



## Selección estable de marcadores moleculares microsátélites (SSRs) para la identificación de clones comerciales de cacao Nacional (*Theobroma cacao* L.), recomendados por el INIAP

Cristina Rosero<sup>1</sup>, Iván Garzón<sup>2</sup>, Eduardo Morillo<sup>3</sup>

**Palabras Clave:** Cacao, Fino de Aroma, EET, Microsátélite, ADN.

**ABSTRACT** - The high demand for genetic materials in the cultivation of cocoa (*Theobroma cacao* L.), required for the renovation, rehabilitation and implementation of new plantations has given rise to a proliferation of centers of propagation, which do not meet criteria qualified technicians especially during the processes of clonal multiplication. In these conditions the certification of nurseries for propagation material, is performed on the basis of phenotypic characteristics, which do not provide a criterion of confidence for the authentication of genotypes. In this sense, we propose the use of molecular markers of microsatellite stable selection, to carry out the identification of individuals of National cocoa "Fine Aroma". 17 SSRs were used to obtain the genetic identity of 31 accessions within which are the recommended by INIAP. For the allocation of molecular weights of the amplified products are employment the migration technique using electrophoretic run in polyacrylamide gels, whose results were revealed in silver nitrate staining and fluorescence in a semi-automated system. The multivariate analyses tested in genotypes were differentiated five groups: EET, SNA, CCN, ESS and AIS. The genotypes EET are a heterogeneous group for which no specific alleles were found, with the exception of the 289pb, in the locus mTcCIR 22 of the genotype EET-19. For this reason, was selected on the basis of allelic frequencies microsatellite markers that differentiate the EET group of genotypes, these being: mTcCIR 6, mTcCIR 12, mTcCIR 24 and mTcCIR 58. The selected markers allowed identifying clones out of type in different systems of asexual propagation. The present study has made important contributions to determine the structure and genetic uniqueness of cocoa.

**Abreviaciones:** AGROCALIDAD: Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro; CCN 51: Colección Castro Naranjal; EET: Estación Experimental Tropical; ESS: Edmundo Sánchez; ICS 95: Imperial Collage Selection; IMC 67: Iquitos Marañón Collection; INIAP: Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias; JHVH 10: Jehová; mTcCIR: Microsátélite *Theobroma cacao* CIRAD; PCR: Reacción en cadena de la polimerasa; PPC: Patricio Paredes Clon; SA: Sebastián Arteaga; SNA: Sabor Nacional Arriba; SSRs: Simple Sequence Repeat.

<sup>1</sup> Escuela Politécnica del Ejército, Departamento de Ciencias de la Vida, Carrera de Ingeniería en Biotecnología

<sup>2</sup> Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), Estación Experimental Tropical Pichilingue

<sup>3</sup> Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), Estación Experimental Santa Catalina

## INTRODUCCIÓN

Es ampliamente conocido que existe una creciente demanda de cacao Fino de Aroma para la industria a nivel mundial, la cual se mantendrá creciente al menos por la siguiente década. En este escenario, la alta demanda de materiales genéticos requeridos para la renovación, rehabilitación o implementación de nuevas plantaciones de cacao en el país, ha dado origen a una proliferación de centros de propagación de material de siembra, los mismos que no cumplen con criterios técnicos calificados o validados, que garanticen una correcta identificación de los materiales propagados clonalmente y usados para la venta a nivel de vivero.

El Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) durante mucho tiempo ha generado información sobre las características fenotípicas de los genotipos recomendados, seleccionando una lista estandarizada de descriptores morfológicos y agronómicos que permite definir caracteres cualitativos y cuantitativos. Sin embargo, éstas constituyen medidas subjetivas que en buena parte están limitadas por efectos ambientales y además requiere de una gran experiencia del evaluador para una caracterización acertada. Otro factor negativo de los descriptores fenotípicos es el tiempo, pues generalmente deben ser usados en árboles adultos que hayan completado su desarrollo.

Actualmente, existen tecnologías basadas en el uso del ADN que permiten la identificación de un genotipo en particular, así como la determinación de la diversidad entre familias y poblaciones, sirven de base para la identificación de especies e híbridos, permiten establecer la paternidad, entre muchos otros aspectos; sin importar la forma o tecnología por la cual fueron obtenidos (Liu & Cordes, 2004).

Entre las técnicas más utilizadas en la última década están los marcadores moleculares microsatélites, los cuales se caracterizan por ser secuencias únicas que se encuentran localizadas en diferentes partes del genoma; son abundantes, altamente polimórficos entre individuos y son codominantes, características que han hecho de estas herramientas perfectamente adaptables y aplicables al cultivo de cacao (Chakraborty *et al.*, 1988).

Como lo demuestran estudios realizados por Saunders, Mischke & Hemeida (2001), ha sido posible seleccionar 15 iniciadores microsatélites como estándares internacional para caracterizar cacao. Para el caso específico del cacao Nacional ya se han realizado estudios con microsatélites como son los casos de Loor (2002, 2009) y Amores *et al.* (2009c).

La presente investigación se orientó hacia la selección de marcadores moleculares microsatélites, con el objeto de disponer de herramientas para la identificación y diferenciación de los clones comerciales de cacao Nacional (*Theobroma cacao* L.), recomendados por el INIAP, de otros con características fenotípicas similares presentes en el mercado ecuatoriano además determinar la estabilidad de los marcadores microsatélites seleccionados para la diferenciación de los genotipos en plantas de cacao Nacional obtenidas mediante diferentes formas de propagación asexual.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal

Se seleccionaron un total de 31 genotipos para el presente estudio (Tabla 1.), de los cuales los 10 primeros genotipos corresponden a clones de tipo Nacional que han sido liberados por el INIAP, para su siembra comercial. Se tomaron muestras foliares de 2 plantas representativas de cada uno de ellos.

**Tabla 1** Lista de Genotipos de cacao empleados en la investigación

No	Código	No	Código	No	Código
1	EET-19	12	EET-577	22	ESS 5
2	EET-48	13	EET-559	23	ESS 6
3	EET-62	14	IMC-67	24	ESS 7
4	EET-95	15	ICS-95	25	ESS 8
5	EET-96	16	CCN-51	26	SNA-0409a
6	EET-103	17	JHVH 10	27	SNA-1003
7	EET-544	18	ESS 1	28	SA-16
8	EET-558	19	ESS 2	29	PPC1
9	EET-575	20	ESS 3	30	PPC2
10	EET-576	21	ESS 4	31	PPC3
11	EET-400				

El muestreo consistió en tomar la segunda, tercera y cuarta hoja desde el ápice, de las ramas ubicadas en el tercio medio de cada planta, las cuales tenían una coloración verde claro y buen estado fitosanitario y fueron transportadas del campo al laboratorio en una nevera portátil (Scheffe, 2008).

### Extracción de ADN

El protocolo de extracción utilizado en esta investigación se basó en el propuesto por Doyle & Doyle (1987) y modificado por Faleiro *et al.* (2002). Adicionalmente se realizaron ciertas modificaciones.

El protocolo inició con el macerado de tejido foliar en nitrógeno líquido hasta convertirlo en polvo. Del producto macerado se tomó una alícuota de 0,1g en un microtubo de 2mL. A continuación se añadió 1ml de buffer de extracción (2.8% CTAB; 1.3M NaCl; 20mM EDTA; 100mM, pH 8 TRIS-HCl; 1% PVP 40; 0,2% de  $\beta$  Mercaptoetanol; agua MILLI-Q), previamente calentado a 65°C en baño. Se homogenizó en Vortex y se colocó a 65°C en baño María por una hora agitando levemente. Se

retira la preparación del baño María dejando enfriar a temperatura ambiente. A continuación se adicionó 700 $\mu$ L de CIA, seguido de suaves inversiones hasta que estuvo turbio y se centrifugó a 13.000rpm por 10 minutos. Luego se extrajo el sobrenadante y se adicionó 55 $\mu$ L de CTAB al 7%, se mezcló por 5 minutos. Se repitió el lavado con CIA. Se recuperó nuevamente el sobrenadante, añadiendo 300 $\mu$ L de etanol frío en cada tubo, mezclando por cinco minutos luego se coloca esta preparación a -20°C durante 30 minutos. A continuación se centrifugó durante 10 minutos a 14.000rpm y se eliminó el sobrenadante. Se lavó con etanol al 70% y se dejó secar a temperatura ambiente por dos horas. Se resuspendió el ADN en 100 $\mu$ L de agua. Se añadió 10 $\mu$ L de NaCl 5M y 75 $\mu$ L de etanol frío. Se puso a -20°C durante tres horas. Se repitió los lavados con etanol y se dejó secar. Finalmente se resuspendió en 200 $\mu$ L de TE y se almacenó a -20°C.

### Cuantificación del ADN obtenido

*Cuantificación por electroforesis en gel de agarosa:* Se realizaron corridas electroforéticas en gel de agarosa al 1%, con el propósito de verificar la existencia del ADN extraído, siguiendo el protocolo propuesto por Morillo & Miño (2009).

*Cuantificación por espectrofotometría:* Se realizó en un espectrofotómetro Hitachi U-2900 UV-VIS mediante la medida de las absorbancias a longitudes de onda de 260nm y 280nm.

### Genotipaje con microsatélites

La técnica de genotipaje usada en este experimento fue la de "Secuencias de Repeticiones Simples" (SSRs, por sus siglas en inglés), también llamados microsatélites. Esta técnica comprende 3 procesos principales: Amplificación de ADN por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR por siglas en inglés), Migración del ADN mediante electroforesis en geles de poliacrilamida y revelado de resultados el cual se efectuó por medio de Tinción de los

geles con nitrato de plata y por medio de Fluorescencia.

*Amplificación (PCR):* En este estudio se empleó un total de 20 iniciadores microsátélites (Tabla 2), reportados como polimórficos por Saunders *et al.* 2004, Loor (2007) y López (2010) para *Theobroma cacao* L.

**Tabla 2** Lista de marcadores microsátélites empleados en el presente trabajo.

No.	Nombre	No. Crom	Tamaño pb	Secuencia del Iniciador	T annealing °C	Reportados por
1	mTeCIR 1	8	128-146	PF GCAGGGCAGGTCCAGTGAAGCA PR TGGGCAACCAGAAAACGAT	51	
2	mTeCIR 6	6	224-253	PF TTCCCTCTAAACTACCCTAAAT PR TAAAGCAAAGCAATCTAACATA	46	
3	mTeCIR 7	7	148-163	PF ATGCGAATGACAACCTGGT PR GCTTTCAGTCCTTTGCTT	51	
4	mTeCIR 8	9	290-307	PF CTAGTTTCCCATTTACCA PR TCCTCAGCATTTCTTTC	46	
5	mTeCIR 11	2	286-321	PF TTTGGTGATTATTAGCAG PR GATTTCGATTTGATGTGAG	46	
6	mTeCIR 12	4	165-256	PF TCTGACCCCAAACCTGTA PR ATTCCAGTTAAAGCACAT	46	
7	mTeCIR 15	1	234-263	PF CAGCCGCTCTTGTTAG PR TATTGGGATTCTTGATG	46	
8	mTeCIR 18	4	333-357	PF GATAGCTAAGGGGATTGAGGA PR GGTAATTCAATCATTGAGGATA	51	(Saunders <i>et al.</i> , 2004)
9	mTeCIR 22	1	276-301	PF ATTCTCGCAAAAACCTTAG PR GATGGAAGGAGTGAAAATAG	46	
10	mTeCIR 24	9	186-207	PF TTTGGGGTGATTTCCTCTGA PR TCTGTCTCGTCTTTTGGTGA	46	
11	mTeCIR 26	8	285-310	PF GCATTCATCAATACATTC PR GCACTCAAAGTTCATACTAC	46	
12	mTeCIR 33	4	265-348	PF TGGGTGAAGATTGGT PR CAACAATGAAAATAGGCA	51	
13	mTeCIR 37	10	136-187	PF CTGGGTGCTGATAGATAA PR AATACCCTCCACAAAAT	46	
14	mTeCIR 40	3	259-288	PF AATCCGACAGTCTTAAATC PR CCTAGGCCAGAGAATTGA	51	
15	mTeCIR 60	2	190-218	PF CGCTACTAACAACATCAAA PR AGAGCAACCATCACTAATCA	51	
16	mTeCIR 58	9	208-324	PF TTTTGGTGATGGAACAT PR TGGTTAAGCAACACTAAACT	51	
17	mTeCIR 84	1	136	PF CATGGGACGCTGCCT PR CTCTTATTAATGAATTCTCT	51	
18	mTeCIR 225	8	302	PF AAGACAAAGGGAAGAAGA PR AGGGGAAGAGCAAATC	51	(Loor, 2007 y López, 2010)
19	mTeCIR 230	2	228-267	PF GTGGAAGCCTTATGATTATGT PR ATTTATGCCCATGCAGAC	51	
20	mTeCIR 290	6	175	PF AGCGAGAGACAAAGATAAT PR GACTGAAATGGTGGTAAAG	51	

En base a la estimación de la concentración del ADN, se realizaron las diluciones correspondientes para obtener una concentración de 5 ng/μL.

A continuación se detalla el master mix utilizado para una reacción de 10μL: 2μL de Green GoTaq® Flexi Buffer (M891A PROMEGA) (1X), 0.8μL de MgCl<sub>2</sub> (A351H PROMEGA) (2mM), 0.10μL de dNTP's

(10297-018 INVITROGEN™) (0,02 mM c/u), 0.45μL de iniciador SSR Forward (0.45μM) y 0.45 μL de iniciador SSR Reverse (0.45μM), 0.6μL de ADN, (0.3ng/μL), 5.55μL de Agua ultrapura (10977 – 015 Gibco INVITROGEN™) y 0.05μL de GoTaq® DNA Polymerase (M829B PROMEGA) (5 U/ μl), propuesto por Promega Corporation (2008); Surzycki (2000).

El programa que se empleó en el termociclador 5331 Matercycler® gradient EPPENDORF para la PCR fue: Inicial a 95°C por 2 minutos, seguida de 35 ciclos a 94°C por 30 segundos, luego 30 segundos de anillamiento a la temperatura establecida para cada iniciador, 2 a 72°C y finalente 72°C por 5 minutos (Promega Corporation, 2008; Surzycki 2000).

*Geles de poliacrilamida:* El proceso de genotipaje de las 31 muestras con 17 marcadores microsátélites se realizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida revelados por tinción con nitrato de plata; también, se empleó la técnica de revelado por fluorescencia. en el equipo LI – COR 4300s (DNA 43 - 0626) (LI – COR, Lincon, NE, USA, Biosciences).

### Verificación de la estabilidad de los marcadores seleccionados

Para ello se realizó extracción, cuantificación, amplificación y electroforesis en geles de poliacrilamida teñidos con nitrato de plata de tres materiales (EET – 96, EET – 103 y EET – 576). Finalmente se comparó los perfiles moleculares obtenidos del mismo genotipo multiplicado por diferentes formas de propagación asexual.

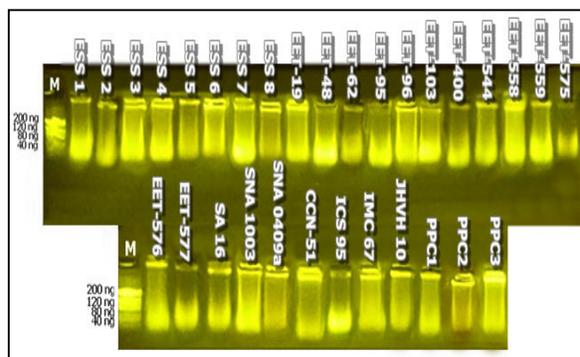
### Análisis de datos

Se realizó el análisis de diversidad genética empleando el programa PowerMarker versión 3.0 (Liu & Muse, 2005); para los análisis UPGMA, *Bootstrap* se utilizó el programa PowerMarker y para visualizarlos el programa TREEVIEW (Page, 2008), para el análisis ACoP se realizó con el programa NTSYS ver.2.1 (Rohlf, 2002). El programa que se empleó para realizar el AMOVA fue GenAlEx (Peakall & Smouse, 2009).

## RESULTADOS

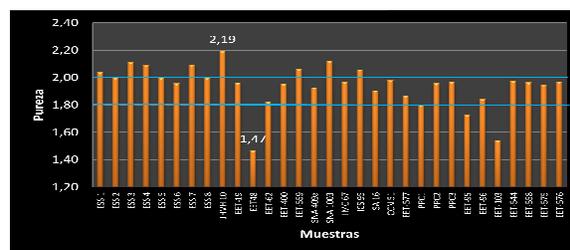
### Extracción y cuantificación de ADN

La cuantificación del ADN mediante electroforesis mostró que existió ADN en todos los materiales extraídos (Figura 1). Sin embargo, la intensidad de las bandas varió dependiendo de las diferentes concentraciones de ADN. En el gel se observó además, contaminación en las bandas, posiblemente debido a la presencia de polisacáridos y polifenoles en las muestras.



**Figura 1** Muestras de ADN de hojas de cacao, corridas en gel de agarosa al 1% y teñidas con Sybr Gold, 4 µl de Marcador Low DNA Mass Ladder.

La concentración del ADN varía desde 30,00ng/µL a 567,50ng/µL, con un promedio de 284,60ng/uL, lo cual es suficiente para realizar las pruebas de análisis de PCR. Adicionalmente, se midió la pureza del ADN que va en un rango de 1,47 hasta 2,19 (Figura 2).



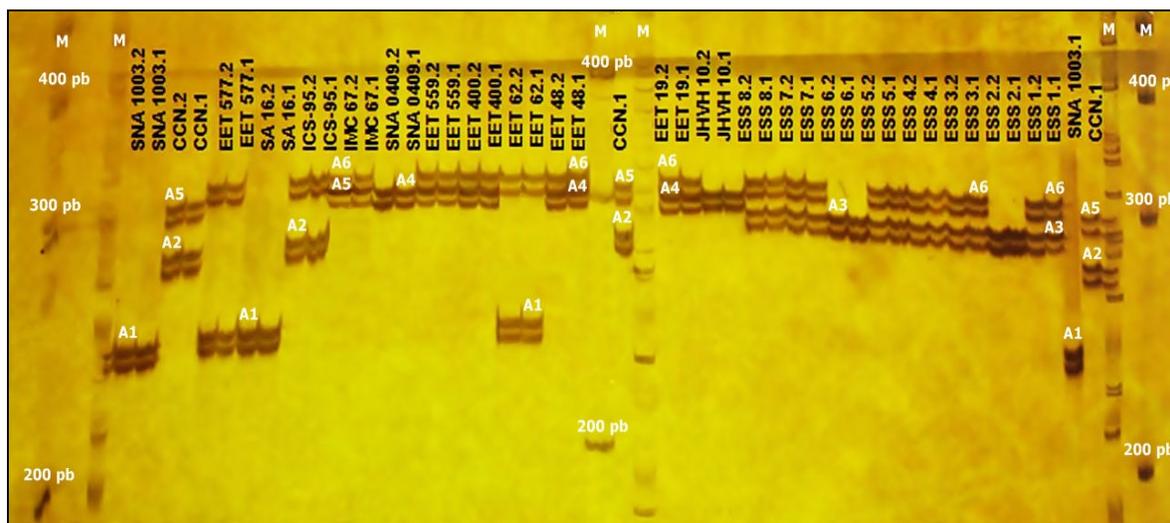
**Figura 2** Pureza del ADN de hojas de cacao. Relación ABS 260/ABS 280. Rango establecido 1,8 – 2,0.

En la figura 2 se muestra los valores de pureza del ADN extraído. La mayoría del ADN de las muestras se encuentra dentro del rango establecido 1,8 a 2,0. Se puede observar que existieron valores por encima y por debajo del rango establecido lo que probablemente se debe a la existencia de proteínas u otros elementos absorbentes de UV ó a la presencia de cloroformo o fenol en la muestra.

### Genotipaje con microsatélites

*Geles de poliacrilamida revelados por tinción con nitrato de plata*

El marcador mTcCIR 58 (Figura 3) muestra variabilidad genética entre las muestras, por ejemplo el genotipo EET-577 es heterocigoto para este locus, con un alelo (A6) compartido con ICS-95 e IMC-67 y el otro alelo (A1) lo comparte con SNA-1003, SA-16 y con EET-62. También se aprecia que el alelo A6, está presente en todos los genotipos EET y en la mayoría de ESS. Los genotipos EET-559, EET-400, EET-48 y EET-19 son heterocigotos, uno de sus alelos es el A4, el cual está presente en el genotipo SNA-0409a, y su otro alelo es A6. El genotipo EET-62 es heterocigoto, presenta el alelo A1 y el alelo A6.



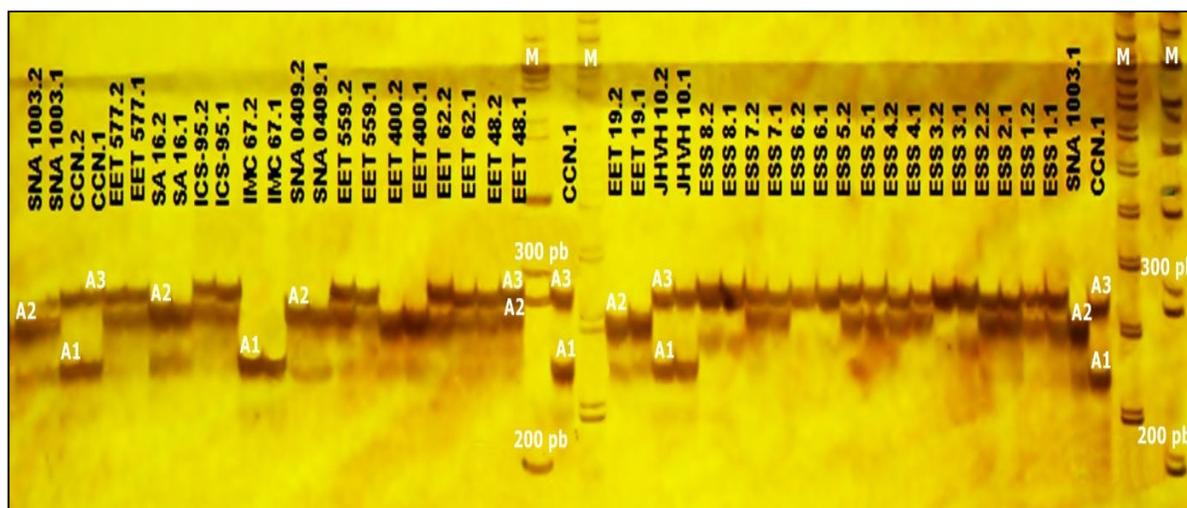
**Figura 3** Gel de poliacrilamida 6% marcador mTcCIR 58. A1= alelo 1, A2= alelo 2, A3= alelo 3, A4= alelo 4, A5, alelo 5, A6= alelo 6.

La figura 3 muestra que el genotipo testigo CCN 51 es heterocigoto, uno de sus alelos (A2) está presente en el genotipo ICS-95, y el otro alelo (A5) está presente tanto en el genotipo IMC-67 como en el genotipo JHVH 10. Cabe resaltar que este último genotipo presenta únicamente el alelo A5.

El grupo de los genotipos denominados ESS presentan los alelos A6 y A3, con excepción del

los genotipos ESS 6 y ESS 2 que poseen solo el segundo alelo.

La figura 4 muestra el marcador mTcCIR 230, donde se observa una tinción bastante uniforme con bandas alélicas bien definidas, se nota un poco de sombra debajo de cada una de ellas, pero a pesar de ello el revelado de bandas permitió una correcta lectura de los resultados.



**Figura 4** Gel de poliacrilamida 6% marcador mTcCIR 230. A1= alelo 1, A2= alelo 2, A3= alelo 3.

En la figura 4 se observa que los genotipos EET-577, EET-559, EET-62 y EET-48 son heterocigotos, presentan un alelo (A3), el cual se encuentra en el genotipo CCN-51, ICS-95, JHVH 10 y en el grupo de los ESS. El segundo alelo (A2), está presente en los genotipos SNA 1003, SA 16, ICS-95, SNA 0409a, EET-400, EET-19, ESS 1, ESS 2, ESS 4, ESS 5 y ESS 7. Los genotipos EET-19 y EET-400 son homocigotos compartiendo el alelo A2.

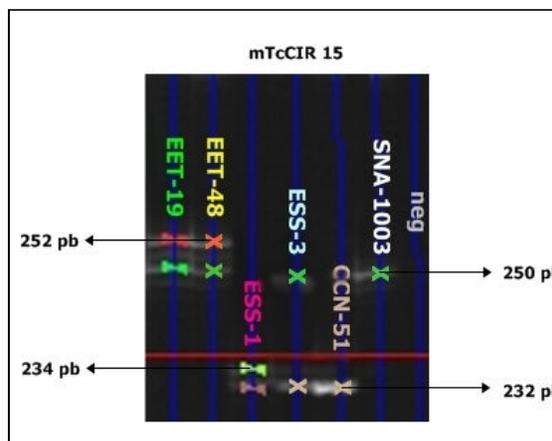
Los genotipos CCN-51 y JHVH 10 son heterocigotos, presentan los mismos alelos, el primer alelo (A1) se encuentra en el genotipo IMC-67 y un segundo alelo (A3) presente en todos los genotipos con excepción de los genotipos SNA 0409a, SA 16, SNA 1003 y EET-19. Los genotipos ESS son heterocigotos, presentan el alelo A3 y el alelo A2, con excepción de los genotipos ESS 3, ESS 6 y ESS 8, que son homocigotos para el alelo A3 (figura 4).

*Geles de poliacrilamida revelados por fluorescencia*

Para esta fase de la investigación se empleó únicamente los genotipos que mostraron bandas representativas para cada marcador así como los genotipos que mostraron dificultad en su

observación mediante los geles revelados con nitrato de plata.

Los genotipos EET-19, EET-48, ESS 1 y SNA 1003 con el marcador mTcCIR 15, mostraron dos bandas claramente bien definidas, con excepción del genotipo SNA 1003 que mostró una sola banda. En contraste con las bandas poco definidas que se obtuvieron con el revelado con nitrato de plata (figura 5).

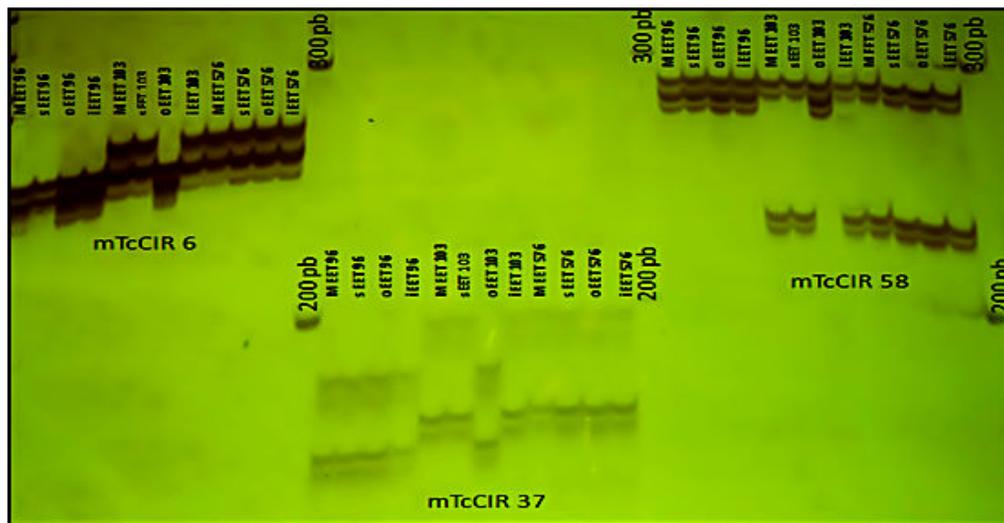


**Figura 5** Pesos moleculares asignados a alelos obtenidos de muestras de cacao, marcador mTcCIR 15.

La figura 5 muestra que los genotipos EET-48 y EET-19 comparten los mismos alelos de 252pb y de 250pb, de los cuales el último se encuentra presente en los genotipos SNA-1003 y ESS 3. El genotipo CCN 51 es homocigoto con un alelo de 232pb, el cual está presente también en los genotipos ESS 1 y ESS 3.

### Verificación de la estabilidad de los SSRs seleccionados

Para verificar la estabilidad de los marcadores microsatélites seleccionados se realizó corridas electroforéticas en geles de poliacrilamida revelados con nitrato de plata (figura 6) empleando los genotipos EET – 96, EET – 103 y EET – 576 obtenidos por diferentes formas de propagación asexual (injerto, embriogénesis somática y enraizamiento de estacas ortotrópicas).



**Figura 6** Gel de poliacrilamida, marcadores mTcCIR 6, 37 y 58, genotipos EET 96, 103 y 576. M = muestra tomada de las colecciones, S = muestra somática, O = muestra ortotrópica, I = muestra de planta injertada.

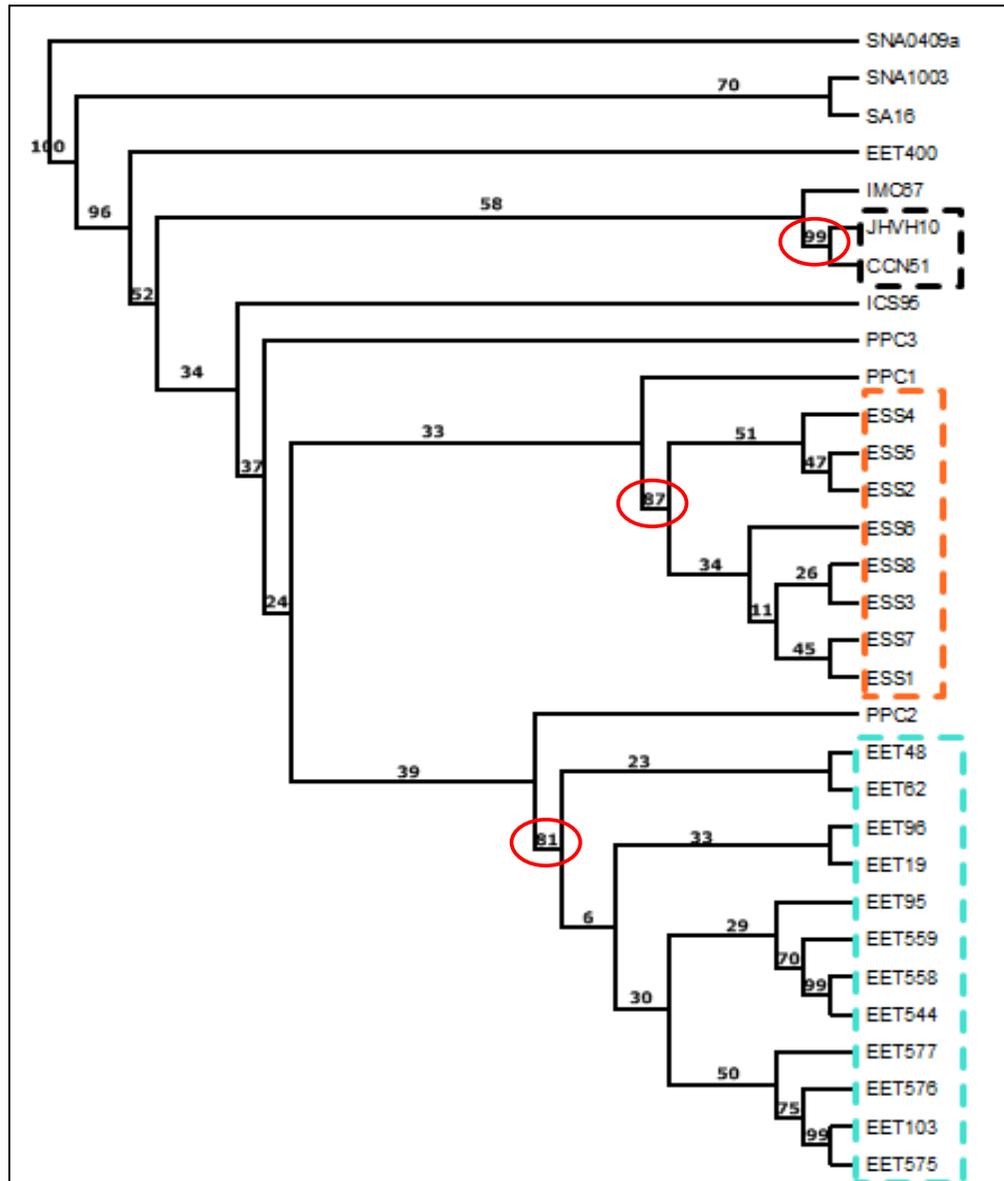
En la figura 6 se observa que las diferentes formas de propagación asexual pertenecientes a un mismo genotipo coinciden, con excepción de la muestra ortotrópica del genotipo EET – 103, que tiene bandas diferentes con respecto a las demás muestras del mismo genotipo. Con estos resultados se puede decir que los marcadores moleculares seleccionados diferencian genotipos fuera de tipo dentro de una accesión.

### Análisis de datos

#### *Análisis de agrupamiento*

El dendograma (figura 7), muestra un 81% una alta robustez estadística para la conformación

del grupo (EET) integrado por los genotipos EET con excepción del genotipo EET 400 que está completamente separado de los demás. Del mismo modo, con un 87% de probabilidad existe una alta robustez estadística para la formación del grupo (ESS) integrado por los ocho genotipos ESS. Finalmente con un 99% se estima la conformación de un pequeño grupo integrado por los genotipos CCN-51 y JHVH 10.



**Figura 7** Dendrograma del material de *Theobroma cacao* L. analizado en el presente estudio

#### *Análisis de coordenadas principales (ACoP)*

La figura 8 muestra el análisis ACoP con tres coordenadas dando lugar a la distinción de cinco grupos principales (A, B, C, D y E). El grupo A está conformado por los genotipos SNA 1003, SNA 0409a y SA-16, en el grupo B formado por los EET con excepción del genotipo EET-400, dentro de este grupo, el genotipo EET – 19 se encuentra un poco alejado de los demás EET

dentro del mismo grupo. El grupo C está formado por los genotipos ESS, y el grupo D formado por CCN, JHVH, ICS, IMC y EET – 400. Finalmente el grupo E lo conforman los genotipos PPC 1, PPC 2 y PPC 3.

Análisis de Coordenadas Principales Todos los genotipos Estudiados

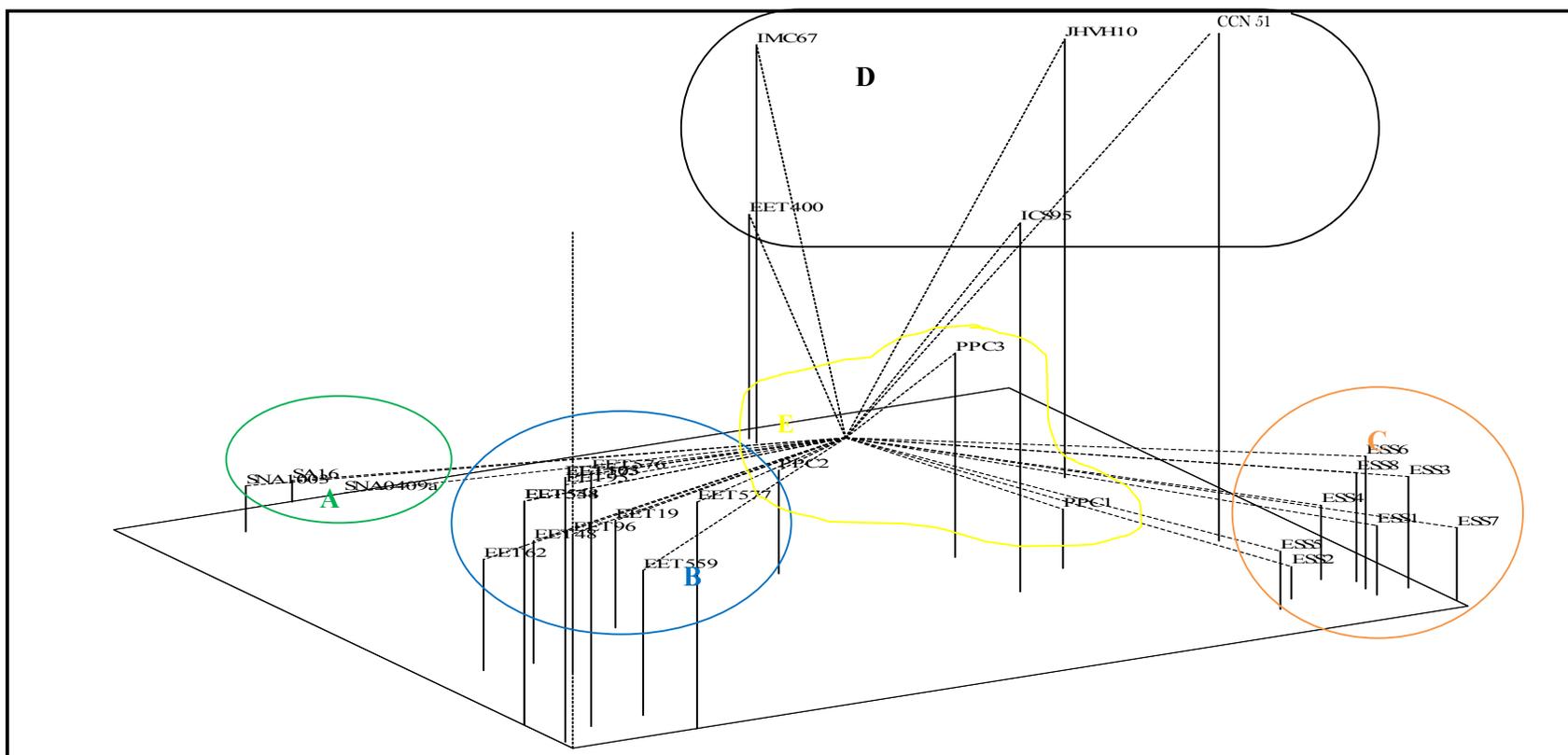


Figura 8 ACoP 3D de las muestras de cacao analizadas en este estudio. Grupos A, B, C, D y E.

### *Análisis molecular de varianza (AMOVA)*

El AMOVA realizado para todos los genotipos (Tabla 3) con los grupos A, B, C, D y E, mostró que el 20% de diversidad genética se debe a la diferenciación entre los 5 grupos, mientras que el 80% de la diversidad se debe a la diferenciación presente dentro de cada grupo. En el caso del grupo B, conformado por los genotipos EET, se observa mucha variación dentro del mismo.

**Tabla 3** Resumen del AMOVA.

Fuente de Variación	G L	Sum.C	CM	Com. Var	%
Entre Grupos (A, B, C, D y E)	4	36608	9152	714	20
Entre Individuos	26	25366	975	0	0
Dentro de Cada Grupo	31	86965	2805	2805	80
Total	61	148940		3519	10

### *Diversidad genética*

Con los resultados anteriormente expuestos del genotipaje, se procedió a realizar los análisis de diversidad genética que mostraron, un total de 77 alelos fueron revelados en toda la población estudiada con tamaños que oscilaron entre 128 – 346pb, se observó cuatro genotipos duplicados y no se obtuvieron datos perdidos.

Los parámetros de diversidad genética obtenidos en este estudio, donde el locus más polimórfico fue el analizado con el marcador mTcCIR 290 con 7 alelos y el menor fue el analizado con mTcCIR 1 con 2 alelos, el promedio de alelos por locus fue de 4,53. El locus analizado con mTcCIR 58 presenta mayor heterocigosidad esperada 0,79. La mayor heterocigosidad observada mostró los loci analizados con mTcCIR 6 y 26 con un valor de 0,97, se obtuvo un promedio general de 0,78. El valor más alto de PIC fue de 0,76 para el marcador mTcCIR 58 y un promedio de 0,57 para los marcadores empleados. El mayor número de combinaciones alélicas fueron 11 para mTcCIR 12 y mTcCIR 58, el menor para mTcCIR 1 con 2 y el promedio fue de 6,82.

La mayor frecuencia alélica fue 0,61 para el alelo mTcCIR 1 – 140. Este alelo se encontró presente en todos los genotipos analizados. La menor frecuencia alélica fue 0,02 para los alelos mTcCIR 11-301, mTcCIR 11-311, mTcCIR 12-202, mTcCIR 24-208, mTcCIR 290-159 y mTcCIR 290-169 presentes en el genotipo EET-400, mTcCIR 22-289 presente en el genotipo EET-48, mTcCIR 24-198 presente en el genotipo PPC3, mTcCIR 33-300 presente en el genotipo ICS 95, mTcCIR 37-159 y mTcCIR 290-163 presentes en el genotipo IMC 67 y mTcCIR 40-262 presente en el genotipo PPC1.

### *Análisis de alelos específicos y compartidos*

Al realizar el análisis de alelos específicos y compartidos se observó que existe un alelo específico para el genotipo EET-19 alelo de 289pb en el locus mTcCIR 22, con una frecuencia de 0,042. El alelo 206pb y el alelo 256pb del locus mTcCIR 58, está presente no solo en algunos de los genotipos EET sino también está presente en los genotipos SNA 1003, SNA 0409a y SA-16.

La Tabla 4 muestra las frecuencias alélicas presentes en el grupo EET y en el grupo de los otros genotipos estudiados. En base a estas frecuencias se eligió un grupo de marcadores que tengan mayor frecuencia alélica para el grupo de los genotipos EET recomendados y menor frecuencia para los demás genotipos estudiados. Además se realizó el análisis de alelos específicos y compartidos a cada uno de los genotipos EET recomendados. Con el propósito de obtener su identidad genética, se seleccionó y combinó un grupo de marcadores que presenten alelos para cada uno de los genotipos EET y que tengan menor frecuencia alélica en los demás genotipos EET recomendados.

**Tabla 4** Frecuencia alélica presente en el grupo de los EET y en los demás genotipos estudiados

Locus	Alelo	Grupo EET	Otros genotipos
<b>mTcCIR6</b>	221	0,077	0,250
	225	0,154	0,250
	235	0,462	0,139
	237	0,000	0,083
	247	0,308	0,278
<b>mTcCIR12</b>	187	0,038	0,250
	199	0,038	0,278
	204	0,423	0,111
	213	0,500	0,250
	222	0,000	0,111
<b>mTcCIR24</b>	192	0,500	0,639
	198	0,000	0,028
	202	0,000	0,111
	208	0,038	0,000
	245	0,462	0,222
<b>mTcCIR58</b>	206	0,192	0,111
	236	0,038	0,111
	248	0,000	0,333
	256	0,269	0,083
	258	0,000	0,139
	264	0,500	0,222

## DISCUSIÓN

La extracción de ADN de las muestras en estudio se realizó sin mayor dificultad, se observaron bandas de ADN con poca degradación, similar a los resultados obtenidos por Carranza *et al.* (2008) en su investigación con muestras foliares de cacao. Sin embargo, cabe recalcar que para obtener mejores resultados se debe incrementar una purificación con mini-columnas de sílica (Microbial, 2009), el tiempo de migración y el voltaje de la corrida electroforética. Según Espinosa (2000) para el voltaje recomienda utilizar 5 voltios por cada centímetro que exista entre los dos electrodos de la cámara de electroforesis. Para moléculas de alto peso molecular hace falta correrlas con voltajes muy pequeños, se puede correr el gel con un voltaje

mayor, pero esto puede afectar la resolución de las muestras (CIMMYT, 2004).

La concentración obtenida de ADN por espectrofotometría para los 31 individuos en este estudio varió desde 30,00ng/μL a 567,50ng/μL, con un promedio de 284,60ng/μL. La concentración obtenida en esta investigación es relativamente baja comparada con la concentración de 111 hasta 1802ng/μL que obtuvo Chia (2009) en sus investigaciones con 50 individuos de cacao.

La pureza del ADN obtenida por espectrofotometría varía de 1,47 hasta 2,19. Estos datos son similares a los obtenidos por Chia (2009) con valores de pureza que varían desde 1,20 hasta 2,39. CIMMYT (2004) menciona que, si esa relación es de 1,8-2,0, es probable que la absorción sea causada por los ácidos nucleicos. Una relación inferior a 1,8 indica que pueden existir proteínas y otros elementos absorbentes de UV en la muestra; en ese caso, es conveniente volver a precipitar el ADN. Una relación superior a 2,0 indica que las muestras pueden estar contaminadas con cloroformo o fenol y se debe volver a efectuar la precipitación con etanol.

Finalmente, al comparar los dos métodos de cuantificación: el método visual en gel de agarosa y el método por espectrofotometría se puede decir que el método más preciso es el método por espectrofotometría ya que no depende de la percepción del investigador.

En la amplificación se observó una buena resolución de bandas con tamaños entre 128 – 346pb, en los geles de poliacrilamida teñidos por nitrato de plata (Saunders *et al.*, 2004; Cryer, Fenn, Turnbull, & Wilkinson. 2005; Montilal *et al.*, 2008 e Irish *et al.*, 2010), a excepción del microsatélite mTcCIR 84 el cual no presentó una buena resolución en estos geles. En este estudio se excluyó este último marcador pese a que en estudios realizador por Montilal, Zhang,

Umaharan, Mischke, Boccara, & Pinney (2008), lo reportan como un marcador bastante polimórfico.

Para la mayoría los marcadores microsatélites corridos en geles de poliacrilamida, se observó que los genotipos **SNA 1003**, **SNA 0409a** y **SA 16** son homocigotos. Esta información concuerda con lo mencionado por Loor *et al.* (2009) donde señalan que los genotipos **SA 16**, **SNA 1003** mostraron un 90% de homocigocidad y el genotipo **SNA 0409a** mostró un 85% de homocigocidad.

El genotipo CCN 51 mostró ser heterocigoto para la mayoría de marcadores corridos. Además, posee alelos de sus progenitores IMC 67 e ICS 95, información que concuerda por lo descrito por Castro en 1981 (Stern, 2011), en donde se menciona que CCN 51 es el cruce de la F1 del IMC-67 x ICS-95 por O-1, y donde O-1 es una accesión de cacao colectada en valle de Canelos.

En cuanto a los genotipos denominados super árboles, más conocidos como ESS, se observó que comparten al menos uno de sus alelos entre todos los miembros de este grupo, por lo que se asume que están emparentados y posiblemente provienen de la misma madre. Esto también se observa en el dendograma y en el ACoP donde estos genotipos forman un grupo. Sin embargo, a estos genotipos se los puede diferenciar entre ellos con los marcadores empleados en este estudio. Investigando en el origen de los super árboles, de acuerdo a F. Amores, Líder del programa Nacional de cacao del INIAP (comunicación personal), se menciona que estos árboles son originarios de la Amazonía ecuatoriana y que además, poseen características fenotípicas similares y alta productividad.

El genotipo JHVH 10 comparte la mayoría de alelos con CCN-51 lo cual se ve reflejado en los análisis UPGMA y ACoP donde se ubicaron en un mismo grupo, por lo que se podría suponer su parentesco. De acuerdo a F. Amores

(comunicación personal), el genotipo JHVH 10 probablemente es originario de Milagro, una característica notoria de la mazorca es su coloración amarilla que lo podría confundir con un genotipo EET ó un genotipo Nacional. Los resultados de este estudio sugieren que el genotipo JHVH 10, no pertenece a los genotipos EET ni pertenece al cacao Nacional Fino de Aroma.

Los genotipos PPC comparten alelos con varios genotipos, poseen alelos de algunos SNA, poseen alelos de varios EET y alelos de ICS-95. Esto se observa también en el dendograma donde los tres genotipos se encuentran ubicados en diferentes partes del árbol. PPC2 se encuentra junto a los genotipos EET, PPC1 se encuentra junto a los genotipos ESS y PPC3 se encuentra junto a ICS 95. De acuerdo a D. Saquicela, Investigador del Programa de cacao de la EET-Pichilingue (comunicación personal), describe que los PPC provienen de una finca ubicada en Valle Hermoso, Provincia de Santo Domingo de los Tsachilas. Se menciona que estos árboles poseen diferencias morfológicas entre ellos. Frente a los resultados obtenidos en este estudio y las características fenotípicas antes mencionadas, se llegaría a suponer que estos genotipos no pertenecen al grupo de los EET, ni al grupo de los SNA.

Los genotipos EET comparten entre ellos ciertos alelos con excepción del genotipo EET-400 que muestra bandas muy diferentes. En el dendograma y en el ACoP estos genotipos se ubicaron dentro del mismo grupo excluyendo al EET-400. En este sentido, es necesario recordar que los genotipos: EET-19, EET-48, EET-62, EET-95, EET-96 y EET-103, pertenecen a la primera generación de clones recomendados por el INIAP (Vera, Suarez, & Mogrovejo, 1984) y que los genotipos denominados EET-544, EET-558, EET-575 y EET-576, son genotipos recomendados más recientes (INIAP EET-Pichilingue, 1995). El origen de esta diferencia genética probablemente fueron las múltiples

recombinaciones genéticas naturales que debieron darse con el paso de los años.

Las características fenotípicas de los clones recomendados también revelan, diferencias y similitudes entre ellos como: el color del fruto inmaduro, forma del fruto, el tamaño de las hojas, color del nuevo brote, características de los órganos reproductivos, entre otras (Enríquez & Soria, 1967; Vera *et al.*, 1984; Soria & Enríquez, 1981; García, 2007). Toda esta diversidad mostrada a través de características fenotípicas va de acuerdo con la dispersión de genotipos EET observada en el ACoP del grupo B y concuerda con el porcentaje de diversidad presente entre los miembros de cada grupo, expresado en el AMOVA.

El genotipo EET-400 como se mencionó antes se encuentra completamente separado de los demás EET. En el dendograma y en el ACoP este genotipo se lo encuentra cercano al IMC 67. En las investigaciones realizadas por Irish *et al.* (2010) y Montilal *et al.* (2008) con SSRs en cacao, también, se puede observar esta cercanía, además según Enríquez & Soria (1967) y Soria & Enríquez (1981), al genotipo EET-400 lo describen como un híbrido de la variedad Amazónica forastera, descendencia de Silecia 1, que confirmaría los resultados obtenidos en esta investigación.

En este estudio se obtuvieron dos resultados bastante singulares, el primero involucra a los genotipos EET-544 y EET-558 y el segundo a los genotipos EET-575 y EET-103. En ambos casos estos genotipos mostraron perfiles genéticos idénticos, por lo que se supondría desde el punto de vista genético, que estos clones son simplemente replicas exactas. Sin embargo, quedaría abierta la posibilidad de posibles errores en el manejo de estos materiales en campo (mal etiquetamiento), dentro de la misma accesión en la colección CGN de la EET-Pichilingue, cosa extrañamente posible a pesar de que se tomó dos plantas de diferentes posiciones de la misma accesión.

Ante estos casos se plantean posibles razones que explican el resultado obtenido. Primeramente, los marcadores SSR empleados en la presente investigación coinciden en su mayoría con los marcadores reportados en investigaciones como las realizadas por Zhang *et al.* (2007) quienes mencionan que es posible utilizar 15 marcadores SSRs en cacao para diferenciar genotipos, identificar accesiones mal etiquetadas y cuantificar la diversidad genética con un gran número de accesiones. Turnbull y sus colaboradores (2004) afirman que los 15 microsatélites empleados en su investigación poseen suficiente poder estadístico para identificar cultivos de cacao, por lo tanto el uso de 17 SSRs debió ser suficiente para poder diferenciar entre las 31 accesiones analizadas en este estudio. Otra alternativa es la señalada por Zhang, Mischke, Johnson, Phillips-Mora, & Meinhardt (2008), quienes mencionan que el empleo de 15 SSRs no es suficiente para distinguir clones estrechamente relacionados. Estos autores sugieren que existen casos excepcionales que pueden presentar mutaciones puntuales no detectables por SSRs, y que causan cambios fenotípicos como cambio de color de la semilla o vaina. Esta podría ser la explicación por la cual no se pudo diferenciar entre los genotipos EET-544 y EET-558.

Un factor importante que se debería tomar en cuenta es la Epigenética, la cual es el estudio de los cambios en la función de los genes que son heredables, sin modificación en la secuencia del ADN y que pueden ser reversibles concuerda por lo descrito por Waddington en 1939 (Cruz, 2012). En otras palabras la epigenética se basa en la existencia de un nivel de regulación de la expresión génica que no implica cambios en la secuencia del DNA y que puede perdurar durante una o más generaciones (Lewin, 2008; Sánchez & Lamas, 2011). Un ejemplo de esto se muestra en la investigación realizada de cacao por Cryer & Wilkinson (2006) donde las diferentes condiciones ambientales de crecimiento influyen en la forma de metilación de los nucleótidos del

ADN, forma más común de modificación epigenética.

Parte de los locus microsátelites obtenidos en esta investigación fueron comparados con los locus provistos de la base de datos International Cocoa Germoplasm Database (ICGD), la cual recopila información relacionada con marcadores moleculares aplicados a cacao (Cryer, Fenn, Charters, & Wilkinson, 2003; Irish, *et al.*, 2010 & Zhang 2010a, 2010b), donde se obtiene coincidencias y semejanzas para más de la mitad de los locus microsatelite presentados en esta investigación. Además, se los comparó también con la base de datos provista por Looor (2007), donde se encuentran varias semejanzas.

Al realizar el análisis de alelos específicos, se esperaba encontrar por lo menos un alelo que estuviera presente sólo en el grupo de los genotipos EET (con excepción del genotipo EET-400) y ausente en los demás genotipos estudiados, pero esto no ocurrió ya que se observó la existencia de un alelo específico para el grupo de los EET (alelo de 289pb para el locus mTcCIR 22). La baja frecuencia (0,042), en cada uno significó que este alelo no se encuentra presente en todos los genotipos que conforman el grupo de los EET y solo está en el genotipo EET-19, por estos motivos y en base a frecuencias alélicas, se seleccionó un grupo de marcadores para diferenciar al grupo de los EET, de los demás.

Existen alelos presentes en algunos genotipos EET, así como en los genotipos SNA 1003, SNA 0409a y SA-16, lo cual evidencia que los genotipos EET descienden de cacao Nacional ya que comparten alelos con los genotipos Sabor Nacional Arriba.

Al momento de comparar el perfil genético entre plantas madres, somáticas, ortotrópicas e injertos, la planta del genotipo EET-103 ortotrópica se observó diferencias en su perfil genético. Al parecer presentó el perfil genético del genotipo EET-96. Esto se debe probablemente a que la

planta del genotipo EET-103 ortotrópica estuvo mal etiquetada ó que probablemente se dio un error en el proceso del análisis en el laboratorio, por ello se comprobó volviendo a repetir el análisis a la misma planta y a otras plantas ortotrópicas cercanas, mostrando que efectivamente la planta ortotrópica inicial estuvo mal etiquetada en el invernadero. Finalmente, cabe destacar que, con los resultados mostrados la técnica empleada es válida para diferenciar entre varios genotipos de una misma accesión, por lo que se podría emplearla en procesos futuros de discriminación de genotipos EET.

En conclusión, se logró establecer la identidad genética de los genotipos comerciales de cacao Nacional con el empleo de 17 marcadores moleculares microsátelites, se encontró un alelo específico para el genotipo EET-19, alelo 289pb para el marcador mTcCIR 22. Finalmente los marcadores microsátelites seleccionados para diferenciar al grupo de genotipos EET recomendados de otros genotipos empleados en este estudio son: mTcCIR 6, mTcCIR 12, mTcCIR 24 y mTcCIR 58, los cuales permitieron identificar plantas fuera de tipo propagadas por diferentes formas de propagación asexual ya que los SSR presentan estabilidad.

## **AGRADECIMIENTOS**

Un especial agradecimiento a la Escuela Politécnica del Ejército, Carrera de Ingeniería en Biotecnología y al Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias.

## **BIBLIOGRAFÍA**

- Amores, F., Agama, J., Mite, F., Jiménez, J., Looor, G. & Quiróz, J. (2009c). *EET-544 y EET-558 Nuevos Clones de Cacao Nacional para la Producción Bajo Riego en la Península de Santa Elena. Boletín Técnico No. 134*. Quevedo: INIAP.
- Carranza, M., Motte, E., Cedeño, V., Cevallos, O., Saucedo, S. & Canchignia, H. (2008) Estudio de

- la Diversidad Genética de 20 Accesiones de Cacao (*Theobroma cacao* L.) Mediante AP-PCR de la Colección del Centro del Cacao de Aroma Tenguel en la Finca Experimental La Buseta. *Ciencia y Tecnología* (1), pp. 1-5.
- Chakraborty, R., Meagher, T. & Smouse, P. (1988). Parentage analysis with genetic markers in natural populations. *Genetics*, 118 (3). Recuperado de <http://www.genetics.org/cgi/-reprint/118/3/527.pdf>
- Chia, J. (2009). *Caracterización molecular mediante marcadores ISSR de una colección de 50 árboles clonales e híbridos de cacao (Theobroma cacao L.) de la UNAS-Tingo María*. (Tesis de Maestría). UNAS, Tingo María, PR.
- CIMMYT (Centro internacional de mejoramiento de maíz y trigo). (2004). Protocolos del Laboratorio, Laboratorio de genética molecular aplicada. *CIMMYT*. Recuperado de <http://apps.cimmyt.org/spanish/docs/manual/protocols/LabgeneticaMolecular.pdf>
- Cruz, J. (2012). Epigenética y Psiquiatría. *Slide Share*. Recuperado de <http://www.slideshare.net/-drjlcruzflores/epigenetica>
- Cryer, N. & Wilkinson, M. (2006). Detección de Modificación Epigenética en el Cacao. *Centro agronómico tropical de investigación y enseñanza*. Recuperado de [http://web.catie.ac.cr/-disco\\_cacao/espanol/3sesion.pdf](http://web.catie.ac.cr/-disco_cacao/espanol/3sesion.pdf)
- Cryer, N., Fenn, M., Charters, Y. & Wilkinson, M. (2003). Allele size data for SSR primers generated from germplasm held at University of Reading Intermediate *Cocoa Quarantine*. *International Cocoa Genome Database*.
- Cryer, N., Fenn, M., Turnbull, C. & Wilkinson, M. (2005). Allelic size standards and reference genotypes to unify international cocoa (*Theobroma cacao* L.) microsatellite data. *World Cocoa Foundation*. Recuperado de <http://www.worldcocoafoundation.org/scientificresearch/researchlibrary/documents/Cryer2006.pdf>
- Doyle, JJ. & Doyle, JL. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Norwich*. Recuperado de <http://irc.igd.cornell.edu/Protocols/DoyleProtocol.pdf>
- Enriquez, G. & Soria, J. (1967). *Cacao Cultivars Register*. Turrialba: IICA.
- Espinosa, L. (2000). Guía práctica sobre la técnica de PCR. *INE*. Recuperado de <http://www2.ine.gob.mx/publicaciones/libros/530/cap17.pdf>
- Faleiro, FG., Araújo, IS., Bahia, R., Santos, RF., Yamada, MM. & Anher, D. (2002). Otimização da extração e amplificação de dna de *Theobroma cacao* L. visando obtenção de marcadores RAPD. *Centro de Investigaciones en Cacao*. Recuperado de <http://www.ceplac.gov.br/Agrotropica/volume%2014%20n2-/artigo%202.pdf>
- García, L. (2007). *Identificación de Cultivares de Cacao Guía de Campo*. Tingo María: ACDI/VOCA-Perú.
- INIAP EET-Pichilingue (Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias Estación Experimental Tropical Pichilingue). (1995). *Informe Anual Técnico 1994*. Quevedo: INIAP.
- Irish, B. M., Goenaga, R., Zhang, D., Schnell, R., Brown, J. S. & Motamayor, J. C. (2010). Microsatellite Fingerprinting of the USDA-ARS Tropical Agriculture Research Station Cacao (*Theobroma cacao* L.) Germplasm Collection. *Crop Science* (50), pp. 656 - 667.
- Lewin, B. (2008). *Genes IX*. Mexico: Mc Graw Hill.
- Liu, Z. & Cordes, J. (2004). DNA marker technologies and their applications in aquaculture: genetics *Genetics*. Recuperado de <http://www.sciencedirect.com/science?ob=Article>

- Liu, K. & Muse, S. (2005). Power Marker: Integrated analysis environment for genetic marker data. *Bioinformatics*, 21 (9), pp. 2128-2129.
- Loor, G. (2002). *Caracterización morfológica y molecular de 37 clones de cacao (Theobroma cacao L.) Nacional de Ecuador*. (Tesis de Maestría). Montecillo, MX.
- Loor, R. G. (2007). *Domesticación del cacao Theobroma cacao L. variedad Nacional del Ecuador. Identificación de la variedad nativa Nacional y sus ancestros salvajes*. (Tesis Doctorado). Montpellier, FR.
- Loor, R. G., Risterucci, A., Courtois, B., Fouet, O., Jeanneau, M., Rosenquist, E., Amores, F., Vasco, A., Medina, M. & Lanaud, C. (2009). Tracing the native ancestors of the modern *Theobroma cacao* L. population in Ecuador. *Tree Genetics & Genomes*, pp. 421 – 433.
- López, W. (2010). *Diagnóstico Técnico del Cultivo de cacao en Ecuador*. Bahía: CEPLAC.
- Microbial. (2009). La extracción y purificación del ADN para el análisis por PCR. *Microbial-systems*. Recuperado de [http://www.microbial-systems.com/web/docs/Newsletter\\_Microbial\\_03.pdf](http://www.microbial-systems.com/web/docs/Newsletter_Microbial_03.pdf)
- Montilal, A., Zhang, D., Umaharan, P., Mischke, S., Boccara, M. & Pinney, S. (2008). Increasing Accuracy and Throughput in Large-Scale Microsatellite Fingerprinting of Cacao Field Germplasm Collections. *World Cocoa foundation*. Recuperado de <http://www.worldcocoa-foundation.org/scientificresearch/researchlibrary/documents/Motilal2008.pdf>
- Morillo, E. & Miño, G. (2009). *Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias Estación Experimental Santa Catalina Departamento Nacional de Biotecnología: Protocolos de Marcadores Moleculares*. Quito: INIAP.
- Page, R. (2008). TreeView 1.6.1.6. *Taxonomy*. Recuperado de <http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>
- Peakall, R. & Smouse, P.E. (2006) GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, (6), pp. 288-295. Recuperado de <http://www.anu.edu.au/BoZo/GenALEX/>
- Promega Corporation. (2008). *Go Taq Flexi DNA Polymerase*. Catalog # M8295 . Madison, USA: Promega.
- Rohlf, J. (2002). Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System Version 2.1. *Department of Ecology and Evolution State University of New York*.
- Sánchez, S. & Lamas, M. (2011). Epigenética: Un nuevo lenguaje, un nuevo destino. *El Residente*, pp. 105-110.
- Saunders, A., Mischke, S. & Hemeida, A. (2001). USDA DNA Fingerprinting programme for identification of *Theobroma cacao* Accessions. *International Workshop on New Technologies and Cocoa Breeding*. pp.108-114.
- Saunders, A., Mischke, S., Leamy, E. & Hemeida, A. (2004). Selection of international molecular standards for DNA fingerprinting of *Theobroma cacao*. *World Cocoa Foundation*. Recuperado de <http://www.worldcocoafoundation.org/scientific-research/researchlibrary/pdf/-Saunders04.pdf>
- Scheffe, L. (2008). How to Collect and Interpret plant Tissue Samples. *USDA*. Recuperado de [http://www.nm.nrcs.usda.gov/technical/handbook/s/iwm/NM\\_IWM\\_Field\\_Manual/Section05/5dHow\\_to\\_Collect\\_and\\_Interpret\\_Plant\\_Tissue\\_Samples.pdf](http://www.nm.nrcs.usda.gov/technical/handbook/s/iwm/NM_IWM_Field_Manual/Section05/5dHow_to_Collect_and_Interpret_Plant_Tissue_Samples.pdf)
- Soria, J. & Enríquez, G. (1981). *International Cacao Cultivar Catalogue*. Turrialba: ACRI.
- Stern, J. (2011). The History of CCN-51 en Ecuador. *Education & Training*. Recuperado de

<http://jeffreygstern.com/ecuadorian-cacao-varieties/the-history-of-ccn-51/>

Surzycki, S. (2000). *Basic Techniques in Molecular Biology*. Springer.

Turnbull, C., Butler, D., Cryer, N., Zhang, D., Lanaud, C., Daymond, A., Ford, C., Wilkinson, M. & Hadley, P. (2004). Tracking Mislabelling in Cocoa Germoplasm Collections. *Ingenic Newsletter*, pp. 8-11.

United States department of Agriculture. (2012). Plants Profile. *USDA*. Recuperado de <http://plants.usda.gov/java/profile?symbol=thca>

Vera, J., Suarez, C. & Mogrovejo, E. (1984). *Descripción técnica de algunos híbridos y clones de cacao recomendados por el Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP). Comunicación Técnica No 12*. Quevedo: Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias.

Zhang, D., Boccara, M., Motilal, L., Butler, D., Umaharan, P., Mischke, S. & Meinhardt, L. (2007). Microsatellite Variation and Population Structure in the "Refractario" Cacao of Ecuador. *Springer*. Recuperado de <http://www.springerlink.com/content/67104k542g83u76v/>

Zhang, D., Mischke, S., Johnson, E. S., Phillips-Mora, W. & Meinhardt, L. (2008). Molecular characterization of an international cacao collection using microsatellite markers. *World Cocoa Foundation*. Recuperado de <http://www.worldcocoafoundation.org/scientificresearch/researchlibrary/documents/Zhang2008G.pdf>

Zhang, D. (2010a). Microsatellite profiles for cocoa accessions held at ICG,T. *International Cocoa Genome Database*.

Zhang, D. (2010b). Microsatellite profiles for cocoa accessions held at CATIE (Caboria farm). *International Cocoa Genome Database*.