todos los días: Nelly (Lalo), María Elena, Lissette, Silvana, Ana, Dora y Jorge por su amistad y por hacer más fácil el diario quehacer.

A mis amigos de la promoción 88-90, por todos los ratos compartidos y por esta inolvidable experiencia.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN	viii
SUMMARY	ix
LISTA DE CUADROS	x
LISTA DE FIGURAS	xii
1. INTRODUCCION	1
2. ANTECEDENTES	4
2.1 El Cacao.	4
2.2 La Moniliasis del cacao.	5
2.3 Polimorfismo de Fragmentos de Restricción: Definición y Detección.	7
2.4 Utilidad de los RFLP en la Genética de Plantas.	9
2.5 Los RFLP como Marcadores en Cacao.	14
3. MATERIALES Y METODOS	16
3.1 Material vegetal para el análisis RFLP.	16
3.2 Aislamiento del ADN de cacao.	18
3.3 Sondas para la detección de RFLP.	24
3.4 Marcaje de la sonda con biotina.	24
3.5 Digestión del ADN de cacao.	27
3.6 Electroforesis en geles de agarosa.	29
3.7 Transferencia de Southern.	29
3.8 Detección de polimorfismo.	30
3.8.1 Hibridación y detección con BluGene™	31

	Pág.
3.8.2 Hibridación y detección con PhotoGene™ ..	32
3.9 Análisis de los fragmentos.	34
4. RESULTADOS	35
4.1 Aislamiento del ADN de cacao.	35
4.2 Detección de polimorfismo.	36
4.3 Análisis de RFLP.	41
4.3.1 Sonda #12 (β -1,3-glucanasa).	42
4.3.2 Sonda #4 (β -1,3-glucanasa).	50
4.3.3 Sonda 21kD (gen de proteína de reserva de semilla de 21 kD).	50
5. DISCUSION	61
5.1 Aislamiento del ADN	61
5.2 Detección de Plimorfismo	64
5.3 Análisis de RFLP	66
6. CONCLUSIONES	76
7. RECOMENDACIONES	78
8. BIBLIOGRAFIA	79

FEBRES, V. 1990. Caracterización de clones de cacao (Theobroma cacao L.) resistentes y susceptibles a la Moniliasis (Moniliophthora roreri [Cif & Par] Evans et al.) mediante marcadores RFLP.

Palabras claves: cacao, Moniliasis, Theobroma cacao, Moniliophthora roreri, RFLP, ADN, marcadores genéticos, caracterización de germoplasma.

RESUMEN

El polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) es una metodología que depende de la propiedad de las endonucleasas de restricción para catalizar el rompimiento de las cadenas de ADN en sitios de reconocimiento específicos. Este clivaje del ADN origina fragmentos de longitudes definidas. Posteriormente, se procede a la detección de fragmentos particulares de ADN mediante la hibridación de secuencias moleculares clonadas (sondas), que permiten detectar variaciones a nivel genético. Las diferencias en los patrones RFLP representan la heterogeneidad genética existente entre los individuos de una especie.

El presente trabajo estudió los patrones RFLP de plantas de cacao (Theobroma cacao L.) resistentes y susceptibles a la Moniliasis (Moniliophthora roreri [Cif & Par] Evans et al.), enfermedad que causa grandes pérdidas en el área centroamericana. El objetivo principal fue determinar la utilidad de esta metodología en la caracterización de estos dos grupos y, en general, de la colección de cacao del CATIE.

Los clones estudiados fueron: CC-137, EET-67, EET-75, EET-183 y UF-273, resistentes a la Moniliasis y los clones susceptibles: POUND-7, CC-132, UF-29, UF-221, CATONGO y UF-613.

Se logró la detección de polimorfismo con una de las sondas empleadas que corresponde a un gen de una proteína de reserva de semilla de 21 kilodalton (kD). Todas las enzimas de restricción usadas con esta sonda (Eco RI, Hind III, Hae III) detectaron polimorfismo, lo que indica rearrreglos en el genoma de cacao. La sola combinación de la sonda 21 kD/Hae III permitió, además, separar los clones en seis grupos diferentes. Estos resultados demuestran la utilidad que tiene el análisis RFLP para estudiar la organización genómica, la taxonomía y la caracterización del germoplasma de cacao.

FEBRES, V. 1990. Characterization of cocoa clones (Theobroma cacao L.) resistant and susceptible to Monilia pod rot (Moniliophthora roreri [Cif & Par] Evans et al.) using RFLP markers.

Key words: cocoa, Theobroma cacao, Moniliophthora roreri, RFLP, DNA, genetic markers, germplasm characterization.

SUMMARY

Restriction fragment length polymorphism (RFLP) is a methodology that depends on restriction endonucleases to catalyze the cleavage of DNA strands in specific recognition sequences. The DNA fragments originated have defined lengths; consequently, specific fragments are detected by hybridization with cloned molecular sequences (probes). Using this method any variation can be detected at the genetic level.

Monilia pod rot (Moniliophthora roreri Cif & Par) is a fungal disease that causes important losses in cocoa production in Central American countries. The present work studied RFLP's of resistant and susceptible plants to undertake the usefulness of this methodology for the characterization of both groups and, in general, of CATIE's cocoa collection.

The resistant clones studied were: CC-137, EET-67, EET-75, EET-183 and UF-273; and the susceptible ones were: POUND-7, CC-132, UF-29, UF-221, CATONGO and UF-613.

The 21 kD probe that correspond to a 21 kilodalton seed reserve protein gene, detected polymorphism with all the restriction enzymes used (Eco RI, Hind III, Hae III), indicating the presence of rearrangements in the cocoa genome. The combination of 21 kD/Hae III led to the separation of six defined groups between the different cocoa clones used in this study. This results demonstrate the usefulness of the RFLP analysis to understand the genetic organization, taxonomy and germplasm characterization of cocoa.

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Pág.
1. Algunas características de los clones de cacao utilizados en este estudio.	19
2. Características de las sondas empleadas para el análisis de RFLP.	25
3. Características de las enzimas de restricción usadas para generar los fragmentos.	28
4. Longitud de los fragmentos observados al digerir los clones UF-273, CC-137, EET-67, EET-183, EET-75, UF-221, POUND-7, CC-132, UF-29 y CATONGO con <u>Hind III</u> , homólogos a la sonda # 12 correspondiente al gen de la β -1,3-glucanasa.	43
5. Longitud de los fragmentos observados al digerir los clones UF-273, CC-137, EET-183, UF-221 y POUND-7, con <u>Eco RI</u> , homólogos a la sonda # 12 correspondiente al gen de la β -1,3-glucanasa.	45
6. Longitud de los fragmentos observados al digerir los clones UF-273, CC-137, EET-183, UF-221 y POUND-7, con <u>Pst I</u> , homólogos a la sonda # 12 correspondiente al gen de la β -1,3-glucanasa.	47
7. Longitud de los fragmentos observados al digerir los clones UF-273, CC-137, EET-67, EET-183, EET-75, UF-221, POUND-7, UF-29, UF-613 y CATONGO, con <u>Hae III</u> , homólogos a la sonda # 12 correspondiente al gen de la β -1,3-glucanasa.	49
8. Longitud de los fragmentos observados al digerir los clones UF-273, CC-137, EET-75, UF-221, POUND-7 y CC-132 con <u>Eco RI</u> , homólogos a la sonda # 4 correspondiente al gen de la β -1,3-glucanasa.	52
9. Longitud de los fragmentos (kb) más fuertes observados al digerir con <u>Hind III</u> , homólogos a la sonda 21kD.	55
10. Longitud de los fragmentos (kb) de señal más fuerte observados al digerir con <u>Eco RI</u> , homólogos a la sonda 21kD.	57

11. Longitud de los fragmentos (kb) de señal más fuerte observados al digerir con <u>Hae III</u> , homólogos a la sonda 21kD.	59
--	----

LISTA DE FIGURAS

Figura	Pág.
1.	Esquema general del procedimiento para el análisis de RFLP. 17
2.	Procedimiento de extracción I. 20
3.	Procedimiento de extracción II. 21
4.	Procedimiento de extracción III. 22
4.	Procedimiento de extracción III (continuación). 23
5.	Electroforesis horizontal de agarosa (1%) del ADN de cacao purificado con el procedimiento de extracción III. 37
6.	Electroforesis horizontal de agarosa (0,8%) del ADN de cacao (2 µg) digeridos con enzimas de restricción (10 U/µg). 38
7.	Análisis RFLP mostrando los pesos moleculares de los fragmento en Kb, del ADN total de cacao digerido con <u>Hind III</u> e hibridizados con la sonda # 12 (β-1,3-glucanasa). La detección se realizó con el sistema BluGene™ (BRL). 39
8.	Análisis RFLP mostrando los pesos moleculares de los fragmento en Kb, del ADN total de cacao digerido con <u>Hind III</u> e hibridizados con la sonda # 12 (β-1,3-glucanasa). La detección se realizó con el sistema PhotoGene™ (BRL). 40
9.	Análisis RFLP mostrando los pesos moleculares de los fragmento en Kb, del ADN total de cacao digerido con <u>Eco RI</u> e hibridizados con la sonda # 12 (β-1,3-glucanasa). La detección se realizó con el sistema BluGene™ (BRL). 44
10.	Análisis RFLP mostrando los pesos moleculares de los fragmento en Kb, del ADN total de cacao digerido con <u>Pst I</u> e hibridizados con la sonda # 12 (β-1,3-glucanasa). La detección se realizó con el sistema BluGene™ (BRL). 46
11.	Análisis RFLP mostrando los pesos moleculares de los fragmento en Kb, del ADN total de cacao digerido con <u>Hae III</u> e hibridizados con la sonda # 12 (β-1,3-glucanasa). La detección se

	realizó con el sistema PhotoGene™ (BRL).	48
12.	Análisis RFLP mostrando los pesos moleculares de los fragmento en Kb, del ADN total de cacao digerido con <u>Eco RI</u> e hibridizados con la sonda # 4 (β -1,3-glucanasa). La detección se realizó con el sistema BluGene™ (BRL).	51
13.	Análisis RFLP mostrando los pesos moleculares de los fragmento en Kb, del ADN total de cacao digerido con <u>Hind III</u> e hibridizados con la sonda 21kD. La detección se realizó con el sistema PhotoGene™ (BRL).	54
14.	Análisis RFLP mostrando los pesos moleculares de los fragmento en Kb, del ADN total de cacao digerido con <u>Eco RI</u> e hibridizados con la sonda 21kD. La detección se realizó con el sistema BluGene™ (BRL).	56
15.	Análisis RFLP mostrando los pesos moleculares de los fragmento en Kb, del ADN total de cacao digerido con <u>Hae III</u> e hibridizados con la sonda 21kD. La detección se realizó con el sistema PhotoGene™ (BRL).	58

1. INTRODUCCION

Un marcador genético es una característica visible presente en un individuo que indica la constitución de un gen en particular (Smith, 1989), permitiendo conocer el genotipo de individuos y poblaciones. Por tanto, su importancia fundamental está en que hace posible estimar y caracterizar la diversidad genética.

Existen dos clases fundamentales de marcadores genéticos: los morfológicos y los moleculares. La mayoría de los marcadores morfológicos no son adecuados, su expresión está sujeta a variaciones del medio ambiente, pueden estar regulados por la acción de varios genes y solo pueden ser evaluados en estado adulto, que en el caso del cacao es alcanzado a los 4-6 años después de la siembra. Dentro de los marcadores moleculares existen dos tipos, dependiendo del nivel a que los genes son detectados (Tanksley, 1983): las isoenzimas y los marcadores de ADN o polimorfismo de los fragmentos de restricción (RFLP, como se les conoce por sus siglas en inglés).

Las isoenzimas presentan un uso limitado, ya que no todos los genes codifican una enzima, por lo que su número no es suficiente para cubrir todo el genoma de un individuo. Los RFLP, en cambio, reúnen las características de un marcador genético ideal. Se presentan en número ilimitado y no son afectados por factores ambientales. Así mismo, al detectar diferencias genéticas a nivel de ADN, pueden ser aplicados a

las plántulas, lo que implica una mayor eficiencia en la caracterización genética, ya que el material se puede evaluar en etapas muy tempranas del crecimiento, ahorrándose en tiempo y dinero al evitar el mantenimiento de material indeseado.

Las diferencias en los patrones de RFLP representan la heterogeneidad genética existente entre los individuos de una especie. Por tanto, los RFLP pueden ser utilizados para: identificación individual, varietal o parental, seguimiento y mapeo de caracteres simples y cuantitativos, análisis de la organización genómica, medir la diversidad genética de una especie o población y desarrollar mapas genéticos detallados, entre otros (Landry y Michelmore, 1987).

Una de las principales enfermedades que afecta al cacao y que causa grandes pérdidas en la producción es la Moniliasis, causada por el hongo Moniliophthora roreri (Cif. & Par.) Evans et al. En el CATIE han sido clasificados algunos clones como resistentes a esta enfermedad. Debido a esto, se proponen como objetivos de este trabajo:

1) Estudiar los patrones de RFLP de plantas de cacao resistentes y susceptibles a la Moniliasis para tratar de identificar algún tipo de polimorfismo que discrimine entre estos dos grupos.

2) Determinar la utilidad de esta metodología para

caracterizar la colección de cacao del CATIE.

3) Determinar la variabilidad genética de algunos clones de la colección de cacao del CATIE.

2. ANTECEDENTES

2.1 El Cacao.

El cacao (Theobroma cacao L.), es una planta perteneciente a la familia Sterculiaceae, siendo la única especie dentro de este género que es cultivada ampliamente. El centro primario de diversidad de este cultivo corresponde a la cuenca alta del Amazonas, de donde se extendió hacia el norte y el oeste (Wood y Lass, 1985). Es una planta diploide con $2n=20$, de acuerdo con Glicenstein y Fritz (1989a, 1989b).

En la actualidad se reconocen tres tipos principales o grupos de poblaciones de cacao, estos son: 1) Criollo, que resultó de la diseminación hacia Ecuador, Colombia, Venezuela, Centroamérica y Mexico. Estos se caracterizan por poseer mazorcas de color verde hasta rojo, cilíndricas, con diez surcos profundos, pericarpio rugoso, cotiledones blancos o violeta pálido, producen un chocolate aromático; 2) Forastero, que se encuentra localizado en el norte de Brasil y las Guayanas, presenta mazorcas amarillas, ovoides, amelonadas, con diez surcos superficiales o profundos, pericarpio liso o ligeramente rugoso, cotiledones violeta oscuro; y 3) Trinitario, que corresponde a un tipo intermedio entre el Criollo y el Forastero y que se originó, probablemente, en la isla de Trinidad. Las características genéticas son intermedias a los dos grupos anteriores (Wood y

Lass, 1985; Enriquez, 1985; Manual de Cultivo del Cacao, 1987).

El tipo de clima más favorable para el crecimiento de este cultivo es el cálido húmedo, con lluvias preferiblemente entre los 1.500-2.000 mm y una estación seca de no más de tres meses (Wood y Lass, 1985).

Para el año de 1988 la producción mundial de cacao fue de 2.230.000 TM, siendo los principales países productores Costa de Marfil, Brasil y Ghana (FAO, 1989). Este cultivo es, sin embargo, atacado por varios patógenos cuya importancia es variable de un país a otro. Cramer en 1967 estimó que las pérdidas mundiales por causa de las enfermedades debían ser de un 20% aproximadamente (Wood y Lass, 1985). Entre las enfermedades más importantes que afectan a este cultivo en el área de centroamérica se encuentra la Moniliasis.

2.2 La Moniliasis del cacao.

Esta enfermedad es producida por el hongo Moniliophthora roreri (Cif. & Par.) Evans et al. que pertenece al orden Moniliales de la clase Deuteromicetes. Debido a la estructura del micelio se piensa, además, que este hongo constituye la fase asexual de un Basidiomicete desconocido (Evans, 1981).

El patógeno ataca principalmente las mazorcas jóvenes, ocasionando la necrosis de los tejidos internos y externos, incluyendo las almendras, produciendo una podredumbre acuosa

(Evans, 1981, 1986) que resulta en la pérdida de las mismas.

La Moniliasis, hasta hace relativamente poco tiempo, se encontraba confinada a la parte nor-occidental de América del Sur, pero en la actualidad ha sido descrita en Perú, Ecuador, Colombia, Venezuela, Panamá, Costa Rica, Nicaragua y posiblemente en el occidente del Brasil (Evans, 1986).

Los daños que causa esta enfermedad son muy variables de un país a otro, dependiendo principalmente de las condiciones climáticas y del manejo que se le haga al cultivo (Phillips, 1986). En algunos de los países afectados esta enfermedad constituye uno de los factores limitantes más importantes debido a que ocasiona la pérdida total o casi total de las mazorcas enfermas (Evans, 1981; Galindo, 1987).

En el caso de Colombia, por ejemplo, Barros (1981) señala que las pérdidas debidas a la Moniliasis en ese país constituyen casi una tercera parte de la producción total, lo que equivale a 10.000 TM de cacao seco. Por otro lado, Enríquez *et al.* (1981) señalan que las pérdidas en Costa Rica pueden alcanzar hasta un 90% de la producción total. Así mismo, muchas plantaciones de cacao en Ecuador, Colombia y Costa Rica han sido abandonadas por causa de esta enfermedad (Evans, 1986).

En la actualidad la Moniliasis se combate principalmente mediante prácticas culturales que incluyen podas sanitarias periódicas (Galindo, 1987; Porras *et al.*, 1990). El control de la enfermedad mediante resistencia genética presenta, sin

embargo, mayores ventajas debido a que es una estrategia barata para el agricultor, no requiere de conocimientos especiales para su aplicación y en algunos casos es suficiente para controlar la enfermedad (Fry, 1982).

En el caso de la Moniliasis Phillips y Galindo (1987) han encontrado cinco cultivares que presentan altos niveles de resistencia. Estos son: CC-137, EET-67, EET-75, EET-183 y UF-273.

2.3 Polimorfismo de Fragmentos de Restricción: Definición y Detección.

Esta metodología se basa en la disponibilidad de secuencias de ADN de baja repetición clonadas, para ser utilizadas como sondas en la identificación de fragmentos específicos de ADN del genoma de un organismo y detectar así variaciones a nivel genético (Beckmann y Soler, 1986). La sonda permite explorar el genoma y detectar cualquier cambio que haya ocurrido dentro o cerca de su secuencia de ADN.

Para la detección de los RFLP se debe extraer y purificar el ADN del individuo que se va a analizar y digerirlo con enzimas de restricción. Las endonucleasas de restricción reconocen secuencias específicas, generalmente de 4 a 6 nucleótidos, en el ADN de doble cadena, cortándolo en o cerca de esta secuencia particular de reconocimiento, originando fragmentos de longitudes definidas (Sambrook et

al., 1989). De esta manera se formará una mezcla de fragmentos que difieren en su longitud, de acuerdo a la distribución de los sitios específicos de reconocimiento a lo largo del genoma del individuo (Beckmann y Soler, 1986). Los fragmentos son luego separados por tamaños mediante electroforesis en geles de agarosa.

Para detectar el polimorfismo en los fragmentos de restricción es necesario transferirlos del gel a un soporte sólido, tal como los filtros de nitrocelulosa o las membranas de nylon, mediante la técnica de Southern. Posteriormente se realiza la hibridación con la sonda marcada que contiene una secuencia homóloga a uno o más de los fragmentos o a partes de estos. La sonda marcada se utiliza para poder visualizar posteriormente el resultado de la hibridación. En el marcaje de las sondas se han utilizado nucleótidos que contienen elementos radiactivos que luego se detectan mediante exposición a películas sensibles (Sambrook, *et al.*, 1989). En otros casos se ha usado la biotina (vitamina H) que presenta gran afinidad por la estreptavidina. La estreptavidina es conjugada a una fosfatasa alcalina que luego se detecta por la reacción enzimática con el sustrato adecuado que genera un compuesto coloreado (Gebeyehu *et al.*, 1987).

La detección de la sonda revela un patrón de bandas que en algunos casos puede ser específico para determinados individuos y revela la presencia de un gen particular, constituyendo un marcador.

Aquellas sondas que incluyan secuencias altamente repetitivas del genoma hibridizarán con un gran número de fragmentos, originando una sola banda continua, que no podrá ser analizada. Por tanto se prefieren secuencias únicas o que se encuentren repetidas en bajo número dentro del genoma de la especie (Beckmann y Soler, 1986).

Estas secuencias de copias únicas o de baja repetición a ser utilizadas como sondas pueden obtenerse de bibliotecas de ADN complementario (cADN), que se construyen a partir de ARN mensajero que es copiado a ADN a través de una transcriptasa reversa, o de bibliotecas genómicas (gADN) que se obtienen a partir de ADN de todo el genoma (Landry y Michelmore, 1987).

2.4 Utilidad de los RFLP en la Genética de Plantas.

Varios autores han señalado las posibles aplicaciones de los RFLP en el mejoramiento vegetal (Burr *et al.*, 1983; Beckmann y Soler, 1986; Landry y Michelmore, 1987; Tanksley *et al.*, 1989). Entre estas aplicaciones está: 1) desarrollo de mapas genéticos, 2) identificación varietal, 3) estimación de la organización genómica y la diversidad genética, 4) evaluación de los niveles de homocigosis-heterocigosis, 5) detección de genes mayores (caracteres simples), 6) descomposición de los caracteres cuantitativos en sus componentes, 7) mejoramiento vegetal determinístico y 8) evaluación de los recursos genéticos.

Un mapa genético de ligamiento basado en RFLP es de gran utilidad para acelerar el proceso de fitomejoramiento (Tanksley et al., 1989). Estos mapas proveen un método más directo para seleccionar genes deseables. En la actualidad se han generado mapas de ligamiento de RFLP para unas 10 especies cultivadas que incluyen maíz, papa, tomate, arroz, soya y lechuga, entre otros (Helentjaris y Burr, 1989; Helentjaris et al., 1986). Para esta última especie no existía un mapa genético previo (Landry et al. 1987).

La construcción de un mapa genético utilizando RFLP requiere el desarrollo de las sondas adecuadas que identifiquen polimorfismo y posteriormente, realizar el análisis de segregación (Landry y Michelmore, 1987). Este análisis de segregación con RFLP como marcadores se facilita por: 1) en la mayoría de los casos los alelos se expresan de manera codominante, lo que permite identificar el genotipo de un determinado locus (homocigote vs. heterocigote), 2) la gran variación alélica (polimorfismo) que se puede detectar y que es generada por el número casi ilimitado de combinaciones enzima-sonda, 3) ausencia de efecto epistático, lo que permite el seguimiento de todos los marcadores en una población, 4) ausencia del efecto ambiental sobre los marcadores y 5) la mayoría de los marcadores son neutros fenotípicamente, lo que evita caracteres indeseados en los programas de fitomejoramiento (Landry y Michelmore, 1987; Tanksley et al., 1989).

Los RFLP pueden también ser utilizados para la identificación de líneas e individuos así como para la discriminación varietal (Landry y Michelmore, 1987). Aquellas sondas homólogas a loci altamente heterocigotes y que presentan alelos múltiples son ideales para este fin (Landry y Michelmore, 1987). Soller y Beckmann (1983) estiman, por ejemplo, que 20 a 30 RFLP son suficientes para diferenciar todas las líneas de maíz o tomate.

Para caracterizar la organización genética de un organismo el análisis de RFLP permite identificar la organización y variación de componentes específicos del genoma, proporcionando mayor información que la suministrada por las cinéticas de reasociación (Landry y Michelmore, 1987). Así la tasa de mutación, variabilidad genética, relaciones filogenéticas y homología de secuencias han sido determinadas para diversas especies (Landry y Michelmore, 1987; Tanksley *et al.*, 1989). En tomate y papa, por ejemplo, se ha encontrado una gran homología en sus secuencias de ADN. Estas dos especies comparten muchos de sus loci, siendo además idéntico el orden de éstos en nueve de sus cromosomas, mientras que los otros tres cromosomas han sufrido, aparentemente, inversiones paracéntricas (Bonierbale *et al.*, 1988). Igualmente esta técnica ha permitido detectar duplicaciones y rearrreglos en el genoma de especies de plantas cultivadas tal como es el caso del género Brassica (Helentjaris y Burr, 1989).

En cuanto a la evaluación de los niveles de homocigosis-heterocigosis los RFLP pueden utilizarse para acelerar la selección de una línea, que ha sido obtenida a partir de plantas heterocigotas, hacia la homocigosis con fines de mejoramiento (Burr et al., 1983).

La utilidad de los marcadores genéticos tipo RFLP en el mejoramiento vegetal se basa en encontrar un fuerte ligamiento entre estos marcadores y un gen mayor (p. ejem.: resistencia vertical), permitiendo, por lo tanto, inferir la presencia del gen de interés por la presencia del marcador RFLP (Tanksley et al., 1989). Algunos de los caracteres que frecuentemente se desea transferir de un genotipo a otro están dominados por genes simples, por lo que esta técnica permite hacer su seguimiento. En tomate, se han identificado marcadores RFLP ligados a genes de resistencia al virus mosaico del tabaco, Fusarium, bacterias y nematodos (Young et al., 1988; Paterson et al., 1988).

Por otra parte, muchos caracteres de interés para el fitomejorador (p. ejem.: producción, resistencia horizontal, factores de calidad) son de herencia poligénica o cuantitativa. Los mapas genéticos de alta densidad basados en RFLP permiten descomponer los caracteres cuantitativos en sus genes componentes, pudiéndose identificar y medir el efecto de cada uno de estos componentes (Tanksley et al., 1989). De esta manera los caracteres cuantitativos pueden ser tratados como genes simples haciendo más fácil y eficaz el proceso de

selección y mejoramiento. En tomate, por ejemplo, se ha encontrado un marcador RFLP, derivado de una biblioteca de cADN, que se encuentra fuertemente ligado a los genes que controlan el contenido de sólidos solubles en el fruto (Osborne, et al., 1987). Esta característica es de herencia poligénica en la planta de tomate.

En relación al mejoramiento vegetal determinístico, como ya se ha mencionado, los RFLP permiten reducir las limitaciones de los métodos de selección convencionales (Tanksley et al., 1989). Si los genes de interés, bien sea simples o cuantitativos, pueden ser marcados a nivel de ADN, las poblaciones segregantes de un cruce pueden ser estudiadas a nivel de plántula para determinar cuáles individuos poseen los caracteres de interés, antes de que estos se expresen (Tanksley et al., 1989). Más aún, cuando se realiza selección recurrente utilizando marcadores RFLP ubicados a todo lo largo del genoma se pueden seleccionar aquellas plantas que no solamente posean los genes de interés sino que también posean la mayor proporción de segmentos de cromosomas similares a los del padre recurrente y por tanto la máxima probabilidad de que el resto del genoma retorne hacia el padre recurrente (Helentjaris y Burr, 1989). Por tanto se ahorra en tiempo y dinero en el proceso de mejoramiento de una especie o variedad.

En la evaluación de los recursos fitogenéticos los RFLP permiten determinar la diversidad genética que existe en

determinado grupo de plantas. La heterogeneidad identificada mediante RFLP para ciertos caracteres es indicativa de la heterogeneidad en otros caracteres (Burr et al., 1983), por tanto, esta metodología puede ser utilizada para evaluar colecciones y determinar así cuáles individuos se deben preservar para conservar una amplia diversidad (Mirazón, 1988; Burr et al., 1983).

2.5 Los RFLP como Marcadores en Cacao.

Mirazón et al. (1989) han estudiado la factibilidad de aplicar la técnica de RFLP en cacao, encontrando que es posible detectar polimorfismo mediante distintas combinaciones sonda-enzima de restricción.

Entre los usos de los RFLP en el mejoramiento de cacao está en utilizarlos como marcadores de genes de interés tales como los de resistencia a enfermedades. De esta manera se puede saber, desde muy temprano en el desarrollo de una planta, si esta presenta la característica de resistencia deseada.

Entre los genes asociados con la resistencia a las enfermedades fungosas en las plantas se encuentra el que codifica la enzima β -1,3-glucanasa (Wessels y Sietsman, 1981). El sustrato de esta enzima, β -1,3-glucano, es un componente importante de la pared celular de muchos hongos y se ha encontrado que esta enzima, junto con la quitinasa, es

capaz de inhibir el desarrollo de ciertos hongos fitopatógenos causando la degradación de su pared celular (Mauch et al. 1988). Así mismo, se ha encontrado que la β -1,3-glucanasa se acumula en los espacios intercelulares de plantas de tomate resistentes, asociándose fuertemente a las hifas de hongos patógenos durante la penetración (Benhamou et al. 1989). El incremento en actividad de esta enzima se expresa más tempranamente en las plantas resistentes que en las susceptibles (Benhamou et al. 1989).

Por otro lado, la técnica de RFLP puede también ser utilizada para evaluar la variabilidad entre los distintos tipos de cacao y así caracterizar las colecciones ya existentes.

3. MATERIALES Y METODOS

El esquema general de la metodología seguida para la detección de RFLP en cacao se representa en la Figura 1. El primer paso consistió en aislar el ADN total de las células del tejido de cacao de los demás componentes celulares. Posteriormente se digirió el ADN purificado con enzimas de restricción y se separaron los fragmentos, por tamaño, mediante electroforesis en geles de agarosa. El ácido nucléico se transfirió a un soporte sólido mediante la técnica de Southern (1975) y en éste se realizó la hibridación con la sonda marcada para luego detectar los patrones RFLP.

3.1 Material vegetal para el análisis RFLP.

El material vegetal utilizado en este trabajo se colectó en el banco de germoplasma del CATIE, Turrialba. La colección se ubica a 600 m.s.n.m., con una precipitación promedio anual de 2.640 mm y temperaturas entre los 17° y 27°C.

La selección de los clones empleados en este estudio se basó en los trabajos de Phillips y Galindo (1986, 1987). Se escogieron los clones que mostraron la mayor resistencia así como la mayor susceptibilidad a la Moniliasis:

Clones resistentes: CC-137, EET-67, EET-75, EET-183 y UF-273.

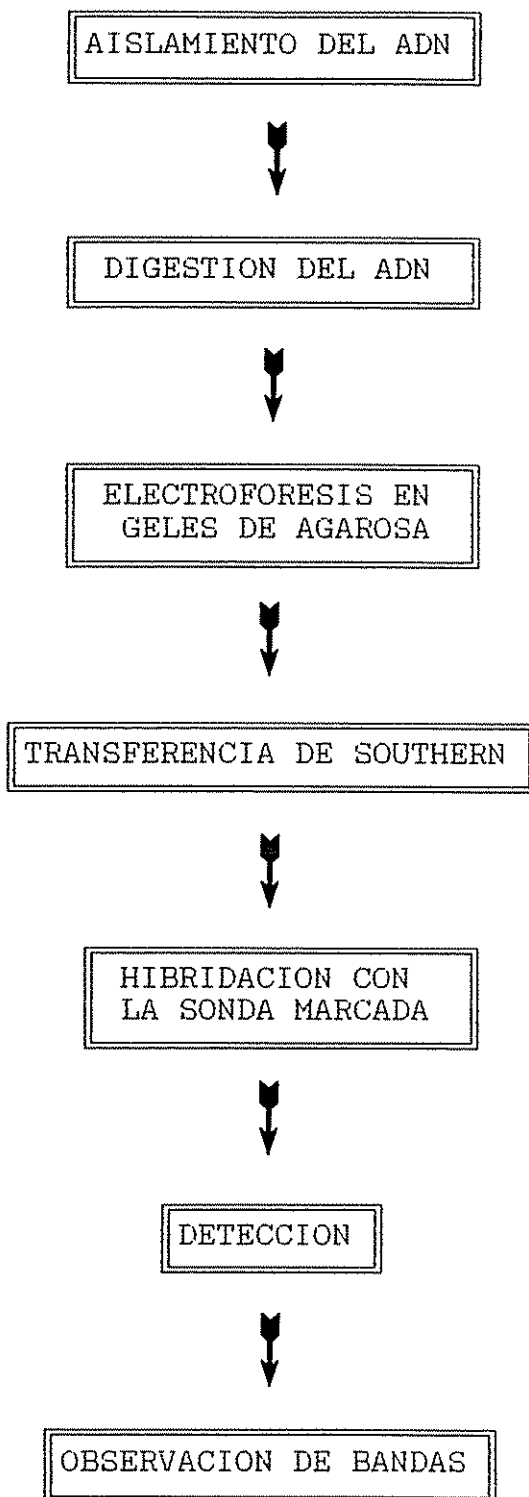


Figura 1. Esquema general del procedimiento para el análisis de RFLP.

Clones susceptibles: CC-132, Pound-7, UF-29, UF-221.

También se incluyeron las líneas CATONGO y UF-613 que serán utilizadas en otro estudio para el desarrollo de un mapa genético. En el Cuadro 1 se representan algunas características de las introducciones empleadas.

3.2 Aislamiento del ADN de cacao.

Se compararon tres métodos diferentes para purificar el ADN de cacao. Los esquemas detallados se muestran en las Figuras 2, 3 y 4. El procedimiento de extracción I se modificó de Dellaporta *et al.* (1983), el procedimiento de extracción II según Doyle y Doyle (1990) y el procedimiento de extracción III modificado de Couch y Fritz (1990).

En todos los casos el material vegetal de partida fueron hojas jóvenes, verdes sin expandir totalmente.

La concentración de ADN se estimó mediante electroforesis en geles de agarosa al 0,8% en presencia de 0,5 $\mu\text{g/ml}$ de bromuro de etidio en buffer 1x TAE (40 mM Tris-acetato 1mM EDTA pH 8,2), comparando la intensidad de fluorescencia con un patrón de concentración conocida (ADN de Lambda, BRL, Bethesda, MD., USA) al ser irradiado con luz UV de 302 nm (Transilluminator UVP, TM-15 Inc., San Gabriel, Calif., USA), de acuerdo a Sambrook *et al.* (1989).

Cuadro 1. Algunas características de los clones de cacao utilizados en este estudio.*

CLON	PAIS DE ORIGEN /A	TIPO GENETICO /B	COMPATIBILIDAD /C	RESISTENCIA A/D	
				MONILIASIS	HAZORCA NEGRA
CC-137	C.R.	Trin.	+	R.	M.S.
EET-67	E.	Ven.A.	+	R.	S.
EET-75	E.	Ven.A.xVen.R.	+	R.	S.
EET-183	E.	Nac.Hibr.	+	R.	S.
UF-273	C.R.	Trin.	+	R.	M.S.
POUND-7	P.	Fo.Am.	-	S.	R.
CC-132	C.R.	Trin.	+	S.	M.S.
UF-29	C.R.	Fo.(Nac.)	+	M.S.	M.R.
UF-221	C.R.	Trin.An.	+	S.	M.S.
CATONBO	B.	Fo.(Común)	+	M.R.	M.S.
UF-613	C.R.	Trin.Am.	-	M.R.	M.R.

/A País de origen: B.= Brasil; C.R.= Costa Rica; E.= Ecuador; P.= Perú.

/B Tipo genético: Fo= Forastero; Fo.Am.= Forastero Amelonado; Nac.= Nacional; Nac.Hibr.= Nacional Híbrido; Trin.= Trinitario; Trin.Am.= Trinitario Amelonado; Trin.An.= Trinitario Anjoleta; Ven.A.= Venezolano Amarillo; Ven.R.= Venezolano Rojo.

/C Compatibilidad: + = autocompatible; - = autoincompatible.

/D Resistencia: R= resistencia; S= susceptibilidad; M.R.= moderadamente resistente; M.S.= moderadamente susceptible.

Moniliasis= Moniliophthora roreri

Hazorca negra= Phytophthora palmivora

* Tomado de: International Cacao Cultivar Catalog, 1981; Engels, 1986; Phillips, 1986; Phillips y Enriquez, 1988; Phillips y Galindo, 1989.

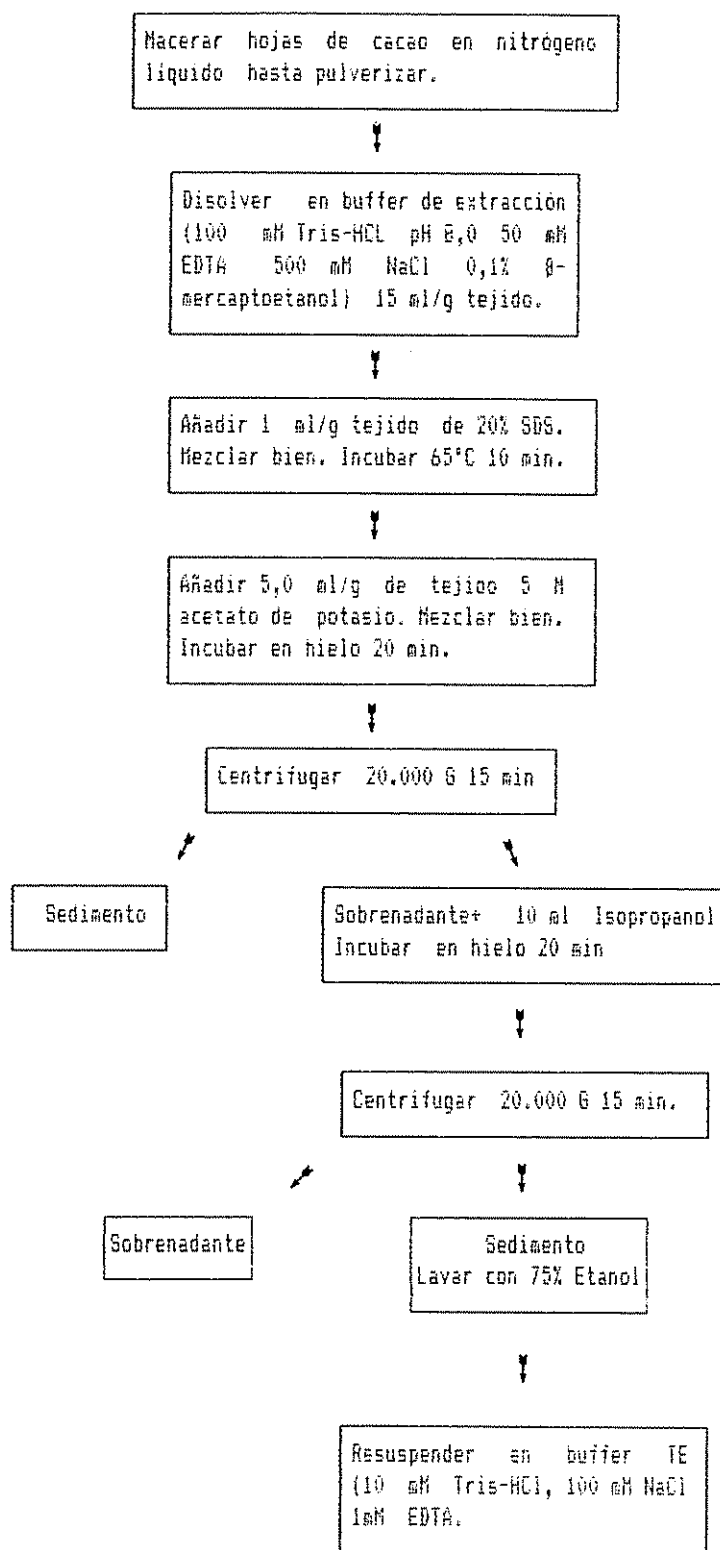


Figura 2. Procedimiento de extracción I.

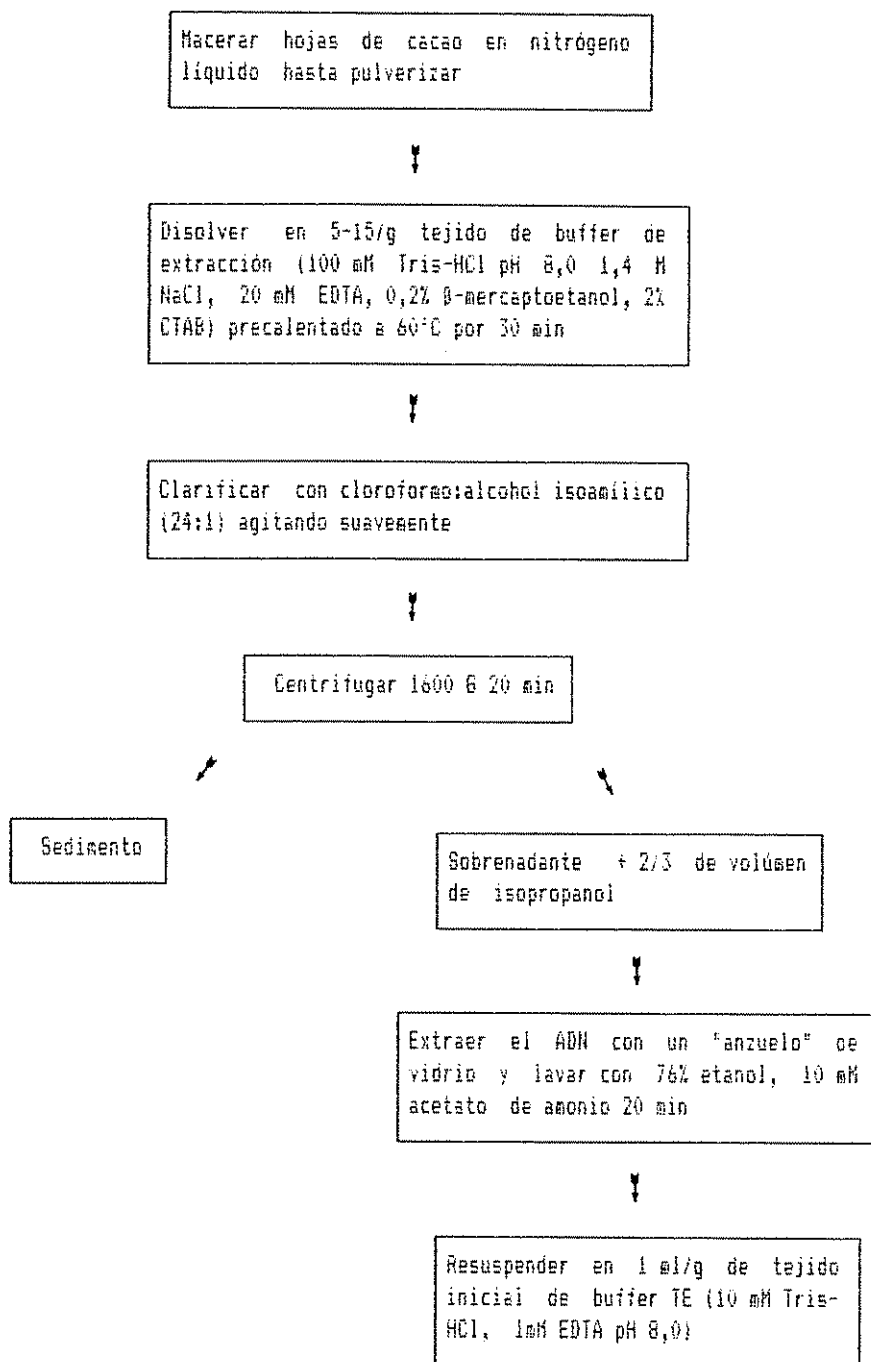


Figura: 3. Procedimiento de extracción II.

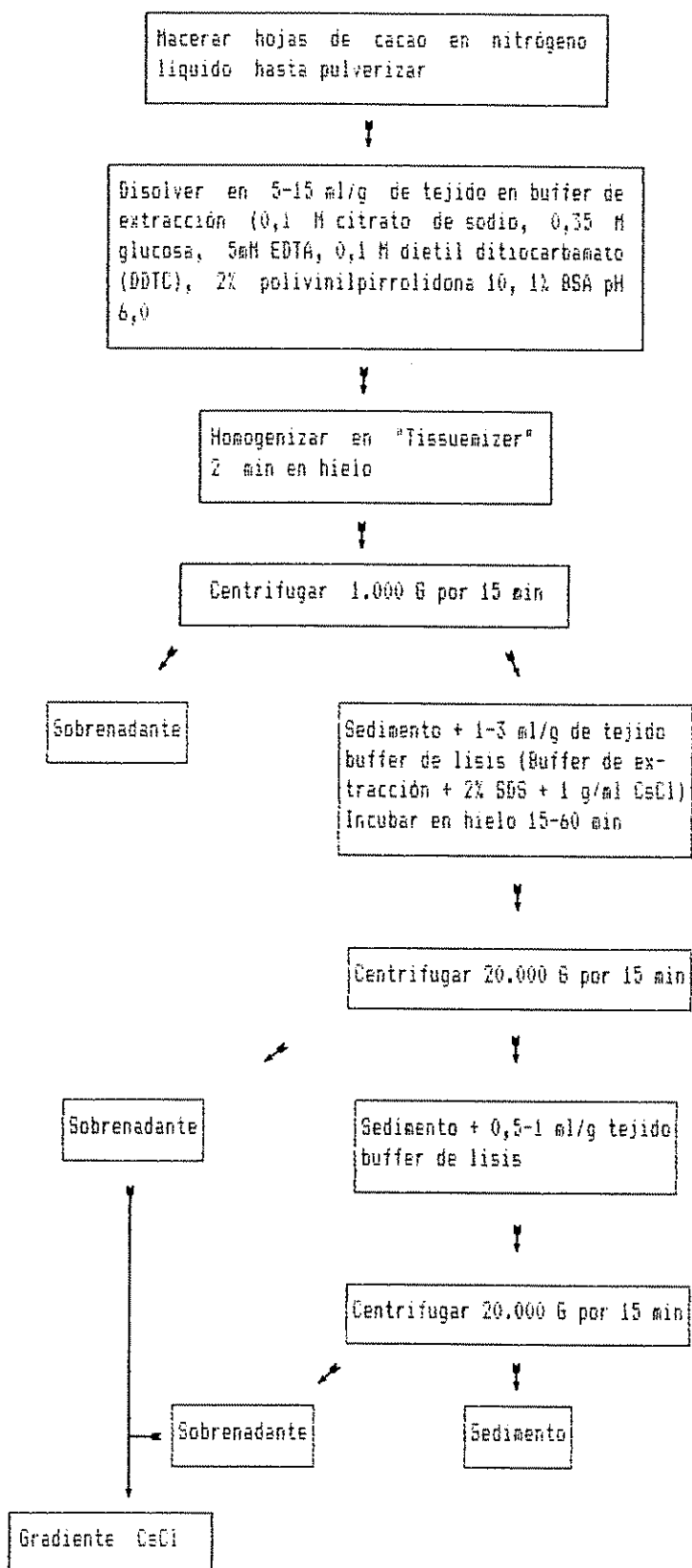


Figura 4. Prodedimiento de extracción III.

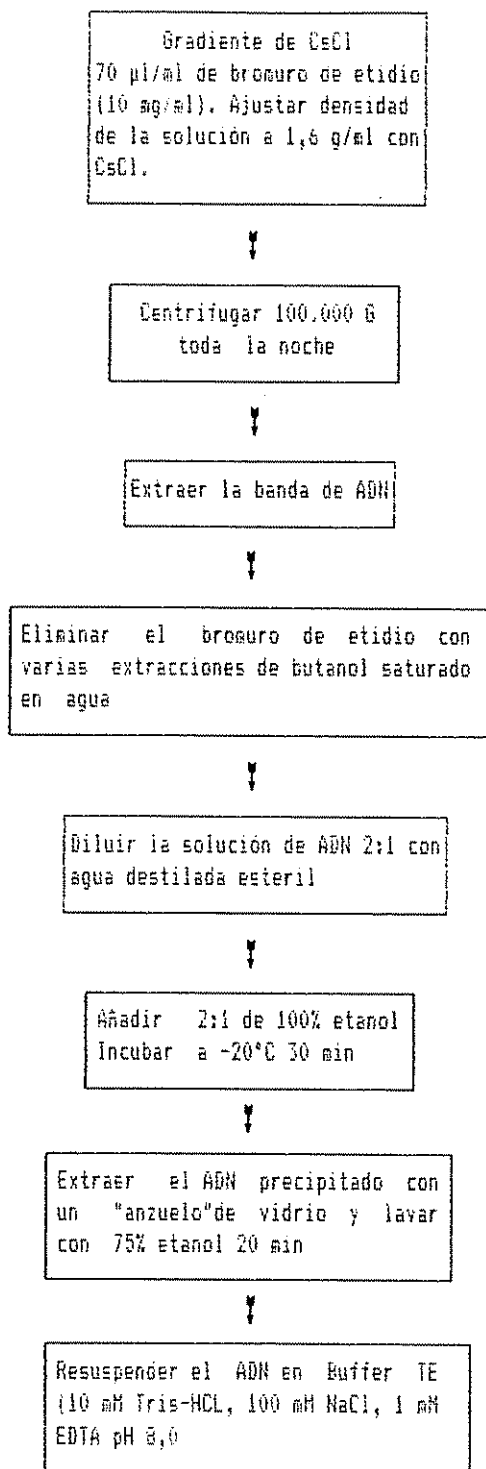


Figura 4. Prodedimiento de extracción III (continuación).

3.3 Sondas para la detección de RFLP.

Las sondas purificadas utilizadas para los análisis de RFLP fueron suministradas por el Laboratorio de Biología Molecular de Cacao de Penn State University, (Pennsylvania, U.S.A), a cargo del Dr. P. Fritz.

Las secuencias de ADN están clonadas en un vector Lambda y se amplificaron en *E. coli* cepa MB406. La multiplicación y purificación se realizó de acuerdo a los procedimientos descritos en Sambrook *et al.* (1989). En el Cuadro 2 se muestran algunas de las características de las sondas.

Dos de las secuencias probadas son heterólogas a un gen de la β -1,3-glucanasa de tabaco. Esta enzima ha sido asociada con la resistencia a enfermedades fungosas en otras especies. Otra de las secuencias contiene un gen de una proteína de reserva de 21 kilo Dalton (kD). La secuencia clonada se obtuvo a partir de una biblioteca de ADN complementario de semillas de 130 días después de la polinización.

3.4 Marcaje de la sonda con biotina.

El ADN total purificado de la sonda se marcó con biotina mediante la técnica de "nick-translation" usando el sistema de marcaje BioNick™ (BRL). De 1-5 μ g de ADN se colocaron con 5 μ l de mezcla dNTP 10x (0,2 mM dCTP, dGTP, dTTP, 0,1 mM dATP, 0,1 mM biotin-14-dATP, 500 mM Tris-HCl pH 7,8; 50 mM

Cuadro 2. Características de las sondas empleadas para el análisis de RFLP.

SONDA	VECTOR /A	ORIGEN /B	CARACTERÍSTICAS	ENZIMA QUE LIBERA FRAGMENTO CLONADO
21kD	Lambda (gt10)	cADN	1 Kb gen de una proteína de reserva de semilla de 21 kD	Eco RI
#4	Lambda (gt11)	gADN	11 Kb secuencia heteróloga a un gen de β -1,3-glucanasa	Sfi I
#12	Lambda (gt11)	gADN	12 Kb secuencia heteróloga a un gen de β -1,3-glucanasa	Sfi I

/A gt10 y gt11= Promega Biotech Company, Madison, Wis. USA.

/B cADN= biblioteca de ADN complementario.

gADN= Biblioteca de ADN genómico.

MgCl₂, 100 mM β-mercaptoetanol, 100 µg/ml BSA libre de nucleasas) y 5 µl de mezcla enzimática 10x (0,5 unidades/µl de ADN Polimerasa I, 0,0075 unidades/µl de DNasa I, 50 mM Tris-HCl pH 7,5; 5mM acetato de magnesio, 1mM β-mercaptoetanol, 0,1 mM fenilmetilsulfonil fluoruro, 50% glicerol, 100 µg/ml BSA libre de nucleasas). El volúmen final de la reacción fue de 50 µl, ajustándose con agua destilada esteril. La mezcla se incubó por una hora a 16°C.

Para separar la sonda marcada de los nucleótidos no incorporados se utilizaron cualquiera de dos procedimientos: 1) cromatografía en columnas con Sephadex G-50, 2) doble precipitación con etanol, según la metodología descrita en Sambrook et al. (1989).

1) Cromatografía de columna:

Unos 10g de la resina Sephadex G-50 (Pharmacia) se hidrataron en agua bidestilada esteril toda la noche. Posteriormente se empacó en una columna de 15x1 cm y se equilibró con varios volúmenes de buffer 1x SSC (0,15 M NaCl, 15 mM citrato de sodio pH 7,0) 0,1% SDS. La mezcla con la sonda marcada se colocó sobre la columna e inmediatamente se comenzaron a coleccionar alícuotas de 15 gotas c/u. Para determinar en cual de las alícuotas se encontraba la sonda se tomó 1 µl de cada una de las muestras y se colocaron en un filtro de nitrocelulosa procediendo luego a su detección colorimétrica (ver sección 3.8.1).

2) Precipitación con etanol:

A la mezcla conteniendo la sonda marcada se le añadieron 1/10 de volumen de 3M acetato de sodio y dos volúmenes de etanol absoluto frío incubándose durante 2 horas a -20°C con el fin de precipitar el ADN. Posteriormente se centrifugó durante 10 min en una microcentrífuga de mesa Bekman E (Bekman Instruments, Inc. Palo Alto, Calif. USA.). El sobrenadante se descartó y el sedimento se resuspendió en 50 μl de agua destilada esteril, repitiéndose el mismo procedimiento de precipitación. Finalmente, el sedimento con la sonda marcada se resuspendió en 200 μl de buffer TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 7,5).

3.5 Digestión del ADN de cacao.

Aproximadamente 2 μg de ADN genómico fueron digeridos con 10 unidades de EcoR I, Hae III, Hind III o Pst I (BRL) a 37°C de 4-10 horas de acuerdo a las instrucciones del fabricante, en un volumen final de 20 μl . Las secuencias reconocidas por estas enzimas y la posición del clivaje se muestran en el Cuadro 3.

La digestión se detuvo con 2 μl de 10x buffer: 50% (v/v) glicerol, 0,1 M EDTA, 1 % (p/v) SDS y 0,1 % azul de bromofenol.

Cuadro 3. Características de las enzimas de restricción usadas para generar los fragmentos.

ENZIMA	SECUENCIA DE RECONOCIMIENTO	PROCEDENCIA
EcoR I	5´G/AATTC3´	<u>Escherichia coli</u> RY13
Hae III	5´GG/CC3´	<u>Haemophilus aegyptius</u>
Hind III	5´A/AGCTT3´	<u>Haemophilus influenza</u>
Pst I	5´CTGCA/G3´	<u>Providencia stuartii</u>

3.6 Electroforesis en geles de agarosa.

El ADN digerido se separó mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa al 0,8 %. Las electroforesis se corrieron a 20 volts toda la noche a 4°C ó a 50 volts por 6 horas a temperatura ambiente en buffer TAE 1x (40 mM Tris-Acetato, 1mM EDTA pH 8,2) en presencia de 0,5 µg/ml de bromuro de etidio. Se incluyeron como marcadores de peso molecular ADN de Lambda digerido con EcoR I (BRL) y ADN de Lambda digerido con BstE II (New England BioLabs, Beverly, Mass., USA) con un rango de 702-23.130 pb.

Los geles se iluminaron con luz UV (302 nm) y se fotografiaron con una cámara Polaroid modelo DS34 (Polaroid Corporation, Cambridge, Mass., USA) y película Polaroid tipo 667 para guardar un registro de los mismos.

3.7 Transferencia de Southern.

El ADN se transfirió de los geles a filtros de nitrocelulosa (Schleicher & Schuell, Keene, N.H., USA.) o membranas de Nylon (BRL) usados como soportes, mediante la técnica de Southern descrita en Southern (1975).

Luego de finalizada la electroforesis los geles se incubaron durante 10 min en una solución de 0,2 N HCl para depurar el ADN; por 1 hora en una solución 1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH para desnaturalizar el ADN y por 1 hora en una solución 1 M Tris-HCl, 1,5 M NaCl pH 7,4 con el fin de

neutralizar. Los geles se colocaron luego sobre papel de filtro impregnado en buffer de transferencia (10x SSC), colocándose sobre los geles invertidos las membranas hidratadas previamente por 5-15 min en el mismo buffer de transferencia y sobre éstas papel de filtro también embebido en el mismo buffer. Sobre el papel de filtro se colocaron servilletas de papel secas con el fin de que absorvieran el líquido y de esta forma transferir el ADN del gel al filtro. Sobre todo se colocó un peso de unos 500 g. La transferencia se desarrolló toda la noche. Los filtros se lavaron posteriormente durante 5 min en 6x SSC y se secaron al vacío por 2 horas a 80°C. Antes de ser descartados, los geles se retañeron en solución de bromuro de etidio (0,5 µg/ml en 1x TAE) por 2-3 horas y fueron reexaminados en luz UV (302 nm) para determinar si la transferencia había sido completa.

3.8 Detección de polimorfismo.

Para la detección de RFLP los filtros que contenían el ADN digerido fueron hibridizados con una sonda marcada con biotina. La visualización de la hibridación se realizó mediante dos métodos: BluGene™ (BRL) y PhotoGene™ (BRL), a ser comparados. Con el primer método la sonda se detecta mediante una reacción colorimétrica, con el segundo método mediante una reacción de luz.

3.8.1 Hibridación y detección con BluGene™

En este sistema se utilizaron únicamente los filtros de nitrocelulosa. Los filtros secos, guardados al vacío, con el ADN digerido se prehibridizaron a 42°C por 4 horas en 35 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ de una solución de 50% formamida, 5x SSC (0,75 M NaCl, 80 mM citrato de sodio pH 7,0), 5x Denhardt's (0,1% Ficoll, 0,1% BSA, 0,1% polivinilpirrolidona; SIGMA, St. Louis, Mo. USA), 25 mM fosfato de sodio pH 6,5 y 0,5 mg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado. La solución de prehibridación se sustituyó por solución de hibridación (50 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$) que contenía 45% formamida, 5X Denhardt's, 20 mM fosfato de sodio pH 6,5, 5% sulfato de dextrano, 0,2 mg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado y sonda marcada desnaturalizada por calentamiento a 100°C por 10 min. La hibridación se realizó a 42°C durante toda la noche.

Posteriormente se procedió a lavar los filtros dos veces por tres min c/u en 2X SSC, 0,1% SDS a temperatura ambiente; dos veces por tres min c/u en 0,2x SSC, 0,1% SDS a temperatura ambiente; 2 veces por 15 min c/u en 0,16x SSC, 0,1% SDS a 50°C y una enjuagada en 2x SSC a temperatura ambiente.

La detección colorimétrica de la sonda se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los filtros se lavaron por un minuto en buffer 1 (0,1 M Tris-HCl 0,15 M NaCl pH 7,5) y se incubaron a 65°C por una hora en solución bloqueadora (3% BSA en buffer 1). Luego se incubaron con el

conjugado estreptavidina-fosfatasa alcalina (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) en buffer 1 (70 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$) durante 10 min, se lavaron dos veces por 15 min c/u en buffer 1 y una vez por 10 min con buffer 3 (0,1 M Tris-HCl, 0,1 M NaCl, 50 mM MgCl₂ pH 9,5).

Para visualizar los patrones RFLP los filtros de nitrocelulosa se incubaron unas tres horas con 330 μg de nitro-azul de tetrazolium (NBT) y 166 μg de 5-bromo-4cloro-3-indolilfosfato (BCIP) en 75 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ de buffer 3. La reacción colorimétrica se detuvo añadiendo buffer 20 mM Tris-HCl, 0,5 mM EDTA.

3.8.2 Hibridación y detección con PhotoGene™

Se siguió el procedimiento descrito por el fabricante. Las membranas de nylon con el ADN transferido se prehibridizaron durante 4 horas a 42°C en 250 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ de una solución que contenía: 50% formamida, 6x SSPE (60 mM NaH₂PO₄, 0,9 M NaCl, 6mM EDTA pH 7,4), 5x Denhardt's, 0,5% Sarcosyl y 0,2 mg/ml ADN de esperma de salmón desnaturalizado. Seguidamente la hibridación se efectuó a la misma temperatura, durante toda la noche, sustituyendo la solución de prehibridación con 100 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ de solución: 50% formamida, 6X SSPE, 5X Denhardt's, 10% sulfato de dextrano, 0,2 mg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado y sonda marcada desnaturalizada por calentamiento (100°C por 10 min). Posteriormente las membranas se lavaron dos veces con 5x SSC, 0,5% SDS a 65°C por 5 minutos c/u; una vez con 0,1x SSC, 1%

SDS a 50°C por 30-60 min y una vez con 2x SSC a temperatura ambiente por 5 min.

Para la detección de la sonda se lavaron las membranas con TBS-Tween (100 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,05% Tween 20) por 1 min, se incubaron en solución bloqueadora (3% BSA en TBS-Tween, 0,75 ml/cm²) a 65°C una hora y se incubaron por 10 min a temperatura ambiente con 1 µg/ml de conjugado estreptavidina-fosfatasa alcalina en TBS-Tween (70 µl/cm²). Seguidamente se procedió a lavar las membranas dos veces en TBS-Tween por 15 min c/u y 1 hora a temperatura ambiente en 1 ml/cm² de buffer de lavado final (suministrado por el fabricante) diluido 1:10. Las membranas se colocaron luego en un sobre de material plástico transparente y se añadieron 10 µl/cm² de reactivo de detección (4-metoxi-4-(3-fosfatofenil) espiro[1,2-dioxietano-3,2'-adamantano]) en 0,75 M de 2-amino-2-metil-1-propanol y activadores). El filtro se incubó a temperatura ambiente por unas 3-4 horas para proceder a detectar la luz emitida utilizando película Kodak Ortho-M para rayos-X. El tiempo óptimo de exposición fue de unos 30 min a temperatura ambiente.

Con este sistema se probó rehibridizar las membranas de nylon eliminando primero la sonda por calentamiento a 100°C por 15 min en 0,1x SSC, 0,1% SDS y luego lavando en 6x SSPE por 5 min a temperatura ambiente. Las membranas se dejaron secar al aire por unos 60 min, guardándose luego al vacío.

3.9 Análisis de los fragmentos.

El peso molecular de las bandas observadas, con cualquiera de los dos métodos de detección, se estimó mediante ajuste de regresión de un modelo logarítmico a partir de los marcadores Lambda/Hind III y Lambda/Est EII con fragmentos de peso molecular conocido.

4. RESULTADOS

4.1 Aislamiento del ADN de cacao.

Se utilizaron tres protocolos diferentes de extracción de ADN modificados de Dellaporta *et al.* (1983), Doyle y Doyle (1990) y Couch y Fritz (1990).

Con el primer procedimiento se logró aislar el ADN de cacao. El material obtenido, sin embargo, a pesar de que fluorescía con luz UV al ser teñido con bromuro de etidio, indicando la presencia de ADN, se encontraba precipitado, no migrando en los geles de agarosa (1%).

Utilizando el segundo procedimiento de extracción no se logró aislar el ADN. El resultado de la lisis fue un material espeso difícil de manipular. Así mismo la clarificación era ineficiente por lo que el ADN precipitado con isopropanol contenía otras impurezas. Se probaron tres concentraciones de CTAB (1, 2 y 3%) y disminuir a la mitad la concentración de los componentes del buffer de extracción (de acuerdo con el método original de Saghi-Maroot *et al.*, 1984) sin obtenerse mejores resultados.

Con el tercer método se logró la extracción del ADN de cacao. Electroforesis en geles de agarosa (0,8 y 1%) revelaron la presencia de ADN de alto peso molecular (Fig. 5). Así mismo, el ADN aislado con este procedimiento fue digerido totalmente con enzimas de restricción (10 U/ μ g) en

una hora de incubación a 37°C (Fig. 6).

Siguiendo este método se lograron rendimientos máximos de 10 µg/g de tejido inicial. El ADN utilizado posteriormente para los análisis RFLP se obtuvo mediante este procedimiento de extracción.

En la Figura 5 se muestra también la manera como se determinó la concentración de ADN. Comparando la intensidad de fluorescencia de las líneas A y B se observa que la primera es aproximadamente el doble de la segunda y por tanto presenta el doble de la concentración. Estas bandas son comparadas con las de la línea C, de concentraciones conocidas, estimándose de esta manera un valor aproximado de la concentración de ADN en µg/µl.

4.2 Detección de polimorfismo.

Para comparar los sistemas de detección no radiactiva de ADN BluGene™ y PhotoGene™ se prepararon dos filtros con ADN de cacao digerido con Hind III y se hibridizaron a la sonda #12. Cada uno de los filtros se detectó utilizando uno de los dos sistemas. En la Fig. 7 se muestra el resultado obtenido mediante el sistema de BluGene™ y en la Fig. 8 con PhotoGene™. Como se puede observar, los patrones de bandas detectados con ambas metodologías son

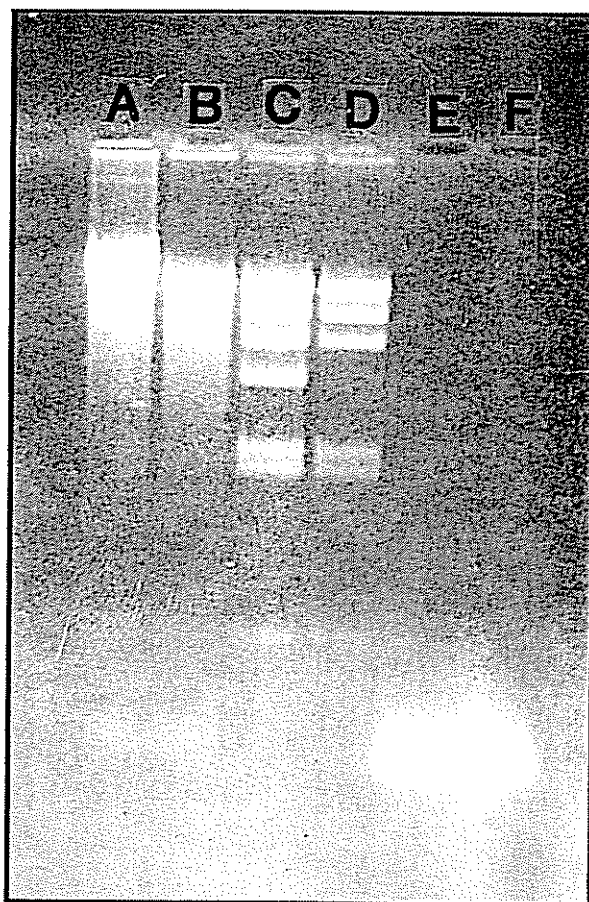


Figura 5. Electroforesis horizontal de agarosa (1%) del ADN de cacao purificado con el procedimiento de extracción III. A= ADN de alto peso molecular de CC-137; B= ADN de alto peso molecular de EET-183; C= Marcador Lambda digerido con Hind III calentado a 65°C por 10 min en 20 mM Tris-HCl (pH 8,0), 20 mM NaCl, 0,1 mM EDTA para romper los enlaces entre los extremos cohesivos y linealizar la molécula; D= Marcador Lambda digerido con Hind III sin el tratamiento anterior; E= ADN de Lambda degradado; F= ADN de Lambda degradado.

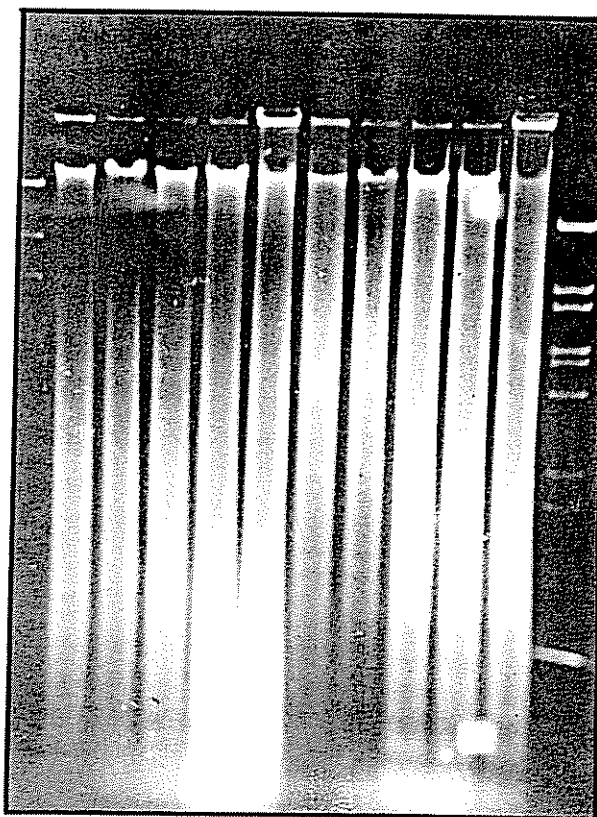


Figura 6. Electroforesis horizontal de agarosa (0,8%) del ADN de cacao (2 μg) digeridos con enzimas de restricción (10 U/ μg). A= Marcador Lambda digerido con Hind III, B= UF-273, C= CATONGO, D= EET-67, E= CC-137, digeridos con Hae III; F= UF-273, G= CATONGO, H= EET-67, I= CC-137, digeridos con Eco RI; J= Marcador Lambda digerido con Bst EII.

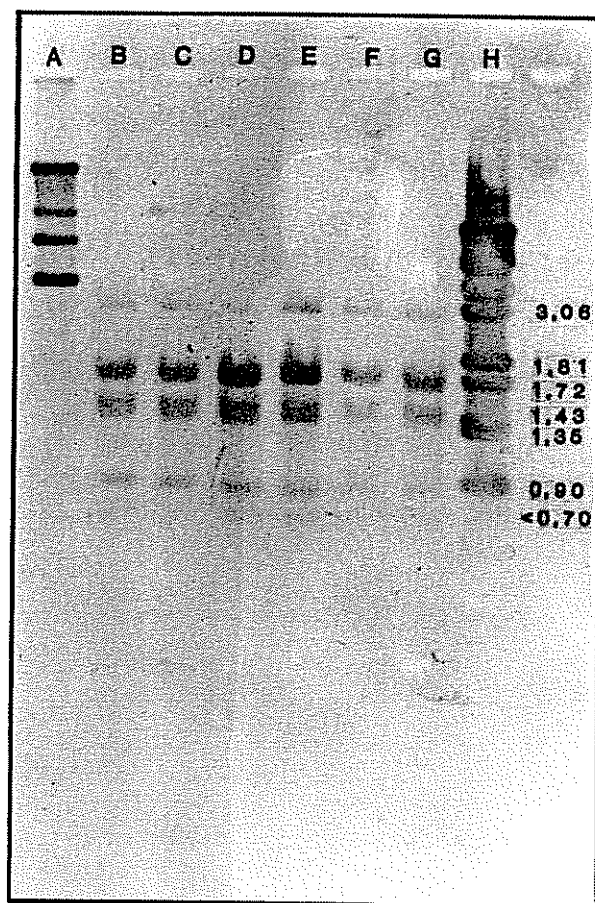


Figura 7. Análisis RFLP mostrando los pesos moleculares de los fragmento en Kb, del ADN total de cacao digerido con Hind III e hibridizados con la sonda # 12 (β -1,3-glucanasa). La detección se realizó con el sistema BluGene™ (BRL). A= Marcador Lambda digerido con Hind III; B= CC-132; C= UF-29; D= UF-273; E= EET-183; F= POUND-7; G= EET-75; H= Marcador Lambda digerido con BstE II.

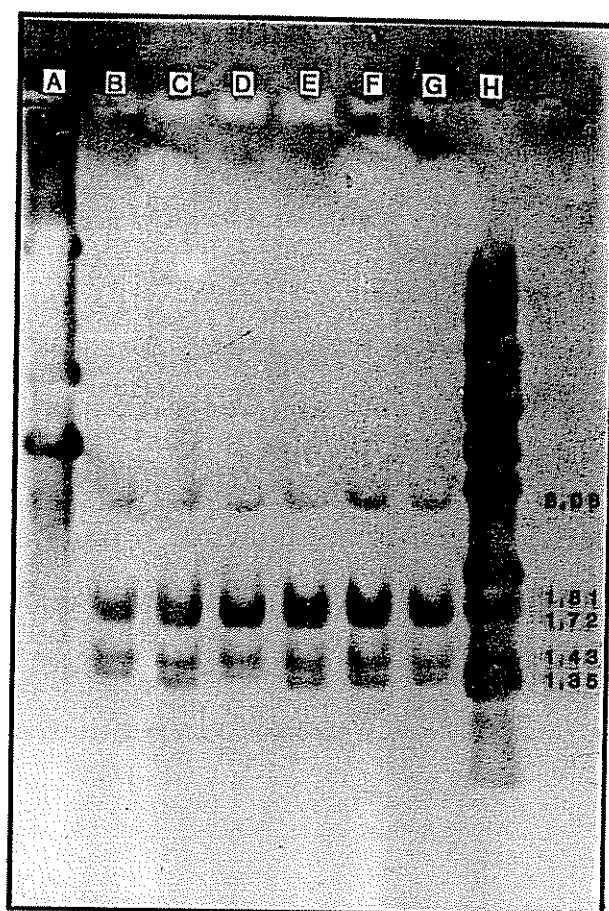


Figura 8. Análisis RFLP mostrando los pesos moleculares de los fragmento en Kb, del ADN total de cacao digerido con Hind III e hibridizados con la sonda # 12 (β -1,3-glucanasa). La detección se realizó con el sistema PhotoGene™ (BRL). A= Marcador Lambda digerido con Hind III; B= CC-137; C= POUND-7; D= EET-75; E= UF-221; F= EET-67; G= CATONGO; H= Marcador Lambda digerido con BstE II.

similares. Sin embargo, la detección con BluGene™ muestra dos bandas de bajo peso molecular (0,9 y <0,7 kb) que no se observaron con PhotoGene™. Esto se debe a que se transfirió al filtro para detectar con BluGene™ una mayor cantidad de ADN (3 µg) que la utilizada para la detección con PhotoGene™ (2 µg).

Las membranas de nylon que contenían el ADN de cacao fueron hibridizadas hasta cuatro veces y detectadas con PhotoGene™, sin observarse pérdida aparente en la intensidad de la señal. Los filtros de nitrocelulosa no fueron rehibridizados de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. El NBT y BCIP se unen irreversiblemente a los filtros y no pueden ser removidos.

4.3 Análisis de RFLP.

Con el fin de simplificar la interpretación de los resultados en el análisis de las bandas obtenidas en las hibridaciones, se tomaron en cuenta solamente aquellos fragmentos que presentaron las señales más fuertes.

Por otro lado, los pesos moleculares señalados corresponden a un promedio \pm la desviación estándar de los pesos moleculares calculados para fragmentos considerados similares entre los diferentes clones.

4.3.1 Sonda #12 (β -1,3-glucanasa).

El ADN de los clones de cacao digeridos con las cuatro enzimas de restricción (Hind III, Eco RI, Pst I y Hae III) se hibridizó a la sonda # 12 que contenía el gen de la β -1,3-glucanasa. En ninguno de los casos se logró la detección de polimorfismo entre los distintos clones de cacao.

En la hibridación de la sonda #12 con el ADN de UF-273, CC-137, EET-67, EET-183, EET-75, UF-221, POUND-7, CC-132, UF-29 y CATONGO digeridos con Hind III (Figs. 7 y 8) se observaron fragmentos de 3,06; 1,81; 1,72; 1,43; 1,35; 0,90; y <0,70 kilo bases (kb). Todos los clones estudiados presentaron un patrón de bandas similar. En el Cuadro 4 se presenta un resumen de los pesos moleculares \pm la desviación estándar.

El ADN digerido con Eco RI de los clones UF-273, CC-137, EET-183, UF-221 y POUND-7 hibridizado con la sonda #12 (Fig. 9), presentó en todos los casos un patrón de cuatro fragmentos de 5,70; 3,97; 1,27 y 0,97 kb respectivamente (Cuadro 5).

El ADN de los clones UF-273, CC-137, EET-183, UF-221 y POUND-7, digeridos con Pst I e hibridizados con la sonda #12 se presenta en la Fig. 10. Se encontraron dos fragmentos de pesos moleculares 14,24 y 4,40 kb. Todos los clones presentaron el mismo patrón (Cuadro 6).

En la hibridación del ADN de UF-273, CC-137, EET-67, EET-183, EET-75, UF-221, POUND-7, UF-29, UF-613 y CATONGO,

Cuadro 4. Longitud de los fragmentos observados al digerir los clones UF-273, CC-137, EET-67, EET-183, EET-75, UF-221, POUND-7, CC-132, UF-29 y CATONGO con Hind III, homólogos a la sonda # 12 correspondiente al gen de la β -1,3-glucanasa.*

FRAGMENTO	PESO MOLECULAR (kb)
1	3,06 \pm 0,19
2	1,81 \pm 0,07
3	1,72 \pm 0,06
4	1,43 \pm 0,05
5	1,35 \pm 0,03
6	0,90 \pm 0,02/A
7	< 0,70/A

/A Solo se observaron en la detección con BluGene™ (Fig. 7)

* Se presentan las medias \pm la desviación estándar.

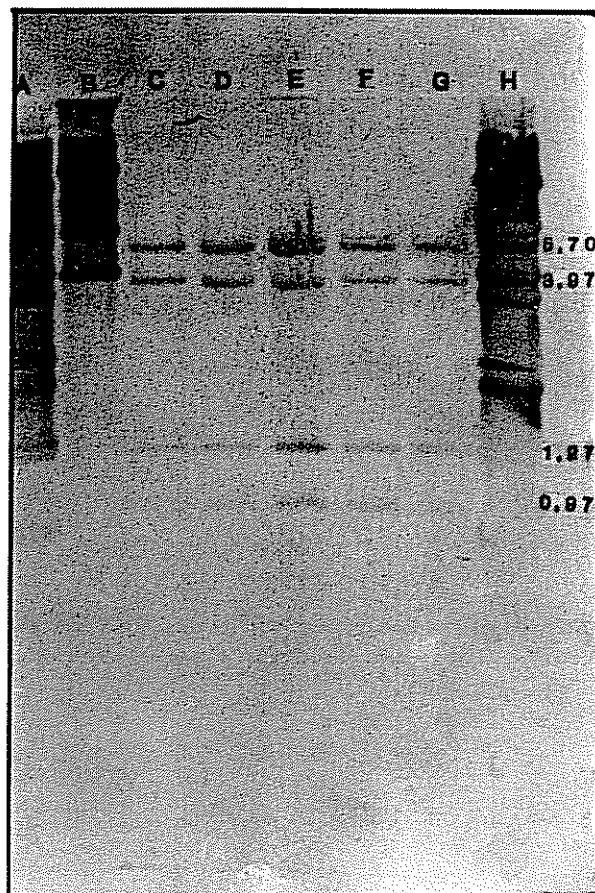


Figura 9. Análisis RFLP mostrando los pesos moleculares de los fragmento en Kb, del ADN total de cacao digerido con Eco RI e hibridizados con la sonda # 12 (β -1,3-glucanasa). La detección se realizó con el sistema BluGene™ (BRL). A= Marcador Lambda digerido con BstE II; B= Marcador Lambda digerido con Hind III; C= POUND-7; D= CC-137; E= EET-183; F= UF-273; G= UF-221; H= Marcador Lambda digerido con BstE II.

Cuadro 5. Longitud de los fragmentos observados al digerir los clones UF-273, CC-137, EET-183, UF-221 y POUND-7, con Eco RI, homólogos a la sonda # 12 correspondiente al gen de la β -1,3-glucanasa.*

FRAGMENTO	PESO MOLECULAR (kb)
1	5,70 \pm 0,15
2	3,97 \pm 0,07
3	1,27 \pm 0,00
4	0,97 \pm 0,01

* Se presentan las medias \pm la desviación estándar.

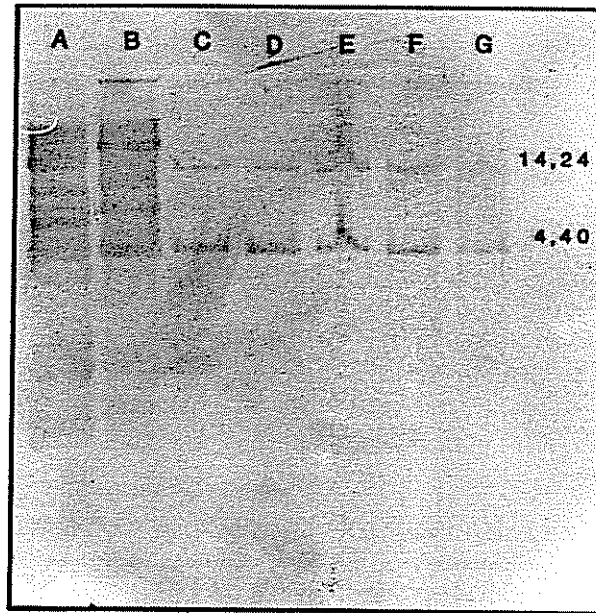


Figura 10. Análisis RFLP mostrando los pesos moleculares de los fragmento en Kb, del ADN total de cacao digerido con Est I e hibridizados con la sonda # 12 (β -1,3-glucanasa). La detección se realizó con el sistema BluGene™ (BRL). A= Marcador Lambda digerido con BstE II; B= Marcador Lambda digerido con Hind III; C= POUND-7; D= CC-137; E= EET-183; F= UF-273; G= UF-221.

Cuadro 6. Longitud de los fragmentos observados al digerir los clones UF-273, CC-137, EET-183, UF-221 y POUND-7, con Pst I, homólogos a la sonda # 12 correspondiente al gen de la β -1,3-gluconasa.*

FRAGMENTO	PESO MOLECULAR (kb)
1	14,24 \pm 0,00
2	4,40 \pm 0,00

* Se presentan las medias \pm la desviación estándar.

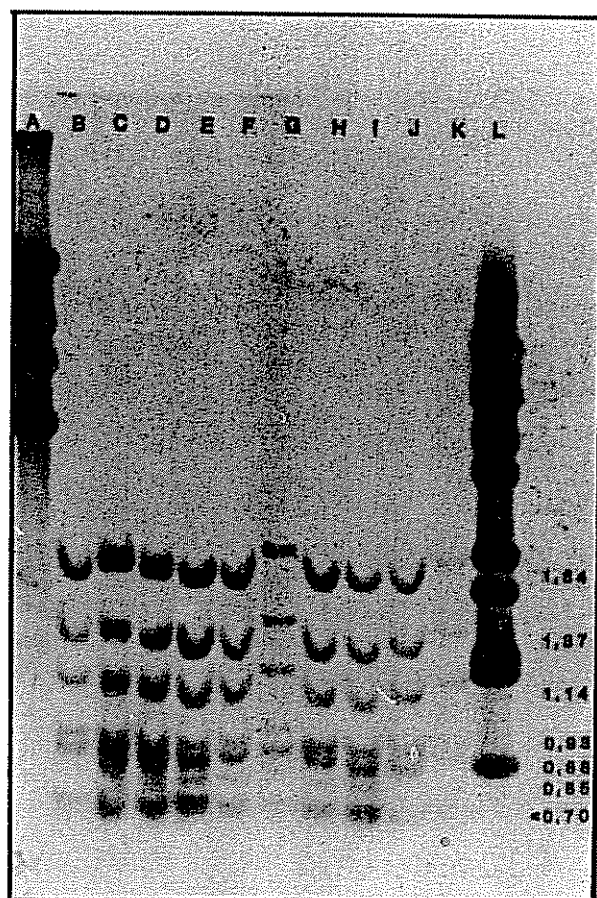


Figura 11. Análisis RFLP mostrando los pesos moleculares de los fragmento en Kb, del ADN total de cacao digerido con Hae III e hibridizados con la sonda # 12 (β -1,3-glucanasa). La detección se realizó con el sistema PhotoGene™ (BRL). A= Marcador Lambda digerido con Hind III; B= CATONGO; C= UF-613; D= EET-183; E POUND-7; F= EET-75; G= UF-29; H= EET-67; I= CC-137; J= UF-221; K= UF-273; L= Marcador Lambda digerido con BstE II.

Cuadro 7. Longitud de los fragmentos observados al digerir los clones UF-273, CC-137, EET-67, EET-183, EET-75, UF-221, POUND-7, UF-29, UF-613 y CATONGO, con Hae III, homólogos a la sonda # 12 correspondiente al gen de la β -1,3-glucanasa.*

FRAGMENTO	PESO MOLECULAR (kb)
1	1,84 \pm 0,16
2	1,37 \pm 0,06
3	1,14 \pm 0,05
4	0,93 \pm 0,04
5	0,88 \pm 0,03
6	0,85 \pm 0,02
7	< 0,70

* Se presentan las medias \pm la desviación estándar.

digeridos con la enzima Hae III (Fig. 11) se detectaron siete fragmentos de 1,84; 1,37; 1,14; 0,93; 0,88; 0,85 y <0,70 kb (Cuadro 7).

4.3.2 Sonda #4 (β -1,3-glucanasa).

La hibridación de la sonda #4 se realizó con el ADN de cacao digerido con Hind III, Eco RI y Hae III. En todos los casos la señal obtenida fue muy baja y solo se logró observar bandas en la digestión con Eco RI (Fig. 12).

En este último caso el ADN de UF-273, CC-137, EET-75, UF-221, POUND-7 y CC-132 presentó tres fragmentos de 10,72; 2,38 y 2,16 kb (Cuadro 8).

La digestión con Hind III se efectuó en los clones CC-137, EET-67, EET-75, UF-221, POUND-7 y CATONGO.

La digestión con Hae III incluyó a los clones UF-273, CC-137, EET-67, EET-183, EET-75, UF-221, POUND-7, UF-29, UF-613 y CATONGO.

4.3.3 Sonda 21kD (gen de proteína de reserva de semilla de 21 kD).

La sonda 21kD fue hibridizada con ADN digerido con Hind III, Eco RI y Hae III. En todas las combinaciones se encontró polimorfismo.

En la Fig. 13 se muestra el resultado de la hibridación con el ADN de los clones CC-137, EET-67, EET-75, UF-221, POUND-7 y CATONGO luego de la digestión con Hind III. Todos

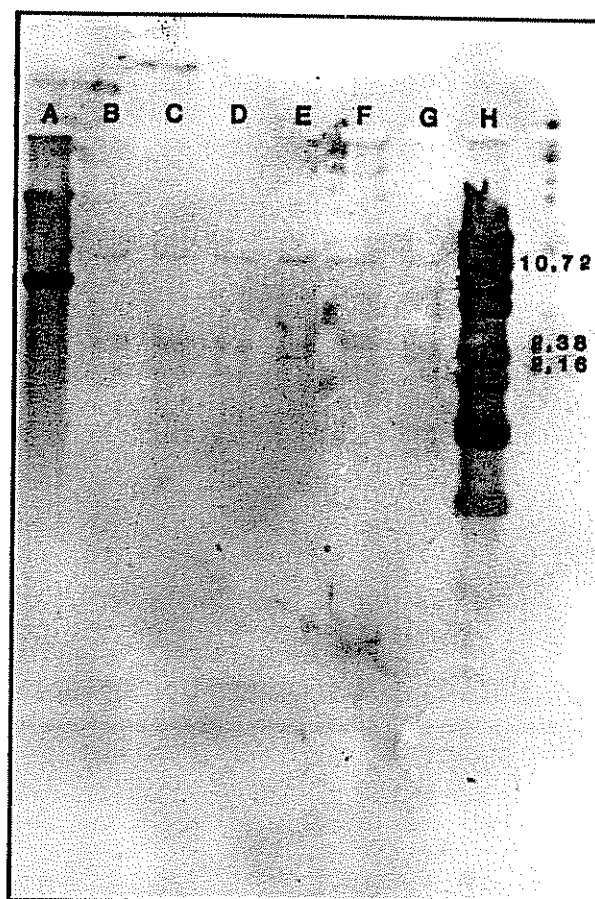


Figura 12. Análisis RFLP mostrando los pesos moleculares de los fragmento en Kb, del ADN total de cacao digerido con Eco RI e hibridizados con la sonda # 4 (β -1,3-glucanasa). La detección se realizó con el sistema BluGene™ (BRL). A= Marcador Lambda digerido con Hind III; B= UF-221; C= CC-137; D= CC-132; E= UF-273; F= POUND-7; G= EET-75; H= Marcador Lambda digerido con BstE II.

Cuadro 8. Longitud de los fragmentos observados al digerir los clones UF-273, CC-137, EET-75, UF-221, POUND-7 y CC-132 con Eco RI, homólogos a la sonda # 4 correspondiente al gen de la β -1,3-glucanasa.*

FRAGMENTO	PESO MOLECULAR (kb)
1	10,72 \pm 0,40
2	2,38 \pm 0,09
3	2,16 \pm 0,10

* Se presentan las medias \pm la desviación estándar.

los clones presentaron un fragmento de 0,99 kb. El fragmento de 2,95 kb se presentó solo en EET-67 y EET-75. De los tres fragmentos restantes (5,21; 4,48 y 3,95 kb), EET-67 y UF-221 presentaron los tres, CC-137, POUND-7 y CATONGO presentaron solo el mayor (5,21 kb) y el menor (3,95 kb), mientras que EET-75 presentó únicamente el fragmento intermedio (4,48 kb). El Cuadro 9 presenta el peso molecular de los fragmentos detectados \pm la desviación estándar.

El resultado de la hibridación del ADN de los clones UF-273, CC-137, EET-67, EET-75, POUND-7, UF-221, UF-29 y CATONGO digerido con Eco RI se muestra en la Fig. 14. En total se observaron cuatro fragmentos distintos. Todos los clones, excepto UF-29, presentaron un fragmento de 12,70 kb. EET-75, UF-221 y POUND-7 presentaron un fragmento de 16,27 kb. UF-29, por el contrario presentó un fragmento de 15,21 kb intermedio a estos dos últimos. El fragmento de 2,97 kb se presentó en todos los clones menos en EET-67. Los clones UF-273, CC-137, UF-221, POUND-7, UF-29 y CATONGO presentaron un fragmento pequeño de $< 1,90$ kb. El Cuadro 10 resume lo encontrado en la Fig. 14.

El patrón de bandas observado en la hibridación del ADN digerido con Hae III de los clones UF-273, CC-137, EET-67, EET-183, EET-75, POUND-7, UF-221, UF-29, UF-613 y CATONGO se muestra en la Fig. 15. En total se presentaron ocho fragmentos diferentes. Las bandas de 1,79 y $< 0,70$ kb fueron compartidas por todos los clones. La banda de 1,40 kb

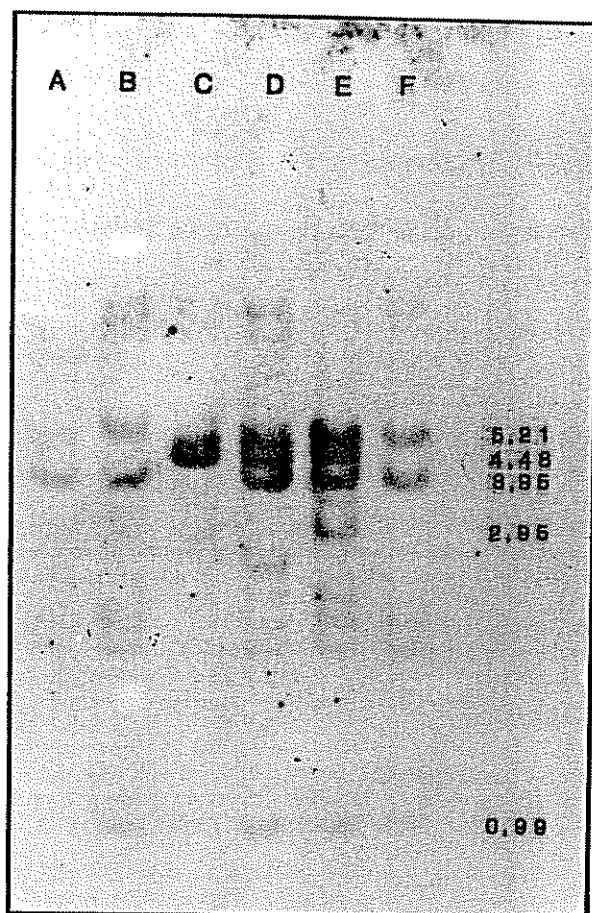


Figura 13. Análisis RFLP mostrando los pesos moleculares de los fragmento en Kb, del ADN total de cacao digerido con *Hind III* e hibridizados con la sonda 21kD. La detección se realizó con el sistema PhotoGene™ (BRL). A= CC-137; B= POUND-7; C= EET-75; D= UF-221; E= EET-67; F= CATONGO.

Cuadro 9. Longitud de los fragmentos (kb) más fuertes observados al digerir con Hind III, homólogos a la sonda 21kD.*

FRAG.	CC-137	EET-67	EET-75	POUND-7	UF-221	CATONGO
1	5,21 ±0,17	5,21 ±0,17	—	5,21 ±0,17	5,21 ±0,17	5,21 ±0,17
2	—	4,48 ±0,11	4,48 ±0,11	—	4,48 ±0,11	—
3	3,95 ±0,07	3,95 ±0,07	—	3,95 ±0,07	3,95 ±0,07	3,95 ±0,07
4	—	2,95 ±0,14	2,95 ±0,14	—	—	—
5	0,99 ±0,01	0,99 ±0,01	0,99 ±0,01	0,99 ±0,01	0,99 ±0,01	0,99 ±0,01

* Se presentan las medias ± la desviación estándar.

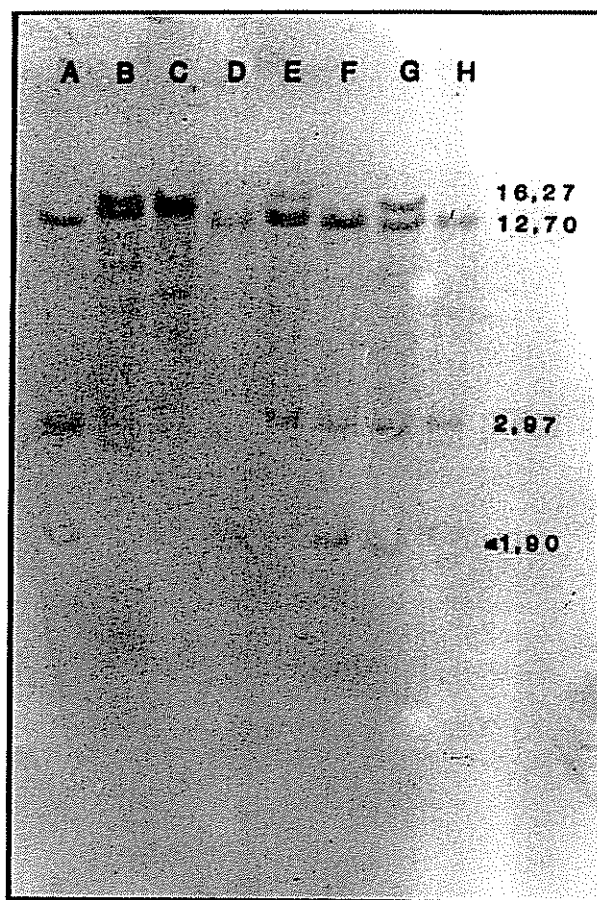


Figura 14. Análisis RFLP mostrando los pesos moleculares de los fragmento en Kb, del ADN total de cacao digerido con *Eco* RI e hibridizados con la sonda 21kD. La detección se realizó con el sistema BluGene™ (BRL). A= CATONGO; B= EET-75; C=UF-29; D= EET-67; E= POUND-7; F= CC-137; G= UF-221; H= UF-273.

Cuadro 10. Longitud de los fragmentos (kb) de señal más fuerte observados al digerir con Eco RI, homólogos a la sonda 21kD.*

FRAG.	UF-273	EET-67	EET-75	CC-137	POUND-7	UF-221	UF-29	CATON60
1	—	—	16,27 ±0,92	—	16,27 ±0,92	16,27 ±0,92		—
2	12,70 ±0,63	12,70 ±0,63	12,70 ±0,63	12,70 ±0,63	12,70 ±0,63	12,70 ±0,63	15,21	12,70 ±0,63
3	2,97 ±0,05	—	2,97 ±0,05	2,97 ±0,05	2,97 ±0,05	2,97 ±0,05	2,97 ±0,05	2,97 ±0,05
4	< 1,90	—	—	< 1,90	< 1,90	< 1,90	< 1,90	—

* Se presentan las medias ± la desviación estándar.

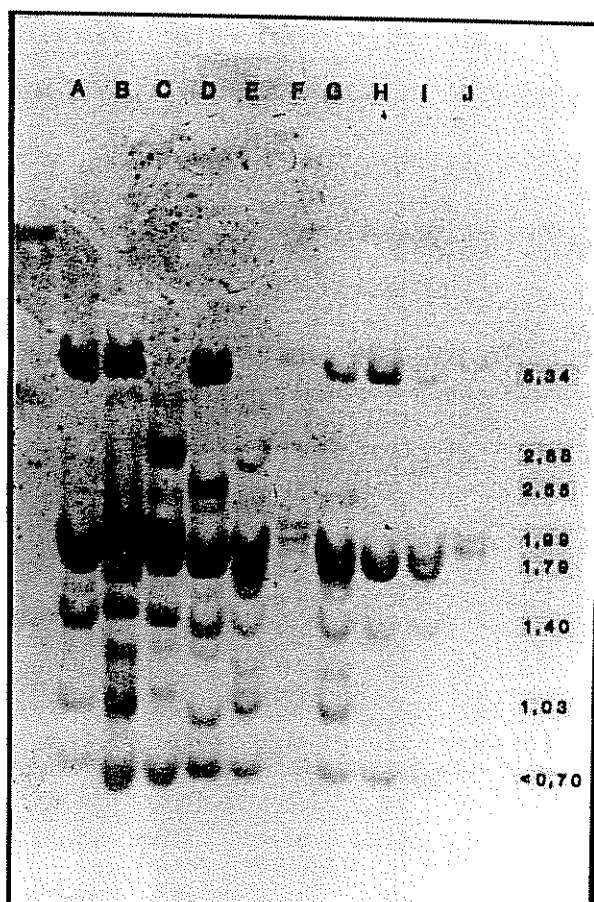


Figura 15. Análisis RFLP mostrando los pesos moleculares de los fragmento en Kb, del ADN total de cacao digerido con *Hae III* e hibridizados con la sonda 21kD. La detección se realizó con el sistema PhotoGene™ (BRL). A= CATONGO; B= UF-613; C= EET-183; D= POUND-7; E= EET-75; F= UF-29; G= EET-67; H= CC-137; I= UF-221; J= UF-273.

Cuadro 11. Longitud de los fragmentos (kb) de señal más fuerte observados al digerir con Hae III, homólogos a la sonda 21kD.*

FRAB.	UF-273	CC-137	EET-67	EET-183	EET-75	POUND-7	UF-221	UF-29	UF-613	CATON60
1	5,34 ±0,30	5,34 ±0,30	5,34 ±0,30	—	—	5,34 ±0,30	5,34 ±0,30	5,34 ±0,30	5,34 ±0,30	5,34 ±0,30
2	—	—	—	2,88 ±0,10	2,88 ±0,10	—	2,88 ±0,10	—	—	—
3	—	—	—	—	—	2,55 ±0,06	—	—	—	—
4	1,99 ±0,13	—	1,99 ±0,13	1,99 ±0,13	1,99 ±0,13	—	1,99 ±0,13	1,99 ±0,13	1,99 ±0,13	—
5	1,79 ±0,11	1,79 ±0,11	1,79 ±0,11	1,79 ±0,11	1,79 ±0,11	1,79 ±0,11	1,79 ±0,11	1,79 ±0,11	1,79 ±0,11	1,79 ±0,11
6	—	1,40 ±0,07	1,40 ±0,07	1,40 ±0,07	1,40 ±0,07	1,40 ±0,07	1,40 ±0,07	1,40 ±0,07	1,40 ±0,07	1,40 ±0,07
7	—	1,03 ±0,04	1,03 ±0,04	1,03 ±0,04	1,03 ±0,04	1,03 ±0,04	—	1,03 ±0,04	1,03 ±0,04	1,03 ±0,04
8	<0,70	<0,70	<0,70	<0,70	<0,70	<0,70	<0,70	<0,70	<0,70	<0,70

* Se presentan las medias ± la desviación estándar.

se presentó también en todos los clones menos en UF-273. El fragmento de 1,03 kb se presentó en todos los clones estudiados menos en UF-273 y UF-221. La banda de 5,34 kb se presentó en todos los clones menos en EET-183 y EET-75. Exepto CC-137, POUND-7 y CATONGO todos los demás clones presentaron una banda de 1,99 kb. Por el contrario, solo EET-183, EET-75 y UF-221 presentaron una banda de 2,88 kb, mientras que POUND-7 fue el único en presentar el fragmento de 2,55 kb. En el Cuadro 11 se presenta un resumen de los RFLP observados.

5. DISCUSION

5.1 Aislamiento del ADN

El aislamiento de ADN de plantas de alto peso molecular, adecuado para la digestión con enzimas de restricción, es un proceso muchas veces difícil debido a la gran cantidad de compuestos secundarios que éstas poseen. En el caso de T. cacao este proceso se dificulta debido al alto contenido en polifenoles que posee (Forsyth, 1952, 1955; Jalal y Collin, 1977) y que interactúan irreversiblemente con los ácidos nucleicos, interfiriendo en los procesos posteriores de digestión con enzimas de restricción (Couch y Fritz, 1990; Mirazón, 1988).

En el presente trabajo se probaron tres métodos de extracción con el fin de utilizar aquel que diera los mejores resultados (ADN de alto peso molecular, digerible por las enzimas de restricción) y a la vez fuese sencillo.

El método I resultaba el más sencillo, sin embargo no se logró aislar ADN de suficiente calidad para utilizarlo en el análisis RFLP. Probablemente el buffer de extracción era muy simple, por lo que no se inhibía la acción de fenoles y otros compuestos que coprecipitaban con el ADN. Así mismo la precipitación de proteínas con acetato de potasio resultó ineficiente, dejando contaminantes en la fracción de ADN. Esto originó un extracto de ADN precipitado que no migraba en

electroforesis de agarosa al 1%.

El procedimiento de extracción II se seleccionó debido a la simplicidad de la metodología y a que sus autores (Doyle y Doyle, 1990) señalan que ha sido utilizado con éxito en un gran número de especies vegetales dentro de varios taxones, por lo que se pensó podría dar buenos resultados con el cacao. En las pruebas iniciales se obtuvieron extractos de ADN viscosos, que dificultaban su manipulación, posiblemente por el gran contenido de polisacáridos y otros compuestos. Se probó variar la concentración de CTAB sin mejores resultados. Así mismo el proceso de clarificación con cloroformo:alcohol isoamílico no era eficiente, dejando la fracción de ADN con un color verdoso que al ser precipitado con isopropanol originaba una masa con gran cantidad de sustancias contaminantes. Por esta razón este procedimiento fue descartado.

El procedimiento de extracción III resultó el más eficiente, obteniéndose rendimientos de hasta 10 $\mu\text{g/g}$ con un ADN que era digerido por las enzimas de restricción. El buffer de extracción es el más completo. Contiene compuestos tales como la polivinilpirrolidona, que inhibe la acción de los fenoles y el dietil ditiocarbamato (DDTC), agente quelante de los iones Cu^{++} , los cuales son requeridos por las polifenoloxidasas para la oxidación de los fenoles a quinonas. Los rendimientos obtenidos, sin embargo, son menores a los señalados por Couch y Fritz (1990) de 20 $\mu\text{g/g}$

de tejido. Una explicación para esto es que el material vegetal de partida para la extracción fueron hojas traídas directamente del campo y no hojas de plantas cultivadas en el invernadero, como es el caso del trabajo original. Es posible que las condiciones variables del medio ambiente, así como la exposición continua a patógenos y depredadores origine la producción de una mayor cantidad de compuestos secundarios que disminuyan la eficiencia de la purificación. Así mismo el tipo de hojas recomendadas para la extracción son hojas jóvenes verdes, no totalmente expandidas (P. Fritz, comunicación personal), sin embargo, en muchos casos las hojas jóvenes presentan una coloración rojiza debido a la acumulación de antocianinas que posiblemente interfieren con la purificación. Se llegó a observar, cuando se utilizaba como material de partida este tipo de hojas, que no se formaba la banda de ADN luego del gradiente de CsCl, a pesar de prolongarse el tiempo de centrifugación. Esto puede ser debido a que las antocianinas enmascaren el ADN cuando éste es iluminado con luz UV en presencia de bromuro de etidio. También es posible que el contenido de polisacáridos en estas hojas sea alto (Thimann *et al.*, 1951; Creaser *et al.*, 1981), lo cual se sabe dificulta la visualización de la banda de ADN en el gradiente de CsCl (Sambrook *et al.*, 1989).

La utilización de hojas verdes ya maduras en vez de hojas jóvenes, para tratar de evitar el problema antes mencionado, dió como resultado la extracción de ADN

precipitado que migraba poco o nada en los geles de agarosa (0,8%). Esto coincide con lo obtenido por Couch y Fritz (1990), quienes recomiendan utilizar preferiblemente las hojas más jóvenes.

5.2 Detección de Plimorfismo

La hibridación de ácidos nucleicos inmobilizados en soportes sólidos con sondas marcadas es una metodología básica muy difundida con aplicación tanto en investigación como en diagnóstico. En la reacción de hibridación más utilizada las sondas son marcadas con radioisótopos, permitiéndolo que se reasocien a las secuencias homólogas del ADN inmobilizado. Posteriormente la sonda se detecta mediante autorradiografía, utilizando para ello película para rayos X. Sin embargo, los compuestos radiactivos presentan problemas en su desecho, peligros a la salud, vida corta, y costos elevados (Gebeyehu *et al.*, 1987). Por esta razón se han desarrollado sistemas de marcaje y detección que no presenten los problemas de los radioisótopos.

Una alternativa ha sido la utilización de nucleótidos marcados con biotina, basándose en la alta afinidad que presenta la avidina (o la estreptavidina) por este sustrato, lo cual permite su posterior detección. Los sistemas de BluGene™ y PhotoGene™, ambos de BRL, utilizan este principio. BluGene™ puede detectar hasta 0,25 pg de ADN

marcado con biotina mediante una reacción colorimétrica. Una fosfatasa alcalina, conjugada a la estreptavidina, cataliza la producción de un compuesto coloreado a partir del nitroazul de tetrazolium (NBT) y del 5-bromo-4cloro-3-indolilfosfato (BCIP).

PhotoGene™ utiliza básicamente el mismo principio, sin embargo, el sustrato de la fosfatasa alcalina es un compuesto muy estable: 4-metoxi-4-(3-fosfatofenil) espiro[1,2-dioxietano-3,2'-adamantano], que al ser defosforilado se transforma en un dioxietano inestable capaz de emitir luz (Carlson et al., 1990). La detección se realiza entonces utilizando una película para rayos X. Con este sistema se pueden visualizar hasta 0,1 pg de ADN marcado.

De acuerdo a los resultados obtenidos se encontró que ambos sistemas fueron igualmente útiles en la detección de RFLP en cacao. PhotoGene™, sin embargo, presentó la ventaja de que pudo ser reusado por lo menos cuatro veces. Esto permite la hibridación de una misma membrana con múltiples sondas, acelerando el proceso de análisis de RFLP y disminuyendo los costos.

La rehibridación de las membranas de nylon detectadas con PhotoGene™ es simple y no requiere la utilización de reactivos costosos. Así mismo con este sistema, debido a que la detección final se realiza mediante una impresión fotográfica, se pueden regular los tiempos de exposición hasta obtener la señal deseada.

La rehibridación de los filtros de nitrocelulosa no se probó ya que no es recomendado por el fabricante. Sin embargo, Gebeyehu et al. (1987) realizaron la rehibridación de membranas de nylon que fueron detectadas usando BluGene™. La metodología para eliminar el compuesto coloreado y la sonda son complicados, requiriendo de la utilización de diversos reactivos, muchos de ellos costosos (proteínasa K, dimetilformamida, formamida, etc.). Así mismo, el resultado no fue muy exitoso ya que disminuyó la intensidad de la señal. Por tanto no se probó tampoco la rehibridación con membranas con nylon utilizando el sistema de BluGene™.

La detección con BluGene™ presenta la ventaja de ser más simple y rápida que con PhotoGene™. Por tanto, la preferencia de uno u otro método depende del tipo de trabajo que se desee realizar. En el caso de análisis de RFLP el sistema PhotoGene™ resultó ser el más conveniente.

5.3 Análisis de RFLP

Uno de los objetivos de este trabajo fue el de tratar de identificar marcadores que permitieran diferenciar los clones resistentes a la Moniliasis de los susceptibles. Es por ello que se probaron las sondas #4 y #12 que contienen secuencias heterólogas al gen de la β -1,3-glucanasa en tabaco. Esta enzima, junto con la quitinasa (ambas hidrolasas), pertenece al grupo de las proteínas asociadas a la patogenicidad (PR),

que se acumulan en las plantas infectadas por hongos, bacterias, virus y viroides (Kauffman et al., 1987; Vera et al., 1989) y que han sido asociadas a la resistencia.

La β -1,3-glucanasa actúa coordinadamente con la quitinasa (Vögeli et al., 1988), sin embargo, la quitinasa no posee un sustrato conocido en las plantas y la calosa (sustrato de la β -1,3 glucanasa) se encuentra en pequeñas cantidades. La quitina y el β -1,3 glucano, por el contrario, forman parte importante en la composición de la pared celular de los hongos, pudiendo representar los sustratos naturales de estas enzimas (Mauch et al., 1988).

La β -1,3-glucanasa y la quitinasa son inducidas por infecciones, etileno, e inductores de las fitoalexinas (Felix y Meins, 1987; Vögeli-Lange et al., 1988; Kendra et al., 1989). Así mismo han sido encontradas en muchas especies de planta superiores tales como el tabaco, tomate, melón, soya y arveja (Benhamou et al., 1989). Su efecto fungitóxico puede ser tanto directo como indirecto. La acumulación de estas enzimas en las plantas resistentes ocasiona, por un lado, la lisis de las hifas de hongos patógenos, inhibiendo su crecimiento (Mauch et al., 1988; Benhamou et al., 1989). Por otro lado, los fragmentos de β -glucano generados por la hidrólisis de los polímeros mayores en la pared celular de los hongos, funcionan como inductores de las fitoalexinas, antibióticos de amplio espectro que se acumulan en las plantas resistentes (Ryan, 1988; Ebel y Grisebach, 1988),

amplificando la respuesta defensiva.

Es por esta evidencia que se pensó que la β -1,3-glucanasa podía estar involucrada en los mecanismos de resistencia de los clones de cacao, lo que permitiría detectar diferencias en los patrones de RFLP de las plantas susceptibles y resistentes. En pruebas preliminares se ha encontrado que esta enzima se expresa en los tejidos de cacao.

Las sondas utilizadas en este trabajo fueron aisladas de una librería genómica de cacao y son heterólogas a un gen de β -1,3-glucanasa de tabaco (Vögeli *et al.*, 1988) bajo condiciones de 70% de homología (T. Snyder, comunicación personal).

A pesar de que las dos sondas corresponden al gen de la β -1,3-glucanasa se encontró una gran diferencia en sus resultados. Con la sonda #4 siempre se obtuvo una señal muy baja que impidió, en muchos casos, la observación de las bandas, mientras que la sonda #12 sí originó bandas visibles. La diferencia en la señal obtenida con ambas sondas del gen de la β -1,3-glucanasa puede deberse a que sus secuencias corresponden a genes diferentes que codifican enzimas similares. Joosten y De Wit (1989) encontraron dos formas de esta enzima en plantas de tomate infectadas con Cladosporium fulvum con distintos pesos moleculares, aunque serológicamente muy relacionadas. Es posible entonces que ambas formas presenten en el tomate una estructura primaria y

terciaria muy similar, por lo que se da la reacción cruzada del antisuero. Por tanto, ambos genes deben presentar una secuencia de bases similar. Se puede pensar, en base a esto, que en el caso del cacao también pueden estar presentes al menos dos genes de la β -1,3-glucanasa con cierta homología en sus secuencias, pero que codifican formas distintas de la misma enzima. La hibridación de ambas secuencias con la sonda de tabaco indica la existencia de homología entre las dos. Posiblemente la secuencia de la sonda #4 se encuentra en bajo número en el genoma de cacao, por lo que la señal no es muy fuerte (Chang *et al.*, 1988), mientras que la secuencia de la sonda #12 está presente en mayor número.

Con la sonda #12 las bandas fueron observadas claramente, pero no se logró la detección de polimorfismo con ninguna de las enzimas de restricción empleadas.

El gen de la β -1,3-glucanasa constituye, entonces, una secuencia altamente conservada en el genoma de *T. cacao*. Más aún la β -1,3-glucanasa es ubicua en las plantas superiores (Kauffman *et al.*, 1987), por lo que debe ser un gen muy conservado entre diferentes taxones. Prueba de esto es la homología existente entre el gen de tabaco y los genes de cacao, pertenecientes a distintas familias.

A pesar de no detectarse diferencias genéticas entre los clones de cacao resistentes y susceptibles a la Moniliasis, utilizando la sonda de la β -1,3-glucanasa, se debe señalar que la acción de esta enzima puede ser, por

tanto, uno de varios mecanismos protectivos que presentan las plantas de cacao para defenderse del ataque de patógenos. La acumulación de esta enzima en el tejido resistente es uno de los eventos tempranos que limita la diseminación de hongos fitopatógenos (Benhamou *et al.*, 1989).

Es muy posible, como señala Phillips (1986), que la resistencia de los clones de cacao a *Monilia* sea un carácter cuantitativo, debido a la acción de varios genes en conjunto, siendo el gen de la β -1,3-glucanasa solo una parte de ese conjunto y por tanto no permite la caracterización total de individuos susceptibles y resistentes.

Por otro lado, la presencia de un gen en un individuo no indica nada sobre su expresión. No sabemos si existen diferencias en la producción y acumulación de esta enzima en los tejidos infectados de cacao de los distintos clones.

Es necesario probar, sin embargo, la misma sonda con otras enzimas de restricción, de manera que se cubran con las enzimas otras secuencias del genoma, aumentando así la probabilidad de detectar polimorfismo.

La sonda 21kD, a diferencia de los casos anteriores, permitió la detección de polimorfismo, observándose múltiples bandas con todas las enzimas de restricción utilizadas (Hind III, Eco RI, Hae III). Esto indica la presencia de múltiples copias de este gen en el genoma de cacao, así como rearrreglos en el ADN.

Los RFLP se generan por alteraciones en la longitud de

los fragmentos de restricción, causados por cambios en la distancia entre los sitios de reconocimiento de una enzima de restricción (Apuya et al., 1988). Esto puede ocurrir por la ganancia o pérdida de un sitio de reconocimiento, debido a una mutación puntual, o por un rearrreglo del ADN que aumenta (o disminuye) la distancia entre los sitios de reconocimiento (Apuya et al., 1988). Estos rearrreglos pueden ser debidos a inserciones, deleciones, inversiones o substituciones (Helentjaris et al., 1988; Bonierbale et al., 1988).

Los cambios en sitios específicos de reconocimiento alteran solamente la longitud de los fragmentos producidos por una enzima de restricción, mientras que los rearrreglos causan cambios en el tamaño de los fragmentos generados por varias enzimas de restricción (McCouch, et al., 1988; Apuya et al., 1988). Esto es debido a que las inserciones, deleciones, inversiones y substituciones involucran grandes segmentos de ADN que pueden contener varios sitios de restricción. La detección de polimorfismo utilizando la sonda 21kD en combinación con cualquiera de las enzimas de restricción demuestra, en base a lo anterior, la ocurrencia de rearrreglos en el genoma de cacao, posiblemente del tipo inserción/delección.

La presencia de múltiples bandas en las hibridaciones con la sonda 21kD no se puede explicar, además, por el clivage de un solo locus en varios fragmentos, por las enzimas de restricción. En primer lugar, la longitud total de

los fragmentos observados con las distintas combinaciones sonda/enzima tienen una longitud (> 17 kb) mucho mayor que la de la sonda (aproximadamente 1 kb). Una sola copia en el genoma de esta secuencia no podría generar entonces varios fragmentos de gran tamaño. En segundo lugar, varios de los fragmentos están ausentes en un mismo individuo. Ejemplo de esto está en el Cuadro 11, en que los fragmentos 2 y 3 están ausentes en muchos clones. Así mismo las bandas 6 y 7 están ambas ausentes en UF-273. Los alelos que ocupan un mismo locus no pueden estar todos ausentes en un individuo (Helentjaris *et al.*, 1985), lo que implica, en nuestro caso, la presencia de varios loci.

Podemos decir, entonces, que el gen de la proteína de semilla de 21 kD se encuentra repetido en el genoma de cacao, siendo esto un indicativo de su complejidad. Al igual que se ha encontrado en otras especies como la soya y la papa, este tipo de patrones en que una misma sonda hibridiza con varios fragmentos de ADN que no están ligados entre sí, puede representar la existencia de múltiples copias de la secuencia homóloga a la sonda, pero con bordes polimórficos, que están dispersas por todo el genoma (Apuya *et al.*, 1988; Gebhardt *et al.*, 1989). Por tanto, las diferencias en el patrón de hibridaciones pueden también ser ocasionadas por diferencias en el número de regiones cromosómicas que contienen secuencias homólogas a la sonda (Figdore *et al.*, 1988).

Mirazón (1988) ya había señalado la posibilidad de la

existencia de repeticiones en el ADN de cacao, por sus resultados obtenidos utilizando otras sondas polimórficas.

Otra evidencia que sustenta la multiplicidad de copias del gen 21kD en el genoma de cacao, causado por rearrreglos en su ADN, está en su secuencia de nucleótidos. Tai (1990) determinó la secuencia de la sonda 21kD y ésta solo contiene un sitio de reconocimiento para la enzima Hae III y ninguno para Hind III y Eco RI. Esto implica que los fragmentos generados al digerir con Eco RI o Hind III corresponden, aproximadamente, al número de copias que existe de la secuencia en el genoma de cacao. Esto en el caso de que no se haya formado un sitio de restricción interno a la secuencia debido a alguna mutación. Por otro lado, el número de bandas que se observan al digerir con Hae III representa, aproximadamente, el doble de copias que están presentes en el cacao. De acuerdo a los resultados obtenidos se piensa que en cacao existen unas tres o cuatro copias de este gen.

Uno de los objetivos del presente trabajo era determinar la utilidad del análisis RFLP para caracterizar la colección de cacao del CATIE. De los resultados anteriores podemos ver que la sonda 21kD digerida con Hae III generó un gran número de fragmentos polimórficos. Esto a primera vista podría representar confusión para el análisis, sin embargo, este tipo de patrones presentó la ventaja de que permitió la identificación de varias introducciones de cacao con solo una sonda. La combinación 21kD/Hae III diferencia, por ejemplo, 6

grupos de clones: 1) UF-273, 2) CC-137 y CATONGO, 3) EET-75 y EET-183, 4) POUND-7, 5) EET-67, UF-29 y UF-613 y 6) UF-221 (ver Cuadro 11). Varios de los clones pueden diferenciarse tan solo con esta sonda.

Por otro lado, la visualización de múltiples bandas permite deducir información de más de un locus al mismo tiempo. Esto facilita la caracterización de una mayor parte del genoma, reduciendo el número de sondas que se deben utilizar.

No se encontró ninguna diferencia entre la utilización de enzimas de restricción que reconocían secuencias de 6 nucleótidos (Hind III, Eco RI y Pst I) y las que reconocen 4 nucleótidos (Hae III), ya que en ambos casos se detectó igualmente polimorfismo. Sin embargo, es necesario ampliar el estudio para poder llegar a un resultado concluyente.

La escogencia de estas enzimas se realizó en base a que son de las más comúnmente utilizadas en este tipo de estudios, bajos costos y a que contienen en sus secuencias de reconocimiento varios nucleótidos A+T. En estudios preliminares (J. Couch, sin publicar), se encontró que el ADN de cacao contiene cerca de un 60% de nucleótidos A+T. Por tanto empleando enzimas de restricción que tengan en sus secuencias de reconocimiento nucleótidos A+T se aumentan las posibilidades de encontrar fragmentos polimórficos.

El tercer objetivo de este trabajo era determinar la variabilidad genética de los diferentes clones de cacao. La

única sonda que detectó polimorfismo resultó ser muy variable entre las distintas líneas estudiadas. Esto representa solamente un indicio de lo que puede estar ocurriendo en el resto del genoma del cacao.

6. CONCLUSIONES

1) El método de detección no radiactiva de ácidos nucleicos que resultó más adecuado para el análisis RFLP fue el de PhotoGene™, debido a su sensibilidad (0,1 pg de ADN) y a que permite la rehibridación de los filtros, disminuyendo los costos y acelerando el trabajo.

2) A pesar de que el gen de la β -1,3-glucanasa ha sido asociado en otras especies vegetales con la resistencia a las enfermedades fungosas, éstas sondas no sirvieron como marcadores de la resistencia a la Moniliasis en T.cacao.

3) Se demuestra la existencia de rearrreglos en el genoma de T. cacao, lo cual es un indicador de su complejidad genética.

4) Los resultados de este estudio demuestran el potencial que tiene el análisis de RFLP para estudiar la organización genómica, la taxonomía y la caracterización del germoplasma de cacao.

5) También se demuestra la utilidad de esta metodología en la identificación de material y en la caracterización de la colección de cacao ya existente en el CATIE. Esto permitirá hacer un uso más racional de la misma con fines de mejoramiento, así como la eliminación de genotipos

duplicados.

6) Esta metodología permite la evaluación de la variabilidad y caracterización de la colección estudiando de una manera más directa el genoma de T. cacao, complementando las evaluaciones agronómicas y morfológicas ya existentes.

7. RECOMENDACIONES

- Se debe ampliar el estudio empleando un mayor número de sondas para tratar de detectar otras secuencias polimórficas y de esta manera aumentar las posibilidades de detectar marcadores asociados con la resistencia a la Moniliasis.

- Para determinar ligamiento entre los marcadores y las características de interés es necesario incluir un estudio de segregación en las generaciones P₁ y P₂, que permita estimar las frecuencias de recombinación entre los marcadores. Esto con el fin de determinar el grado de ligamiento entre la característica y el marcador, así como la distancia cromosómica entre los diferentes marcadores (mapa genético).

- Una fuente importante de sondas para la detección de polimorfismo, asociado con la resistencia, podría ser una biblioteca de de ADN complementario (cADN), obtenida de mazorcas de plantas resistentes infectadas. De esta manera se estarían estudiando aquellos genes cuya transcripción es inducida por la acción de *M. royeri* en las plantas resistentes.

8. BIBLIOGRAFIA

- APUYA, N.R.; FRAZIER, B.L.; KEIM, P; JILL ROTH, E.; LARK, K.G. 1988. Restriction fragment length polymorphism as genetic markers in soybean, Glicine max (L.) Merrill. Theretical Applied Genetic 75: 889-901.
- BARROS, O. 1981. Avances en la represión de la Moniliasis del cacao. 8° Conferencia Internacional de Investigación en Cacao. Cartagena, Colombia. p 401-405.
- BECKMANN, J.S.; SOLLER, M. 1986. RFLP and genetic improvement of agricultural especies. Euphytica 35:111-124.
- BENHAMOU, N.; GRENIER, J., ASSELIN, A.; LEGRAND, M. 1989. Immunogold localization of β -1,3-glucanases in two plants infected by vascular wilt fungi. The Plant Cell 1: 1209-1221.
- BONIERBALE, M.W.; PLAISTED, R.L.; TANKSLEY, S.D. 1988. RFLP maps based on a common set of clones reveal modes of chromosomal evolution in potato and tomato. Genetics 120: 1095-1103.
- BURR, B.; EVOLA, S.V.; BURR, F.A.; BECKMANN, J.S. 1983. The application of RFLP to plant breeding. In Genetic Engineering: Principles and Methods. Ed. by J.K. Setlow; A. Hollaender. N.Y. USA. Plenum Press, Vol. 5 p. 45-59.
- CARLSON, D.P.; SUPERKO, C.; MACKEY, J.; GASKILL, M.E.; HANSEN, P. 1990. Chemiluminiscent detection of nucleic acid hybridization. Focus 12 (1): 9-12.

- CHANG, C.; BOWMAN, J.L.; DEJOHN, W.; LANDER, E.S.; MEYEROWITZ, E.M. 1988. Restriction fragment length polymorphism linkage map for Arabidopsis thaliana. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85: 6856-6860.
- COUCH, J.A.; FRITZ, P.J. 1990. Isolation of DNA from plants high in polyphenolics. Plant Molecular Biology Reporter. 8(1): 8-12.
- CREASER, V.; HASEGAWA, P.M.; JANICK, J. 1981. In vitro cotyledonary development and anthocyanin synthesis in zygotic and asexual embryos of Theobroma cacao. Journal of the American Society for Horticultural Science 106(3): 381-385.
- DELLAPORTA, S.L.; WOOD, J.; HICKS, J.B. 1983. A plant DNA miniprep: version II. Plant Molecular Biological Reporter 1:19-21.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12(1): 13-15.
- EBEL, J.; GRISEBACH, H. 1988. Defense strategies of soybean against the fungus Phytophthora megasperma f.sp. glycinea: a molecular analysis. Trends in Biochemical Sciences 13(1): 23-27.
- ENGELS, J.M.M. 1986. The systematic description of cacao clones and its significance for taxonomy and plant breeding. Doctoral Thesis. Wageningen, Agricultural University. 125 p.
- ENRIQUEZ, G.A. 1985. Curso sobre el cultivo del cacao. Turrialba, Costa Rica, CATIE. 239 p.

- . ; BRENES, O.; DELGADO, J.C. 1981. Desarrollo e impacto de la moniliasis del cacao en Costa Rica. 8° Conferencia Internacional de Investigación en Cacao. Cartagena, Colombia.
- EVANS, H.C. 1981. Pod rot of cacao caused by Moniliophthora (Monilia) roreri. Commonwealth Mycological Institute. Phytopathological Papers 24:1-41.
- . 1986. A reassessment of Moniliophthora (Monilia) pod rot of cocoa. Cocoa's Grower Bulletin 37:34-43.
- F.A.O. (Italia) -1989. Anuario de Producción 1988.Roma. p. 228. (Colección Estadística N° 88).
- FELIX, G.; MEINS, F. 1987. Ethylene regulation of β -1,3-glucanase in tobacco. Planta 172: 386-392.
- FIGDORE, S.S.; KENNARD, W.C.; SONG, K.M.; SLOCUM, M.K.; OSBORNE, T.C. 1988. Assessment of the degree of restriction fragment length polymorphism in Brassica. Theoretical Applied Genetic 75: 833-840.
- FORSYTH, W.G.C. 1952. Cacao polyphenolic substances 1. Fractionation of the fresh bean. Biochemical Journal 51: 511-516.
- . 1955. Cacao poliphenolic substances 3. Separation and estimation on paper chromatograms. Biochemical Journal 60: 108-111.
- FRY, W.E. 1982. Principles of plant disease management. Orlando, Fla. Academic Press, Inc. 378 p.

- GALINDO, J.J. 1987. La moniliasis del cacao en Centro América. In Plagas y enfermedades de caracter epidémico en cultivos frutales de la Región Centroamericana. CATIE. Serie Técnica. Informe Técnico N°110 p. 7-16.
- GEBEYEHU, G.; RAO, P.Y.; SOOCHAN, P.; SIMMS, D.A.; KLEVAN, L. 1987. Novel biotinylated nucleotide-analogs for labeling colorimetric detection of DNA. Nucleic Acid Research 15(11): 4513-45-34.
- GEBHARDT, C.; RITTER, E.; DEBENER, T.; SCHACHTSCHABEL, U.; WALKEMEIER, B.; UHRIG, H.; SALAMINI, F. 1989. RFLP analysis and linkage mapping in Solanum tuberosum. Therotical Applied Genetic 78: 65-75.
- GLICENSTEIN, L.J.; FRITZ, P.J. 1989a. Meiosis in Theobroma cacao. Turrialba 39 (4): 497-500.
- . .; FRITZ, P.J. 1989b. Ploidy level in Theobroma cacao. J. Hered 80: 464-467.
- HELENTJARIS, T.; BURR, B. 1989. Development and application of molecular markers to problems in plant genetics. Current Communications in Molecular Biology. N.Y., USA. Cold Spring Harbor Laboratory. 165 p.
- . .; GRETCHEN, K.; SLOCUM, M.; SIEDENSTRANG, C.; WEGMAN, S. 1985. Restriction fragment polymorphism as probes for plant diversity and their development as tools for applied plant breeding. Plant Molecular Biology 5: 109-118.
- . .; SLOCUM, M.; WRIGHT, S.; SCHAEFER, A.; NIENHUIS, J. 1986. Construction of genetic linkage maps in maize and tomato using restriction fragment length

polymorphisms. Theoretical Applied Genetic 72: 761-769.

——— .; WEBER, D.; WRIGHT, S. 1988. Identification of the genomic location of duplicate nucleotide sequences in maize by analysis of restriction fragment length polymorphisms. Genetics 118: 353-363.

INTERNATIONAL CACAO Cultivar Catalog. 1981. Ed. by J. Soria V.; G.A. Enríquez. Turrialba, C.R., CATIE. Technical bulletin N° 6. 156 p.

JALAL, M.A.F.; COLLIN, H.A. 1977. Polyphenols of mature plant, seedling, and tissue cultures of Theobroma cacao. Phytochemistry 16: 1377-1380.

JOOSTEN, M.H.A.J.; DE WIT, P.J.G.M. 1989. Identification of several pathogenesis related proteins in tomato leaves inoculated with Cladosporium fulvum (syn. Fulvia fulva) as 1,3- β -glucanases and chitinases. Plant Physiology 89: 945-951.

KAUFFMANN, S.; LEGRAND, M.; GEOFFROY, P.; FRITIG, B. 1987. Biological function of "pathogenesis-related" proteins: four PR proteins of tobacco have β -1,3-glucanase activity. The EMBO Journal 6(11): 3207-3212.

KEIM, P.; SHOEMAKER, R.C. PALMER, R.G. 1989. Restriction fragment length polymorphism diversity in soybean. Theoretical Applied Genetic 77: 786-792.

KENDRA, D.F.; CHRISTIAN, D.; HADWIGER, L.A. 1989. Chitosan oligomers from Fusarium solani/pea interactions, chitinase/ β -glucanase digestion of sporelings and from fungal chitin actively inhibit fungal growth and enhance disease resistance. Physiological and Molecular Plant

Pathology 35: 215-230.

- LANDRY, B.S.; KESSELI, R.V.; FARRARA, B.; MICHELMORE, R.W. 1987. A genetic map of lettuce (Lactuca sativa L.) with restriction fragment length polymorphism, isozyme, disease resistance and morphological markers. *Genetics* 116: 331-337.
- .; MICHELMORE, R.W. 1987. Methods and applications of RFLP analysis to plants. In *Tailoring genes for crop improvement*, G. Bruening, J. Harada, T. Kosuge, A. Hollaender (Eds.) Plenum Publishing Corporation, p. 25-44.
- MANUAL DE Cultivo del Cacao 1987. Ed by C. Suárez C. Quevedo, Ecuador, Estación Experimental "Pichilingue". 109 p.
- MAUCH, F.; MAUCH-MANI, B.; BOLLER, T. 1988. Antifungal hydrolases in pea tissue II. Inhibition of fungal growth by combinations of chitinase and β -1,3-glucanase. *Plant Physiology* 88: 936-942.
- MCCOUCH, S.R.; KOCHERT, G.; YU, Z.H.; WANG, Z.Y.; KHUSH, G.S.; COFFMAN, W.R.; TANKSLEY, S.D. 1988. Molecular mapping of rice chromosomes. *Theoretical Applied Genetics* 76: 815-829.
- MIRAZON, M.L. 1988. Theobroma cacao: genetic analysis using restriction fragment length polymorphisms. M. Sc. Thesis. The Pennsylvania State University. 85 p.
- .; GORA-MASLAK, G.; McHENRY, L.; FRITZ, P.J. 1989. Theobroma cacao DNA: Protocols for RFLP analysis. *Turrialba* 39 (4): 519-524.

- OSBORNE, T.C.; ALEXANDER, D.C.; FOBES, J.F. 1987. Identification of restriction fragment length polymorphism linked to genes controlling soluble solids content in tomato fruit. *Theoretical Applied Genetics* 73: 350-356.
- PATERSON, A.H.; LANDER, E.S.; HEWITT, J.D.; PETERSON, S.; LINCOLN, S.E.; TANKSLEY, S.D.; 1988. Resolution of quantitative traits into Mendelian factors by using a complete RFLP linkage map. *Nature* 335: 721-726.
- PHILLIPS, W. 1986. Evaluación de la resistencia de cultivares de cacao (Theobroma cacao L.) a Moniliophthora roreri (Cif y Par.) Evans et al.. Tesis Mag. Sc. Turrialba, C.R. Universidad de Costa Rica-CATIE. 100 p.
- .; ENRIQUEZ, G.A. 1988. Catálogo de cultivares de cacao. Turrialba, C.R., CATIE. Boletín Técnico N° 18. S.P.
- .; GALINDO, J.J. 1986. Reaction of cacao cultivars to inoculation with Moniliophthora roreri Cif & Par. *Phytopathology* 76: 375.
- .; GALINDO, J.J. 1987. Evaluación de la resistencia de cultivares de cacao a Moniliophthora roreri. 10ª Conferencia Internacional de Cacao. Santo Domingo, República Dominicana. p. 685-689.
- .; GALINDO, J.J. 1989. Método de inoculación y evaluación de la resistencia a Phytophthora palmivora en frutos de cacao (Theobroma cacao). Turrialba 39: 488-496.

- PORRAS, V.H.; CRUZ, C.A.; GALINDO, J.J. 1990. Manejo integrado de la mazorca negra y la moniliasis del cacao en el trópico húmedo bajo de Costa Rica. Turrialba 40(2): 238-245.
- RYAN, C.A. 1988. Oligosaccharides as recognition signals for the expression of defensive genes in plants. Biochemistry 27: 8879-8883.
- SAGHAI-MAROOF, M.A.; SOLIMAN, K.M.; JORGENSEN, R.A.; ALLARD, R.W. 1984. Ribosomal DNA spacer length polymorphism in barley: mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 8014-8018.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. 1989. Molecular cloning-A laboratory manual. 2nd Ed. N.Y. USA. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 3 v.
- SMITH, J.S.C. 1989. Gene markers and their uses in the conservation, evaluation and utilization of genetic resources of maize (Zea mays L.). IBPGR Training courses. Lecture Serie 2. p. 125-135.
- SOLLER, M. BECKMANN, J.S. 1983. Genetic polymorphism in varietal identification and genetic improvement. Theor. Appl. Genet. 67: 25-23.
- SOUTHERN, E.M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98: 503-517.
- TAI, H. 1990. Molecular cloning and sequencing of a seed cDNA encoding a putative glycerol-3-phosphate acyl-transferase gen. Ph. D. Thesis. Penn State University.

Pensylvannia, USA.

- TANKSLEY, S.D. 1983. Molecular markers in plant breeding. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1: 3-8.
- .; YOUNG, N.D.; PATERSON, M.W.; BONIERBALE, M.W. 1989. RFLP mapping in plant breeding: new tools for an old science. *Biotechnology* 7: 257-263.
- THIMANN, K.V.; EDMONDSON, YH.; RADNER, B.S. 1951. The biogenesis of the anthocyanins. III. The role of sugars in anthocyanin formation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 34: 305-323.
- VERA, P; HERNANDEZ, YAGO, J.; CONEJERO, V. 1989. Immunogold localization of the citrus exocortis viroid induced pathogenesis-related proteinase P69 in tomato leaves. *Plant Physiology* 91: 119-123.
- VÖGELI, U.; MEINS, F.; BOLLER, T 1988. Co-ordinate regulation of chitinase and β -1,3-glucanase in bean leaves. *Planta* 174: 364-372.
- VÖGELI-LANGE, R.; HANSEN-GEHRI, A.; BOLLER, T.; MEINS, F. 1988. Induction of the defense-related glucanohydrolases, β -1,3-glucanase and chitinases, by tobacco mosaic virus infection of tobacco leaves. *Plant Science* 54: 171-176.
- WESSELS, J.G.H.; SIETSMAN, J.H. 1981. Fungal cell walls: A survey. In *Encyclopedia of Plant Physiology, New Series*. Vol 13B, W. Tanner y F.A. Loewus (Eds.). New York: Springer, p 352-394.
- WOOD, G.A.; LASS, R.A. 1985. *Cocoa*. Longman Scientific and

Technical, England. Copublished with J. Wiley and Sons, Inc., N.Y. 620 p.

Young, N.D.; Zamir, D.; Ganai, M.W.; Tanksley, S.D. 1988. Use of isogenic lines and simultaneous probing to identify DNA markers tightly linked to the Tm-2a gene in tomato. *Genetics* 120: 579-585.