



Identificación de un gen codificante de polifenol oxidasa (PPO) en *Theobroma cacao* L. (cacao) de Ecuador

Identification of a gene encoding polyphenol oxidase (PPO) in *Theobroma cacao* L. (cacao) from Ecuador

Jaime Morante-Carriel¹, Milena Acosta-Farías², Víctor Huebla-Concha³, Anna Agnieszka-Obrebska¹, Roque Bru-Martínez⁴, María Lorena Cadme-Arévalo¹

¹Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Facultad de Ciencias Ambientales, Departamento de Biotecnología. Laboratorio de Biología Molecular, Campus Manuel Haz Álvarez. Av. Quito Km 1.5 vía Santo Domingo de los Tsáchilas. EC.120301. Quevedo, Ecuador. jamorante@uteq.edu.ec; anna.obrebska31@gmail.com; mcadme@uteq.edu.ec

²Universidad Politécnica Salesiana (UPS), Carrera de Ingeniería en Biotecnología de los Recursos Naturales, Campus Girón, Av. Isabel La Católica N23-52 y Madrid, Quito, Ecuador. jmacostafarias@gmail.com

³Escuela Superior Politécnica de Chimborazo-ESPOCH-Extensión Morona Santiago, Macas, Ecuador. zvictorh@yahoo.es

⁴Universidad de Alicante, Grupo de Proteómica y Genómica Funcional de Plantas. Ctra. San Vicente s/n, 03690 San Vicente del Raspeig, Alicante, España. roque.bru@ua.es

Rec.: 05.06.2017. Acept.: 26.09.2017.
Publicado el 1 de diciembre de 2017

Resumen

En Ecuador, las plantaciones de cacao presentan bajos promedios de producción debido a la diversidad de patógenos, especialmente a la infección por *Moniliophthora roreri* (monilia). Se cree que existe una relación entre el ataque del hongo y el aumento de los niveles de expresión de genes codificantes de polifenol oxidasas (PPOs) como mecanismo de defensa ante patógenos y herbívoros en diferentes plantas. Para la identificación de genes que codifican para PPOs, se seleccionaron hojas de cacao Nacional, provenientes de plantas resistentes y susceptibles a monilia, ubicadas en la Finca Experimental La Represa, propiedad de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo. Se afinó un protocolo de extracción de ARN total de alta calidad para hojas de cacao recalcitrantes. Después de su retrotranscripción a ADNc, se realizaron ensayos de amplificación por PCR con diferentes primers, diseñados a partir de secuencias conservadas de PPOs. Los productos de amplificación permitieron la identificación de un gen de 961 pb, similar a un gen que codifica para la PPO predictiva de *Theobroma cacao* depositada en NCBI (XP_017978715.1). La identificación de este gen, es fundamental para evaluar a futuro los niveles de expresión y cuantificación en diferentes estados de desarrollo del fruto. Dicha cuantificación permitirá proponer herramientas de control para monilia y construir las bases para el mejoramiento genético del cacao Nacional.

Palabras clave: polifenol oxidasas, cacao, identificación, expresión génica

Abstract

In Ecuador, cocoa plantations have low production averages due to the diversity of pathogens, especially the infection by *Moniliophthora roreri* (monilia). It is believed that there is a relationship between the attack of the fungus and increased levels of expression of genes encoding polyphenol oxidases (PPOs) as a defense mechanism against pathogens and herbivores in different plants. For the identification of genes that code for PPOs, National cocoa leaves were selected, from resistant and susceptible plants to monilia, located in the Finca Experimental La Represa, property of the Universidad Técnica Estatal de Quevedo. A high-quality total RNA extraction protocol was recalculated for recalcitrant cocoa leaves. After its retrotranscription to cDNA, PCR amplification assays will be carried out with different primers, from the conserved sequences of PPOs. The amplification products allowed the identification of a 961 bp gene, similar to a gene that codes for the predictive PPO of *Theobroma cacao* deposited in NCBI (XP_017978715.1). The identification of this gene is essential to evaluate future levels of expression and quantification in different stages of fruit development. This reading quantification will propose control tools for monilia and build the bases for the genetic improvement of the National cacao.

Key words: polyphenol oxidases, cocoa, identification, gene expression

Introducción

La calidad de los frutos ha sido analizada por el consumidor desde tiempos inmemorables, por lo que el agricultor es presionado por los clientes para liberar al mercado productos que satisfagan sus necesidades. La calidad se valora mediante la medición de las características organolépticas, características intrínsecas, así como la apariencia del producto (Morante *et al.*, 2014). Las PPOs (polifenol oxidasas) son importantes en la industria agro-alimentaria e influyen en la calidad de un producto, la cual disminuye considerablemente cuando ésta presenta pardeamiento enzimático en su estructura; la destrucción de los compartimentos cloroplásticos y las vacuolas provocan la liberación de sus contenidos lo que hace posible la reacción enzimática (Liao *et al.*, 2006; Morante *et al.*, 2014).

Las polifenol oxidasas son enzimas que usan el oxígeno molecular para convertir los fenoles en quinonas (Mayer, 2006; Tran *et al.*, 2012). La oxidación de los sustratos fenólicos es catalizada por las enzimas PPOs que da como resultado la formación de un complejo proteico y la aparición de manchas café compuestas por melanina en la estructura de los frutos. Aunque las funciones específicas de las PPOs en los frutos intactos no están esclarecidas; se sugiere que su principal acción en los frutos con cierto tipo de daño es la defensa contra herbívoros y patógenos, incluso con una disminución de su contenido nutricional. Adicionalmente, se ha evidenciado que las PPOs responden a estímulos como el estrés abiótico (Boeckx *et al.*, 2015).

No obstante, la distribución de las PPOs es amplia, existen plantas de varias familias de interés económico que contienen una gran cantidad de PPOs en su constitución y que se presentan a manera de isoenzimas, cuya función se desconoce; entre las cuales se menciona *Solanum tuberosum* (papa), *Glycine max* (soya), *Solanum melongena* (berenjena), *Theobroma cacao* (cacao). En algunas plantas se ha observado que los niveles de fenoles presentes en su estructura aumentan en el momento de la recolección. Sin embargo, en el momento de la maduración los niveles de PPOs se mantienen casi constantes (Morante *et al.*, 2014).

Theobroma cacao es una planta de interés nacional, puesto que implica una decena de actores en los procesos iniciales como siembra y mantenimiento de la planta hasta la cosecha y elaboración de productos procesados. Las zonas de producción del cacao son las regiones de la Costa y Amazonía en Ecuador, siendo de mayor enfoque la provincia de Los Ríos cuya fuente principal de ingresos proviene del agro (Guerrero, 2014). De acuerdo al Boletín emitido por el Ministerio de Comercio Exterior, se ubica con el 6.69% el grupo de productos denominado Cacao y elaborados durante el período enero-abril del 2015 en el apartado de exportaciones no petroleras a los principales mercados de Norteamérica,

Europa y Asia; con lo que se deduce su importancia para la economía del país (Ministerio de Comercio Exterior, 2015).

Mediante el uso de aplicaciones biotecnológicas y moleculares se pretende identificar, secuenciar y caracterizar al menos un gen responsable de la síntesis de PPOs en cacao como parte de un estudio pionero en el país que pretende buscar mecanismos biológicos de defensa de las plantas de cacao frente a patógenos.

La identificación de los genes que se encargan de la síntesis de PPOs en cacao supone un aporte significativo para la ciencia y por ende a la economía de Ecuador a través de la resistencia del cacao a las principales enfermedades, especialmente la monilia (causada por el hongo *Moniliophthora roreri*), que causa maduración prematura, marchitez, secamiento hasta llegar a los abultamientos y la momificación de la mazorca con lo que se presume el contagio del resto de la plantación que puede llegar hasta el 80% de la plantación (Solis y Suárez, 2006; Villavicencio y Jiménez, 2010).

Para la realización de la investigación se pretende la identificación molecular de al menos un gen codificante de polifenol oxidasa (PPO) en *Theobroma cacao* L. (cacao) en el cantón Quevedo, provincia de Los Ríos, debido a la importancia del cultivo en la provincia y el país, con el objetivo de mejorar la cadena productiva, los réditos percibidos y la valoración a nivel mundial de este producto.

Materiales y métodos

Extracción de RNA de hojas de cacao

Recolección del material vegetal

Se usaron hojas de cacao nacional (*Theobroma cacao* L.) procedentes de árboles seleccionados por sus características sobresalientes a nivel agronómico como productividad y poca incidencia a enfermedades, recolectados en la Finca Experimental La Represa, de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, ubicada en Quevedo, provincia de Los Ríos.

Se trabajó con tejido foliar proveniente de plantas resistentes (clon L8H12) y susceptibles (clon L44h88) de la finca experimental "La Represa", en función de los clones reportados como resistentes y susceptibles a monilia y a otras enfermedades, según Amores *et al.* (2009) y Sánchez-Mora *et al.* (2014). Al momento de la recolección, las hojas se sumergieron en nitrógeno líquido y se conservaron a -80°C hasta su uso.

Extracción de DNA genómico de cacao

Para validar la eficiencia de los oligonucleótidos e identificar posibles intrones en los productos de amplificación, se realizó la extracción y purificación de DNA genómico de cacao en función de DNeasy Plant Mini Kit de Qiagen.

Extracción y purificación de RNA total de cacao de alta calidad

Eliminación de ribonucleasas

Los materiales, soluciones y reactivos se trataron con dietilpircarbonato (DEPC), inhibidor de RNAasas, a una concentración de 1 ml L⁻¹ de agua.

Método de extracción de RNA descrito por Morante *et al.* (2014)

Para la extracción de RNA total se trabajó con el protocolo de Morante *et al.* (2014) para plantas con alto contenido de polisacáridos y polifenoles. Debido a que los tejidos utilizados por Morante *et al.* (2014), son muy similares al cacao en cuanto a su recalcitrancia y a su dificultad por aislar RNA de alta calidad, se realizó la extracción de RNA de cacao siguiendo las recomendaciones de los autores.

Dentro de las modificaciones están las variaciones de peso de tejido (100-300 mg y 500-1000 mg), adición de tampón de lavado y tampón de extracción a cada muestra de manera individual.

Las hojas provenientes de plantas sanas y enfermas se maceraron con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino y se añadió buffer de extracción (300mM Tris-HCl, 25mM EDTA, 2M NaCl, 2% CTAB, 2% PVPP, 0.05% espermidina y 2% mercaptoetanol antes de usar) precalentado a 65 °C. La proporción de tejido y buffer de extracción fue de 10 a 12 mL por cada gramo de tejido. El pellet obtenido después de la extracción se precipitó con LiCl 10M.

Tratamiento del RNA con DNAasa

Para eliminar la presencia del DNA genómico asociado a la extracción de RNA, se empleó la enzima DNase I de Invitrogen, que consiste en la digestión de DNA monocatenario y bicatenario a oligodeoxi-ribonucleótidos con un fosfato en el extremo 5'. Se añadió la muestra de RNA con buffer de reacción, se añadió 1 µL de DNase I y se llevó a volumen de 10 µL con agua tratada con DEPC. Tras la adición de los componentes se inactivó la enzima y se incubó a 65 °C.

Síntesis de cDNA (DNA complementario) para ensayos de amplificación por RT-PCR

Para la síntesis de cDNA se usó el juego de reactivos "Super Script III First-Strand Synthesis for RT-PCR" de Invitrogen, siguiendo las instrucciones del fabricante. Como molde se empleó el RNA total de cacao tratado con DNase I para el ensayo de retrotranscripción (RT) (Cuadro 1).

A esta mezcla se le añadió la siguiente combinación de reactivos 10x RT Buffer, 25 mM MgCl₂, 0.1 M DTT, RNase OUT y Superscript III RT seguido de incubación a 50 °C por 50 minutos, 10 minutos a 25 °C y 50 minutos a 50 °C. Para terminar los tiempos de incubación se incubó 5 minutos a 85 °C para luego reposar en hielo. Por último, se añade 1 µL de

Cuadro 1. Síntesis de cDNA a partir de RNA total

Componente	Cantidad
RNA	n µL
50 µM Oligo (dT)	1 µL
10 mM dNTP mix	1 µL
Agua-DEPC	Hasta completar la reacción a 10 µL

RNase H y se incubó a 37 °C por 20 minutos. Se guarda el cDNA sintetizado a -20 °C.

Reacción en cadena de la polimerasa

RT-PCR

El cDNA sintetizado previamente se utilizó como molde para los ensayos de amplificación. De manera que, se prepararon las reacciones de PCR y se llevaron a cabo en un equipo termociclador Peltier-based y las condiciones de amplificación se ajustaron a las temperaturas de melting (T_m) de los oligonucleótidos y a las especificaciones de uso para la enzima Taq DNA Polymerase Recombinant de Invitrogen. La mezcla de PCR contenía 10.5 µL de agua Milli-Q, 2 µL de buffer PCR 10X, 2 µL de MgCl₂ 50mM, 2 µL de dNTPs 10mM, 2 µL de cada oligonucleótido 10mM, 4 µL de molde de cDNA y 0.5 µL de Taq-polimerasa.

Oligonucleótidos utilizados

Se diseñaron tres parejas de oligonucleótidos (Tc-Fw4/Tc-Rev4; Tc-Fw5/Tc-Rev5; Tc-Fw6/Tc-Rev6) a partir de secuencias altamente conservadas de PPOs que fueron probados de manera independiente y combinados entre ellos para obtener mayor probabilidad de hibridación, empleando DNA genómico y cDNA como moldes. Todos los oligonucleótidos empleados en este trabajo fueron sintetizados y suministrados por Sigma-Aldrich (Cuadro 2).

Electroforesis de DNA en geles de agarosa

La separación y validación de los productos de PCR se realizó mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa con tinción de bromuro de etidio. Los geles se prepararon en tampón TAE (tris, acetato de sodio, EDTA) 1X que contiene: 40 mM Tris-base; 1 mM EDTA, 20 mM ácido acético.

Los geles se analizaron con un fotodocumentador (E-Gel Imager, Life Technologies) digital que incorpora un transiluminador ultravioleta UVP y una cámara digital de alta resolución.

Purificación de los fragmentos de DNA de geles de agarosa

Los fragmentos de DNA amplificados y separados mediante electroforesis se cortaron con un bisturí, evitando la contaminación entre las bandas. Seguidamente, se purificaron con el kit "Purelink Quick Gel Extraction" de Invitrogen de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Cuadro 2. Oligonucleótidos empleados en este trabajo

Oligonucleótido	Temperatura de melting °C	Secuencia (5'-3')
Tc-Fwd4	58.8	AAAGAAGACGGAATTGTTCA
Tc-Fwd5	54.7	GTATTCATGCGTAAAGTAGATC
Tc-Fwd6	56.9	TGGCAGATTTGAACTACTTC
Tc-Rev4	56.9	CCTTCAATTGTTACTACTGCT
Tc-Rev5	57.6	GAGGACTCAAATTTGTTTCC
Tc-Rev6	57.8	TCCTTCAATTGTTACTACTGC

Ligación del DNA para clonación

El inserto/gen amplificado y purificado, se ligó con el vector pCR 2.1 mediante la enzima DNA ligasa proveniente del bacteriófago T4, incorporada en el kit "The Original TA Cloning Kit" de Invitrogen, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Transferencia de DNA a *Escherichia coli* mediante transformación

Las moléculas obtenidas en la ligación se procedieron a transformar en células de *E. coli* quimio-competentes, estirpe DH5 α .

Transformación de *E. coli* y siembra de colonias

Para la transformación, se empleó el kit One Shot Transformation Protocol, que incorpora el medio SOC (Super Optimal Colony). Al momento de la transformación se dispusieron las células en hielo. Se colocaron 2 μ L de la reacción de ligación en los viales que contienen las células competentes, se incubaron en hielo por 30 minutos, luego se las sometió a choque térmico por 30 segundos a 42 °C y se las transfirió a hielo. Se añadieron 250 μ L de medio SOC a cada vial y se agitaron a 37 °C por 1 hora a 225 rpm.

Pasado el tiempo de la incubación, se dispusieron hasta 200 μ L de cada transformación a platos de Petri con medio LB (Luria-Bertani), cuyo contenido consta de Bacto triptona, extracto de levadura, cloruro de sodio y bacto agar en incubación a 37 °C toda la noche.

Para la posterior identificación mediante ensayos de complementación α , se suplementó al medio sólido IPTG 0.2 mM y 40 μ g mL⁻¹ X-gal, de manera que las células transformadas que incorporaron el inserto fueron de color blanco, mientras que, las que no lograron incorporar el inserto fueron de color azul.

Escrutinio de colonias

Las colonias blancas (que contienen el inserto) se sometieron a ensayos por PCR para la amplificación del fragmento del gen de interés, empleando los primers Tc-Fw6/Tc-Rev4. Las colonias seleccionadas y comprobadas por PCR se dispusieron a crecimiento en medio LB a 37 °C toda la noche.

Purificación de DNA plasmídico

El DNA plasmídico fue purificado mediante el kit PureLink HQ Mini Plasmid Purification, de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Secuenciación de DNA

La secuenciación de los fragmentos de interés se llevó a cabo en un secuenciador tipo Li-cor por el método de Sanger. Las secuencias de DNA se obtuvieron mediante hibridación con los oligonucleótidos universales M13 forward y M13 reverse. Se secuenció 1 μ g de DNA plasmídico en un volumen de 15 μ L de cada muestra.

Caracterización de un gen codificante de polifenol oxidasa (PPO)

Se utilizó el programa Bio-Edit (USA) para la edición de secuencias y construcción de alineamientos. Para comparar nuestras secuencias contra secuencias de bases de datos públicas se utilizó el programa BLASTX (Altschul *et al.*, 1990), que compara el porcentaje de similitud con otras secuencias de PPOs y se trabaja con el electroferograma proveniente del equipo secuenciador. El alineamiento de secuencias se realizó en el programa CLUSTALW (Thompson *et al.*, 1997) disponible *on-line* en la página web del European Bioinformatics Institute (www.ebi.ac.uk).

Para la búsqueda y comparación de secuencias de interés se accedió a la base de datos pública NCBI (National Center for Biotechnology Information) y para el alineamiento y traducción de secuencias de DNA a proteínas se accedió a ExPASy (Expert Protein Analysis System).

Se realizó el ensamblaje de secuencias eliminando aproximadamente cincuenta nucleótidos del extremo 3' en dirección Forward y del extremo 5' en dirección Reverse.

Resultados y discusión**Extracción de RNA total de cacao**

La extracción de RNA de cacao supone un desafío importante para la investigación debido a la complejidad y recalcitrancia del tejido foliar, por lo que se utilizó el método

Electroforesis de RNA total en geles de agarosa al 1.5% (p/v) para hojas de cacao provenientes de plantas resistentes y susceptibles a monilia

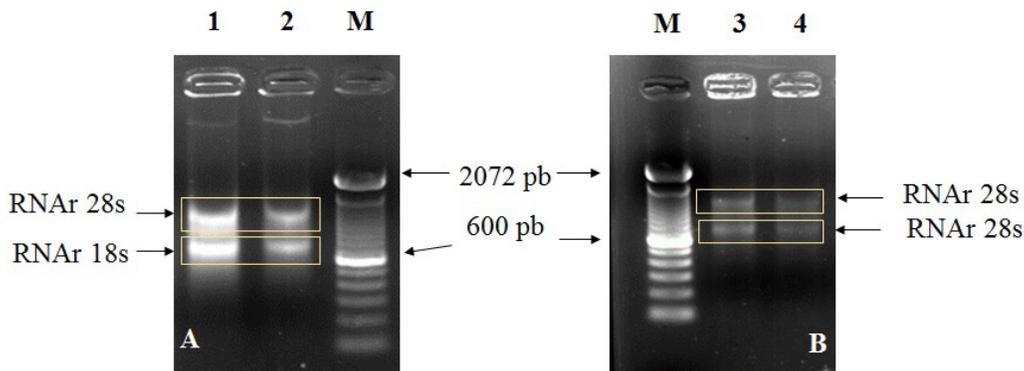


Figura 1. Electroforesis de RNA total en geles de agarosa al 1.5% (p/v). A, se muestran los productos de extracción de RNA a partir de HPR (calles 1 y 2). B, se muestran los productos de extracción de RNA a partir de HPS a monilia (calles 3 y 4). M, marcador de peso molecular (TrackIt™ 100 pb DNA Ladder, Invitrogen). Se cargó en cada calle 1 μ L de cada producto de extracción más 2 μ L de tampón de carga de RNA y 3 μ L de agua-DEPC

de Morante *et al.* (2014) para plantas recalcitrantes para conseguir el alto grado de pureza de RNA total imprescindible para la síntesis de cDNA. Este método ha sido eficientemente desarrollado para frutos como el níspero, uvas y rosas con altos niveles de polisacáridos y polifenoles, su aplicación en tejidos de cacao permitió obtener RNA total (Figura 1).

Al momento de la cuantificación por espectrofotometría la proporción A260/A280 evidenció la ausencia de proteínas contaminantes en los productos de extracción, cuyo rango estuvo comprendido entre 1,8-2. La relación 260/230, mostró bajo nivel de contaminación por polisacáridos, carbohidratos

y compuestos fenólicos, cuyo rango fue ≥ 2 .

Amplificación de un gen codificante de polifenol oxidasa de cacao

Los ensayos de amplificación se realizaron con oligonucleótidos diseñados a partir del alineamiento múltiple de secuencias predictivas de PPOs en plantas, disponibles en GenBank. De manera específica se favoreció a aquellas secuencias nucleotídicas de PPOs cercanas a la familia botánica del *Theobroma cacao* L.

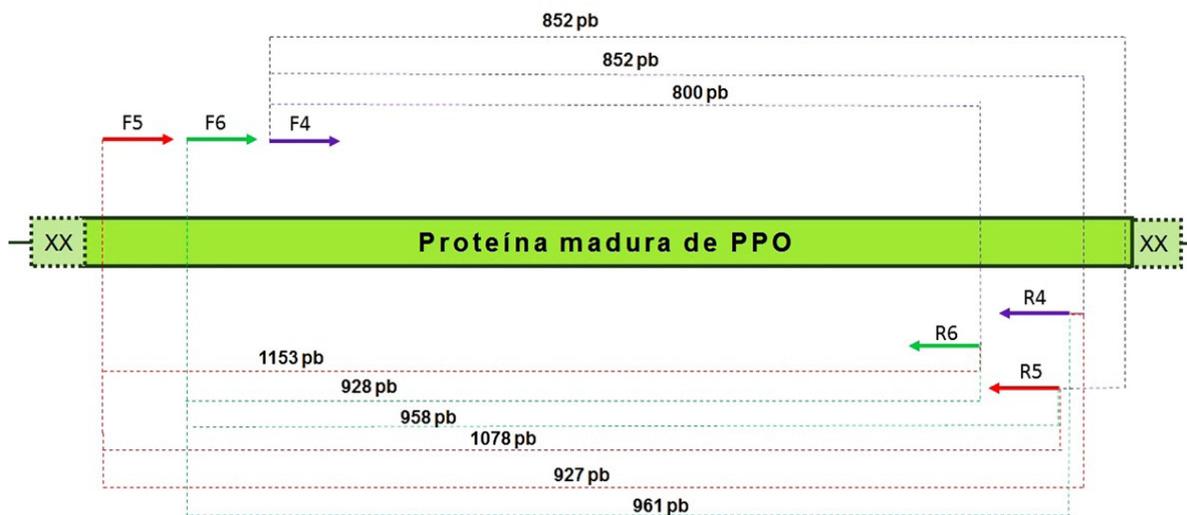


Figura 2. Esquema de orientación de los oligonucleótidos empleados en este trabajo. Las flechas indican la orientación de los oligonucleótidos (Forward y Reverse) y las líneas discontinuas indican la combinación entre ellos. Los números indican el tamaño teórico esperado de los fragmentos

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes (Cuadro 3) una vez que se han definido los oligonucleótidos a usar:

Cuadro 3. Condiciones de amplificación para PCR

Etapa	Temperatura	Tiempo	Nº de ciclos
Desnaturalización inicial	94 °C	4 min	1
Desnaturalización	94 °C	1 min	40
Ligación	58 °C	30 s	
Extensión	72 °C	45 s	
Extensión final	72 °C	7 min	1

Se probaron tres parejas de oligonucleótidos (Tc-Fwd4/ Tc-Rev4; Tc-Fwd5/ Tc-Rev5; Tc-Fwd6/ Tc-Rev6) de manera independiente, usando DNAg como molde para comprobar la eficiencia de los oligonucleótidos (Figura 3).

Electroforesis de DNAg en gel de agarosa al 1% (p/v) para hojas de cacao

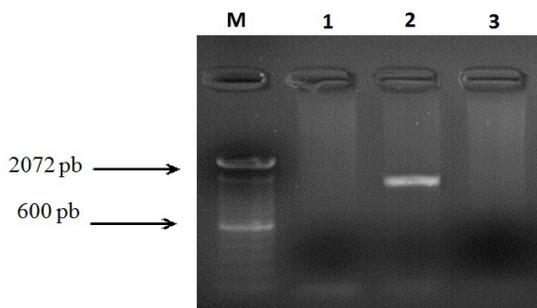


Figura 3. Electroforesis de DNAg en gel de agarosa al 1% (p/v). Se muestra la amplificación por PCR. Calle 1: Tc-Fwd4 y Tc-Rev4; Calle 2: Tc-Fwd5 y Tc-Rev5; Calle 3: Tc-Fwd6 y Tc-Rev6. M: marcador de peso molecular (TrackIt™ 100 pb DNA Ladder, Invitrogen). Se cargó en cada calle 1 µL de cada producto de extracción más 2 µL de tampón de carga de DNA y 3 µL de agua

El gel de electroforesis usando DNAg como molde muestra la ausencia de productos de amplificación por PCR en las calles 1 y 3, a diferencia de la calle 2. Como estrategia para aumentar la capacidad de hibridación, se probaron varias mixturas de oligonucleótidos; Tc-Fwd4/ Tc-Rev5; Tc-Fwd4/ Tc-Rev6; Tc-Fwd5/ Tc-Rev4; Tc-Fwd5/ Tc-Rev6; Tc-Fwd6/ Tc-Rev4; Tc-Fwd6/ Tc-Rev5 (Figura 4).

La banda que aparece en la calle 3, se debe a una hibridación inespecífica de los oligonucleótidos Tc-Fwd5/ Tc-Rev4 con el DNAg. Por su parte, la banda en la calle 5 coincide con el tamaño teórico esperado (961 pb).

Electroforesis de DNAg en gel de agarosa al 1% (p/v) para hojas de cacao

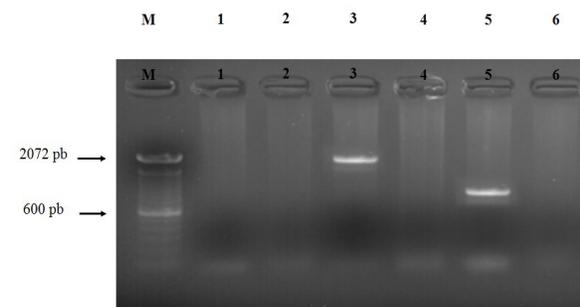


Figura 4. Electroforesis de DNAg en gel de agarosa al 1% (p/v). M, marcador de peso molecular (TrackIt™ 100 pb DNA Ladder, Invitrogen); Calle 1: Tc-Fwd4/Tc-Rev5; Calle 2: Tc-Fwd4/Tc-Rev6; Calle 3: Tc-Fwd5/Tc-Rev4; Calle 4: Tc-Fwd5/Tc-Rev6; Calle 5: Tc-Fwd6/Tc-Rev4; Calle 6: Tc-Fwd6/Tc-Rev5. Se cargó en cada calle 1 µL de cada producto de extracción más 2 µL de tampón de carga de DNA y 3 µL de agua.

Únicamente los oligonucleótidos (Tc-Fw5/Tc-Rev5; Tc-Fw6/Tc-Rev4) que hibridaron con el DNA genómico se emplearon en ensayos de amplificación con cDNA, siendo la pareja de oligonucleótidos Tc-Fw6/Tc-Rev4, la que hibridó de manera específica con el cDNA, obteniéndose un fragmento de 1000 pares de bases (Figura 5).

Electroforesis de cDNA en gel de agarosa al 1% (p/v) para hojas de cacao provenientes de plantas resistentes y susceptibles a monilia

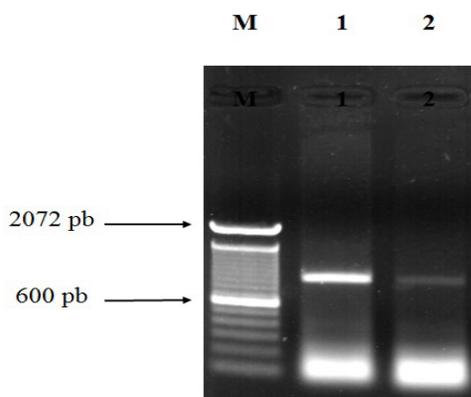


Figura 5. Electroforesis de cDNA con el juego de oligonucleótidos Tc-Fwd6 y Tc-Rev4 en gel de agarosa al 1% (p/v). M, marcador de peso molecular (TrackIt™ 100 pb DNA Ladder, Invitrogen); Calle 1: cDNA de HPR; Calle 2: cDNA de HPS. Se cargó en cada calle 1 µL de cada producto de extracción más 2 µL de tampón de carga de DNA y 3 µL de agua

Los fragmentos de DNA amplificados y separados por electroforesis, se recortaron en un transiluminador con

luz ultravioleta y se purificaron con el juego de reactivos "Purelink Quick Gel Extraction" de Invitrogen, de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se comprobaron los productos en geles de agarosa al 1% (p/v) (Figura 6).

En los carriles 1, 2 y 3 se evidencian bandas de similares pares de bases, provenientes de hoja de planta resistente y susceptible a monilia. La calle 1 muestra la amplificación de DNAg, en contraste con las calles verdes 2 y 3 provenientes de tejido sano y enfermo, respectivamente.

Purificación de DNA plasmídico

El DNA plasmídico se purificó con el kit PureLink HQ Mini Plasmid Purification Kit. Las secuencias generadas con el

vector de clonación sirvieron para la posterior secuenciación, mediante el uso de los primers M13 Forward y M13 Reverse. La eficiencia de la extracción de DNA plasmídico se verificó por amplificación por PCR con el juego de primers Tc-Fw6/ Tc-Rev4 y se visualizó mediante electroforesis horizontal, en el cual aparece una banda de aproximadamente 3000 pb, que indica presencia de residuos, y el gen de interés que coincide con el producto amplificado 961 pb (Figura 7).

Secuenciación de DNA

El método de secuenciación utilizado en este trabajo permitió obtener la secuencia completa del fragmento clonado (Figura 8).

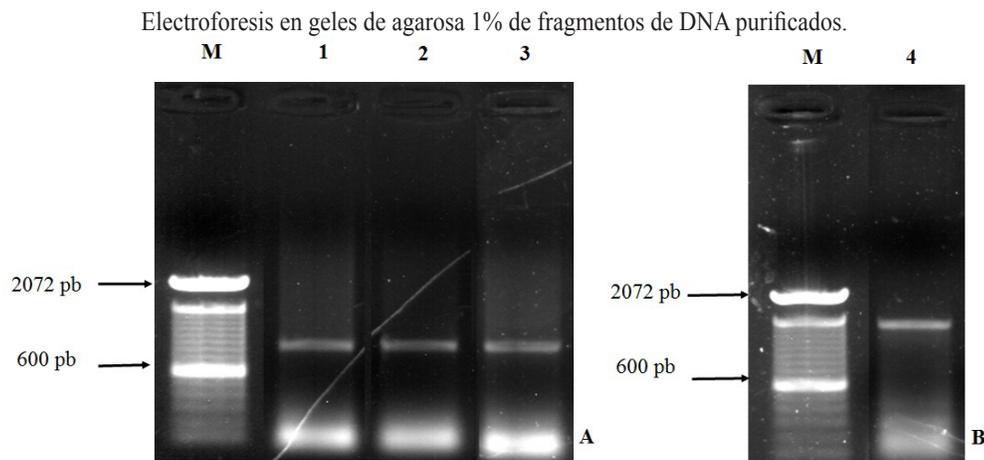


Figura 6. Electroforesis en geles de agarosa 1% de fragmentos de DNA purificados. A. Juego de oligonucleótidos utilizado Tc-Fwd6 y Tc-Rev4. Calle 1: molde de DNAg, calle 2: molde cDNA de HPR, calle 3: molde de cDNA de HPS. B. Juego de oligonucleótidos usado Tc-Fwd5 y Tc-Rev5. Calle 4: molde DNAg. M: marcador de peso molecular (TrackIt™ 100 pb DNA Ladder, Invitrogen). Se cargó en cada calle 1 μ L de cada producto de extracción más 2 μ L de tampón de carga de DNA y 3 μ L de agua

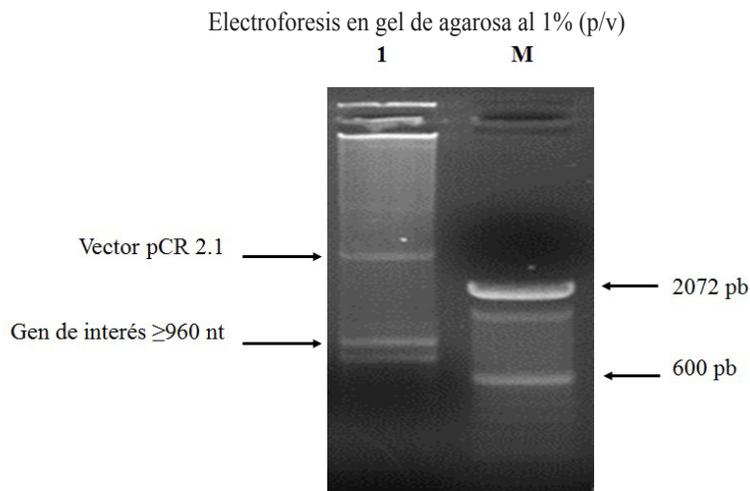


Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v). Calle 1: producto de amplificación de DNA plasmídico purificado. M: marcador de peso molecular (TrackIt™ 100 pb DNA Ladder, Invitrogen)

Secuencia del gen PPO1-Tc

CTAGCTATGGCTTCTCCTGTCTGCGGTCATCAACCCCAACCCTATTTCAGCTCCCCATTCAAACCTCCTT
 CTTTCCAAAAACATGTCAACTTTTCTTGAATAAGAAGATCAAAAAGCCAGACTACTCCGGCCCAAGTAAAGT
 AGTGTTCATGCAAAGCCACGAACAATGGGAGCAAAGGAGACTCTTCTCTCAACAGGTTTGATAGAAGGGATC
 TCCTGATTGGCTAGGAGGTCTTACGGGGCAACCATCTTCCAATGACCCATTGCATTAGCAGCACCTAT
 TGCCGCTCCTGATTGACCCTTTCGGGTGATGCAACAATATCAGACACAACAAAAGAGACAGTCTATTGCTG
 CCCACCAGAAACGACAAAAGGTCATAGATTTCAAACCACCTACATATTCCAAGATACGCTATAGGTCTGCTGCA
 CATTAGTTGATCCTGACTACTTGGCTAAATTTACCAAGGCCATGGAGCTCATGAGAGCTCTTCTCTGATGATG
 ATCCACGTAGTTTCAAGCAACAAGCAAATATTCATTGTGCTATTGTAACGGGGCTTATGATCAAGTAGGGTT
 TGATCAAGATATCAAGTTCATTTCTCGTGGCTCTTTTCCCATTCATAGGTTGTATCTTTATTTCTATGAAAG
 GATTTTGGGCAAGCTGATTGGTGACCCGGATTCGCCATGCCATTTTGGAACTGGGATGCCCTGCAGGCATG
 CCCATAACCTGCCATATATGTAACCCCTAACTCTCCACTCTACGATGACAAGCGCAATGTTAACCATCAGGCACC
 AAAGTGCCTGATCTTGATTACAATGGCACTGATAAAGATATAACAGACACAGCAATGGTACAAAAGTAATCTC
 AAGGTCATGTACAAGCAGATGGTGCTGGTTCAAAGACGGCTCTCTTTTCCATGAAAGGTGTACCGTGTCT
 GCGATAAACCCA

Figura 8. Secuencia del gen PPO1-Tc identificado en este trabajo. La secuencia consta de 961 nt

Caracterización del gen PPO1-Tc

El gen PPO1-Tc se caracterizó mediante el uso de herramientas bioinformáticas disponibles en NCBI (National Center for Biotechnology Information) y en EBI (European Bioinformatics Institute). La secuencia nucleotídica del gen PPO1-Tc codifica para una proteína de 317 aminoácidos (Figura 9).

Para comprobar la similitud/identidad del gen obtenido en este trabajo se realizó una búsqueda aleatoria mediante Blastn disponible en NCBI, la cual muestra que el gen denominado PPO1-Tc tiene una similitud cercana al 100% a la secuencia predictiva de PPO de *Theobroma cacao* depositada en NCBI (XP_017978715.1). Este gen también fue similar a otras PPOs predictivas de cacao y similar en un 70% a la PPO

predictiva de algodón (Cuadro 4). Para comprobar el máximo parentesco molecular con otras PPOs de plantas cercanas a la familia botánica del cacao, se realizó un alineamiento múltiple de secuencias nucleotídicas con las secuencias predictivas de PPOs de cacao depositadas en NCBI, con el fin de comprobar la correspondencia y posición según su ORF (open reading frames, en español marco abierto de lectura), de acuerdo al programa MUSCLE, versión 3.8, disponible en el sitio web del EBI.

Los aminoácidos codificados por el gen PPO1-Tc, ocupan la posición que aparece sombreada y cabe mencionar que la M (metionina) representa el codón de inicio de la proteína (Figura 10).

Aminoácidos codificados por el gen PPO1-Tc

MASPVLPSSPTTISSSPIQTSFFPKTCQLFLNKKIKKPDYSGPSKVVSKATNNGSKGDSLSLNRFDRLDLIGL
 GGLYGATILSNDFALAAPIAAPDLTLCGDATISDTTKETVYCCPPETTKVIDFKPPTYSKIRYRASAHLVDPDY
 LAKFTKAMELMRALPDDDPKQFQKQANIHCAYCNGAYDQVGFQDIQVHFSWLFPPFHRLYLFFYERILGKL
 IGDPDFAMPFWNWDAPAGMPIAIYVNPNSPLYDDKRNVNHQAPKVADLDYNGTDDITDTAMVQSNLKV
 MYKQMVSGSKTASLFFHGKVVYRAGDKP

Figura 9. Aminoácidos codificados por el gen PPO1-Tc

Cuadro 4. Máximo parentesco molecular de la proteína PPO1-Tc con otras PPOs provenientes de plantas

Id Gen	Similitud	Identidad	Acc. NCBI
PPO1-Tc	PREDICTED: polyphenol oxidase, chloroplastic [Theobroma cacao]	99%	XP_017978715.1
	Larreatricin hydroxylase isoform 1 [Theobroma cacao]	98%	EOY28328.1
	Larreatricin hydroxylase isoform 2 [Theobroma cacao]	98%	EOY28329.1
	Larreatricin hydroxylase [Theobroma cacao]	79%	EOY28325.1
	PREDICTED: polyphenol oxidase I, chloroplastic [Theobroma cacao]	79%	XP_017978713.1
	PREDICTED: polyphenol oxidase, chloroplastic-like [Gossypium raimondii]	70%	XP_012451640.1

Alineamiento múltiple del gen PPO1-Tc

```

gi|823237991|ref|XP_012451640.1| -----MAFPVVNSPPSNFVILPSSSIPTSCLPKTSQLFIF-KMKKPF---SKKLVSK
gi|508781069|gb|EOY28325.1| -----MAPLVL--QSSSPT-IPSSSIQTSFFPKTSQLSLNKKTKKPYYSVFNNVVSCR
gi|1063510254|ref|XP_017978713.1| -----MAPLVL--QSSSPT-IPSSSIQTSFFPKTSQLSLNKKTKKPYYSVFNNVVSCR
gi|508781073|gb|EOY28329.1| -----MASPVL--PSSTPTTISSSPIQTSFFPKTSQLFLNKKIKKPDYSGPSKVVVSK
PPO1-Tc -----MASPVL--PSSTPTTISSSPIQTSFFPKTSQLFLNKKIKKPDYSGPSKVVVSK
gi|1063510262|ref|XP_017978715.1| -----MASPVL--PSSTPTTISSSPIQTSFFPKTSQLFLNKKIKKPDYSGPSKVVVSK
gi|508781072|gb|EOY28328.1| MYHQILAMASPVL--PSSTPTTISSSPIQTSFFPKTSQLFLNKKIKKPDYSGPSKVVVSK
      * * : .*.*. :.*.* * :***.* : * ** ..:***.

gi|823237991|ref|XP_012451640.1| ASNGNQ-----NNEGSSSLNSFDRRDILLGLGSLYGATNLVSDPFALAAPIAAPDLSL
gi|508781069|gb|EOY28325.1| ATNNGNQNPPTSSNSKGSALNRFDRRDLLIGLGLYGATNLANDPFALAAPIAAPDLTL
gi|1063510254|ref|XP_017978713.1| ATNNGNQNPPTSSNSKGSALNRFDRRDLLIGLGLYGATNLANDPFALAAPIAAPDLTL
gi|508781073|gb|EOY28329.1| ATNNG-----SKGSSLNRFDRRDLLIGLGLYGATNLSNDPFALAAPIAAPDLTL
PPO1-Tc ATNNG-----SKGSSLNRFDRRDLLIGLGLYGATNLSNDPFALAAPIAAPDLTL
gi|1063510262|ref|XP_017978715.1| ATNNG-----SKGSSLNRFDRRDLLIGLGLYGATNLSNDPFALAAPIAAPDLTL
gi|508781072|gb|EOY28328.1| ATNNG-----SKGSSLNRFDRRDLLIGLGLYGATNLSNDPFALAAPIAAPDLTL
*:*..      .:*.*:** *****:*:***.***** * .*****:***:*.

gi|823237991|ref|XP_012451640.1| CENSTVTSSSSGTSISVPCPPKTNILDFKPPRFSTIRLRPAHLVDANYLEKFTKAME
gi|508781069|gb|EOY28325.1| CGNAVISETTGETTY---CCPPTTTITDYKPPSFKLRYRPPAHLVDADYLAKFTKAMN
gi|1063510254|ref|XP_017978713.1| CGNAVISETTGETTY---CCPPTTTITDYKPPSFKLRYRPPAHLVDADYLAKFTKAMN
gi|508781073|gb|EOY28329.1| CGDATISDTTKETVY---CCPETTKVIDFKPPTYSKIRYRSAHLVDPDYLAFTKAME
PPO1-Tc CGDATISDTTKETVY---CCPETTKVIDFKPPTYSKIRYRSAHLVDPDYLAFTKAME
gi|1063510262|ref|XP_017978715.1| CGDATISDTTKETVY---CCPETTKVIDFKPPTYSKIRYRSAHLVDPDYLAFTKAME
gi|508781072|gb|EOY28328.1| CGDATISDTTKETVY---CCPETTKVIDFKPPTYSKIRYRSAHLVDPDYLAFTKAME
* :.:.:.: *      **** *.: *:*:* :.*.* .*****:* ** *****:

gi|823237991|ref|XP_012451640.1| LMKALPDDDDPRSFQQAIVHCAYCNQAYDQVGFDDQLQVHFSWLFPPHRLYLYFYERI
gi|508781069|gb|EOY28325.1| LMKELPSDDPRSFQQAIVHCAYCNQAYDQVGFDDQLQVHFSWLFPPHRLYLYFYERI
gi|1063510254|ref|XP_017978713.1| LMKELPSDDPRSFQQAIVHCAYCNQAYDQVGFDDQLQVHFSWLFPPHRLYLYFYERI
gi|508781073|gb|EOY28329.1| LMRALPDDDDPRSFQQAIVHCAYCNQAYDQVGF-DQDIQVHFSWLFPPHRLYLYFYERI
PPO1-Tc LMRALPDDDDPRSFQQAIVHCAYCNQAYDQVGF-DQDIQVHFSWLFPPHRLYLYFYERI
gi|1063510262|ref|XP_017978715.1| LMRALPDDDDPRSFQQAIVHCAYCNQAYDQVGF-DQDIQVHFSWLFPPHRLYLYFYERI
gi|508781072|gb|EOY28328.1| LMRALPDDDDPRSFQQAIVHCAYCNQAYDQVGF-DQDIQVHFSWLFPPHRLYLYFYERI
** .*.***** ** :***** **.:***** *****

gi|823237991|ref|XP_012451640.1| LGKLGDPDFVMPFVNWDAPAGMPIPAIYVNPQSPLYDDKRNVNHPKVLADLDYNGTDK
gi|508781069|gb|EOY28325.1| LGKLGDPDFVMPFVNWDAPAGMPIPAIYVNPQSPLYDDKRNVNHPKVLADLDYNGTDK
gi|1063510254|ref|XP_017978713.1| LGKLGDPDFVMPFVNWDAPAGMPIPAIYVNPQSPLYDDKRNVNHPKVLADLDYNGTDK
gi|508781073|gb|EOY28329.1| LGKLGDPDFVMPFVNWDAPAGMPIPAIYVNPQSPLYDDKRNVNHPKVVLDYNGTDK
PPO1-Tc LGKLGDPDFVMPFVNWDAPAGMPIPAIYVNPQSPLYDDKRNVNHPKVVLDYNGTDK
gi|1063510262|ref|XP_017978715.1| LGKLGDPDFVMPFVNWDAPAGMPIPAIYVNPQSPLYDDKRNVNHPKVVLDYNGTDK
gi|508781072|gb|EOY28328.1| LGKLGDPDFVMPFVNWDAPAGMPIPAIYVNPQSPLYDDKRNVNHPKVVLDYNGTDK
*****:*.******:*.*.* ** *:*:*****:*****.*: * ** **.:

gi|823237991|ref|XP_012451640.1| ELSKRDQIKSNLSVMYRQMTV-YKTASLFLGAAYRAGDDPSPGMGSIENNPHTAVHRWVG
gi|508781069|gb|EOY28325.1| DITDAEQIAINLKLKMYQMVSNATTATLFGHKPYRAGDAGSPGGGSVELGCHTAIHRWVG
gi|1063510254|ref|XP_017978713.1| DITDAEQIAINLKLKMYQMVSNATTATLFGHKPYRAGDAGSPGGGSVELGCHTAIHRWVG
gi|508781073|gb|EOY28329.1| DITDKAMVQSNLKVYKQMVSGSKTASLFGHKVYRAGDKPSGGGVVELGSHTAIHRWVG
PPO1-Tc DITDTAMVQSNLKVYKQMVSGSKTASLFGHKVYRAGDKP-----
gi|1063510262|ref|XP_017978715.1| DITDTAMVQSNLKVYKQMVSGSKTASLFGHKVYRAGDKPSGGGVVELGSHTAIHRWVG
gi|508781072|gb|EOY28328.1| DITDKAMVQSNLKVYKQMVSGSKTASLFGHKVYRAGDKPSGGGVVELGSHTAIHRWVG
: :. : *:*.*.***: .**.* * *****

```

Figura 11. Alineamiento múltiple de aminoácidos de otras proteínas con la secuencia traducida del gen PPO1-Tc realizado con el programa Muscle 3.8

Discusión

La extracción de RNA total de alta calidad en plantas presenta una serie de dificultades, su obtención es determinante para subsecuentes ensayos moleculares como síntesis de DNA complementario (cDNA) mediado por retrotranscriptasa (RT), amplificación por PCR (Birtic y Kranner, 2006), (Islas-Flores *et al.*, 2006), amplificación rápida de DNA complementario final (Portillo *et al.*, 2006) y (Shi y Bressan, 2006); pasos previos e imprescindibles para la clonación, secuenciación y caracterización de un gen codificante de polifenol oxidasa (PPO) de cacao.

Así mismo, la extracción de RNA de tejidos de plantas recalcitrantes conlleva una serie de problemas por la presencia de pectinas, taninos (ME., 1992), pigmentos (Kim y Hamada, 2005), polisacáridos (Manickavelu *et al.*, 2007), poliquinonas (Meisel *et al.*, 2005) y otros metabolitos secundarios (de Keukeleire *et al.*, 2006). Todos estos componentes vegetales pueden interactuar con los ácidos nucleicos, concretamente con el RNA formando complejos insolubles. Esta interferencia química puede causar degradación y bajos rendimientos de RNA mensajeros (RNAm) como un mecanismo de oxidación de polifenoles y coprecipitación con polisacáridos (Wang *et al.*, 2000) y (Morante-Carriel *et al.*, 2014).

Algunos de los protocolos descritos para la extracción de RNA de plantas ricas en polisacáridos y compuestos polifenólicos incluyen el uso de pirrolidona y precipitación con etanol, sin embargo, el uso de este reactivo no siempre se convierte en un beneficio para el investigador (Morante-Carriel *et al.*, 2014). La dificultad de extraer RNA de estos tejidos con los métodos convencionales ya descritos, por lo general siempre requiere incluir modificaciones, optimizando procedimientos específicos para ciertos tejidos vegetales. La aplicación de este protocolo permitió la extracción y purificación de RNA de cacao, con suficiente pureza y calidad, que se empleó para la síntesis de cDNA y clonación y secuenciación de un gen de polifenol oxidasa. Además, se espera que las modificaciones efectuadas funcionen en la extracción de RNA en otras plantas de similares características.

En cuanto a la síntesis de cDNA, es notable mencionar que en los últimos años han aparecido en el mercado juegos de reactivos para la síntesis de cDNA para RT-PCR. El kit "SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR" de Invitrogen fue usado para la investigación, cuyas reacciones de cDNA fueron utilizadas para los siguientes ensayos de amplificación de secuencias codificantes de PPOs por PCR.

Por otro lado, a pesar de la descripción de familias multigénicas en varias plantas como el tomate (Newman *et al.*, 1993), papa (Thygesen *et al.*, 2004), plátano (Gooding *et al.*, 2001), álamo (Wang y Constabel, 2004) y algunas Rosáceas (Haruta *et al.*, 1999) y la descripción de expresión simultánea

de dos o más genes en un mismo estado de desarrollo (Kim *et al.*, 2001), no se ha descrito hasta el momento en cacao la secuencia de un gen que codifique para polifenol oxidasa ni tampoco la disponibilidad de información en el estadio de la planta en el que se expresa. Sin embargo, en este trabajo y debido al método de secuenciación se identificó la totalidad del fragmento clonado.

Posterior a la identificación del fragmento se completó el alineamiento de secuencias que permitió caracterizar de forma molecular al gen de interés, el cual presentó similitud entre los aminoácidos que ocupan una posición concreta en la secuencia. Sin embargo, las diferencias puntuales pueden deberse a polimorfismos de nucleótido simple (SNPs), ya que estas sustituciones pueden ser el resultado de la sustitución de una sola base en los respectivos codones. Estos cambios son posibles porque el material vegetal usado para secuenciar el genoma de cacao tiene múltiples orígenes (Ecuador, Costa de Marfil, entre otros), siendo diferentes al tejido empleado en el presente trabajo (hoja de cacao Nacional), recolectados de la Finca Experimental la Represa en Quevedo, Ecuador.

El aislamiento de esta secuencia indica que existe base génica y evidencias experimentales de la existencia de al menos un gen codificante de polifenol oxidasa presente en hojas de cacao. A partir de este trabajo, el desafío a futuro, será desarrollar oligonucleótidos específicos para iniciar ensayos de expresión génica mediante PCR cuantitativa en diferentes estados de desarrollo de la mazorca, orientadas a analizar el comportamiento de este gen en situaciones de estrés de la planta de cacao.

Conclusiones

La extracción y purificación de RNA total de alta calidad de hojas de cacao provenientes de plantas identificadas como resistentes y susceptibles a monilia fue exitosa aplicando un protocolo establecido para plantas recalcitrantes, por tanto, el RNA obtenido se usó para la síntesis de cDNA y los posteriores ensayos de amplificación por PCR; de los cuales se obtuvieron tres fragmentos de PPOs de cacao Nacional, el primer producto derivado de DNAg y dos productos derivados de cDNA, provenientes de plantas resistentes y susceptibles. Finalmente, la caracterización molecular del fragmento de interés, llamado de ahora en adelante gen PPO1-Tc que codifica para polifenol oxidasa (PPOs) en cacao Nacional, *Theobroma cacao* L. fue exitosa logrando identificar el total de pares de bases y aminoácidos codificados por el gen. Con este resultado exitoso se corrobora la presencia de al menos un gen codificante de PPOs en plantas resistentes y susceptibles a monilia.

Bibliografía

- Altschul, S., Gish, W., Miller, W., & Lipman, D. (1990). Basic local alignment search tool (BLAST). *Molecular Biology Journal*, 215(3), 403-410.
- Amores, F., Agama, J., Mite, F., Jiménez, J., Loor, G., & Quiroz, J. (2009). EET 544 y EET 558. Nuevos clones de cacao nacional para la producción bajo riego en la Península de Santa Elena. *Boletín Técnico N° 134*. Quevedo, Ecuador: INIAP.
- Birtic, S., & Kranner, I. (2006). Isolation of high-quality RNA from polyphenol-, polysaccharide- and lipid-rich seed. *Phytochemical Analysis*, 17(3), 144-148. doi:10.1002/pca.903
- Boeckx, T., Winters, A., Webb, J., & Kingston-Smith, A. (2015). Polyphenol oxidase in leaves; is the any significance to the chloroplastic localization? *Journal of Experimental Botany*, 66(12), 3571-3579. doi:10.1093/jxb/erv141
- Chun, G. H., Chikako, H., Masayuki, K., Zilian, Z., Tomomi, T., & Takaya, M. (2002). A simple protocol for RNA isolation from fruit trees containing high levels of polysaccharides and polyphenol compounds. *Plant Molecular Biology Reporter*, 20(69), 69a-69g. doi:10.1007/BF02801935
- Constabel, P., & Barbehenn, R. (2008). Defensive Roles of Polyphenol Oxidase in Plants. En P. Constabel, *Induced Plant Resistance to Herbivory* (págs. 253-269). Victoria: Springer.
- De Keukeleire, J., Roldán-Ruiz, I., Van Bockstaele, E., Heyerick, A., & De Keukeleire, D. (2006). Efficient extraction of high-quality total RNA from various hop tissues (*Humulus lupulus* L.). *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 36(4), 355-362.
- Gooding, P., Bird, C., & Robinson, S. (2001). Molecular cloning and characterisation of banana fruit polyphenol oxidase. *Planta*, 213, 748-757. doi:10.1007/s004250100553
- Guerrero, G. (2014). *Revista Líderes*. Recuperado el 2016, de El cacao ecuatoriano su historia empezó antes del siglo XV: <http://www.revistalideres.ec/lideres/cacao-ecuatoriano-historia-empezo-siglo.html>
- Haruta, M., Murata, M., Kadokura, H., & Homma, S. (1999). Immunological and molecular comparison of polyphenol oxidase in Rosaceae fruit trees. *Phytochemistry*, 50, 1021-1025. doi:10.1016/S0031-9422(98)00633-5
- Islas-Flores, I., Peraza-Echeverría, L., Cantó-Canché, B., & Rodríguez-García, C. (2006). Extraction of high-quality, melanin-free RNA from *Mycosphaerella fijiensis* for cDNA preparation. *Molecular Biotechnology*, 34(1), 45-50. doi:10.1385/MB:34:1:45
- Kim, J. Y., Seo, Y. S., Kim, J. E., Sung, S.-K., Song, K. J., An, G., & Kim, W. T. (2001). Two polyphenol oxidases are differentially expressed during vegetative and reproductive development and in response to wounding in the Fuji apple. *Plant Science*, 161(6), 1145-1152. doi:10.1016/S0168-9452(01)00522-2
- Kim, S.-H., & Hamada, T. (2005). Rapid and Reliable Method of Extracting DNA and RNA from Sweetpotato, *Ipomoea batatas* (L). *Lam. Biotechnology Letters*, 27(23), 1841-1845. doi:10.1007/s10529-005-3891-2
- Liao, Z., Chen, R., Chen, M., Yang, Y., Fu, Y., Zhang, Q., & Lan, X. (2006). Molecular Cloning and Characterization of the Polyphenol Oxidase Gene from Sweetpotato. *Molecular Biology*, 40(907), 907-913. doi:10.1134/S0026893306060094
- ME., J. (1992). An efficient method for isolation of RNA and DNA from plants containing polyphenolics. *Nucleic Acids Research*, 20(9), 2381. doi:10.1093/nar/20.9.2381
- Manickavelu, A., Kambara, K., Mishina, K., & Koba, T. (2007). An efficient method of purifying high quality RNA from wheat pistils. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 54(2), 254-258. doi:10.1016/j.colsurfb.2006.10.024
- Mayer, A. (2006). Polyphenol oxidases in plants and fungi: Going places? A review. *Phytochemistry*, 67(21), 2318-2331. doi:10.1016/j.phytochem.2006.08.006
- Meisel, L., Fonseca, B., Gonzalez, S., Baeza-Yates, R., Cambiazo, V., Campos, R., Silva, H. (2005). A rapid and efficient method for purifying high quality total RNA from peaches (*Prunus persica*) for functional genomics analyses. *Biological Research*, 38(1), 83-88.
- Ministerio de Comercio Exterior. (2015). *Boletín Mensual de Comercio Exterior*. Recuperado el 2016, de Junio-Julio 2015: <http://www.proecuador.gob.ec/wp-content/uploads/2015/07/JULfinal.pdf>
- Morante-Carriel, J., Obrebska, A., Bru-Martínez, R., Carranza, M., Pico, R., & Nieto, E. (2014). Distribución, localización e inhibidores de las polifenol oxidasas en frutos y vegetales usados como alimento. *Ciencia y Tecnología*, 7(1), 23-31.
- Morante-Carriel, J., Sellés-Marchart, S., Martínez-Márquez, A., Martínez-Esteso, M.J., Luque, I., & Bru-Martínez, R. (2014). RNA isolation from loquat and other recalcitrant woody plants with high quality and yield. *Analytic Biochemistry*, 452(1), 46-53.
- Newman, S., Eannetta, N., Yu, H., Prince, J., de Vicente, M., Anskley, S., & Steffens, J. (1993). Organisation of the tomato polyphenol oxidase gene family. *Plant Molecular Biology*, 21(6), 1035-1051.
- Portillo, M., Fenoll, C., & Escobar, C. (2006). Evaluation of different RNA extraction methods for small quantities of plant tissue: Combined effect of reagent type and homogenization procedure on RNA quality-integrity and yield. *Physiologia Plantarum*, 128(1), 1-7. doi:10.1111/j.1399-3054.2006.00716.x
- Reid, K., Olsson, N., Schlosser, J., Peng, F., & Lund, S. (2006). An optimized grapevine RNA isolation procedure and statistical determination of reference genes for real-time

- RT-PCR during berry development. *BMC Plant Biology*, 6(27). doi:10.1186/1471-2229-6-27
- Sánchez-Mora, F., Zambrano, J., Vera, J., Ramos, R., Garcés, F., & Vascónez, G. (2014). Productividad de clones de cacao tipo Nacional en una zona del bosque húmedo tropical de la provincia de Los Ríos, Ecuador. *Ciencia y Tecnología*, 7(1), 33-41.
- Shi, H., & Bressan, R. (2006). RNA Extraction. *Methods in Molecular Biology*, 323, 345-348. doi:10.1385/1-59745-003-0:345
- Solis, K., & Suárez, C. (2006). Uso de *Trichoderma* spp para control del complejo Moniliasis-Escoba de Bruja del cacao en Ecuador. 15th Conferencia Internacional de Investigación en Cacao. Quevedo, Ecuador: Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias. Recuperado el 2016
- Thompson, J., Gibson, T., Plewniak, F., Jeanmougin, F., & Higgins, D. (1997). The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids*, 25(24), 4876-4882.
- Thygesen, P., Dry, I., & Robinson, S. (1995). Polyphenol oxidase in potato. A multigene family that exhibits differential expression patterns. *Plant Physiology*, 109(2), 525-531. doi:10.1104/pp.109.2.525
- Tran, L., Taylor, J., & Constabel, P. (2012). The polyphenol oxidase gene family in land plants: Lineage-specific duplication and expansion. *BMC Genomics*, 13(395). doi:10.1186/1471-2164-13-395
- Villavicencio, M., & Jiménez, M. (2010). Caracterización morfológica, fisiológica y patogénica de *Moniliophthora roreri* aislados de cinco provincias de la Costa Ecuatoriana. CICYT. Recuperado el 2016, de <http://www.dspace.espol.edu.ec/xmlui/bitstream/handle/123456789/10957/Caracterizaci%C3%B3n%20morfol%C3%B3gica%20fisiol%C3%B3gica%20y%20patog%C3%A9nica.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Wang, J., & Constabel, P. (2004). Polyphenol oxidase overexpression in transgenic *Populus* enhances resistance to herbivory by forest tent caterpillar (*Malacosoma disstria*). *Planta*, 220(1), 87-89. doi:10.1007/s00425-004-1327-1
- Wang, S., Hunter, W., & Plant, A. (2000). Isolation and purification of functional total RNA from woody ranches and needles of Sitka and white spruce. *BioTechniques*, 28(2), 292-296.