

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

C. A. Romero, J. A. Bonilla, E.G. Santos, E. L. Peralta*

Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador, Escuela Superior Politécnica del Litoral, Campus Gustavo Galindo, Km. 30.5 vía Perimetral. Apartado 09-01-5863. Guayaquil, Ecuador.

caromero@espol.edu.ec, bjulio_andres@hotmail.com, efren.santos@gmail.com

*estherlilia@gmail.com

Resumen

Las poblaciones nativas de cacao (*Theobroma cacao* L.) ecuatoriano, son altamente apreciadas en los mercados internacionales por su exquisito aroma y fino 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 más productivos y gradualmente han ido reemplazando las poblaciones nativas. Además, los bancos de germoplasma de cacao, presentan indudablemente diferentes niveles de redundancia genética, lo cual dificulta la eficiente conservación y utilización de las accesiones de cacao. En tal sentido, en el presente estudio, 41 plantas de cacao pertenecientes a cuatro cultivares diferentes y conservadas como colecciones *ex situ* en un invernadero privado de la Región Amazónica del Ecuador fueron evaluadas mediante el análisis de nueve microsatélites loci con el objetivo de verificar la relación genética de estas plantas con el grupo de cacao Nacional. Los nueve pares de iniciadores microsatélites utilizados fueron altamente discriminativos y generaron un total de 52 alelos, con un promedio de 5.7 alelos por locus. El promedio de diversidad genética detectado entre los individuos que conforman cada una de las cuatro poblaciones fue $H_e = 0.80$. El valor del índice de fijación $F_{ST} = 0.075$ muestra bajos niveles de diferenciación genética entre las poblaciones. El análisis del clúster jerárquico permitió confirmar la afinidad genética existente entre las 41 plantas analizadas con el grupo de cacao Nacional ecuatoriano.

Palabras clave: *Theobroma cacao*, cacao Nacional, microsatélites loci, diversidad genética, índice de fijación, clúster jerárquico.

Abstract

The native *Theobroma cacao* L. populations from Ecuador are highly appreciated in the international markets by their strong floral aroma and by their fine flavor known as “arriba”. However, the quality of Ecuadorian cacao is presently threatened due principally to successive introduction of foreign genetic materials. Hybrid descendants are highly productive and gradually have replaced the native populations. In addition, cacao germplasm collections invariably contain different levels of genetic redundancy, which hinders the efficient conservation and utilization of the cacao accessions. Therefore in the present study 41 plants from four different cultivars maintained as *ex situ* collections in a private greenhouse of the Ecuadorian Amazon Region were evaluated using nine microsatellite loci with the objective to verify the genetic relationship of these plants with the National cacao group. The nine microsatellite markers were highly discriminative and generated a total of 52 alleles, with an average of 5.7 alleles per locus. The average genetic diversity detected among the individuals within each of the four populations was $H_e = 0.80$. The value for the fixation index $F_{ST} = 0.075$ showed low level of genetic differentiation among populations. The hierarchical cluster analysis confirmed the genetic affinity between the 41 cacao plants analyzed with the National cacao group.

Key words: *Theobroma cacao*, National cacao, microsatellite loci, genetic diversity, fixation index, hierarchical cluster.

1. Introducción

El Cacao (*Theobroma cacao* L.) es un árbol nativo de los bosques húmedos de Sur América. Se cree que el centro de origen del cacao se encuentra localizado en los bosques tropicales de la Región Amazónica de Perú, Colombia y Ecuador, debido a la alta diversidad genética que ha sido reportada en estos sitios [1, 2, 3]. Tres principales grupos genéticos de cacao han sido descritos y cultivados tradicionalmente alrededor del mundo: Criollo, Forastero y Trinitario. [4]. El grupo de los Criollos fue originalmente cultivado por los mayas en América Central y representa el primer grupo de cacao domesticado del mundo [5]. El grupo de los Forasteros incluye distintas poblaciones localizadas a lo largo de la Región Amazónica desde Colombia hasta Guayanas [6, 7]. El grupo de los Trinitarios está constituido por poblaciones híbridas desarrolladas a partir de hibridaciones naturales entre Criollo y Forastero. Además de los tres grupos principales de cacao, han sido descritos dos grupos adicionales, que por su importancia han despertado el interés de la comunidad científica a nivel mundial. El primero es el grupo de los Refractarios el cual está constituido por poblaciones híbridas derivadas de múltiples parentales, se cree que se originó en la Costa Ecuatoriana alrededor de 1920. Zhang *et al* [18] determinaron que los Refractarios tienen una estrecha relación genética con el grupo de Cacao Nacional y posiblemente éste sea uno de los parentales de Refractario. Este grupo se caracteriza por poseer resistencia natural a la enfermedad conocida como ‘escoba de la bruja’ (*witches broom*) causada por el hongo *Moniliophthora perniciosa* [15]. El segundo es un grupo primitivo conocido como “Nacional o Arriba” es cultivado en la Región Pacífico-Costera de Ecuador. A pesar de que su origen exacto es desconocido, se lo considera como nativo de este país [1,8]. A lo largo de los años esta clasificación ha variado, inicialmente fue clasificado por Cheesman y Soria [1,8] dentro del grupo de los Forasteros, posteriormente Enríquez [9] lo ubicó dentro de los Criollos. Sin embargo, ahora se considera que es un grupo diferente a Criollo y Forastero pero genéticamente más emparentado con el último [10]. Soria y Vera [8,12] sugieren que el centro de origen de este grupo se encuentra localizado en la parte baja de los Andes en la Región Amazónica de Ecuador.

Los árboles de cacao Nacional desarrollaron un fuerte aroma floral, y un sabor distintivo que se produce exclusivamente en Ecuador y es conocido en los mercados internacionales como “arriba”, esta denominación surge debido a que los frutos provienen de la parte alta de la Cuenca del Río Guayas. De las diferentes clases de cacao Nacional (“Bolívar” y “Esmeraldas”) que se producen en Ecuador, el cacao “arriba” es el más famoso por ser el de mejor calidad [11]. Su aroma y sabor son altamente apreciados para realizar productos específicos a base de chocolate [13].

Hasta 1890 el cacao Nacional era el único que se cultivaba en la Región Costera Este de Ecuador (excepto en Esmeraldas), cuando se comenzaron a introducir semillas de un cultivar llamado “Venezuela” desde Trinidad y Tobago. Con la aparición en 1916 de *Moniliophthora roleri* hongo que ocasiona la podredumbre de las semillas de cacao [14], y en 1919 de *Moniliophthora perniciosa* agente causal de la ‘escoba de la bruja’ [15] se produjo la introducción de grandes cantidades de material genético foráneo. Consecuentemente, más del 95% del área original previamente plantada con cacao Nacional, ha sido reemplazada con material híbrido constituido principalmente por clones de Trinitario [16].

Una significativa cantidad de material genético de cacao Nacional fue recolectada durante varias expediciones realizadas a lo largo de la Región Costera Ecuatoriana en la década de 1940 [4]. Actualmente, este material genético se encuentra almacenado en forma de colecciones *ex-situ* en los dos principales bancos de germoplasma de Ecuador. El primero se encuentra localizado en la Estación Experimental Tropical Pichilingue (EET-P) y el segundo se encuentra en el Centro de Cacao de Aroma de Tenguel (CCAT) [17]. Sin embargo, tal como en el caso de otros bancos de germoplasma de cacao localizados alrededor del mundo, estas colecciones contienen invariablemente accesiones duplicadas, debido principalmente a la dificultad operacional originada por manejar grandes cantidades de germoplasma, por lo tanto errores de documentación comúnmente ocurren durante la transportación o mantenimiento del material vegetal, como resultado existe un gran número de plantas con identidades no confirmadas o repetidas [18]. Este alto grado de redundancia no solo dificulta una conservación eficiente de estas accesiones, sino que además obstaculiza su potencial explotación y el mejoramiento genético de los cultivos. Realizar una evaluación exhaustiva de la identidad individual y de la estructura genética de la población es primordial para optimizar programas de mejoramiento genético encaminados a producir nuevas y mejoradas variedades de cacao Nacional para preservar su conocido sabor “arriba” [4].

La identificación de las distintas accesiones de cacao ha sido alcanzada usando distintos tipos de metodologías, especialmente a través de la descripción de características taxonómicas y a través de técnicas moleculares. Distintos tipos de marcadores moleculares como los Fragmentos de Restricción de Longitud Polimórfica [19] (RFLP por sus siglas en inglés) o como los Fragmentos de Amplificación de Longitud Polimórfica (AFLP) [20] han sido ampliamente utilizados para caracterizar varias colecciones de germoplasma, ya que permiten determinar accesiones duplicadas o errores en el etiquetado entre las plantas de cacao de una forma rápida y precisa. Sin embargo, desde el desarrollo de los marcadores microsatélites o secuencias simples

repetidas (SSRs), el uso de los RFLPs y AFLPs ha disminuido [21].

Los marcadores microsatélites son altamente polimórficos, multi-alélicos, codominantes y fáciles de amplificar por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) [22, 23]. Los microsatélites son secuencias de ADN, cuya unidad de repetición varía de 1 a 7 pares de bases (pb), se distribuyen de forma dispersa a lo largo de todos los cromosomas de los organismos eucariotes y procariotes [24].

Estas secuencias muestran altos niveles de variación genética según las diferencias que se produzcan en las unidades repetidas en tándem de un locus. Estos marcadores permiten visualizar diferencias tangibles entre las secuencias homólogas del ADN de los organismos. Esas diferencias resultan de cambios o rearrreglos entre los pares de bases que conforman este tipo de molécula, tales como: translocaciones, inversiones, recombinación desigual, inserciones o deleciones en regiones homólogas. Tales diferencias pueden ser detectadas en geles de poliacrilamida, donde migran diferentes distancias de acuerdo a su tamaño [25].

En este estudio, nueve pares de iniciadores microsatélites fueron utilizados para caracterizar genéticamente y para determinar la relación genética de 41 plantas de cacao, pertenecientes a cuatro cultivares diferentes y conservados como colecciones *ex situ* en un invernadero privado de la Región Amazónica del Ecuador, con el grupo de cacao Nacional o cacao “arriba”

2. Materiales y Métodos

Un total de 41 plantas de cacao (*Theobroma cacao* L.) pertenecientes a cuatro cultivares diferentes fueron utilizadas en este estudio. Los cultivares fueron los siguientes: EET 95 (11 plantas), EET 96 (10 plantas), EET 103 (10 plantas) y EET 576 (10 plantas). Como controles de referencia se utilizaron dos plantas de cacao, identificadas previamente por expertos locales mediante características taxonómicas y ubicadas dentro del grupo de cacao Nacional (“arriba”). Adicionalmente, se emplearon como patrones de referencia, tres muestras de ADN de cacao provenientes del banco de germoplasma de la USDA (United States Department of Agriculture) y que fueron amablemente cedidas por Dapeng Zhang. Las tres accesiones de cacao fueron: NAT-PE4 (Forastero); NAT-PE5 (Forastero); y CRIOLLO-22 (Criollo).

Se extrajo el ADN genómico a partir de las hojas de cada una de las accesiones, usando una combinación de los protocolos de extracción de ADN descritos por DellaPorta *et al* [26], Aljanabi y Martínez [27] y modificados por Santos [28]. El ADN fue cuantificado mediante electroforesis en geles de agarosa al 0.8 % usando el marcador molecular *High DNA Mass Ladder*

y teñidos con SYBR[®] Safe 1x (Invitrogen, Carlsbad, California, USA).

Los marcadores microsatélites utilizados en este estudio fueron originalmente aislados y caracterizados por Lambert *et al* [29] (Tabla 1) y han sido reportados por los autores por poseer un alto nivel de eficiencia para distinguir diferencias a nivel molecular entre distintas accesiones de cacao. Las muestras de ADN fueron amplificadas por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) siguiendo las especificaciones descritas por Lambert *et al* [29]. La PCR fue llevada a cabo en un volumen final de 20 μ l, con 30 ng de ADN genómico, 0.24 μ M de cada iniciador y 1x de GoTaq[®] Green Master Mix (Promega, Madison, Wisconsin, USA). Para correr las muestras de PCR, se utilizó el termociclador *Mastercycler Gradient* (Eppendorf, Foster City, California, USA) programado con un ciclo inicial de desnaturalización a 94°C por 5 minutos; seguido por un protocolo de *touchdown*: ocho ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 segundos, anillamiento a 55°C por 60 segundos, con reducción de 1°C después de cada ciclo y extensión a 72°C por 60 segundos; seguido por 25 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 segundos, anillamiento a 51°C por 60 segundos, extensión a 72°C por 60 segundos; y un ciclo final de extensión a 60°C por 15 minutos. Los productos de PCR fueron separados en geles de poliacrilamida al 6% y visualizados por tinción de plata.

El programa de Análisis *Molecular Imager Gel Doc XR* (Bio-Rad, Philadelphia, California, USA) fue usado para calcular el tamaño de los alelos generados mediante la amplificación por PCR. Se elaboró una matriz de datos binaria en la cual los alelos fueron numerados en orden ascendente, asignando el número uno (1) a los alelos de menor tamaño en pares de bases (pb) y el número nueve (9) a los alelos de mayor tamaño. Esta matriz fue exportada al programa *Tools for Population Genetic Analysis* (TFPGA) [30] para determinar la diversidad genética entre las accesiones. El programa Popgen 32 [31] fue usado para determinar la frecuencia alélica por loci, el promedio de heterocigosidad observada (H_o) y heterocigosidad esperada (H_e). La diferenciación genética fue estimada usando el programa FSTAT 2.9.3. 2 [32]

3. Resultados y discusión

Los nueve pares de iniciadores microsatélites utilizados en este estudio fueron lo suficientemente discriminativos para determinar el nivel de polimorfismo y la identidad genética de las 41 plantas de cacao provenientes de cuatro cultivares diferentes. La amplificación por medio de la PCR de las muestras de ADN con los nueve pares de iniciadores microsatélites, reveló la presencia de un total de 52 alelos, con un promedio de 5,7 alelos por locus (Tabla 1). El número de alelos identificados por locus,

estuvo comprendido en el rango de 5 – 7, con un promedio de polimorfismo de 0,82. El iniciador que detectó el menor número de alelos fue mtcCIR12, el contenido de información polimórfica (PIC, por sus siglas en inglés) para este locus fue de 0.71. El iniciador que generó el mayor número de alelos fue mtcCIR15 y el contenido de información polimórfica para este locus fue de 1,00.

El promedio de heterocigosidad observada fue $H_o = 0,45$ y el promedio de diversidad genética fue $H_e = 0,80$. Valores análogos de diversidad genética han sido reportados por Looor *et al* [4] quienes analizaron 322 plantas de cacao Nacional recolectadas de diferentes zonas geográficas ubicadas a lo largo de la Región Costera Ecuatoriana y determinaron que la estructura genética de las poblaciones modernas de cacao Nacional se caracterizan por presentar altos niveles de heterocigosidad y de diversidad genética, lo cual además concuerda con lo anteriormente expuesto por Rorer [14] quien afirmó, que la sucesiva introducción de germoplasma foráneo que data desde finales de 1890, y el subsecuente flujo genético que tuvieron estas accesiones con las poblaciones nativas de cacao Nacional produjeron altos niveles de diversidad genética dentro de las poblaciones de cacao.

La estructura genética de la población fue analizada en base a los F estadísticos según lo descrito por Weir y Cockerhan [33]. El valor promedio del coeficiente de cruzamiento (*inbreeding coefficient*) (F_{IS}) que mide la correlación de alelos dentro de los individuos que conforman una población se ubicó en 0,290. El valor promedio del índice de fijación (F_{ST}) el cual permite determinar la similitud de los alelos entre los

individuos de una población fue de 0,075. El valor hallado en el coeficiente de cruzamiento, indica que los individuos que conforman las cuatro poblaciones analizadas presentan niveles relativamente altos de heterocigosidad. Por otra parte, el valor encontrado en el índice de fijación, el cual es cercano a cero, muestra que la diferenciación genética entre las poblaciones estudiadas, es prácticamente nula. Similares resultados han sido obtenidos por Sereno *et al* [34] y por Zhang *et al* [35] quienes analizando la diversidad genética de poblaciones de cacao Forastero procedentes de Brasil y de Perú respectivamente, determinaron que la diferenciación genética entre los individuos de las poblaciones estudiadas era muy baja, con valores comprendidos entre 0,018 para Brasil y 0,055 para Perú. Los autores determinaron además que los valores promedio de F_{IS} de 0.318 para las poblaciones de Brasil y de 0, 234 para las de Perú, confirmaban la

Tabla 1. Estructura genética de 9 microsatélites loci evaluados en 46 accesiones de cacao

Locus	¹ Na _e	² Tamaño de Alelos (pb)	³ Na	⁴ Tamaño de Alelos (pb)	PIC	H _o	H _e
CIR 12	14	164 – 216	5	260 – 385	0.71	0.39	0.80
CIR 15	14	232 – 260	7	206 – 289	1.00	0.56	0.82
CIR 26	8	272 – 308	6	214 – 310	0.85	0.39	0.85
CIR 33	15	273 – 347	6	265 – 381	0.85	0.47	0.80
CIR 37	14	134 – 178	6	248 – 320	0.85	0.50	0.80
CIR 42	11	202 – 238	5	212 – 265	0.71	0.48	0.81
CIR 57	5	247 – 257	5	156 – 268	0.71	0.52	0.80
CIR 243	7	125 – 141	6	137 – 186	0.85	0.49	0.83
CIR 244	13	240 – 270	6	190 – 312	0.85	0.22	0.79
Media	11		5.7		0.82	0.45	0.81

¹Número de alelos esperados [28]

²Tamaño de alelos esperados [28]

³Número de alelos detectados

⁴Tamaño de alelos detectados

PIC: Contenido de información polimórfica

H_o: Heterocigosidad observada

H_e: Heterocigosidad esperada

hipótesis planteada al inicio de sus respectivos estudios, la cual enunciaba que “los individuos de las distintas poblaciones de cacao Forastero presentan altos niveles de polimorfismo”.

Para realizar el análisis del clúster jerárquico se utilizaron el método UPGMA (*unweighted pair group method with arithmetic mean*) y el coeficiente de Roger’s como criterios de agrupamiento. El dendograma (Figura 1) generado a partir de los datos obtenidos con los nueve pares de iniciadores microsatélites confirmó la afinidad genética existente entre las cuatro poblaciones de cacao analizadas, ya que se puede apreciar que las 41 plantas de cacao, están agrupadas en un solo clúster.

Adicionalmente, el dendograma muestra que, las 41 plantas de cacao se encuentran genéticamente más emparentadas con las 2 accesiones de cacao Nacional (AM-2P y AM-3P) utilizadas como controles de referencia, que con los controles proporcionados por la USDA. La distancia genética entre las dos muestras de cacao pertenecientes al grupo de los Forasteros Amazónicos (NAT-PE4 y NAT-PE5) con Criollo-22 es del 18%, mientras que la distancia genética detectada entre las muestras control de cacao Nacional con Criollo-22 es del 9% (resultados no mostrados).

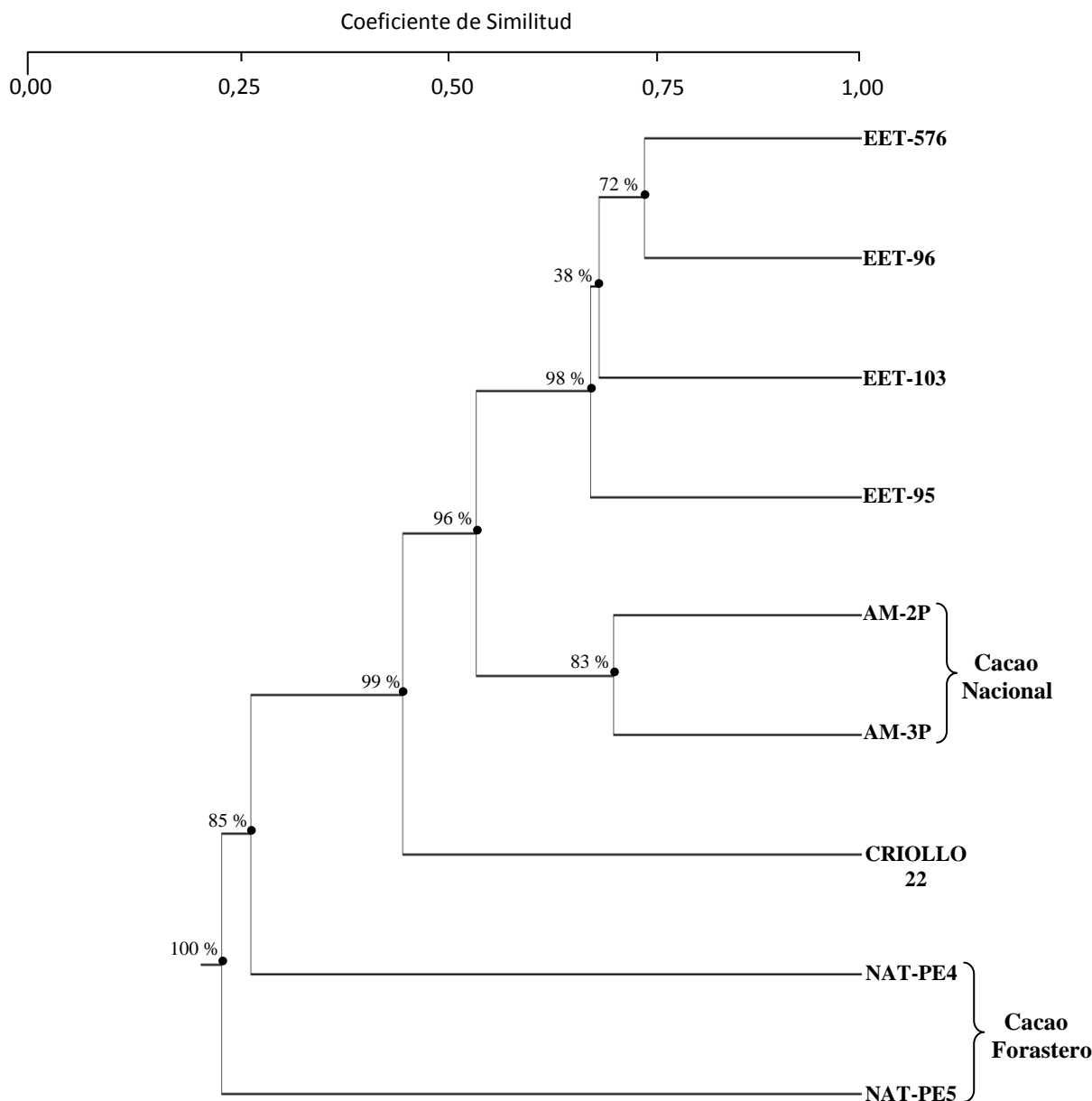


Figura 1. Dendograma basado en Rogers (1972) [36]. Relación genética entre cuarenta y seis accesiones de cacao (*Theobroma cacao* L.) calculada en base al análisis de nueve microsatélites loci. Los valores en porcentajes indican el número de veces que los genotipos fueron agrupados juntos en 1000 ciclos de ligamiento. El coeficiente de correlación cofenética (r) fue de 0,90.

Estos resultados sugieren que las diferentes poblaciones de cacao Nacional están genéticamente emparentadas tanto con el grupo de los Criollos, como con el grupo de los Forasteros, tal como lo expuesto anteriormente por Soria y Vera [8, 12] en sus respectivas publicaciones. Finalmente, el coeficiente de correlación cofenética (r) de 0,90 muestra que la relación entre la matriz de similaridad y el dendograma obtenido es correcta.

Los marcadores moleculares han sido ampliamente usados para evaluar accesiones duplicadas o mal etiquetadas en los distintos bancos de germoplasma alrededor del mundo. A diferencia de los métodos de identificación, que usan marcadores moleculares dominantes, como los RAPD, RFLP, o AFLP, los métodos de identificación molecular que se basan en el uso de microsatélites son significativamente más precisos debido a que la identificación de la identidad genética de las accesiones se basa en el análisis del perfil genético de muchos loci (permiten la identificación de heterocigotos).

La evaluación de la diversidad genética realizada en base al análisis de nueve microsatélites loci en 41 plantas de cacao procedentes de cuatro cultivares diferentes reveló que la mayor parte de los loci eran altamente polimórficos y presentaban altos niveles de heterocigosidad observada y de heterocigosidad esperada (diversidad genética). Similares conclusiones fueron obtenidas por Lerceteau *et al* [16] quienes utilizando 43 sondas RFLP y un set de 18 oligonucleótidos, diseñados para amplificar aleatoriamente fragmentos de ADN (RAPD, por sus siglas en inglés), evaluaron la diversidad genética de 60 plantas de cacao Nacional con el objetivo de definir la estructura genética de las distintas poblaciones analizadas. Los autores determinaron que las distintas poblaciones de cacao Nacional presentaban diversos niveles de heterocigosidad, siendo las poblaciones más polimórficas aquellas en las que se habían producido hibridaciones entre los grupos Nacional y Trinitario. Es importante mencionar además que los autores determinaron que los clones EET 95, EET96 y EET103 presentaron altos niveles de similaridad genética entre ellos. Estos resultados demuestran que al igual que los marcadores microsatélites, los RFLP y RAPD son útiles para realizar estudios de diversidad genética en distintas poblaciones de cacao. Sin embargo, la principal desventaja que presentan los marcadores moleculares dominantes es la dificultad para lograr establecer perfiles genéticos estandarizados entre laboratorios, particularmente cuando los alelos difieren solamente en uno o dos pares de bases [37], en contraste el uso de los marcadores microsatélites ha permitido que diferentes laboratorios localizados alrededor del mundo puedan establecer de forma rápida, fácil y reproducible los perfiles genéticos de

distintas poblaciones de cacao. [16]. En este estudio se comprobó que los nueve microsatélites loci aislados y caracterizados por Lambert *et al* [29] son efectivos para llevar a cabo análisis de *fingerprinting* en distintos cultivares de *Theobroma cacao* con un alto porcentaje de precisión, reduciendo de esta manera el tiempo y el número mínimo de muestras que anteriormente era requerido para llevar a cabo estudios dirigidos a determinar la diversidad genética en distintas poblaciones de cacao.

A pesar de que se utilizó un reducido número de loci, para confirmar la identidad genética de 41 plantas de cacao, se pudo obtener resultados altamente confiables usando la combinación de loci recomendada por Lambert *et al* [29].

Por otra parte, es importante mencionar que estos loci son capaces además de detectar redundancia genética y duplicados en los bancos de germoplasma de cacao [38]. Tener un alto nivel de redundancia en las colecciones de cacao no solo incrementaría los costos de mantenimiento, sino que además obstaculizaría la potencial explotación del germoplasma para el mejoramiento genético de los cultivos. Una exhaustiva evaluación de la redundancia y de la diversidad genética es particularmente importante, ya que las semillas de algunos grupos de cacao son recalcitrantes y por lo tanto las plantas solo pueden ser mantenidas como colecciones *ex situ* en los campos de cultivo o en invernadero [39].

4. Conclusiones

Los nueve pares de iniciadores microsatélites utilizados en este estudio fueron altamente discriminativos y demostraron tener un alto nivel de exactitud para verificar la identidad genética y para agrupar a las 41 plantas de cacao, mantenidas como colecciones *ex situ* en un invernadero privado ubicado en la Región Amazónica del Ecuador, dentro del grupo de cacao Nacional. La estructura genética de las poblaciones de cacao Nacional, se caracterizó por presentar altos niveles de heterocigosidad dentro de los individuos de un mismo grupo y por mostrar bajos niveles de diferenciación genética entre poblaciones.

Debido a la continua introducción de material genético foráneo, cada vez existen más plantaciones constituidas por material genético híbrido, como consecuencia la calidad y el número de árboles plantados de cacao Nacional han ido disminuido paulatinamente. La disminución de la calidad del cacao Ecuatoriano ha provocado que cerca del 25% del cacao que se exporta anualmente a los mercados internacionales deje de ser considerado como 'fino de aroma', y que consecuentemente se obtenga un menor precio por las exportaciones.

El establecimiento de una base de datos con el tamaño estándar de los alelos detectados tanto en las 41 plantas de cacao estudiadas como en las accesiones utilizadas como controles de referencia, podría contribuir en el mantenimiento y conservación de las colecciones de cacao Nacional en Ecuador, facilitaría especialmente la identificación de material genético híbrido, de esta forma se podrían asegurar la calidad y el intercambio sólo de genotipos de cacao Nacional entre los distintos bancos de germoplasma germoplasma y se podrían además optimizar programas de mejoramiento genético encaminados a producir nuevas y mejoradas variedades de cacao Nacional para preservar su fino aroma y su exquisito sabor “arriba”.

5. Agradecimientos

Al personal del Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE) por apoyarnos durante la realización de este trabajo de investigación. Especialmente a Omar Ruíz por los consejos brindados para finalizar el manuscrito. Un especial agradecimiento para el Doctor Dapeng Zhang investigador de la USDA (United States Department of Agriculture) por habernos proporcionado el material genético de las muestras control.

6. Referencias

- [1] Cheesman, E. Notes on the nomenclature, classification and possible relationships of cocoa population. 1944. Tropical Agriculture. Vol.21. Pp 144–159.
- [2] Cuatrecasas, J. Cacao and its allies. A taxonomic revision of the genus *Theobroma*. 1964. National Herb Vol.35. Pp 375–614. Smithsonian Institution, Washington, DC.
- [3] Dias, L. Origin and distribution of *Theobroma cacao* L: A new scenario. In: Dias LAS (ed) Genetic improvement of cacao. Available at: <http://ecoport.org/ep?SearchType=earticleView&earticleId=197&page=-2>.
- [4] Loor, R., Risterucci, A., Courtois, B., Fouet, O., Jeanneasu, M., Rosenquist, E., Amores, F., Vasco, A., Medina, M., Lanaud, C. Tracing the native ancestors of the modern *Theobroma cacao* L. population in Ecuador. 2009. Tree Genetics and Genomes Vol.5. Pp. 421-433. Springer-Verlag 2009.
- [5] Hurst, J., Tarka, M., Powis, T., Valdez, F., Hester, R. Archaeology: cacao usage by the earliest Maya civilization. 2002. Nature 418:289–290
- [6] Pound, F., Cacao and witches’ broom disease (*Marasmius perniciosus*) of South America, with notes on other species of *Theobroma*. 1938. Yuille’s Printerie, Port of Spain, Trinidad and Tobago, 9–49. Reprinted 1982. Arch Cocoa Res 1:21–64.
- [7] Pound, F. A note about the cacao populations of South America. Report and Proceedings Cocoa Research Conference, London. 1945. Colonial 192:95–7. Reprinted 1982. Arch Cocoa Res 1: 93–97.
- [8] Soria, J. Principal varieties of cocoa cultivated in tropical America. 1970. Cocoa Grow Bull 19: 12-21.
- [9] Enriquez, G. Characteristics of cacao “National” of Ecuador. International Workshop on Conservation. Characterization and Utilization of Cocoa Genetic Resources in the 21st century 1982. Port of Spain. Trinidad 13-17th September. The Cocoa Research Unit. The University of the West Indies. Pp 269-278.
- [10] Lerceteanu, V., Robert, T., Pétiard, V., Crouzillat, D. Evaluation of the extent of genetic variability among *Theobroma cacao* L accessions using RAPD and RFLP markers 1997. Theor Appl Genet 95: 10-19.
- [11] Osorio, R. Estudio del Efecto de *Trichoderma harzianum* en el control de *Moniliophthora roreri* en plantas de *Theobroma cacao* en la Provincia de Esmeraldas. 2010. Escuela Politécnica Nacional. Facultad de Ingeniería Química y Agroindustrial. Pp. 1 – 13.
- [12] Vera, B. Botánica del cacao. Manual del cultivo de cacao. 1993. INIAP, EET-Pichilingue, Quevedo, Ecuador, pp 10-15.
- [13] Van Hall, C. Cocoa, 2nd edition. MacMillan, London, pp 304-320.
- [14] Rorer, J. Ecuador cacao. 1926. Tropical Agriculture. Trinidad. 3: 69-69.
- [15] Pound, F. Cacao and witches broom disease (*Marasmius perniciosus*) of South America, with notes on other species of *Theobroma*. 1938. Yuille’s Printerie, Port of Spain, Trinidad and Tobago, 9-49. Reprinted 1982. Arch Cocoa Res 1:21-64.
- [16] Loor, R. Obtención de híbridos de cacao tipo Nacional provenientes de materiales de alta productividad y resistentes a enfermedades. Tesis de Ingeniero Agrónomo. Universidad Técnica de Manabí, Portoviejo, Ecuador.
- [17] Lerceteanu, E., Quiroz, J., Soria, J., Flipo, S., Pétiard, V., and Crouzilat, D. Genetic differentiation among Ecuadorian *Theobroma cacao* L. accessions using DNA and morphological analyses. 1997. Euphatica 95: 77-87. Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands.
- [18] Zhang, D., Boccara, M., Motilal, L., Butler, D., Umharan, P., Mischke, S., Meinhardt, L. Microsatellite variation and population structure in the “Refractario” cacao of Ecuador. 2008. Conserv Genet 9: 327-337. Springer Science+Business Media B.V. 2007

- [19] Lanaud, C., Motamayor, J., Risterucci, A. Implications of new insight into the genetic structure of *Theobroma cacao* L. for breeding strategies. 2001. In: Proceedings of the International Workshop on New Technologies for Cocoa Breeding, Kota Kinabalu, Malaysia, London: Ingenic Press, 89–107. <http://www.personal.psu.edu/users/a/o/aoa113/ingenic/documents/communications/meetings/past/2000INGENIC.pdf>
- [20] Kobayashi, N., Horikoshi, T., Katsuyama, H., Handa, T., Takayanagi, K. A simple and efficient DNA extraction method for plants, especially woody plants. 1998. *Plant Tissue Cult Biotechnol* 4 (2):76–80
- [21] Zhang, D., Boccara, M., Motilal, L., Mischke, S., Johnson, E., Butler, D., Bailey, B., Meinhardt, L. Molecular characterization of an earliest cacao (*Theobroma cacao* L.) collection from Upper Amazon using microsatellite DNA markers. 2009. *Tree Genetics & Genomes*. Springer-Verlag 2009.
- [22] McPherson, M., and Moller, S. PCR. 2000. School of Biochemistry and Molecular Biology, University of Leeds, Leeds, UK and Laboratory of Plant Molecular Biology, Rockefeller University, New York, USA. Springer-Verlag. New York. Pp. 1–23.
- [23] Buhariwalla, H., Jarret, R., Jayashree, B., Crouch, J., and Ortiz, R. Isolation and characterization of microsatellite markers from *Musa balbisiana*. 2005. *Molecular Ecology Notes* 5. México pp. 327–330.
- [24] Creste, S., Benatti, T., Orsi, M., Risterucci, A., y Figueira, A. Isolation and characterization of microsatellite loci from a commercial cultivar of *Musa acuminata*. *Molecular Ecology Notes* 6. Brazil, 2006, pp. 303–306.
- [25] Riviera y Colaboradores. Isolation and characterization of polymorphic microsatellites in *Coco nucifera*. 1999. *Genome*. 42: 668–675.
- [26] Dellaporta, S. Word, J. A plant DNA minipreparation: version II. *Plant Molecular Biology Reports*. N°1, 1983, pp. 19 – 21.
- [27] Aljanabi, S., Martinez, I. Universal and rapid salt – extraction of high quality genomic DNA for PCR – based techniques. 1997. *Nucleic Acids Research* 25. Pp. 4692 – 4693.
- [28] Santos, E. Characterization and isolation of T-DNA tagged banana promoters active during *in vitro* regeneration and low temperature stress. *Disertaciones de Agricultura*. Ph.D. thesis 787. Katholieke Universiteit Leuven, Belgium. Faculteit Bio-Ingenuieurswetenschappen. 2008, 188 p.
- [29] Lambert, A., Zhang, D., Umaharan, P., Mischke, S., Boccara, M., Pinney, S. Increasing Accuracy and Throughput in Large-Scale Microsatellite Fingerprinting of Cacao Field Germplasm Collection. 2009. *Tropical Plant Biol.* 2: 23–37.
- [30] Miller, M. Tools for populations genetic analyses (TFPGA) version 1.3. A windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. 1997. Department of Biological Sciences. North Arizona University.
- [31] Population Genetic Analysis. POPGENE Version 1.32. A Joint Project of Ag/For Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta and Center for International Forestry Research.
- [32] Goudet, J. Fstat. Versión 2.9.3.2. Institute of Ecology. Biology Building, 2002. UNIL. CH-1015, Lausanne, Switserzland.
- [33] Weir, B., Cockerhan, C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38:1358–1370.
- [34] Sereno, M., Albuquerque, P., Vencovsky, R., Figueira, A. Genetic diversity and natural population structure of cacao (*Theobroma cacao* L.) from the Brazilian Amazon evaluated by microsatellite markers. 2006. *Conservation Genetics* 7: 13 – 24. Springer 2006.
- [35] Zhnag, D., Arevalo-Gardini, E., Mischke, L., Zuñiga-Cernades., Barreto-Chávez, A., Aguila, J. Genetic diversity and structure of managed and semi-natural populations of cocoa in the Huallaga and Ucayali valleys of Peru. 2006. *Annals of Botany* 98:647–655. Available online at www.aob.oxfordjournals.org.
- [36] Rogers, J. S. (1972). Measures of genetic similarity and genetic distance. *Studies in Genetics*, University of Texas Publications, 7213:145–153
- [37] Cryer, N., Fenn, M., Turnbull, C and Wilkinson, M. Allelic size standards and reference genotypes to unify international cocoa (*Theobroma cacao* L.) microsatellite data. 2006. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 53: 1643 – 1652.
- [38] Risterucci, A., Eskes, B., Fargeas, D., Motamayor, J., Lanaud, C. Use of microsatellite markers for germplasm identity analysis in cocoa. 2001. In: Proceeding of the Third International Group for Genetic Improvement of Cocoa (INGENIC). International Workshop on the New Technologies and Cocoa Breeding. 16th – 17th October 2000, Kota Kinabalu, Malaysia, pp. 25–33.
- [39] Johnson, S., Mora, A., Schnell, R. Field guide efficacy in the identification of reallocated clonally propagated accessions of cacao. 2007. *Genet Resource Crop. Evol* 54: 1301–1313.