

Detección de mezcla de semillas de cacao CCN-51 en las de tipo Nacional mediante marcadores SSRs

D. A. Jarrín*

*Correspondencia E-mail: dajarrin@espe.edu.ec

Resumen

El objetivo de este trabajo fue encontrar diferencias genéticas usando marcadores SSRs para identificar semillas del genotipo CCN-51 en un lote de cacao Nacional. Se analizó un total de 44 fincas productoras de cacao Tipo Nacional y 19 de CCN-51, provenientes de distintas zonas de las provincias de Los Ríos, Bolívar, Cotopaxi y Guayas. Se probaron tres métodos de extracción de ADN en almendras y se seleccionó el protocolo de Doyle & Doyle (1987) modificado por Faleiro (2002). Se amplificó cada muestra con ocho SSRs y se corrió en geles de poliacrilamida. No se encontraron alelos exclusivos para CCN-51; pero entre los alelos pertenecientes a este genotipo, dos mostraron una baja frecuencia en el de tipo Nacional (mTcCIR 58 – 258 y mTcCIR 12 - 199). En las muestras de tipo Nacional se encontraron once alelos específicos. La probable presencia de alelos de CCN-51 en las fincas de tipo Nacional fue detectada. Las introgresiones que ha sufrido el cacao Nacional probablemente representen una dificultad para el desarrollo de este modelo, sin embargo los datos obtenidos apoyan la hipótesis de que es posible la separación de cacaos tipo Nacional y CCN-51.

Palabras claves: Nacional, CCN-51, ADN, marcadores moleculares.

INTRODUCCIÓN

La especie *Theobroma cacao L.* es considerada como el producto agrícola de mayor incidencia en la historia del Ecuador, debido a su relevancia histórica, contribución al desarrollo social, económico y político. Es reconocido mundialmente por sus características organolépticas de sabor y aroma que lo distingue de otros cacaos producidos internacionalmente (Amores et al., 2007).

En la actualidad más del 90 % de las unidades productivas corresponde al denominado complejo Nacional, con reconocimiento internacional como cacao fino o de aroma (Enríquez, 2003). El resto de la producción, se considera estar integrada por la variedad clonal CCN-51, la misma que debido a sus atributos especiales (almendras grandes, peso, maduración rápida, entre otros), viene siendo utilizada para mezclas con el cacao Nacional, con el fin de mejorar la calidad física y en consecuencias mejorar el precio y además ofrecer más producto. Sin embargo el CCN-51 no proporciona la misma calidad organoléptica que

el cacao Nacional ya que pertenece a los denominados cacaos ordinarios. La mezcla con CCN-51 ha empezado a descontrolarse llegando a grandes proporciones por parte de los actores de la cadena del cacao y por ende a mermar significativamente la calidad del grano, lo cual provoca malestar entre los países consumidores e industriales del chocolate fino (International Cocoa Council's, 2001).

Una posible herramienta para la identificación de variedades, finas o de aroma, es el "finguerprinting" de ADN. Actualmente, en cacao se encuentran disponibles una gran cantidad de marcadores microsatélites (Lanaud et al. 1999; Risterucci et al. 2000; Pugh et al. 2004); que permiten la discriminación de grupos genéticos. Se conoce que los marcadores microsatélites permiten la identificación entre los distintos genotipos de cacao (Saunders et al., 2004). Es por esto que la presente investigación busca determinar los marcadores moleculares que permitan la separación objetiva y eficaz de lotes de cacao fino del cacao ordinario CCN-51.

METODOLOGÍA

Material vegetal. Las semillas de cacao fueron colectadas de fincas ubicadas en varias localidades cacaoteras de la zona Central del Litoral. Las almendras fueron fermentadas y secadas por los propietarios de cada una de las fincas. En total fueron estudiadas 44 fincas del

complejo Nacional y 19 de CCN-51. Además, se usó ADN de tres genotipos como controles: IMC-67 e ICS-95 procedentes de la Estación Experimental Tropical Pichilingue y CCN-51 de la hacienda las Cañas. La procedencia de los materiales ensayados se enlista en la Tabla 1.

Tabla 1. Fincas cacaoteras usadas para la identificación de marcadores moleculares para la discriminación de mezclas de cacao tipo Nacional y CCN-51.

Tipo Nacional				CCN-51	
Finca	Procedencia	Finca	Procedencia	Finca	Procedencia
12	El Tambo, Bolívar	87	El Empalme, Guayas	2	Las Naves, Bolívar
13	Babahoyo, Los Ríos	88	El Empalme, Guayas	8	Babahoyo, Los Ríos
14	Babahoyo, Los Ríos	89	El Empalme, Guayas	15	Caluma, Bolívar
20	Quinsaloma, Los Ríos	90	El Empalme, Guayas	24	Quinsaloma, Los Ríos
21	Quinsaloma, Los Ríos	112	Quevedo, Los Ríos	30	Moraspungo, Cotopaxi
26	Moraspungo, Cotopaxi	118	Mocache, Los Ríos	32	Moraspungo, Cotopaxi
40	Quinsaloma, Los Ríos	138	Las Naves, Bolívar	38	Quinsaloma, Los Ríos
43	Caluma, Bolívar	141	Mocache, Los Ríos	41	Quinsaloma, Los Ríos
45	Caluma, Bolívar	146	Babahoyo, Los Ríos	117	Mocache, Los Ríos
48	Caluma, Bolívar	151	Moraspungo, Cotopaxi	136	Las Naves, Bolívar
50	Caluma, Bolívar	180	Quevedo, Los Ríos	153	Moraspungo, Cotopaxi
53	Vinces, Los Ríos	196	Las Naves, Bolívar	164	Valencia, Los Ríos
55	Vinces, Los Ríos	199	Quevedo, Los Ríos	178	Moraspungo, Cotopaxi
57	Vinces, Los Ríos	232	Vinces, Los Ríos	189	Quinsaloma, Los Ríos
60	La Maná, Cotopaxi	234	Caluma, Bolívar	272	El Empalme, Guayas
61	La Maná, Cotopaxi	248	Caluma, Bolívar	283	Echandía, Bolívar
62	La Maná, Cotopaxi	260	Buena Fe, Los Ríos	280	El Empalme, Guayas
63	Buena Fe, Los Ríos	264	Buena Fe, Los Ríos	290	Buena Fe, Los Ríos
66	Buena Fe, Los Ríos	267	El Empalme, Guayas	294	Buena Fe, Los Ríos
67	Buena Fe, Los Ríos	278	El Empalme, Guayas	IMC-67 *	EET-P
68	Quevedo, Los Ríos	279	El Empalme, Guayas	ICS-95 *	EET-P
73	Ventanas, Los Ríos	286	Ventanas, Los Ríos	CCN-51 *	Hda. Las Cañas
78	Mocache, Los Ríos				

Las muestras de Nacional pertenecen a una de las zonas de mayor producción de la región central del país, que comprende principalmente la provincia de Los Ríos. *Controles.

Se evaluarán tres métodos de extracción para determinar cual permite obtener ADN idóneo para ser amplificado por la técnica PCR. Los protocolos evaluados fueron: el desarrollado por Doyle & Doyle (1987) y modificado por Faleiro et al., (2002), el implementado por Bayer Crop-Science (2008) y el protocolo de extracción

expuesto por Colombo et al., (1998). La visualización del ADN se realizó en geles de agarosa 1% y la cuantificación se realizó en un espectrofotómetro HITACHI U-2900. Todas las muestras fueron diluidas para obtener una concentración de $\approx 5 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$.

Microsatélites y Amplificación por la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Los microsatélites usados en este estudio fueron previamente reportados por (Lanaud et al., 1999;

Pugh et al., 2004). Inicialmente 19 pares de iniciadores fueron usados, pero solo 8 fueron revelados con éxito. Los microsatélites ensayados se enlistan en la Tabla 2.

Tabla 2. Marcadores microsatélites SSRs propuestos como candidatos para la discriminación de mezclas entre el tipo Nacional y CCN-51.

Nombre	Crom.	Tamaño (pb)	Secuencia primer	Tm (°C)	Motivo
mTcCIR 1	8	128-146	PF GCAGGGCAGGTCCAGTGAAGCA PR TGGGCAACCAGAAAACGAT	51	(CT) ₁₄
mTcCIR 6	6	224-253	PF TTCCCTCTAAACTACCCTAAAT PR TAAAGCAAAGCAATCTAACATA	46	(TG) ₇ (GA) ₁₃
mTcCIR 7	7	148-163	PF ATGCGAATGACAACCTGGT PR GCTTTCAGTCCTTTGCTT	51	(GA) ₁₁
mTcCIR 8	9	290-307	PF CTAGTTTCCCATTTACCA PR TCCTCAGCATTTTCTTTC	46	(TC) ₅ TT(TC) ₁₇ TTT(CT) ₄
mTcCIR 11	2	286-321	PF TTTGGTGATTATTAGCAG PR GATTTCGATTTGATGTGAG	46	(TC) ₁₃
mTcCIR 12	4	165-256	PF TCTGACCCCAAACCTGTA PR ATTCCAGTTAAAGCACAT	46	(CATA) ₄ N ₁₈ (TG) ₆
mTcCIR 15	1	234-263	PF CAGCCGCCTCTGTGATG PR TATTTGGGATTCTTGATG	46	(TC) ₁₉
mTcCIR 22	1	276-301	PF ATTCTCGCAAAAACCTTAG PR GATGGAAGGAGTGAAAATAG	46	(TC) ₁₂ N ₁₄₆ (CT) ₁₀
mTcCIR 24	9	186-207	PF TTTGGGGTGATTCTTCTGA PR TCTGTCTCGTCTTTTGGTGA	46	(AG) ₁₃
mTcCIR 26	8	285-310	PF GCATTCATCAATACATTC PR GCACTCAAAGTTCATACTAC	46	(TC) ₉ C(CT) ₄ TT(CT) ₁₁
mTcCIR 33	4	265-348	PF TGGGTTGAAGATTGGT PR CAACAATGAAAATAGGCA	51	(TG) ₁₁
mTcCIR 37	10	136-187	PF CTGGGTGCTGATAGATAA PR AATACCCTCCACACAAAT	46	(GT) ₁₅
mTcCIR 40	3	259-288	PF AATCCGACAGTCTTAAATC PR CCTAGGCCAGAGAATTGA	51	(AC) ₁₅
mTcCIR 60	2	190-218	PF CGCTACTAACAACATCAAAA PR AGAGCAACCATCACTAATCA	51	(CT) ₇ (CA) ₂₀
mTcCIR58	9	208-324	PF TTTTTGGTGATGGAACAT PR TGGTTAAGCAACACTAAACT	51	(GT) ₄₀
mTcCIR84	1	136	PF CATGGGACGCTGCCT PR CTCTTATTAATGAATTCTCT	51	(GA) ₁₁
mTcCIR225	8	302	PF AAGACAAAGGGAAGAAGA PR AGGGGAAGAGCAAATC	51	(TC) ₁₀
mTcCIR230	2	231	PF GTGGAAGCCTTATGATTATGT PR ATTTATGCCCATGCAGAC	51	(CT) ₈
mTcCIR290	6	175	PF AGCGAGAGACAAAGATAAT PR GACTGAAATGGTGGTAAAG	51	(CT) ₁₉ CACC (CA) ₁₈

Posiciones, tamaños esperados, secuencias, Tm: temperaturas de anillamiento y motivos de los iniciadores empleados.

La amplificación por PCR fue llevada a cabo en un volumen total de 7.5 μL , conteniendo 1.33 ng $\cdot \mu\text{L}^{-1}$ de ADN genómico. Todas las reacciones contuvieron 0.066 U $\cdot \mu\text{L}^{-1}$ GoTaq DNA polymerase (Promega), 0.253 mM dNTPs, 0.5 μM de cada iniciador “forward” y “reverse”, 2 mM de MgCl₂ y 1X Green Go Taq flexi buffer

(Promega). El programa del termociclador consistió de lo siguiente: 4 min de denaturación a 94 °C, seguido por 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 45 s, 1 min de anillamiento a la temperatura establecida para cada primer, 2 min de extensión a 72 °C, con una extensión final a 72 °C de 5 min y un último paso de 10 min a 5 °C.

Electroforesis. La electroforesis fue realizada en geles de poliacrilamida y revelados con Nitrato de Plata. Las muestras fueron preparadas previamente para la electroforesis añadiendo 4 μL de blue stop (Morillo & Miño, 2009), entonces se denaturó a 94 °C por 5 minutos y se conservó a 75 °C en un Mastercycler® (5333 Eppendorf). Se colocaron 4 μL de amplificado y se corrió a 1800 V a 60 °C por 4 horas. Para un determinado número de muestras se empleó un sistema de detección por fluorescencia infrarroja, el analizador LI-COR 4300 (DNA43-0626) y el resultado fue analizado por software SAGA_{GT} versión 3.3 (LI-COR Biosciences, 2009) para la asignación de alelos y determinación del tamaño de los fragmentos.

Análisis. Se determinó el número de alelos coincidentes entre las fincas de cacao tipo Nacional, CCN-51 y los controles (CCN-51, IMC-67, ICS-95). Además se analizó la frecuencia de alelos y el número de alelos privados y compartidos entre las fincas con el software GenALEX (Peakall et al., 2006). Los datos fueron codificados en notación binaria, presencia (1)/ausencia (0), dispuestos en una matriz de tallas alélicas para calcular las distancias genéticas mediante los alelos compartidos. Se usó el método de agrupamiento UPGMA basado en la distancia de alelos compartidos mediante el software Power Marker 3.25 (Lui y Muse, 2005) y Treeview 1.6.6 (Page, 2001), para construir el dendrograma y apreciar las relaciones genéticas existentes. Se realizó una validación del árbol obtenido mediante el test bootstrap y mediante software Phylip 3.67 (Felsenstein, 1993) se obtuvo el árbol consenso. El análisis ACoP se realizó con el software NTSYS-PC 2.0 (Rohlf, 2002) mediante el cálculo de la matriz de similitud con el coeficiente SM (Simple Matching). El análisis de la estructura poblacional se realizó con el software Structure 2.3.3 (Pritchard et al., 2000) para determinar la formación de subgrupos poblacionales. Se utilizó la información previa del estatus de colecta, es decir, si pertenece a una finca del tipo Nacional o CCN-51, más no se consideró la ubicación geográfica. El análisis consistió en 10^5 períodos de prueba y una longitud de corrida de 10^6 réplicas, asumiendo que las frecuencias alélicas en cada población fueron independientes, $\lambda = 1$. Se realizaron tres

corridas independientes para cada valor de K (número de subpoblaciones) de 2 a 10, para posteriormente comparar las probabilidades posteriores de K (estrictamente hablando el $\text{Ln Pr}(X|K)$) y tomar el mayor valor promedio de las probabilidades estimadas.

RESULTADOS

Extracción y Cuantificación de ADN. Los protocolos mostraron un ADN de bajo rendimiento y calidad. Sin embargo el método de extracción de ADN desarrollado por Doyle & Doyle (1987) fue el mejor y fue usado para la extracción de las muestras de semillas.

Nivel de Polimorfismo. El genotipage de los productos de amplificación mostraron patrones de difícil lectura y monomórficos por lo que varios marcadores tuvieron que ser descartados reduciéndose a 8 los marcadores empleados en este estudio. Se contabilizaron un total de 44 bandas microsatélites para los 66 muestras de las poblaciones de cacao Nacional, Trinitario y CCN 51. Todos los marcadores mostraron ser polimorfismo con tamaños de fragmentos de amplificación que oscilaron entre 139 a 346 pares de bases. El rango de diferenciación alélica entre alelos fue de 2 a 72 pb. A nivel de diversidad alélica, el loci que presentó mayor variabilidad fue el mTcCIR 37 con siete alelos mientras que el mTcCIR 7 fue el que presentó menor variabilidad con cuatro alelos con un promedio de 5.5 alelos/locus.

En la figura 1 se muestra el número de alelos compartidos de CCN-51 con cada una de las muestras de cacao tipo Nacional. El número total de los alelos encontrados en el control de CCN-51 fue de 14 y la coincidencia de estos en las fincas del tipo Nacional fue de 6 a 14. Las fincas 14 y 141 resultaron tener la mayor coincidencia, mientras que la finca 286 tuvo el menor número de coincidencias. En otras muestras, la presencia de alelos de CCN-51 fue de 13 alelos para la finca 63, 12 para la finca 13 y entre 7 a 11 para el resto de la población. En la figura también se muestra la distribución de alelos de los genotipos controles (IMC-67 e ICS-95) que no pertenecieron a CCN-51, en donde se observó una mayor presencia de alelos de IMC-67, de 3 a 6, en comparación a los de ICS-95, que fue de 1

materiales de tipo Nacional en las plantaciones de CCN-51.

Análisis de agrupamiento. La representación gráfica de las relaciones genéticas existentes en los grupos estudiados mostró dos grupos, A y B (Figura 2). El grupo A, comprende las fincas pertenecientes al tipo Nacional, en donde la única muestra que no se encontró en este grupo es la número 141. Este grupo se ramificó en

varios subgrupos, los cuales poseen alelos compartidos entre ellos. El grupo B, agrupó las fincas de cacao CCN-51 y los controles. En este grupo se encontraron 11 materiales que compartieron la misma rama, denominado subgrupo B1. En el análisis bootstrap, se obtuvo un árbol de 1000 repeticiones en donde sola rama alcanzó (690) de robusta.

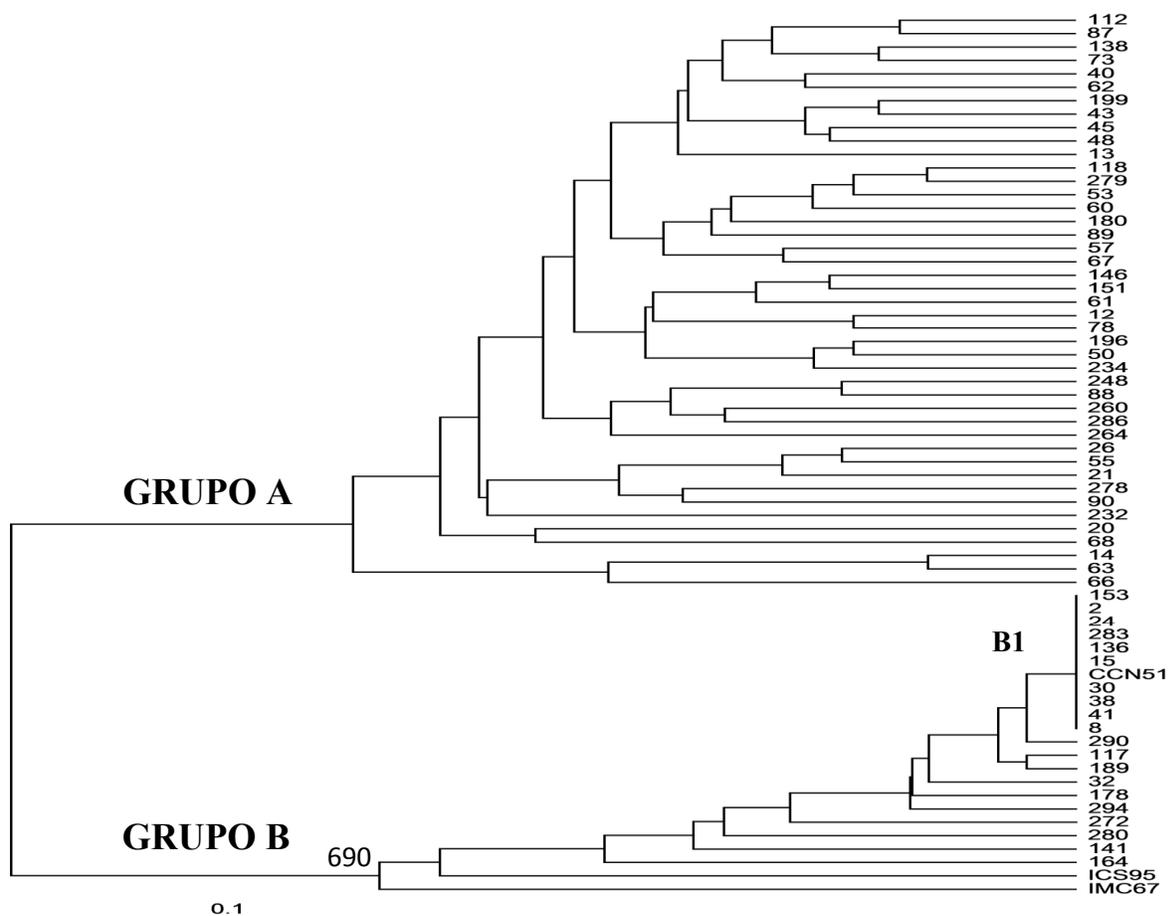


Figura 2. Dendrograma UPGMA basado en la distancia de alelos compartidos (DAS), que indica distribución de las 66 muestras de cacao, analizadas con ocho SSRs. Las letras A, B representan cada una de las ramas principales del árbol (grupos) y el código B1 representa un subgrupo.

Análisis de Coordenadas Principales. Este análisis apoyó los resultados obtenidos en el análisis de agrupamiento y permitió inferir mejor la distribución del subgrupo B1. La figura 3 representa la dispersión de las 63 muestras de cacao y de los 3 controles en función de los dos primeros ejes de coordenadas, los cuales que extraen el 51.45% de la varianza total observada.

Solo el primer eje, que contribuye el 44.28% de la varianza total, da lugar a la formación de dos grupos principales A y B. Las muestras de tipo Nacional se dispersaron al lado derecho del primer eje, mostrando una amplia distribución en el segundo eje. El segundo grupo B, lo conformaron las muestras de CCN-51, cuyos integrantes se ubicaron en el extremo izquierdo

del primer eje y en la sección central del segundo eje. Un subgrupo B1 se conformó por 16 muestras de las cuales 10 coincidieron en un mismo punto (2, 8, 15, 24, 30, 38, 41, 136, 153 y 283) con el control de CCN-51. Las demás muestras: 272, 280 y 164 estuvieron de manera dispersa, en donde la muestra 280 se ubicó cerca al genotipo IMC-67 a diferencia de lo estimado

en el análisis de agrupamiento. En este análisis se observó que la finca 141 se agrupó dentro del grupo de cacao CCN-51, a pesar de haber sido colectada como parte del tipo Nacional, lo cual coincidió con lo encontrado en el análisis de agrupamiento.

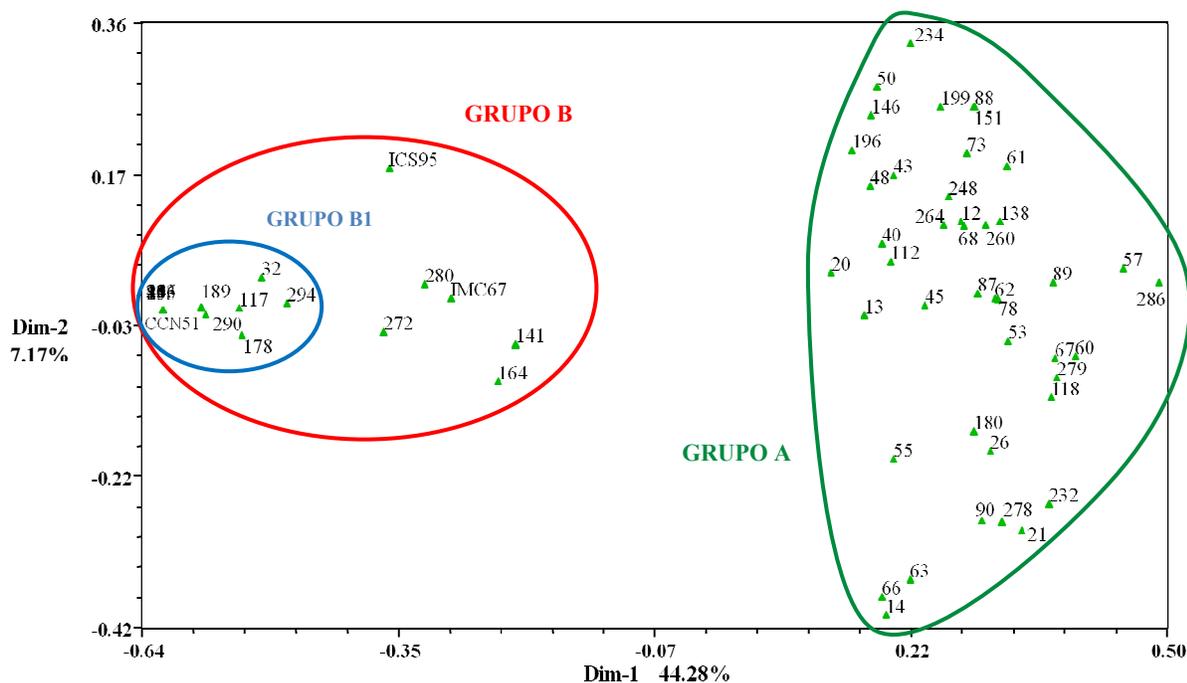


Figura 3. Distribución de las 66 muestras de cacao Nacional (muestras de ADN en "pool") en el análisis PCO, de 44 polimorfismos SSRs. El porcentaje de la varianza desprendido, se indica bajo el eje correspondiente. El código A, B y B1 corresponden a los grupos definidos por el "cluster análisis".

Análisis de asignación genética. Se definió el valor más probable del número de poblaciones muestreadas (k), para seis subpoblaciones. Las muestras de tipo Nacional se distribuyeron en cinco de estas, mientras que las muestras de CCN-51 conformaron la última. La asignación de individuos para confirmar la correspondencia de las fincas dentro de los grupos: tipo Nacional o CCN-51 se realizó con un valor umbral q de 0.700. Los resultados mostraron que 41 muestras del tipo Nacional guardaron su estatus de colecta original, pero tres no pudieron ser asignadas dentro de un grupo poblacional. Así por ejemplo, la muestra 20 no fue clasificada en ninguno de los grupos establecidos para la población Nacional, ya que alcanzó un valor q de asignación por debajo del umbral (0.643), lo cual se debe a la probable mezcla de genotipos. La

muestra 141 tampoco fue asignada dentro de las poblaciones de cacao Nacional y su valor de asignación fue de 0.659 pero para el grupo CCN-51. En cambio las 18 muestras de las fincas de CCN-51 fueron ubicadas dentro de este mismo grupo, con un perfil predominantemente coincidente con el perfil del genotipo CCN-51 de referencia. Solo la finca 164 no fue catalogada dentro de este grupo debido a su valor q de asignación de 0.633, ya que presentó alelos adicionales respecto al genotipo de referencia.

El análisis efectuado con los marcadores seleccionados para la identificación de diferencias moleculares a través del análisis comparativo de los perfiles moleculares de cacao del tipo Nacional y CCN-51 mostró que no

existen alelos específicos para CCN-51. Sin embargo, se hallaron dos alelos (mTcCIR 58-258 y el mTcCIR 12-199) con buena especificidad para CCN-51, los cuales segregaron 40 muestras de fincas del tipo Nacional de las de CCN-51. Tratando de llegar a una mayor nivel de discriminación se logró segregar dos muestras más con el alelo mTcCIR 58-236 con lo cual se logró discriminar 42 muestras del tipo Nacional.

Discusión

Se encontró un nivel importante de diversidad genética en los materiales cultivados en las fincas Nacionales de las localidades evaluadas. Se observó que la población del tipo Nacional analizada posee alelos propios y otros compartidos con los genotipos controles CCN-51, IMC-67 e ICS-95. Entonces, estamos ante la presencia de alelos conservados de la población Nacional y tres fuentes de alelos que están formando parte del actual complejo Nacional.

Existieron 11 alelos propios pero no se puede precisar el origen o procedencia de estos alelos. Sin embargo, la información encontrada supone una primera aproximación acerca del estado del cacao Nacional en algunas fincas ecuatorianas y es probable que se trate de alelos específicos para la variedad Nacional, cuyo mayor análisis contribuya a establecer diferencias para la discriminación entre Nacional y CCN-51.

Por otro lado, se encontró 7 alelos que estuvieron compartidos entre las fincas de CCN-51 y las de tipo Nacional que no correspondieron a ninguno de los controles (CCN-51, IMC-67 e ICS-95), posiblemente se trate de la presencia de ciertos individuos del tipo Nacional en las fincas de CCN-51 o probablemente son muestras que sufrieron una mezcla por parte del agricultor ya que en la finca se cultivan ambas variedades o quizás segregaciones entre Nacional y CCN-51. En cambio, solo en algunas fincas de cacao CCN-51 se encontró cierta variabilidad, lo cual sugiere que a pesar de tratarse de materiales propagados clonalmente y de su uso comercial, pudieran tratarse de segregaciones de CCN-51.

Los alelos de CCN-51 que tuvieron en baja presencia en las fincas del tipo Nacional, revelados por el mTcCIR 58. Aunque estos alelos son escasos en los materiales de tipo

Nacional se requiere de mayor análisis para afirmar que se trata de marcadores específicos para CCN-51. En definitiva se revelan indicios de ciertas variantes alélicas pertenecientes al genotipo CCN-51 que muestran ser poco frecuentes en la población de cacao Nacional y debería evaluarse su poder discriminatorio. Entonces se propone que es factible el uso de marcadores microsátélites para discriminar la presencia del genotipo CCN-51 en muestras de almendras de la variedad Nacional.

Un punto importante que debe ser tomado en cuenta en futuras investigaciones, es el número de loci a utilizar, ya que en este trabajo, ocho resultaron ser insuficientes para la determinar variantes alélicas únicas en una pequeña población de cacao tipo Nacional, pero si se evaluara un mayor número de fincas, seguramente se requerirán profundizar en el análisis del genoma con un mayor número de loci por cromosoma.

En cuanto a la distancia genética que mostraron los dos tipos de cacao, Nacional y CCN-51, en los análisis de agrupamiento y de coordenadas principales, se debe al bandaje propio de un complejo en comparación a las plantaciones manejadas mayoritariamente con clones. En gran parte de las fincas de CCN-51 se observó un solo genotipo y en el resto de fincas, como ya se mencionó, está presente el genotipo CCN-51 junto con segregaciones del mismo u otros híbridos. Esto se deduce por cuanto los alelos encontrados en las muestras de semillas representan la información de los progenitores presentes en cada finca y al comparar estos perfiles se observa que los alelos predominantes o los más frecuentes coinciden con el genotipo control de CCN-51.

En general se observó que los alelos del genotipo CCN-51 estuvieron presentes dentro de todas las muestras del tipo Nacional, en menor o mayor proporción. Esta presencia puede deberse al alto nivel de diversidad genética encontrado en las poblaciones modernas de cacao Nacional causada por la hibridación entre los individuos Nacionales y varios germoplasmas introducidos. En el presente existe incertidumbre en cuanto a la composición actual de la población presente en campo, debido a que no se conoce hasta que nivel se ha diversificado la variedad en algunas

regiones. Bartley (2005), explica que debido a los procesos de introducción descontrolados se creó una amplia gama de genotipos recombinantes que fueron ampliamente diseminados. En algunas áreas, aún se registran poblaciones Nacionales a causa de los intereses por mantener la calidad por la cual fue reconocida la variedad. Pero la gran parte de las poblaciones actuales, seguramente, consisten en híbridos con la variedad Nacional y sus descendientes. En el otro extremo estarían los genotipos que parecen poseer casi todos los atributos que se asocian con las variedades introducidas. Loor et al. (2009), por su parte analizaron 322 plantas de cacao Nacional recolectadas de diferentes zonas geográficas ubicadas a lo largo de la región Costera Ecuatoriana, donde el 65% de la población analizada corresponde a cruces de segunda generación y además sugiere que las plantaciones tradicionales actualmente están conformadas mayoritariamente por cruces de cuarta o quinta generación. En general la historia del cacao Nacional ecuatoriano revela que ha pasado por una sucesiva introducción de germoplasma foráneo desde finales de 1890 y el subsecuente flujo genético que tuvieron estas accesiones con las poblaciones nativas de cacao Nacional (Van Hall, 1932) produjeron altos niveles de diversidad genética dentro de las poblaciones de cacao y provocaron el decrecimiento y desaparición gradual de los genotipos puros (Bartley, 2005). En definitiva Lerceteau et al. (1997), Cruzillat et al. (2000) y Loor et al. (2009), coinciden en que, el cacao Nacional se define como un complejo con un gran rango de genotipos, debido a la histórica contribución de variedades foráneas.

La información acerca de los procesos de introducción de material foráneo realizados en los años 1890, a más de ser escasa y confusa, se agudiza por la inexistente información acerca del material genético que fue usado por los agricultores para conformar sus actuales fincas. Lo que se tiene claro es la significativa mezcla genética existente en el cacao Nacional y la subsecuente pérdida de los genotipos puros. Ante esto se podría pensar que la discriminación de CCN-51 con respecto a algunas poblaciones del tipo Nacional puede requerir de mayor trabajo, ya que la posibilidad de que exista

coincidencia de alelos entre los materiales de algunas fincas y el genotipo CCN-51, se comprobó en este estudio en varios loci. Pero dicha coincidencia puede hacer referencia a la alta variabilidad presente en las fincas de tipo Nacional, en donde algún alelo llega a coincidir por homoplasia con los alelos de CCN-51, es decir que estos alelos, aunque coinciden, son de orígenes distintos. Sin embargo esto no explica porque la mayoría de las fincas comparten de 7 a 11 alelos con el genotipo control de CCN-51, en algunos casos entre 12 y 13 alelos llegando inclusive a 14 alelos en dos muestras, es decir se compartieron la totalidad de los alelos de CCN-51 control.

La respuesta que se logra deducir es que el nivel de introgresión o mezcla no es similar en las distintas zonas del país, resultando en fincas con mayor o menor porcentaje de introducción. Entonces se podría decir que ciertas localidades han sufrido un grado importante de introgresión genética (alelos de otros tipos de cacao incorporados en el genoma de poblaciones locales) diluyendo la pureza de las variedades presentes en la finca y generando híbridos que comparten alelos con el genotipo CCN-51. Entonces debido a los actuales o pasados eventos de recombinación con CCN-51, de sus parentales o tal vez de otros materiales relacionados con estos explicaría la coincidencia de alelos entre ambos cacaos en determinadas fincas.

También se consideró la posibilidad de mezcla de semillas del genotipo CCN-51 en las muestras de cacao Nacional. Se podría considerar analizar cada semilla de la muestra de la finca 14, en la cual estuvieron presentes todos los alelos de CCN-51 control, para determinar si existen semillas que provengan de CCN-51 o se trata de alelos compartidos con los individuos tipo Nacional presentes en las fincas, ya que se observó una gran diversidad alélica en esta finca. En otro caso la finca 141, en la que también se dio la presencia de los 14 alelos de CCN-51 control, pero tuvo una diversidad alélica baja y un solo alelo de los 11 reconocidos como propios del tipo Nacional, lo cual lleva a pensar que la muestra corresponde a una mezcla intencional, debido a cultivar en mayor proporción CCN-51 que la variedad Nacional lo

cual se respalda en el análisis de agrupamiento (Figura 3.13) y de coordenadas principales (Figura 3.14).

La incidencia de alelos de CCN-51 en estas dos fincas crea una discusión al respecto de su procedencia. Se encontró evidencia de una mezcla de variedades en los resultados obtenidos en otro tipo de análisis realizado en el Laboratorio de Calidad en la EET-Pichilingue del INIAP basado en espectrofotometría para diferenciar muestras de cacao tipo Nacional y CCN-51. En el estudio existieron muestras de cacao tipo Nacional y de CCN-51 que se ubicaron en la variedad a la cual no pertenecían (Rodríguez, 2010). A partir de esto se dedujo que existieron muestras con mayor o menor proporción de mezcla entre las variedades, en donde una de ellas fue la muestra 141, misma que en este estudio se consideró como perteneciente al grupo CCN-51 en el análisis de asignación genética a pesar de ser muestreada como de tipo Nacional. Esto implica varias posibilidades una de las cuales es que la información provista por el productor de la finca, acerca de la variedad proporcionada, era incorrecta y la muestra corresponde a una mezcla intencional con cacao CCN-51 razón por

la cual no se encontraron alelos exclusivos para CCN-51.

Son muchas las posibilidades que el estudio del genoma del cacao podrá abrir en los próximos años en donde el uso de marcadores moleculares. Se puede pensar usar para detecte las mezclas e incluso cuantificarlas la cantidad de material CCN-51 dentro de una muestra de cacao Nacional. Esta metodología se convertirá en la mejor forma de control de la adulteración en los lotes de exportación y que a futuro promete determinar la calidad genética de un lote de semillas. Existe inclusive la posibilidad de aprovechar esta técnica para conocer la extensión, estructura y distribución geográfica de la identidad y diversidad genética del cacao ecuatoriano y con esto será posible rastrear y establecer los genes de los sabores y aromas del cacao ecuatoriano.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por el Instituto Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) y desarrollado en el laboratorio de la Estación Experimental Tropical Pichilingue de la misma institución.

LITERATURA CITADA

- Amores, F., Butler, D., Ramos, G., Sukha, D., Espin, S., Gomez, A., Zambrano, A., Hollywood, N., Van Loo, R., & Seguíne, E. (2007). *Project to establish the physical, chemical and organoleptic parameters to differentiate between fine or flavor and bulk cocoa*. (Project Completion Report EX/134/10). Ecuador: Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP).
- Bartley, B. G. (2005). *The genetic diversity of cacao and its utilization*. Reading, Estados Unidos: Cabi.
- Colombo, C., Second, G., Losada-Valle, T., & Charrier, A. (1998). Genetic diversity characterization of cassava cultivars (*Manihot esculenta* Crantz) by RAPD markers. *Genetics and Mol. Bio.*(11), 105-113.
- Crouzillat, D., Bellanger, L., Rigoreau, M., Bucheli, P., & Petiard, V. (2000). Genetic structure, characterization and selection of National cocoa compared to other genetic groups (pp. 47-64.). En *International Workshop on New Technologies and Cocoa Breeding*. Sabah, Malaysia: Kota Kinabalu.
- Doyle, J. J., & Doyle, J. L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Interactive Resource Center*. Norwich, Reino Unido. Rescatado de <http://irc.igd.cornell.edu/Protocols/DoyleProtocol.pdf>
- Enríquez, G. (2003). El cultivo orgánico de cacao bajo el concepto de calidad total. En *Seminario-taller normativa, procesos y tecnologías para la producción orgánica de cacao*. Quito, Ecuador: Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP).

- Faleiro, F. G., Araújo, I. S., Bahia, R., Santos, R. F., Yamada, M. M., & Anher, D. (2002). Otimização da extração e amplificação de DNA de *Theobroma cacao* L. visando obtenção de marcadores RAPD. *Agrotropica*, 14(2), 31 – 34
- International Cocoa Organization (ICCO). (2001). Annual report for 2000/2001. *Berners Street*. Recuperado de <http://www.icco.org/about/anualreport.aspx>
- Lanaud, C., Risterucci, A. M., Pieretti, I., Falque, M., Bouet, A., & Lagoda, P. (1999). Isolation and characterization of microsatellites in *Theobroma cacao* L. *Mol. Ecol.*, 8, 2141-2152.
- Lerceteau, E., Quiroz, J., Soria, J., Flipo, S., Pétiard, V., & Crouzil, D. (1997). Genetic differentiation among Ecuadorian *Theobroma cacao* L. accessions using DNA and morphological analyses. *Euphytica*, 95, 77-87.
- LI-COR Biosciences. (2004). Automated microsatellite analysis. *Lincoln*. Recuperado de <http://www.licor.com/bio/PDF/genomics/microsat.pdf>
- Liu, K., & Muse, S. (2005). Power marker: Integrated analysis environment for genetic marker data. *Bioinformatics*, 21(9), 2128-2129.
- Loor, R. G., Risterucci, A. M., Courtois, B., Fouet, O., Jeabbeau M., Rosenquist, E., Amores, F., Vasco, A., Medina, M. & Lanaud, L. (2009). Tracing the native ancestors of the modern *Theobroma cacao* L. population in Ecuador. *Tree Genetics & Genomes* 5, 421-433.
- Morillo, E., & Miño, G. (2009). *Protocolos de marcadores moleculares*. Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias, Estación Experimental Santa Catalina. Quito: Autor.
- Page, R. (2008). TreeView 1.6.1.6. Recuperado de <http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>.
- Peakall, R., & Smouse, P. (2005). GenAlEx 6: Genetic analysis in excel. The Australian National University, Canberra, Australia.
- Pritchard, J., Stephens, M., & Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*(155), 945-959.
- Pugh, T., Fouet, O., Risterucci, A. M., Brottier, P., Abouladze, M., Deletrez, C., Courtois, B., Clement, D., Larmande, P., N'Goran, J. A., & Lanaud C. (2004). A new cacao linkage map based on codominant markers: Development and integration of 201 new microsatellite markers. *Theor Appl Genet*, 108, 1151-1161.
- Rodríguez, G. (2010). Uso del espectrofotómetro para la diferenciación de almendras de cacao Nacional y CCN-51. (Tesis de ingeniería inédita). Universidad Estatal de Quevedo, Ecuador.
- Saunders, J. A., Mischke, S., Leamy, E., & Hemeida, A. A. (2004). Selection of international molecular standards for DNA fingerprinting of *Theobroma cacao* L. *Theor Appl Genet*(110), 41-47.