



**UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS**

**TESIS DE GRADO PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE  
INGENIERO AGRÓNOMO**

**TEMA:**

**“DETERMINACIÓN DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA DE 50  
CLONES DE CACAO DE LA COLECCIÓN ALLEN DEL INIAP CON  
LA UTILIZACIÓN DE MARCADORES MOLECULARES  
MICROSATÉLITES”**

**AUTOR:**

**ÓSCAR MAURICIO CHENCHE LÓPEZ**

**DIRECTOR:**

**Ing. Agr. Gonzalo Almagro Mayorga, Msc.**

**ECUADOR**

**2014**



**UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS**

La presente tesis de grado titulada: **“DETERMINACIÓN DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA DE 50 CLONES DE CACAO DE LA COLECCIÓN ALLEN DEL INIAP CON LA UTILIZACIÓN DE MARCADORES MOLECULARES MICROSATÉLITES”**, realizada por el señor **Óscar Mauricio Chenche López**, bajo la dirección del **Ing. Agr. Gonzalo Almagro Mayorga, Msc.**, ha sido aprobada y aceptada por el Tribunal de Sustentación, con la calificación de 10 - 10 - 10 - 10 puntos, equivalentes a sobresaliente, como requisito previo para obtener el título de:

**INGENIERO AGRÓNOMO**

**TRIBUNAL DE SUSTENTACIÓN:**

Ing. Agr. Eison Valdiviezo Freire, M.Sc.  
**PRESIDENTE**

Ing. Agr. Gonzalo Almagro Mayorga, Msc.  
Examinador Principal

Ing. Agr. Laura Paris-Moreno Rivas  
Examinadora Principal

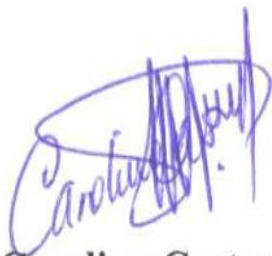
Ing. Agr. Carlos Ramírez Aguirre, Msc.  
Examinador Alterno

Guayaquil, 18 de julio de 2014

## **CERTIFICADO DEL GRAMÁTICO**

**ING. CAROLINA CASTRO MENDOZA, CON DOMICILIO UBICADO EN LA CIUDAD DE GUAYAQUIL, POR EL PRESENTE CERTIFICO QUE HE REVISADO LA TESIS DE GRADO ELABORADA POR EL SEÑOR ÓSCAR MAURICIO CHENCHE LÓPEZ, PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERO AGRÓNOMO, CUYO TEMA ES: “DETERMINACIÓN DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA DE 50 CLONES DE CACAO DE LA COLECCIÓN ALLEN DEL INIAP CON LA UTILIZACIÓN DE MARCADORES MOLECULARES MICROSATÉLITES”.**

**LA TESIS DE GRADO ARRIBA SEÑALADA HA SIDO ESCRITA DE ACUERDO A LAS NORMAS GRAMATICALES Y DE SINTAXIS VIGENTES DE LA LENGUA ESPAÑOLA.**



**Ing. Carolina Castro Mendoza**

**C.I. 0919052175**

**Nº Registro SENESCYT: 1006-11-1071409**

**La responsabilidad del contenido de esta investigación me corresponde exclusivamente, y el patrimonio intelectual de la misma a la Universidad de Guayaquil.**

**ÓSCAR MAURICIO CHENCHE LÓPEZ**  
**E-mail: oscar\_chenche@hotmail.com**  
**Telf. 0959153552 – (04) 2972116**

## **DEDICATORIA**

A Dios, por darme perseverancia y sabiduría en mi formación profesional.

A mis padres, Félix Chenche y Gladys López, quienes con su sabiduría me supieron formar como persona, guiándome en cada paso que daba y sosteniéndome en cada peldaño que escalaba.

También, de forma muy especial, a mi tía Liliana y a mis hermanos, Félix, César y Stephani, que fueron un pilar fundamental en la formación de mi carrera.

A mi esposa, Patricia Wong, mi empuje, mi sostén incondicional, quien con su comprensión ayudó a formarme como profesional.

A mis hijos, Samantha y Óscar, como prueba de dedicación, empeño y ejemplo de perseverancia.

A todos aquellos que estuvieron ahí y creyeron en mis capacidades.

## **AGRADECIMIENTO**

Mi infinito agradecimiento a Dios por permitirme llegar hasta aquí al final de mi carrera profesional y por lograr mis metas trazadas.

Le agradezco a toda mi familia por apoyarme en mis decisiones.

A la FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS DE LA UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL, porque me formaron como profesional, y a sus maestros que brindaron sus conocimientos sin ningún celo ni reserva.

Al INSTITUTO NACIONAL AUTÓNOMO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS (INIAP), que permitió realizar mi investigación en sus instalaciones y a sus técnicos en general que me brindaron su colaboración.

Mi agradecimiento especial a los señores: Ing. Gonzalo Almagro, Ing. James Quiroz, Dr. Walter Reyes e Ing. Samuel Mestanza, tutores en mi trabajo de tesis, por su objetividad en sus comentarios para terminar de forma satisfactoria esta investigación.

A mis compañeros de laboratorio: Ing. Eugenia Romero, Alex Valarezo, Wladimir Escalante, José Acosta y Joselyne Mendoza, por compartir sus conocimientos adquiridos conmigo y brindarme su apoyo.

## ÍNDICE GENERAL

	<b>Pág.</b>
<b>Carátula</b>	<b>i</b>
<b>Tribunal de sustentación</b>	<b>ii</b>
<b>Certificado del gramático</b>	<b>iii</b>
<b>Responsabilidad</b>	<b>iv</b>
<b>Dedicatoria</b>	<b>v</b>
<b>Agradecimiento</b>	<b>vi</b>
<b>Índice general</b>	<b>vii</b>
<b>Índice de cuadros</b>	<b>x</b>
<b>Índice de figuras</b>	<b>x</b>
<b>Repositorio de la SENESCYT</b>	<b>xiv</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>PROBLEMA</b>	<b>2</b>
<b>OBJETIVO GENERAL</b>	<b>2</b>
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	<b>3</b>
<b>HIPÓTESIS</b>	<b>3</b>
<b>II. REVISIÓN DE LITERATURA</b>	<b>4</b>
2.1 Origen y taxonomía del cacao	4
2.2 Genotipos de cacao en el mundo	4
2.3 Bancos de germoplasma	5
2.3.1 Colección Allen	5

2.4	Caracterización	6
2.5	Descriptores	6
2.5.1	Descriptores morfológicos	7
2.5.2	Descriptores moleculares	7
2.6	Marcadores moleculares	7
2.6.1	Ventajas de los marcadores moleculares sobre los morfológicos	8
2.7	Extracción de ADN	9
2.8	PCR	10
2.8.1	Fases de la PCR	11
2.8.2	Marcadores basados en PCR (Polymerase Chain Reaction)	12
2.8.3	RFLP	12
2.8.4	RAPD's	12
2.8.5	AFLP's	13
2.8.6	Microsatélites	13

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS 16**

3.1	Ubicación geográfica	16
3.2	Fases experimentales	16
3.2.1	Materiales vegetales experimentales	17
3.3	Fase de laboratorio	18
3.4	Manejo específico del experimento	18
3.4.1	Colecta del material vegetal	18
3.4.2	Extracción de ADN genómico	19
3.4.3	Cuantificación de ADN	21
3.4.4	Amplificación de ADN	24
3.4.5	Tinción	26



3.4.6 Secuenciación	26
3.4.7 Corrida electroforética	27
3.4.8 Foto-documentación	27
3.4.9 Análisis de datos	31
3.5 Análisis estadístico	31
<b>IV. RESULTADOS</b>	<b>30</b>
4.1 Extracción y cuantificación	33
4.2 Amplificación de ADN	35
4.3 Secuenciación y foto-documentación	35
4.4 Variabilidad genética	40
4.4.1 Índices de diversidad genética	40
<b>V. DISCUSIÓN</b>	<b>47</b>
<b>VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</b>	<b>51</b>
<b>VII. RESUMEN</b>	<b>52</b>
<b>VIII. SUMMARY</b>	<b>54</b>
<b>IX. LITERATURA CITADA</b>	<b>56</b>
<b>X. ANEXOS</b>	<b>62</b>
Anexo 1. Glosario	62

Anexo 2.	Descripción de abreviaturas utilizadas	64
Anexo 3.	Croquis de ubicación	66
Anexo 4.	Croquis de ubicación	67
Anexo 5.	Croquis de ubicación	68
Anexo 6.	Croquis de ubicación	69
Anexo 7.	Figuras	70

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.	Colección ALLEN	<b>17</b>
Cuadro 2.	Tampón de extracción	<b>19</b>
Cuadro 3.	Resultados obtenidos por el espectrofotómetro	<b>23</b>
Cuadro 4.	Coctel de amplificación	<b>24</b>
Cuadro 5.	Cantidades de cada componente del coctel SSR-M13	<b>26</b>
Cuadro 6.	Concentración final de stock de muestras de ADN de cada clon estudiado	<b>34</b>
Cuadro 7.	Matriz depurada obtenida por el LICOR 4300	<b>39</b>
Cuadro 8.	Índices de diversidad genética	<b>41</b>
Cuadro 9.	Contenido de información polimórfica (PIC)	<b>41</b>
Cuadro 10.	Matriz de distanciamiento genético (Nei 1973)	<b>42</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Genotipos de la colección Allen (A). Identificación y colecta de los genotipos (B). Rotulación de las muestras colectadas (C). Conservación para el traslado de las muestras (D). Temperatura de traslado por debajo de los 10°C (E). Limpieza de material vegetal en laboratorio (F).	<b>18</b>
-----------	--	-----------

Figura 2.	Maceración de tejido vegetal (A); muestras sometidas a baño María 45 minutos a 65 °C (B); centrifugación de las muestras (C); pellet de ADN en microtubo (D); corrida en cámara de electroforesis horizontal (E); visualización en foto-documentador de los ADN resultantes en gel de agarosa (F).	<b>22</b>
Figura 3.	Foto-documentación de los patrones de bandas del SSR mtc CIR1	<b>28</b>
Figura 4.	Dúplex 3, marcador CIR 7 – CIR 33, anillamiento 51°C, marcaje 700.	<b>28</b>
Figura 5.	Dúplex 5, marcador CIR 290 – CIR 58, anillamiento 46°C, marcaje 700.	<b>29</b>
Figura 6.	Dúplex 6, marcador CIR 37 – CIR 8, anillamiento 46°C, marcaje 800.	<b>29</b>
Figura 7.	Dúplex 8, marcador CIR 15 – CIR 22, anillamiento 46°C, marcaje 700.	<b>30</b>
Figura 8.	Dúplex 9, marcador CIR 26 – CIR 12, anillamiento 51°C, marcaje 800.	<b>30</b>
Figura 9.	Comprobación del proceso de extracción en gel de agarosa al 0.8%.	<b>34</b>
Figura 10.	Test de amplificación de las muestras utilizando el marcador SSr CIR 37 en gel de agarosa al 2%.	<b>35</b>
Figura 11.	Foto-documentación de productos amplificados con SSr mtcCIR 1.	<b>36</b>

Figura 12.	Foto-documentación de productos amplificados con SSr mtcCIR 7.	<b>36</b>
Figura 13.	Foto-documentación de productos amplificados con SSr mtcCIR 8.	<b>36</b>
Figura 14.	Foto-documentación de productos amplificados con SSr mtcCIR 12.	<b>36</b>
Figura 15.	Foto-documentación de productos amplificados con SSr mtcCIR 15.	<b>37</b>
Figura 16.	Foto-documentación de productos amplificados con SSr mtcCIR 22.	<b>37</b>
Figura 17.	Foto-documentación de productos amplificados con SSr mtcCIR 26.	<b>37</b>
Figura 18.	Foto-documentación de productos amplificados con SSr mtcCIR 33.	<b>37</b>
Figura 19.	Foto-documentación de productos amplificados con SSr mtcCIR 37.	<b>38</b>
Figura 20.	Foto-documentación de productos amplificados con SSr mtcCIR 58.	<b>38</b>
Figura 21.	Foto-documentación de productos amplificados con SSr mtcCIR 290.	<b>38</b>
Figura 22.	Dendograma de distanciamiento de individuos de cacao	<b>46</b>

Figura 23.	Recolección del material vegetal de la colección Allen	<b>70</b>
Figura 24.	Rótulo de los clones seleccionados	<b>70</b>
Figura 25.	Identificación para el traslado de los clones	<b>71</b>
Figura 26.	Desempaque y limpieza del material vegetal	<b>71</b>
Figura 27.	A) Preparación de buffer de extracción.	<b>72</b>
	B) Foto-documentación de las muestras de la colección	



Presidencia  
de la República  
del Ecuador



Plan Nacional  
de Ciencia, Tecnología,  
Innovación y Saberes



**SENESCYT**  
SECRETARÍA NACIONAL DE EDUCACIÓN SUPERIOR,  
CIENCIA, TECNOLOGÍA E INNOVACIÓN

<b>REPOSITORIO NACIONAL EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA</b>		
<b>FICHA DE REGISTRO DE TESIS</b>		
<b>TÍTULO:</b> “DETERMINACIÓN DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA DE 50 CLONES DE CACAO DE LA COLECCIÓN ALLEN DEL INIAP CON LA UTILIZACIÓN DE MARCADORES MOLECULARES MICROSATÉLITES”		
<b>AUTOR:</b>  <b>ÓSCAR MAURICIO CHENCHE LÓPEZ</b>	<b>REVISORES:</b> Ing. Eison Valdiviezo Freire, Msc.  Ing. Gonzalo Almagro Mayorga, MSc.  Ing. Laura Paris-Moreno Rivas	
<b>INSTITUCIÓN:</b> Universidad de Guayaquil	<b>FACULTAD:</b> Ciencias Agrarias	
<b>CARRERA:</b> Ingeniería Agronómica		
<b>FECHA DE PUBLICACIÓN:</b>	<b>Nº DE PÁGS.:</b>	
<b>ÁREAS TEMÁTICAS:</b> Bibliográfica, cultivo, variabilidad genética.		
<b>PALABRAS CLAVE:</b> cacao, clones, variabilidad genética,		
<p><b>RESUMEN:</b> Existen diversas herramientas para la caracterización ya sea del tipo morfológico como molecular. Para esta investigación que tiene como base la caracterización molecular, se escogieron los marcadores SSR basándose en el objetivo del trabajo, los mismos que por su característica de codominantes brinda una herramienta versátil para los fitomejoradores, al momento de realizar segregaciones de descendencia. Se plantea como objetivo la caracterización de 50 individuos de cacao de la colección Allen, buscando determinar el poder discriminante de los marcadores SSR, estos basados en la técnica de PCR. La colecta de los clones se la realizó en la EETP ( Estación Experimental Tropical Pichilingue) del INIAP, en la provincia de Los Ríos, donde los árboles de esta colección se encuentran en tres lotes distintos. Se colectaron hojas fotosintéticas en buenas condiciones; con pruebas preliminares se determinó el protocolo de extracción, llevando a cabo el descrito por Doyle y Doyle. Luego de la obtención y pruebas de los resultantes de la extracción se procedió a la amplificación de las muestras, las mismas que fueron amplificadas con el ciclaje establecido por la Estación Experimental Santa Catalina para marcadores microsatélites con variación en la temperatura de anillamiento. Se realizó el test de integridad para las muestras, obteniendo una buena amplificación en las imágenes; se realizó la secuenciación en el LICOR 4300 para luego realizar el genotipage en el programa SAGA, se transformó a matrices de datos; estos resultados fueron modificados y depurados con trabajos antes realizados donde se le podía asignar un valor ya conocido a los alelos encontrados; se convirtió en una matriz binaria donde se pudo establecer la relación de similitud entre los individuos con la utilización del programa Power Markert. Utilizando los postulados descritos por Nei se logró establecer la diversidad genética dentro de la colección. Para la realización del dendograma se usó el coeficiente de UPGMA que utiliza el ligamento promedio entre individuos, proyectando resultados satisfactorios para futuros estudios de mejoramiento.</p>		
<b>Nº DE REGISTRO (en base de datos):</b>		<b>Nº DE CLASIFICACIÓN:</b>
<b>DIRECCIÓN URL (tesis en la web):</b>		
<b>ADJUNTO PDF:</b>	<b>SI</b> <input checked="" type="checkbox"/>	<b>NO</b>
<b>CONTACTO CON AUTOR:</b> Óscar Mauricio Chenche López	<b>Teléfono:</b> 0959153552	<b>E-mail:</b> oscar_chenche@hotmail.com
<b>CONTACTO EN LA INSTITUCIÓN:</b> Ciudadela Universitaria “Dr. Salvador Allende”. Av. Delta s/n y Av. Kennedy s/n. Teléfono: 593-42288040 Guayaquil – Ecuador	<b>Nombre:</b> Ing. Agr. Gonzalo Almagro Mayorga, MSc.	
	<b>Teléfono:</b> (04) 2-288040	
	<b>E-mail:</b> www.ug.edu.ec/facultades/cinciasagrarias.aspx	

## I. INTRODUCCIÓN

Los granos de cacao (*Theobroma cacao* L.) procedentes del Ecuador son altamente apreciados en los mercados internacionales por su exquisito aroma fino y sabor conocido como “arriba”; sin embargo, la calidad del cacao nacional ecuatoriano está siendo amenazada, debido principalmente a la introducción de material genético foráneo, cuyos descendientes híbridos son mucho más productivos, los cuales gradualmente han ido remplazando las poblaciones nativas (Romero *et al.*, 2010).

De la misma forma, para el caso del cultivo de cacao, se ha vuelto indispensable suplir genes de resistencia a enfermedades, ya que es uno de los factores de mayor importancia en la reducción de la producción cacaotera en el Ecuador, particularmente la escoba de bruja causada por el hongo (*Moniliophthora perniciosa*), siendo la resistencia genética la mejor alternativa (Mayorga & Paola, 2001).

Una amplia variabilidad genética de cacao reside en la Amazonia. A raíz de la misma se han realizado varias caracterizaciones, a fin de conocer el comportamiento genético de los genotipos existentes en los bancos de germoplasma. Teniendo como objetivo seleccionar genotipos con caracteres deseables, se han utilizado caracterizaciones morfoagronómicas y caracterizaciones moleculares, las mismas que han llevado a dar un paso significativo en los programas de mejoramiento (Faleiro *et al.*, 2004).

El desarrollo de un sistema de documentación acerca de las características de los materiales conservados en los bancos de germoplasma, constituye un apoyo para los fitomejoradores, puesto que permitirá establecer prioridades

en cuanto a planificar de mejor manera las actividades de mejoramiento genético logrando optimizar tiempo y recursos.

El Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), a través de la Estación Experimental Litoral Sur, considerando la importancia de la caracterización de los bancos de germoplasma existentes desde el año 1980, inicia un estudio con la finalidad de encontrar caracteres deseables de la colección Allen, conocida con anterioridad como colección San Carlos, ubicada en la Estación Experimental Tropical Pichilingue (Allen, 1987).

## **PROBLEMA**

En su mayoría, los programas de mejoramiento genético están orientados a elevar la productividad; sin embargo, los bancos de germoplasma de cacao presentan indudablemente diferentes niveles de redundancia genética, ya que en la actualidad los genotipos sembrados son de origen mixto, lo que dificulta encasillarlo en los grupos tradicionales y no permite la eficiente conservación y utilización de las accesiones.

Por lo expuesto, en el presente estudio se proponen los siguientes objetivos:

## **OBJETIVO GENERAL**

Conocer la variabilidad genética de la colección Allen del INIAP en 50 genotipos, con la caracterización molecular, a través de marcadores microsatélites.



## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Validar un protocolo de extracción de ADN para cacao.
- Determinar el grado de polimorfismo de los marcadores SSR y el nivel de variabilidad genética, dentro y entre los genotipos de la colección Allen de cacao Amazónico.

## **HIPÓTESIS**

- El cacao Amazónico de la colección Allen presenta características moleculares particulares, de alta variabilidad y de tipo resistente.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 Origen y taxonomía del cacao

De acuerdo con Enríquez (1985), el cacao es una planta que se originó en América del Sur, en el área del alto Amazonas; debido al sistema de vida nómada que llevaban los primeros habitantes es difícil decir a ciencia cierta cuál es el lugar real de su origen.

Motomayor *et al.* (2002) han encasillado al T. cacao como perteneciente a la familia Malvaceae *sensu lato* y por tanto ya no dentro de las Sterculiaceae.

Reino:	Plantae
Subreino:	Tracheobionta
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Subclase:	Dilleniidae
Familia:	Malvaceae
Subfamilia:	Byttnerioideae
Orden:	Malvales
Género:	Theobroma
Especie:	<i>Theobroma cacao</i> (Chia, 2009)

### 2.2 Genotipos de cacao en el mundo

Las formas de cacao se clasifican tradicionalmente en tres grupos genéticos: Criollo, Forastero y Trinitario; sin embargo, nuevos estudios han mostrado que esta clasificación no describe suficientemente la variabilidad

de la especie. Particularmente, el grupo Forastero abarca una alta variabilidad genética, mientras que las formas Criollo son más estrechamente definidas. El grupo Trinitario comprende híbridos entre los dos primeros grupos. La mayoría de las formas de cacao cultivadas mundialmente hoy en día son híbridos de orígenes mixtos que no pueden ser completamente incluidos dentro de esta división clásica (Dostert *et al.*, 2011).

### **2.3 Bancos de germoplasma**

Se define como germoplasma al material que se mantiene, ya sea como semilla, cultivo de tejido o como plantas en crecimiento activo. Este germoplasma se conserva en distintos tipos de colección, que son utilizados por el banco de germoplasma de diferentes maneras (Painting *et al.*, 1993).

Las colecciones deben proveer a los mejoradores de variantes genéticas genes o genotipos que les permitan responder a los nuevos desafíos planteados por los sistemas productivos, siendo para ello imprescindible conocer las características del germoplasma (Abadie y Berreta, 2001).

#### **2.3.1 Colección Allen**

Esta colección se estableció a comienzos de 1980, llevando el nombre de John Allen quien realizó la recolección bajo un acuerdo entre el INIAP y la Alianza de Cacao, Chocolate y Confitería de Gran Bretaña, con financiamiento del Mercado de Cacao de Londres, el mismo que finalizó en octubre de 1985. En esta colección se recolectaron materiales genéticos de las diferentes zonas agroecológicas de la Amazonia ecuatoriana; resaltando

las zonas desde el norte al sur de la Amazonia: Puerto El Carmen, Cuyabeno, Lago Agrio, Loreto, Tena, Puyo y Zamora (Allen, 1987).



## 2.4 Caracterización

Hinthum van (1995), citado por Abadie y Berreta (2001), indica que se entiende por caracterización a la descripción que existe en una colección de germoplasma. De igual forma, Abadie y Berreta (2001) mencionan que la caracterización debe permitir diferenciar a las accesiones de una especie, teniendo como objetivo principal la identificación de las mismas.

## 2.5 Descriptores

Un descriptor es una característica o atributo cuya expresión es fácil de medir, registrar o evaluar y que hace referencia a la forma, estructura o comportamiento de una accesión. Los descriptores son aplicados en la

caracterización ya que estos expresan el atributo deseado de forma precisa (Abadie y Berreta, 2001).

### **2.5.1 Descriptores morfológicos**

Corresponden en su gran mayoría a la descripción morfológica de la planta y su arquitectura; se pueden agrupar en botánico-taxonómico, morfoagronómicos y evaluativos, los mismos que pueden ser de tipo cualitativo: mazorca (forma, ápice, base, color, rugosidad); almendra (color); flor (color); y, cuantitativo: mazorca (diámetro, largo y peso) y semillas (número, largo, ancho y peso) (Hidalgo, 2003).

### **2.5.2 Descriptores moleculares**

Según D'Vicente *et al.* (2004), son aquellos que definen la información mínima que se necesita para describir un marcador, permiten eliminar tanto los inconvenientes de una selección basada en el análisis exclusivo del fenotipo, como la identificación de especies y variedades de una forma más rigurosa y repetitiva. Funcionan como señaladores de diferentes regiones del genoma y se usan para el mapeo genético, permiten evidenciar variaciones (polimorfismos) en la secuencia del ADN entre dos individuos, modifiquen estas o no su fenotipo.

## **2.6 Marcadores moleculares**

La información genética de las plantas se encuentra almacenada en el ADN de los cromosomas nucleares y en los genomas de las organelas. La definición de la estructura molecular del ADN por parte de Watson y Crick en los años 50, abrió todo un mundo de nuevas posibilidades científicas

para el conocimiento y el mejor aprovechamiento de las plantas, animales y microorganismo, contribuyendo a la revolución de la biotecnología (Phillips, 1998).

La técnica de los marcadores moleculares es fruto del desarrollo de la tecnología del ADN que se inició a comienzos de la década de los años 70 (Ángel, 2000).

Las técnicas de biología molecular y particularmente de uso de marcadores moleculares han permitido conocer y caracterizar el contenido genético de los organismos, así como estimar la diversidad y las relaciones genéticas entre grupos de interés. Los marcadores moleculares han aportado información relevantes en áreas claves de la conservación *in situ* y *ex situ* (Karp *et al.*, 1997).

### **2.6.1 Ventajas de los marcadores moleculares sobre los morfológicos**

La ventaja de la caracterización del ADN sobre la caracterización morfológica es que no está influenciada por el ambiente y se puede utilizar parte de la planta en cualquier estado de desarrollo (Powell, 1992).

<b>Marcadores moleculares de ADN</b>	<b>Marcadores morfológicos</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Más abundantes ADN, sólo limitados por el tamaño del genoma.</li> <li>• No afectado por el ambiente.</li> <li>• Un solo cistrón implicado (isoenzimas) o un número limitado de bases del ADN.</li> <li>• Mínimo o nulo efecto epistático.</li> <li>• Para el análisis suele ser suficiente una pequeña cantidad de tejido vegetal en ADN de cualquier órgano.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Número limitado.</li> <li>• Importante interacción con el ambiente germoplasma.</li> <li>• Con frecuencia caracteres poligénicos.</li> <li>• Mayor posibilidad de epistasia.</li> <li>• Para algunos caracteres es necesarios completar el ciclo de vida.</li> </ul>

(Powell, 1992).

## 2.7 Extracción de ADN

En la extracción de los ácidos nucleicos, estos se separan de cualquier otro compuesto proveniente de las células o del ambiente del cual tomaron las muestras. Inicialmente es necesario llevar a cabo una lisis para liberar al ADN del interior celular, para lo cual, se utilizan los buffer de extracción que contienen: 1) detergentes, como sodio dodecilo sulfato (SDS), a una concentración final del 1% o Triton X al 0.5 %; 2) una molécula quelante para desestabilizar la membrana de ADN; 3) sales (NaCl), que forman una

capa iónica suave que recubre al ADN, protegiéndolo y ayudándolo a evitar su degradación; y, 4) proteinasa K (Eguiarte *et al.*, 2007).

## 2.8 PCR

PCR son las siglas en inglés de *Polymerase Chain Reaction* o Reacción en Cadena de la Polimerasa. La idea básica de la técnica es sintetizar muchas veces un pedazo de fragmento de ADN utilizado en una polimerasa que puede trabajar a temperaturas muy elevadas, ya que proviene de la bacteria *Thermus aquaticus* que vive en altas temperaturas (de 79 a 85 °C), de ahí su nombre comercial más conocido: Taq polimerasa.

Cuando se realiza una reacción PCR se simula lo que sucede en la célula cuando se sintetiza el ADN, se mezclan todos los ingredientes necesarios para hacerlo: la polimerasa, el ADN del organismo que se estudia, los oligonucleótidos o llamados también iniciadores necesarios para que se inicie la transcripción, dinucleótidos (dNTPs), y las condiciones para que la enzima trabaje adecuadamente (cierto pH, determinadas cantidades de magnesio en forma de MgCl<sub>2</sub>, KCl, y pueden necesitarse otras sales o reactivos, dependiendo de cada polimerasa).

Esta técnica tiene muchas aplicaciones y se ha convertido en una herramienta muy importante en la biología molecular; sus aplicaciones van desde la genética de poblaciones, evolución molecular, genómica, hasta la medicina forense (Ferreira & Grattapaglia, 1998).



### **2.8.1 Fases de la PCR**

Según Ferreira & Grattapaglia (1998), un ciclo de PCR consta de tres etapas: desnaturalización, pareamiento y elongación o polimerización.

En la primera, el ADN de doble cadena es desnaturalizado mediante el aumento de la temperatura que puede variar de 92 a 95°C. En la segunda etapa, la temperatura es rápidamente reducida entre 35° y 60°C, dependiendo esencialmente del tamaño y secuencia del iniciador utilizado, permite la hibridación ADN-ADN de cada iniciador con las secuencias complementarias que flanquean la región “blanco”. Enseguida la temperatura es elevada a 72 °C para que la enzima de ADN polimerasa realice la extensión de la cadena a partir de cadena terminal 3’ de los iniciadores mediante la incorporación de nucleótidos, utilizando como molde la “secuencia-blanco”.

Esta extensión comprende la adición de nucleótidos utilizando como molde la secuencia-blanco, de manera que una copia de esta secuencia es producida en el proceso.

Este ciclo se repite algunas decenas de veces. Una vez que la cantidad de ADN de la secuencia-blanco se duplica en cada ciclo, la amplificación sigue una progresión geométrica de manera que, después de unos 20 ciclos, se produce más de un millón de veces la cantidad inicial de secuencia-blanco.

Esta escala de amplificación permite, por lo tanto, iniciar con cantidades mínimas de ADN (del orden de algunos picogramos o nanogramos) y terminar la reacción con grandes cantidades de ADN de la secuencia específica de interés.

### **2.8.2 Marcadores basados en PCR (Polymerase Chain Reaction)**

Existen varios tipos de marcadores de ADN como son:

- RFLP (restriction fragment length polymorphism).
- RAPD's (random amplified polymorphic).
- AFLP's (amplified fragment length polymorphism).
- SSR's (secuencia simple repetida o microsatélites). Phillips (1998).

### **2.8.3 RFLP**

Restriction fragment length polymorphism (polimorfismos en longitud de fragmentos de restricción), son los marcadores moleculares más antiguos y aún son usados para algunas aplicaciones importantes como mapeo comparativo y estudio de sintenia entre especies (Levitus *et al.*, 2010).

### **2.8.4 RAPD's**

Según Waugh y Powell (1992), citados por Azofeifa (2006), los polimorfismos producidos con la técnica RAPD se denominan marcadores RAPD's, y pueden resultar de cualquier cambio en la secuencia o sitio de unión del iniciador (mutación puntual), lo cual impide que el iniciador se una a la cadena, o también pueden ser el producto de cambios que alteren el tamaño o impidan la exitosa amplificación del ADN molde.

### **2.8.5 AFLP's**

Vos *et al.* (1995) citado por Gonzales (1998), indican que el polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados o AFLP se basa en la amplificación selectiva de los fragmentos de restricción del ADN genómico usando PCR, esta involucra primero la digestión del ADN genómico con las enzimas de restricción.

### **2.8.6 Microsatélites**

Los microsatélites son secuencias consecutivas de nucleótidos (1 a 6 bases nucleótidos), repetidas hasta 50 veces, flaqueadas en sus extremos por secuencias únicas, las cuales se mantienen estables dentro de una misma especie.

Estas secuencias se encuentran localizadas en diferentes partes del genoma, son abundantes, muy variables en el número de copia de los microsatélites y por ende altamente polimórficos entre individuos (Davierwala *et al.*, 2001).

Según Ferreira & Grattapaglia (1998), los microsatélites han sido observados en diversos organismos como en seres humanos, ballenas, ratones, bovinos y caprinos, entre otros.

Weising *et al.*, 1989 y Beyermann *et al.*, 1992, citados por Ferreira & Grattapaglia (1998), mencionan que, en plantas, su existencia había sido sugerida cuando se observó que oligonucleótidos compuestos por elementos repetidos del tipo TG y GATA/GACA, detectaban polimorfismos cuando se utilizaban como sondas RFLP. También en

plantas, una búsqueda de bancos de datos de secuencias de ADN publicadas, reveló que los sitios de microsatélites están ampliamente distribuidos con una frecuencia de uno cada 50 mil pares de bases.

La determinación del polimorfismo SSR se realiza con un PCR y la separación de los productos mediante electroforesis en geles de agarosa, poliacrilamida o geles de número de unidades repetidas (Lowe *et al.*, 2000).

En las variedades de cacao, los estudios de diversidad utilizando marcadores moleculares son más bien escasos a nivel mundial en lo que concierne a cacao.

Quiroz (2002) realizó una caracterización molecular de 63 genotipos de cacao procedente de Costa Rica y una evaluación morfológica de 51 clones de la Estación Experimental de Pichilingue (Ecuador), además, a tres genotipos de referencia de los tipos genéticos: Trinitarios (UF-676), Forastero Amazónico (Matina) y Criollo (Criollo-36); el dendograma para los 63 clones de cacao demostró la no conformación de grupos genéticos específicos, pero sí separados por su origen y constitución genética.

En otro estudio, Cryer *et al.* (2006), realizaron el primer esfuerzo para la sistematización de microsatélites a nivel internacional. (Lodoño *et al.*, 2011).

Los marcadores moleculares se caracterizan por estar ampliamente distribuidos en todo el genoma, tener herencia mendeliana y no estar influenciados por el medio ambiente, por lo cual resultan adecuados para su

utilización en la identificación varietal de especies y la caracterización de la diversidad genética.

Los microsatélites (*Single Sequence Repeats*, SSRs) son marcadores moleculares altamente polimórficos y su característica de ser codominantes los potencia como una herramienta muy poderosa para generar una identificación confiable de organismos y permitir una evaluación adecuada de la diversidad genética (Tolares *et al.*, 2005).

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1 Ubicación geográfica**

La investigación se la realizó desde marzo hasta diciembre del año 2013, a cargo del Programa de Cacao, en conjunto con el Laboratorio de Biotecnología de la Estación Experimental del Litoral Sur “Dr. Enrique Ampuero Pareja” del Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP); ubicado en las coordenadas geográficas 2°15’15”, latitud Sur y 79°30’40” de longitud occidental a 17msnm, en el km 26, al este de Guayaquil, en la vía Durán – Tambo, parroquia Virgen de Fátima del cantón Yaguachi, provincia del Guayas.<sup>1/</sup>

#### **3.2 Fases experimentales**

La colecta del material vegetal de la colección Allen se la realizó en la Estación Experimental Tropical Pichilingue, con las siguientes características climáticas y edafológicas del banco de germoplasma<sup>1/</sup>:

Temperatura promedio:	25.47 °C
Humedad relativa promedio:	85.84 %
Precipitación anual:	2,223.85 mm
Heliofanía promedio:	898.66
Altitud:	75 msnm
Textura:	franco – arcilloso

<sup>1/</sup> [www.iniap.gob.ec/nsite/index.php?option](http://www.iniap.gob.ec/nsite/index.php?option)

### 3.2.1 Materiales vegetales experimentales

Los materiales a caracterizar fueron seleccionados de forma arbitraria dentro de la colección Allen. En el siguiente cuadro se especifica cada uno de los genotipos colectados:

**Cuadro 1. Colección ALLEN**

Nombre Varietal	Grupo Genético-Genealogía	País origen	Accesión Código/colección	Lugar
c CCN-51	(imc-67*ics-95)*Forastero	ECUADOR	BGC-015	EETP
c SCA-6	Forastero Alto amazonas	PERU	BGC-045	EETP
c SCA-12	Forastero	PERU	BGC-045	EETP
c EET-233	Trinitario*Criollo	VENEZUELA	.....	EETP
c EET-387	HIB CG*SCA-12	ECUADOR	.....	EELP
c EET-536	Nacional	ECUADOR	.....	EELP
c EET 545	Nacional	ECUADOR	.....	EELP
c EET 548	Nacional	ECUADOR	.....	EETP
c EET 551	Nacional	ECUADOR	.....	EETP
c EET-574	Nacional	ECUADOR	.....	EETP
LCT-6 S/3	Amazónico	ECUADOR	Allen	EETP
LCT-6 S/9	Amazónico	ECUADOR	Allen	EETP
LCT-10 S/7	Amazónico	ECUADOR	Allen	EETP
LCT-10 S/8	Amazónico	ECUADOR	Allen	EETP
LCT-23 S/3	Amazónico	ECUADOR	Allen	EETP
LCT-24 S/2	Amazónico	ECUADOR	Allen	EETP
LCT-28 S/1	Amazónico	ECUADOR	Allen	EETP
LCT-30	Amazónico	ECUADOR	Allen	EETP
LCT-62 S/7	Amazónico	ECUADOR	Allen	EETP
LCT-62 S/8	Amazónico	ECUADOR	Allen	EETP
LCT-66 S/4	Amazónico	ECUADOR	Allen	EETP
LCT-72 S/4	Amazónico	ECUADOR	Allen	EETP
LCT-77	Amazónico	ECUADOR	Allen	EETP
LCT-77 S/10	Amazónico	ECUADOR	Allen	EETP
LCT-83 S/3	Amazónico	ECUADOR	Allen	EETP
LCT-83 S/7	Amazónico	ECUADOR	Allen	EETP
LCT-84 S/2	Amazónico	ECUADOR	Allen	EETP
LCT-109 S/7	Amazónico	ECUADOR	Allen	EETP
LCT-121	Amazónico	ECUADOR	Allen	EETP
LCT-189	Amazónico	ECUADOR	Allen	EETP
LCT-202 S/1	Amazónico	ECUADOR	Allen	EETP
LCT-205 S/5	Amazónico	ECUADOR	Allen	EETP
LCT-214 S/4	Amazónico	ECUADOR	Allen	EETP
LCT-244 S/2	Amazónico	ECUADOR	Allen	EETP
LCT-278	Amazónico	ECUADOR	Allen	EETP
LCT-295 S/8	Amazónico	ECUADOR	Allen	EETP
LCT-312	Amazónico	ECUADOR	Allen	EETP
LCT-324	Amazónico	ECUADOR	Allen	EETP
LCT-326	Amazónico	ECUADOR	Allen	EETP
LCT-329	Amazónico	ECUADOR	Allen	EETP
LCT-347	Amazónico	ECUADOR	Allen	EETP
LCT-367	Amazónico	ECUADOR	Allen	EETP
LCT-405 S/2	Amazónico	ECUADOR	Allen	EETP
LCT-436	Amazónico	ECUADOR	Allen	EETP
LCT-436 S/2	Amazónico	ECUADOR	Allen	EETP
LCT-436 S/5	Amazónico	ECUADOR	Allen	EETP
LCT-437 S/3	Amazónico	ECUADOR	Allen	EETP
LCT-437 S/6	Amazónico	ECUADOR	Allen	EETP
EBC-138	Amazónico	ECUADOR	Allen	EETP
EBC-142	Amazónico	ECUADOR	Allen	EETP

### 3.3 Fase de laboratorio

Una vez realizada la recolección de los genotipos de la colección Allen, el proceso de extracción se lo realizó en la EELS, donde se llevó a cabo la investigación hasta la fase de formación de matrices de datos, obtenidos previamente por genotipage de las muestras.

### 3.4 Manejo específico del experimento

#### 3.4.1 Colecta del material vegetal

La colecta de las accesiones se realizó tomando dos hojas con las siguientes características: hojas jóvenes, sin daño por insectos, sin daños mecánicos, expuestas al sol y con tonalidad verde oscuro.

Las hojas se colocaron en bolsas de papel debidamente rotuladas con el código de la accesión y el número del árbol seleccionado luego fueron puestas en una funda. Posterior a ello fueron trasladadas al laboratorio en una hielera con una temperatura por debajo de los 10 °C.



**Figura 1. Genotipos de la colección Allen (A). Identificación y colecta de los genotipos (B). Rotulación de las muestras colectadas (C). Conservación para el traslado de las muestras (D). Temperatura de traslado por debajo de los 10 °C (E). Limpieza de material vegetal en laboratorio (F).**



### 3.4.2 Extracción de ADN genómico

Partiendo de la validación de un método de extracción se probaron distintos protocolos utilizados en materiales de *Theobroma*, siendo el descrito por Doyle y Doyle, modificado por Faleiro *et al.* (2002), el que arrojó mejores resultados, en comparación por el descrito por EMBRAPA (2010).

El proceso del protocolo de extracción de ADN de Doyle y Doyle (1987), modificado por Faleiro *et al.* (2002), se lo llevó de la siguiente manera:

**Cuadro 2. Tampón de extracción.**

Reactivos	Concentración final	Cantidad para 15 muestras
CTAB 7%	2,8 %	6 mL
NaCl 5 M	1,3 M	4 mL
EDTA (0,5 M)	20 mM	0,6 mL
TRIS-HCL (pH 8,0)	100 mM	1,5 mL
PVP 40 (SÓLIDO)	1 %	0,15 g
$\beta$ – Mercaptoetanol	0,2 %	30 $\mu$ L
Agua MILLI-Q		

1. Preparar en un vaso de precipitación el tampón de extracción. Se necesita aproximadamente 1 mL de tampón para muestras a extraerse. Calentar el tampón, en un baño María a 65 °C.

2. Macerar una hoja en nitrógeno líquido, utilizando mortero hasta que el tejido se convierta en polvo. Transferir una pequeña cantidad de la maceración (hasta ½ tubo) a microtubos Eppendorf, de un volumen de 1.5 ml debidamente identificados. Hacer este paso lo antes posible para evitar la oxidación del material.
3. Añadir 800µL de tampón por muestra.
4. Mezclar en vórtex y añadir 5µL de proteinasa K, concentración de 20 mg/µL; colocar en baño María a 65 °C durante una hora, revolviendo continuamente de 10 en 10 minutos.
5. Retirar del baño María y dejar enfriar a temperatura ambiente.
6. Adicionar 700µL de una mezcla de cloroformo-álcohol isoamílico, proporción 24:1 y agitar el tubo con suaves inversiones por 10 minutos hasta que esté turbio. Centrifugar por 10 minutos a 14.000 rpm en microcentrifuga, a 4 °C.
7. Extraer el sobrenadante a nuevos tubos, debidamente identificados, adicionar 55µL de CTAB al 7 %, mezclar durante cinco minutos y repetir el paso 6.
8. Recuperar el sobrenadante y añadir 700µL de isopropanol frío, mezclar por inversión durante cinco minutos y poner a -20 °C durante 30 minutos, o a 4 °C toda la noche.
9. Centrifugar durante 10 minutos a 14.000 rpm. Un precipitado blanco se formará en el fondo del tubo. Eliminar el sobrenadante, lavar este precipitado de una a dos veces con etanol al 70 % para quitar la sal

presente. Secar el precipitado (pellet) a temperatura ambiente durante 15 a 20 minutos.

**10.** Resuspender el ADN en 100µL de agua con RNAsa a una concentración final de 40 mg/mL y colocar en baño María a 37 °C para disolver el precipitado.

**11.** Añadir NaCl concentración 5M en una proporción de 1:10 (NaCl : ADN resuspenso). Añadir 2/3 del volumen de isopropanol frío para precipitar el ADN otra vez.

**12.** Incubar en el refrigerador a 4 °C durante la noche o a -20 °C durante tres horas.

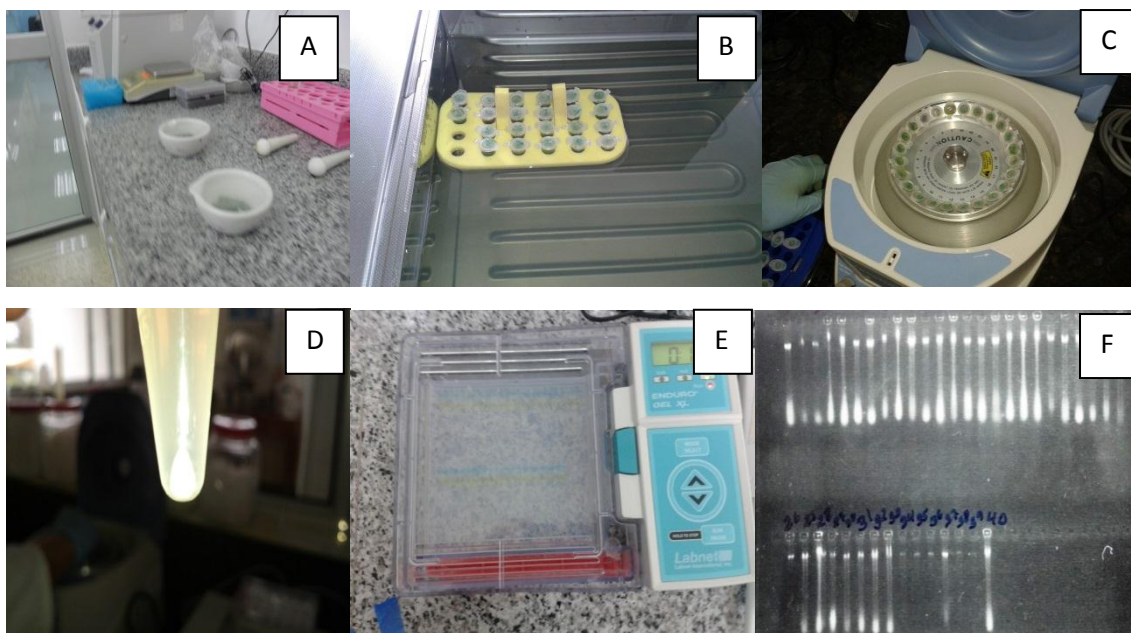
**13.** Repetir el paso 9 y resuspender el precipitado final en 100 µL de agua.

### **3.4.3 Cuantificación de ADN**

Se la realizó mediante visualización en comparación con un marcador de talla y peso molecular *Low Mass Ladder*. Cat No. 10068013 INVITROGEN.

Sobre un pedazo de parafilm se colocó 1µL de blue juice por cada muestra, a esto se adicionó 3µL de ADN. Se preparó un gel de agarosa al 0.8 %, el mismo que se colocó en la cámara de electroforesis, posteriormente en el gel se cargó 2µL de la mezcla (BJ+ADN) utilizando una micropipeta con una punta para cada muestra, dejando el primer pozo para el marcador de talla; luego se migró en el buffer de corrida TAE 1X pH 8,0 por 25 minutos a 100 voltios en cámara de electroforesis horizontal marca LABNET modelo ENDURO GEL XL INTERNATIONAL.

Posteriormente se tiñó el gel en una solución de TAE 1X con Sybr Green por cada 10mL de TAE 1X / 3μL de Sybr Green, para luego su análisis visual.



**Figura 2. Maceración de tejido vegetal (A); muestras sometidas a baño María 45 minutos a 65 °C (B); centrifugación de las muestras (C); pellet de ADN en microtubo (D); corrida en cámara de electroforesis horizontal (E); visualización en foto-documentador de los ADN resultantes en gel de agarosa (F).**

Una vez realizada la visualización se procedió a la corroboración de datos en un espectrofotómetro marca HITACHI; este instrumento tiene la capacidad de proyectar un haz de luz monocromática a través de una muestra y medir la cantidad de luz que es absorbida por dicha muestra.

Los datos obtenidos por el espectrofotómetro se muestran en el (Cuadro 3), a continuación:

**Cuadro 3. Resultados obtenidos por el espectrofotómetro.**

<b>Accesión</b>	<b>Absorbancia</b>
LCT-6 S/3	0.020
LCT-6 S/9	0.021
LCT-10 S/7	0.022
LCT-10 S/8	0.018
LCT-23 S/3	0.019
LCT-24 S/2	0.017
LCT-28 S/1	0.019
LCT-30	0.021
LCT-62 S/7	0.022
LCT-62 S/8	0.017
LCT-66 S/4	0.016
LCT-72 S/4	0.017
LCT-77	0.020
LCT-77 S/10	0.021
LCT-83 S/3	0.021
LCT-83 S/7	0.019
LCT-84 S/2	0.018
LCT-109 S/7	0.017
LCT-121	0.021
LCT-189	0.023
LCT-202 S/1	0.021
LCT-205 S/5	0.019
LCT-214 S/4	0.013
LCT-244 S/2	0.019
LCT-278	0.015
LCT-295 S/8	0.016
LCT-312	0.021
LCT-324	0.020
LCT-326	0.011
LCT-329	0.021
LCT-347	0.019
LCT-367	0.018
LCT-405 S/2	0.019
LCT-436	0.021
LCT-436 S/2	0.019
LCT-436 S/5	0.017
LCT-437 S/3	0.017
LCT-437 S/6	0.021
EBC-138	0.019
EBC-142	0.019
c CCN-51	0.025
c SCA-6	0.025
c SCA-12	0.037
c EET-233	0.028
c EET-387	0.027
c EET-536	0.046
c EET 545	0.024
c EET 548	0.028
c EET 551	0.026
c EET-574	0.025

### 3.4.4 Amplificación de ADN

Se realizó un test de integridad de las muestras, con el fin de observar si los ADN extraídos están en condiciones de amplificación para posteriormente realizar las corridas electroforéticas en geles desnaturalizantes de acrilamida; la amplificación de las 50 muestras de ADN extraídas se la realizó utilizando un primer mTcCIR37 (CTGGGTGCTGATAGATAAT-ATTTGTGTGGAGGGTATT). Cada reacción llegó a un volumen final de 7.52  $\mu$ L, como se muestra en el Cuadro 4.

**Cuadro 4. Coctel de amplificación.**

ADN		2 $\mu$ l
Buffer PCR		1.5 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub>		0.6 $\mu$ l
DNTPs		0.38 $\mu$ l
Primer Forward		0.38 $\mu$ l
Primer Reverse		0.38 $\mu$ l
Taq		0.1 $\mu$ l
AUP		2.18 $\mu$ l

Se dispensó el mix en una placa de PCR, con el volumen correspondiente por reacción, luego se centrifugó y se agregó aceite mineral para evitar la evaporación de las muestras. La PCR se realizó en un termociclador marca Eppendorf, con el siguiente ciclaje:

<b>Wait</b>	<b>Auto</b>
T= 94°	0:05:00
T= 94°	0:00:45

**T= 51°      0:01:00 Temperatura de anillamiento**

T= 72°      0:02:00

GO TO      REP 29

T= 72°      0:07:00

T= 10°      0:05:00

Cada amplificación se llevó a cabo en dependencia de la temperatura de anillamiento de cada marcador; los productos amplificados fueron visualizados en geles de agarosa al 2%, cargando 3 µL por cada pozo y se dejó migrar por 25 minutos a 100 voltios.

Una vez pasado el test de integridad de las muestras, se utilizó un mix PCR M13 detallado a continuación en el Cuadro 5 que presenta su volumen por una unidad de reacción, el mismo que fue ajustado por números de muestras y para la utilización de Dúplex, con la finalidad de poder visualizar dos marcadores por gel genotipado.

**Cuadro 5. Cantidades de cada componente del coctel SSR-M13.**

<b>REACTIVO</b>	<b>1Rx/<math>\mu</math>L</b>
ADN (5ng/ $\mu$ L)	1.00
Tampón 5x	1.00
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	0.50
dNTP's (5mM)	0.20
M13 700 - 800 ( 1 $\mu$ M)	0.50
Cebador Forward- M13 (1 $\mu$ M)	0.05
Cebador Reverse (10 $\mu$ M)	0.08
Taq polimerasa (5U/ $\mu$ L)	0.05
Agua ultra pura	1.62
<b>Volumen final</b>	<b>5.00</b>

### **3.4.5 Tinción**

Para la tinción de los productos amplificados se utilizó un marcaje M13 en dos categorías:

- Marcaje 700
- Marcaje 800

### **3.4.6 Secuenciación**

Cada uno de los 50 genotipos fue evaluado con 11 primers que se seleccionaron del listado internacional de marcadores microsatélites para



cacao. Se tomaron en cuenta los más discriminatorios, según estudios realizados por Cryer *et al.* (2006), Johnson *et al.* (2007), Lemes *et al.* (2009), Loor *et al.* (2009), Saunders *et al.* (2004) y Zhang *et al.* (2009), detallados a continuación: **mTcCIR1, mTcCIR33, mTcCIR7, mTcCIR290, mTcCIR58, mTcCIR37, mTcCIR8, mTcCIR15, mTcCIR22, mTcCIR26 , y, mTcCIR12.**

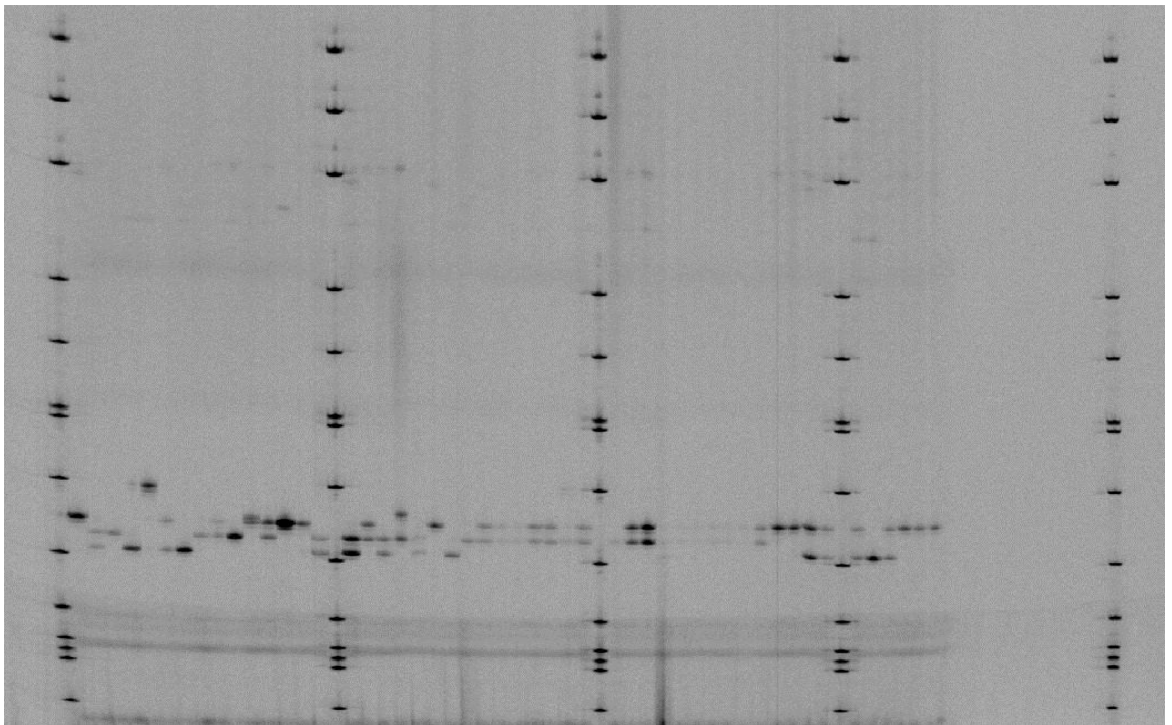
### **3.4.7 Corrida electroforética**

Posterior a la amplificación de la totalidad de las muestras se realizaron las corridas electroforéticas en el equipo LICOR 4300, que utiliza electroforesis vertical en geles desnaturalizantes, que es una solución de Acrilamida Invitrogen, particular para este equipo, más persulfato de amonio y temed, utilizados para la polimerización del gel.

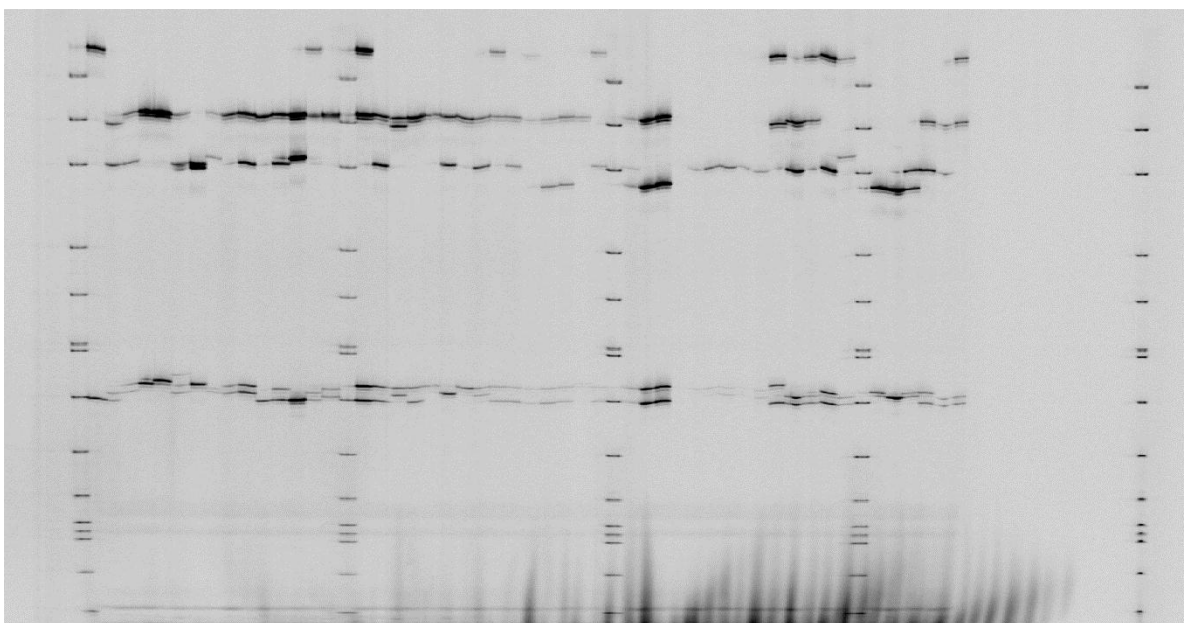
Una vez colocadas las muestras en las placas con los geles en un volumen de 1  $\mu$  por cada pozo se realizó la migración de las muestras durante 30 minutos.

### **3.4.8 Foto-documentación**

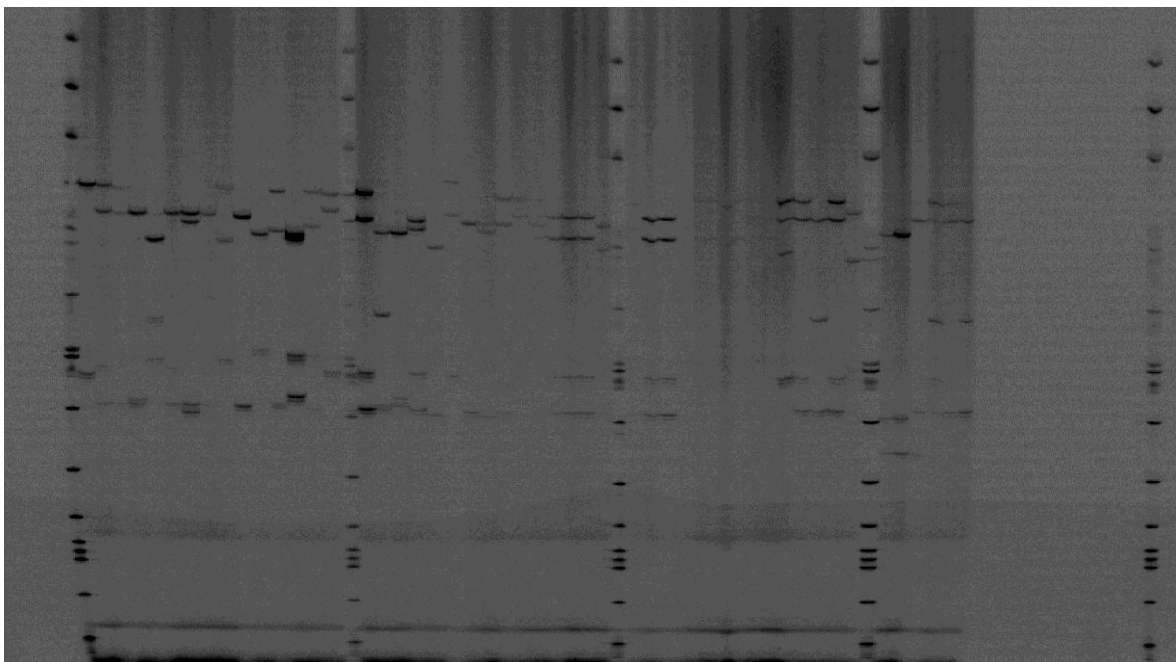
Las imágenes obtenidas por el secuenciador fueron analizadas en el software SAGA, el mismo que proporciona el tamaño exacto de los alelos del SSR que permitió el genotipage de la totalidad de las accesiones en investigación.



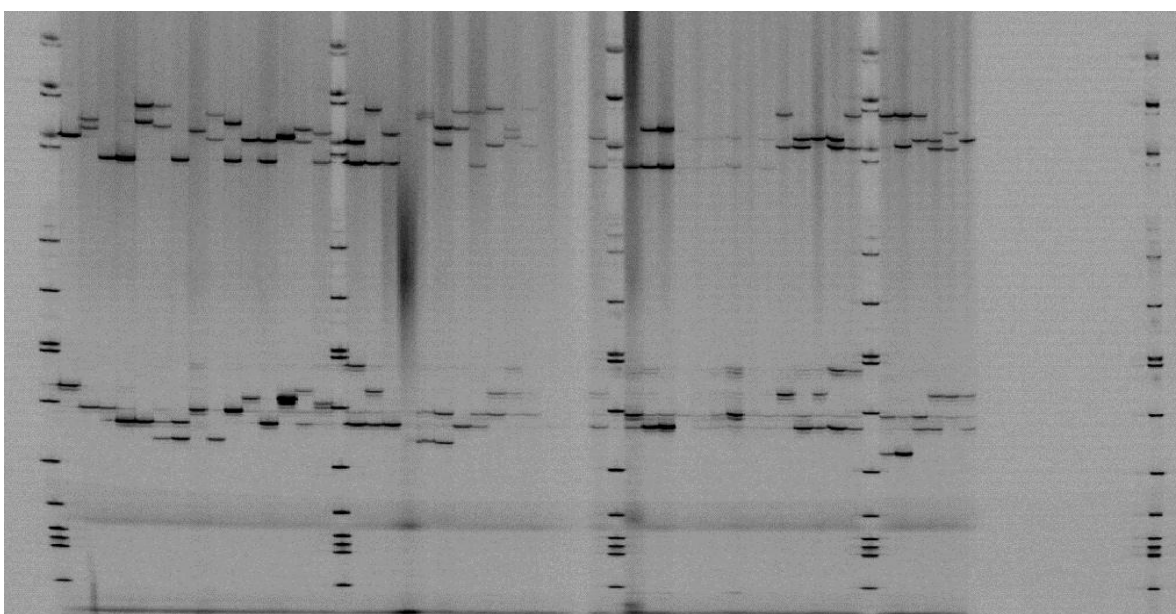
**Figura 3. Foto-documentación de los patrones de bandas del SSR mtc CIR1.**



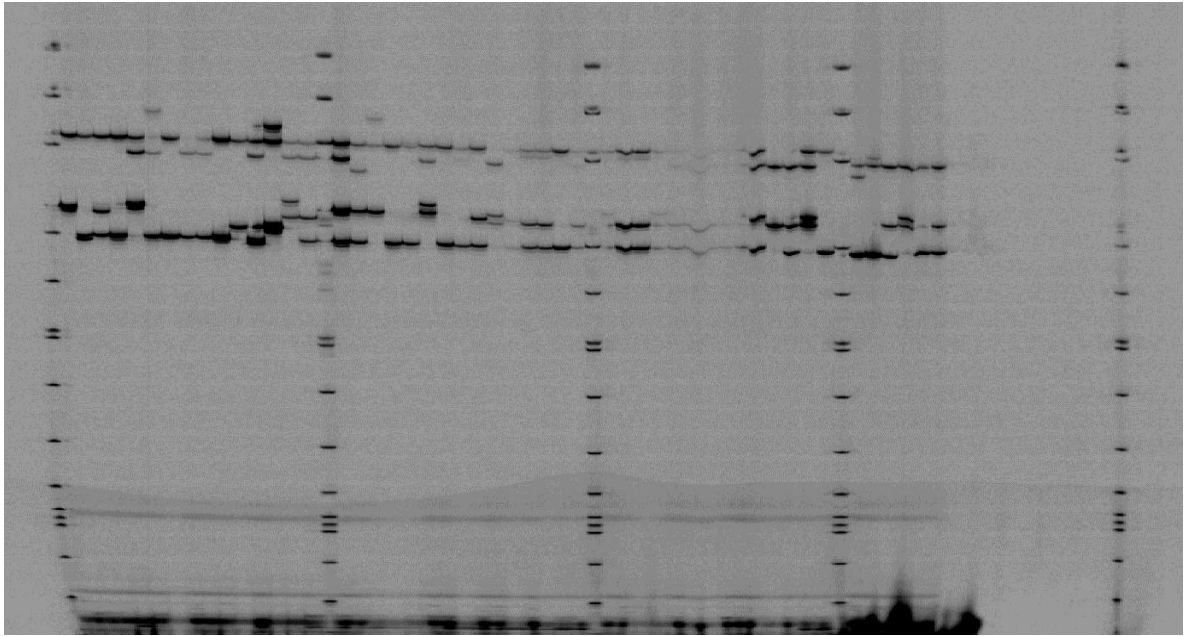
**Figura 4. Dúplex 3, marcador CIR 7 – CIR 33, anillamiento 51 °C, marcaje 700.**



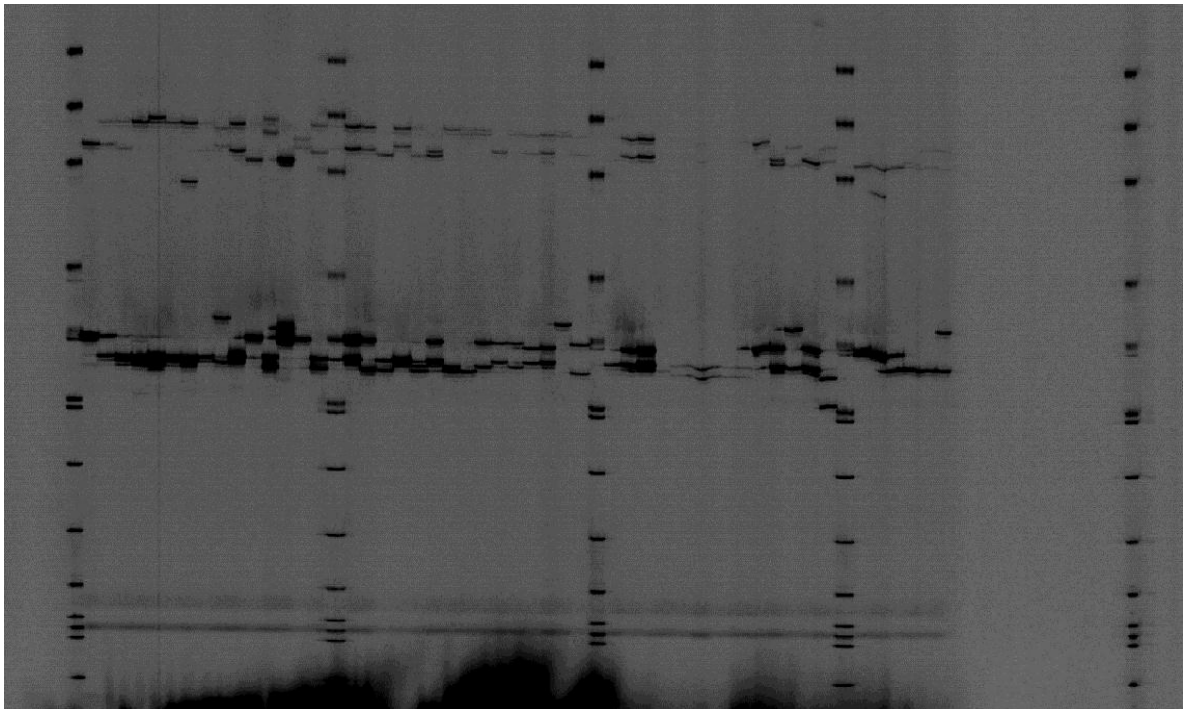
**Figura 5. Dúplex 5, marcador CIR 290 – CIR 58, anillamiento 46 °C, marcaje 700.**



**Figura 6. Dúplex 6, marcador CIR 37 – CIR 8, anillamiento 46 °C, marcaje 800.**



**Figura 7. Dúplex 8, marcador CIR 15 – CIR 22, anillamiento 46 °C, marcaje 700.**



**Figura 8. Dúplex 9, marcador CIR 26 – CIR 12, anillamiento 51 °C, marcaje 800.**

### 3.4.9 Análisis de datos

Una vez genotipados los locus se documentó y se transformó en matrices de datos para ser analizados estadísticamente.

### 3.5 Análisis estadístico

El análisis se lo realizó mediante pruebas estadísticas no paramétricas de comparación de dos matrices, que permitió determinar si existe correlación entre las muestras.

Los datos genotipados se procesaron mediante un software estadístico (Power Marker), con el cual se estimaron los parámetros genéticos, donde las distancias genéticas permitieron generar una matriz de distancias entre las unidades taxonómicas operativas (UTO) que fueron calculadas a partir de los patrones de bandas.

Las distancias se definen como  $I-S$ , siendo  $S$  el coeficiente de similitud; el cual fue estimado por el coeficiente de Nei 1973 (Nei, 1978).



Donde,  $S_{ij}$  es la similitud entre las UTO  $i$  y  $j$ ;  $a$  es el número de bandas presentes en ambas UTO  $i$  y  $j$ ;  $b$ , es el número de bandas presentes en  $i$  y ausentes en  $j$ , y  $c$  es el número de bandas presentes en  $j$  y ausentes en  $i$ .

La distancia genética para la construcción de la matriz de distancias y el dendrograma se define como  $1-S_{ij}$ . Para la construcción del dendrograma se realizó el análisis de agrupamiento aplicando el algoritmo UPGMA (ligamiento promedio utilizando la media aritmética no ponderada). Las frecuencias alélicas se estimaron utilizando la expresión:


$$p_u = \frac{n_u}{2n}$$

Donde  $n_u$  representa los conteos totales de alelos de tipo  $u$  y  $2n$  es el número total de alelos en un locus dado.

## IV. RESULTADOS

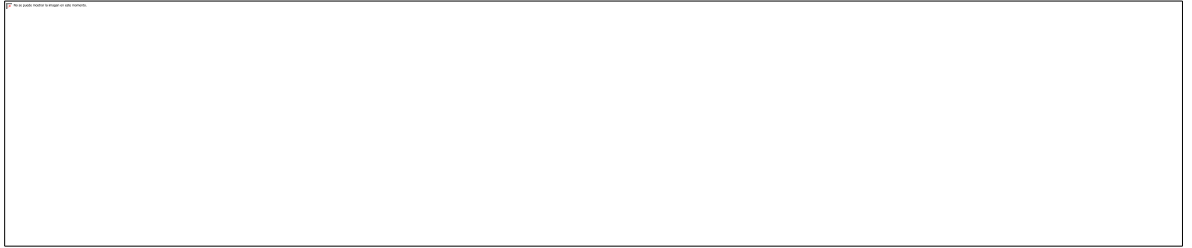
### 4.1 Extracción y cuantificación

Se planteó como objetivo de esta investigación la validación de un protocolo de extracción para material vegetal de cacao, partiendo de dos protocolos de extracción: EMBRAPA (2010) y el protocolo Doyle y Doyle modificado por Faleiro *et al.* (2002), siendo el protocolo Doyle y Doyle del que se obtuvo mejores resultados en cuanto a calidad y cantidad del producto final (Figura 9).

Para la extracción de ADN las muestras contaban con las siguientes características: hojas sanas, fotosintéticas, expuestas al sol.

El peso aproximado por muestra a procesarse de hoja fresca es de 0.7g, obteniendo un valor promedio en concentración de ADN 209 ng/mL por la totalidad de las muestras.

La calidad de las muestras se vio comprometida por la acumulación de fenoles en el producto final que causaba una oxidación al pellet de ADN, el mismo que fue corregido aumentando la cantidad de lavados con el buffer de lavado (etanol 70%), sin poder evitar el desprendimiento del pellet, perdiendo en un mínimo la cantidad de ADN. La concentración por cada clon estudiado se detalla en el (Cuadro 6).



**Figura 9. Comprobación del proceso de extracción en gel de agarosa al 0.8%.**

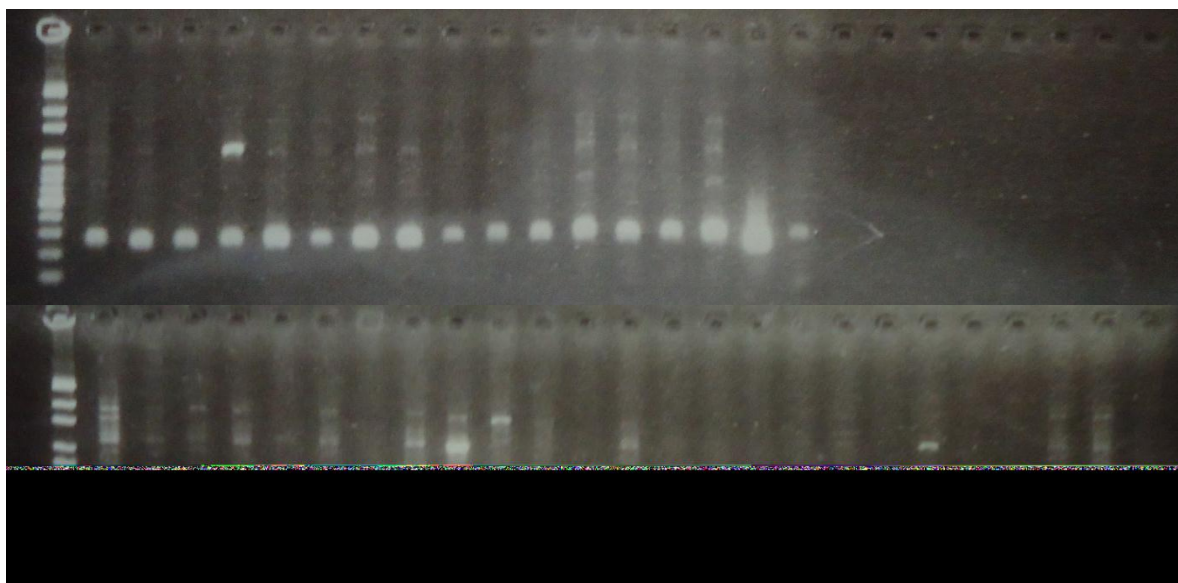
**Cuadro 6. Concentración final de stock de muestras de ADN de cada clon estudiado.**

A large, empty rectangular box with a thin black border, intended for a table or data visualization related to the final concentration of DNA stock samples.



## 4.2 Amplificación de ADN

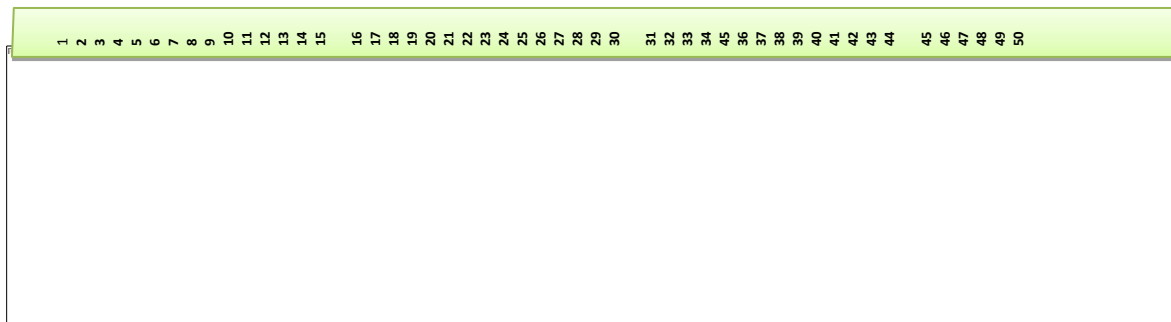
Una vez realizada la validación de las muestras con un marcador SSR conocido como mtcCIR37, las mismas presentaron un buen bandeo (Figura 10). Se realizó la amplificación con la totalidad de los primers seleccionados.



**Figura 10.** Test de amplificación de las muestras utilizando el marcador SSR CIR 37 en gel de agarosa al 2%.

## 4.3 Secuenciación y foto-documentación

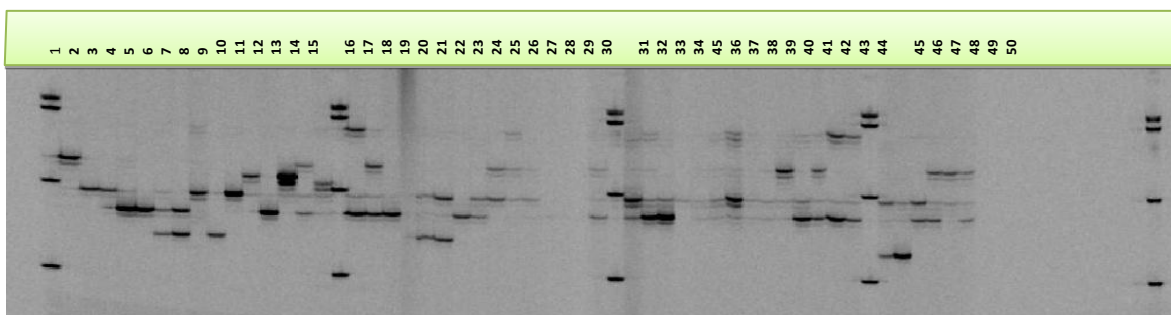
Una vez verificada la información que nos brindan los geles de agarosa al 2 % en cuanto a la calidad de las muestras, se procedió al montaje de las mismas en el secuenciador. Culminado este proceso se dio lugar a la visualización de los patrones de bandas generados por cada uno de los marcadores SSR y su posterior foto-documentación (Figuras: 11-21).



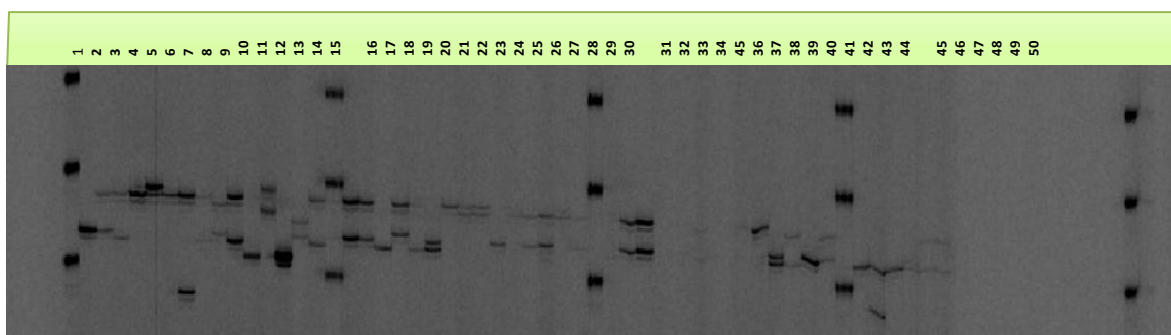
**Figura 11. Foto-documentación de productos amplificados con SSr mtcCIR 1.**



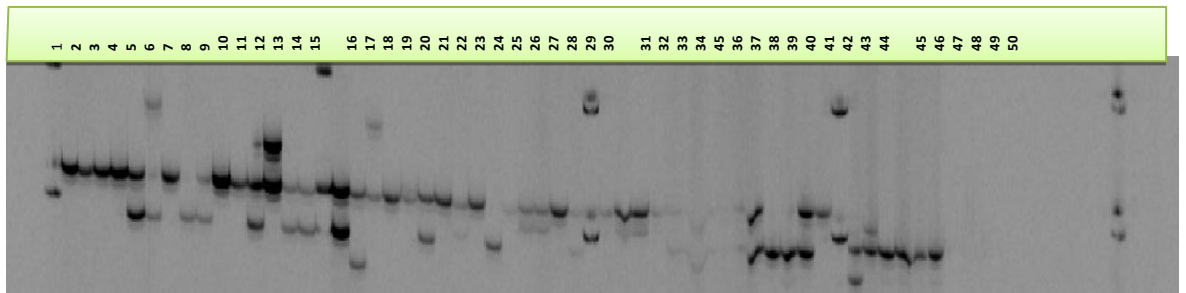
**Figura 12. Foto-documentación de productos amplificados con SSr mtcCIR 7.**



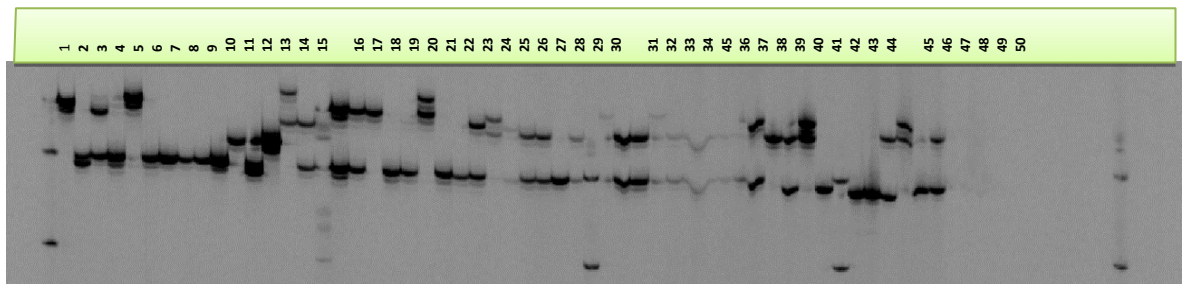
**Figura 13. Foto-documentación de productos amplificados con SSr mtcCIR8.**



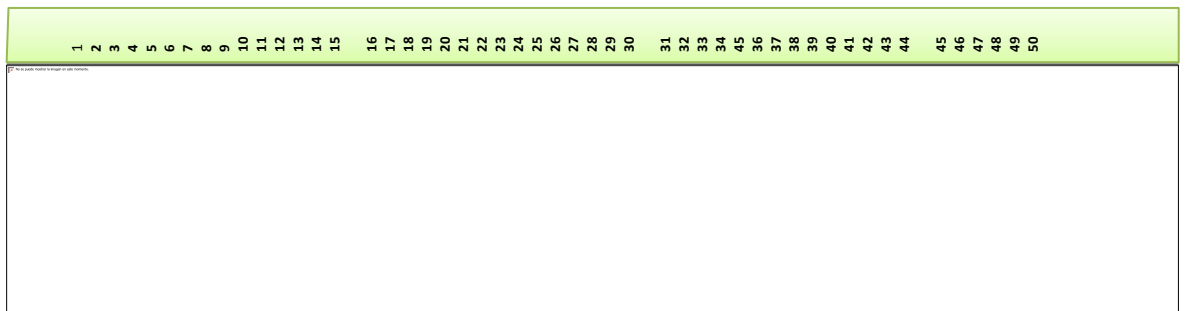
**Figura 14. Foto-documentación de productos amplificados con SSr mtcCIR 12.**



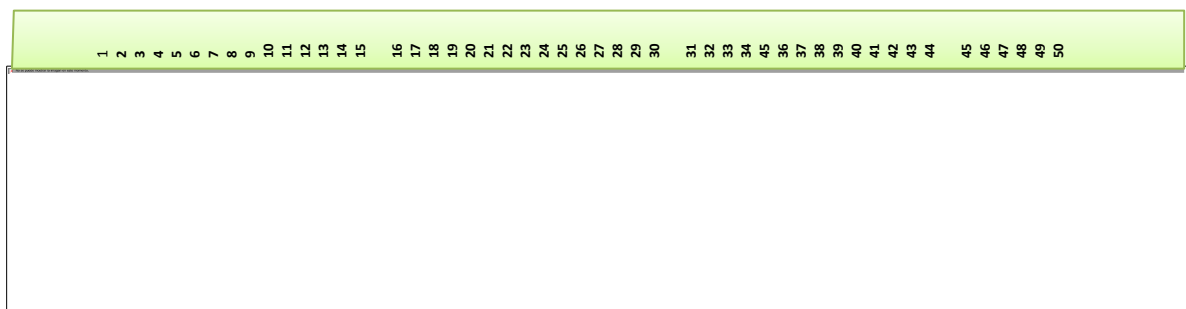
**Figura 15.** Foto-documentación de productos amplificados con SSR mtcCIR 15.



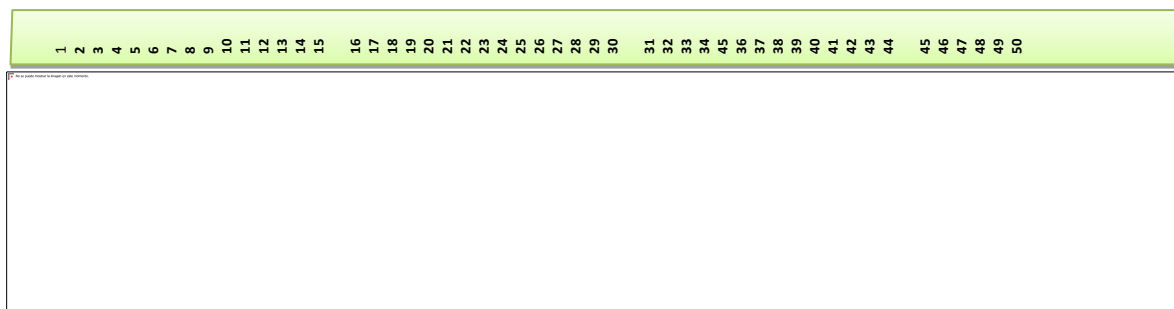
**Figura 16.** Foto-documentación de productos amplificados con SSR mtcCIR 22.



**Figura 17.** Foto-documentación de productos amplificados con SSR mtcCIR 26.



**Figura 18.** Foto-documentación de productos amplificados con SSR mtcCIR 33.



**Figura 19.** Foto-documentación de productos amplificados con SSr mtcCIR 37.



**Figura 20.** Foto-documentación de productos amplificados con SSr mtcCIR 58.



**Figura 21.** Foto-documentación de productos amplificados con SSr mtcCIR 290.

Después de la visualización con cada uno de los marcadores se realizó el genotipaje de las mismas, generando una matriz binaria de datos a la cual se le restó los 19 pares de base de la cola del primer *forward* (Cuadro 7).

**Cuadro 7. Matriz depurada, obtenida por el LICOR 4300.**

	mTcCIR1		mTcCIR33		mTcCIR7		mTcCIR290		mTcCIR58		mTcCIR37		mTcCIR8		mTcCIR15		mTcCIR22		mTcCIR12		mTcCIR26	
Sample	Alelo1	Alelo2	Alelo1	Alelo2	Alelo1	Alelo2	Alelo1	Alelo2	Alelo1	Alelo2	Alelo1	Alelo2	Alelo1	Alelo2	Alelo1	Alelo2	Alelo1	Alelo2	Alelo1	Alelo2	Alelo1	Alelo2
1	140	140	348	348	156	156	171	171	258	258	165	165	282	282	248	248	287	287	213	213	288	290
2	128	136	282	304	160	160	161	177	246	258	153	153	286	290	234	234	287	287	204	212	290	300
3	136	136	282	310	160	164	161	161	246	256	153	153	272	272	236	248	287	287	202	204	288	300
4	128	140	310	310	164	164	161	161	246	206	149	149	272	272	236	236	287	287	202	202	300	300
5	128	140	310	310	164	164	181	181	236	236	149	149	290	296	250	250	278	287	201	204	300	300
6	128	140	282	310	160	160	161	177	248	248	141	149	286	296	236	236	278	289	202	204	300	300
7	128	128	282	282	164	164	157	161	240	248	141	149	272	272	236	236	284	284	201	202	275	300
8	136	136	284	310	160	160	-1	-1	248	248	153	177	286	286	236	236	275	275	204	204	288	300
9	136	140	310	310	160	164	181	181	236	260	141	141	282	294	236	236	275	284	202	222	292	298
10	136	136	284	310	160	164	161	161	248	248	153	177	272	290	236	236	281	281	204	204	288	300
11	140	142	310	310	156	156	-1	-1	240	240	165	165	282	282	242	242	281	281	212	212	285	285
12	136	140	284	310	156	164	161	161	240	260	149	149	272	282	236	236	275	281	201	204	296	302
13	140	140	284	310	156	156	163	183	236	240	159	161	282	282	242	242	281	289	212	217	285	285
14	140	140	310	348	156	160	161	161	240	260	149	165	282	286	248	252	275	281	212	212	292	295
15	128	136	310	310	160	164	177	177	248	258	159	159	272	286	236	248	275	281	201	204	290	302
16	128	136	310	348	156	164	161	177	248	260	149	177	272	282	236	250	275	281	204	210	292	302
17	136	140	282	310	156	164	161	161	240	206	149	165	272	296	236	250	281	281	201	210	292	302
18	128	136	304	310	160	164	161	163	240	240	149	149	272	286	250	250	281	292	201	203	290	290
19	136	145	310	310	156	164	161	177	240	248	-1	-1	286	290	236	236	281	281	203	203	294	302
20	128	136	310	310	164	164	159	159	236	236	141	153	296	296	236	236	281	281	199	201	290	290
21	140	140	284	310	160	160	177	177	248	266	141	153	282	290	252	252	275	281	203	210	290	292
22	128	128	310	310	164	164	161	161	248	248	149	149	290	296	236	236	281	281	199	201	302	302
23	136	136	282	310	160	164	159	159	240	248	149	153	272	296	236	236	278	281	199	199	302	302
24	136	140	310	348	156	164	161	177	248	260	153	165	282	300	236	248	281	281	201	210	302	302
25	136	140	282	310	156	164	177	177	248	260	165	177	286	290	248	250	278	278	203	210	292	292
26	136	140	310	346	156	164	177	177	248	260	153	165	282	300	236	248	287	287	201	210	300	300
27	136	140	272	310	156	164	161	177	240	248	149	153	282	282	236	248	281	287	203	208	292	300
28	136	140	272	310	156	164	161	177	240	248	149	153	-1	-1	236	248	281	287	203	208	292	300
29	136	140	310	310	164	164	161	177	240	248	-1	-1	272	286	236	236	287	287	217	217	300	300
30	136	140	284	348	156	164	161	161	236	248	149	165	272	286	236	248	278	287	199	210	290	300
31	136	136	272	282	156	164	-1	-1	258	258	153	153	272	272	236	252	287	287	202	202	288	300
32	136	140	272	310	156	164	161	177	240	248	149	153	272	290	236	248	281	287	202	208	290	297
33	136	140	272	310	156	164	161	177	240	248	149	153	272	290	236	248	281	287	202	208	290	297
34	128	136	-1	-1	164	164	161	161	-1	-1	153	153	272	272	236	252	287	287	-1	-1	290	298
35	136	140	284	284	164	164	161	177	240	260	153	153	272	286	236	248	278	287	198	202	290	298
36	136	140	284	284	160	164	159	177	240	260	153	153	272	286	236	248	278	287	198	202	288	296
37	136	140	284	284	160	164	159	159	240	260	153	177	272	286	236	248	278	287	198	202	296	296
38	136	140	284	284	160	164	-1	-1	248	260	149	153	-1	-1	236	248	278	287	198	202	-1	-1
39	136	140	284	284	160	164	-1	-1	248	260	149	153	272	286	236	248	278	287	198	202	296	296
40	136	140	310	348	156	164	177	177	248	260	165	165	282	296	236	252	278	287	210	210	296	296
41	140	140	284	310	156	160	161	177	248	260	149	153	282	286	248	248	278	278	202	210	288	290
42	140	140	310	348	156	160	161	161	248	206	149	165	286	286	234	248	278	278	202	217	288	295
43	128	140	284	348	156	164	161	177	248	260	149	177	282	286	248	252	278	287	202	210	288	288
44	128	140	292	348	156	160	-1	-1	236	256	149	177	282	296	234	234	287	287	188	198	288	295
45	128	140	272	272	164	164	141	159	240	240	135	153	296	296	234	234	275	278	207	209	288	288
46	128	128	272	272	160	160	141	159	240	240	135	153	282	296	234	234	278	281	207	207	288	288
47	128	140	272	282	160	164	141	161	248	248	149	153	286	296	232	248	278	278	201	207	288	288
48	140	140	282	310	156	164	161	177	260	206	149	165	282	286	248	252	278	278	201	207	288	288
49	140	140	282	310	156	160	161	161	248	260	153	165	282	290	234	234	278	278	202	202	288	295
50	140	140	310	348	156	160	161	161	248	206	149	165	286	286	234	248	278	278	202	217	288	295

#### **4.4 Variabilidad genética**

Se procesaron los datos obtenidos por el secuenciador para realizar los análisis de variabilidad genética, utilizando el coeficiente de Nei 1973.

Cada uno de los individuos fue analizado y rotulado en orden aleatorio (del 1 al 50). La matriz fue modificada a razón de la Heterocigocis de cada uno, asignándole un valor numérico; a los clones que presentaban Homocigocis o un solo locus, también llamado monomórficos, se les otorgó el valor del alelo conocido.

La matriz fue tomada en cuenta con los espacios nulos para la generación de los árboles dendogramas.

Mediante la visualización de los geles se pudo apreciar un total de 84 alelos entre monomórficos y polimórficos; las poblaciones fueron clasificadas por individuos para realizar el análisis de agrupamiento.

##### **4.4.1 Índices de diversidad genética**

Con los resultados obtenidos y utilizando el software Power Marker se obtuvieron los índices de diversidad genética que interactuaron entre los marcadores seleccionados y los individuos estudiados.

El valor obtenido en el análisis fue de 0.87 (Cuadro 8), y el contenido de información polimórfica fue similar (Cuadro 9); se generó una matriz de similitud utilizando el coeficiente de Nei 1973 (Cuadro 10). Se graficó utilizando el método de agrupamiento por medias aritméticas no ponderables (Figura 22).

**Cuadro 8. Índices de diversidad genética.**

<b>Marker</b>	<b>Major allele</b>	
	<b>frequency</b>	<b>Gene diversity</b>
<b>mtcCIR1</b>	0,36	0,79
<b>mtcCIR33</b>	0,18	0,89
<b>mtcCIR7</b>	0,32	0,79
<b>mtcCIR290</b>	0,32	0,80
<b>mtcCIR58</b>	0,20	0,89
<b>mtcCIR37</b>	0,19	0,90
<b>mtcCIR8</b>	0,17	0,92
<b>mtcCIR15</b>	0,28	0,84
<b>mtcCIR22</b>	0,18	0,88
<b>mtcCIR26</b>	0,10	0,96
<b>mtcCIR12</b>	0,10	0,94
<b>Total</b>	<b>0,22</b>	<b>0,87</b>

**Cuadro 9. Contenido de información polimórfica (PIC).**

<b>Marker</b>	<b>Major allele frequency</b>	<b>PIC</b>
<b>mtcCIR1</b>	0,36	0,76
<b>mtcCIR33</b>	0,18	0,88
<b>mtcCIR7</b>	0,32	0,76
<b>mtcCIR290</b>	0,32	0,78
<b>mtcCIR58</b>	0,20	0,89
<b>mtcCIR37</b>	0,19	0,89
<b>mtcCIR8</b>	0,17	0,91
<b>mtcCIR15</b>	0,28	0,82
<b>mtcCIR22</b>	0,18	0,86
<b>mtcCIR26</b>	0,10	0,95
<b>mtcCIR12</b>	0,10	0,94
<b>Mean</b>	<b>0,22</b>	<b>0,86</b>

**Cuadro 10. Matriz de distanciamiento genético Nei 1973 (T1)**

OTU	Sample1	Sample10	Sample11	Sample12	Sample13	Sample14	Sample15	Sample16	Sample17	Sample18	Sample19	Sample2
Sample1	0,00	1,00	0,70	1,00	0,73	0,91	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,91
Sample10	1,00	0,00	0,90	0,73	0,91	0,91	0,91	1,00	0,82	0,91	0,80	1,00
Sample11	0,70	0,90	0,00	1,00	0,60	0,90	0,90	1,00	0,90	0,90	0,78	1,00
Sample12	1,00	0,73	1,00	0,00	0,91	0,73	0,82	0,73	0,73	0,91	0,80	1,00
Sample13	0,73	0,91	0,60	0,91	0,00	0,91	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Sample14	0,91	0,91	0,90	0,73	0,91	0,00	0,91	0,82	0,82	1,00	1,00	1,00
Sample15	1,00	0,91	0,90	0,82	1,00	0,91	0,00	0,82	1,00	0,73	0,90	0,91
Sample16	1,00	1,00	1,00	0,73	1,00	0,82	0,82	0,00	0,73	0,91	0,80	0,82
Sample17	1,00	0,82	0,90	0,73	1,00	0,82	1,00	0,73	0,00	1,00	0,80	1,00
Sample18	1,00	0,91	0,90	0,91	1,00	1,00	0,73	0,91	1,00	0,00	1,00	0,91
Sample19	1,00	0,80	0,78	0,80	1,00	1,00	0,90	0,80	0,80	1,00	0,00	0,80
Sample2	0,91	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,91	0,82	1,00	0,91	0,80	0,00
Sample20	1,00	0,82	0,80	0,91	1,00	1,00	0,82	0,91	0,91	0,82	0,70	0,91
Sample21	0,91	0,91	1,00	0,82	0,82	1,00	0,82	0,91	1,00	1,00	1,00	0,91
Sample22	1,00	0,64	0,80	0,73	1,00	1,00	0,91	1,00	0,82	0,91	0,70	1,00
Sample23	1,00	0,73	1,00	0,91	1,00	1,00	0,91	1,00	0,82	0,91	0,80	1,00
Sample24	1,00	0,91	0,90	0,82	1,00	1,00	0,91	0,64	0,64	1,00	0,70	0,91
Sample25	1,00	1,00	1,00	0,82	1,00	1,00	0,91	0,82	0,73	1,00	0,80	0,91
Sample26	0,91	1,00	1,00	0,82	1,00	1,00	0,82	0,82	0,73	1,00	0,90	0,91
Sample27	0,91	1,00	0,90	0,82	0,91	1,00	0,91	0,82	0,82	1,00	0,70	0,91
Sample28	1,00	1,00	1,00	0,80	1,00	1,00	0,90	0,80	0,80	1,00	0,67	0,90
Sample29	0,90	0,90	0,89	0,80	1,00	1,00	0,80	0,90	0,90	0,90	0,60	0,80
Sample3	0,91	0,64	1,00	0,91	1,00	1,00	0,82	1,00	0,82	0,91	1,00	0,82
Sample30	1,00	0,91	1,00	0,73	1,00	1,00	0,82	0,91	0,64	0,91	0,90	0,91
Sample31	0,80	0,80	1,00	0,90	1,00	1,00	1,00	0,90	0,90	1,00	0,89	0,80
Sample32	1,00	0,91	1,00	0,82	1,00	1,00	0,91	0,82	0,82	1,00	0,70	0,91
Sample33	1,00	0,91	1,00	0,82	1,00	1,00	0,91	0,82	0,82	1,00	0,70	0,91
Sample34	0,88	0,88	1,00	0,88	1,00	1,00	0,88	0,88	0,88	0,88	1,00	0,63
Sample35	1,00	1,00	1,00	0,82	1,00	1,00	0,82	0,91	0,91	0,91	0,90	0,82
Sample36	1,00	0,91	1,00	0,82	1,00	1,00	0,73	1,00	0,91	0,82	1,00	0,91
Sample37	1,00	0,82	1,00	0,82	1,00	1,00	0,73	1,00	0,91	0,82	1,00	1,00
Sample38	1,00	0,88	1,00	0,88	1,00	1,00	0,75	0,88	0,88	0,88	1,00	1,00
Sample39	1,00	0,90	1,00	0,90	1,00	1,00	0,70	0,90	0,90	0,80	1,00	1,00
Sample4	0,91	0,82	0,90	0,73	1,00	1,00	0,91	1,00	0,91	0,91	0,80	0,91
Sample40	0,91	1,00	0,90	0,82	1,00	1,00	0,91	0,73	0,82	1,00	0,90	1,00
Sample41	0,73	0,91	1,00	0,91	0,82	1,00	1,00	0,82	1,00	1,00	0,90	0,91
Sample42	0,91	0,91	1,00	0,91	0,91	1,00	1,00	0,91	0,82	1,00	1,00	1,00
Sample43	1,00	1,00	1,00	0,91	1,00	1,00	1,00	0,64	0,91	1,00	0,80	0,91
Sample44	0,90	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,90	1,00	1,00	1,00	0,80
Sample45	1,00	1,00	0,90	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,91	1,00	0,91
Sample46	1,00	1,00	0,90	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,91	1,00	0,82
Sample47	1,00	0,82	1,00	1,00	1,00	1,00	0,91	1,00	1,00	0,91	1,00	1,00
Sample48	0,91	1,00	1,00	0,91	0,91	1,00	1,00	0,82	0,73	1,00	0,80	0,91
Sample49	0,91	0,91	1,00	0,91	0,91	1,00	1,00	0,91	0,82	1,00	1,00	0,91
Sample5	1,00	1,00	0,90	0,82	1,00	1,00	0,82	1,00	1,00	0,82	0,90	1,00
Sample50	0,91	0,91	1,00	0,91	0,91	1,00	1,00	0,91	0,82	1,00	1,00	1,00
Sample6	1,00	0,82	1,00	0,91	1,00	1,00	1,00	0,91	0,91	1,00	0,80	0,82
Sample7	1,00	0,91	1,00	0,91	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,80	1,00
Sample8	1,00	0,30	1,00	0,80	0,90	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,89	0,90
Sample9	1,00	0,82	0,90	0,82	1,00	1,00	0,82	1,00	0,91	0,91	0,80	1,00



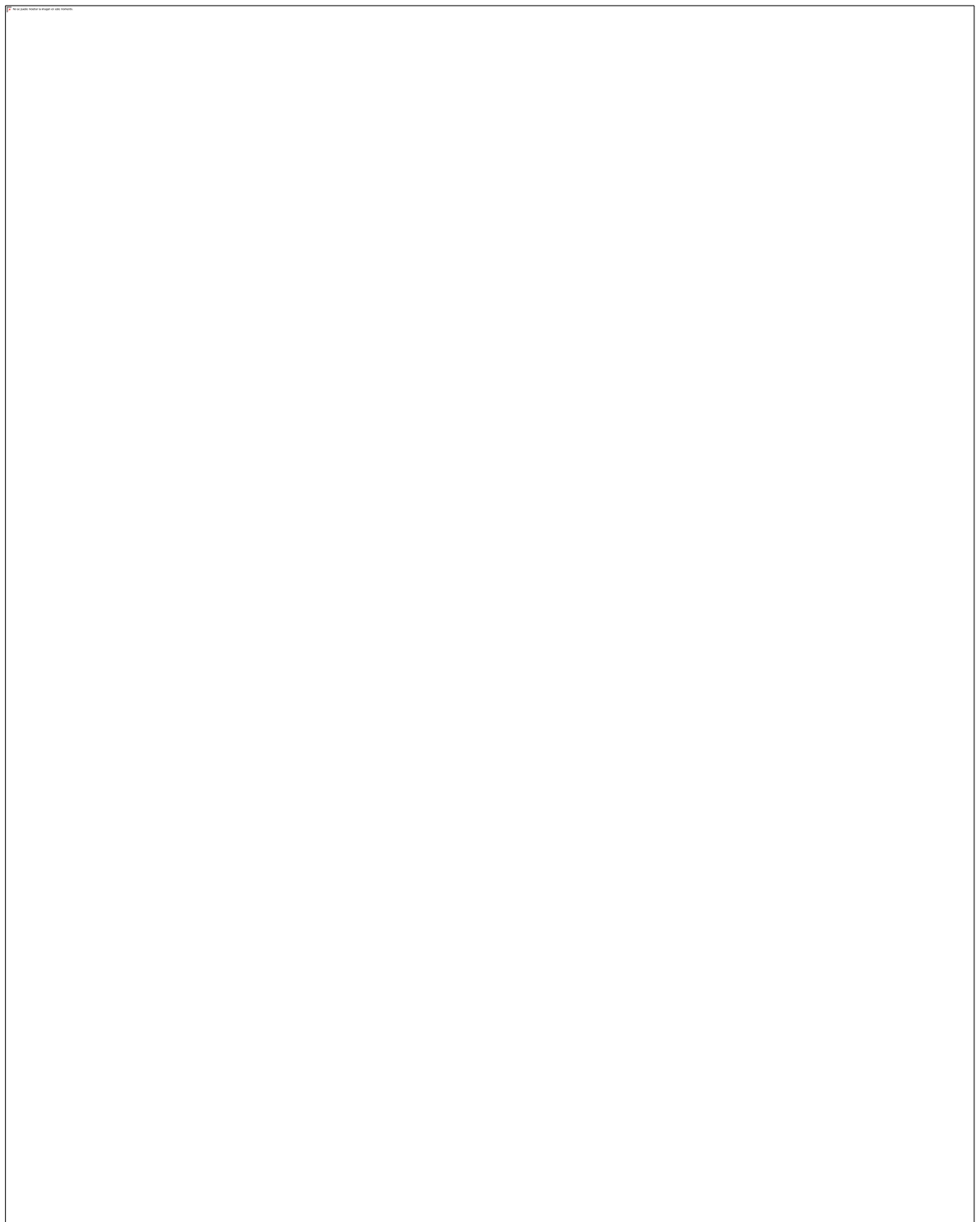
**Cuadro 10. Matriz de distanciamiento genético Nei 1973 (T2).**

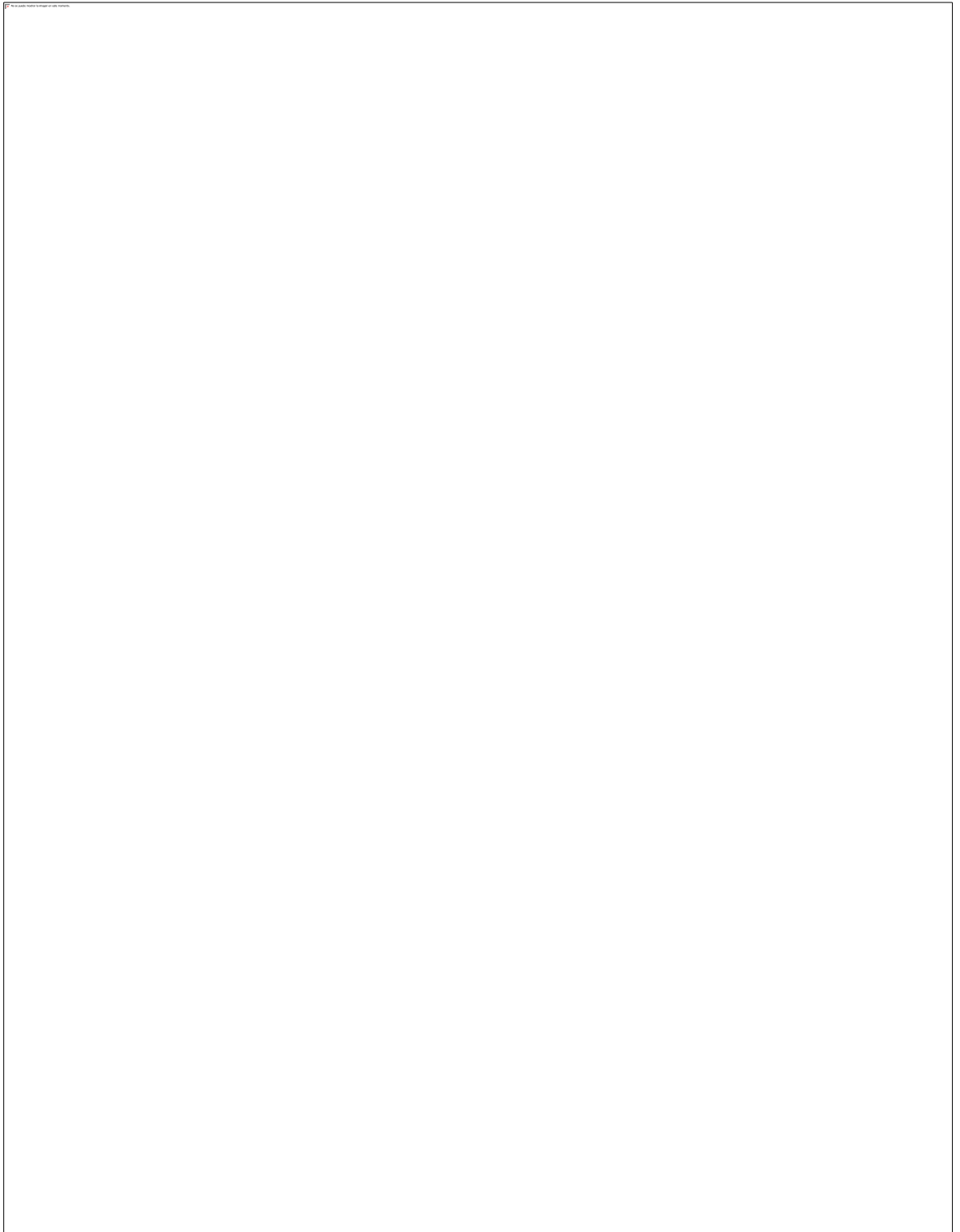
OTU	Sample20	Sample21	Sample22	Sample23	Sample24	Sample25	Sample26	Sample27	Sample28	Sample29	Sample3	Sample30
Sample1	1,00	0,91	1,00	1,00	1,00	1,00	0,91	0,91	1,00	0,90	0,91	1,00
Sample10	0,82	0,91	0,64	0,73	0,91	1,00	1,00	1,00	1,00	0,90	0,64	0,91
Sample11	0,80	1,00	0,80	1,00	0,90	1,00	1,00	0,90	1,00	0,89	1,00	1,00
Sample12	0,91	0,82	0,73	0,91	0,82	0,82	0,82	0,82	0,80	0,80	0,91	0,73
Sample13	1,00	0,82	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,91	1,00	1,00	1,00	1,00
Sample14	1,00	0,82	0,91	1,00	0,91	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,91	0,82
Sample15	0,82	0,82	0,91	0,91	0,91	0,91	0,82	0,91	0,90	0,80	0,82	0,82
Sample16	0,91	0,91	1,00	1,00	0,64	0,82	0,82	0,82	0,80	0,90	1,00	0,91
Sample17	0,91	1,00	0,82	0,82	0,64	0,73	0,73	0,82	0,80	0,90	0,82	0,64
Sample18	0,82	1,00	0,91	0,91	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,90	0,91	0,91
Sample19	0,70	1,00	0,70	0,80	0,70	0,80	0,90	0,70	0,67	0,60	1,00	0,90
Sample2	0,91	0,91	1,00	1,00	0,91	0,91	0,91	0,91	0,90	0,80	0,82	0,91
Sample20	0,00	0,91	0,55	0,82	0,91	1,00	1,00	1,00	1,00	0,70	1,00	1,00
Sample21	0,91	0,00	1,00	1,00	1,00	0,82	0,91	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Sample22	0,55	1,00	0,00	0,82	0,82	1,00	1,00	1,00	1,00	0,70	0,91	0,91
Sample23	0,82	1,00	0,82	0,00	0,91	0,91	1,00	0,82	0,80	0,80	0,73	1,00
Sample24	0,91	1,00	0,82	0,91	0,00	0,73	0,36	0,64	0,60	0,80	0,91	0,73
Sample25	1,00	0,82	1,00	0,91	0,73	0,00	0,64	0,82	0,80	0,90	0,91	0,82
Sample26	1,00	0,91	1,00	1,00	0,36	0,64	0,00	0,73	0,70	0,70	0,82	0,73
Sample27	1,00	1,00	1,00	0,82	0,64	0,82	0,73	0,00	0,00	0,70	0,91	0,73
Sample28	1,00	1,00	1,00	0,80	0,60	0,80	0,70	0,00	0,00	0,67	0,90	0,70
Sample29	0,70	1,00	0,70	0,80	0,80	0,90	0,70	0,70	0,67	0,00	0,90	0,80
Sample3	1,00	1,00	0,91	0,73	0,91	0,91	0,82	0,91	0,90	0,90	0,00	0,82
Sample30	1,00	1,00	0,91	1,00	0,73	0,82	0,73	0,73	0,70	0,80	0,82	0,00
Sample31	1,00	1,00	1,00	0,90	0,90	0,90	0,80	0,90	0,89	0,89	0,50	0,90
Sample32	1,00	1,00	1,00	0,82	0,64	0,82	0,73	0,27	0,20	0,70	0,91	0,73
Sample33	1,00	1,00	1,00	0,82	0,64	0,82	0,73	0,27	0,20	0,70	0,91	0,73
Sample34	0,75	1,00	0,75	1,00	1,00	1,00	0,88	1,00	1,00	0,71	0,50	0,88
Sample35	0,91	1,00	0,91	1,00	0,73	0,91	0,82	0,73	0,70	0,60	0,82	0,64
Sample36	1,00	1,00	1,00	0,91	0,82	0,91	0,82	0,82	0,80	0,80	0,73	0,64
Sample37	0,91	1,00	1,00	0,82	0,82	0,91	0,82	0,82	0,80	0,80	0,82	0,64
Sample38	1,00	1,00	1,00	0,75	0,63	0,75	0,63	0,63	0,63	0,86	0,75	0,63
Sample39	1,00	1,00	1,00	0,80	0,70	0,80	0,70	0,70	0,67	0,78	0,80	0,60
Sample4	0,73	1,00	0,55	0,91	1,00	1,00	0,82	1,00	1,00	0,50	0,73	0,91
Sample40	1,00	0,91	1,00	1,00	0,64	0,64	0,64	0,82	0,80	0,90	1,00	0,73
Sample41	1,00	0,82	1,00	0,91	0,82	0,82	0,91	0,82	0,80	0,90	1,00	1,00
Sample42	1,00	0,91	0,91	1,00	0,91	0,91	1,00	1,00	1,00	1,00	0,91	0,82
Sample43	1,00	1,00	1,00	1,00	0,73	0,82	0,82	0,82	0,80	0,90	1,00	0,73
Sample44	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,90	1,00	1,00	0,89	0,90	1,00
Sample45	0,82	1,00	0,91	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,90	1,00	1,00
Sample46	1,00	0,91	0,91	0,91	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Sample47	1,00	1,00	0,91	0,82	1,00	0,91	1,00	0,91	0,90	1,00	0,91	1,00
Sample48	1,00	0,91	1,00	0,91	0,82	0,73	0,91	0,82	0,80	0,90	0,91	0,82
Sample49	1,00	0,82	0,91	0,91	0,82	0,73	0,82	1,00	1,00	1,00	0,82	0,91
Sample5	0,73	1,00	0,64	1,00	1,00	1,00	0,91	1,00	1,00	0,70	1,00	0,91
Sample50	1,00	0,91	0,91	1,00	0,91	0,91	1,00	1,00	1,00	1,00	0,91	0,82
Sample6	0,91	0,91	0,82	0,82	0,91	0,91	0,91	0,91	0,90	0,70	0,82	1,00
Sample7	0,82	1,00	0,73	0,82	1,00	1,00	1,00	0,91	0,90	0,70	0,91	1,00
Sample8	0,90	0,80	0,80	0,80	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,89	0,80	1,00
Sample9	0,82	1,00	0,82	0,82	0,91	0,91	0,91	0,91	0,90	0,70	0,91	0,91

**Cuadro 10. Matriz de distanciamiento genético Nei 1973 (T3).**

OTU	Sample31	Sample32	Sample33	Sample34	Sample35	Sample36	Sample37	Sample38	Sample39	Sample4	Sample40	Sample41	Sample42
Sample1	0,80	1,00	1,00	0,88	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,91	0,91	0,73	0,91
Sample10	0,80	0,91	0,91	0,88	1,00	0,91	0,82	0,88	0,90	0,82	1,00	0,91	0,91
Sample11	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,90	0,90	1,00	1,00
Sample12	0,90	0,82	0,82	0,88	0,82	0,82	0,82	0,88	0,90	0,73	0,82	0,91	0,91
Sample13	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,82	0,91
Sample14	1,00	1,00	1,00	0,88	0,91	0,91	0,91	1,00	1,00	0,91	0,91	0,73	0,55
Sample15	1,00	0,91	0,91	0,88	0,82	0,73	0,73	0,75	0,70	0,91	0,91	1,00	1,00
Sample16	0,90	0,82	0,82	0,88	0,91	1,00	1,00	0,88	0,90	1,00	0,73	0,82	0,91
Sample17	0,90	0,82	0,82	0,88	0,91	0,91	0,91	0,88	0,90	0,91	0,82	1,00	0,82
Sample18	1,00	1,00	1,00	0,88	0,91	0,82	0,82	0,88	0,80	0,91	1,00	1,00	1,00
Sample19	0,89	0,70	0,70	1,00	0,90	1,00	1,00	1,00	1,00	0,80	0,90	0,90	1,00
Sample2	0,80	0,91	0,91	0,63	0,82	0,91	1,00	1,00	1,00	0,91	1,00	0,91	1,00
Sample20	1,00	1,00	1,00	0,75	0,91	1,00	0,91	1,00	1,00	0,73	1,00	1,00	1,00
Sample21	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,91	0,82	0,91
Sample22	1,00	1,00	1,00	0,75	0,91	1,00	1,00	1,00	1,00	0,55	1,00	1,00	0,91
Sample23	0,90	0,82	0,82	1,00	1,00	0,91	0,82	0,75	0,80	0,91	1,00	0,91	1,00
Sample24	0,90	0,64	0,64	1,00	0,73	0,82	0,82	0,63	0,70	1,00	0,64	0,82	0,91
Sample25	0,90	0,82	0,82	1,00	0,91	0,91	0,91	0,75	0,80	1,00	0,64	0,82	0,91
Sample26	0,80	0,73	0,73	0,88	0,82	0,82	0,82	0,63	0,70	0,82	0,64	0,91	1,00
Sample27	0,90	0,27	0,27	1,00	0,73	0,82	0,82	0,63	0,70	1,00	0,82	0,82	1,00
Sample28	0,89	0,20	0,20	1,00	0,70	0,80	0,80	0,63	0,67	1,00	0,80	0,80	1,00
Sample29	0,89	0,70	0,70	0,71	0,60	0,80	0,80	0,86	0,78	0,50	0,90	0,90	1,00
Sample3	0,50	0,91	0,91	0,50	0,82	0,73	0,82	0,75	0,80	0,73	1,00	1,00	0,91
Sample30	0,90	0,73	0,73	0,88	0,64	0,64	0,64	0,63	0,60	0,91	0,73	1,00	0,82
Sample31	0,00	0,90	0,90	0,43	0,90	0,90	1,00	1,00	1,00	0,70	0,80	1,00	1,00
Sample32	0,90	0,00	0,00	1,00	0,73	0,82	0,82	0,63	0,70	1,00	0,82	0,82	1,00
Sample33	0,90	0,00	0,00	1,00	0,73	0,82	0,82	0,63	0,70	1,00	0,82	0,82	1,00
Sample34	0,43	1,00	1,00	0,00	0,63	0,88	1,00	1,00	1,00	0,50	0,88	1,00	0,88
Sample35	0,90	0,73	0,73	0,63	0,00	0,27	0,36	0,38	0,40	0,91	0,82	0,91	1,00
Sample36	0,90	0,82	0,82	0,88	0,27	0,00	0,27	0,25	0,30	1,00	0,82	1,00	1,00
Sample37	1,00	0,82	0,82	1,00	0,36	0,27	0,00	0,25	0,20	1,00	0,73	1,00	1,00
Sample38	1,00	0,63	0,63	1,00	0,38	0,25	0,25	0,00	0,00	1,00	0,63	0,75	1,00
Sample39	1,00	0,70	0,70	1,00	0,40	0,30	0,20	0,00	0,00	1,00	0,60	0,80	1,00
Sample4	0,70	1,00	1,00	0,50	0,91	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00	1,00	1,00	0,91
Sample40	0,80	0,82	0,82	0,88	0,82	0,82	0,73	0,63	0,60	1,00	0,00	0,91	0,91
Sample41	1,00	0,82	0,82	1,00	0,91	1,00	1,00	0,75	0,80	1,00	0,91	0,00	0,73
Sample42	1,00	1,00	1,00	0,88	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,91	0,91	0,73	0,00
Sample43	0,90	0,82	0,82	1,00	0,82	0,91	0,91	0,75	0,80	0,91	0,73	0,64	1,00
Sample44	0,90	1,00	1,00	0,86	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,80	0,90	0,90	0,80
Sample45	1,00	1,00	1,00	0,88	0,91	1,00	1,00	1,00	1,00	0,82	1,00	1,00	1,00
Sample46	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,91	1,00	1,00
Sample47	0,90	0,91	0,91	1,00	1,00	0,91	0,91	0,75	0,80	0,91	1,00	0,82	0,91
Sample48	0,90	0,82	0,82	1,00	0,91	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,91	0,64	0,73
Sample49	0,90	1,00	1,00	0,88	1,00	1,00	1,00	0,88	0,90	0,82	0,91	0,64	0,55
Sample5	1,00	1,00	1,00	0,88	0,82	0,91	0,91	0,88	0,90	0,55	0,91	1,00	1,00
Sample50	1,00	1,00	1,00	0,88	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,91	0,91	0,73	0,00
Sample6	1,00	0,91	0,91	1,00	0,91	1,00	1,00	1,00	1,00	0,73	1,00	0,91	1,00
Sample7	0,90	0,91	0,91	0,75	0,91	1,00	1,00	1,00	1,00	0,73	1,00	1,00	1,00
Sample8	0,80	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,90	1,00	1,00	0,90	1,00	0,90	0,90
Sample9	1,00	0,91	0,91	1,00	0,91	0,82	0,82	0,75	0,80	0,82	0,91	1,00	1,00

### **Cuadro 10. Matriz de distanciamiento genético Nei 1973 (T4).**





**Figura 22. Dendograma de distanciamiento de individuos de cacao.**

## V. DISCUSIÓN

En lo referente al ADN, la calidad y cantidad que se obtenga de los procesos de extracción se torna una pieza fundamental en este tipo de investigación, concordando con Armas (2013) que indica que el éxito de la caracterización molecular gira en torno a la obtención de una muestra consistente y de muy buena calidad. Existen distintos procesos de extracción de ADN para material vegetal para el género *Theobroma* los descritos por Mariac *et al.* (1999), Doyle y Doyle (1987) y EMBRAPA (2010).

En acuerdo con Faleiro *et al.* (2002), el protocolo de extracción de Doyle y Doyle (1987) presenta mejores resultados en cuanto a consistencia y calidad de ADN para los materiales de cacao, siendo así, en este estudio se utilizó el protocolo Doyle y Doyle con modificaciones de Faleiro *et al.* (2002), las cuales evitaban la degradación y oxidación de las muestras ya que aumentaba concentraciones de PVP, Mercaptoetanol, que son agentes antioxidantes.

La degradación de las muestras y el entorpecimiento de los resultados también pueden ser comprometidos por las condiciones ambientales o por el manejo cultural de las colecciones, concordando con lo expuesto por Moreno *et al.* (2004).

La amplificación de ADN se la realizó de forma individual y en combinación, previo a la realización de pruebas de estandarización, en acuerdo con Morillo y Miño (2011) que indican que, para la realización de dúplex debe coincidir la temperatura de anillamiento y el marcaje, y, el producto de amplificación debe ser distinto en peso.

El programa de amplificación establecido por la EESC para SSR fueron los mismos que los descritos por Saunders (2004) y se obtuvo como resultado una buena especificidad del producto final, debido a que las concentraciones utilizadas fueron las correctas.

Los resultados de la amplificación fueron observados en el secuenciador LICOR 4300. Fueron inéditos, ya que es la primera investigación a nivel de caracterización molecular de la colección en estudio. Globalizándolo como material amazónico, presenta similitud con los estudios realizados por Lemes *et al.* (2007), donde se hayan bandas tanto monomórficas como polimórficas, con un índice PIC de 0.87.

Para esta investigación se planteó como objetivo determinar la variabilidad genética de la colección ALLEN del tipo amazónico, con el uso de marcadores moleculares microsatélites SSR sintetizados para géneros de *Theobroma*.

Saunders *et al.* (2004) y Zhang *et al.* (2009), parten de la selección de marcadores más polimórficos y discriminantes dentro de sus estudios realizados. De igual forma, dentro de los marcadores microsatélites utilizados para la caracterización, en esta investigación se seleccionaron los más polimórficos y discriminantes.

En cuanto al polimorfismo de los marcadores utilizados, los marcadores mTcCIR-26 y mTcCIR-12 presentaron el nivel más alto de polimorfismo en la colección Allen, mientras que Lemes *et al.* (2007) reportan en sus estudios realizados niveles bajos de polimorfismo en los marcadores citados.

En lo que se refiere al marcador mTcCIR-37 resultó con un nivel bajo en polimorfismo, lo que difiere con los resultados expuestos por Saunders *et al.* (2004), quienes reportaron un nivel alto en este marcador.

Respecto al ordenamiento de los clones, para esta investigación se seleccionaron genotipos de carácter resistente a monilla y escoba de bruja, con la finalidad de observar cuáles son los clones que se agrupan en los del tipo resistente, al igual que los de Chia (2009). En afinidad con el mismo, se agruparon en el mismo clúster SCA-6 y CCN-51; sin embargo, el SCA12 se presenta como vecino más cercano al CCN51, que al SCA6 de su propio parental.

A fin de dar solidez a los gráficos de agrupamiento generados, se utilizó la prueba conocida como la correlación de Mantel de dos vías, la cual demuestra que existe una adecuada representación de similitudes genéticas utilizando los postulados de Nei 1973; y, para los fenogramas generados se utilizó el coeficiente de asociación de Jaccard, al igual que lo investigado por Zhang *et al.* (2009); no obstante, el resto de los materiales utilizados como controles no son tomados en cuenta para la discusión, a fin de evitar valores sesgados.

En el cluster 1 se conglomeran dos subcluster. En el primero están los materiales: LCT- 23 S/3, LCT- 24 S/2, LCT- 437 S/3, LCT- 72 S/4, EET- 552, LCT- 83 S/7, LCT- 121, LCT-278, LCT- 312, LCT-329, LCT- 189, LCT- 347, LCT- 244 S/2, LCT- 77 S/10, LCT- 437 S/6 y LCT- 109 S/7. En este subcluster se agrupa uno de los clones controles del tipo nacional que comparte muchas características morfológicas con los miembros de la colección Allen; su disonancia con el resto de los integrantes de la colección es un indicativo de su varianza a nivel molecular.

En el segundo subcluster encontramos los clones: LCT- 205 S/5, LCT- 324 S/1, LCT- 6 S/9, LCT-28 S/1, LCT- 10 S/7, LCT-10 S/8, LCT- 295 S/8, LCT- 66 S/4, LCT- 83 S/3, LCT- 405 S/2, LCT- 77, LCT- 84 S/2, LCT- 214 S/4, LCT- 62 S/2, LCT- 436 S/5, LCT- 6 S/3, LCT- 436 S/2, LCT- 436, LCT- 367 y LCT- 202 S/1. Este subcluster conglomerado en el cluster 1 del grupo de los altos amazónicos, sin características moleculares que los agrupen dentro de los clones controles, fueron divergentes al resto de los miembros.

Cluster 2. En este grupo se encasilla la mayoría de los clones controles, con la excepción del EET- 552. Como se indicó con anterioridad en esta investigación se presenta similitud en lo estudiado por Chia (2009), donde los materiales SCA-6 y CCN-51 se hayan como vecinos más cercanos con características moleculares análogas; no obstante, en esta indagación se da la aparición del clon SCA-12 entre los mencionados; así mismo, en este cluster se encuentran agrupados materiales de la colección Allen como son: LCT- 62 S/8, EBC- 142, EBC- 138, LCT- 326 y LCT- 30, dando lugar a una relación molecular de mayor afinidad entre los clones controles.



## VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Se concluye que:

- El protocolo de extracción Doyle y Doyle con modificaciones de Faleiro *et al.* (2002), presenta mejores resultados, independientemente del estado en que se encuentren las muestras y de la distancia de su lugar de estudio.
- Con el uso de marcadores moleculares SSR se logró determinar la variabilidad genética entre y dentro de los individuos de cacao estudiados.
- Se presenta con más alto nivel de polimorfismos el marcador mTcCIR-26.
- Indicados por los parámetros de Nei (1973) se presenta una amplia diversidad entre individuos del mismo tipo Amazónico.
- Se logró encontrar en el cluster 2 que, los individuos: LCT- 62 S/8, EBC- 142, EBC- 138, LCT- 326 y LCT- 30, comparten características geográficas, morfológicas y moleculares con los clones controles, omitiendo al CCN- 51, SCA- 6 y SCA-12 con distintas características morfológicas a los del tipo Amazónico.
- Los clones: LCT- 62 S/8, EBC- 142, EBC- 138, LCT- 326 y LCT- 30 se los considera para futuros estudios de resistencia

Se recomienda lo siguiente:

- Las representaciones por agrupamiento y ordenamiento de los individuos de la colección Allen se pueden considerar como un discernimiento para programas de mejoras genéticas.
- Realizar estudios de segregación para reforzar hipótesis de herencia en los parentales.

## **VII. RESUMEN**

Existen diversas herramientas para la caracterización ya sea del tipo morfológico como molecular. Para esta investigación, que tiene como base la caracterización molecular, se escogieron los marcadores SSR basándose en los objetivos planteados.

Por su característica de codominantes, los marcadores microsatélites brindan una herramienta versátil para los fitomejoradores al momento de realizar segregaciones de descendencia.

Se tiene como objetivos de este estudio la caracterización molecular de 50 individuos de cacao de la colección Allen. Además, determinar variantes como el poder discriminante de los marcadores SSR, estos basados en la técnica de PCR.

La colecta de los clones se la realizó en la EETP (Estación Experimental Tropical Pichilingue) del INIAP, ubicada en la provincia de Los Ríos, donde los árboles de esta colección se encuentran en tres lotes distintos.

Se colectaron hojas fotosintéticas en buenas condiciones; mediante pruebas preliminares se determinó el protocolo de extracción llevando a cabo el descrito por Doyle y Doyle.

Luego de la obtención y pruebas de los resultantes de la extracción se procedió a la amplificación de las muestras, las mismas que fueron amplificadas con el ciclaje establecido por la Estación Experimental Santa

Catalina para marcadores microsatélites, con variación en la temperatura de anillamiento.

Se realizó el test de integridad para las muestras, obteniendo buena amplificación de las imágenes.

La secuenciación de las muestras se la efectuó en el LICOR 4300. Se realizó la documentación de los geles para luego realizar el genotipage en el programa SAGA; se transformó a matrices de datos, estos resultados fueron modificados y depurados, basándose en trabajos antes realizados donde se le podía asignar un valor ya conocido a los alelos encontrados.

Se convirtió en una matriz binaria donde se pudo establecer la relación de similitud entre los individuos, con la utilización del programa Power Markert.

Utilizando los postulados descritos por Nei (1973), se logró establecer la diversidad genética dentro de la colección. Para la elaboración de los árboles de agrupamiento entre los clones se usó el coeficiente de UPGMA que utiliza el ligamento promedio entre individuos, proyectando resultados satisfactorios para futuros estudios de mejoramiento.

## VIII. SUMMARY

Several tools for characterizing either the morphological and molecular type, for this research is based molecular characterization SSR markers were chosen based on the objectives.

For his feature codominant microsatellites markers provide a versatile tool for breeders at the time of descent Fito segregations are aims of this study, the molecular characterization of 50 individuals of cocoa Allen collection.

Also variants such as determining the discriminating power of these SSR markers based on PCR, the collection of the collection was made in the EETP (Pichilingue Tropical Station) Los Rios province where the trees in this collection are in three different lots.

Photosynthetic leaves were collected in good condition mediante pretesting the extraction protocol was determined by carrying just described by Doyle and Doyle, after obtaining and testing resulting from the extraction, we proceeded to the amplification of the samples the same as were amplified with the cycling set by Santa Catalina Experimental Station for microsatellite markers with variation in the annealing temperature, the integrity test samples to obtain good amplification in the images presented were performed.

The sequencing of the samples was the conducted at the LIQUOR 4300 documentation gels then perform genotipage in the SAGA program was conducted, it became a data matrix, these results were modified and depurándos based on work formerly done where he you could assign a value already known alleles found became a binary matrix where it could

establish the relationship of similarity between individuals with the use of Power Markert program.

Using the principles described by Nei was able to establish the genetic diversity within the collection, for the production of trees of groups of clones coefficient UPGMA using the average ligament between individuals was used, projecting satisfactory results for future studies of improvement .

## IX. LITERATURA CITADA

- Abadie, T. y Berretta, A. 2001.** Caracterización y evaluación de recursos fitogenéticos. Estrategia en recursos fitogenéticos para los países del Cono Sur. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. IICA. San José, CR. pp. 91-100.
- Allen, J. 1987.** Comunicación Técnica N° 15. Recolección de Cacao Silvestre de la Región Amazónica Ecuatoriana - Proyecto Amazonas, Convenio INIAP-CCCA. Reporte final – primera fase. Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), Estación Experimental Tropical Pichilingue. EC. 116 p.
- Ángel, F. 2000.** Marcadores moleculares, usos y aplicaciones. Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas. SINCHI.
- Azofeifa, A. 2006.** Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicación en frutales de trópico. Agronomía Mesoamericana. Vol. 17. N° 2, pp. 221-244.
- Chia. 2009.** Caracterización molecular mediante marcadores moleculares ISSR de una colección de 50 árboles clonales e híbridos de cacao (*Theobroma cacao* L.) de la UNAS-Tingo María. Tesis Mag. Sc. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 118 p.
- Cryer, N. C., Fenn, M. G., Turnbull, C. J., y Wilkinson, W. 2006.** Allelic size standards and reference genotypes to unify international cocoa (*Theobroma cacao* L.) microsatellite data. School of Biological Sciences. p. 1645.

- D’Vicente, C., Metz, T. y Alercia, A. 2004.** Descriptors for genetic markers technologies-Version 1.0 Bioverity International. 24 p.
- Davierwala, A., Rayakrishna, W., Chowdari, V., Ranjencar, P., y Gupta, V. 2001.** Potencial of (GATA) microsatellites from rice for inter-variability studies. BMC Evolutionary Biology. Vol. 1. p. 7.
- Dostert, N., Roque, J., Cano, A., La Torre, M. y Weigend, M. 2011.** Hoja Botánica Cacao. Proyecto Perú Biodiverso. PE. 19 p.
- Eguiarte, L. E., Souza, V., y Aguirre, X. 2007.** Ecología Molecular. Universidad Nacional Autónoma de México. 592 p.
- Enríquez, G. A. 1985.** Curso sobre el cultivo de cacao. Serie de materiales de enseñanza. N° 22. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE). Turrialba, CR. 239 p.
- Faleiro, F. G., Santos, I. S., Bahía, RCS., Santos, R. F, y Anhert, D. 2002.** Otimização da extração e amplificação de DNA de *Theobroma cacao* L. visando obtenção de marcadores RAPD.
- Faleiro, F. G.; Pires J. L.; Reis, W.; Lopes, U.; Yamada, M.; Piedra, A. G.; y Moura, A. 2004.** Variability in cacao accessions from the Brazilian, Ecuadorian and Peruvian Amazons based on molecular.
- Ferreira, M. E. y Grattapaglia, D. 1998.** Introducción al Uso de Marcadores Moleculares en el Análisis Genético. Brasilia: EMBRAPA-CENARGEN, 220 p.

- Gonzales, D. 1998.** Revista mexicana de micología. N°14. Marcadores moleculares para los estudios comparativos de la variación en ecología sistemática. pp. 1- 22.
- Hidalgo, R., 2003.** Boletín Técnico IPGRI. N° 8. Variabilidad genética y caracterización de especies vegetales. En: Análisis Estadístico de Datos de Caracterización Morfológica de Recursos Fitogenéticos. Franco, T., Hidalgo, R. eds. Bioversity International. pp. 2-15.
- Johnson, E.S., Mora, A., Raymond, J., y Schnell. 2007.** Field guide efficacy in the identification of reallocated clonally propagated accessions of cacao (*Theobroma cacao* L.). Genet Resour Crop Evol. pp. 1301-1313.
- Karp, A., Kresovich, S., Bhat, K., Ayad, W., y Hodgking. T., 1997.** IPGRI Technical Bulletin. N° 2. Molecular tools in plant genetic resources conservation: a guide to the technologies. Rome, Italy. 47 p.
- Lemes, M. R., Martiniano, T. M., Reis, V. M., Faria, C. P., Gribel, R. 2009.** Cross-amplification and characterization of microsatellite loci three species of *Theobroma* (Sterculiaceae) from the Brazilian Amazon. Genetic Resources and Crop Evolution. pp. 1.653-1.657.
- Levitus, G., Echenique, V., Rubinstein, C., Hopp, E., y Mroginski, L. 2010.** Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II. Agern Bio. pp. 70-79.
- Lodoño, L., Gil, D., Aguilar, S., Rivera, F. y López, G., 2011.** Caracterización Molecular de Clones de *Theobroma cacao* L., por



medio de Marcadores Moleculares Microsatélites. Luna Azul, N° 32, p. 53.

**Loor, R. G., Risterucci, A. M., Courtois, B., Fouet, O., Jeanneau, M., Rosenquist, E., y Lanaud, C. 2009.** Tracing the native ancestors of the modern *Theobroma cacao* L. population in Ecuador. Tree Genetics & Genomes. pp. 421-433.

**Lowe, A. J., Gillis, A. C. M., Wilson, J. y Dawson, I. K. 2000.** Conservation genetics of bush mango from central/west Africa, implications from RAPD analysis molecular ecology. 9 : 831-841 pp.

**Mayorga, L., y Paola, K. 2001.** Análisis Estadístico de la Producción de Cacao en el Ecuador. p. 75.

**Motomayor, J. C., Risterucci, A. M., López, P. A., Ortiz, C. F. y Lanaud, C. 2002.** Cacao Domestication I: the origin of the cacao cultivated by the Mayas. Heredity. Vol 89, pp. 380 -386.

**Nei, M. 1978.** Estimation of average heterozygosity and genetic distance from as small number of individual. Genetics 89: pp. 583-590.

**Painting, K. A., Perry, M. C., Denning, R. A. y Ayad, W. G. 1993.** Guía para la documentación de Recursos Genéticos. Consejo Internacional de Recursos Fitogenéticos, Roma, Italia. pp. 1-17.

**Phillips, W., Rodríguez, H. y Fritz, P. 1995.** Marcadores de ADN: teoría, aplicaciones y protocolos de trabajo, con ejemplos de investigaciones en cacao (*Theobroma Cacao*). Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE). CR. 176 p.

- Phillips, W. 1998.** Biología molecular y marcadores moleculares en la agricultura. En memoria II. Congreso Nacional de Estudiantes del Sector Agropecuario Costarricense. IICA- EARTH. 280 p.
- Powells, W. 1992.** Plant, genomes, gene marked and linkage maps. In moss. J. P. ed. Biotechnology and crop improvement in Asia. Patancheru, India, International Crops Research Institute. For the Semi-Arid Tropics. pp. 297-320.
- Quiroz, J. 2002.** Caracterización molecular y morfológica de genotipos superiores con características de cacao nacional (*Theobroma cacao* L.) de Ecuador. Tesis de Magister Scientiae. Turrialba, CR. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. 111 p.
- Romero, C.A., Bonilla, J.A., Santos, E.G. y Peralta, 2010.** Revista Tecnológica Espol. Vol. 23. Identificación Varietal de 41 Plantas Seleccionadas de Cacao (*Theobroma cacao* L.) provenientes de cuatro Cultivares distintos de la Región Amazónica Ecuatoriana, mediante el uso de Marcadores Microsatélites. pp. 121-128.
- Saunders, J. A., Mischke, S., Leamy, E. A. y Hemeida, A. A. 2004.** Selection of international molecular standards for DNA fingerprinting of *Theobroma cacao*. Theoretical and Applied Genetics. pp. 41-47.
- Tolares, S., Marcucci, P. y Harrond, L. 2005.** Identificación genética de clones en *Eucalyptus grandis* utilizando Microsatélites. Instituto de Recursos Biológicos CNIA, INTA Castelar. PR.

**Zhang, D., Boccara, M., Motilal, L., Mischke, S., Johnson, E. S., Butler, D. R. y Meinhardt, L. 2009.** Molecular characterization of an earliest cacao (*Theobroma cacao* L.) collection from Upper Amazon using microsatellite DNA markers. *Tree Genetics & Genomes.* pp. 595-607.

## **X. ANEXOS**

### **Anexo 1. Glosario genético**

**ADN:** el ácido desoxirribonucleico es un polímero de nucleótidos, es decir, un polinucleótido, donde cada nucleótido está formado por un azúcar, una base nitrogenada y un grupo fosfato que sirve como enganche de cada nucleótido.

**Alelo:** cada una de las formas alternativas que puede tener un gen que se diferencian en su secuencia y que se pueden manifestar en modificaciones concretas de la función de un gen.

**Cistrón:** es la unidad más pequeña de material genético, capaz de ser responsable de la síntesis de un polipéptido.

**Desnaturalización:** es un cambio estructural de las proteínas o ácidos nucleicos. La desnaturalización de ácidos nucleicos como el ADN, por altas temperaturas, produce una separación de la doble hélice que ocurre porque los enlaces o puentes de hidrógeno se rompen.

**Epistasia:** la epistasia es la interacción entre diferentes genes al expresar un determinado carácter fenotípico.

**Genotipo:** se refiere a la información genética que posee un organismo en particular.

**Genoma:** es la totalidad de la información genética que posee un organismo o una especie en particular.

**Izoenzima:** son enzimas que difieren en la secuencia de los aminoácidos.

**Polimorfismo genético:** hace referencia a la existencia en una población de múltiples alelos de un gen; es una variación en la secuencia de un lugar determinado del ADN.

**Polimerasa:** enzima capaz de transcribir o replicar ácidos nucleicos.

**Sintenia:** es la localización conservada de genes en posiciones equivalentes en especies relacionadas.

**Variabilidad genética:** se refiere a la variación en el material genético de una población o especie.

## Anexo 2. Descripción de abreviaturas utilizadas en la investigación.

ABREVIATURA	DESCRIPCIÓN
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism”
AUP	Agua ultra pura
BrET	Bromuro de etidio
CIA	Cloroformo – Alcohol Isoamílico
Cl <sub>2</sub> Mg	Cloruro de magnesio
CLNa	Cloruro de sodio
CTAB	Cetyltrimethylammonium bromide (detergente catiónico)
dATP	Deoxyadenosinetriphosphate (nucleótido – síntesis DNA)
Dntp`s	Desoxirribonucleotidos (dATP, dCTP, dTTP, dGTP)
EDTA	(Ácido entilen diamino tetracético)
G	Gramo
Ha	Hectárea
Kb	Kilobase
M	Molar
Mm	Milimolar
mA	Miliamperios
Ng.	Nanogramo
Pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Pm	Peso molecular
PVP	Polivinilpirolidona (antioxidante)
Qbit	Fluorómetro para cuantificación

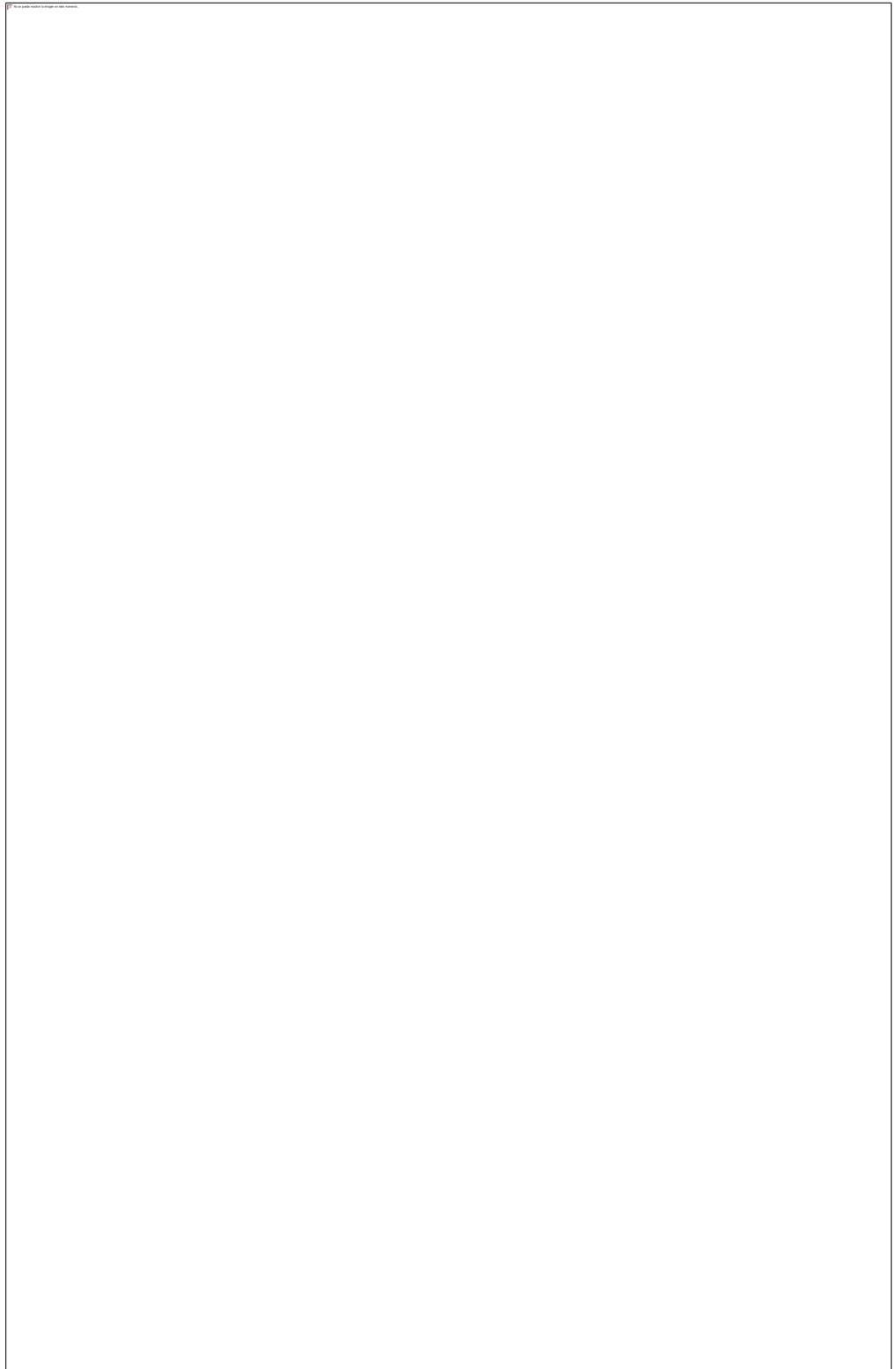
RAPD	“Random Amplified Polymorphic DNA”
RFLP	“Restriction Fragment Length Polymorphism”
Rpm	Revoluciones por minuto
SSR	“Simple Sequence Repeat”
TAE	Tricetato EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i> (bacteria termoestable)
TE	Amortiguador tris EDTA
3`	Átomo 3 del carbono de la desoxirribosa
UV	Ultravioleta
µg.	Microgramo
µL	Microlitro
Vol	Volumen
V	Voltio

### **Anexo 3. Croquis de la ubicación de los individuos de la colección Allen.**





#### **Anexo 4. Croquis de la ubicación de los individuos de la colección Allen.**



Guardarray																																
1	LCT-67 SA	P	P	P	P	34	LCT-122	P	V	V	V	V	68	LCT-220	P	F	F	F	102	LCT-68 SA	V	V	V	V	160	LCT-33 SA0	V	V	V	F	F	
2	LCT-29 SA	P	P	P	V	35	LCT-66 SA	V	V	V	V	V	69	LCT-348 SA0	P	V	V	P	V	103	LCT-349 SA	V	V	B	V	149	LCT-5 SA2	V	V	V	F	F
3	LCT-337 SA2	V	V	V	V	36	LCT-65 SA	V	V	P	P	P	70	LCT-347 SA	V	V	V	V	V	104	LCT-361 SA0	V	V	V	V	148	LCT-372 SA	P	V	V	V	V
4	LCT-343 SA	V	V	V	V	37	LCT-300 SA4	F	V	V	V	V	71	LCT-202 SA	V	V	V	V	V	105	LCT-367 SA0	V	V	V	V	147	LCT-373 SA	V	V	V	V	V
5	LCT-83 SA4	V	V	V	V	38	LCT-341 SA6	F	V	V	V	V	72	LCT-341 SA2	P	P	V	V	F	106	LCT-367 SA0	P	V	V	V	146	LCT-374 SA	V	V	V	V	V
6	LCT-332 SA0	V	V	V	V	39	LCT-341 SA2	V	V	V	V	V	73	LCT-347 SA5	B	V	V	P	V	107	LCT-187	V	P	V	V	145	LCT-375 SA	V	V	V	V	V
7	LCT-86 SA2	V	V	V	V	40	LCT-341 SA2	V	V	V	V	V	74	LCT-332 SA	B	V	V	P	V	108	LCT-366 SA7	V	V	V	V	144	LCT-376 SA	V	V	V	V	V
8	LCT-37 SA6	V	V	V	P	41	LCT-340 SA6	V	V	V	V	P	75	LCT-332 SA	B	V	V	P	V	109	LCT-204 SA8	V	V	V	V	143	LCT-377 SA	V	V	V	V	V
9	LCT-30 SA6	V	V	V	V	42	LCT-340 SA6	V	V	V	V	P	76	LCT-185	V	V	V	V	V	110	LCT-334 SA5	V	V	V	V	142	LCT-378 SA	V	V	V	V	V
10	LCT-344 SA6	V	V	V	V	43	LCT-345 SA6	P	V	V	V	V	77	LCT-134 SA6	P	P	P	P	P	111	LCT-202 SA8	V	V	V	V	141	LCT-379 SA	V	V	V	V	V
11	LCT-347 SA0	V	V	V	V	44	LCT-345 SA6	P	V	V	V	V	78	LCT-92 SA2	V	V	V	V	P	112	LCT-178	P	P	V	V	140	LCT-380 SA	V	V	V	V	V
12	LCT-339 SA0	V	V	V	V	45	LCT-345 SA6	V	V	V	V	V	79	LCT-346 SA4	V	V	V	F	P	113	LCT-132 SA	V	V	V	V	139	LCT-381 SA	V	V	V	V	V
13	LCT-32 SA0	V	V	V	V	46	LCT-345 SA6	V	V	V	V	V	80	LCT-346 SA0	V	V	V	F	V	114	LCT-132 SA	V	V	V	V	138	LCT-382 SA	V	V	V	V	V
14	LCT-5 SA5	V	V	V	V	47	LCT-345 SA6	V	V	P	V	V	81	LCT-288 SA	F	V	V	P	P	115	LCT-132 SA	V	V	V	V	137	LCT-383 SA	V	V	V	V	V
15	LCT-243 SA6	V	V	V	V	48	LCT-345 SA6	V	V	P	V	V	82	LCT-337 SA7	V	V	V	V	V	116	LCT-132 SA	V	V	V	V	136	LCT-384 SA	V	V	V	V	V
16	LCT-342 SA5	V	V	P	V	49	LCT-345 SA6	V	V	P	V	V	83	LCT-337 SA7	V	V	V	V	V	117	LCT-132 SA	V	V	V	V	135	LCT-385 SA	V	V	V	V	V
17	LCT-348 SA7	V	V	P	P	50	LCT-345 SA6	V	V	P	P	P	84	LCT-65	P	P	P	P	P	118	LCT-132 SA	V	V	V	V	134	LCT-386 SA	V	V	V	V	V
18	LCT-424 SA6	R	V	V	P	51	LCT-345 SA6	V	V	P	P	P	85	LCT-302 SA2	V	V	V	F	V	119	LCT-242 SA0	B	V	P	V	133	LCT-387 SA	V	V	V	V	V
19	LCT-79	V	V	V	V	52	LCT-345 SA6	V	V	P	P	P	86	LCT-67 SA6	P	V	V	V	V													

## Anexo 6. Croquis de ubicación de los individuos de la colección Allen.

FECHA DE SIEMBRA: ENERO, AGOSTO Y SEPTIEMBRE DEL 2019									
UBICACIÓN II: SECTOR 2° A*									
NÚMERO DE 157 ACCESOS DES									
Distancia de siembra: 3m X 3m									
Período de siembra Enero 2019 - Marzo 2010									
LCT 248.8	1 x 1 x 1	LCT 10.82	x B x x x	LCT 203.82	x x x x 1	LCT 339.44	x x x x x	LCT 108.13	1 1 1 1 1
LCT 863.4	x x x x x	LCT 6.85	x x x x 1	DBC 12.81	x x x x x	DBC 38.5	1 x x x x	LCT 108.13	1 1 1 1 1
LCT 338.8	x x x x x	LCT 40.83	x x 1 x 1	LCT 183.40	1 x x x x	LCT 201.81	1 1 x 1 x	LCT 108.13	1 1 1 1 1
LCT 399	x x 1 x x	LCT 24.89	1 x 1 x x	DBC 147.82	1 1 x x 1	LCT 135.88	x x 1 x 1	LCT 108.13	1 1 1 1 1
LCT 371	x 1 x x x	LCT 45.86	x x x x x	LCT 183.40	1 x x x x	DBC 108.10	1 1 1 1 x	LCT 108.13	1 1 1 1 1
LCT 248.44	x x x x x	LCT 28.6	x x x x x	DBC 147.82	1 1 x x 1	LCT 348.13	1 1 x x x	LCT 108.13	1 1 1 1 1
LCT 598.3	x x x x 1	LCT 58.10	x x x x x	LCT 147.82	1 1 x x 1	LCT 135.88	x x 1 x 1	LCT 108.13	1 1 1 1 1
LCT 678.1	x x x x x	LCT 33.85	x x x 1 x	LCT 183.40	1 x x x x	LCT 201.81	1 1 x 1 x	LCT 108.13	1 1 1 1 1
LCT 408.16	x x x x x	LCT 78.6	x x x x x	LCT 348.13	1 1 x x x	LCT 135.88	x x 1 x 1	LCT 108.13	1 1 1 1 1
LCT 408.1	1 1 1 x 1	LCT 78.6	x x x x x	LCT 147.82	1 1 x x 1	LCT 348.13	1 1 x x x	LCT 108.13	1 1 1 1 1
LCT 458.4	x x x x x	LCT 40.82	x x x x x	LCT 45.81	x x x x x	LCT 135.88	x x 1 x 1	LCT 108.13	1 1 1 1 1
LCT 588.4	x x x x x	LCT 41	1 x x x x	LCT 93.82	x x 1 x 1	LCT 408.13	x x x x x	LCT 108.13	1 1 1 1 1
LCT 408.3	1 x x x x	LCT 78.4	x x x x x	LCT 68.6	1 x x x 1	LCT 201.81	1 1 x 1 x	LCT 108.13	1 1 1 1 1
LCT 828.1	x x x x x	LCT 138.3	1 1 1 1 1	LCT 87.84	x x x x x	LCT 183.40	x x x x x	LCT 108.13	1 1 1 1 1
LCT 768.1	x x x x x	LCT 45.85	x x x x x	LCT 68.6	x x x x x	LCT 183.40	1 1 1 x x	LCT 108.13	1 1 1 1 1
LCT 408.4	x x x x x	LCT 19.6	x x x 1 x	LCT 138.40	x x 1 x x	LCT 338.7	x x 1 x x	LCT 108.13	1 1 1 1 1
LCT 437.6	x x x x x	LCT 163	x x x x x	LCT 83.83	x x x x x	DBC 135	1 1 x x x	LCT 108.13	1 1 1 1 1
LCT 408.3	x x 1 x x	LCT 78.1	x x x x x	LCT 77.6	x x x 1 x	LCT 248.8	x x x x x	LCT 108.13	1 1 1 1 1
LCT 437.5	x x x x x	LCT 164	x x x x x	LCT 45.82	x x x x x	LCT 578.4	1 1 1 x 1	LCT 108.13	1 1 1 1 1
LCT 908.0	1 x x x 1	LCT 50.6	x x x 1 x	LCT 68.6	x x x x x	LCT 135.85	x x x x x	LCT 108.13	1 1 1 1 1
LCT 108.7	x x x x x	LCT 24.83	x 1 x x x	LCT 76.8	x x x x x	DBC 148.9	1 1 x 1 1	LCT 108.13	1 1 1 1 1
LCT 408.9	x x x 1 x	LCT 68.6	1 x 1 1 1	LCT 158.4	x x x x x	LCT 348.16	x x x x x	LCT 108.13	1 1 1 1 1
LCT 408.10	x x x x x	LCT 45.88	x x x x x	LCT 58.7	x x x x x	LCT 348.7	x x x x x	LCT 108.13	1 1 1 1 1
LCT 437.3	x x x x x	LCT 76.8	x x x 1 x	LCT 348.5	x x x x x	LCT 338.1	1 x x x x	LCT 108.13	1 1 1 1 1
LCT 248.16	1 x x x x	LCT 68.6	x x x x x	LCT 83.8	x 1 x x x	LCT 183.3	x x x x x	LCT 108.13	1 1 1 1 1

\* Fecha de siembra último bloque 10.11 de Marzo del 2010.

GUARDARRAYA

1 = LATEO II  
X = LLANTA  
F = FALLA

