

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE AGRONOMIA  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGRONOMICAS

IDENTIFICACION DE 25 CLONES DE CACA0 (Theobroma cacao L.) POR  
ELECTROFORESIS DE ISOENZIMAS

TESIS

PRESENTADA A LA HONORABLE JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE  
AGRONOMIA DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

POR

EYSEN R. ENRIQUEZ O.

EN EL ACTO DE INVESTIDURA COMO

INGENIERO AGRONOMO

EN

SISTEMAS DE PRODUCCION AGRICOLA

EN EL GRADO ACADEMICO DE

LICENCIADO

GUATEMALA, JULIO DE 1995

01  
(1544)  
c. 4

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

RECTOR

DR. JAFETH ERNESTO CABRERA FRANCO

JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE AGRONOMIA

|               |                                     |
|---------------|-------------------------------------|
| DECANO        | Ing. Agr. Efraim Medina Guerra      |
| VOCAL PRIMERO | Ing. Agr. Juan José Castillo M.     |
| VOCAL SEGUNDO | Ing. Agr. Waldemar Nufio Reyes      |
| VOCAL TERCERO | Ing. Agr. Carlos Motta de Paz       |
| VOCAL CUARTO  | Prof. Gabriel Amado Rosales         |
| VOCAL QUINTO  | Br. Augusto Guerra Gutiérrez        |
| SECRETARIO    | Ing. Agr. Marco Romilio Estrada Muy |

Guatemala, mayo de 1995

Honorable Junta Directiva  
Honorable Tribunal Examinador  
Facultad de Agronomía  
Universidad de San Carlos de Guatemala


Señores Miembros:

De conformidad con las normas establecidas por la Universidad de San Carlos de Guatemala, tengo el honor de someter a vuestra consideración, el trabajo de tesis titulado:

IDENTIFICACION DE 25 CLONES DE CACAO (Theobroma cacao L.) POR ELECTROFORESIS DE ISOENZIMAS

al presentarlo como requisito previo a optar al título de Ingeniero Agrónomo en Sistemas de Producción Agrícola, en el grado académico de licenciado.

Atentamente

  
Eysen R. Enriquez O.

### ACTO QUE DEDICO

Este acto es dedicado a mi señora madre Marfa Alicia Ochoa, y a todos aquellos hombres de buen corazón que con su trabajo honrado luchan por obtener un mejor futuro y así poder heredar a las generaciones del mañana una forma de vida diferente.

## AGRADECIMIENTOS

Mis más sinceros agradecimientos al asesor de esta tesis Dr. Luis Mejía de León de la Facultad de Agronomía de la USAC.; al Dr. Thomas Redlinger de la Universidad de Masachusset por su colaboración en el equipamiento del laboratorio de electroforesis y por su ayuda en el desarrollo de la metodología empleada; a la Dirección General de Investigación de la USAC (DIGI) por el financiamiento aportado; a mi compañero de trabajo Br. Noé Ariel Castillo Lemus de la Escuela de Biología de la USAC; y a todas las personas que de una u otra forma hicieron posible que esta investigación se realizara.

## INDICE

| Contenido   | Página |
|---|--------|
| 1. INTRODUCCION.....  | 1      |
| 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....                                    | 3      |
| 3. MARCO TEORICO.....   | 4      |
| 3.1 Marco conceptual.....   | 4      |
| 3.1.1 Origen del cacao.....   | 4      |
| 3.1.2 Marcadores isoenzimáticos.....                                  | 7      |
| 3.1.3 Electroforesis de isoenzimas.....                               | 10     |
| 3.2 Marco referencial.....  | 13     |
| 3.2.1 Jardín clonal.....  | 13     |
| 3.2.2 Estudios con marcadores isoenzimáticos en cacao..               | 14     |
| 3.2.3 Características de las enzimas.....                             | 16     |
| 4. OBJETIVOS.....   | 17     |
| 5. HIPOTESIS.....   | 17     |
| 6. METODOLOGIA.....   | 18     |
| 7. RESULTADOS Y DISCUSION.....  | 23     |
| 7.1 Acido shiquímico deshidrogenasa.....                              | 23     |
| 7.2 Alcohol deshidrogenasa (revelada con pH 7.2).....                 | 25     |
| 7.3 Alcohol deshidrogenasa (revelada con pH 8.3).....                 | 27     |
| 7.4 Enzima málica.....  | 30     |
| 7.5 Esterasa.....   | 32     |
| 7.6 Fosfatasa ácida.....  | 32     |
| 7.7 Fosfoglucomutasa.....   | 36     |
| 7.8 Isocitrato deshidrogenasa.....                                    | 36     |
| 7.9 Malato deshidrogenasa.....  | 39     |
| 7.10 Peroxidasa.....  | 41     |
| 7.11 Fenograma de los 25 clones de cacao.....                         | 44     |
| 8. CONCLUSIONES.....  | 47     |
| 9. RECOMENDACIONES.....   | 48     |
| 10. BIBLIOGRAFIA.....   | 49     |
| 11. ANEXOS.....   | 52     |
| 11.1 Soluciones stock para preparar geles de poli-<br>acrilamida..... | 52     |
| 11.2 Fórmulas para tinción de enzimas.....                            | 53     |

## INDICE DE FIGURAS

| Figura no.   | Página |
|--|--------|
| 1. Zimograma de un locus con dos alelos para enzimas: monómeras, dímeras, trímeras y tetrámeras..... | 10     |
| 2. Esquema de la composición del sistema de electroforesis discontinuo.....                          | 11     |
| 3. Esquema de la colocación de la rama tierna de cacao dentro del tubo de ensayo.....                | 18     |
| 4. Zimogramas de los 25 clones de cacao para la enzima ácido shiquímico deshidrogenas.....           | 24     |
| 5. Zimogramas de los 25 clones de cacao para la enzima alcohol deshidrogenas, revelada a pH 7.2..... | 26     |
| 6. Zimogramas de los 25 clones de cacao para la enzima alcohol deshidrogenas, revelada a pH 8.3..... | 28     |
| 7. Zimogramas de los 25 clones de cacao para la enzima málica.....                                   | 31     |
| 8. Zimogramas de los 25 clones de cacao para la enzima esterasa.....                                 | 33     |
| 9. Zimogramas de los 25 clones de cacao para la enzima fosfatasa ácida.....                          | 35     |
| 10. Zimogramas de los 25 clones de cacao para la enzima fosfoglucomutasa.....                        | 37     |
| 11. Zimogramas de los 25 clones de cacao para la enzima isocitrato deshidrogenasa.....               | 38     |
| 12. Zimogramas de los 25 clones de cacao para la enzima malato deshidrogenasa.....                   | 40     |
| 13. Zimogramas de los 25 clones de cacao para la enzima peroxidasa.....                              | 42     |
| 14. Fenograma de los 25 clones de cacao del jardín clonal del CATBUL.....                            | 45     |

## INDICE DE CUADROS

| Cuadro no.  | Página |
|---|--------|
| 1. Clones existentes en el jardín clonal del CATBUL y su origen.....  | 14     |
| 2. Número, localización subcelular y estructura de nueve enzimas..... | 16     |

IDENTIFICACION DE 25 CLONES DE CACAO (Theobroma cacao L.) POR  
ELECTROFORESIS DE ISOENZIMAS

IDENTIFICATION OF 25 CLONES OF COCOA (Theobroma cacao L.) BY ISOZYME  
ELECTROPHORESIS

RESUMEN

En este estudio se establecieron los zimogramas por medio de electroforesis de isoenzimas de los 25 clones de cacao del jardín clonal de Centro de Agricultura Tropical Bulbuxyá (CATBUL), ubicado en San Miguel Panán, Suchitepéquez.

El análisis isoenzimático se realizó en el Laboratorio de Electroforesis de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala. Se utilizó un sistema de electroforesis discontinuo en geles de poliacrilamida y nueve sistemas enzimáticos (SKD, ADH, EM, Est, ACP, PGM, IDH, MDH y Prx) en hojas tiernas.

De los nueve sistemas enzimáticos estudiados, en todos se registró variación en una o más regiones de tinción. Todos los patrones de tinción fueron repetitivos, a excepción de la peroxidasa en la que las regiones de tinción no fueron persistentes. Se pudo establecer que las enzimas fosfatasa ácida (ACP), alcohol deshidrogenas (ADH) y ácido shiquímico deshidrogenas (SKD) son marcadores útiles para realizar estudios de paternidad en cacao, y que la enzima esterasa (Est) es muy útil para la identificación de los clones.

Un fenograma de los 25 clones, utilizando índices de similitud (o distancia genética) permitió agruparlos en cinco unidades. Esta clasificación podría servir de guía en la selección de progenitores para tratar de obtener niveles óptimos de heterosis en la progenie.

Se encontró alta contaminación en varias unidades clonales del jardín, por lo que es recomendable que se realice una purificación mediante el uso de las características morfológicas de los clones y por medio de marcadores isoenzimáticos.



## 1. INTRODUCCION

El uso de marcadores isoenzimáticos permite medir variaciones genéticas a nivel de especie, entre poblaciones y dentro de poblaciones (individuos). Lo cual es importante para ampliar los conocimientos de estructura y diferenciación genética, aspectos importantes aplicados a la resolución de problemas relacionados con la evolución ecológica y fitomejoramiento en la agricultura.

En Guatemala se encuentran colecciones de clones de cacao originarios de varios países. Así como colecciones de híbridos realizados en nuestro país a través de polinizaciones artificiales. La caracterización de estos clones e híbridos se ha realizado hasta ahora por medio de descriptores morfológicos los cuales no siempre son convenientes, en parte debido a que los efectos ambientales pueden variar las características de las plantas. En general, se tienen muchas dudas sobre las relaciones filogenéticas de los diferentes grupos de cacao.

Este estudio se realizó utilizando electroforesis en geles de poliacrilamida de nueve sistemas enzimáticos. La finalidad fue obtener marcadores bioquímicos que permitieran identificar los clones de cacao del jardín clonal del Centro de Agricultura Tropical Bulbuyá (CATBUL) de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala. La fase de laboratorio se llevó a cabo en el Laboratorio de Electroforesis del Instituto de Investigaciones Agronómicas (IIA) de la Facultad de Agronomía.

De las nueve enzimas estudiadas (ácido shiquímico deshidrogenasa, alcohol deshidrogenasa, enzima málica, esterasa, fosfatasa ácida, fosfoglucomutasa, isocitrato deshidrogenasa, malato deshidrogenasa y

peroxidasa), todas exhibieron variación (polimorfismo) al menos en una de las regiones de tinción, y todas presentaron zimogramas repetitivos. Excepto la peroxidasa en que las regiones que exhibieron variación no fueron constantes, pero si fueron repetitivas las regiones invariables.

Los resultados de esta investigación serán utilizados para la identificación de plantas atípicas en las unidades clonales del jardín clonal y otros estudios relacionados con la genética del cacao.

Esta investigación se realizó en el Instituto de Investigaciones Agronómicas con el apoyo de la Dirección General de Investigación de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

## 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las poblaciones de cacao presentan gran variabilidad debido a las hibridaciones naturales y artificiales entre los diferentes grupos. Esta variabilidad ha permitido la selección de cultivares que por una u otra característica deseable se han mantenido invariables a través de su clonación. Los jardines clonales proveen apoyo a múltiples investigaciones, por lo cual es importante la caracterización adecuada de los materiales ahí mantenidos.

Desde el inicio de la investigación se comenzó a sospechar la existencia de plantas contaminantes en algunas unidades clonales de cacao del jardín clonal del CATBUL, debido a que se encontraban zimogramas diferentes para el mismo clon cuando se analizaban diferentes plantas de una misma unidad clonal.

La electroforesis de isoenzimas en geles de poliacrilamida permite la caracterización rápida y confiable de los clones de cacao y ayuda a obtener marcadores bioquímicos útiles para realizar estudios genéticos avanzados en los que los descriptores morfológicos son poco útiles. Por esta razón se utilizó esta técnica para identificar los 25 clones de cacao del jardín clonal del CATBUL.

### 3. MARCO TEORICO

#### 3.1 Marco conceptual

##### 3.1.1 Origen del cacao

Cacao Theobroma cacao L. Familia Sterculiaceae

El cacao es originario de las regiones tropicales de América (América Central, Amazonia, Ecuador, Perú) (Soria (32); Enríquez (13)). Su cultivo se desarrolló hace unos tres mil años en Mesoamérica, por los Aztecas y Mayas (Cuatrecasas (9)), quienes lo utilizaron con fines ceremoniales y como moneda. Estos aborígenes extraían de las semillas secas una bebida llamada "el licor de los dioses" (Dierendonck (1)), y era destinada a caciques y reyes (Melespin (23)). Actualmente de las semillas fermentadas, secas, tostadas y molidas con azúcar se produce el chocolate, el cual tiene varios usos.

El cacao es una especie diploide, con 20 cromosomas (Glicenstein y Fritz (15)). Alógama y autoincompatible, con polinización cruzada considerada superior al 95%, (Enríquez (13)). La polinización es realizada principalmente por insectos de las familias Cecidomyiidae y Ceratopogonidae, siendo el género Forcipomyia uno de los más importantes (Young (40)).

La planta puede alcanzar alturas hasta de 20 m. Las flores se producen en cojines florales, sobre el tallo y las ramas, éstas son completas, pentámeras y los sépalos y pétalos están soldados por la base y forman un capuchón blanco que cubre las anteras. Los frutos pueden tener entre 20 y 40 semillas según Melespin (23). En frutos de polinización libre procedentes del jardín clonal del CATBUL se han encontrado hasta 53 semillas.

El cacao se ha propagado por semillas, procedentes de hibridaciones naturales y artificiales entre los diferentes grupos, lo que ha generado la alta variabilidad existente en las poblaciones (López (21)). A partir de 1930 se empezó a utilizar la propagación vegetativa (Braudeau (3)), lo que dio lugar a la selección de los primeros clones en América (García (14)). Entre ellos los ICS del Colegio Imperial en Trinidad, los CC del Centro Interamericano de Cacao en Costa Rica, los SPA y APA de la Estación de Palmira en Colombia, los EET de la Estación Experimental Tropical de Pichilingue en Ecuador, los SCA de Escavina, Ecuador, los IMC de Iquitos, Perú, los UF de la United Fruit Co. en Costa Rica.

Según Lanaud (20), el cacao cultivado originalmente por los Mayas y los Aztecas es el actualmente denominado Criollo.

Otros tipos de cacao, llamados Forasteros existen en estado silvestre en América del Sur, en el valle del Amazonas (Chalmers (5); Soria (32)). Su domesticación y cultivo se desarrolló hace dos o tres siglos (Lanaud (20)) en la cuenca del Amazonas.

En general, los árboles de cacao se han dividido en estos dos grupos, Criollos y Forasteros, que se distinguen según Lanaud (20) por la forma y color de sus frutos y semillas, de la manera siguiente:

a. Criollos Theobroma cacao L. ssp cacao Cuat. tienen frutos verdes o rojos antes de madurar, estos frutos son delgados y alargados con surcos profundos y tienen semillas blancas o rosadas. Aquí se encuentran las poblaciones silvestres y cultivadas de Centro América y las del norte de América del Sur.

b. Forasteros T. cacao ssp sphaerocarpum Cuat. tienen frutos de varias formas, generalmente verdes antes de madurar, con semilla

aplanada y pequeña de color violeta oscuro; aquí se encuentra la subdivisión Amelonado, que es extensamente cultivado en la región baja del Amazonas, en Brasil, el oriente de Venezuela y Guyanas. Constituye poblaciones silvestres y cultivadas.

c. El tercer grupo es el Trinitario, que es considerado un híbrido entre Criollo y Forastero. Posiblemente uno de sus orígenes fue la sustitución de árboles destruidos por un ciclón en Trinidad con Forasteros, lo que dio lugar a una hibridación natural, éstos se distribuyeron en muchos países (Cheesman (4)). Presentan todos los tipos intermedios entre Criollo y Forastero (Braudeau (3)) y no se encuentran en forma silvestre.

De acuerdo a Cheesman (4), el centro de diversidad y origen del cacao podría ser la región alta del Amazonas, al oeste de Ecuador. El grupo Criollo también pudo originarse ahí.

Varios tipos de cacao se han introducido en África con mayor o menor éxito. La introducción a este continente se originó de dos fuentes: a) de Belem en Brasil (Amelonado) a Sao Tomé en 1882 y de aquí a Ghana; y b) de Surinam a la isla de Fernando Poo en 1840, (una mezcla de Trinitario y Amelonado) (Lanaud (20)).

En 1528 el cultivo fue llevado de América a Europa (Enríquez (13)). Posteriormente fue introducido en Asia a principios de 1560. La primera plantación de Trinitario se estableció en Nigeria, con frutos procedentes de la isla de Fernando Poo y de ahí se distribuyó en varios países del oeste de África.

En los años 1934 a 1938, los mayores productores de cacao en el mundo fueron Costa Rica, Cuba y la República Dominicana. Para 1982

los principales productores centroamericanos fueron Costa Rica y Guatemala.

Hoy en día se tienen muchas dudas con respecto a las relaciones existentes entre los varios tipos de cacao y su origen, debido a que las características morfológicas no dan siempre una respuesta precisa.

Hasta el presente los programas de producción en el oeste de África y muchos países de América Latina se basan en la producción de híbridos entre estos grupos (Lanaud (20)).

### 3.1.2 Marcadores isoenzimáticos

Desde el descubrimiento de las isoenzimas por Hunter y Markert en 1957, éstas han sido de mucha importancia en varias ramas de la biología (Stebbins (34)). El uso de marcadores isoenzimáticos, tiene aplicaciones prácticas en varios campos, más notablemente en estudios de poblaciones, genética, citogenética, y recientemente en taxonomía y caracterización de germoplasma en plantas (Simpson y Withers (31)).

Los marcadores isoenzimáticos han proporcionado buenos resultados para estudiar la diversidad genética, y en otros estudios como en la determinación de sistemas de cruzamiento, determinación de la pureza de la semilla, flujo genético, caracterización de germoplasma, conservación de los recursos genéticos, identificación de genotipos élite resistentes a enfermedades, construcción de mapas genéticos, identificación de híbridos y de cultivares, estimación de tasas de alogamia, etc.

Muchas especies de plantas han sido estudiadas para el polimorfismo enzimático y casi todas han mostrado variación para uno o más loci (Nielsen (25)). El uso de los marcadores isoenzimáticos ha permitido la cuantificación de la variabilidad genética en las poblaciones naturales, lo que ha dado una visión más precisa de la genética de poblaciones, de los procesos evolucionarios y de las relaciones filogenéticas entre poblaciones (Mejía (22)).

En Guatemala la electroforesis de isoenzimas aún no se ha utilizado intensivamente en la caracterización de materiales vegetales. Esta técnica permite realizar estudios más avanzados en los que los descriptores fenotípicos son de poca o ninguna utilidad (Elliot y Kennedy (11)). Otro aspecto importante en el caso de árboles es que para hacer estudios de caracterización no es necesario esperar a que éstos fructifiquen lo cual podría tardar varios años, ya que puede hacerse en cualquier etapa de su desarrollo, incluso hasta en los embriones o semillas. Arus et al. (1) resume las ventajas de los marcadores isoenzimáticos de la siguiente manera: 1) su expresión generalmente no es alterada por el ambiente; 2) su fenotipo puede determinarse en semillas o en plántulas; y 3) su expresión es generalmente codominante.

La heterogeneidad enzimática en las plantas es la base del uso de las isoenzimas, ésta se hace evidente cuando se separan en sus diferentes formas moleculares, de acuerdo a sus cargas eléctricas, permitiendo así, el estudio de la variabilidad genética entre individuos (Gottlieb (17)).

Los genes representan un segmento del ADN y controlan un conjunto de procesos específicos del desarrollo, ocupando un determinado locus. El producto de los genes, generalmente es una proteína y el



desarrollo de un organismo depende de sus proteínas específicas (Ramírez, et al. (28)).

En el estudio de las isoenzimas es necesario conocer su genética y su estructura (Gottlieb (17)). Las enzimas pueden estar formadas por una copia de la cadena polipeptídica (enzima monomérica), dos o más copias (dímeros con dos copias, trímeros con tres copias, tetrameros con cuatro copias, etc.). Para un individuo diploide heterocigoto para un determinado locus, los segmentos de DNA que conforman sus dos alelos, se diferencian en uno o más nucleótidos y codifican polipéptidos que difieren en uno o más aminoácidos. También pueden haber diferencias en la conformación espacial y en la carga neta de la proteína, lo que influye en la movilidad al separarse por electroforesis.

Cuando las enzimas se separan por electroforesis, se obtienen patrones de bandas o zimogramas. En el caso de una enzima monomérica los individuos homocigotos para un locus con dos alelos, presentarán una banda y los heterocigotos dos bandas similares; la banda más electropositiva (A) migrará menos distancia y la más electronegativa (a) migrará más distancia. En las enzimas dimericas los homocigotos (AA o aa) presentarán siempre una banda y los heterocigotos (Aa) tres bandas equidistantes, teniendo la central el doble de intensidad que las bandas parentales; en las enzimas triméricas los heterocigotos presentarán cuatro bandas (AAA, AAa, Aaa y aaa) (Ramírez et al., 1989; Gottlieb, 1981) y en las enzimas tetraméricas los heterocigotos presentarán cinco bandas (AAAA, AAAa, AAaa, Aaaa y aaaa) (Gottlieb (16)). Los patrones de bandas esperados para un locus con dos alelos para enzimas monómeras, dímeras, trímeras y tetraméricas se presentan en la figura 1.

| Estructura cuaternaria | individuos |  |            |
|------------------------|------------|--|------------|
|                        | Parental 1 | Híbrido  | Parental 2 |
| Monómero               | A _____    | A _____<br>a _____   | a _____    |
| Dímero                 | AA _____   | AA _____<br>Aa _____<br>aa _____                                   | aa _____   |
| Trímero                | AAA _____  | AAA _____<br>AAa _____<br>Aaa _____<br>aaa _____                   | aaa _____  |
| Tetrámero              | AAAA _____ | AAAA _____<br>AAAa _____<br>AAaa _____<br>Aaaa _____<br>aaaa _____ | aaaa _____ |

Figura 1. Zimograma de un locus con dos alelos para enzimas: monómeras, dímeras, trímeras y tetrámeras (Ramírez et al. (28); Gottlieb (16)).

### 3.1.3 Electroforesis de isoenzimas

Hay diferentes técnicas de electroforesis, que dependen del medio soporte que se utilice (agar, almidón, acríalmida) (Nielsen (25)).

La electroforesis en geles de poliacrilamida, es la más empleada para la separación de macromoléculas (proteínas y ácidos nucleicos); estas geles son inertes, transparentes y elásticas, carecen de grupos ionizables, no reaccionan con las biomoléculas y son compatibles con la mayoría de amortiguadores (Ponz et al. (27)). La mayoría de trabajos con isoenzimas se han realizado en geles de almidón, principalmente debido a que estas geles pueden cortarse en varias rodajas y revelar en cada rodaja una enzima.

Su principio básico es la migración de partículas al someterlas a un campo eléctrico, debiendo tener estas partículas una

polaridad que sea susceptible al campo eléctrico que se les aplica (Contreras y Mansilla (7)). La velocidad de migración de la molécula la determinan su carga, su tamaño y su forma (Ponz et al. (27))

Todos los tipos de electroforesis están gobernados por el principio general de la fórmula siguiente:

$$\text{Movilidad de la molécula} = \frac{\text{Voltaje aplicado} \times \text{Carga neta de la molécula}}{\text{Fricción de la molécula}}$$

En la electroforesis discontinua en gel de poliacrilamida el medio soporte está compuesto por dos geles; una gel de concentración, que contiene de dos a cuatro por ciento de acrilamida y una gel de resolución, que contiene de siete a 20% de acrilamida. En un sistema discontinuo de amortiguadores en donde la gel de concentración y los extractos tienen mayor fuerza iónica y un pH inferior que la gel de resolución (Ornstein (26)). Figura 2.

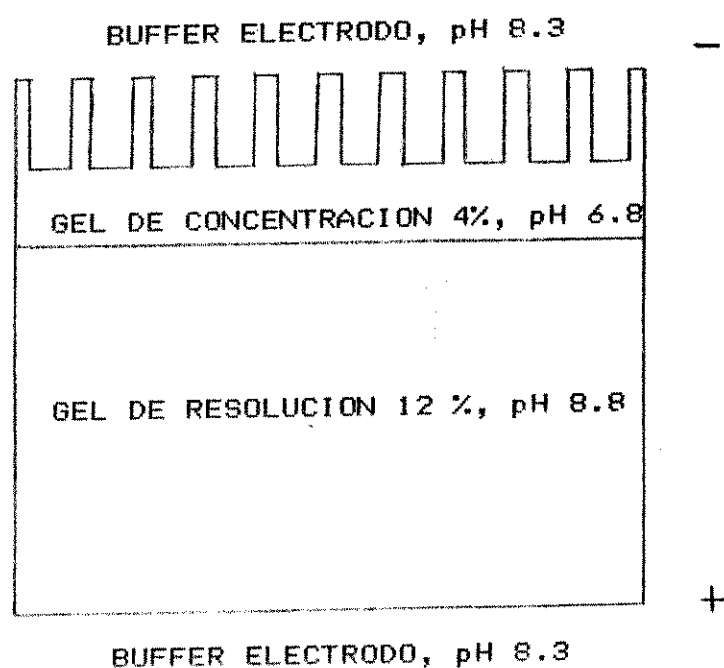


Figura 2. Esquema de la composición del sistema de electroforesis discontinuo.

Los siguientes principios determinan la migración de las moléculas en el sistema discontinuo (Clark y Switzer (6)), figura 2. Al colocar las muestras en la gel de concentración, esta gel está entre dos sistemas amortiguadores de glicina a pH 8.3. Al inicio los iones de glicina tienen carga de -0.1 en este pH, al entrar en contacto con esta gel, se encuentran con pH más bajo por el amortiguador Tris HCl, entonces éstos son titulados a un pH menor (6.9), lo que reduce el promedio de carga [-] en los aniones de la glicina, esto reduce la movilidad de la población de iones de glicina. A un pH 6.9 muchas de las proteínas tienen cargas negativas y muchas pueden vencer las interacciones de fricción, por lo general tienen mayor movilidad que los iones de glicina. Este fenómeno provoca que las proteínas se acumulen al frente de los iones de glicina. Por su parte los iones clorhídricos en la gel de concentración con una carga neta [-] de tamaño más pequeño y poca fricción, migran más rápidamente que las proteínas, dando como resultado una movilidad aniónica en la gel de concentración de la siguiente manera: [Cl (-) > proteínas (-) > glicina (-)]. En el siguiente paso es necesario un flujo de iones adicionales, lo que provoca que el frente de iones entre a la gel de resolución, que en este momento tiene un pH 8.9, esto produce dos sucesos: 1) el avance de los iones de glicina que son nuevamente titulados a pH 8.9, por el amortiguador utilizado en la gel de resolución, ocasionando que la glicina adquiera carga [-] y mayor movilidad que las proteínas; y 2) las proteínas también son tituladas al nuevo pH de la gel de resolución, entonces cada una de ellas toma una banda discreta y se inicia la migración.

La localización de cada proteína en la gel se realiza por medio de una tinción específica.

### 3.2 Marco referencial ✓

#### 3.2.1 Jardín clonal

La finca Bulbuxyá está ubicada en San Miguel Panán, Suchitepéquez. En 1969 ésta fue donada por el Lic. Flavio Herrera a la Universidad de San Carlos y en 1978 su administración quedó a cargo de la Facultad de Agronomía. En 1981 se le denominó "Centro de Agricultura Tropical Bulbuxyá (CATBUL)", con la función de apoyar los programas de docencia e investigación de la facultad.

Este centro tiene una extensión de 90 hectáreas, se encuentra a una elevación promedio de 325 msnm; entre las coordenadas  $14^{\circ}39'39''$  latitud Norte y  $91^{\circ}22'00''$  longitud Oeste. Se encuentra en la zona de vida Bosque Subtropical Húmedo, con temperatura media anual de 24 grados C, máxima de 36 grados C y mínima de 18 grados C; precipitación promedio anual de 4000 mm y humedad relativa de 80%.

El cacao es uno de los cultivos principales del CATBUL. En este centro se encuentra un jardín clonal de cacao el cual contiene 25 clones de diferentes orígenes. Estos clones se obtuvieron del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), Turrialba, Costa Rica y se sembraron hace 12 años en unidades clonales de 24 plantas por clon.

En el transcurso de los años, varias plantas se han perdido, posiblemente por el ataque de enfermedades, las que algunas veces se han reemplazado con plantas jóvenes de diferentes orígenes, lo que evidencia contaminación en los materiales. En varias unidades clonales hay plantas adultas atípicas al clon. Los clones existentes en el jardín clonal del CATBUL y su origen se presenta en el cuadro 1.

Cuadro 1. Clones existentes en el jardín clonal del CATBUL y su origen.

| Clones            | Origen     |
|-------------------|------------|
| 1. Catongo.....   | Brasil     |
| 2. CC 18.....     | Costa Rica |
| 3. EET 48.....    | Ecuador    |
| 4. EET 62.....    | Ecuador    |
| 5. EET 95.....    | Ecuador    |
| 6. EET 96.....    | Ecuador    |
| 7. EET 162.....   | Ecuador    |
| 8. EET 399.....   | Ecuador    |
| 9. ETT 400.....   | Ecuador    |
| 10. ICS 6.....    | Trinidad   |
| 11. IMC 67.....   | Perú       |
| 12. Pound 7.....  | Perú       |
| 13. Pound 12..... | Perú       |
| 14. SCA 6.....    | Ecuador    |
| 15. SCA 12.....   | Ecuador    |
| 16. SPA 9.....    | Colombia   |
| 17. UF 12.....    | Costa Rica |
| 18. UF 29.....    | Costa Rica |
| 19. UF 296.....   | Costa Rica |
| 20. UF 613.....   | Costa Rica |
| 21. UF 654.....   | Costa Rica |
| 22. UF 667.....   | Costa Rica |
| 23. UF 668.....   | Costa Rica |
| 24. UF 676.....   | Costa Rica |
| 25. UF 677.....   | Costa Rica |

Durante varios años se han realizado hibridaciones artificiales entre estos clones, la semilla híbrida obtenida se vendió a productores de la región para establecer plantaciones comerciales.

### 3.2.2 Estudios con marcadores isoenzimáticos en cacao

Atkinson, Withers y Simpson (2) estudiaron semillas de diferente procedencia con 24 sistemas enzimáticos en hoja; 17 sistemas presentaron actividad, nueve exhibieron variación y sólo en siete esa variación fue reproducible. Sólo la peroxidasa se estudió en corteza y presentó variación. Las enzimas que presentaron variación fueron: fosfatasa ácida, alcohol deshidrogenasa, esterasa, malato deshidrogenasa, menadiona reductasa, fosfoglucoisomerasa y fosfoglucomutasa. Para este estudio se utilizaron geles de almidón.

Lanaud (20), estudió el polimorfismo de las enzimas fosfoglucoisomerasa, fosfoglucomutasa, malato deshidrogenasa, isocitrato deshidrogenasa, alcohol deshidrogenasa y fosfatasa ácida en diferentes grupos de cacao para intentar determinar la utilidad de los marcadores para reflejar la historia del cacao y proveer información sobre su estructura genética y su diversidad. Encontró que el grupo de cacao proveniente de la alta amazonia se distingue por su alta diversidad. Concluyendo que los marcadores enzimáticos son útiles para estudiar la variabilidad genética del cacao y que pueden reflejar su diversificación y su historia evolutiva.

Ngambi (24), estudió variabilidad genética en cacao. Utilizó electroforesis en geles de almidón y extractos de hoja de 10 plantas de cuatro cultivares. Evaluó 11 sistemas enzimáticos y concluyó que la fosfoglucoisomerasa y la enzima málica pueden ser de interés en estudios genético.

Elliot y Kennedy (11), estudiaron la peroxidasa con electroforesis en geles de almidón y los zimogramas obtenidos fueron usados para clasificar el germoplasma de la colección de cacao de "The Cocoa Research Unit" de la University of the West Indies, trabajo que ya se había realizado con otras enzimas.

Yidana, Kennedy y Withers (39), estudiaron las isoenzimas de la peroxidasa. Utilizaron hojas maduras y corteza de 12 clones de cacao. Observaron que las hojas maduras muestran menos bandas que el tejido de corteza pero con coloramiento más intenso, y que los árboles maduros del mismo clon producen zimogramas idénticos o casi idénticos. En los casos en que los zimogramas no son completamente idénticos la variación es generalmente en una o dos de las cuatro zonas principales de coloramiento y su presencia no disfraza la

distinción de las principales bandas características de los clones. Además, estos autores creen que la caracterización de cacao por medio del análisis isoenzimático podría convertirse una práctica rutinaria que vendría a sustituir o complementar los métodos tradicionales de caracterización.

### 3.2.3 características de las enzimas

El número de isoenzimas, la localización subcelular y la estructura cuaternaria de las nueve enzimas estudiadas se presentan en el cuadro 2.

Cuadro 2. Número, localización subcelular y estructura de nueve enzimas.

| Enzima                    | Isoenzimas | Localización | Estructura           |
|---------------------------|------------|--------------|----------------------|
| Shiquímico deshidrogenasa | 1-2        | p<br>c       | monómero<br>monómero |
| Alcohol deshidrogenasa    | 1-3        | c            | dímero               |
| Enzima málica             | 1          | c            | tetrámero            |
| Esterasa                  | 2-10       | c            | dímero<br>monómero   |
| Fosfatasa ácida           | 2-4        | varios       | dímero<br>monómero   |
| Fosfoglucomutasa          | 2          | c, p         | monómero             |
| Isocitrato deshidrogenasa | 1          | c            | dímero               |
| Malato deshidrogenasa     | 3          | c, mt, mc    | dímero               |
| Peroxidasa                | 2-13       | c, pc        | dímero<br>monómero   |

Fuente: Weeden y Wendel (37).

c= citosol; p= plastidio; mt= mitocondria; mc= microcuerpo; pc= pared celular.



#### 4. OBJETIVOS

##### Generales

- a. Identificar los 25 clones de cacao del jardín clonal del CATBUL mediante el uso de isoenzimas.

##### Específicos

- a. Analizar las isoenzimas de las enzimas: ácido shiquímico deshidrogenasa, alcohol deshidrogenasa, enzima málica, esterasa, fosfatasa ácida, fosfoglucomutasa, isocitrato deshidrogenasa, malato deshidrogenasa y peroxidasa.
- b. Determinar que enzimas y que regiones pueden ser de utilidad para la identificación de los clones y posteriores estudios sobre genética y reproducción en cacao.
- c. Elaborar un fenograma de los 25 clones de cacao mediante la comparación entre bandas.

#### 5. HIPOTESIS

Por los menos algunas de las enzimas estudiadas son polimórficas y en combinación permiten la identificación adecuada de cada clon.

## 6. METODOLOGIA

### a. Genotipos de cacao

El material vegetal lo constituyeron los 25 clones de cacao existentes en el jardín clonal del CATBUL. La denominación de los clones y su origen se muestra en el cuadro 1.

### b. Colecta y transporte de las muestras

Se contaron ramas de 10 a 15 cm de largo, que contenían hojas tiernas de dos a 10 cm de largo. Las ramas se transportaron al laboratorio en tubos de ensayo que contenían 10 ml de una solución de sacarosa al dos por ciento. A los tapones de hule de los tubos se les abrió un agujero por el cual se insertó la base de la rama hasta que hizo contacto con la solución de sacarosa permitiendo que las hojas quedaran fuera del tubo. Después de su identificación las muestra se cubrieron con bolsas plásticas y se transportaron hacia el laboratorio en una hielera. En la figura 3 se presenta la colocación de la rama de cacao dentro del tubo de ensayo.

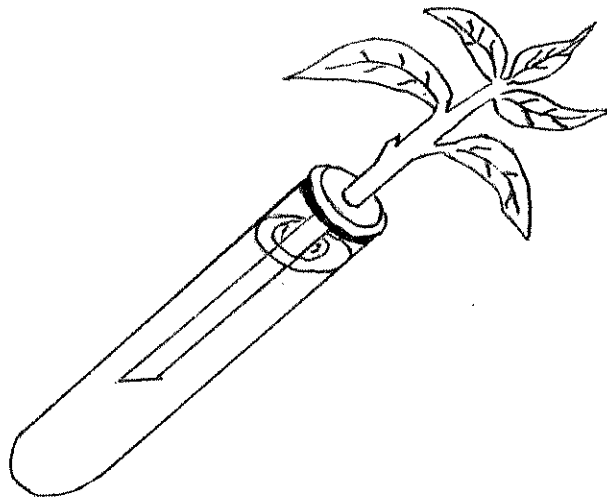


Figura 3. Esquema de la colocación de la rama tierna de cacao dentro del tubo de ensayo.

### c. Preparación de geles de poliacrilamida

Se utilizó un sistema discontinuo, que consistió en una gel de resolución con 12% de acrilamida y una gel de concentración con cuatro por ciento de acrilamida. La electroforesis fue en una dimensión, siguiendo el método de Laemmli (19). Las soluciones stock para la preparación de las geles y amortiguadores se presente en el anexo 1.

### d. Extracción de las muestras

Se tomaron 80 mg de hoja tierna recién cortada y se maceraron con 800 microlitros de buffer de extracción en un mortero frío. El buffer de extracción fue el siguiente:

|                          |                  |
|--------------------------|------------------|
| 0.1 M Tris-HCl, pH 7.5   | 38 ml            |
| Triton X-100             | 2%               |
| 2-Mercaptoetanol         | 2 microlitros/ml |
| Polyvinylpolypyrrolidone | 5%               |

El pUPP y el mercaptoetanol se agregaron al momento de ser usado el buffer. Además se agregó un mg de bromofenol a cada 10 ml de buffer el que sirvió de frente durante la corrida electroforética.

El macerado se trasladó a un tubo de reacción frío y se centrifugó durante ocho minutos, se tomaron 250 microlitros del sobrenadante y se pasaron a otro tubo de reacción frío, al que se le habían añadido 75 microlitros de glicerol con el fin de agregarle peso a la muestra. Terminada esta etapa las muestras estuvieron listas para la electroforesis, estas muestras se mantuvieron en el congelador hasta un máximo de tres días.

### e. Cargado de las muestras

Cuando las geles de concentración polimerizaron se procedió a colocar las geles en el aparato de electroforesis, se anadió el buffer de electrodo frío. Inmediatamente después, con una

micropipeta, se depositó en cada pozo 15 microlitros de los extractos vegetales cuando se utilizó el aparato de electroforesis pequeño (Bio-Rad Mini-PROTEAN II Dual Slab Cel) y 60 microlitros en cada pozo cuando se utilizó el aparato grande (Bio-Rad PROTEAN II).

#### f. Condiciones de la corrida electroforética

Las corridas se realizaron dentro del refrigerador, con bolsas de hielo rodeando el aparato de electroforesis y recirculado agua fría entre mangueras de plástico en el buffer de electrodo, las geles pequeñas se corrieron a 200 voltios durante 70 minutos y las geles grandes a 200 voltios durante seis horas. En ambos casos se utilizó una fuente poder Fisher (Biotech electrophoresis systems FB 105).

#### g. Revelación de enzimas

Durante el transcurso de la corrida, se pesaron y se midieron los reactivos para teñir dos enzimas, debido a que se corrieron dos geles pequeñas en cada corrida. Mientras que para las geles grandes se corrieron cuatro geles en cada corrida. Al finalizar la corrida, inmediatamente se desconectó la fuente poder y el recirculador, y simultáneamente se separaron las geles y se mezclaron con los reactivos. Para teñir geles pequeñas se utilizaron 50 ml de colorante y para geles grandes 150 ml.

Cuando las enzimas se revelaron, las geles se lavaron con agua y se fijaron utilizando ácido acético glacial, metanol y agua, en proporciones 1:5:5; o glicerol, ácido acético, agua, etanol en proporciones de 1:2:4:5 (Stuber et al., (35) ). Las geles que se analizaron inmediatamente se mantuvieron únicamente en agua (hasta dos semanas) para evitar la desecación.

#### h. Sistemas enzimáticos que se estudiaron

Se establecieron y analizaron los zimogramas de las enzimas ácido shiquímico deshidrogenasa, alcohol deshidrogenasa, enzima málica, esterasa, fosfatasa ácida, fosfoglucomutasa, isocitrato deshidrogenasa, malato deshidrogenasa y peroxidasa en cinco árboles de los 25 clones de cacao del jardín clonal existente en el CATBUL. (Las soluciones reveladoras de estas enzimas se presentan en el anexo 2).

#### i. Variables

Para establecer la figura de los zimogramas se utilizó la variable distancia de migración de las bandas y para la elaboración del fenograma que agrupa los diferentes clones de cacaos se utilizaron las variables ausencia o presencia de bandas.

#### j. Establecimiento de los zimogramas y su análisis

Para el establecimiento de los zimogramas se corrió por lo menos nueve veces cada clon para cada enzima, a excepción de la enzima ácido shiquímico deshidrogenasa y alcohol deshidrogenasa revelada con 0.1 M Tris-HCl, pH 8.3, que sólo se corrieron dos veces. Los zimogramas se dibujaron a escala y se tomaron como base zimogramas obtenidos en las geles grandes, con excepción de las enzimas ácido shiquímico deshidrogenasa y alcohol deshidrogenasa revelada con buffer 0.1 M Tris-HCl, pH 8.3 en las que se tomó como base zimogramas obtenidos en geles pequeñas. Además las geles reveladas se fotografiaron con el fin de obtener una fidelidad en los zimogramas. La estructura de las enzimas se determinó en base al patrón de bandas que presentaron los diferentes clones.

El fenograma de los 25 clones se elaboró de la siguiente manera: a) cada OTU lo constituyó un clon; b) los caracteres lo constituyeron las bandas mostradas por cada enzima, no se tomaron en cuenta las bandas consideradas producto de la hibridación de alelos; c) la matriz básica de datos se construyó asignando valor de uno a presencia y de cero a la ausencia de bandas; d) los valores de similitud se obtuvieron por medio del coeficiente simple de correspondencia (Simple matching coefficient). El valor de este coeficiente oscila entre uno y cero; e) La matriz de similitud se construyó usando el programa RAPDLOT (programa diseñado para el análisis de RAPDs, al no incorporar bandas híbridas entre alelos, puede utilizarse para analizar datos de isoenzimas); f) la conformación de los grupos se hizo con el programa PHYLIP (desarrollado en la Universidad de Filadelfia); y g) para el agrupamiento de los clones se utilizó el ligamiento promedio no ponderado (UPGMA). El procedimiento completo de la elaboración del fenograma lo describen Crisci y López (8).

## 7. RESULTADOS Y DISCUSION

En la muestra de 125 plantas analizadas, cinco árboles de cada clon se encontró que 23 árboles (18.4 %) no correspondió a los patrones de bandeo establecidos. Este resultado indica que existe un alto nivel de contaminación en el jardín clonal. Es posible que inicialmente durante el transporte y la siembra de los materiales se hayan cometido errores o que posteriormente los árboles hayan sido reemplazados con otros materiales.

Al haber altos niveles de contaminación en este jardín clonal es imposible garantizar el genotipo de los híbridos que ahí se producen. El costo relativamente alto de la verificación por electroforesis se justifica al tener la plena certeza de los materiales que posteriormente se someterán a constantes pruebas de evaluación a largo plazo.

Al no contar con los patrones de bandeo correspondientes a los clones del estudio los resultados que se presentan a continuación son válidos únicamente para los clones del jardín clonal de cacao del Centro de Agricultura Tropical Bulbuxyá, siendo necesario establecer estos patrones en la fuente original.

### 7.1 ACIDO SHIQUIMICO DESHIDROGENASA (SKD)

Presenta una región (figura 4) bien definida entre 1.2 y 1.7 cm, en nuestra interpretación ésta corresponde a tres alelos de un gen. Sólo el clon EET 400 sería homocigota para la banda más cercana al origen (aa), tres clones homocigotas para la banda intermedia (bb) (por ejemplo SPA 9), 18 clones homocigotas para la banda más lejana al origen (cc) (por ejemplo Pound 12) y sólo el clon UF 613 heterocigota (ac) y los clones IMC 67 y UF 29 son heterocigotas para los alelos bc.

SKD

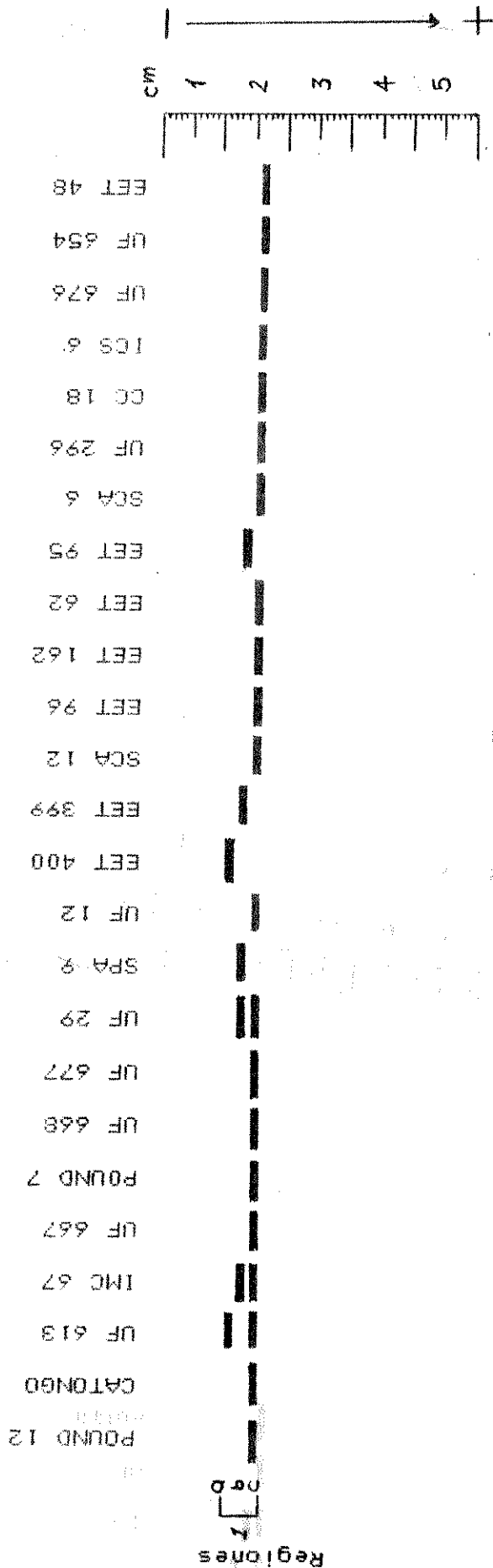


Figura 4. Zimogramas de los 25 clones de cacao del Centro de Agricultura Tropical Bulbuxyá (CATBUL) para la enzima ácido shiquímico deshidrogenasa (SKD). Únicamente presenta una región con tres alelos (a, b y c), siendo de importancia para estudios de paternidad el alelo "a" que presentan los clones EET 400 x UF 613.



Esta enzima según el patrón de bandas presentado es monomérica. Es de mucha importancia el alelo raro (a) que poseen los clones EET 400 (homocigota aa) y UF 613 (heterocigota ac).

## 7.2 ALCOHOL DESHIDROGENASA (ADH)

### 7.2.1 Alcohol deshidrogenasa (ADH) (Revelada con buffer 0.1 M Tris-HCl, pH 7.2)

Presenta dos regiones (figura 5), una región entre 2.85 a 3.2 cm. Los resultados indican que posiblemente exista comigración en esta región (es decir que hay producto de más de un gen en la misma región). Tres clones presentan una sola banda, la más cercana al origen (aa) (por ejemplo Pound 12). Siete clones presentan la banda más distante del origen (bb) (por ejemplo, Catongo). Ocho clones presentan tres bandas siendo la central más fuerte (ab) (por ejemplo UF 613). Cinco clones tienen tres bandas, pero la más distante del origen es la más fuerte (por ejemplo IMC 67), esto hace sospechar que este presente otro gen. En esta región la ADH parece tener estructura dimérica.

También se observa la presencia de otra región entre 2.4 y 2.6 cm, que presenta patrones de una y dos bandas, observándose claramente que algunos clones como por ejemplo Pound 7 tienen la banda más distante del origen (bb), y otros clones como por ejemplo IMC 67, tienen la banda más cercana al origen (aa). Otros clones, como por ejemplo EET 96 son heterocigotas por poseer las dos bandas (ab). En esta región la ADH se presenta como una enzima monomérica.

Cuando se utilizó poca cantidad de muestra, sólo se observaron dos regiones, pero al aumentar la cantidad se observaron otras regiones más que al parecer son polimórficas. Además, el apareamiento de otras regiones podría estar influenciado por la edad

ADH

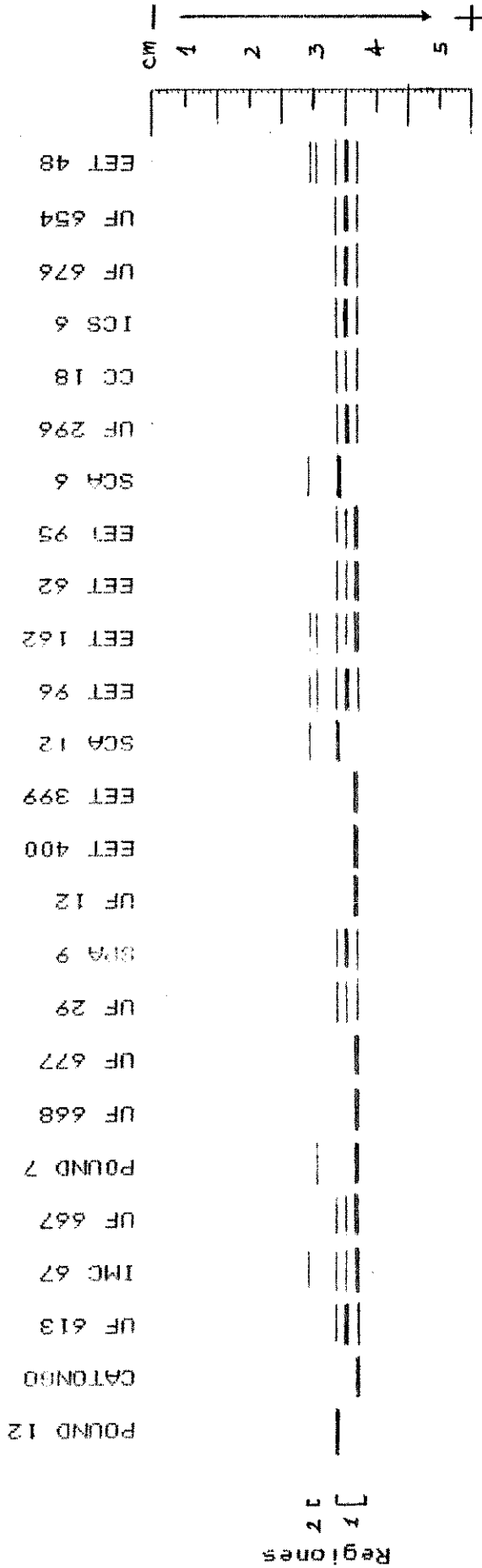


Figura 5. Zimogramas de los 25 clones de cacao para la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH) revelada con buffer Tris-HCl, pH 7.2. Presenta dos regiones, la región uno en la que posiblemente existe comigración debido a que en los clones que poseen tres bandas no siempre fue la central la más intensa. Mientras que en la región dos se presentan claramente dos alelos (a y b). La diferencia de estructura que se presenta en la ADH con diferente buffer posiblemente se debe a que en cada sistema revelador se revela una isoenzima diferente.

de la planta, plantas más jóvenes parecen presentar más regiones que las plantas más adultas.

### 7.2.2 Alcohol deshidrogenasa (ADH) (Revelada con buffer 0.1 M Tris-HCl, pH 8.3)

Presenta dos regiones bien definidas (figura 6). La región uno está ubicada entre 2.0 y 2.3 cm presenta bandas anchas. Clones como por ejemplo UF 613 presentan una banda, la más cercana al origen, otros clones, como Catongo presentan dos bandas, siendo en la mayoría de los clones más fuerte la que está más cerca del origen. Por la ligera diferencia de la intensidad de las bandas se sospecha que se trate de dos regiones o que posiblemente haya comigración.

La región dos está ubicada entre 1.8 y 1.9 cm, las bandas son mucho más delgadas que las de la región uno, es polimórfica con dos alelos. Algunos clones, como por ejemplo Pound 12 presentan la banda más cercana al origen (aa). Clones como por ejemplo SPA 9 presentan la banda más lejana al origen (bb). Otros clones, como por ejemplo UF 613, presentan dos bandas (ab) de la misma intensidad.

El patrón de bandas presentado en la región dos de la ADH corresponde a una enzima monomérica, lo cual coincide con el zimograma de la ADH de la figura 5. En la región uno sí existe variación en los dos zimogramas de la ADH.

Así que cuando se reveló la ADH con buffer 0.1 M Tris-HCl, pH 7.2 se obtuvieron patrones de una y tres bandas, en los que la más intensa no fue siempre la central (figura 4). También se observó en algunas corridas que la ADH revelada con este mismo buffer, algunos clones, como por ejemplo en UF 667 presentaron cinco bandas, siendo la central más intensa y la de los lados muy débiles, o bien una banda

ADH

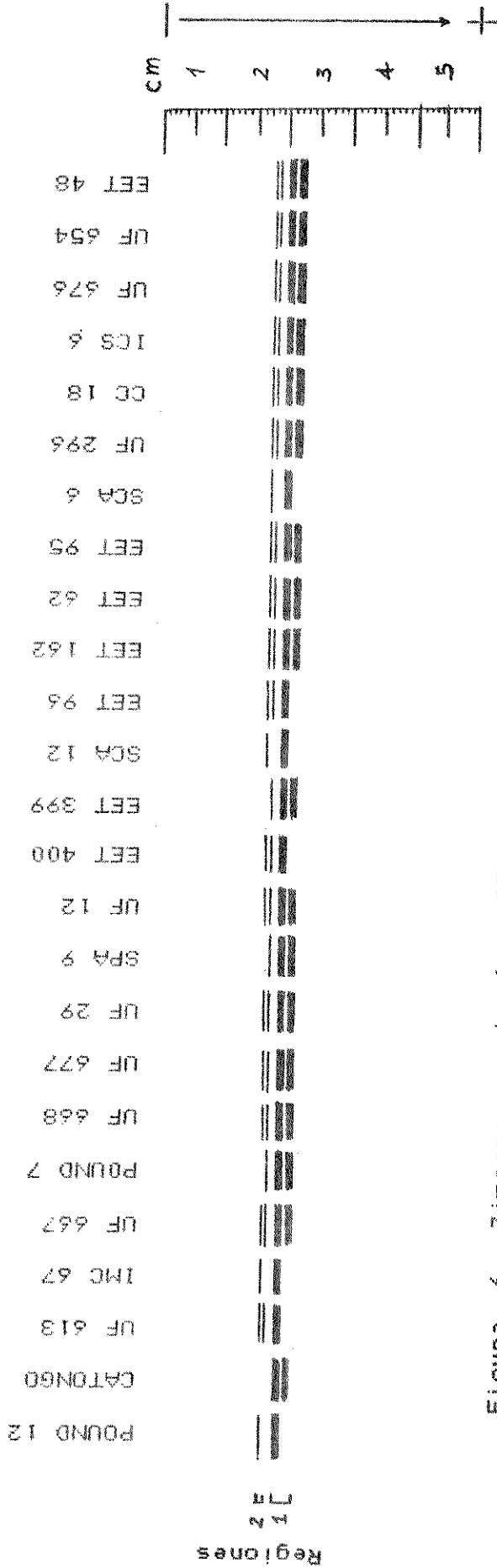


Figura 6. Zimogramas de los 25 clones de cacao para la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH) revelada con buffer Tris-HCl, pH 8.3. Presenta dos regiones, la región uno (con dos alelos a y b) presenta bandas anchas. Posiblemente existe migración debido a que en algunos clones la banda del alelo a se tiñó más fuerte que la banda del alelo b y en ninguno de los clones la banda del alelo q se tiñó más fuerte que la banda del alelo a. De ser así se trata de dos regiones una invariable (la más cercana al origen) y otra variable (la más lejana al origen) de esa manera la banda más cercana al origen aparece más intensa cuando los clones son heterocigotos para la región variable. La región dos se presenta similar a la de la figura 5.

fuerza entre dos muy débiles, como por ejemplo en UF 668, y algunas veces una fuerte con dos muy débiles arriba y una abajo, como por ejemplo en UF 677. Esto hace suponer que se trate de duplicación de bandas o bien de comigración.

La región dos de la ADH en plantas de polinización libre de Pound 12 también presentaron patrones de una y dos bandas, lo que puede contribuir a la interpretación de esta enzima.

Además debe tomarse en cuenta que esta enzima revelada con pH 7.2, en frutos de polinización libre presenta patrones de una (aa y bb) y tres bandas (ab) bien definidas en la región uno en la progenie de plantas heterocigotas de cacao. Esto hace sospechar que esta región de la ADH es dimérica y que no hay comigración.

No se puede asegurar la estructura de la ADH en la región uno, pero posiblemente se trata de un monómero (figura 6) en la que existe comigración debido a que en algunos clones la banda más cercana al origen es más intensa o bien se trate de un dímero (figura 5).

Otra posibilidad es que se trate de una isoenzima diferente la que se revela en la región uno de la ADH cuando se cambia el pH y de ser así, al revelarla con pH 8.3 se expresa una región monomérica en la que hay comigración, siendo la región más cercana al origen invariable y la otra variable. En la que la banda de la región variable de los homocigotos aa, migra la misma distancia que la banda invariable, apareciendo una sola banda en esa región, mientras que en los homocigotos bb, aparecen dos bandas con la misma intensidad, y en los heterocigotos ab aparecen siempre dos bandas, pero con la diferencia que la banda invariable es más intensa que la más lejana al origen. Esto explicaría el cambio de intensidad de la banda más

cercana al origen de la región uno, porque en ninguno de los zimogramas de los clones en la que la ADH se reveló con pH 8.3 la banda más lejana al origen se haya teñido más fuerte y además la banda más lejana al origen no haya aparecido sola.

### 7.3 ENZIMA MALICA (EM)

Presenta siete regiones (figura 7), la región uno esta ubicada a 3 cm, presenta bandas anchas como por ejemplo las de Pound 12, no definiéndose en ninguno de los clones el número de bandas contenidas en esta región. Por ejemplo en Catongo se presenta una banda más angosta y más cercana al origen, mientras que en otros clones, como por ejemplo en IMC 67 se presentan una banda más lejana al origen y de grosor similar a la de Catongo.

La región dos se ubica a 1.8 cm, todos los clones presentan una banda, clones como por ejemplo Pound 12 presentan la más cercana al origen y otros como por ejemplo UF 667 la más lejana al origen.

La región tres está ubicada a 1.5 cm, se presenta como una banda invariable en la mayoría de los clones, excepto en EET 399 que fue el doble de ancho a la presentada por los demás clones, pero no se definió si se trata de más de una banda.

La cuarta región se ubica a 1.2 cm, la mayoría de los clones presentan una banda, la más cercana al origen, como por ejemplo Pound 12, otros clones como por ejemplo UF 667 presentan dos bandas del mismo grosor e intensidad.

La región cinco está ubicada a 0.9 cm, se presenta como una región invariable en la que no se definió si trata de más de una banda.

EM

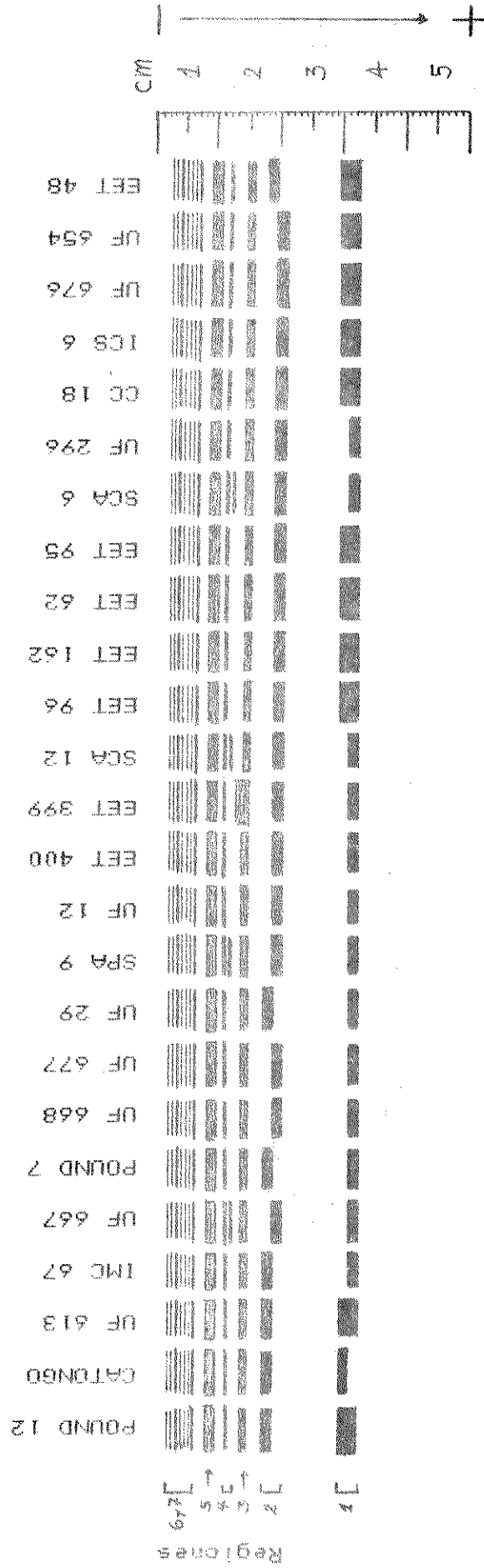


Figura 7. Zimogramas de los 25 clones de cacao para la enzima málica (EM). Presenta siete regiones, cuatro son variables (1, 2, 3 y 4) y tres son invariables, no se puede asegurar la estructura de esta enzima, pero posiblemente la región cuatro sea monomérica.

Las regiones seis y siete se ubican entre 0.3 a 0.7 cm, está compuesta por siete bandas, al parecer es invariable en todos los clones, la primera banda, o sea la más lejana al origen es fuerte, luego se presentan tres bandas débiles y después una fuerte, y arriba de esta banda fuerte hay dos bandas débiles. Las siete bandas tienen la misma separación y son las que primero aparecen durante la tinción, pero presentan el problema que cuando aparecen el resto de bandas estas dos regiones se tiñen intensamente y se pierde la definición de las bandas, quedando únicamente como una mancha. En algunas corridas y en algunos clones se podían observar cuatro bandas débiles en lugar de tres entre las dos fuertes, de cualquier manera se asume que puede haber comigración en esta región por el patrón de bandas presentado. Por lo que la interpretación genética es difícil.

#### 7.4 ESTERASA (Est)

Presenta un patrón de bandeo complicado, que aún es difícil definir el número de regiones que presentan debido a que las regiones están muy juntas, siendo difícil establecer que bandas corresponden a que región. Sin embargo sí es una enzima que permite detectar diferencias entre los clones estudiados y que para este fin es más útil que cualquiera de las demás enzimas analizadas. Según los patrones presentados por esta enzima en cacao es un monómero. Los zimogramas de la Est de los 25 clones de cacao se presentan en la figura 8.

#### 7.5 FOSFATASA ACIDA (ACP)

Presenta cuatro regiones (figura 9), la primera a 3.7 cm, es homocigota e invariable; la segunda entre 2.8 a 3.5 cm, es polimórfica, con tres alelos, 10 clones, entre ellos Catongo tienen



1.33

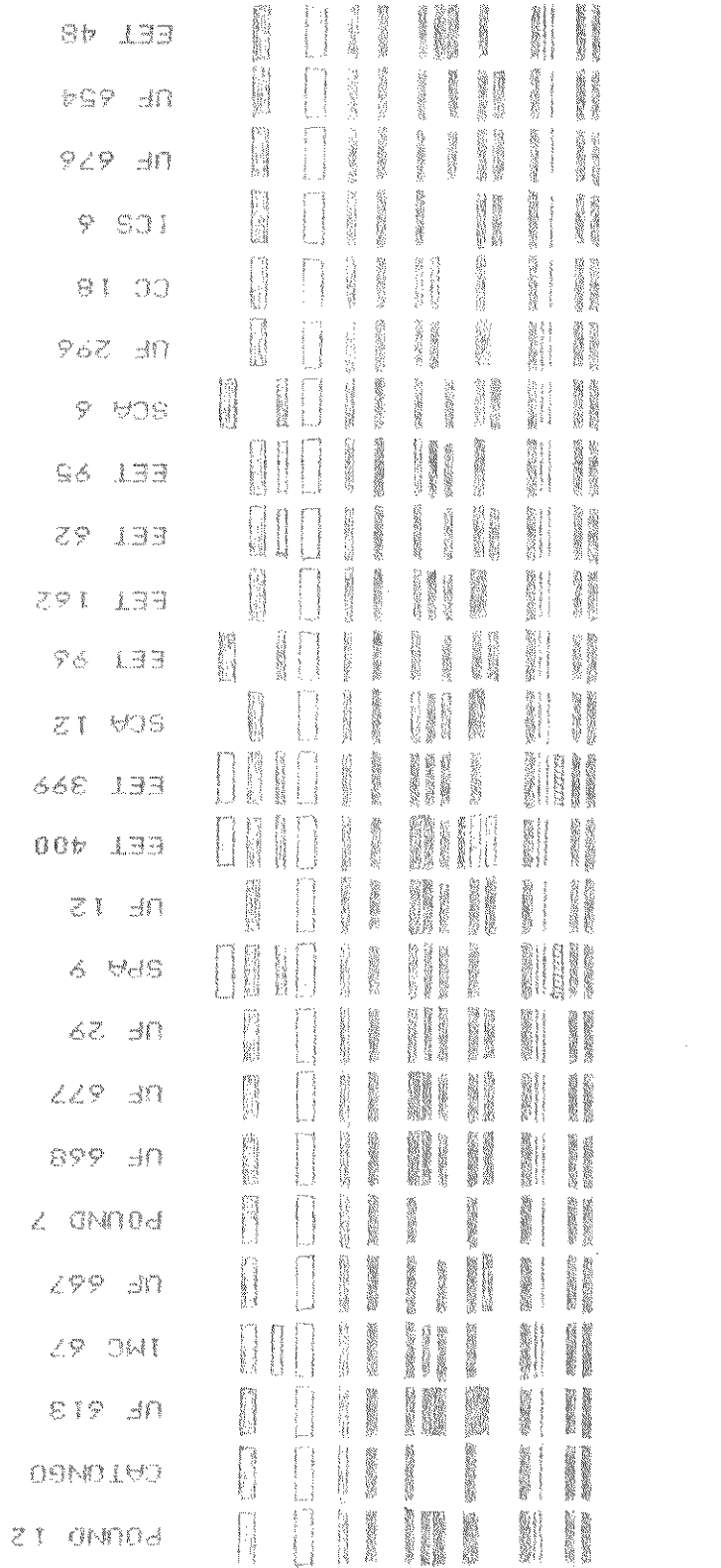


Figura 8. Zimogramas de los 25 clones de cacao para la enzima esterasa (Est). La interpretación genética de esta enzima es complicada debido a que las regiones se presentan muy juntas, pero para identificación de clones es importante.

los alelos aa, cuatro clones, como por ejemplo Pound 12, tienen los alelos bb, tres clones, como por ejemplo IMC 67, tienen los alelos ab y ocho clones, como por ejemplo UF 29, tienen los alelos ac. Los clones heterocigotos (ab y ac) presentan tres bandas, siendo la central más fuerte. En esta región de la ACP su estructura es dimérica.

La tercera y cuarta región (entre 1.6 a 2.1 cm) presentan comigración debido a que hay patrones de una, dos y tres bandas. Estos patrones no corresponden a una enzima dimérica, en los clones que presentan tres bandas todas son del mismo grosor e intensidad, y en algunos clones, como por ejemplo en Pound 12, están juntas y más separadas en otros, como por ejemplo en UF 667. En los clones que presentan dos bandas ambas son del mismo grosor, pero la más alejada al origen es más fuerte y en algunos clones están juntas, como por ejemplo en Catongo, y en otros más separadas, como por ejemplo en UF 613, y en los que presentan una banda (la más alejada al origen) siempre ésta es fuerte.

Los embriones y las plántulas de cacao presentan más regiones de tinción que las hojas tiernas de plantas adultas. Así que la región dos de la ACP en plantas adultas descrita en este documento, queda entre dos regiones cuando se analizan embriones o plántulas de cacao. La aparición de estas dos regiones puede causar confusión cuando se estudian embriones o plántulas de cacao, algunas veces la región de arriba de estas dos regiones aparece en muestras de hojas tiernas de plantas adultas cuando se aumenta la cantidad de muestra por pozo. Las cuatro regiones aquí descritas son persistentes en hojas tiernas de plantas adultas, en embriones y plántulas.

ACP

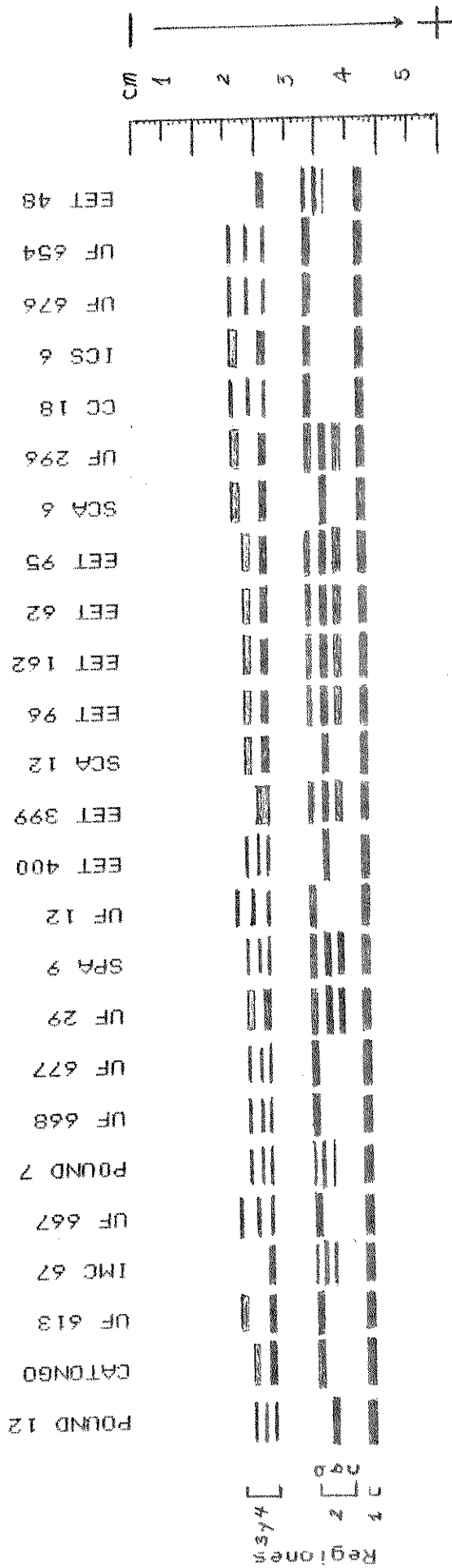


Figura 9. Zimogramas de los 25 clones de cacao para la enzima fosfatasa ácida (ACP). Presenta cuatro regiones, la región uno es invariable. La región dos es variable con tres alelos (a, b y c), no presenta comigración ni hibridación entre bandas y su herencia es mendeliana simple, por lo que es de interés para estudios genéticos. Se asume que las regiones 3 y 4 están unidas (hay comigración) por los patrones de una, dos y tres bandas que no corresponden a una enzima dimerica.

Existe la posibilidad de que en la región dos de la ACP exista un cuarto alelo (más cercano al origen) no presente en los 25 clones estudiados, pero que puede estar presente en materiales de cacao contaminantes del jardín clonal o bien entre los cacaos que están cerca de éste. Este alelo se encontró en plantas de polinización libre de Pound 12.

La región dos de la fosfatasa ácida es un marcador útil para realizar estudios genéticos en cacao debido a que presenta polimorfismo, no existe comigración ni hibridación entre bandas, y su herencia es mendeliana.

#### 7.6 FOSFOGLUCOMUTASA (PGM)

Presenta dos regiones (figura 10), una a 2.9 cm, la que mostró bandas anchas, como por ejemplo en UF 667, no se definió si se trata de más de una banda.

La región dos migró 1.8 cm, la mayoría de los clones, como por ejemplo Pound 12, presentan la banda más cercana al origen. Sólo IMC 67 y POUND 7 presentan la banda más lejana al origen. Según el patrón de bandeo, esta enzima es monomérica.

#### 7.7 ISOCITRATO DESHIDROGENASA (IDH)

Presenta dos regiones (figura 11), la región uno está ubicada a 2.3 cm. En varios clones, como por ejemplo en Pound 12, se presenta la banda más cercana al origen y otros, como por ejemplo en UF 667, la banda más lejana al origen. Las bandas fueron del mismo grosor e intensidad.

PGM

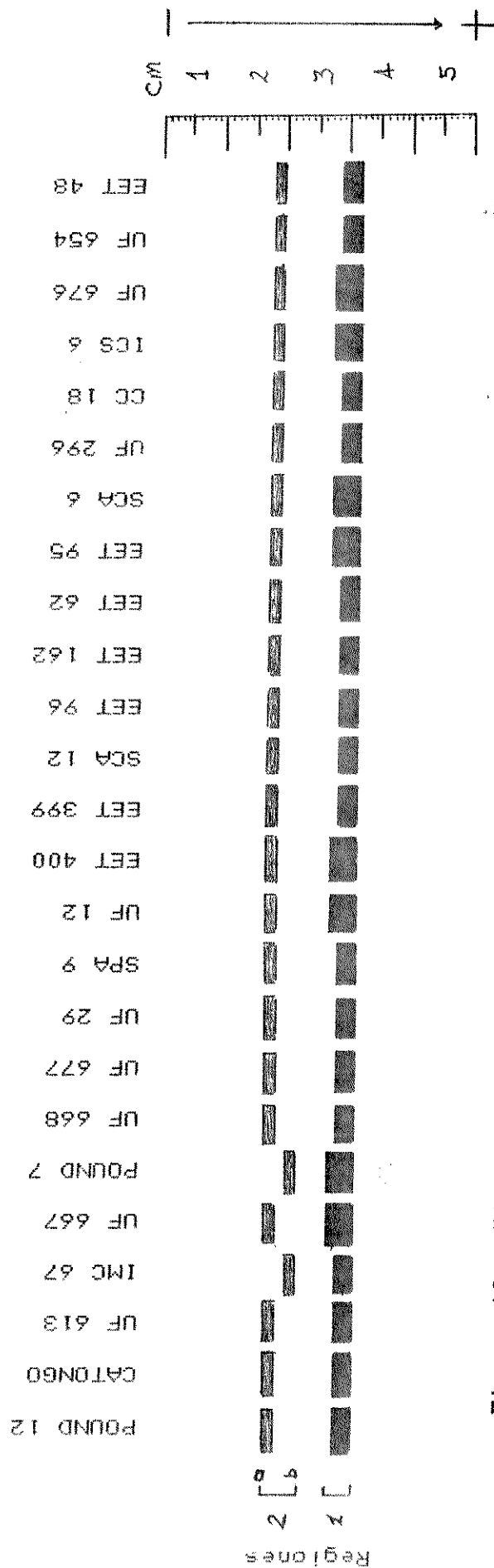


Figura 10. Zimogramas de los 25 clones de cacao para la enzima fosfoglucomutasa (PGM). Presenta dos regiones, la región uno presenta variabilidad pero no se define el número de bandas. La región dos es variable con dos alelos (a y b).

IDH

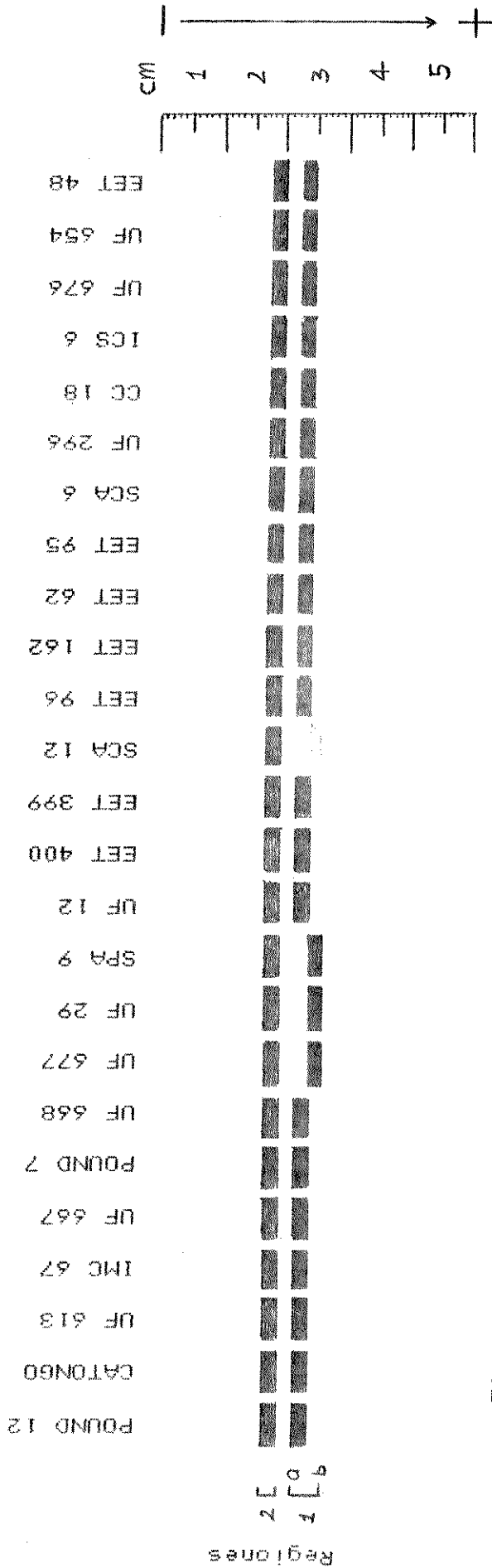


Figura 11. Zimogramas de los 25 clones de cacao para la enzima isocitrato deshidrogenasa (IDH). Presenta dos regiones, la región uno es variable con dos alelos (a y b). La región dos es invariable.

La región dos está ubicada a 1.8 cm, se presenta invariable en todos los clones. Para ambas regiones no se pudo establecer si se encuentran más de una banda.

#### 7.8 MALATO DESHIDROGENASA (MDH)

Presenta cuatro regiones (figura 12), la primera a 3 cm, con una sola banda invariable y consistente en todas las corridas, es menos intensa que la banda de la región dos.

La región dos está ubicada a 2.7 cm, con una sola banda de coloración fuerte, invariable y consistente en todas las corridas y en todos los clones.

La región tres ubicada entre 2.5 a 2.9 cm, presenta patrones de una y tres bandas, en los patrones de una banda sólo se presenta la banda más distante del origen (bb), como se observa en el clon Pound 12 y otros clones. En los patrones de tres bandas todas las bandas fueron del mismo grosor e intensidad, unos clones, como por ejemplo UF 12, las presentan juntas, en otros, como por ejemplo en UF 613, se presentan más separadas, y en otros clones, como por ejemplo UF 668, no se definieron las tres bandas sólo se observa una mancha difusa del ancho que ocupan las tres bandas más juntas. En esta región los patrones presentados corresponden a una enzima dimérica.

La región cuatro se ubica a 1.7 cm, presenta una región tenida débilmente, consistente y parece ser invariable. Sólo en el clon ICS 6 se logró una perfecta definición y mostró dos bandas del mismo grosor e intensidad, en el resto de los clones no se logró tal definición pero el ancho de la región tenida es similar al ancho que

MDH

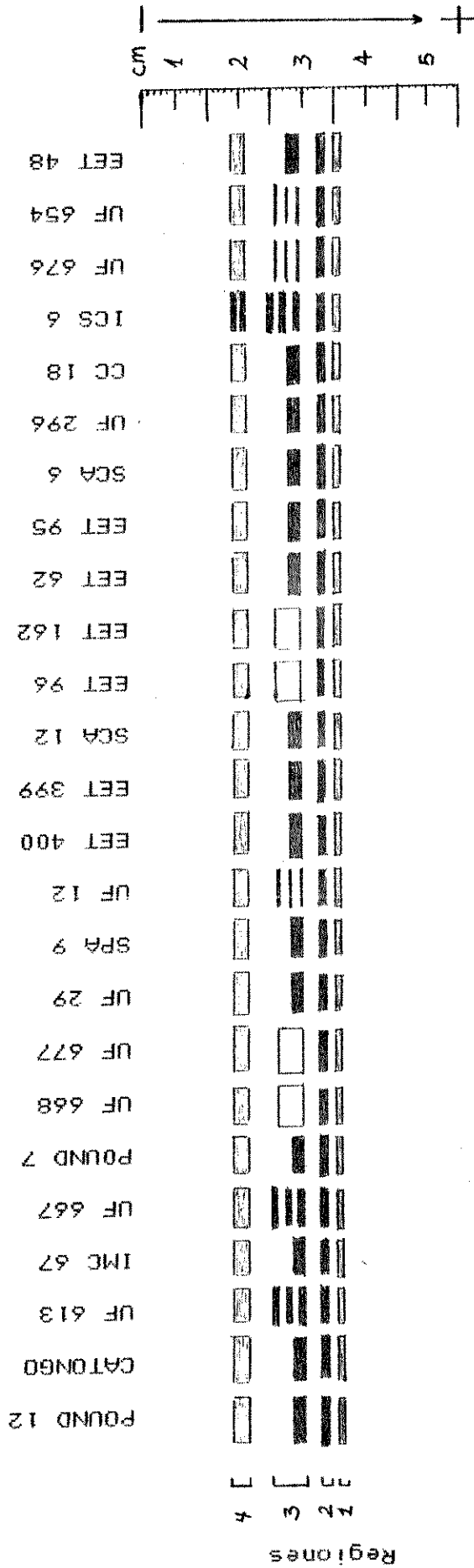


Figura 12. Zimogramas de los 25 clones de cacao para la enzima malato deshidrogenasa (MDH). Presenta cuatro regiones, las regiones uno y dos son invariables. La región tres presenta tres alelos (a, b y c), en algunos clones, como por ejemplo en UF 668 no se definió el número de bandas. La región cuatro al parecer es invariable, sólo en el clon ICS 6 se definieron dos bandas.



ocupan las dos bandas de ICS 6. La definición lograda en el clon ICS 6 indica que podría ser la MDH en esta región una enzima monomérica.

#### 7.9 PEROXIDASA (Prx)

Presenta nueve regiones (figura 13) de las cuales, cuatro son consistentes en todos los clones y en todas las corridas.

La región uno se localiza a 9.6 cm, es invariable y consistente en todas las corridas y en todos los clones, la coloración de las bandas en esta región varió en los diferentes clones desde muy débil hasta muy fuerte.

La región dos está ubicada a 9.1 cm, esta región no fue consistente en todas las corridas y sólo se presentó en tres clones (IMC 67, UF 12 y SCA 6) y cuando apareció en uno de estos clones no se presentó en los otros dos.

En algunos clones que presentaron esta región dio la idea que esta banda pertenecía a la región uno y que los clones que la poseían eran heterocigotos, pero realmente se trata de dos regiones diferentes en la que una es consistente y la otra no lo es. De esa manera el clon SCA 6 parece ser heterocigoto cuando en realidad no lo es. Por ejemplo, el clon IMC 67 presentó la banda de esta región en siete corridas, pero no la presentó en la octava y novena.

La región tres está ubicada entre 8.5 a 9 cm, no fue consistente en todos los clones ni en todas las corridas.

La región cuatro se ubica a 6.3 cm, fue consistente en todos los clones y en todas las corridas, mostró una coloración débil, y una sola banda invariable.

PRX

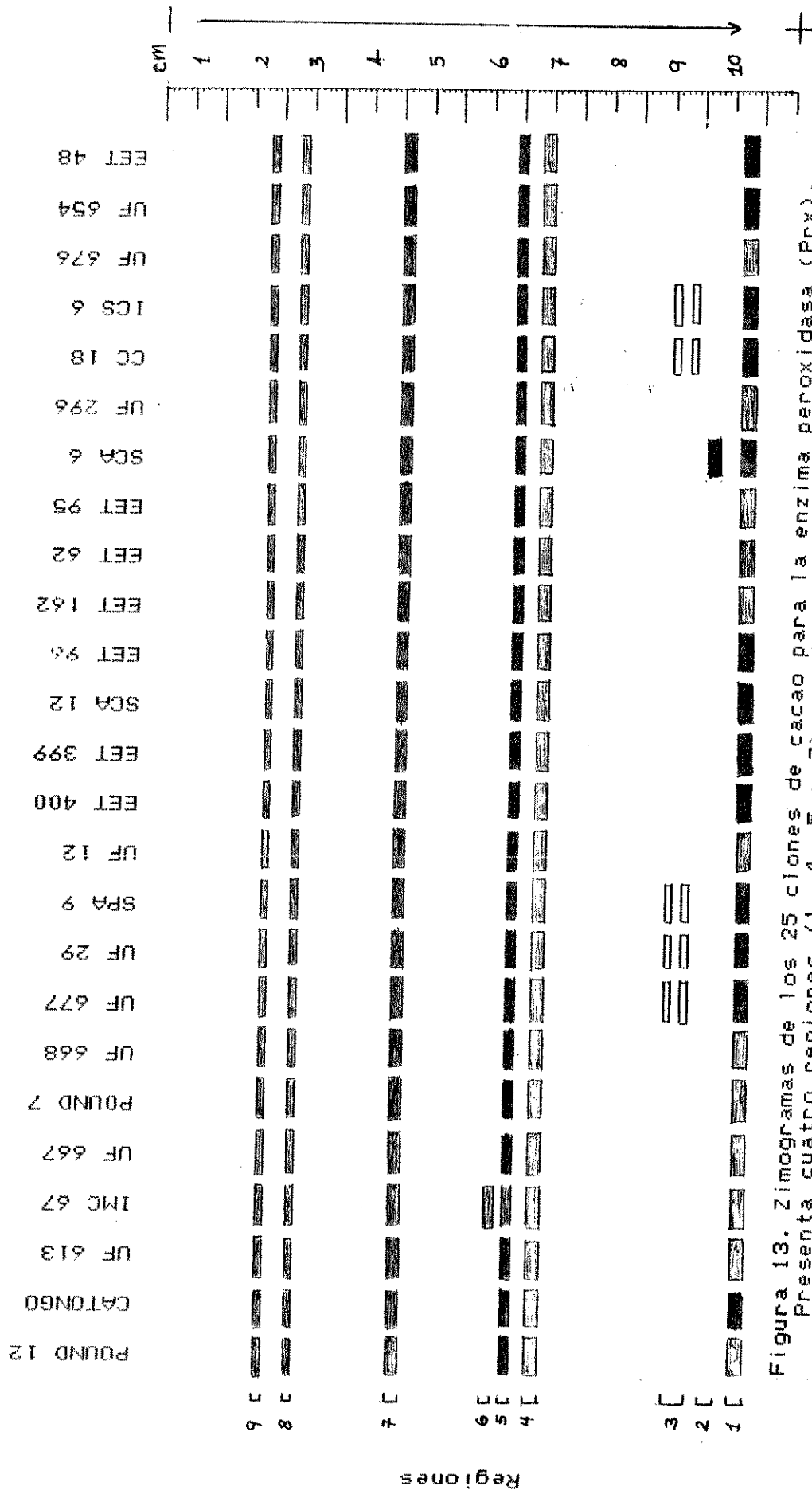


Figura 13. Zimogramas de los 25 clones de cacao para la enzima peroxidasa (Prx). Presenta cuatro regiones (1, 4, 5 y 7) consistentes e invariables en todos los clones y en todas las corridas. Las regiones 2, 3, 6, 8 y 9 son inconsistentes. Por esta razón las isoenzimas de la peroxidasa son de poca utilidad para la clasificación de clones de cacao.

La región cinco está ubicada a 5.9 cm, es una región invariable y consistente en todos los clones y en todas las corridas. La banda de esta región es de coloración más intensa que la banda de la región cuatro.

La región seis se ubica a 5.6 cm, la banda de esta región es no consistente, en unas corridas la presentó el clon IMC 67 y en otras el clon SCA 12. El apareamiento de esta banda da la impresión de que esta banda y la banda de la región cinco sean de misma región y que los clones que la presentan sean heterocigotas, debido a que el grosor y la intensidad de las dos bandas son similares.

La región siete se ubica a 4 cm, es una región invariable y consistente en todos los clones, en algunas corridas la banda fue bien definida y en otras no hubo buena definición.

La región ocho se ubica a 2.3 cm, presentó una sola banda, invariable y no consistente en todos los clones y todas las corridas.

La región nueve está ubicada a 1.8 cm, se presentó como una región no consistente en todos los clones y en todas las corridas, algunas veces y en algunos clones se presentó una banda y en otras corridas y en otros clones se presentaron dos bandas.

La estructura de las isoenzimas de la peroxidasa en cacao puede ser monomérica, ya que se tienen regiones con una banda (como por ejemplo, la región uno), o bien con dos bandas (como por ejemplo, las de la región tres).

Las isoenzimas de la peroxidasa son de poco interés para identificación de los clones de cacao estudiados debido a que las

regiones persistentes en todas las corridas son invariables, y aquellas regiones que muestran variabilidad no son persistentes.

Unos de los problemas que se presentaron es que algunas veces la definición de las bandas no fue perfecta, y en ocasiones se tendió a asumir que el número de bandas estaba en función del ancho de la región tenida. Esto resultó totalmente falso, al menos en la región uno de la ADH en la que pueden obtenerse bandas simples gruesas y bandas delgadas. Al analizar los zimogramas puede caerse en el error de nombrar a los individuos que presentan bandas anchas heterocigotos sin serlo. El grosor de tinción de una región esta de acuerdo a la actividad de la enzima y del pH en que se revela. Al presentarse este caso, lo aconsejable es repetir las corridas y tratar de lograr la mejor definición de las bandas posible.

#### 7.10 FENOGRAMA DE LOS 25 CLONES DE CACAÓ DEL CATBUL

El fenograma de los 25 clones de cacao del CATBUL se presenta en la figura 14, en él se observan cinco grupos. En el fenograma se observa que seis de los clones UF y el clon CC 18 (originarios de Costa Rica) se agrupan en el grupo uno, y tres de estos clones (UF 29, 668 y 677) están en el grupo dos. Es posible que los clones de Costa Rica sean Criollos, derivados de forasteros en el pasado, y a ésto se deba que se distribuyan en estos dos grupos (1 y 2).

La mayoría de los clones ecuatorianos (EET y SCA) están agrupados en los grupos dos (cinco clones), tres (dos clones) y cuatro (dos clones). Los clones EET presentan algunas veces características que corresponden a materiales Criollos (por ejemplo, semilla blanca en EET 400) lo que indica que son los ancestros más directos de estos materiales.

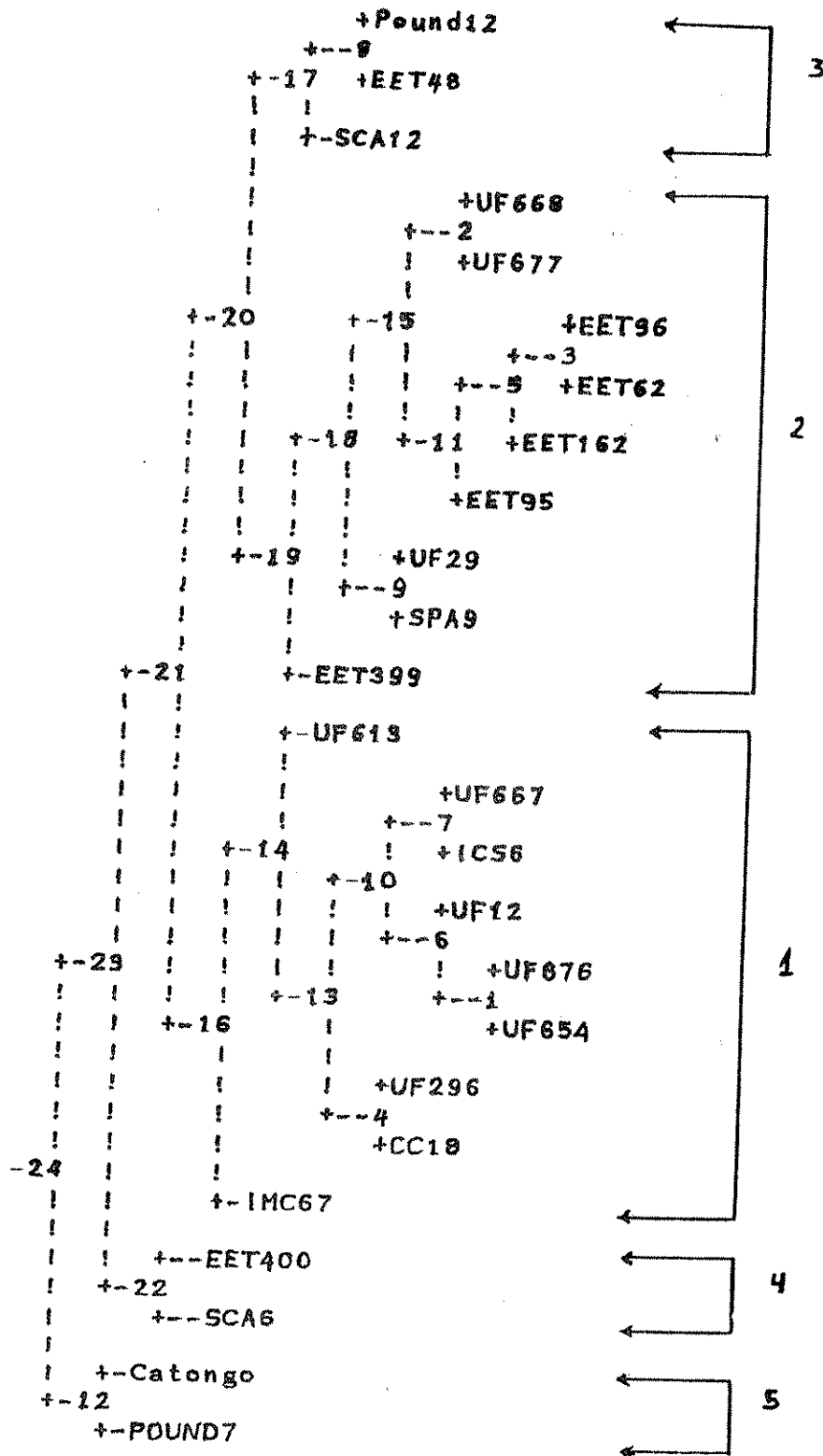


Figura 14. Fenograma de los 25 clones de cacao del jardín clonal del Centro de Agricultura Tropical Bulbuxyá (CATBUL). Presenta cinco grupos de cacao, observándose que los clones UF y CC 18 originarios de Costa Rica, en su mayoría están en grupo uno, y sólo tres de estos clones se agrupan en el grupo dos. Mientras que ninguno de los clones ecuatorianos EET y SCA están en el grupo uno. Los cinco grupos representados en el fenograma indican la alta variabilidad que existe en las poblaciones de cacao.

La alta variabilidad encontrada en los materiales ecuatorianos es consistente con las teorías que indican que esta región del Amazonas es el centro de origen del cacao, Cheesman (4), Lanaud (20).

Cantongo, es el único material del bajo Amazonas y se clasifica en el grupo cinco aparte de los materiales ecuatorianos.

En el caso de producción de semilla híbrida este fenograma podría utilizarse para la selección de los materiales menos emparentados, ya sea para el establecimiento de jardines biclonales, o para hacer hibridaciones artificiales, los que al cruzarse posiblemente producirán un mayor vigor híbrido. En este caso, los grupos cinco y uno son los que tienen los materiales menos emparentados, pero la selección de los progenitores dependerá del comportamiento de los materiales.

## 8. CONCLUSIONES

1. De los nueve sistemas enzimáticos estudiados, las isoenzimas de la esterasa son las más importantes para la identificación de los 25 clones de cacao.
2. Las enzimas ácido shiquímico deshidrogenasa y las regiones dos de la fosfatasa ácida y de la alcohol deshidrogenasa son de especial interés debido a que su base genética es relativamente simple de acuerdo a los patrones de segregación observados.
3. Las isoenzimas de la peroxidasa de hojas tiernas de plantas adultas de cacao no son muy útiles para la identificación de clones de cacao debido a que las regiones variables no son repetitivas.
4. La enzima malato deshidrogenasa aunque sí muestra polimorfismo en la región tres, se encontró complicado el poder definir las diferentes bandas.
5. El resto de las enzimas analizadas (enzima málica, fosfoglucomutasa y isocitrato deshidrogenasa) muestran poca variación.
6. La utilización de los nueve sistemas enzimáticos analizados permite la identificación de los 25 clones de cacao del jardín clonal del CATBUL.
7. El polimorfismo encontrado en los nueve sistemas enzimáticos analizados permitió agrupar a los 25 clones en cinco grupos.

## 9. RECOMENDACIONES

1. Debido a la alta contaminación observada en el jardín clonal, es necesario identificar y eliminar los árboles contaminantes en las unidades clonales. Primero podrían eliminarse los árboles cuyas características morfológicas sean diferentes a los árboles del clon, luego para el resto de las plantas la pureza debe verificarse por electroforesis de isoenzimas utilizando tejido de la parte aérea y basal de las plantas.
2. Las nuevas plantas que se propaguen asexualmente deben desarrollarse de una planta conocida que garantice que sí corresponde al clon deseado. Las plantas de reposición de las eliminadas no debe ser injertos.
3. Deben verificarse la parte basal de los clones, porque se sospecha que algunas plantas llamadas clones puedan ser injertos.
4. Realizar cruces entre los clones compatibles menos emparentados. A las plantas híbridas obtenidas debe hacerseles un análisis por medio de electroforesis de enzimas para verificar si corresponden al híbrido deseado. Posteriormente debe evaluarse su compartamiento y producción.
5. Es importante introducir selecciones guatemaltecas de cacao, y otros materiales clonales, al jardín clonal del CATBUL.
6. Es necesario establecer los patrones de bandeo de los clones en la fuente original para poder garantizar que los clones del jardín clonal del CATBUL son los verdaderos de acuerdo a su denominación.



## 10. BIBLIOGRAFIA

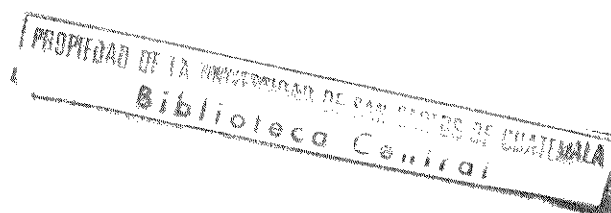
1. ARUS, P.; TANKSLEY, S.D.; ORTON, T.J.; JONES, R.A. 1992. Electrophoretic variation as a tool for determining seed purity and for breeding hibrid varieties of Brassica oleracea. *Euphytica* (Países Bajos) 31:417-428.
2. ATKINSON, M.D.; WITHERS, L.A.; SIMPSON, M.J.A. 1986. Characterisation of cacao germplasm using isoenzyme markers i; a preliminary survey of diversity using starch gel electrophoresis and standardisation of the procedure. *Euphytica* (Países Bajos) 35:741-750.
3. BRAUDEAU, J. 1978. El cacao, técnicas agrícolas y producciones tropicales. Barcelona, España, Limusa. 297 p.
4. CHEESMAN, E.E. 1944. Notes on the nomenclature, classification and possible relationships of cocoa populations. *Tropical Agriculture* (Trinidad y Tobago) 22(8):144-159.
5. CHALMERS, W.S. 1970. Cocoa germplasm collection in the oriente region of Ecuador. En Reports. Trinidad y Tobago. Imperial College of Tropical Agriculture/University of West Indies. s.p.
6. CLARK JUNIOR, J. M.; SWITZER, R.L. 1977. Experimental biochemistry. 2 ed. EE.UU., Freeman. p. 43-56.
7. CONTRERAS, A.; MANSILLA, R. 1989. Electroforesis de proteínas y esterases como un método químico de identificación de papas. *Turrialba* (C.R.) 39(2):193-198.
8. CRISCI, J.V.; LOPEZ A., M.F. 1983. Introducción a la teoría y práctica de la taxonomía numérica. Washington. Secretaría General de la Organización de Estados Americanos. 132 p.
9. CUATRECASAS, J. 1964. Cacao and its allies; a taxonomic revision of the genus Theobroma. *Contrib. U.S. Nat. Herb.* (EE.UU.) 35(6): 379-614.
10. DIERENDONCK, F.G.E. 1959. The manuring of coffee, cocoa, tea and tobacco. Gêneve, Italia. Centre d'Estude de l'Azote. p. 57-76.
11. ELLIOT, A.; KENNEDY, A.J. 1989. The use of isozyme analysis in the characterization of cocoa germplasm. En Annual Seminar on Agricultural Research (1988, St. Augustine, Trinidad y Tobago). Trinidad y Tobago, s.e. 1:11-13.
12. ENGELS, J.M.M. 1981. Genetic resources of cocoa: a catalogue of the CATIE collection. Turrialba, Costa Rica. Technical Bulletin no. 7, 196 p.
13. ENRIQUEZ, G.A. 1985. Curso sobre el cultivo del cacao. Turrialba, C.R., CATIE. Serie Materiales de Enseñanza no. 22, 329 p.
14. GARCIA P., H.A. 1984. Caracterización agronómica de las colecciones guatemaltecas de cacao (Theobroma cacao L.). Tesis Ing. Agr. Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Agronomía. 52 p.

15. GLICENSTEIN, L.J.; FRITZ, P.J. 1989. Meiosis en Theobroma cacao. Turrialba (C.R.) 39(4):497-500.
16. GOTTLIEB, L.D. 1981. Electrophoretic evidence and plant populations. Progress in Phytochemistry (EE.UU) 7:1-46.
17. ----- 1989. Evidencia y aplicaciones de las isoenzimas en poblaciones vegetales. En Seminario Taller Biotecnología y las Ciencias Agrícolas (1989, Gua.). Avances y aplicaciones. Guatemala, CATIE. p. 20-34.
18. HAMRICK, J.L.; GODT, M.D. 1990. Allozyme diversity in plant species. s.n.t. p. 3-40.
19. LAEMMLI, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. Nature (Inglaterra) 227:680-685.
20. LANAUD, C. 1986. Genetic studies of Theobroma cacao L. with the help of enzymatic markers; study of polymorphism of six enzymatic systems. Café, Cacao Thé (Francia) 30(4):278-280.
21. LOPEZ B., D. 1984. Herencia de ciertos caracteres de la semilla de cacao (Theobroma cacao L.). Tesis Mag. Sc. Turrialba, C.R., CATIE. 93 p.
22. MEJIA, L. 1992. Estudios con isoenzimas como marcadores genéticos en plantas. Tikalía (Gua.) 10(1-2):59-66.
23. MELESPIN, M. 1982. El cacao. Nicaragua, IICA. Serie Publicaciones Misceláneas no. 381. 62 p.
24. NGAMBI N., J.M. 1988. Variabilité enzymatique chez le cacaoyer (Theobroma cacao L.). In International Cocoa Research Conference (1987, Santo Domingo, Rep. Dominicana), Hertford, RU., Stephen Austin and Sons. p. 725-728.
25. NIELSEN, G. 1985. The use of isozymes as probes to identify and label plant varieties and cultivars. Isozymes: Current Topic in Biological and Medical Research (EE.UU) 12:1-32.
26. ORNSTEIN, L. 1964. Disc electrophoresis i; background and theory. Ann. NY. Acad. Sci. (EE.UU) 121:321-349.
27. PONZ A., E. et al. 1983. Electroforesis. Madrid, Espana, Universidad Politécnica de Madrid. Monografía no. 76. p. 39-58.
28. RAMIREZ, H.; CALDERON, A.; ROCA, W. M. 1989. Técnicas moleculares para evaluar y mejorar el germoplasma vegetal. En Cultivo de tejidos y su aplicación a la agricultura. s.n.t. p. 49-63.
29. SCANDALIUS, J.G. 1969. Genetic control of multiple molecular forms of enzymes in plants. Biochemical Genetics (EE.UU) 3:37-49.
30. SHAW, C.R.; PRASAD, R. 1970. Starch electrophoresis of enzymes: a compilation of recipes. Biochemical genetics (EE.UU) 4:297-320.

31. SIMPSON, M.J.A.; WITHERS, L.A. 1986. Characterization of plant genetic resources using isozyme electrophoresis: a guide to the literature. Italy, Roma, International Board for Plant Genetic Resources. p. 1-33.
32. SORIA V., J. 1970. The latest cocoa expedition to the Amazonas basin. *Cocoa (C.R)* 15(1):5-15.
33. ----- 1978. The breeding of cacao (Theobroma cacao L.). *Tropical Agriculture Research Series* 11: 161-168.
34. STEBBINS, G.L. 1990. Introducción. En D.E. Soltis; M.P.S. Soltis (Eds). *Isozymes in plant biology*. Portland, Oregon, Dioscorides Press. p. 5-45.
35. STUBER, C.W.; WENDEL, J.F.; GOODMAN, M.M.; SMITH C., J.S. 1988. Techniques and scoring procedures for starch gel electrophoresis of enzymes from maize (Zea mays L.). EE, UU, North Carolina, Agricultural Research Service. *Technical Bulletin* 286. 87 p.
36. VALLEJOS, C.E. 1983. Enzyme activity staining. En S.D. Tanksley, T.J. Orton (Eds). *Isozymes in plant genetics and breeding (part A)*. Amsterdam, Holanda, Elsevier. p. 469-516.
37. WEEDEN, N.F.; WENDEL, J.F. 1989. Genetics of plant isozymes. En D.E. Soltis; M. P. S. Soltis (Eds). *Isozymes in plant biology*. Portland, Oregon, Dioscorides Press. p. 46-72.
38. WENDEL, J.F.; WEEDEN, N.F. 1989. Visualization and interpretation of plant isozymes. En D.E. Soltis; M.P.S. Soltis (Eds). *Isozymes in plant biology*. Portland, Oregon, Dioscorides Press. p. 5-45.
39. YIDANA, J.A.; KENNEDY, A.J.; WITHERS, L.A. 1988. Variation in peroxidase isozymes of cocoa (Theobroma cacao L.). In International Cocoa Research Conference (1987, Santo Domingo, Rep. Dominicana). Hertford, RU., Stephen Austin and Sons. p. 719-723.
40. YOUNG, A.M. 1989. Pollination biology in Theobroma cacao and Herrania (Sterculiaceae); iv major volatile constituents of eteam-distilled floral oils as field attractants to cacao-associated midges (Diptera: Cecidomyiidae and Ceratopogonidae) in Costa Rica. *Turrialba (C.R.)* 39(4):454-458.



Vo. Bo. Rolando Barrios.



## 11. ANEXOS

## Anexo 1

Soluciones stock para preparar geles de poliacrilamida (Laemmli (19)).

- A. Acrilamida/bis (30% T, 2.6% C)  
 87.6 g acrilamida (29.2 g/100 ml)  
 2.4 g N,N'-bis-methylene-acrilamida (0.8 g/100 ml)
- Hacer 300 ml con agua destilada. Filtrar y almacenar a 4o C en oscuridad (máximo 30 días).
- B. 1.5 M Tris-HCl, pH 8.8  
 27.23 g Tris base (18.15 g/100 ml)  
 80 ml de agua destilada
- Ajustar a pH 8.8 con HCl 1N. Hacer 150 ml con agua destilada y almacenar a 4o C.
- C. 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8  
 6 g Tris base  
 60 ml de agua destilada
- Ajustar a pH 6.8 con HCl 1N. Hacer 100 ml con agua destilada y almacenar a 4o C.
- D. Buffer de electrodo 5X, pH 8.3  
 Tris base 9.0 g (15 g/l)  
 Glicina 43.2 g (72 g/l)  
 En 600 ml de agua destilada  
 Almacenar a 4o C. Temperaturas de 37o C antes de su uso pueden ocasionar precipitación.  
 Diluir 60 ml del stock 5X en 240 ml de agua destilada para una corrida electroforética.

## GEL DE RESOLUCION (12 %)

0.375 M tris-HCl, pH 8.8

|  |         |
|--|---------|
| H <sub>2</sub> O                                     | 3.35 ml |
| Solución B   | 2.5 ml  |
| Solución A   | 4.0 ml  |
| Persulfato de amonio<br>(10% preparado el mismo día) | 50.0 ul |
| TEMED  | 5.0 ul  |

## GEL DE CONCENTRACION (4 %)

0.125 M tris-HCl, pH 6.8

|  |         |
|--|---------|
| H <sub>2</sub> O                                     | 6.1 ml  |
| Solución C   | 2.5 ml  |
| Solución A   | 1.3 ml  |
| Persulfato de amonio<br>(10% preparado el mismo día) | 50.0 ul |
| TEMED  | 10.0 ul |

## Anexo 2

## Fórmulas para tinción de enzimas

## 1)--- ACIDO SHIQUIMICO DESHIDROGENASA (Wendel y Weeden (38))

|                         |        |
|-------------------------|--------|
| 0.1 M tris HCl, pH 8.3  | 100 ml |
| 0.010 % NADP            | 10 mg  |
| 0.10 % Acido shiquimico | 100 ml |
| 0.02 % NBT              | 20 mg  |
| 0.004 % PMS             | 4 mg   |

## 2)--- ALCOHOL DESHIDROGENASA (Vallejos (36))

|                        |        |
|------------------------|--------|
| 0.1 M Tris-HCl, pH 7.2 | 100 ml |
| 0.03 % NAD             | 30 mg  |
| 0.02 % MTT             | 20 mg  |
| 0.004 % PMS            | 4 mg   |

Antes de usar agregar seis mililitros de etanol al 95%.

## 3)--- ALCOHOL DESHIDROGENASA (Wendel y Weeden (38))

|                        |        |
|------------------------|--------|
| 0.1 M Tris-HCl, pH 8.0 | 100 ml |
| 0.02 % NAD             | 20 mg  |
| 0.02 % NBT o MTT       | 20 mg  |
| 0.004 % PMS            | 4 mg   |

Antes de usar agregar 0.4 mililitros de etanol al 95%.  
En este estudio la ADH se reveló con pH 8.3.

## 4)--- ENZIMA MALICA (Wendel y Weeden (38))

|   |        |
|---|--------|
| 0.1 M Tris-HCl, pH 8.3                      | 100 ml |
| 0.4 % DL-ácido málico                       | 400 mg |
| 0.4 % Cloruro de magnesio 6H <sub>2</sub> O | 400 mg |
| 0.02 % NADP                                 | 20 mg  |
| 0.02 % MTT                                  | 20 mg  |
| 0.002 % PMS                                 | 2 mg   |

## 5)--- ESTERASA (Show y Prasad (30))

|                            |       |
|----------------------------|-------|
| 0.05 M tris HCl, pH 7.1    | 50 ml |
| 0.03 % alfa naftil acetato | 15 mg |
| 0.03 % Beta naftil acetato | 15 mg |
| 0.1 % Fast Blue RR sal     | 50 mg |

## 6)--- FOSFATASA ACIDA (Vallejos (36))

|   |        |
|---|--------|
| Buffer acetato de sodio/ácido acético, pH 5.5 | 50 ml  |
| 0.03 % beta naftil ácido fosfato              | 15 mg  |
| 0.02 % cloruro de magnesio hexahidratado      | 100 mg |
| 0.1 % Fast black K salt                       | 50 mg  |

## 7)-- FOSFATASA ACIDA (Stuber et al. (35))

|   |         |
|---|---------|
| Buffer acetato de sodio/ácido acético, pH 5.5 | 50 ml   |
| 0.1 % Fast Garnet GBC salt                    | 50 mg * |
| 0.1 % MgCl <sub>2</sub>                       | 50 mg * |
| 0.1 % Alfa naftil ácido fosfato, Na-sal       | 50 mg * |

\* Agregar cinco minutos antes de la tinción.

## 8)--FOSFATASA ACIDA

|   |       |
|---|-------|
| Buffer acetato de sodio/ácido acético, pH 5.5 | 50 ml |
| 0.1 % Fast Garnet GBC salt                    | 50 mg |
| 0.1 % MgCl <sub>2</sub>                       | 50 mg |
| 0.1 % Beta naftil ácido fosfato               | 50 mg |

Con este colorante se logró tener geles grandes del aparato de electroforesis PROTEAN II.

## 9)-- FOSFOGLUCOMUTASA (Wendel y Weeden (38))

|  |             |
|--|-------------|
| 0.1 M Tris-HCl, pH 8.3                       | 100 ml      |
| 0.04 % Cloruro de magnesio 6H <sub>2</sub> O | 400 mg      |
| 0.1 % Glucosa -1-fosfato disodium salt       | 100 mg      |
| ----- Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa       | 40 unidades |
| 0.01 % NAD                                   | 10 mg       |
| 0.02 % MTT                                   | 20 mg       |
| 0.002 % PMS                                  | 2 mg        |

## 10)-- ISOCITRATO DESHIDROGENASA (Wendel y Weeden (38))

|   |          |
|---|----------|
| 0.1 M Tris-HCl, pH 7.2                    | 100.0 ml |
| 0.1 % Acido isocítrico trisodium salt     | 100.0 mg |
| 1 % Cloruro de magnesio 6H <sub>2</sub> O | 1.0 g    |
| 0.01 % NADP                               | 10.0 mg  |
| 0.015 % MTT                               | 15.0 mg  |
| 0.002 % PMS                               | 2.0 mg   |

11)-- MALATO DESHIDROGENASA (Vallejos (36))  
(con modificación de Soltis 1983)

|                        |        |
|------------------------|--------|
| 0.1 M tris HCl, pH 8.3 | 50 ml  |
| 0.4 % D1-ácido málico  | 200 mg |
| 0.03 % NAD             | 15 mg  |
| 0.02 % MTT             | 10 mg  |
| 0.004 % PMS            | 2 mg   |

## 12)-- PEROXIDASA (Shaw y Prasad (30))

|                                  |         |
|----------------------------------|---------|
| 0.1 M Sodio/acetato, pH 5        | 100 ml  |
| 0.025 % 3-amino-9-ethylcarbazole | 25 mg * |
| 0.015 % Cloruro de calcio        | 15 mg   |

15 microlitros de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30%, se agregan al momento de usar.

\* Se disuelve en 2 ml de N,N-Dimethylformamide.



UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
 FACULTAD DE AGRONOMIA  
 INSTITUTO DE INVESTIGACIONES  
 AGRONOMICAS

Ref. Sem.043-95

LA TESIS TITULADA: "IDENTIFICACION DE 25 CLONES DE CACAO Theobroma cacao L.  
 POR ELECTROFORESIS DE ISOENZIMAS".

DESARROLLADA POR EL ESTUDIANTE: EYSEN RODRIGO ENRIQUEZ OCHOA

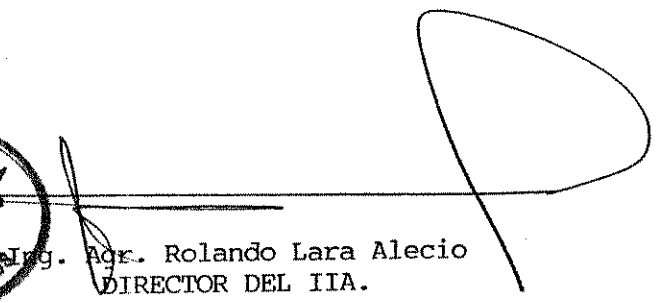
CARNET No: 8640107

HA SIDO EVALUADA POR LOS PROFESIONALES: Ing. Agr. Edgar Franco  
 Ing. Agr. Víctor Alvarez

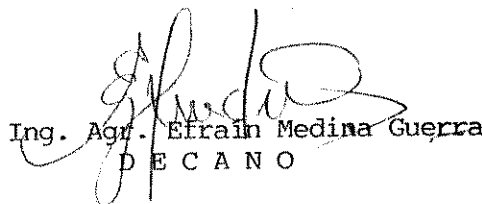
El Asesor y las Autoridades de la Facultad de Agronomía, hacen constar que ha cumplido con las normas universitarias y reglamentos de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

  
 Dr. Luis Mejía de León  
 ASESOR



  
 Ing. Agr. Rolando Lara Alecio  
 DIRECTOR DEL IIA.

I M P R I M A S E

  
 Ing. Agr. Efraim Medina Guerra  
 DECANO



c.c.Control Académico  
 Archivo  
 RL/prr.

APARTADO POSTAL 1545 • 01091 GUATEMALA, C. A.

TELEFONO: 769794 • FAX: (5022) 769770