



Centro de Investigaciones en
Biotecnología Agrícola
"Dra. Dora Micheletti de Zerpa"

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE AGRONOMÍA
INSTITUTO DE GENÉTICA-CIBA
LABORATORIO DE GENÉTICA MOLECULAR

INFORME FINAL

ESTUDIO DE IDENTIDAD
DE ÁRBOL DE CACAO,
CHOCOLATES MARQUEZ
San Francisco, estado Zulia

Solicitante: Sr. Orlando Márquez

Institución: Chocolates Márquez

Fecha: 8 de diciembre de 2021

INTRODUCCIÓN

La utilización de descriptores morfológicos para la caracterización de genotipos es sumamente útil, sin embargo, la medición de los mismos resulta un proceso largo que requiere de gran trabajo (González, 2001) y, dado las influencias que sobre las plantas ejercen las variables ambientales, existe una gran controversia sobre la efectividad de la caracterización de cacao por este método (N´Goran *et al.* 1994).

Es por ello que se han empleado técnicas en las cuales intervienen marcadores bioquímicos y moleculares, tales como los análisis de proteínas, Isoenzimas y de ADN, entre estos últimos tenemos: Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD), Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP), Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) y Simple Sequence Repeat (SSR). La utilización de marcadores moleculares, permite la caracterización de los materiales a nivel genotípico, permitiendo evaluar las relaciones evolutivas y los niveles de divergencia genética con mayor precisión que los morfológicos (Singh *et al.* 1991).

El uso de técnicas moleculares como complemento de la caracterización morfológica, permite identificar con rigurosidad los genotipos de cacao y su proximidad, pudiendo además, utilizarse la información generada para garantizar la pureza genética de aquellas plantas colectadas en campo y propagadas en viveros e inclusive como apoyo a una posible certificación de calidad de las almendras (Marcano, 1996, Ramos *et al.* 1996, Ramos, 1997).

En ese sentido, en el caso particular de Chocolates Márquez, se propagaron por semilla plantas ubicadas en la Sierra de Perijá, estado Zulia. Según comenta el Sr. Orlando Márquez, estas plantas estaban ubicadas en una zona deshabitada en las cercanías de un afluente. De tales plantas proviene la que es objeto de este estudio, sembrada en el sector Sur América, del Municipio San Francisco, estado Zulia, a 53msnm, que tal como se observa en la figura 1 presenta frutos y semillas con características morfológicas del tipo porcelana.

OBJETIVO:

Identificar el origen genético del árbol ubicado en el sector SurAmérica del Municipio San Francisco, estado Zulia, con el uso de marcadores del ADN tipo microsatélites (SSR).



Figura 1. Características morfológicas de frutos y semillas del árbol de cacao ubicado en sector Sur América, municipio San Francisco, estado Zulia, identificado como Márquez 1

METODOLOGÍA

1. COLECTA DE MATERIAL VEGETAL

En junio 2021 se recibió el material vegetal (hojas) de árbol bajo estudio, identificado como Márquez 1, a partir del cual se procedió a extraer el ADN, así como los distintos referenciales de los tipos criollo, criollo moderno y forastero.

2. EXTRACCIÓN DE ADN

Metodología

Se procedió a la extracción de ADN a partir de 0,5g de hojas jóvenes de cacao recibidas, siguiendo protocolo de Risterucci *et al* (2000) estandarizado por Jiménez (2006). Se verificó la cantidad y calidad de ADN en geles de agarosa al 0,8% comparándolos con un patrón de referencia de ADN Lambda de concentración conocida.

Finalmente, por comparación con un marcador de ADN de concentración conocida se realizó la estimación de la concentración de cada muestra. Con tal estimación y la verificación de la calidad se procedió a seleccionar las muestras para el estudio molecular; estas fueron diluidas a una concentración de 2ng/μL.

RESULTADOS

3. AMPLIFICACIÓN DE MICROSATÉLITES (SSR)

Metodología

Se seleccionaron 10 microsatélites a partir del mapa de ligamiento desarrollado por Pugh *et al*, (2004), verificados por Jiménez (2006). Tales SSR presentan alto polimorfismo y buena resolución en electroforesis (Cuadro 1).

La amplificación del ADN por la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se realizó en un termociclador MJ Research, y se utilizaron 10 ng del ADN de cada muestra de cacao, contenidos en volúmenes de 20μl. Se siguió el medio de reacción utilizado por Jiménez (2006), como se muestra en cuadro 2.

Cuadro 1. Microsatélites (SSR) seleccionados para el análisis de identidad genética de árbol Márquez 1, ubicado en sector Sur América, municipio San Francisco, estado Zulia.

Marcador SSR	Cromosoma de ubicación en <i>T. cacao</i>	SSR	Tamaño esperado (pb)
1	1	mTc 121	138
2	2	mTc 73	112
3	3	mTc 167	254
4	4	mTc 221	273
5	5	mTc109	162
6	6	mTc 291	218
7	7	mTc 190	166
8	8	mTc 163	194
9	9	mTc 266	192
10	10	mTc 91	186

Cuadro 2. Medio de reacción utilizado para la amplificación de SSR en cacao (Jiménez, 2006)

REACTIVO	VOLUMEN
ADN 2 ng/μL	5 μL
Buffer green Go Taq	4 μL
MgCl ₂ 25 mM	2 μL
dNTP's 20mM	0,4 μL
BSA 5 mg/mL	0,2 μL
Primer F 5 mM	1 μL
Primer R 5mM	1 μL
Go Taq	0,5 μL
Agua Bidestilada (ampolla)	5,9 μL
VOLUMEN TOTAL	20 μL

El Programa de PCR utilizado fue el siguiente:

1. 94 °C por 5 minutos
2. 94 °C por 30 segundos
3. 46 °C por 1 minuto
4. 72 °C por 1 minuto
5. Volver al paso 2 y repetir pasos 2, 3 y 4 treinta y cinco (35) veces
6. 72 °C por 8 minutos
7. 8 °C por 15 minutos
8. FIN

Duración: 2 horas y 40 minutos.

Visualización de los productos de amplificación (SSR)

Después de la amplificación del ADN, se realizó una corrida electroforética en geles de agarosa al 2,5%, para verificar la correcta amplificación. Finalmente, los SSR fueron visualizados en geles de poliacrilamida al 6% de 0,4 mm de espesor, y revelados con Nitrato de Plata de acuerdo a la metodología de Arnao (2003).

RESULTADOS

En la Figura 2 se muestra el gel de poliacrilamida con los productos amplificados para el microsatélite mTc91, de los genotipos incluidos en el estudio. En la misma se señalan los dos alelos visualizados de 198pb (alelo 1) y 192pb (alelo 2), así como la identificación de genotipos homocigotas para el alelo 1, como IMC-67, que solo presentan una banda de 198pb, genotipos homocigotas para el alelo 2, que solo presentan una banda de 192pb correspondientes a los árboles de cacao criollo, tipo porcelana; y genotipos heterocigotas los cuales presentan las dos bandas, como Ocumare-61.

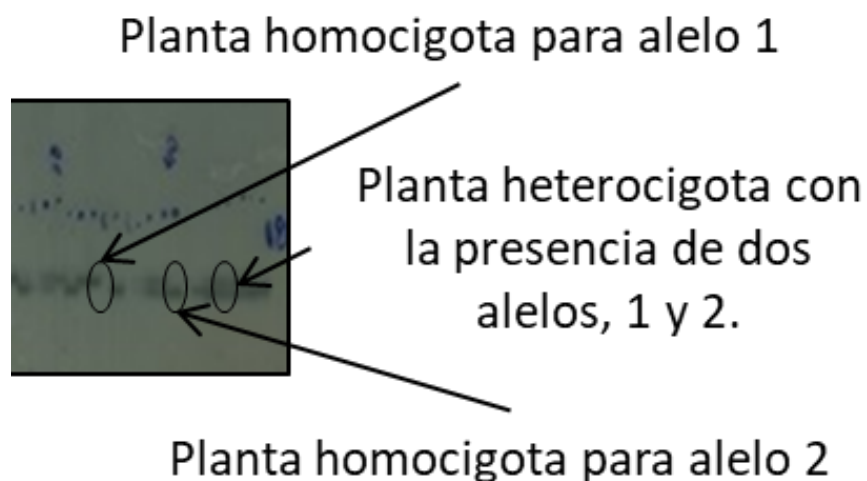


Figura 2. Productos de amplificación el microsatélite mTc91 obtenidos para distintos genotipos de cacao, visualizados en geles de poliacrilamida al 6%.

En la misma se observan, de manera nítida, los carriles correspondientes a cada árbol, permitiendo asignar un genotipo a cada uno para cada microsatélite.

4. ANÁLISIS GENÉTICO

Metodología

Para cada microsatélites (SSR) y muestra se asignó un genotipo dependiendo de las banda (s) observada (s), la matriz de datos así generada se utilizó para los siguientes análisis:

Similitud genética

A fin de establecer las relaciones genéticas entre los materiales incluidos, una vez caracterizados los genotipos para cada marcador molecular, se calculó el coeficiente de similitud de DICE, a través de la fórmula:

$$Sd = \frac{2a}{2a+b+c} ,$$

donde “a” corresponde al número de bandas comunes entre dos genotipos; y, “b” y “c”, representan el número de bandas presentes en un genotipo y ausentes en el otro (Díaz, 2005).

Finalmente, a partir de la matriz generada por el índice seleccionado, se obtuvo un dendrograma UPGMA (ligamiento promedio no ponderado), mediante el programa PAST, versión 1.60.

Caracterización de origen

A fin de esclarecer el origen genético del material bajo estudio, los resultados del análisis de similitud se compararon con germoplasma característico de los cacaos tipo criollo, criollo moderno y forastero. Se señalan los grupos correspondientes a cada genotipo.

Resultados

Similitud genética

En la Figura 3 se presenta el dendrograma obtenido mediante el análisis de agrupamiento basado en el método de UPGMA de 6 genotipos de cacao incluidos en el presente estudio. En tal figura se presenta la diferenciación del clon IMC-67 tipo forastero del resto de los árboles. Igualmente se observa la diferencia del clon OC-61, tipo criollo moderno.

Seguidamente se observan los otros 3 referenciales tipo criollo, Chiapas, Porcelana rojo y Porcelana Verde, en conjunto con Márquez 1, formando 2 grupos. El grupo I conformado por los Porcelana rojo y Chiapas, y un segundo grupo con Porcelana Verde y Márquez 1.

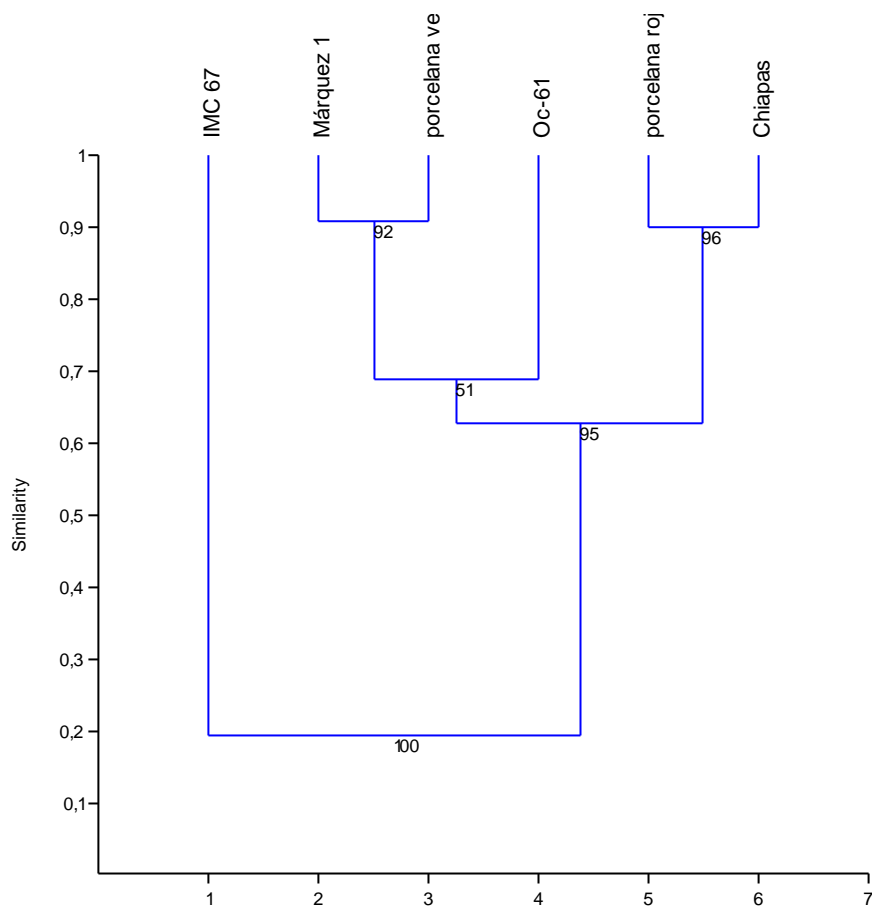


Figura 3. Dendrograma del análisis de similitud por el método UPGMA de 6 genotipos de cacao

Resultados similares se obtuvieron por el análisis de correspondencia en el cual mediante los vectores 1 y 2 se explica un 43,9% de la similitud observada en los 6 genotipos de cacao mediante alelos microsatélites.

En efecto, como se muestra en la figura 4 el genotipo IMC-67 es el más distante al resto de los materiales genéticos. Por otra parte, hacia el lado inferior izquierdo se agruparon los genotipos criollos de occidente, y hacia la parte superior izquierdo el de la costa aragüeña.

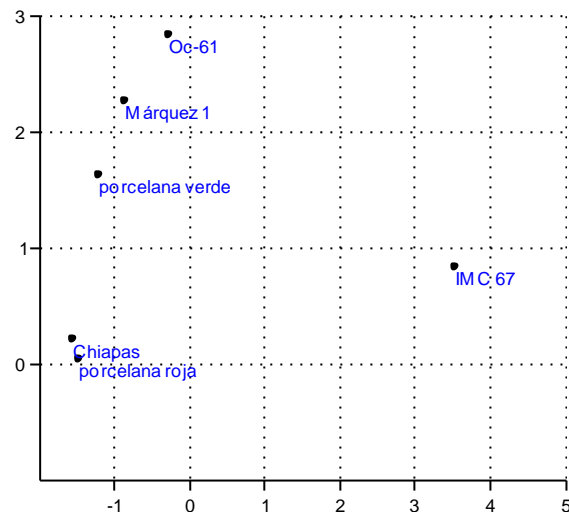


Figura 4. Análisis multivariado de correspondencia entre 6 genotipos de cacao, mediante alelos microsatélites

Caracterización de genotipos

En el cuadro 7 se presenta el % de loci homocigotas, y el % de la presencia de alelos tipo criollo observados en los genotipos del occidente del país, con tal información se le asignó el grupo genético a cada clon.

Un aspecto característico del cacao tipo criollo es su pureza, observable por el alto porcentaje de homocigosis (Motamayor, *et al.*, 2002), así como la presencia de alelos típicos. Con base en esos principios se le asignó el grupo genético “criollo” a los materiales del occidente del país.

En el caso del cacao de la costa aragüeña, es posible encontrar cacaos trinitarios, criollos e hibridaciones entre estos, llamados criollos modernos, los cuales presentan un porcentaje de homocigosis mayor al 50%, así como la presencia de los alelos típicos de cacao criollo (Motamayor *et al.*, 2003); tal es el caso de Ocumare-61.

El cacao forastero tiende a presentar un alto grado de autoincompatibilidad por lo que la homocigosis es baja, tal es el caso de IMC-67.

En el caso del árbol bajo estudio, Márquez 1, se obtuvo un alto nivel de homocigosis, y alta presencia alelos criollo, específicamente muy próximo al cacao tipo porcelana verde. Un aspecto importante es que presenta un 20% de alelos distintos al tipo porcelana utilizados como referenciales en el presente estudio lo que indicaría la particularidad de este material e interesante para seguir su propagación y evaluación en campo, pues siendo un genotipo puro presenta algunas diferencias a los referenciales.

Cuadro 7. Grupo asignado según análisis de agrupamiento, % de loci homocigotas y % alelos tipo criollo de occidente, para 10 microsatélites de 6 genotipos de cacao

Genotipo	% de loci homocigotas	% alelos tipo criollo de occidente	Grupo Genético
Porcelana fruto verde	100	100	Criollo Porcelana
Porcelana fruto rojo	100	100	Criollo Porcelana
Márquez 1	90	90	Criollo Porcelana
IMC 67	10	10	Forastero
OC-61	40	66,7	Criollo moderno
Chiapas	100	90	Criollo Antiguo

CONCLUSIONES

El árbol de origen desconocido, identificado como Márquez 1 ubicado en el sector Sur América, municipio san Francisco, estado Zulia, corresponde a un **material de tipo criollo porcelana** muy próximo al tipo porcelana de fruto verdes, con un 90% de homocigosis lo que evidencia su pureza, aunque con un alelo distinto al criollo del occidente del país. Se recomienda su propagación y evaluación en campo pues representa un material particular.

Dra. Catalina Ramis
Instituto de Genética
Centro de Investigaciones en Biotecnología Agrícola (CIBA)
Facultad de Agronomía
Universidad Central de Venezuela

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARNAO, E. 2003. Selección asistida por marcadores moleculares en un programa de retrocruzas en arroz. Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de Magister scientiarum en Agronomía. Orientación: Mejoramiento de plantas. Postgrado en Agronomía. Universidad Central de Venezuela.

FRANCESCHI, JV. 2017. El cacao en la vida venezolana y en el mundo. Ed. Tropykos. Caracas, Venezuela. 231p

JIMENEZ, J. 2006. Caracterización morfológica y molecular del jardín clonal de cacao (*Theobroma cacao* L.) ubicado en la estación INIA Miranda. Tesis de Pre-grado. Universidad Central de Venezuela. Maracay. Venezuela. 120 p.

MOTAMAYOR, J.; A. RISTERUCCI; P. LOPEZ; C. ORTIZ; A. MORENO; C. LANAUD. 2002. Cacao domestication I: the origin of the cacao cultivated by the Mayas. *Heredity (USA)* 89: 380-386.

MOTAMAYOR, J., RISTERUCCI, A., HEATH, M., LANAUD, C. (2003). Cacao domestication II: progenitor germplasm of the Trinitario cacao cultivar. *Heredity*, 91: 322-330.

PUGH, T.; FOUET, O.; RISTERUCCI, A.; BROTTIER, P; ABOULADZE, M.; DELETREZ, C.; COURTOIS, B.; CLEMENT, D.; LARMANDE, P.; N'GORAN, J. and LANAUD, C. 2004. A new cacao linkage map based on codominant markers: development and integration of 201 new microsatellite markers. *Theor Appl Genet* 108: 1151-1161.

SALAZAR, J. 2016. Análisis de la diversidad genética del cacao (*Theobroma cacao* L.) venezolano resguardado en los bancos de germoplasma nacional, con miras a establecer programas de mejoramiento genético. Trabajo de Maestría. Maracay, Venezuela; Facultad de Agronomía. Universidad Central de Venezuela. 155p.