



UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO

FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS

CARRERA INGENIERÍA AGROPECUARIA

Proyecto de Investigación previo a la
obtención del título de Ingeniero
Agropecuario.

Título del Proyecto de Investigación:

**Relaciones filogenéticas entre tipos de cacao (*theobroma cacao* L.): forastero, trinitario
y nacional, basadas en marcadores morfológicos y secuencias nucleotídicas de la
región ITS; y su posible uso en la identificación de clones.**

Autor:

Jonathan Carlos Zambrano Cruz

Director del Proyecto de Investigación:

Dr. Camilo Alexander Mestanza Uquillas

Quevedo – Los Ríos – Ecuador.

2017

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

Yo, **Jonathan Carlos Zambrano Cruz**, declaro que el trabajo aquí descrito es de mi autoría; que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional; y que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

La Universidad Técnica Estatal de Quevedo, puede hacer uso de los derechos correspondientes a este trabajo, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su reglamento y por la normatividad institucional vigente.

Jonathan Carlos Zambrano Cruz
CC. 230008702-6
AUTOR.



Acreditada

Teléfonos : FCP (Fax) 783 487 UTEQ (593-05) 750 320 / 751 430 / 753 302

Fax UTEQ : (593 –05) 753 300 / 753 303 / 752 177

E.mail.info@uteq.edu.ec /fcp_91@yahoo.es

FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS
UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO
CAMPUS UNIVERSITARIO LA MARÍA
Km. 7 ½ Vía Quevedo-El Empalme, Entrada a Mocache



CASILLAS

Guayaquil

:10672

Quevedo : 73

Quevedo – Los Ríos – Ecuador

La Primera Universidad Agropecuaria del País. Acreditada

CERTIFICACIÓN DE CULMINACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

El suscrito, **Dr. Camilo Mestanza Uquillas**, Docente de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, certifica que el estudiante **Jonathan Carlos Zambrano Cruz**, realizó el Proyecto de Investigación de grado titulado, “**RELACIONES FILOGENÉTICAS ENTRE TIPOS DE CACAO (*Theobroma cacao* L.): FORASTERO, TRINITARIO Y NACIONAL, BASADAS EN MARCADORES MORFOLÓGICOS Y SECUENCIAS NUCLEOTÍDICAS DE LA REGIÓN ITS; Y SU POSIBLE USO EN LA IDENTIFICACIÓN DE CLONES**”, previo a la obtención del título de Ingeniero Agropecuario, bajo mi dirección, habiendo cumplido con las disposiciones reglamentarias establecidas para el efecto.

Atentamente,

Dr. Camilo Mestanza Uquillas

DIRECTOR DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Quevedo, 6 de noviembre del 2017

Ingeniero

Gerardo Segovia Freire

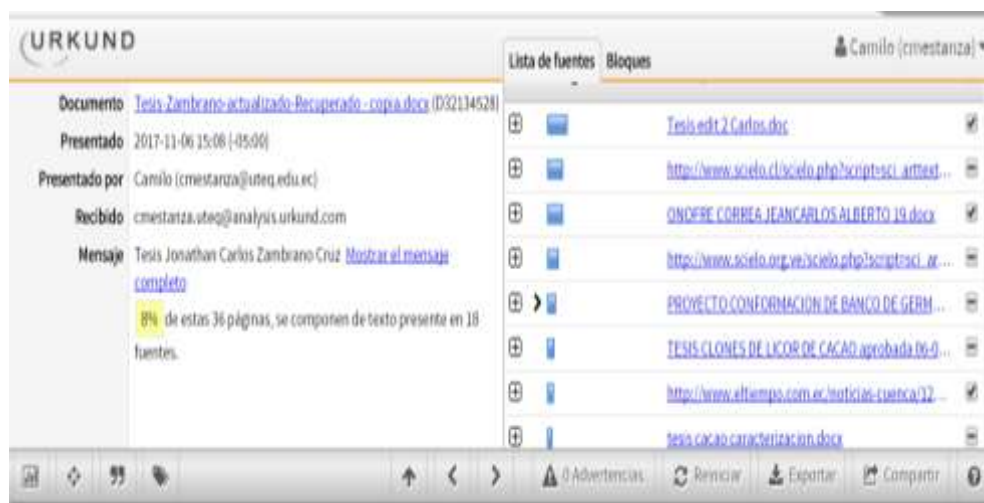
COORDINADOR DE CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA

De mi consideración:

Dado que el suscrito es conocedor que el proyecto de investigación titulado **“RELACIONES FILOGENÉTICAS ENTRE TIPOS DE CACAO (*Theobroma cacao* L.): FORASTERO, TRINITARIO Y NACIONAL, BASADAS EN MARCADORES MORFOLÓGICOS Y SECUENCIAS NUCLEOTÍDICAS DE LA REGIÓN ITS; Y SU POSIBLE USO EN LA IDENTIFICACIÓN DE CLONES”** de autoría del señor **Jonathan Carlos Zambrano Cruz**, estudiante de la carrera de INGENIERÍA AGROPECUARIA, del cual fui designado Profesor Tutor de Trabajo de investigación. Proyecto que ha sido analizado a través de la herramienta URKUND, no incluyendo las listas de fuentes de comparación entre las cuales se encuentran las páginas preliminares de caratula, declaración de auditoria, certificación, agradecimientos, dedicatoria, índices, entre otras fuentes que no son utilizadas en el texto de la tesis.

Por lo expresado, CERTIFICO que el porcentaje validado por el URKUND es de **8% de similitud** (Figura 1), el mismo que es permitido por el mencionado Software, por lo cual solicito la continuación con los trámites pertinentes para solicitar fecha de sustentación del proyecto de investigación del señor **Jonathan Carlos Zambrano Cruz**.

Figura 1. Certificación del porcentaje de confiabilidad (92%) y similitud (8%) de URKUND.



Atentamente,

Dr. Camilo Mestanza Uquillas

DOCENTE TUTOR



UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA INGENIERÍA

CARRERA DE INGENIERIA AGROPECUARIA

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Título:

“RELACIONES FILOGENÉTICAS ENTRE TIPOS DE CACAO (*Theobroma cacao* L.): FORASTERO, TRINITARIO Y NACIONAL, BASADAS EN MARCADORES MORFOLÓGICOS Y SECUENCIAS NUCLEOTÍDICAS DE LA REGIÓN ITS; Y SU POSIBLE USO EN LA IDENTIFICACIÓN DE CLONES”

Presentado a la Comisión Académica como requisito previo a la obtención del título de Ingeniero Agropecuario.

Aprobado por:

PRESIDENTE DEL TRIBUNAL
Dr. Gregorio Vásconez Montufar

MIEMBRO DEL TRIBUNAL
Ing. Wilfrido Escobar Pavón M.Sc.

MIEMBRO DEL TRIBUNAL
Ing. Diana Veliz Zamora M.Sc.

AGRADECIMIENTO

A Dios, primeramente, por darme el aliento de vida y derramar sus bendiciones en cada momento. A mis padres Ecuador Zambrano y Hilda Cruz por darme la vida, por apoyarme en mis estudios y estar en los momentos más difíciles, por lo cual viviré eternamente agradecido y a su vez retribuyo gran parte de ese esfuerzo con este logro. A mis hermanas Carola Zambrano y Violeta Zambrano que contribuyeron con su apoyo y palabras de ánimo que dieron el valor necesario para culminar mis estudios.

Al Dr. Camilo Mestanza Uquillas por su coordinación y paciencia que aportó con sus conocimientos como una guía fundamental en mi trabajo de investigación, a quien tomo como un ejemplo a seguir. A la Decana Jenny Torres por su colaboración y apoyo en la realización de los trámites pertinentes en este trabajo.

A la Universidad Técnica Estatal de Quevedo “Facultad de Ciencias Pecuarias” que me dio la oportunidad de formar parte de ella, de me llevo muchas experiencias y anécdotas que también fueron parte de mi formación profesional. A mis compañeros y amigos incondicionales de clase que con alegrías y tristezas compartimos momentos inolvidables

DEDICATORIA

Mi Proyecto de Investigación se lo dedico primeramente a Dios por ser el motor de mi vida y enseñarme que todo sucede para bien o es parte de sus propósitos. De manera Exclusiva a mis padres y familiares, ya que gracias a su apoyo moral y económico fue posible terminar mi carrera universitaria, a todos ustedes les digo misión cumplida, pero de mi parte hay muchos más sueños e ideales por alcanzar.

Resumen

El presente proyecto de investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo y en las Fincas; Experimental “La Represa” propiedad de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, localizada en el Kilómetro 7.5 de la Vía Quevedo- San Carlos; en el recinto Fanta, Provincia de Los Ríos, y Finca “Maquita” propiedad de la Fundación Maquita Comercializando como Hermanos (MCCH), ubicada en el Cantón Buena Fe a 5 km vía a Santo Domingo, Recinto Limones - Provincia de Los Ríos. El objetivo general fue determinar las relaciones filogenéticas entre tipos de cacao, Forastero, Trinitario y Nacional, basadas en marcadores morfológicos y secuencias nucleotídicas de la región ITS” y establecer el grupo de cacao al que pertenece un clon con características deseables denominado clon Pincay. Para lo cual se tomaron variables morfológicas cuantitativas y cualitativas de la hoja, flor, fruto y semilla y para el análisis molecular de la región ITS se tomaron muestras de hojas de 10 plantas de cada clon para la extracción de ADN y amplificación mediante primers específicos en (PCR). Se determinó mediante el análisis morfológico gran diversidad genética y variaciones en los caracteres dentro de un mismo clon ya sean por factores ambientales, fenológicos o productos de una fecundación cruzada. El estudio molecular de la región ITS con primers específicos, no permitió identificar regiones polimórficas que permitan identificar a cada uno de los grupos de cacao en estudio, debido a que los tipos de cacao analizados, comparten 100% de similitud en esta región. El clon Pincay comparte diversas características morfológicas que se asemejan a los cacaos Nacionales y Forasteros estas características fenotípicas no tienen diferencias significativas existiendo la posibilidad de ser un híbrido emparentado con ciertos grupos de la región.

Palabras claves: Relaciones filogenéticas, Región ITS, PCR, fecundación cruzada, fenotípicas, ADN.

Summary

The present research project was carried out in the Biotechnology Laboratory of the State Technical University of Quevedo and in the Farms; Experimental "La Represa" owned by the State Technical University of Quevedo, located at Kilometer 7.5 of Vía Quevedo-San Carlos; in the Fajita precinct, Province of Los Ríos, and Finca "Maquita" owned by the Maquita Fundación Comercializando Hermanos (MCCH), located in Cantón Buena Fe, 5 km via Santo Domingo, Limones Campus - Los Ríos Province. The general objective was to determine the phylogenetic relationships between types of cocoa, Forastero, Trinitario and Nacional, based on morphological markers and nucleotide sequences of the ITS region "and to establish the cocoa group to which a clone with desirable characteristics belongs to the Pincay clone. For which quantitative and qualitative morphological variables of the leaf, flower, fruit and seed were taken and for the molecular analysis of the ITS region leaf samples of 10 plants of each clone were taken for DNA extraction and amplification by specific primers in (PCR) A large genetic diversity and variations in the characters within the same clone were determined by the morphological analysis, whether due to environmental, phenological or cross-fertilization products. The molecular study of the ITS region with specific primers, did not identify polymorphic regions that allow identifying each of the groups of cocoa under study, because the types of cocoa analyzed, share 100% similarity in this region. The Pincay clone shares diverse morphological characteristics that resemble the Nacional and Forastero cacaos. These phenotypic characteristics do not have significant differences existing the possibility of being a hybrid related to certain groups of the region.

Keywords: Phylogenetic relationships, Region ITS, PCR, cross fertilization, phenotype, DNA.

TABLA DE CONTENIDO

Resumen	viii
Summary	ix
Introducción.....	1
CAPÍTULO I	3
CONTEXTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN	3
1.1. Problema de Investigación.	4
1.1.1. Planteamiento del problema.....	4
1.1.2. Formulación del problema.	5
1.1.3. Sistematización del problema.....	5
1.2. Objetivos.	6
1.2.1. Objetivo General.	6
1.2.2. Objetivos Específicos.....	6
1.3. Justificación.	6
CAPÍTULO II.....	7
FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN	7
2.1. Marco conceptual.....	8
2.2. Marco referencial.....	12
2.2.1. Origen del cacao.....	12
2.2.2. Importancia económica y social.....	12
2.2.3. Taxonomía del cacao.....	13
2.2.4. Grupos genéticos.	13
2.2.4.1. Cacao Criollo.	13
2.2.4.2. Cacao Forastero.....	14
2.2.4.3. Cacao Trinitario.	15
2.2.4.4. Cacao Nacional de Ecuador.....	15
2.2.5. Ácidos Nucleicos y sus Componentes.....	16
2.2.5.1. La estructura del ADN.....	17
2.2.5.2. El ADN como material genético.	18
2.2.5.3. Análisis de la Región ITS.....	19
2.2.6. Extracción de ADN.....	20
2.2.6.1. Amplificación <i>in vitro</i> del ADN.	21
2.2.6.2. Reacción en cadena de la polimerasa o PCR.	21
2.2.6.3. Electroforesis	23

CAPITULO III	24
METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN	24
3.1. Localización y duración de la investigación.	25
3.2. Tipos de investigación.	26
3.2.1. De laboratorio.	26
3.2.2. De campo.	26
3.2.3. Bibliográfica.	26
3.3. Métodos de investigación.	26
3.3.1. Método de observación.	26
3.3.2. Método analítico.	26
3.3.3. Método inductivo.	27
3.4. Fuentes de recopilación de información.	27
3.5. Diseño de la investigación.	27
3.6. Instrumentos de investigación.	28
3.6.1. Fase de campo.	28
3.6.1.1. Caracterización morfológica <i>in situ</i>.	28
3.6.1.2. Descriptores cuantitativos y cualitativos de la mazorca.	29
3.6.1.3. Tamaño de la hoja	30
3.6.1.4. Color del estaminoide de la flor	30
3.6.1.5. Forma y tamaño de la semilla.	31
3.6.1.6. Colecta del material vegetativo para el análisis molecular.	31
3.6.2. Fase de laboratorio.	31
3.6.2.1. Densidad estomática.	31
3.6.2.2. Extracción de ADN.	32
3.6.2.3. Cuantificación de ADN.	32
3.6.2.4. Amplificación de ADN y secuenciación de amplicones.	32
3.6.2.5. Análisis de datos moleculares.	33
3.7. Tratamiento de los datos.	33
3.7.1. Análisis de varianza y comparación de medias.	33
3.8. Recursos humanos y materiales.	34
3.8.1. Humanos.	34
3.8.2. Materiales y Equipos.	34
3.8.2.1. Material vegetativo.	34
3.8.2.2. Equipos de laboratorio.	34

3.8.2.3. Materiales de laboratorio.	34
3.8.2.4. Materiales de campo.	35
3.8.2.5. Reactivos.	35
CAPÍTULO IV	36
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	36
4.1. Resultados.	37
4.1.1. Caracterización fenotípica.	37
4.1.1.1. Evaluación de las variables cualitativas de la flor, fruto y semilla.	37
4.1.1.2. Evaluación de las variables cuantitativas de la hoja.	44
4.1.1.3. Evaluación de las variables cuantitativas del fruto.	45
4.1.1.5. Evaluación de las variables cuantitativas de la flor.	47
4.1.1.6. Densidad estomática.	48
4.1.2. Caracterización molecular.	49
4.2. Discusión.	51
CAPÍTULO V	56
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	56
5.1. Conclusiones.	57
5.2. Recomendaciones.	58
CAPÍTULO VI	59
BIBLIOGRAFÍA	59
6.1. Bibliografía.	60
CAPÍTULO VII	68
ANEXOS	68
Anexo 1. Cronograma de actividades 2016 – 2017.	69
Anexo 2. Protocolo de extracción de ADN de Doyle y Doyle (1990) modificado.	70
Anexo 3. Descriptores morfológicos de Engels y Philips – Mora.	71
Anexo 4. Forma de los ápices de los frutos de cacao.	72
Anexo 5. Rugosidad de la cáscara en frutos de cacao.	73
Anexo 6. Forma de la semilla (parte superior) y forma del corte transversal.	74
Anexo 7. Fotografías de la investigación.	75

Índice de tablas

Tabla 1. Características agroclimáticas de la Finca "La Represa"	25
Tabla 2. Esquema del experimento.....	27
Tabla 3. Descriptores morfológicos de Engels et al. (1980) y Philips – Mora et al (2012), utilizados en la descripción de la mazorca.	29
Tabla 4. Análisis de varianza (ANOVA).....	33
Tabla 5. Porcentajes encontrados en la evaluación de las características fenotípicas, (Variables cualitativas), forma de la mazorca, rugosidad y constricción basal en los genotipos (EET – 103, CCN – 51, IMC – 67 y Pincay).	39
Tabla 6. Porcentajes encontrados en la evaluación de las características fenotípicas, (Variables cualitativas), forma del ápice, color de la mazorca verde y color de la mazorca madura en los genotipos (EET – 103, CCN – 51, IMC – 67 y Pincay).	41
Tabla 7. Porcentajes encontrados en la evaluación de las características fenotípicas, (Variables cualitativas), forma y corte transversal en la semilla de los genotipos (EET – 103, CCN – 51, IMC – 67 y Pincay).....	43
Tabla 8. Promedios de longitud de la hoja, diámetro de la hoja y longitud del peciolo en los genotipos (EET – 103, CCN – 51, IMC – 67 y Pincay).	44
Tabla 9. Promedios de longitud del fruto, diámetro del fruto y Número de semillas por frutos en los genotipos (EET – 103, CCN – 51, IMC – 67 y Pincay).	46
Tabla 10. Promedios de longitud de la semilla, diámetro de la semilla en los genotipos (EET – 103, CCN – 51, IMC – 67 y Pincay).	47
Tabla 11. Promedios del peso de la flor (g), longitud del sépalo y ancho del sépalo en los genotipos (EET – 103, CCN – 51, IMC – 67 y Pincay).	48
Tabla 12. Promedios de densidad estomática de la parte abaxial de las hojas funcionales de los genotipos (EET – 103, CCN – 51, IMC – 67 y Pincay).....	48
Tabla 13. Matriz de Porcentaje de Identidad de secuencias ITS.	55

Índice de figuras

Figura 1. Mapa del ARNr nuclear. En dirección 5' - 3' se muestra en orden: la unidad pequeña ARNr nuclear, seguido del intrón ITS1, el exón 5.8S ADNr, la región ITS2 y la subunidad larga del ARNr nuclear. Tomado de Holst - Jense, 1997 citado por Salgado (49).	19
Figura 2. Descriptores morfológicos de hojas de cacao.	30
Figura 3. Flor de <i>Theobroma cacao</i> donde E; estaminodio, S; Sépalo, Pt; pétalo	30
Figura 4. Pigmentación en los filamentos estaminales de la flor.	37
Figura 5. Visualización del ADN en <i>T. cacao</i> . Análisis de cantidad y calidad de ADN.	49
Figura 6. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizada para la amplificación del fragmento ITS en <i>T. cacao</i>	49
Figura 7. Imagen parcial de un cromatograma del fragmento ITS amplificado en <i>T. cacao</i>	50
Figura 8. Alineación parcial de las secuencias obtenidas de <i>T. cacao</i>	50

CÓDIGO DUBLIN

Título:	“RELACIONES FILOGENÉTICAS ENTRE TIPOS DE CACAO (<i>Theobroma cacao</i> L.): FORASTERO, TRINITARIO Y NACIONAL, BASADAS EN MARCADORES MORFOLÓGICOS Y SECUENCIAS NUCLEOTÍDICAS DE LA REGIÓN ITS; Y SU POSIBLE USO EN LA IDENTIFICACIÓN DE CLONES”			
Autor:	Jonathan Carlos Zambrano Cruz			
Palabras claves:	Relaciones filogenéticas.	Región ITS.	PCR.	ADN
Fecha de publicación:				
Editorial:				
Resumen:	Resumen. - El presente proyecto de investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo y en las Fincas; Experimental “La Represa” propiedad de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, localizada en el Kilómetro 7.5 de la Vía Quevedo- San Carlos; en el recinto Faita, Provincia de Los Ríos, y Finca “Maquita” propiedad de la Fundación Maquita Comercializando como Hermanos (MCCH), ubicada en el Cantón Buena Fe a 5 km vía a Santo Domingo, Recinto Limones - Provincia de Los Ríos. El objetivo general fue determinar las relaciones filogenéticas entre tipos de cacao, Forastero, Trinitario y Nacional, basadas en marcadores morfológicos y secuencias nucleotídicas de la región ITS” y establecer el grupo de cacao al que pertenece un clon con características deseables denominado clon Pincay. Para lo cual se tomaron variables morfológicas cuantitativas y cualitativas de la hoja, flor, fruto y semilla y para el análisis molecular de la región ITS se tomaron muestras de hojas de 10 plantas de cada clon para la extracción de ADN y amplificación mediante primers específicos en (PCR). Se determinó mediante el análisis morfológico gran diversidad genética y variaciones en los caracteres dentro de un mismo clon ya sean por factores ambientales, fenológicos o productos de una fecundación cruzada. El estudio molecular de la región ITS con primers específicos, no permitió identificar regiones polimórficas que permitan identificar a cada uno de los grupos de cacao en estudio, debido a que los tipos de cacao analizados, comparten 100% de similitud en esta región. El clon Pincay comparte diversas características			

	morfológicas que se asemejan a los cacaos Nacionales y Forasteros estas características fenotípicas no tienen diferencias significativas existiendo la posibilidad de ser un híbrido emparentado con ciertos grupos de la región. Abstract. The present research project was carried out in the Biotechnology Laboratory of the State Technical University of Quevedo and in the Farms; Experimental "La Represa" owned by the State Technical University of Quevedo, located at Kilometer 7.5 of Vía Quevedo-San Carlos; in the Faita precinct, Province of Los Ríos, and Finca "Maquita" owned by the Maquita Fundación Comercializando Hermanos (MCCH), located in Cantón Buena Fe, 5 km via Santo Domingo, Limones Campus - Los Ríos Province. The general objective was to determine the phylogenetic relationships between types of cocoa, Forastero, Trinitario and Nacional, based on morphological markers and nucleotide sequences of the ITS region "and to establish the cocoa group to which a clone with desirable characteristics belongs to the Pincay clone. For which quantitative and qualitative morphological variables of the leaf, flower, fruit and seed were taken and for the molecular analysis of the ITS region leaf samples of 10 plants of each clone were taken for DNA extraction and amplification by specific primers in (PCR) A large genetic diversity and variations in the characters within the same clone were determined by the morphological analysis, whether due to environmental, phenological or cross-fertilization products. The molecular study of the ITS region with specific primers, did not identify polymorphic regions that allow identifying each of the groups of cocoa under study, because the types of cocoa analyzed, share 100% similarity in this region. The Pincay clone shares diverse morphological characteristics that resemble the National and Forastero cacaos. These phenotypic characteristics do not have significant differences existing the possibility of being a hybrid related to certain groups of the region.
Descripción	80 hojas : dimensiones, 29 x 21 cm + CD-ROM
URI:	

Introducción

El vestigio más antiguo de cacao en el Ecuador data de hace 5.500 años en la Amazonía, se puede decir que este fruto estuvo en dicha región desde hace 10 mil años, es decir, desde las primeras poblaciones de lo que ahora es Sudamérica (1). El cacao es uno de los más significativos símbolos del país, además es un importante generador de empleo y divisas se estima que aproximadamente 600.000 personas participan directamente en toda la cadena cacaotera, donde existen unas 490.000 hectáreas de cacao, distribuidas básicamente en las provincias de la Costa y en las estribaciones occidentales de la Región Andina (2).

Existen tres variedades principales de cacao: el Forastero, el Criollo y el Trinitario, de las que pueden derivarse otras. Siendo el Forastero la variedad más cultivada en el mundo, (90% de la producción mundial) por su alto rendimiento, sin embargo el cacao Criollo cada vez es cultivado en menor proporción considerado cacao fino, pero sus rendimientos son bajos, el cacao resultante del cruce de las dos anteriores es el Trinitario (3).

El cacao Nacional del Ecuador denominado también “Sabor Arriba” con gran reputación a nivel mundial por poseer un incomparable sabor y aroma floral se lo considera perteneciente a los Forasteros Amazónicos (4). La no existencia de una clasificación definida ha causado que otros autores lo consideren como un grupo distintivo aparte, porque sus características de calidad y aroma se asemejan más a los criollos (5).

Por consiguiente, se han realizado trabajos de caracterización molecular y datos fenotípicos, donde encontraron que el cacao Nacional tiene características independientes a los grupos criollos y forastero con rasgos morfológicos y organolépticos especiales (6) . Por lo tanto, existe poco conocimiento de información genética sobre la calidad del cacao, por lo que se estima que las características de sabor resultan de la interacción de numerosos genes (7).

Ya que estudios realizados con 416 genotipos de cacao de orígenes diferentes, determinaron niveles de heterocigocidad y diversidad genética, que le permitieron concluir que el origen exacto del cacao Nacional es aun desconocido, pero que las pruebas de RFLP realizadas, indican que este grupo es genéticamente diferente a los Forasteros, Criollos y grupos trinitarios (6). Para caracterizar la diversidad existente en *Theobroma cacao* L., los

investigadores han utilizado descriptores botánicos y agronómicos clasificando los genotipos de cacao en Criollo, Forastero y Trinitario (8).

La región del espaciador transcrito interno (ITS, por sus siglas en inglés) del gen ribosomal nuclear, es una de las regiones del genoma cuya variación es una valiosa fuente de caracteres informativos para la inferencia filogenética (9). El ADN_r (ácido desoxirribonucleico ribosómico) nuclear tiene muchas copias, que se repiten una y otra vez; se trata de un sistema complejo que incluye los genes 18S, 28S, y 5.8S en la mayoría de los organismos eucariotas (10). Aunque existen algunas plantas que mantienen la organización de los genes 16S, 23S, 4.5S y 5S, siendo este arreglo similar a la estructura de los genes en procariontes (11); situación que incluye a los genes ribosomales de cacao (12). Las secuencias de estos genes están separadas por espaciadores internos ITS (Internal Transcribed Spacer) (13).

Estas regiones son de gran interés en el estudio de identificación y tipificación de especies, debido a que son fáciles de amplificar y alinear, tienen una alta tasa de mutación, y son relativamente pequeñas (13). En la presente investigación se pretende extraer el ADN de las regiones genómicas ITS mediante la técnica de la PCR, con protocolos eficientes para la amplificación y análisis de las secuencias nucleotídicas de la región ITS, empleando partidores universales descritos por Varghese (14), con el fin de obtener marcadores filogenéticos útiles en la identificación de clones de cacao resultado que será un referente para diferenciar los grandes grupos de *Theobroma cacao*.

Además, el presente estudio permitirá determinar las relaciones de parentesco de un clon de cacao, que hasta el momento no está identificado y que se le atribuyen ciertas características agronómicas y productivas aceptables teniendo una aparente tolerancia significativa a las enfermedades de moniliasis y escoba de bruja, que son dos enfermedades más limitantes del cultivo de cacao en la actualidad, mediante el estudio de secuencias nucleotídicas de la región ITS. Además, se utilizarán algunos marcadores morfológicos, información que será decisiva para su correcta clasificación dentro de uno de los grandes grupos de *Theobroma cacao*.

CAPÍTULO I

CONTEXTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

1.1. Problema de Investigación.

1.1.1. Planteamiento del problema.

Una de las grandes limitantes de la productividad en las zonas cacaoteras del país está relacionado con la selección de variedades de cacao para el establecimiento de las plantaciones, dado que en la comercialización de los clones no existe un registro, ni método rápido que brinde información confiable que establezca la procedencia y origen del material genético del que proceden los germoplasmas. Por lo tanto, es de gran importancia para el sector cacaotero, principalmente para quien realiza la compra de plántulas de cacao, conocer la procedencia y clasificación de sus clones dentro de los grandes grupos de *Theobroma cacao*.

Diagnóstico.

En Ecuador el sector cacaotero atraviesa por considerables descensos en su producción, muchas veces relacionado con enfermedades fungosas que pueden reducir mas del 60% de la producción, como consecuencia de la elección de un material de germoplasma poco productivo o muy susceptible a enfermedades. En la actualidad el productor ha buscado combatir mediante controles químicos y con buenas practicas agrícolas, ya sea por el poco conocimiento o la falta de información el productor no ha tomado en cuenta un factor importante y clave en la producción, como es la procedencia del material genético que va a cultivar, razones por las cuales se plantea esta investigación.

Pronóstico.

Dentro del germoplasma se encuentran todas las características fenotípicas y genotípicas de la especie que le darán el potencial productivo. La falta de investigaciones que den a conocer la procedencia a provocado descensos muy significativos en producción y calidad, debido a que se siguen comercializando materiales clandestinos que en la actualidad viene generando consecuencias desfavorables.

1.1.2. Formulación del problema.

Se caracterizará la región del espaciador interno transcrito (ITS) del ADN ribosomal de los genotipos pertenecientes a los grupos de cacao, Forastero, Trinitario y Nacional, resultado que servirá como un marcador molecular para identificación rápida y temprana de clones de cacao con características promisorias. Datos que serán complementados con la caracterización morfológica.

1.1.3. Sistematización del problema.

¿La amplificación de una de las regiones del genoma (ITS) en clones de los grupos *Theobroma cacao* L., será un marcador útil al momento de seleccionar la variedad?

¿La caracterización morfológica establecerá la relación de parentesco del clon a identificar?

1.2. Objetivos.

1.2.1. Objetivo General.

Determinar las relaciones filogenéticas entre tipos de cacao, Forastero, Trinitario y Nacional, basadas en marcadores morfológicos y secuencias nucleotídicas de la región ITS.

1.2.2. Objetivos Específicos.

- Analizar las secuencias nucleotídicas entre tipos de cacao a través de la amplificación de la región ITS.
- Determinar el uso de marcadores morfológicos para diferenciar características fenotípicas entre tipos de cacao.
- Establecer el grupo de cacao al que pertenece el clon Pincay en base a secuencias nucleotídicas ITS y marcadores morfológicos.

1.3. Justificación.

La clasificación de los diversos clones de cacao Nacional se dificulta por los escasos estudios genéticos e información que permita establecer su parentesco dentro de los grupos establecidos de *Theobroma cacao* L. Los diversos criterios y aseveraciones argumentadas por algunos investigadores que asocian al cacao Nacional dentro del grupo de cacaos Forasteros, son fundamentos desacreditados por otros autores que indican, que este grupo es genéticamente diferente a los demás por lo que debe ser considerado como un grupo distintivo aparte, por tener características del cacao fino de aroma del grupo Criollo. Se justifica la presente investigación ya que tiende a establecer diferencias o similitudes genéticas entre los grupos de *Theobroma cacao* por medio del estudio de la región ITS, que además establecerá resultados muy útiles para la identificación y clasificación de un clon con eficientes características productivas que hasta el momento se desconoce su relación o parentesco con los grupos de cacao.

CAPÍTULO II

FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN

2.1. Marco conceptual.

ADN: (Ácido desoxirribonucleico). Es la molécula responsable de almacenar todas las características (genes) de un individuo y transmitir las a su descendencia. Químicamente es una estructura química compleja cuyos componentes (denominados nucleótidos) se organizan de manera lineal, generando enormes secuencias de información (15).

Agarosa: El gel de agarosa es una herramienta imprescindible de la biología molecular para caracterizar, identificar y aislar DNA o RNA. La electroforesis en gel de agarosa se emplea en los Laboratorios (16).

ARN: El ARN (ácido ribonucleico) es un ácido nucleico de cadena sencilla compuesto por los nucleótidos Adenina (A), Uracilo (U), Guanina (G) y Citosina (C). En las células sirve como intermediario de la información genética ya que copia ésta del ADN y en el citoplasma dirige la síntesis de proteínas según su secuencia de nucleótidos (17).

Analito: Un analito es el componente (elemento, compuesto o ión) de interés analítico de una muestra.

Catálisis: Incremento de la velocidad de una reacción en presencia de un catalizador.

Cromosoma: (chromosome) Es una unidad discreta del genoma que contiene muchos genes. Cada cromosoma consiste de una molécula muy larga de ADN doble y de una masa aproximadamente igual de proteínas. Es visible como una entidad morfológica solamente durante la división celular (18).

Exón: Segmento de un gen y de su correspondiente transcrito que permanece en un ARN mensajero maduro, tras la eliminación de los intrones (segmentos de ADN no codificantes). A este proceso de corte y eliminación de los intrones y empalme de los exones se le denomina “splicing” (19).

Fenotipo: Características observables completas de un organismo o grupo, como los caracteres anatómicos, fisiológicos, bioquímicos y conductuales, determinados por la interacción de la estructura genética y de los factores ambientales (20).

Filogenética: Reconstrucción de las relaciones ancestrales entre los organismos.

- Representación: “El Árbol de la Vida”.
- Principio: agrupar los seres vivos de acuerdo a su nivel de similitud
- Parte de la biología que se ocupa de las relaciones de parentesco entre los distintos grupos de seres vivos.

Gen: Es un fragmento de ADN que codifica para una característica determinada. En otros términos, es la unidad física y funcional de la herencia pasada directamente de los padres a su descendencia. Por ejemplo, características tales como color, altura y forma están codificadas por uno o más genes (15).

Genoma: El término genoma se usa para nombrar al ADN que se encuentra en los núcleos. Los genes son solo una parte, incluso una pequeña parte del genoma. En las células de las plantas, el ADN se encuentra en los núcleos, cloroplastos y mitocondrias, pero el del núcleo, algunas veces es llamado ADN genómico, es el más extenso y complejo. La longitud del ADN a menudo está dada en términos de pares de bases. En las plantas, el ADN genómico varía de 100.000.000 pares de bases (100 megapares) en *Arabidopsis thaliana*, hasta más de 5.000.000.000 pares (5.000 megapares) en trigo (18).

Genotipo: Representa los genes transportados por un individuo.

Intrón: Un intrón es cada uno de los fragmentos de ADN en la codificación de un gen, que no son capaces de expresarse bajo la forma de una proteína. Es una secuencia no codificadora de ADN que separa a dos exones. El intrón inicialmente se transcribe en la molécula de ARN mensajero pero después es eliminado durante el proceso de maduración del ARN (21).

Marcador Genético o Marcador Molecular: Es un segmento de ADN que puede ser identificado y localizado físicamente sobre un cromosoma y cuya herencia puede ser seguida. Un marcador puede ser un gen, o puede ser una sección de ADN sin función conocida. Ejemplos de técnicas que generan marcadores moleculares son los RFLP, RAPD y AFLP, entre otros (15).

AFLP = Polimorfismos en la longitud de fragmentos amplicados.

RAPD = Polimorfismos de ADN amplicados aleatoriamente.

RFLP = Polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción.

Nucleótido: Es el componente estructural básico del ADN. Químicamente es una molécula compuesta por una base nitrogenada, un azúcar de cinco carbonos y un grupo fosfato. Debido a que el ADN es una doble hélice, su longitud se mide en pares de nucleótidos (o pares de bases).

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa es una reacción enzimática in vitro que amplifica millones de veces una secuencia específica de ADN durante varios ciclos repetidos en los que la secuencia blanco es copiada fielmente (22).

Polimorfismo: Un polimorfismo se define como: i) una secuencia de DNA que se transmite de generación en generación de forma simple, es decir, según los modelos mendelianos clásicos y ii) que la secuencia (que puede ser tan corta como un solo nucleótido o bien ser un fragmento de longitud considerable) debe tener por definición dos o más formas diferentes en la población; estas “variantes” genéticas se denominan alelos (23). En el lenguaje coloquial la palabra “polimorfismo” se refiere a las diversas formas que puede tener un objeto. Sin embargo, cuando hablamos de polimorfismos en el ADN no lo tenemos del todo claro (24).

Locus: Se refiere a la posición o localización de un gen en el genoma.

Primers: También conocidos como “iniciadores” o “cebadores”, son cadenas cortas de nucleótidos (oligonucleótidos). Cada uno de ellos debe ser complementario del tramo al que tienen que unirse en las cadenas separadas del ADN objetivo. Es importante aclarar que los primers no deben ser complementarios entre sí para evitar la propia replicación (25).

Secuenciación: Es una técnica que permite conocer el orden de los nucleótidos en una molécula de ADN.

Descripción de los Principales reactivos que conforman el buffer de Extracción de ADN (4).

- a. CTAB (Cetil trimetil amonio bromuro).** - Es un detergente iónico insoluble con los ácidos nucleicos, que solubiliza las membranas celulares por medio de la lisis dependiendo de la concentración de NaCl.
- b. NaCl (Cloruro de sodio).** - La solución remueve los polisacáridos ayuda también a la precipitación del ADN con el etanol y el isopropanol, y protege el ADN en la lisis con CTAB.
- c. EDTA** (Acrónimo del ácido etilen diamino tetraacético). – Agente tamponante que ayuda solubilizar membrana lipilítas y desnaturalizar las proteínas preservando el ADN de enzimas de degradación Inhibe enzimas dependientes de metales (DNAsas) formado por quelatos con Mg y Ca. Puede coordinar por cuatro posiciones acetato y dos aminos, lo que lo convierte en un ligando hexadentado, mucho más los ligandos de quelatos.
- d. P.V.P (Polivinylpyrolidone).** - El PVP se adiciona al buffer de extracción para reducir el efecto de oxidación de compuestos fenólicos como taninos, quinonas y polifenoles.
- e. RNAsa.** - Degrada y destruye el RNA.
- f. Tris HCL.** - Ayuda al CTAB y EDTA en la lisis celular.
- g. Cloroformo isoamilico (24:1).** - Es usado para remover proteínas en las preparaciones de ácidos nucleicos. El cloroformo desnatura las proteínas y facilita la separación de las fases orgánicas y acuosas; el alcohol isoamilico reduce la formación de espuma durante la extracción.
- h. Etanol.** - Retira los residuos del cloroformoisoamilico (24:1), también de alcohol isopropanol, y restos de sal.
- i. Mercaptoetanol.** - Protege el ADN contra las actividades enzimáticas tales como peroxidasa polifenolasas desnaturandolas.

2.2. Marco referencial.

2.2.1. Origen del cacao.

Ciertos estudios de Pound, Cheesman y otros concluyen que el cacao tiene orígenes en América del Sur en sus bosques tropical húmedos, los primeros pobladores del continente americano llevaron una vida nómada, por lo que es ardua la labor de establecer con exactitud el centro de origen del cacao. En países altos amazónicos como el Brasil, se ha encontrado la mayor variabilidad de especies. Las cuencas de los ríos Caquetá, Putumayo y Napo que son tributarios del río Amazonas, región enfocada como el centro de origen del cacao (26).

Su uso social data de hace 5.500 años, según las pruebas de carbono 14 a las que fueron sometidos los vestigios hallados de la cultura Mayo-Chinchi-Marañón, descubierta en 2002 en la zona y que al parecer se extendió por la selva peruana hasta el mayor afluente de la parte alta del río Amazonas (27) (28).

2.2.2. Importancia económica y social.

El Ecuador posee una gran superioridad en cacao Nacional: más del 70% de la producción mundial de Cacao Fino y de Aroma se encuentra en nuestras tierras, también se le atribuye ser el mayor productor de cacao de aroma del mundo. Dándole un prestigio importante, favorable, destacable, indispensable y representativo para el país, prevaleciendo con su conocido “sabor arriba” (29).

El cacao es de gran importancia en las actividades agrícolas del país. Siendo la tercera mayor exportación de Ecuador, el cacao genera fuentes de trabajo directas e indirectas. Es parte esencial de la cotidianidad de muchas comunidades. Solo el 5% del cacao producido en el mundo es fino. De este porcentaje, más del 65% proviene del Ecuador, lo que lo convierte en el mayor productor de cacao fino en el mundo (30).

2.2.3. Taxonomía del cacao.

Reino:	Vegetal
Clase:	Dicotiledoneas
Subclase:	Dialipetalas
Tipo:	Espermatofita
Subtipo:	Angiosperma
Orden:	Malvales
Familia:	Esterculiaceae
Tribu:	Buettnerieae
Género:	<i>Theobroma</i>
Especie:	<i>cacao</i> (31)

2.2.4. Grupos genéticos.

2.2.4.1. Cacao Criollo.

Es el más delicado de los cacaos, originario de América Central por lo que es el menos cultivado (1% de la producción mundial). Sus características son, las más apreciadas, ya que sus frutos poseen una gran finura y aroma (32). El cultivo de cacao Criollo se dispersó desde México y América Central hacia las otras partes del mundo, este cacao es de alta calidad, de sabor muy agradable. Es el cacao que da buen sabor al chocolate y de la más alta calidad que se elabora en las fábricas es un cacao muy delicado y a la vez de poca productividad y al mismo tiempo el más susceptible a las plagas (33).

Los mayas probablemente fueron los primeros en domesticar esta variedad hace más de 3000 años el cacao Criollo comprende árboles delgados, cuenta con bajos rendimientos y mayor susceptibilidad a plagas. Se desarrolla comercialmente en las áreas de origen, en Venezuela, México, Nicaragua, Guatemala y Colombia. El 5—10 % de la producción mundial de cacao se origina de la variedad Criollo (34).

Fue atribuido por los conquistadores españoles, el término Criollo (indígena) quienes lo cultivaron en el norte de América del Sur y América Central nativo especialmente de Venezuela. Estos tienen sus flores con estaminoides de color rosado pálido, mazorcas de color rojo o amarillo al estado de madurez, con diez surcos profundos, muy rugosos y punteadas son frutos de finas paredes; las semillas son grandes, redondas, de color blanco o púrpura pálido, no astringente, y son los que producen el chocolate de más alta calidad. Requieren de un período corto para fermentar (2-3 días), es muy aromático y se los designa comercialmente como "cacao fino". Por desgracia, los tipos Criollo son de bajo rendimiento y susceptibles a muchas enfermedades, y son raramente cultivados (4) (31).

2.2.4.2. Cacao Forastero

También llamado amazónico, por su distribución en forma natural, en la cuenca de este río y sus afluentes. Se reconoce como centro de origen de este complejo genético el área localizada entre los ríos Napo, Putumayo y Caquetá, en América del Sur. Comprende la mayor variedad de cacao sembrados en Brasil y África Occidental, los que proporcionan el 80% de la producción mundial (35). Esta variedad de cacao produce granos pequeños a medianos (de 90 a 110 granos por 100g), de cotiledón oscuro. Esta variedad constituye la mayor parte de la producción mundial de cacao ordinario (36).

De manera que a este grupo pertenecen todos los cacaos comerciales del Brasil, oeste Africano y este de Asia, así como el cacao Nacional del Ecuador, y líneas del bajo Amazonas de tipo amelonado que incluye Iquitos, Nanay, Parinari, y Scavina. El cacao Forastero es muy variable y se encuentra en forma silvestre en el alto (Perú, Ecuador y Colombia) y baja Amazonia (Brasil, Guyanas y a lo largo del río Orinoco en Venezuela), presenta estaminoides con pigmentación púrpura, mazorcas verdes con más de 30 semillas, de color púrpura, con alta astringencia y bajo contenido de grasa (37).

De ahí que resaltan las características de esta variedad; sus mazorcas son amarillas cuando maduran, ovoides, amelonadas, con diez surcos superficiales o profundos, cascara lisa o ligeramente rugosa, delgada o gruesa, con una capa lignificada en el centro del pericarpio, los dos extremos redondos y a veces con un pequeño cuello de botella en la base. Los estaminoides son pigmentados de color violeta sus semillas son más o menos aplanadas en estado fresco, de color púrpura oscuro de forma triangular en corte transversal aplanada y pequeña (35).

2.2.4.3. Cacao Trinitario.

Se afirma que las características genéticas, morfológicas y de calidad, son intermedias entre Criollos y Forasteros, determinando diversos tipos de cacao. Los Trinitarios ocupan del 10 al 15 % de la producción mundial. Botánicamente son un grupo complejo, constituido por una población híbrida que se originó en la Isla de Trinidad, cuando la variedad original (Criollo de Trinidad), se cruzó con la variedad introducida de la Cuenca del Orinoco (4). El cacao Trinitario es resultante del cruce de las variedades Criollo y Forastero, da granos de tamaño medio a grande (de 65 a 90 granos por 100g), con cotiledón de color castaño y aroma de intensidad media (36).

Los cacaos Trinitarios son de calidad muy variable debido a su naturaleza híbrida se cultivan en todos los países donde anteriormente se cultivaron los Criollos (México, Colombia, Trinidad, Venezuela y América Central). El cacao Trinitario en Ecuador se ha introducido desde 1890 y ha desplazado paulatinamente al cacao “Nacional”. Entre sus características tenemos; el gran tamaño de las mazorcas y vigoroso crecimiento del árbol, su grano es más redondeado que la del tipo Forastero y de color violeta claro, el color de la mazorca varía entre rojo, púrpura y amelonado semejante al color de las mazorcas del grupo Forastero, en el color de la mazorca es híbrido y su grano no está aplastado (38).

2.2.4.4. Cacao Nacional de Ecuador.

Variedad tradicional del Ecuador es el tipo denominado “Nacional”, que se caracteriza por dar un chocolate fuerte, de buen sabor y aroma, tiene un tipo de fermentación muy corta, de pocas horas mientras que el Forastero toma varios días en casos extremos 12 días. Este genotipo Nacional se ha venido perdiendo con el tiempo debido a la introducción de materiales resistentes, que ha afectado su producción. Por muchos años se lo ha considerado un tipo de cacao Forastero, debido a que el árbol y la mazorca, semejava a lo que en Venezuela y Trinidad y Tobago se llamó Forastero, por ser de un origen ajeno a esos países, pero en la actualidad se ha comprobado que el cacao Nacional está mucho más cerca del cacao Criollo (33).

La mazorca de cacao de tipo Nacional es típica y puede ser identificada frente a otros genotipos, y considerando además que la forma y color de la semilla no es similar al de los Forasteros; asimismo el tiempo de fermentación calidad y el aroma, indica que es más razonable que esta variedad esté cerca del grupo Criollo, pero que su origen es del alto amazonas en la región del Oriente ecuatoriano, donde se han identificado materiales similares, en las localidades de Tena, Archidona y Macas, desde donde sus frutos posiblemente fueron transportados a ambos lados de los andes, originándose de pocas mazorcas la variedad Nacional, conocida por su especial calidad organoléptica (4).

En vista a los problemas de enfermedades los agricultores comenzaron un acelerado proceso de sustitución de cacaotales de tipo “Nacional” por híbridos de origen Trinitario con altos niveles de producción y con una aparente resistencia a las enfermedades. Lo que va provocando la pérdida de diversidad, especialmente de genes que expresan la calidad, una característica del cacao ecuatoriano. También se observa una mudanza del establecimiento del cultivo hacia zonas más secas debido a que en estos lugares, existe una menor intensidad de las enfermedades (39).

Las características fenotípicas distintivas que representan los genotipos Nacionales son: la pigmentación rojo-rosada en el filamento del estambre, la falta de pigmentación en los sépalos, forma amelonada, más esféricas y ligera estrangulación en la base; cáscara con rugosidad media. Se concluye que la variedad Nacional tiene características diferentes reconocidas por la industria chocolatera internacional (4).

2.2.5. Ácidos Nucleicos y sus Componentes.

Cada célula cuenta con un sistema complejo para reproducirse y construir las moléculas que le permitirán desarrollarse, la información y la maquinaria para lograr lo anterior se encuentra en los ácidos nucleicos y en las proteínas, en las células, los ácidos nucleicos comparten un ambiente que contiene numerosas moléculas inorgánicas, agua y una gran variedad de especies moleculares, potencialmente reactivas, que pueden existir como moléculas excitadas, iones o radicales libres (40).

Además, los organismos contemporáneos llevan su información genética en los ácidos nucleicos -RNA y DNA- y usan esencialmente el mismo código genético. Este código especifica las secuencias de aminoácidos de todas las proteínas que cada organismo necesita. Para decirlo con más precisión, las instrucciones toman la forma de secuencias específicas

de nucleótidos, los bloques constructores de los ácidos nucleicos, estos nucleótidos constan de un azúcar (desoxirribosa en el DNA, y ribosa en el RNA), un grupo fosfato y una de las cuatro bases nitrogenadas. En el DNA, las bases son adenina (A), guanina (G), citosina (C) y timina (T). En el RNA, el uracilo (U) sustituye a la timina. Las bases constituyen el alfabeto, y los tripletes de bases forman las palabras (41).

2.2.5.1. La estructura del ADN.

En 1952 Chargaff, un cuidadoso analista estudia la composición de varios tipos de Ácidos Nucleicos y encuentra cantidades iguales de algunas bases nitrogenadas, por ejemplo: Adenina y Timina y por otro lado Guanina y Citosina, la estructura del ADN es una gran incógnita pero está definida su estequiometría (42).

El descubrimiento de la estructura de la molécula del ácido desoxirribonucleico (ADN), este avance científico es el más importante del pasado siglo XX en el campo de la biología, celebrándose 50 años en el 2003, desde su descubrimiento. Cuando Francis Crick y James Watson desenredaron la doble hélice del ADN fueron muchos los fenómenos del mundo vivo que pudieron entenderse, se encontró la explicación que le faltó a Darwin, la ingeniería genética empezó a hacer realidad lo que antes eran solo ilusiones. Las consecuencias del hallazgo cambian totalmente nuestras vidas y la concepción del mundo que tengamos, y ha supuesto una de las mayores revoluciones en la historia del pensamiento humano (43).

En el año 1944 se identificó el ADN como la molécula portadora de la herencia genética. Se conocía ya muy bien la composición química de aquella sustancia aislada por Miescher hacía tres cuartos de siglo, pero había que resolver la estructura, un verdadero rompecabezas (44). Cuando en 1953 Watson y Crick propusieron el modelo de la doble hélice para explicar la estructura del ADN, no vislumbraron la formidable importancia de información que se generaría a partir de ese momento. Erwin Chargaff en 1950 había aportado unos resultados misteriosos: al examinar el ADN de diferentes seres comprobó que las cantidades de las bases nitrogenadas variaban de un organismo al otro, pero la cantidad de Timina (T) siempre era, sorprendentemente, igual en la de Adenina (A), y la de Citosina (C) en la de Guanina (G) (45).

2.2.5.2. El ADN como material genético.

Hunt Morgan en 1910 descubre un par de cromosomas que se asocian al dimorfismo sexual de la mosca de la fruta, sólo un par que diferencian a los machos y las hembras. Estableciendo las bases genéticas de las diferencias biológicas entre los sexos este descubrimiento señala la existencia de factores genéticos que se transmiten solamente si van asociados a los cromosomas sexuales (42).

El DNA fue aislado por primera vez en 1869 por el bioquímico suizo Friedrich Miescher (1844 – 1895), pocos años después de que Darwin publicara el Origen de las Especies y Mendel presentara sus resultados a la Sociedad de Historia Natural de Brunn. La sustancia que Miescher aisló era blanca y azucarada, ligeramente acida y contenía fosforo. Por encontrarla sólo en el núcleo de las células, la llamo “nucleína”, nombre que luego mutó en ácido nucleico y mucho después en ácido desoxirribonucleico (DNA), para distinguirlo del ácido ribonucleico (RNA) (46).

En 1885 el bioquímico alemán Albrecht Kossel (1853 – 1927) eliminó las proteínas asociadas con los ácidos nucleicos y aisló los distintos tipos de bases nitrogenadas que conforman el DNA. Kossel concluyo que en los ácidos nucleicos también había un azúcar, pero no pudo precisar cuál. Por estos trabajos, Kossel recibió el Premio Nobel en 1910. Análisis químicos posteriores demostraron que el cromosoma eucarionte contenía DNA y proteínas en cantidades aproximadamente iguales, por lo que ambos podían ser portadores de la información hereditaria, es decir desempeñar el papel de material genético (46).

2.2.5.3. Análisis de la Región ITS.

El espacio transcrito interno (ITS) es un segmento trifragmentado, con múltiples copias codificadas por el ADN ribosomal (ADNr) este gen originalmente es transcrito en el nucléolo por la ARN polimerasa I, produciendo un pre ARN ribosomal que contiene las subunidades eucariotas 18S, 5.8S y 28S (47).

De manera que, las regiones del ADNr más comúnmente estudiadas son los tres genes codificantes (18S, 5.8S, y 28S) y los dos espaciadores internos (ITS1 e ITS2). También encontramos asociado a este complejo de genes la región espaciadora intergénica IGS con 2 regiones no codificadoras (ETS-1 y ETS-2). Todas estas regiones del ADNr permiten realizar estudios filogenéticos a diferentes niveles taxonómicos (48).

Dado que la secuencia altamente conservada del gen 5.8S, ha sido utilizada como punto de unión de cebadores universales para amplificar las regiones espaciadoras flanqueantes, y el ITS1 e ITS2, que si son de gran utilidad para establecer relaciones filogenéticas (48). De ahí que, se menciona que estos espacios internos de transcripción son menos conservados que las regiones codificantes, generalmente varían lo suficiente para ser utilizados como herramienta para la discriminación de especies dentro de un género (49).

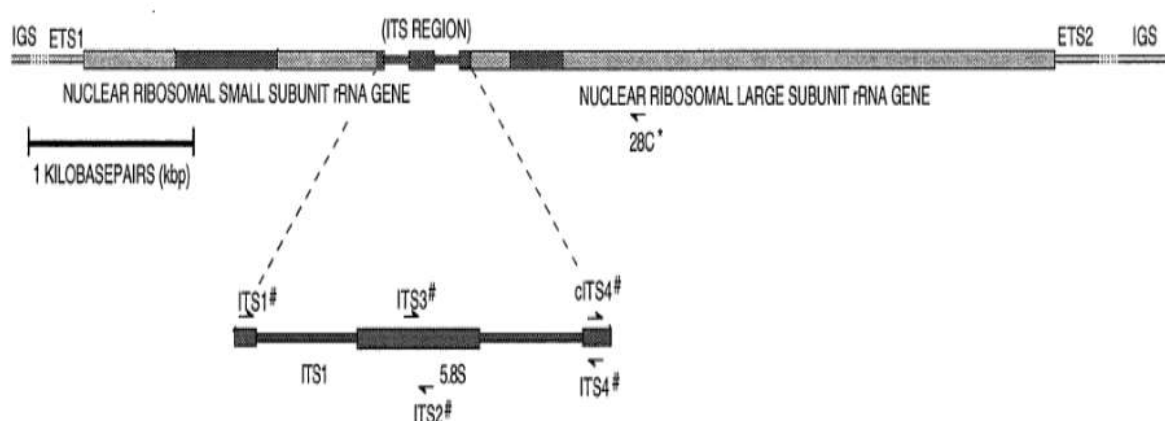


Figura 1. Mapa del ARNr nuclear. En dirección 5'- 3' se muestra en orden: la unidad pequeña ARNr nuclear, seguido del intrón ITS1, el exón 5.8S ADNr, la región ITS2 y la subunidad larga del ARNr nuclear. Tomado de Holst - Jense, 1997 citado por Salgado (49).

2.2.6. Extracción de ADN.

Uno de los principales inconvenientes técnicos en el aislamiento y purificación del ADN vegetal es la obtención simultánea de fenoles, polisacáridos, otros productos secundarios, así como la poca cantidad y calidad del ADN obtenido (50).

En PCR, el ácido desoxirribonucleico (ADN) es el analito. Por tanto, una buena muestra implica siempre un correcto proceso de obtención de esta molécula a partir de material biológico. La extracción de ADN consta de una etapa de lisis, que consiste en romper las estructuras que confinan el citoplasma y liberar al medio su contenido y otra de purificación, que implica la retirada de la solución final de la mayoría de elementos que pueden interferir en la PCR. De los tres pasos críticos que componen el análisis de patógenos por PCR, la extracción de ADN es quizás el más desconocido y sobre el que más control podemos ejercer (51).

El objetivo de extraer ADN es obtener preparaciones enriquecidas en esta molécula. Sin embargo, el ADN está asociado con proteínas (histonas) e inmerso en un medio que contiene estructuras de composición química diversa (15) . La aplicación de las diferentes técnicas para el análisis del genoma (construcción de librerías, RFLP, AFLP, PCR) depende de la habilidad para obtener ADN puro, con alto rendimiento y buena calidad. El ADN de óptima calidad no ocasiona problemas en la amplificación; por encima e incluso por debajo de los 5 ng se obtienen buenos resultados. La precipitación con etanol y lavados con etanol al 70% eliminan contaminantes e inhibidores, pero conducen a pérdidas en la concentración inicial del material (52) .

El ADN puede separarse de las proteínas y restos celulares mediante precipitación de las proteínas facilitada por la presencia de dodecil sulfato sódico (SDS) y acetato de potasio (el ADN permanece en suspensión tras la precipitación por centrifugación), o alternatively, utilizando cloroformo para separar las proteínas de la fase acuosa, donde permanece el ADN más puro y menos sensible a degradación, aunque tiene el inconveniente del manejo de disolventes orgánicos (53).

2.2.6.1. Amplificación *in vitro* del ADN.

Actualmente, con los avances de la Biología Molecular, principalmente con el desarrollo de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la amplificación de fragmentos de ADN, se han desarrollado técnicas poderosas que pueden utilizarse en la caracterización y evaluación de la diversidad genética (54). Se puede partir de homogenados, extractos crudos de tejido, sangre completa, mezclas de fragmentos de ADN obtenidos con enzimas de restricción, muestras resultantes de la extracción y aislamiento de ADN, etc. Sin embargo, debe resaltarse que por razones de importancia es un requisito imprescindible que se conozca la secuencia de una parte de la región de ADN o ARN que se quiere amplificar (53).

La invención de la reacción en cadena de la polimerasa permite la amplificación selectiva de secuencias específicas de ADN que se encuentran en cantidades muy pequeñas. Como su nombre indica, se basa en la actividad de la enzima ADN polimerasa que es capaz de sintetizar una cadena de ADN complementaria a otra ya existente. El método de PCR utiliza dos secuencias cortas de oligonucleótidos llamadas iniciadores o cebadores que son complementarios a los extremos de la región de ADN que se pretende amplificar (55).

2.2.6.2. Reacción en cadena de la polimerasa o PCR.

Actualmente sabemos que la misión de la PCR es copiar millones de veces una secuencia específica de ADN blanco mediante una poderosa catálisis llevada a cabo por una enzima conocida como ADN polimerasa, de tal manera que cantidades pequeñas de ADN pueden ser sintetizadas y copiadas fielmente para analizarse con diferentes fines (22). En la actualidad, la PCR es la técnica de amplificación más sensible y la que se aplica más satisfactoriamente en microbiología clínica. Es un método aparentemente simple y muy versátil, que permite obtener múltiples copias de una secuencia diana de ADN mediante un proceso de amplificación (56).

Al principio, el inventor de la PCR enfrentó dos problemas fundamentales: uno era que en cada ciclo había que añadir la enzima ADN polimerasa, ya que ésta se inactivaba con las temperaturas tan altas demandadas para desnaturalizar el ADN y exponer las bases nitrogenadas de sus nucleótidos. Otro inconveniente era que había que hacerlo manualmente en tres baños mantenidos a las diferentes temperaturas requeridas. El descubrimiento de una bacteria (*Thermus aquaticus*) que vive en aguas termales junto a geysers a 75°C, la cual tiene una ADN polimerasa que funcionaba bien a altas temperaturas (72°C) e incluso es estable a 94°C, supuso un gran avance, ya que solo tenía que ser añadida al principio y se mantenía durante todo el proceso (57).

Cada ciclo de una PCR consta, pues de tres etapas:

1.- Desnaturalización: En esta etapa, las cadenas de ADN son calentadas y separadas a una temperatura de 95 °C durante 20-30 segundos; el tiempo depende de la secuencia del templado, es decir, si la cantidad de G-C es alta, será necesario más tiempo para romper sus uniones debido a que el apareamiento de estas bases está formado por tres enlaces, uno más que las bases de A-T (22). Por consiguiente, se menciona que en la primera etapa (desnaturalización) la doble hélice de ADN se separa en dos hebras mediante una incubación de la muestra a altas temperaturas (93 – 97 °C) en un termociclador. La desnaturalización se producirá cuando la temperatura disminuya (37).

2.- Templado (hibridación): Para la hibridación se baja la temperatura y las condiciones serán tales que se facilitará la unión de los primers a las cadenas. La temperatura y el tiempo requerido para el alineamiento de los primers depende de la composición, tamaño y concentración de los primers amplificadores. Una temperatura de alineamiento óptima es 5°C por debajo de la T_m (temperatura de fusión) de los primers (58). En el segundo paso (hibridación) los cebadores se unen a las zonas 3' complementarias que flanquean el fragmento que queremos amplificar. Se realiza gracias a la reducción de la temperatura (50 – 65 °C) (37).

3.- Elongación (replicación): Etapa de amplificación propiamente dicha (72 a 75 °C, 1 a 3 minutos), en lo que el ADN polimerasa termoestable elonga los cebadores empleando como molde ambas hebras originales. La replicación transcurre 5'-----3' a partir del extremo 3'- OH de cada cebador, empleando como sustrato los 4 dNTPs, hasta terminar la lectura del molde o hasta que se comience una nueva etapa de desnaturalización (siguiente ciclo) (53).

En esta etapa, la Taq polimerasa actúa sobre el complejo templado-primers y empieza su función catalítica a una velocidad muy rápida; agrega dNTP's complementarios para crear las cadenas completas de ADN. La extensión de las cadenas es en dirección de la síntesis del ADN, es decir, de 5' a 3'. La temperatura óptima para la reacción es de 72 °C, ya que a esa temperatura la enzima es funcional. Al final del ciclo, se habrán formado los amplicones con un tamaño dictado por el número total de pares de bases (pb) que deberá ser conocido por el investigador (22).

2.2.6.3. Electroforesis

En la década de los 50 la electroforesis comenzó a ser utilizada en estudios de diversidad genética. Básicamente la electroforesis es una técnica que separa moléculas por su movilidad diferencial a través de un solvente en un campo eléctrico (59). Las moléculas de ADN poseen, al pH alcalino habitual, una carga negativa uniforme por unidad de masa, por lo que hace que su movilidad hacia el ánodo (+) solo venga determinada por el tamaño de la molécula (número de pares de bases, si es lineal). Debe destacarse que los cromosomas eucariotas son demasiado grandes para ser identificados por este tipo de análisis, por lo que comúnmente se aplica sobre ADN fragmentado con nucleasas (53).

Es una técnica empleada para separar las macromoléculas (proteínas, isoenzimas, ácidos nucleicos) a través de una matriz (almidón, agarosa, archilamida). La matriz funciona como un filtro, separando las moléculas en campo eléctrico, de acuerdo con el tamaño y la carga eléctrica neta que poseen. En los ácidos nucleicos, el grupo fosfato es el responsable de la carga eléctrica negativa condiciones de pH neutro, haciendo que los fragmentos migren hacia el polo positivo (ánodo) durante la electroforesis que los separa de acuerdo al tamaño (4).

CAPITULO III

METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

3.1. Localización y duración de la investigación.

La extracción y análisis de las muestras de ADN, se realizó en el Laboratorio de Biotecnología de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, ubicada en el km 1 ½ de la vía Quevedo – Santo Domingo de los Tsáchilas, en la provincia de Los Ríos. La investigación se llevó a cabo a partir de los meses de diciembre del 2016 a abril del 2017

Los materiales vegetales de *Theobroma cacao* L. se recolectaron en las siguientes Fincas;

- Finca “Maquita Cushunchic” propiedad de la Fundación Maquita Comercializando como Hermanos (MCCH), ubicada en el Cantón Buena Fe a 5 km vía a Santo Domingo, Recinto Limones - Provincia de Los Ríos.
- Finca Experimental “La Represa” de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, localizada en el Km 7.5, Recinto “Fayta” de la vía Quevedo San Carlos, provincia de Los Ríos: Su ubicación geográfica es de 1° 03′ 18” de latitud sur. Y de 79° 25′ 24” de longitud oeste a una altura de 73 msnm, contando con las siguientes características.

Tabla 1. Características agroclimáticas de la Finca "La Represa"

Temperatura promedio, °C	24.2
Humedad relativa, %	77.40
Heliofanía, horas luz/año	823
Precipitación, mm/año	1537
Topografía del terreno	Plano
Textura del suelo	franco arcilloso
pH	5.7

Fuente: Estación Meteorológica del INAMHI 2015, INIAP – Pichilingue.

3.2. Tipos de investigación.

3.2.1. De laboratorio.

La investigación de laboratorio es de gran impacto científico, donde sus aplicaciones están relacionadas con el campo genético, la región de estudio denominada ITS en plantaciones de *Theobroma cacao* es un campo en el cual no se han desarrollado investigaciones de este tipo siendo un campo inédito que brinda apertura para la realización de nuevas investigaciones por otros autores.

3.2.2. De campo.

La investigación de campo es de carácter explicativo y descriptivo, donde sus resultados son decisivos en el análisis de las relaciones filogenéticas entre tipos de cacao, así como para la identificación del clon en estudio.

3.2.3. Bibliográfica.

La información bibliográfica fue obtenida de fuentes confiables como una herramienta importante que brindan al investigador informaciones teóricas de investigaciones realizadas en el campo genético abordando conocimientos científicos, generales y específicos (revistas científicas, libros, tesis, etc.) que reforzaron el intelecto, para alcanzar los objetivos propuestos.

3.3. Métodos de investigación.

3.3.1. Método de observación.

La observación es un método clave que sirve como instrumento de análisis, el cual debe tener definido el objetivo a describir sistemáticamente los acontecimientos o comportamientos.

3.3.2. Método analítico.

El método analítico en esta investigación juega un rol importante debido a que se requiere estudiar en forma intensiva cada uno de los elementos y sus relaciones para comprender la naturaleza y los efectos donde surgen nuevas teorías.

3.3.3. Método inductivo.

Pero el método inductivo, es muy importante en esta investigación, ya que en una investigación científica, es aplicado en forma sistemática y rigurosa le ha aportado a la humanidad maravillosos resultados en todos los campos del conocimiento (60).

3.4. Fuentes de recopilación de información.

Primarias: La información primaria se obtuvo mediante la observación directa de las características de las plantaciones de *Theobroma cacao*, que ponen en evidencia la real situación que atraviesan los productores cacaoteros. También el aporte bibliográfico de revistas científicas como: Scielo, Redalyc, Libros y tesis de grado.

Secundarias: Se destaca la participación de los buscadores académicos como: Google académico, Dialnet, Pubmed, Latindex entre otros.

3.5. Diseño de la investigación.

Para el análisis de los marcadores morfológicos cuantitativos se aplicará un diseño completamente al Azar (DCA) conformado por cuatro tratamientos con 10 repeticiones cada uno.

Tabla 2. *Esquema del experimento*

Código	Repeticiones	TUE	Nº Plantas/Tratamiento
T1	10	1	10
T2	10	1	10
T3	10	1	10
T4	10	1	10
Total			40

TUE: Tamaño de la Unidad Experimental
Elaborado: Autor

Tratamientos

T1: Cacao Nacional (Clon EET – 103)

T2: Cacao Trinitario (Clon CCN – 51)

T3: Cacao Forastero (Clon IMC – 67)

T4: Clon Pincay

3.6. Instrumentos de investigación.

3.6.1. Fase de campo.

3.6.1.1. Caracterización morfológica *in situ*.

Para la caracterización morfológica se utilizaron los descriptores propuestos por varios autores como Hidalgo y Engels, quienes mencionan; la flor y el fruto en importancia decreciente las hojas, tronco, ramas, raíces y los tejidos celulares a los que se les atribuyen el ser descriptores altamente heredables, que pueden ser detectados a simple vista y se expresan de igual forma en todos los ambientes. Se utilizaron descriptores cualitativos y cuantitativos de fruto y semilla, que se podían realizar en condiciones de campo descritos por los autores (37) (61).

3.6.1.2. Descriptores cuantitativos y cualitativos de la mazorca.

Se tomaron mazorcas fisiológicamente maduras sin síntomas de enfermedad. (Ver Anexos 2,3 y 4).

Tabla 3. *Descriptores morfológicos de Engels y Philips, utilizados en la descripción de la mazorca (37) (61).*

Descriptor de fruto			
Cualitativo			
Forma	1= angoleta	2= amelonado	3= cundeamor
	4= calabacillo	5= criollo	6= pentágona
	7= oblongo	8= abovado	9= ovado
	10= elíptico	11= orbicular	
Constricción basal	0= ausente	1= escaso	2= intermedio
	3= bien marcado	4= muy ancho	
Forma del ápice	1= puntiagudo	2= agudo	3= obtuso
	4= redondeado	5= pezón	6= dentado
	7= atenuado	8= caudado	
Rugosidad	0= liso	1= leve	3= intermedia
	5= levemente áspera	7= áspera	
Color del fruto maduro	1= amarillo	2= Rojo	3= Otro
Color de fruto verde	1= verde	2= verde - rojo	3= rojo - verde
	4= rojo intenso		
Tamaño y diámetro del fruto (cm)			

3.6.1.3. Tamaño de la hoja

Se tomaron hojas adultas cosechadas de la parte intermedia de los árboles, para lo cual se determinó de acuerdo a la escala propuesta por Hartmann (62) (63). La cual consiste en 1) ancho de la hoja, 2) longitud de la hoja, 3) longitud del pecíolo.

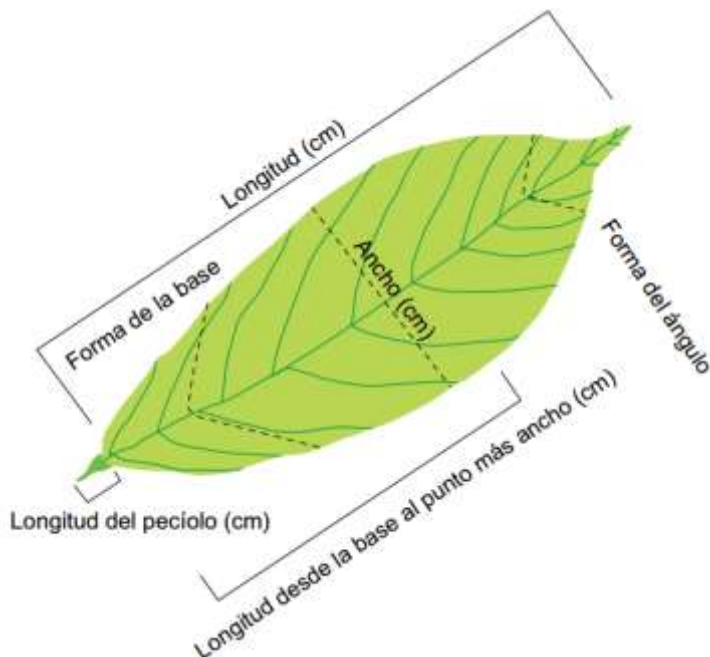


Figura 2. Descriptores morfológicos de hojas de cacao.

3.6.1.4. Color del estaminoide de la flor

De la flor se tomaron dos variables como son; el peso de la flor (g) mediante una balanza analítica y el color del estaminoide que se clasificó de acuerdo a la escala (bien pigmentado, poco pigmentado y no pigmentado) Otra variable es la longitud y ancho del sépalo (mm) (64).

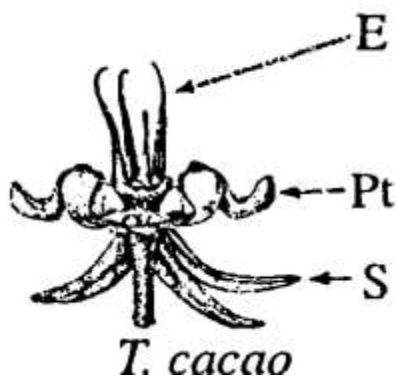


Figura 3. Flor de *Theobroma cacao* donde E; estaminodio, S; Sépalo, Pt; pétalo

3.6.1.5. Forma y tamaño de la semilla.

Se eliminó el mucílago (arilo) y luego el tegumento tras lo cual se determinó los siguientes parámetros: 1) forma de la semilla, 2) forma del corte transversal, 3) longitud, 4) diámetro. (Ver Anexo 6) (63).

3.6.1.6. Colecta del material vegetativo para el análisis molecular.

Se colectaron hojas sanas de las variedades Trinitario, Forastero y Nacional previamente identificadas existentes en la Finca Experimental “La Represa”. También se colectaron hojas del Clon Pincay de origen no establecido que se encuentra en la Finca “Maquita” propiedad de la Fundación Maquita Comercializando como Hermanos (MCCH), ubicada en el Cantón Buena Fe a 5 km vía a Santo Domingo, Recinto Limones - Provincia de Los Ríos.

Se extraerán 10 muestras (10 árboles) en plantaciones de 3 a 5 años de edad en estado productivo de cada grupo, que además incluye al clon Pincay para el estudio como se establece a continuación:

Grupos	Muestras
Nacional	10
Trinitario	10
Forastero	10
Clon Pincay	10
Total	40

3.6.2. Fase de laboratorio.

3.6.2.1. Densidad estomática.

El procedimiento consiste en medir la densidad de estomas en las hojas, que se visualizará por medio del microscopio que será una característica importante para diferenciar los clones de cada grupo de cacao.

De acuerdo a la metodología empleada por Barrientos (65), la técnica consiste en la aplicación de barniz para uñas transparente en un área pequeña (cerca de 50 mm²) en la superficie abaxial de la hoja. Después de que el barniz se seque, por aproximadamente un minuto, la capa es removida y montada en un portaobjetos. Se tomaron las muestras de cada

hoja en la región de la parte central entre las venas secundarias, y se observan los campos en un microscopio (Carl Zeiss, Alemania) con el objetivo 40 X.

Se calculó el área con una cámara Neubauer y se determinó la densidad estomática y de células epidérmicas por mm².

3.6.2.2. Extracción de ADN.

La extracción de ADN se realizó de muestras de hoja de cada uno de los árboles a muestrear, siguiendo el protocolo de extracción de Doyle y Doyle (1990) modificado, (Ver Anexo 1).

3.6.2.3. Cuantificación de ADN.

Se realizó a través de electroforesis en gel de agarosa al 1 % en una cámara de electroforesis. Para ello se preparó 110 ml de TBE 1X, Buffer 10 X, se agregará 1 g de agarosa, se calentó por 1,5 minutos en microondas. Se preparó una bandeja de electroforesis donde se colocó 4 gotas de bromuro de etilo y luego se chorreo el gel. Se utilizaron 20 µL de preparación (ADN, agua y búfer de carga 6x). Para preparar cada muestra se agregó 10 µL de ADN, 7 µL de agua destilada y 3 µL del búfer 6X). Las muestras se colocaron en el gel junto a un marcador de peso, testigo y agua. Se dejará migrar por un tiempo de 40 minutos a 100 watts. Esta técnica se basa en la cuantificación de fluorescencia producida por el bromuro de etilo en el ADN a través de una cámara de luz ultravioleta (37).

3.6.2.4. Amplificación de ADN y secuenciación de amplicones.

Para la amplificación de ADN se utilizaron la metodología de Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR) de acuerdo a Varghese (14). La región ITS fue amplificada utilizando los partidores:

ITS 23S - F, (5'-GGCGTTAGAGCATTGAGAGG-3')

ITS C26A-R (5'-CTGGCGTCGAGCTATTTTTC-3')

Los amplicones generados en la PCR fueron enviados a secuenciar a MacroGen, Korea, para su posterior análisis.

3.6.2.5. Análisis de datos moleculares.

Para el análisis molecular de la región ITS, se realizaron las relaciones de inferencias filogenéticas mediante un árbol filogenético, empleando el programa MEGA con el método estadístico de máxima parsimonia y bootstrap usando 1000 repeticiones.

3.7. Tratamiento de los datos.

Tratamientos

T1 Grupo Nacional (Clon EET – 103)

T2 Grupo trinitario (Clon CCN – 51)

T3 Grupo Forastero (Clon IMC – 67)

T4 Procedencia en investigación (Clon Pincay)

3.7.1. Análisis de varianza y comparación de medias.

Para el análisis entre medias se realizó mediante la prueba de Tukey ($P \leq 0,05$). En el análisis estadístico de los resultados se utilizó un software libre (Infostat)

Tabla 4. *Análisis de varianza (ANOVA)*

Fuente de variación	Formula	Grados de libertad
Tratamiento	t-1	3
Error experimental	t (r-1)	36
Total	t.r-1	39

Elaborado: Autor

Modelo matemático.

$$Y_{ij} = \mu + T_i + E_{ij}$$

Dónde:

Y_{ij} = Total de una observación

T_i = Efecto del tratamiento

μ = Media de la población

E_{ij} = Efecto aleatorio (Error experimental).

3.8. Recursos humanos y materiales.

3.8.1. Humanos.

3.8.2. Materiales y Equipos.

3.8.2.1. Material vegetativo.

Como material vegetativo se utilizaron las hojas jóvenes procedentes de plantaciones de cacao en producción.

3.8.2.2. Equipos de laboratorio.

- Balanza 0,001 g
- Baño maría
- Caja electroforética
- Cámara fotográfica digital
- Centrifuga
- Congelador horizontal -20⁰ C
- Microondas
- Potenciómetro
- Refrigerador grande
- Termociclador
- Uv transiluminador 20 x 20
- Vortex
- Microscopio electrónico
- Cámara Neubauer

3.8.2.3. Materiales de laboratorio.

- Frascos
- Matraces
- Micropipetas
- Microtubos 1.5 mL
- Microtubos PCR individuales 0.2 mL
- Mortero
- Puntas transparentes 200 – 1000 uL
- Puntas transparentes 5 - 200 uL
- Tubos Falcón 15 mL
- Vasos de precipitación

3.8.2.4. Materiales de campo.

- Fundas
- Machete
- Tijeras

3.8.2.5. Reactivos.

- Agarosa ultrapura
- Agua ultra pura (Dnase/Rnase free)
- Hexadecyltrimethyl – bromuro de amonio
- Polivinylpyrrolidone (PVP – 40)
- L – ascorbic Acid (Vit C)
- EDTA
- Tris HCl
- Tris base
- Ribonuclease A
- 2 – Mercaptoethanol (100 X) liquido
- Chloroform: Isoamyl Alcohol (24:1)
- Isopropanol
- Ethanol absoluto
- Sodium chloride (NaCl)
- Azul de bromofenol
- Ácido acético
- Bromuro de etidio
- DNTPS set 4 x 25 μ mol
- Taq DNA polymerase
- Cloruro de magnesio
- Buffers PCR
- Primers
- Nitrógeno líquido

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Resultados.

4.1.1. Caracterización fenotípica.

4.1.1.1. Evaluación de las variables cualitativas de la flor, fruto y semilla.

Evaluación del color del estaminoide en la flor.

El EET – 103, tipo nacional tiene flores donde su color del estaminoide es rojo intenso como se puede apreciar en la Figura 4a, por lo que clasifica dentro de la escala de “bien pigmentados”. El CCN - 51, que es de tipo trinitario tiene filamentos estaminales de pigmentación no muy relevantes por lo que lo ubica en la clasificación de “no pigmentado” Figura 4b. Mientras que el IMC – 67 que es de tipo forastero su estaminoide presenta una pigmentación considerable, clasificando en la escala de los “medianamente pigmentado” como se puede apreciar en la Figura 4c. Por último, el clon Pincay que su anexión a los grupos de *Theobroma cacao* se encuentra en investigación tiene pigmentaciones muy parecidas en intensidad al IMC – 67 el cual es de tipo forastero, por lo que se lo clasifica igualmente como “medianamente pigmentado” como se aprecia en la Figura 4d respectivamente.



Figura 4. Pigmentación en los filamentos estaminales de la flor. Clon tipo Nacional (a), Trinitario (b), Forastero (c) y clon Pincay (d).

Forma de la mazorca

En el EET – 103 de tipo nacional, en su totalidad sus frutos son de forma cundeamor 100%. El genotipo CCN – 51 de tipo trinitario posee un promedio de frutos de forma angoleta del 80%. Así mismo el IMC – 67 posee una totalidad de frutos de forma angoleta 100%. Por último, el clon Pincay alcanza un promedio del 80% de forma angoleta (Tabla 5).

Constricción basal de la mazorca

El EET – 103 es de constricción basal suave en un (50%) y el otro (50%) es intermedia. De manera similar el CCN – 51 predomina la forma intermedia en un promedio del (50%). En cambio, el IMC – 67 presenta una constricción basal suave al (80%). Mientras que el clon Pincay alcanza una constricción basal intermedia al (70%) (Tabla 5).

Rugosidad de la mazorca

La rugosidad en el EET – 103 es intermedia en un 80%. Algo similar ocurre con el CCN – 51 que posee una rugosidad intermedia al 70%. Mientras que en el IMC – 67 la rugosidad sobresale en categoría suave a un promedio de 50% y el clon Pincay presenta una rugosidad intermedia al 70% muy similar a los mencionados anteriormente (Tabla 5).

Tabla 5. Porcentajes encontrados en la evaluación de las características fenotípicas, (Variables cualitativas), forma de la mazorca, rugosidad y constricción basal en los genotipos (EET – 103, CCN – 51, IMC – 67 y Pincay).

Descriptor	Grupo	Categoría	Porcentaje
Forma de la Mazorca	Nacional	Angoleta	100
	Trinitario	Angoleta	80
		Cundeamor	20
	Forastero	Angoleta	100
	Clon Pincay	Angoleta	80
		Cundeamor	20
Constricción basal	Nacional	Suave	50
		Intermedia	50
	Trinitario	Suave	40
		Intermedia	50
		Fuerte	10
	Forastero	Suave	80
		Intermedia	20
	Clon Pincay	Intermedia	70
		Fuerte	20
		Suave	10
Rugosidad	Nacional	Intermedia	80
		Suave	10
		Áspera	10
	Trinitario	Intermedia	70
		Áspera	30
	Forastero	Suave	50
		Ausente	20
		Intermedia	30
	Clon Pincay	Intermedia	70
		Áspera	30

Forma del ápice de la mazorca

En este descriptor morfológico el EET - 103 alcanza un promedio del 90% de frutos de forma dentado. En el caso del CCN – 51 presentan una forma igualmente dentado a un 50%. De manera diferente el IMC - 67 presenta una forma obtusa en un promedio del 70%. Mientras que el clon Pincay presenta una diversidad muy amplia de formas en el ápice (Tabla 6).

Color de la mazorca en estado inmaduro

El color que presentan las mazorcas en el estado inmaduro en el EET – 103 en su totalidad 100% es verde lo mismo sucede con el clon Pincay, mientras que en el IMC – 67 presenta una coloración verde pálido. A su vez el CCN – 51 presenta una coloración de rojo - verde al 100%.

Color de la mazorca en estado maduro

El color de la mazorca en estado maduro es de color amarillo al 100% en los genotipos EET – 103, IMC – 67 y Pincay. De manera diferente el CCN – 51 presenta el color rojo al 100% respectivamente.

Tabla 6. Porcentajes encontrados en la evaluación de las características fenotípicas, (Variables cualitativas), forma del ápice, color de la mazorca verde y color de la mazorca madura en los genotipos (EET – 103, CCN – 51, IMC – 67 y Pincay).

Descriptor	Grupo	Categoría	Porcentaje
Forma del Ápice	Nacional	Dentado	90
		Obtuso	10
	Trinitario	Dentado	50
		Mamilado	30
		Redondeado	10
		Obtuso	10
	Forastero	Obtuso	70
		Dentado	10
		Mamilado	10
		Caudado	10
	Clon Pincay	Caudado	20
		Dentado	20
		Agudo	20
		Obtuso	20
		Atenuado	10
		Mamilado	10
Color de mazorca verde	Nacional	Verde	100
	Trinitario	rojo – verde	100
	Forastero	Verde pálido	100
	Clon Pincay	Verde	100
Color de mazorca madura	Nacional	Amarillo	100
	Trinitario	Rojo	100
	Forastero	Amarillo	100
	Clon Pincay	Amarillo	100

Forma de la semilla

El 60% de las semillas del EET – 103 tienen una forma irregular. De manera similar ocurre en el CCN – 51 donde predomina la forma irregular a un 50%. Así mismo en el IMC – 67 llega a un promedio del 50% la forma irregular. Mientras que el clon Pincay presenta una forma de semilla ovalada que alcanza el 60% respectivamente (Tabla 7).

Corte transversal

En el corte transversal de la semilla se encontró 60% de forma intermedia en el EET – 103. De la misma manera en el CCN – 51 también obtuvo una forma intermedia a un 60%. Lo mismo sucede en el IMC – 67 y en el clon Pincay donde ambos alcanzaron una forma de semilla intermedia del 80% (Tabla 7).

Tabla 7. Porcentajes encontrados en la evaluación de las características fenotípicas, (Variables cualitativas), forma y corte transversal en la semilla de los genotipos (EET – 103, CCN – 51, IMC – 67 y Pincay).

Descriptor	Grupo	Categoría	Porcentaje
Forma de la semilla	Nacional	Irregular	60
		Ovalada	20
		Oblonga	20
	Trinitario	Irregular	50
		Ovalada	20
		Elíptica	20
		Oblonga	10
	Forastero	Irregular	50
		Ovalada	20
		Elíptica	20
		Oblonga	10
	Clon Pincay	Ovalada	60
		Irregular	20
		Elíptica	20
Corte transversal	Nacional	Intermedia	60
		Aplanada	30
		Redondeada	10
	Trinitario	Intermedia	60
		Redondeada	30
		Aplanada	10
	Forastero	Intermedia	80
		Redondeada	20
	Clon Pincay	Intermedia	80
		Redondeado	10
		Aplanada	10

4.1.1.2. Evaluación de las variables cuantitativas de la hoja.

De acuerdo al análisis de varianza los genotipos presentaron significancia estadística para longitud de la hoja, en cambio en el diámetro de la hoja se evidencio alta significancia, mientras que en la longitud del peciolo también se halló significancia estadística, estas variables presentaron coeficientes de variación de 9.95, 11.69, 16.24 respectivamente (Tabla 8).

En la variable longitud de la hoja se encontraron diferencias según Tukey ($p \leq 0.05$), el genotipo EET – 103, presento el mayor promedio 31.99 cm, siendo estadísticamente igual a los genotipos CCN – 51 y IMC – 67, los cuales alcanzaron 30.87 y 30.55 cm y el menor promedio fue de 26.98 cm quien lo obtuvo fue el clon Pincay. Según la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$), en el diámetro de la hoja el EET – 103, presento el mayor promedio con 11.81 cm, el cual es estadísticamente igual a los genotipos CCN – 51 y IMC – 67, quienes alcanzaron promedios de 11.38 y 10.56 cm, el menor promedio lo registra el clon Pincay con 7.13 cm respectivamente.

Se encontraron diferencias estadísticas en la variable longitud del peciolo según Tukey ($p \leq 0.05$), donde el mayor promedio lo alcanza el CCN – 51 con 2.12 cm, siendo estadísticamente igual a los genotipos EET – 103 y IMC – 67 con 2.11 y 1.86 cm, el clon Pincay es el que alcanza el menor promedio de 1.65 cm.

Tabla 8. Promedios de longitud de la hoja, diámetro de la hoja y longitud del peciolo en los genotipos (EET – 103, CCN – 51, IMC – 67 y Pincay).

Tratamientos	Longitud (cm)		Diámetro (cm)
	Peciolo	Hoja	
T1 (EET - 103)	2.11 a	31.99 a	11.81 a
T2 (CCN - 51)	2.12 a	30.87 a	11.38 a
T3 (IMC - 67)	1.86 a b	30.55 a b	10.56 a
T4 (Pincay)	1.65 b	26.98 b	7.13 b
C.V (%)	16.24	9.95	11.69
Probabilidad ($p < 0,05$)	0.0047*	0.0042*	<0.0001**

EET - 103: Estación Experimental Tropical; CCN - 51: Colección Castro Naranjal; IMC - 67: International Marañón Collections; Pincay: Clon en investigación. Promedios en cada columna con letras iguales no difieren estadísticamente (Tukey $p \leq 0.05$). CV: Coeficiente de variación; NS= no significativo; *Significativo, **Alta significancia.

4.1.1.3. Evaluación de las variables cuantitativas del fruto.

La Tabla 9, muestran los resultados obtenidos en la caracterización morfológica de la mazorca en los cuatro genotipos en investigación; longitud, diámetro y número de semillas por fruto. De acuerdo al análisis de varianza los genotipos presentaron alta significancia estadística tanto para longitud de la mazorca, como para diámetro de la mazorca, mientras que en la variable número de semillas solo se encontró significancia estadística. Las variables presentaron coeficientes de variación de 6.86, 6.00, 12.28 respectivamente.

Existen diferencias estadísticas encontradas según la Prueba de Tukey ($p \leq 0.05$), en la variable longitud de la mazorca, el genotipo que presenta el mayor promedio es el CCN – 51 con 20.75 cm, mientras que el clon Pincay alcanza 18.25 cm, siendo este estadísticamente igual al EET – 103 con 17.25 cm, el menor promedio lo alcanzo el IMC – 67 con 16.33 cm.

En la variable diámetro de mazorca si se encontraron diferencias de acuerdo a Tukey ($p \leq 0.05$), donde el más alto promedio fue de 8.87 cm que lo alcanzo el CCN – 51 siendo estadísticamente diferente a los genotipos EET – 103, Pincay y IMC – 67, que obtuvieron promedios de 7.82, 8.00 y 7.44 cm, siendo estos tres promedios anteriores estadísticamente iguales entre sí.

En el número de semillas por fruto también se hallaron diferencias según Tukey ($p \leq 0.05$), donde el CCN – 51 alcanzo el mayor promedio de 54.5 semillas por fruto, seguido del IMC – 67 con 48.3 quienes además son estadísticamente iguales entre sí. Los genotipos EET – 103 y Pincay alcanzaron promedios estadísticamente iguales de 47.00 y 45.5 semillas por frutos (Tabla 9).

Tabla 9. Promedios de longitud del fruto, diámetro del fruto y Número de semillas por frutos en los genotipos (EET – 103, CCN – 51, IMC – 67 y Pincay).

Tratamientos	Medición del Fruto (cm)		Número de semillas por fruto
	Longitud	Diámetro	
T1 (EET - 103)	17.25 bc	7.82 b	47.00 b
T2 (CCN - 51)	20.75 a	8.87 a	54.5 a
T3 (IMC - 67)	16.33 c	7.44 b	48.3 ab
T4 (Pincay)	18.25 b	8.00 b	45.5 b
C.V (%)	6.86	6	12.28
Probabilidad (p<0,05)	<0.0001**	<0.0001**	0.0104*

EET - 103: Estación Experimental Tropical; CCN - 51: Colección Castro Naranjal; IMC - 67: International Marañón Collections; Pincay: Clon en investigación. Promedios en cada columna con letras iguales no difieren estadísticamente (Tukey $p \leq 0.05$). CV: Coeficiente de variación; NS= no significativo; *Significativo, **Alta significancia.

4.1.1.4. Evaluación de las variables cuantitativas de la semilla.

En la Tabla 10, se muestran los resultados obtenidos en la caracterización morfológica de la semilla en los genotipos en investigación; longitud y diámetro de la semilla son las variables evaluadas. En el análisis de varianza se encontró alta significancia estadística en las variables longitud y diámetro de la semilla, las mismas que presentaron coeficientes de variación de 6.94 y 7.41 respectivamente.

La prueba de Tukey ($p \leq 0.05$), encontró diferencias significativas entre los promedios de la variable longitud de la semilla. El CCN – 51 obtuvo el mayor promedio con 2.62 cm, seguido de los genotipos IMC – 67, EET – 103 y Pincay quienes alcanzaron promedios de 2.33, 2.25 y 2.24 cm, además estos tres genotipos son estadísticamente iguales entre sí.

Según Tukey ($p \leq 0.05$), se encontró diferencias significativas en la variable diámetro de la semilla, donde el genotipo que obtuvo mayor promedio fue el CCN – 51 con 1.43 cm, siendo estadísticamente igual al clon Pincay cuyo promedio fue de 1.32 cm, seguidos de los clones EET – 103 y IMC – 67 con 1.17 y 1.12 cm, estos dos últimos son iguales estadísticamente entre sí (Tabla 10).

Tabla 10. Promedios de longitud de la semilla, diámetro de la semilla en los genotipos (EET – 103, CCN – 51, IMC – 67 y Pincay).

Tratamientos	Medición de la semilla (cm)	
	Longitud	Diámetro
T1 (EET - 103)	2.25 b	1.17 b
T2 (CCN - 51)	2.62 a	1.43 a
T3 (IMC - 67)	2.33 b	1.12 b
T4 (Pincay)	2.24 b	1.32 a
C.V (%)	6.94	7.41
Probabilidad (p<0,05)	<0.0001**	<0.0001**

EET - 103: Estación Experimental Tropical; CCN - 51: Colección Castro Naranjal; IMC - 67: International Marañón Collections; Pincay: Clon en investigación. Promedios en cada columna con letras iguales no difieren estadísticamente (Tukey $p \leq 0.05$). CV: Coeficiente de variación; NS= no significativo; *Significativo, **Alta significancia.

4.1.1.5. Evaluación de las variables cuantitativas de la flor.

Caracterización morfológica de la flor en los cuatro genotipos en investigación; peso de la flor, longitud y ancho del sépalo son las variables evaluadas. En el análisis de varianza no se encontró significancia estadística en las variables peso de la flor y ancho del sépalo, mientras que en la variable longitud del sépalo si se encontró significancia, estas variables presentaron coeficientes de variación de 12.69, 6.79 y 11.53 respectivamente.

En las variables peso de la flor y ancho del sépalo según Tukey ($p \leq 0.05$), no se hallaron diferencias significativas en las medias que presentaron los genotipos. En la variable longitud del sépalo si se hallaron diferencias significativas donde el clon Pincay presento el más alto promedio 9.12 mm, siendo estadísticamente igual a los genotipos IMC – 67 y EET – 103 que tuvieron promedios de 8.60 y 8.59 mm, el genotipo que presento el más bajo promedio en longitud fue el CCN – 51 con 8.28 mm respectivamente (Tabla 11).

Tabla 11. Promedios del peso de la flor (g), longitud del sépalo y ancho del sépalo en los genotipos (EET – 103, CCN – 51, IMC – 67 y Pincay).

Tratamientos	Medicación del sépalo (mm)		
	Peso (mg)	Longitud	Ancho
T1 (EET - 103)	52.55 a	8.59 ab	2.09 a
T2 (CCN - 51)	47.22 a	8.28 b	2.39 a
T3 (IMC - 67)	46.27 a	8.60 ab	2.16 a
T4 (Pincay)	51.21 a	9.12 a	2.14 a
C.V (%)	12.69	6.79	11.53
Probabilidad (p<0,05)	0.0877 NS	0.0247*	0.0554 NS

EET - 103: Estación Experimental Tropical; CCN - 51: Colección Castro Naranjal; IMC - 67: International Marañón Collections; Pincay: Clon en investigación. Promedios en cada columna con letras iguales no difieren estadísticamente (Tukey $p \leq 0.05$). CV: Coeficiente de variación; NS= no significativo; *Significativo, **Alta significancia.

4.1.1.6. Densidad estomática.

En el análisis de varianza no se encontró significancia estadística en la variable densidad estomática, donde se presentó un coeficiente de variación de 14.12 respectivamente. De acuerdo a la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$), no se hallaron diferencias significativas en las medias que presentaron los genotipos en estudio.

Tabla 12. Promedios de densidad estomática de la parte abaxial de las hojas funcionales de los genotipos (EET – 103, CCN – 51, IMC – 67 y Pincay).

Tratamientos	Estomas/mm ²
T1 (EET - 103)	860.00 a
T2 (CCN - 51)	877.50 a
T3 (IMC - 67)	740.00 a
T4 (Pincay)	835.00 a
Coef. Var	14.12
Probabilidad (p<0,05)	0.0572 NS

EET - 103: Estación Experimental Tropical; CCN – 51: Colección Castro Naranjal; IMC - 67: International Marañón Collections; Pincay: Clon en investigación. Promedios en cada columna con letras iguales no difieren estadísticamente (Tukey $p \leq 0.05$). CV: Coeficiente de variación; NS= no significativo; *Significativo, **Alta significancia.

4.1.2. Caracterización molecular.

El protocolo de extracción de ADN empleado generó una serie de inconvenientes que tuvieron que ser superados para poder realizar la amplificación mediante PCR. La cantidad ($100 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$) y calidad (una banda bien definida) obtenida fue optima de acuerdo a la visualización realizada en el Transiluminador UV (Figura 5).



Figura 5. Visualización del ADN en *T. cacao*. Análisis de cantidad y calidad de ADN.

Posterior a la observación de la cantidad y calidad de ADN, se realizó la PCR. La amplificación generó fragmentos de tamaño esperado (750 pb) en algunos tipos de cacao (Figura 6). En aquellos casos donde el resultado fue nulo se repitió la amplificación obteniendo resultados nuevamente variables.



Figura 6. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizada para la amplificación del fragmento ITS en *T. cacao*.

Debido a la variación en la PCR, solo se seleccionaron 5 individuos de cada tipo de cacao para la secuenciación. Los fragmentos seleccionados fueron enviados a MacroGen Korea. Una vez obtenido los resultados se realizó la revisión y análisis de las secuencias con ayuda del programa Chromas Lite (Figura 7).

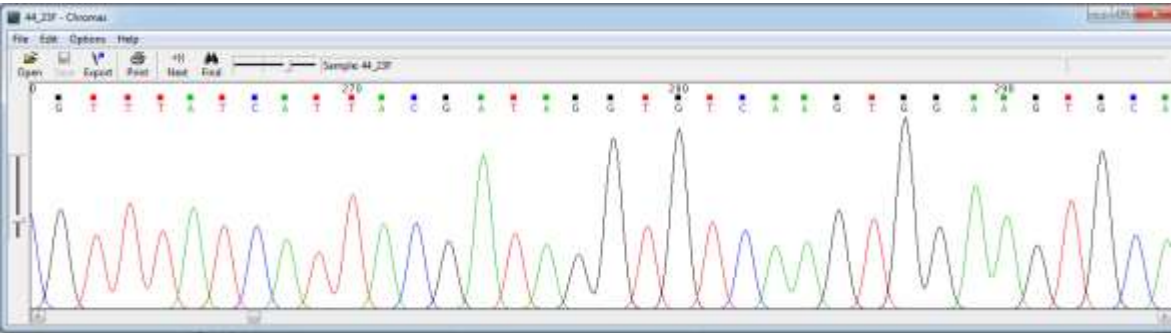


Figura 7. Imagen parcial de un cromatograma del fragmento ITS amplificado en *T. cacao*.

Para cada uno de los tipos de cacao se generó una secuencia consenso. Las secuencias al ser alineadas en el programa ClustalW Omega mostraron ser 100% idénticos entre ellos (Figura 8).

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment	
Forastero-IMC-67	GGCGTTAGAGCATTGAGAGGACCTTTCCCTAGTACGAGAGGACCGGGAAGGACGCACCTC
Nacional-EET-103	GGCGTTAGAGCATTGAGAGGACCTTTCCCTAGTACGAGAGGACCGGGAAGGACGCACCTC
Pincay	GGCGTTAGAGCATTGAGAGGACCTTTCCCTAGTACGAGAGGACCGGGAAGGACGCACCTC
CCN-51	GGCGTTAGAGCATTGAGAGGACCTTTCCCTAGTACGAGAGGACCGGGAAGGACGCACCTC
Forastero-IMC-67	TGGTGTACCAGTTATCGTGCCACGGTAAACGCTGGGTAGCCAAGTGCGGAGCGGATAAC
Nacional-EET-103	TGGTGTACCAGTTATCGTGCCACGGTAAACGCTGGGTAGCCAAGTGCGGAGCGGATAAC
Pincay	TGGTGTACCAGTTATCGTGCCACGGTAAACGCTGGGTAGCCAAGTGCGGAGCGGATAAC
CCN-51	TGGTGTACCAGTTATCGTGCCACGGTAAACGCTGGGTAGCCAAGTGCGGAGCGGATAAC
Forastero-IMC-67	TGCTGAAAGCATCTAAGTAGTAAGCCACCCCAAGATGAGTGCTCTCTATTCCGACTTC
Nacional-EET-103	TGCTGAAAGCATCTAAGTAGTAAGCCACCCCAAGATGAGTGCTCTCTATTCCGACTTC
Pincay	TGCTGAAAGCATCTAAGTAGTAAGCCACCCCAAGATGAGTGCTCTCTATTCCGACTTC
CCN-51	TGCTGAAAGCATCTAAGTAGTAAGCCACCCCAAGATGAGTGCTCTCTATTCCGACTTC
Forastero-IMC-67	CCCAGAGCCTCCGGTAGCACAGCCGAGACGGCAAGGGGTTCTCTGTCCCTGCGGGGATCG
Nacional-EET-103	CCCAGAGCCTCCGGTAGCACAGCCGAGACGGCAAGGGGTTCTCTGTCCCTGCGGGGATCG
Pincay	CCCAGAGCCTCCGGTAGCACAGCCGAGACGGCAAGGGGTTCTCTGTCCCTGCGGGGATCG
CCN-51	CCCAGAGCCTCCGGTAGCACAGCCGAGACGGCAAGGGGTTCTCTGTCCCTGCGGGGATCG
Forastero-IMC-67	AGTGACAGAAGTTTGTAGAATTCAAGAGAAGGTCACGGCGAGACGAGCCGTTTATCATT
Nacional-EET-103	AGTGACAGAAGTTTGTAGAATTCAAGAGAAGGTCACGGCGAGACGAGCCGTTTATCATT
Pincay	AGTGACAGAAGTTTGTAGAATTCAAGAGAAGGTCACGGCGAGACGAGCCGTTTATCATT
CCN-51	AGTGACAGAAGTTTGTAGAATTCAAGAGAAGGTCACGGCGAGACGAGCCGTTTATCATT

Figura 8. Alineación parcial de las secuencias obtenidas de *T. cacao*.

4.2. Discusión.

4.2.1. Caracterización fenotípica.

El presente estudio se ejecutó con la finalidad de definir su anexión del clon Pincay dentro de uno de los grupos de *Theobroma cacao*, mediante la caracterización morfológica y molecular, este clon es procedente de la parte norte ecuatoriana provincia de Esmeraldas donde se lo cultiva de forma muy local sin darse a conocer comercialmente precisamente por no tener una identificación definida, sin embargo es muy deseable por los pocos cacaoteros que tienen conocimiento de sus características importantes, en productividad y una aparente tolerancia a enfermedades de origen fungosas. Para la caracterización se incluyeron tres genotipos de referencia de los tipos genéticos Trinitarios (CCN -51), Forastero Amazónico (IMC – 67) y Nacional (EET – 103).

Es probable que este clon tenga afinidad con el cacao Criollo, en base a su procedencia ya que Según Plúa (66), el cacao Criollo se expandió desde México hacia América Central, América del Sur (Colombia) y la parte norte de Ecuador (Esmeraldas). Sin embargo, existen más probabilidades de formar parte del grupo de cacaos Nacionales autóctonos de Ecuador por ciertas características fenotípicas similares. De acuerdo Vera *et al.* (4), es considerado el cacao Nacional del Ecuador dentro del grupo de los Forasteros Amazónicos, conocido también como “Sabor Arriba” con gran reputación a nivel mundial por poseer un incomparable sabor y aroma floral.

Por otra parte, el cacao Forastero Amazónico comparte características importantes con el clon Pincay sin embargo se aleja significativamente al analizar otras características que de acuerdo a Lucero (67), el cacao Forastero tiene presencia en la Amazonia ecuatoriana y se caracterizan por tener mazorcas de cascara lisas o ligeramente rugosa y delgadas. La diferencia se da en las características de cascara gruesa con rugosidad intermedia y áspera que posee el clon Pincay.

La rugosidad de la mazorca, que va desde la forma intermedia a áspera que tiene el clon Pincay, es el único descriptor morfológico similar con el tipo Trinitario, pero se distingue de este considerablemente en las variables morfológicas cuantitativas, longitud y diámetro de frutos, hojas y semillas, que en el clon Pincay son de menor tamaño. Este mismo clon presenta en la forma del ápice una diversidad de formas. Al respecto Pérez (68), considera que las variables color, constricción basal, rugosidad del mesocarpo, largo y diámetro del fruto son adecuadas para caracterizar los clones. Por el contrario, no recomienda utilizar la forma del ápice ni el número de semillas debido a su fuerte variación dentro del mismo clon.

El clon Pincay presenta una pigmentación considerable en los filamentos estaminales por lo que se lo clasifica en la escala de los “medianamente pigmentados”, muy similar al genotipo IMC – 67 el cual es de tipo Forastero y se ubican en la misma escala. La característica del genotipo EET – 103 de tipo Nacional alcanza una pigmentación roja intensa característica única que lo diferencia de los demás, alcanzando la categoría de “bien pigmentados”. Lerceteau *et al.* (69), Menciona que los rasgos de la flor son probablemente los más útiles para diferenciar tipos de cacao.

Así mismo Quiroz y Soria (64), en su caracterización fenotípica del cacao Nacional de Ecuador, concluyen que el color del filamento estaminal (rojo – rosado), es exclusivamente de los grupos nacionales o sus híbridos. Quiroz (70), menciona que los clones IMC – 67 de origen Amazónico y el EET – 117 de tipo Venezolano amarillo comparten características muy típicas del cacao Nacional como son el color rojo rosado del filamento estaminal, tamaño de la semilla entre otras.

Al clon Pincay no se lo puede considerar con certeza como tipo Nacional debido a que posee ciertas características diferentes existiendo la posibilidad de ser un híbrido emparentado con ciertos grupos de la región. Al respecto Escobar (71), manifiesta que en la actualidad, no existe una variedad nacional genéticamente pura del cacao, pues lo que se encuentra es una mezcla de híbridos naturales que se agrupan en una población conocida con el nombre de complejo “Nacional x Trinitario”

El color de la mazorca en estado inmaduro es verde, y amarillo en estado maduro característica similar en los genotipos Nacionales y Forasteros. Hay que mencionar la posibilidad de considerar al cacao Nacional como un grupo distintivo aparte ya que según Navia y Pazmiño (72), algunos autores, basados en varios estudios, tanto morfológicos como del ADN y del sabor, creen que el cacao nacional mantiene distancias genéticas de los Forasteros, de los Trinitarios y de los Criollos, considerando necesario clasificarlo en un grupo separado de los anteriormente nombrados.

Resultados similares a Ayestas (73), que caracterizo morfológicamente a los árboles promisorios de *Theobroma cacao*, encontró que el color amarillo predominaba a un 71 % en los frutos evaluados, teniendo una rugosidad intermedia del 58%. Acorde con la investigación Graziani de Fariñas *et al.* (74), manifiestan que existe una gran variación de las características físicas entre los tipos y parcelas, mostrando los frutos una gran diversidad de formas, texturas y colores tanto en el estado inmaduro como en el maduro, producto de una fecundación cruzada.

En las variables cuantitativas el clon Pincay presenta una hoja promedio en longitud de 26.98 cm, estadísticamente similar al tipo Forastero IMC – 67, quien además comparte otras importantes características similares que lo acercan al grupo Forastero. Por lo que es complejo establecer parentescos en los genotipos mediante marcadores morfológicos, al respecto Motamayor *et al.* (75), observo la existencia de gran diversidad morfológica en Centro América, así como en América del Sur. Azofeifa-Delgado (76), manifiesta que el uso de marcadores morfológicos en las plantas tiene muchas limitantes, pues su expresión puede estar sujeta a factores ambientales o fenológicos.

Por otra parte, Parra (8), argumenta que la variabilidad que caracteriza a los tipos de cacao es atribuida, no sólo al alto nivel de hibridación natural, sino además, al origen genético de los materiales, y también menciona la dificultad para establecer relaciones de parentesco entre estos cacaos, ya que la heterogeneidad que poseen las plantas que conforman los grupos, no permiten una adecuada discriminación intragrupal. Según Febres (77), menciona la importancia del uso de marcadores moleculares en la caracterización de la diversidad genética, debido a que la mayoría de los marcadores morfológicos no son adecuados, pues su expresión está sujeta a variaciones del medio ambiente.

En el análisis de semillas por frutos el genotipo CCN – 51 presento el mayor promedio con 54.5 semillas por fruto, y el clon Pincay alcanzo el menor promedio con 45.5 semillas por frutos. Según Graziani de Fariñas *et al.* (74) El número de semillas depende de la fecundación individual de los ovarios, estando el máximo controlado por el número de óvulos por ovario, que es un carácter muy constante.

4.2.2. Caracterización molecular.

Al inicio de este proyecto se presentaron algunas dificultades, tales como la oxidación de la muestra o la inhibición de la PCR, otro de los problemas fue la presencia de fenoles, pectinas y proteínas en las muestras. Al respecto Londoño *et al.* (78). Encontró que el cacao es recalcitrante a la extracción de ADN por tener una alta tendencia a la fenolización de las muestras, ante esto recomienda la utilización de columnas de purificación para garantizar una óptima calidad en los resultados de amplificación de microsatélites por PCR.

Cornide (79), describe al fenotipo como un indicador poco preciso del genotipo, mucho más si se trata de formas silvestres, frecuentemente híbridas, en las que los caracteres botánicos aparecen mezclados dificultando su identificación. Por otra parte, Chirinos *et al.* (80), Describe a la unidad repetitiva del ADNr como diferentes regiones que varían en su tasa de mutación, proporcionando información para el análisis filogenético de poblaciones, especies y niveles taxonómicos superiores.

Muñoz *et al* (9). Mencionan que los datos morfológicos deben ser sometidos al filtro de otras aproximaciones y tipos de datos diferentes, entre ellos, la información a nivel molecular. Una de las regiones del genoma cuya variación es una valiosa fuente de caracteres informativos para la inferencia filogenética en Angiospermas, es la región del espaciador interno transcrito (ITS) del ADN ribosomal nuclear. Al respecto Peteira *et al* (81). Describe a la amplificación del Espaciador Interno Transcripto (ITS, Internal Transcribed Spacer) como una de las técnicas moleculares con resultados importantes en diagnóstico, taxonomía, filogenia, mapeo de genes, empleada por numerosos autores en la actualidad para estudios de identificación de géneros y especies en diversos organismos.

En nuestro caso, la región ITS de *T. cacao* no mostró sitios polimórficos que nos permitan distinguir molecularmente a cada uno de los tipos de cacao. De hecho, al buscar en las bases de datos actualizadas encontramos que todos los miembros del género *Theobroma* comparten 100% de similitud en esta región. Diferenciándose mínimamente con Hibiscus y Algodón, especies que pertenecen a la misma familia Malvaceae (Tabla 13).

Tabla 13. Matriz de Porcentaje de Identidad de secuencias ITS.

1: Forastero-IMC-67	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	99.33	99.47	98.12	98.52
2: Nacional-EET-103	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	99.33	99.47	98.12	98.52
3: Pincay	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	99.33	99.47	98.12	98.52
4: CCN-51	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	99.33	99.47	98.12	98.52
5: T.grandiflorum	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	99.33	99.47	98.12	98.52
6: Cacao-Criollo	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	99.33	99.47	98.12	98.52
7: Algodón	99.33	99.33	99.33	99.33	99.33	99.33	100.00	99.60	97.98	98.39
8: Hibiscus	99.47	99.47	99.47	99.47	99.47	99.47	99.60	100.00	98.12	98.52
9: Neem	98.12	98.12	98.12	98.12	98.12	98.12	97.98	98.12	100.00	99.06
10: Papaya	98.52	98.52	98.52	98.52	98.52	98.52	98.39	98.52	99.06	100.00

Se debería emplear otras herramientas moleculares para lograr encontrar sitios polimórficos que nos permitan distinguir a cada uno de los tipos de cacao. Entre ellos se podría emplear microsatélites, RAPD, AFLP, entre otros. Según Quiroz (70), que caracterizó molecularmente 63 genotipos de cacao Nacional empleando marcadores AFLP, incluyendo genotipos de referencia de los tipos genéticos Trinitario (UF – 676), Forastero Amazónico (Matina) y el Criollo (criollo – 36), demostrando una distancia genética muy amplia cuyo rango es de 0,832 que además demuestra la no – conformación de grupos genéticos específicos, pero si separados por su origen y constitución genética, coincidiendo con otros investigadores que indican que los cacaos Nacionales de Ecuador son independientes de los tres grupos genéticos conocidos y que el origen de esta variedad es aún desconocido.

De acuerdo con July (82), que analizó la variabilidad genética del Cacao Nacional Boliviano (CNB) mediante el uso de microsatélites, ubicó al CNB silvestre en un grupo diferente al Forastero y Trinitario (Grupo del Beni). Con respecto a Romero *et al.* (83), Quienes también emplearon microsatélites en el estudio de la estructura genética de las poblaciones de cacao Nacional, encontraron altos niveles de heterocigosidad dentro de los individuos de un mismo grupo y se mostró bajos niveles de diferenciación genética entre poblaciones.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones.

- Se logró amplificar la región ITS de *T. cacao* con primers específicos, teniendo un tamaño de 750 pb, lo que permitió realizar el análisis de diversidad genética de los grupos de cacao mismos que comparten 100% de similitud en esta región.
- De la caracterización y comparación morfológica de los genotipos existe una gran variación de las características físicas encontrándose diferencias significativas en las variables cuantitativas de longitud y diámetro de la hoja, fruto y semilla. La variable cualitativa más importante para discriminar los genotipos de cacaos Nacional es mediante la intensidad de pigmentación del filamento estaminal.
- El clon Pincay comparte diversas características morfológicas que se asemejan a los cacaos Nacionales y Forasteros. A nivel molecular no se logró determinar a qué grupo de cacao pertenece en clon Pincay.

5.2. Recomendaciones.

- Realizar nuevos estudios de análisis moleculares con marcadores como; (AFLP) y Microsatélites (SSR) para establecer las relaciones filogenéticas entre grupos de cacao y definir su anexión del clon Pincay.
- Hacer un aprovechamiento agronómico y difundir las cualidades del clon Pincay complementando con una investigación organoléptica sensorial para establecer su parentesco con los grupos establecidos.
- Se recomienda utilizar un mayor número de mazorcas para la caracterización ya que en el largo y ancho de los frutos se observó que existe mucha variabilidad de estos datos, Se debe tener mucho cuidado con el manejo de las flores la medición se debe realizar inmediatamente ya que estas se empiezan a deshidratar rápidamente.

CAPÍTULO VI

BIBLIOGRAFÍA

6.1. Bibliografía.

1. JNIVERSO. Se habló sobre el origen y la tradición del cacao. [Online].; 2016 [cited 2016 Julio 22. Available from: <http://www.eluniverso.com/vida-estilo/2016/04/17/nota/5526897/se-hablo-sobre-origen-tradicion-cacao>.
2. Anecacao. Actualidad y perspectivas del sector cacaotero en Ecuador. [Online]. Guayaquil - Ecuador: Cumbre Mundial de Cacao; 2014 [cited 2016 Noviembre 20. Available from: <http://www.anecacao.com/uploads/2014/09/1-El-Ecuador-Actualidad-y-Perspectivas-del-Sector-Cacaotero-ANECACAO-cumbre-mundial-del-cacao-2014.pdf>.
3. UTEPI. Cacao. Estudio Agroindustrial en el Ecuador. Competitividad de la Cadena de Valor y Perspectivas del Mercado. Primera ed. Hidalgo J, editor. Quito - Ecuador: Unidad Técnica de Estudios para la Industria (UTEPI); 2007.
4. Vera J, Carranza M, Saucedo S. Extracción de ADN en cacao *Theobroma cacao* L. Variedad tipo Nacional. Primera ed. Vera , editor. Quevedo - Los Rios - Ecuador: Academia Española; 2016.
5. Vera J. Manual del Cultivo de Cacao. Segunda ed. Suárez C, Moreira M, editors. Quevedo - Los Rios - Ecuador: INIAP - Estación Experimental Pichilingue; 1987.
6. Agama J. Selección de progenies y plantas élites de cacao (*Theobroma cacao* L.) Mediante la evaluación de Características agronómicas y de resistencia a enfermedades. Tesis ed. Andrade H, editor. Quevedo - Ecuador: Universidad Central del Ecuador; 2005.
7. Quiroz J. Influencia de la Agronomía y Cosecha sobre la Calidad del Cacao INIAP , M, editors. Guayaquil - Ecuador: Boletín Técnico; 2010.
8. Parra P, González M, Ortiz L, Graziani L, Figueroa R. Caracterización de los tipos de cacaos criollo, trinitario y forastero de cumboto, aragua, mediante patrones electroforéticos de isoenzimas. [Online].; 2002 [cited 2016 Julio 22. Available from: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0002-192X200200000002&lng=es&tlng=es.
9. Muñoz M, Riegel R, Seemann P, Peñailillo P, Schiappacasse F, Núñez J. Relaciones filogenéticas de *Rhodolirium montanum* Phil. y especies afines, basadas en secuencias nucleotídicas de la región ITS y análisis cariotípico. [Online].; 2011 [cited 2016 Julio 22. Available from: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-664320110001000005&lng=es. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-664320110001000005>.

10. ı G, Jubier MF, Olivieri I, Lejeune B. Ribosomal External and Internal Transcribed Spacers: Combined Use in the Phylogenetic Analysis of *Medicago* (Leguminosae). *Journal of Molecular Evolution*. 1997 Julio; 46(299–306).
11. Koch W, Edwards K, Kossel H. Sequencing of the 16S - 23S Spacer in a Ribosomal RNA Operon of *Zea mays* Chloroplast DNA Reveals Two Split tRNA Genes. *Institut fur Biologie Ill*. 1981 Julio; 25(203 - 213).
12. Motamayor J. The genome sequence of the most widely cultivated cacao type and its use to identify candidate genes regulating pod color. [Online].; 2013 [cited 2017 Julio 4. Available from: <https://genomebiology.biomedcentral.com/track/pdf/10.1186/gb-2013-14-6-r53?site=genomebiology.biomedcentral.com>.
13. Sanchez - Avedaño M, Velázquez - Espinoza J, López - Gutiérrez A, Gallegos - Flores A, Herrera - Rodríguez R. Secuencias nucleotídicas de la región ITS en familias S1 y PL de maíces poliembriónicos. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. [Online].; 2015 [cited 2016 Julio 23. Available from: ISSN 2007-0934.
14. Varghese R, Chauhan V, Misra A. Hypervariable spacer regions are good sites for developing specific PCR-RFLP markers and PCR primers for screening actinorhizal symbionts. © Indian Academy of Sciences. 2003 Junio; 28(4).
15. Rocha Salvatierra P. Teoría y práctica para la extracción y purificación del ADN de palma de aceite. [Online].; 2002 [cited 2016 Noviembre 23. Available from: <http://publicaciones.fedepalma.org/index.php/palmas/article/viewFile/921/921>.
16. Laboratorio de Genómica Viral y Humana. Preparación de Geles de Agarosa para Electroforesis. [Online].; 2008 [cited 2016 Noviembre 27. Available from: http://www.genomica.uaslp.mx/Protocolos/Mol_GelAgarosa.pdf.
17. FIBAO Medicina Molecular. Una perspectiva molecular en medicina. [Online].; 2007 [cited 2016 Noviembre 27. Available from: <http://medmol.es/glosario/18/>.
18. Phillips - Mora W, Rodríguez H, Fritz PJ. Marcadores de ADN: Teoría, Aplicaciones y Protocolos de trabajo. Con Ejemplos de investigaciones en cacao (*Theobroma cacao*). IV ed. Couch J, Pruitt K, editors. Turrialba - Costa Rica: Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE); 1995.
19. Ecuared. Exón. [Online].; 2016 [cited 2016 Noviembre 27. Available from: <https://www.ecured.cu/Ex%C3%B3n>.
20. Calá G, Despaigne R, Cobián J, Despaigne R, Cisneros E. Glosario de Morfofisiología Humana I. *Revista Scielo*. 2014 Marzo; 18(3).

21. Contreras R. La Guía los intrones. [Online].; 2013 [cited 2016 Noviembre 27. Available from: <http://biologia.laguia2000.com/genetica/intrones>.
22. Tamay de Dios L, Ibarra C, Velasquillo C. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. Medigraphic (Literatura Biomédica). 2013 Mayo - Agosto; 2(2).
23. Fañanás L. Bases genéticas de la vulnerabilidad a la depresión. Departamento Biología Animal. Universitat de Barcelona. 2002 Marzo; 25(3).
24. DNA didactic. Los polimorfismos y el ADN. [Online].; 2015 [cited 2016 Noviembre 27. Available from: <http://www.dnadidactic.com/blog/tag/polimorfismos-del-adn/>.
25. Santambrosio E, Ortega M, Garibaldi P. PCR (Polymerase chain reaction). [Online].; 2010 [cited 2016 Noviembre 27. Available from: http://www.frro.utn.edu.ar/repositorio/catedras/quimica/5_anio/biotecnologia/PCR.pdf.
26. USAID, IICA, Instituto Interamericano de Cooperación Para la Agricultura. Protocolo estandarizado de oferta tecnológica para el cultivo del cacao en el Perú. Primera ed. Pita K, Febres M, Aguilar C, editors. Lima - Perú: Web Institucional en www.iica.int; 2006.
27. El TIEMPO. El origen del cacao es la Amazonía, según una investigación. [Online].; 2013 [cited 2016 Agosto 5. Available from: <http://www.eltiempo.com.ec/noticias-cuenca/129341-el-origen-del-cacao-es-la-amazona-a-sega-n-una-investigacion/>.
28. Instituto Ecuatoriano de la Propiedad Intelectual. Ecuador, la tierra del cacao. [Online].; 2014 [cited 2016 Agosto 5. Available from: <http://www.PropiedadIntelectual.gob.ec/ecuador-la-tierra-del-cacao/>.
29. Anecacao. El cacao, uno de los más significativos símbolos de nuestro país. [Online].; 2015 [cited 2016 Agosto 5. Available from: <http://www.anecacao.com/es/quienes-somos/cacao-en-ecuador.html>.
30. NESTLE. El plan de cacao, producción social y ambientalmente responsable. [Online].; 2011 [cited 2016 Agosto 6. Available from: <http://ww1.nestle.com.ec/csv/desarrollorural/plancacao>.
31. De La Cruz Medina J, Vargas M, Ortiz A, Del Angel Coronel O. Cacao Operaciones Poscosecha. Primera ed. AGST/FAO Mejía DP, editor. Veracruz - México: Instituto Tecnológico de Veracruz y el Instituto Tecnológico Superior de Huatusco; 2010.
32. Marques. Taxonomía e historia del cacao. [Online].; 2016 [cited 2016 Agosto 6. Available from: <http://www.confiteriamarques.com/index.php/m,37/taxonomia-e-historia-del-cacao>.

33. Enríquez G. Cacao Orgánico, Guía para productores ecuatorianos. 54th ed. Ecuador A, editor. Quito - Ecuador: INIAP (Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias); 2010.
34. Dostert N, Roque J, Cano A. Hoja botánica: Cacao Theobroma cacao. Primera ed. Luebert F, editor. Lima - Perú: Cooperación Alemana al Desarrollo – Agencia de la GIZ en el Perú; 2011.
35. Cedeño P. Determinación de perfiles organolépticos en ocho grupos de cacao mediante la degustación de licor de cacao y chocolates oscuros elaborados artesanalmente. Tesis ed. Saltos J, editor. Calceta - Manabí: Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí "ESPAM"; 2010.
36. Cartay R. Diccionario de cocina Venezolana. Primera ed. Ediciones A, editor. Caracas - Venezuela: Melvin; 2005.
37. Martinez W. Caracterización morfológica y molecular del Cacao Nacional Boliviano y de selecciones élites del Alto Beni, Bolivia. Tesis Posgrado ed. Turrialba - Costa Rica: CATIE (Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza); 2007.
38. Pazmiño K. Estudio del comportamiento de Fructosa, Glucosa y Sacarosa en almendras de cacao de producción nacional durante la fermentación. Tesis ed. Riobamba - Ecuador: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo; 2005.
39. Garcés Fiallos F, Sánchez Mora FD. Moniliophthora roreri (Cif y Par) Evans et al. en el cultivo de cacao. [Online].; 2012 [cited 2016 Noviembre 16. Available from: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=357633703006>.
40. González E. Bases Moleculares del Envejecimiento. 7037th ed. Redalyc , editor. Puebla - México: Benemérita Universidad Autónoma de Puebla; 2000.
41. García P, Montellano M, Quiroz SA, Sour F, Ceballos S, Chávez L. Paleobiología, Lecturas seleccionadas. Segunda ed. Perelló M, editor. México: Facultad de Ciencias, UNAM; 2002.
42. Foradori A, Lagos L M. La larga historia de una molécula: el ADN. [Online].; 2003 [cited 2016 Agosto 15. Available from: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0370-41062003000600001.
43. Guevara G. ADN: historia de un éxito científico. Revista Colombiana de Filosofía de la Ciencia 200439-40. [Online].; 2004 [cited 2016 Agosto 15. Available from: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=41401101..>

44. Franco M, Cediell J, Payán C. Breve historia de la bioinformática. [Online].; 2008 [cited 2016 Agosto 20. Available from: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1657-95342008000100015&lng=en.
45. Cortiñas S. Las metáforas del ADN: una revisión de los procesos divulgativos. [Online].; 2006 [cited 2016 Agosto 20. Available from: [http://jcom.sissa.it/sites/default/files/documents/Jcom0701\(2008\)A02_es.pdf](http://jcom.sissa.it/sites/default/files/documents/Jcom0701(2008)A02_es.pdf).
46. Curtis H, Barnes Sue N, Schnek A, Massarini A. Curtis Biología. Séptima en Español ed. Schnek A, Massarini A, editors. Buenos Aires , Bogotá, Caracas, México, Madrid, Porto Alegre: Medica Panamericana; 2008.
47. Ordóñez E. Identificación genética y determinación de actividad antibacteriana de Microhongos terrestres recolectados en punta Fort William, Isla Greenwich, Antártida Guayaquil - Ecuador: Tesis de grado; 2014.
48. Saltos N. Extracción de ADN genómico y amplificación de la región ITS por PCR en el ascomicete marino *Lulworthia grandispora*. Tesis de Grado ed. Becerra R, editor. Guayaquil - Ecuador: Universidad de Guayaquil; 2012.
49. Salgado C. Identificación molecular de especies de *Monilinia* spp. que afectan la producción de durazno, *Prunus persica*, en las provincias de Carchi, Imbabura, Pichincha y Tungurahua. Tesis ed. Torres M, Arahana V, Tobar J, editors. Quito - Ecuador: Universidad San Francisco de Quito; 2011.
50. Pérez I, Almeida , Angulo L, Osorio G, Ramis C, Bedoya Á, et al. Método modificado de obtención de adn genómico en orquídeas (*Cattleya* spp.) Para amplificación con marcadores moleculares. [Online].; 2011 [cited 2016 Agosto 20. Available from: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1316-33612011000100004&lng=es&tlng=es..
51. Microbial. La extracción y purificación del ADN para el análisis por PCR. Mitos y realidades. [Online].; 2009 [cited 2016 Agosto 22. Available from: http://www.microbial-systems.com/web/docs/Newsletter_Microbial_03.pdf.
52. Muñoz Flórez JE, Morillo Coronado A, Morillo Coronado Y. Microsatélites amplificados al azar (RAM) en estudios de diversidad genética vegetal. Revista Scielo. 2008 Septiembre; 219-226(57).
53. Mestanza C. Establecimiento de un protocolo para la extracción de ADN en Palma Africana (*Elaeis guineensis*). Tesis de grado ed. Saucedo S, editor. Quevedo - Los Rios - Ecuador: Universidad Técnica Estatal de Quevedo; 2008.

54. Legaria J, Alvarado M, Hernández R. Diversidad genética en Pitahaya (*Hylocereus undatus* Haworth. Britton and Rose). *Revista de Fitotecnia*. 2005 Mayo; 28 (3)(179 – 185).
55. Rojas-Herrera R, González-Flores T. Detección e identificación de bacterias causantes de enfermedades transmitidas por alimentos mediante la reacción en cadena de la polimerasa. *Revista Medigraphic Artemisa en línea*. 2006 Febrero; 31(2).
56. Perea EJ. La flora de la boca en la era de la biología molecular. [Online].; 2004 [cited 2016 Noviembre 26. Available from: <http://www.medicinaoral.com/medoralfree01/v9Suppli/medoralv9supplip6.pdf?BXCTX=AD:GOOGLE;DDO:DC-PREVIEW ;RSV:E0>.
57. Rodríguez I, Barrera H. La reacción en cadena de la polimerasa a dos décadas de su invención. *Ciencia de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León*. 2004 Julio - Septiembre; VII(3).
58. Cortazar A, Silva E. Métodos físico - químicos en Biotecnología. [Online].; 2004 [cited 2016 Noviembre 26. Available from: <http://www.ibt.unam.mx /computo/pdfs /met/pcr.pdf>.
59. Becerra V, Paredes M. Uso de marcadores Bioquímicos y moleculares en estudios de diversidad genética. *Revista Scielo*. 2000 Mayo; 60(3).
60. Monroy S. Del Fraude, el método inductivo y los artículos científicos. Una réplica a Peter Medawar. *Revista Colombiana de Filosofía de la Ciencia*. 2005 Septiembre; III(5).
61. Ramos G, Gómez Á, De Ascencao A. Caracteres morfológicos determinantes en dos poblaciones de cacao criollo del occidente de Venezuela. [Online].; 2004 [cited 2016 Septiembre 23. Available from: http://www.scielo.org.v e/scielo.php?script =sci_arttext&pid=S0002-192X2004000100004.
62. Phillips-Mora W, Arciniegas-Leal A, Mata-Quirós A, Motamayor-Arias JC. Catálogo de clones de cacao seleccionados por el CATIE para siembras comerciales. 105th ed. Somarriba E, Mesén F, editors. Turrialba - Costa Rica: Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE); 2012.
63. Engels J, Bartley B, Enríquez G. Cacao descriptors, their status and modus operandi. Primera ed. Turrialba - Costa Rica: CATIE (Centro agronomico de investigación y enseñanza); 1980.
64. Quiroz JSJ. Caracterización fenotípica del cacao nacional de Ecuador. Boletín informativo. Quevedo - Los Rios - Ecuador: INIAP - Estación Experimental Pichilingue, Agricultura; 1994.

65. Barrientos-Priego A, Borys MW, Trejo C, López-López L. Índice y densidad estomática foliar en plántulas de tres razas de aguacatero. [Online].; 2003 [cited 2016 Septiembre 25. Available from: <http://www.revistafitotecniamexicana.org/documentos/26-4/10a.pdf>.
66. Plúa J. Diseño de una Línea Procesadora de Pasta de Cacao Artesanal. Tesis de Grado. Guayaquil - Ecuador: Escuela Superior Politécnica Del Litoral, Facultad de Ingeniería Mecánica y Ciencias de la Producción; 2008.
67. Lucero M. Caracterización de la manteca de cacao de tres variedades Trinitario (CCN-51), Nacional (EET-103) y Foratero (IMC - 67). Tesis de grado. Quevedo - Ecuador: Universidad Técnica Estatal De Quevedo, Facultad de Ciencias Pecuarias; 2014.
68. Pérez J. Evaluación y caracterización de selecciones clonales de cacao (*Theobroma cacao* L.) del Programa de Mejoramiento del CATIE. Tesis de Posgrado. Turrialba - Costa Rica: CATIE, Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza; 2009.
69. Lerceteau E, Quiroz J, Soria J, Flipo S, Pétiard V, Crouzil D. Genetic differentiation among Ecuadorian *Theobroma cacao* L. accessions using DNA and morphological analyses. *Euphytica*. 1997 January; 95(1).
70. Quiroz. Caracterización molecular y morfológica de genotipos superiores con características de cacao Nacional (*Theobroma cacao* L) de Ecuador. Tesis de Posgrado. Turrialba - Costa Rica: Centro agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, Programa de educación para el desarrollo y la conservación ; 2002.
71. Escobar R. Comportamiento de seis clones de “cacao” (*Theobroma cacao* L.) en Guasaganda, provincia de Cotopaxi, Ecuador. *La Granja*. 2008 Diciembre; 7(1).
72. Navia A, Pazmiño N. Mejoramiento de las Características Sensoriales del Cacao CCN - 51 a través de la Adición de Enzimas durante el Proceso de Fermentación. Tesis de grado. Guayaquil - Ecuador: Escuela Superior Politécnica del Litoral, Facultad de Ingeniería en Mecánica y Ciencias de la Producción; 2012.
73. Ayestas E. Caracterización morfológica de cien árboles promisorios de *Theobroma cacao* L. en Waslala, RAAN, Nicaragua, 2009. Tesis de graduación. Managua - Nicaragua: Universidad Nacional Agraria, Facultad de Agronomía; 2009.
74. Graziani de Fariñas L, Ortiz de Bertorelli L, Angulo J, Parra P. Características físicas del fruto de cacaos tipos criollo, forastero y trinitario de la localidad de cumboto, Venezuela. *SciELO*. 2002 Septiembre; 52(3).
75. Motamayor J, Risterucci A, Lopez P, Ortiz C, Moreno A, Lanaud C. Cacao domestication I: the origin of the cacao cultivated by the Mayas. [Online].; 2002 [cited

2017 Junio 14. Available from: <http://www.nature.com/hdy/journal/v89/n5/pdf/6800156a.pdf>.

76. Azofeifa-Delgado Á. Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del trópico. Redalyc. 2006 Julio - Diciembre; 17(2).
77. Febres V. Caracterización de clones de cacao (*Theobroma cacao* L.) resistentes y susceptibles a la Moniliasis (*Moniliophthora roreri* [Sif & Par] Evans et al.) Mediante marcadores RFLP. Tesis de grado. Turrialba - Costa Rica: CATIE, Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza; 1990.
78. Caracterización molecular de clones de *Theobroma cacao* L., por medio de marcadores moleculares microsatélites. [Online].; 2011 [cited 2017 Julio 26. Available from: file:///C:/Users/User/Downloads/Theobroma_cacao_L_CLONES_MOLECULAR_CHARACTERIZATIO.pdf.
79. Cornide M. La Genética vegetal, el mejoramiento y la sociedad. Redalyc. org. 2001; 22(3).
80. Chirinos J, Congrains C, Ramírez R, Ramírez P. Identificación de *Yarrowia lipolytica* (Ascomycota: Hemiascomycetes) como contaminante en la obtención de amplificadores del gen 28S rRNA de moluscos. Scielo. Revista Peruana de Biología. 2010 Abril; 17(1).
81. Peteira B, Toledo V, Martínez B. Variabilidad molecular en aislamientos de *Phytophthora nicotianae* Van Breda de Haan. Revista de protección vegetal. Scielo. 2008 Diciembre; 23(3).
82. July W. La Variabilidad Genética del Cacao (*Theobroma cacao* L.) Nacional Boliviano. Revista de la Carrera de Ingeniería Agronómica - UMSA. 2016 Junio; 2(1).
83. Romero C, Bonilla J, Santos E, Peralta E. 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. Revista Tecnológica ESPOL. 2010 Diciembre; 23(1).

CAPÍTULO VII

ANEXOS

ANEXOS

Anexo 1. Cronograma de actividades 2016 – 2017.

Actividades Meses Semanas	Diciembre				Enero				Febrero				Marzo				Abril			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Aprobación del anteproyecto																				
Expedición y reconocimiento de las plantaciones.																				
Caracterización morfológica in situ de la mazorca.																				
Caracterización morfológica in situ de la hoja.																				
Caracterización morfológica in situ de la semilla.																				
Extracción de ADN																				
Secuenciación																				
Análisis de secuencias																				
Interpretación de los datos																				
Escritura de Tesis																				
Correcciones																				
Escritura Final de Tesis y Defensa																				

Anexo 2. Protocolo de extracción de ADN de Doyle y Doyle (1990) modificado.

Buffer de extracción:

2% de CTAB

NaCl 1.42 M

20 mM EDTA, pH 8

100 mM Tris- HCl, pH 8.0

2% PVP – 40

0.05 % de Mercaptoetanol

Procedimiento

- 1.- Macerar el tejido con nitrógeno líquido.
- 2.- Colocar 100 mg de tejido pulverizado en cada tubo eppendorf.
- 3.- Agregarle 800 µL del buffer de extracción (precalentando a 65 °C por 10 minutos).
- 4.- Mezclar y centrifugar 13000 rpm durante 5 minutos.
- 5.- Después centrifugar se recupera el sobrenadante 500 µL añadiéndosele 7 µL de ARNasa (20 mg/ml), (homogenizada por inversión). A continuación, se procedió a incubarla en baño de maría a 65 °C durante 5 minutos.
- 6.- Agregar 570 µL de cloroformo isoamilalcohol (24:1), mezclar por inversión y centrifugar a 13000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- 7.- Después de centrifugar transferir el sobrenadante a un nuevo tubo, precipitar el ADN con 0.7 volúmenes de isopropanol, mezclar e inmediatamente centrifugar a 13 000 rpm por 5 minutos.
- 8.- Eliminar el alcohol y lavar el pellet con 500 µL de etanol (70%), complementándose con una centrifugada de dos minutos a 13 000 rpm. Secar y resuspender en 40 µL de buffer TE (EDTA y TRIS).

Anexo 3. Descriptores morfológicos de Engels y Philips – Mora

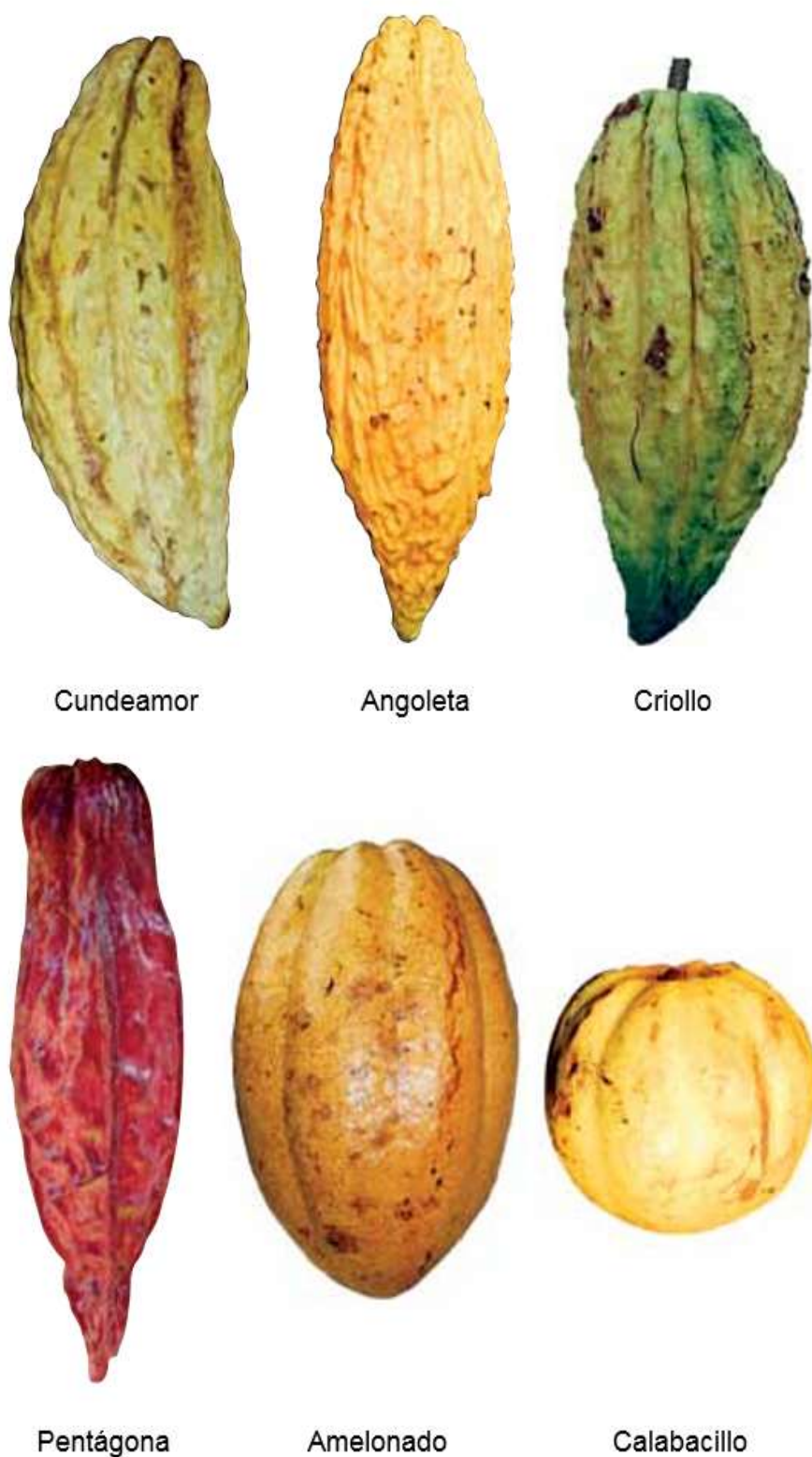


Figura 3. Forma de los frutos de cacao (Descriptores morfológicos de Engels *et al.* 1980, y Philips – Mora *et al.* 2012).

Anexo 4. Forma de los ápices de los frutos de cacao



Figura 4. Forma de los ápices de los frutos de cacao (Descriptores morfológicos de Engels *et al.* 1980, y Philips – Mora *et al.* 2012).

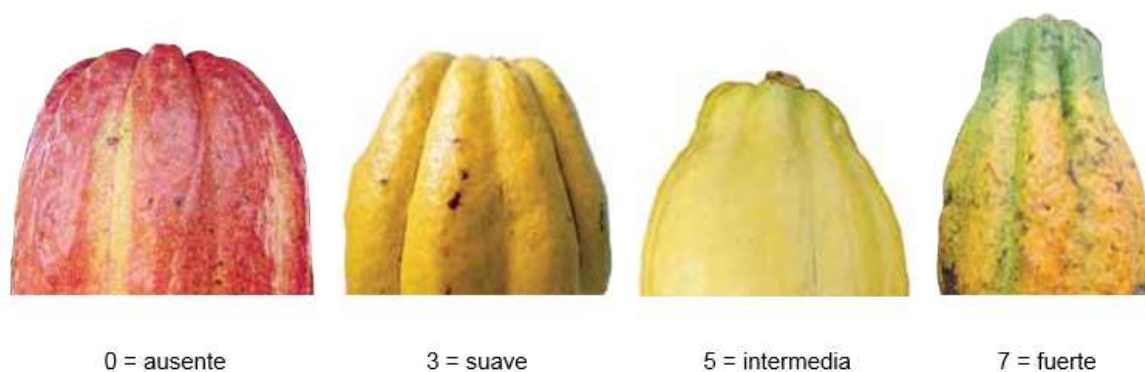


Figura 5. Forma de la constricción basal en frutos de cacao (Descriptores morfológicos de Engels *et al.* 1980, y Philips – Mora *et al.* 2012).

Anexo 5. Rugosidad de la cáscara en frutos de cacao



0 = ausente



3 = suave



5 = intermedia



7 = áspera

Figura 6. Rugosidad de la cáscara en frutos de cacao. (Descriptores morfológicos de Engels *et al.* 1980, y Philips – Mora *et al* 2012).

Anexo 6. Forma de la semilla (parte superior) y forma del corte transversal (parte inferior).

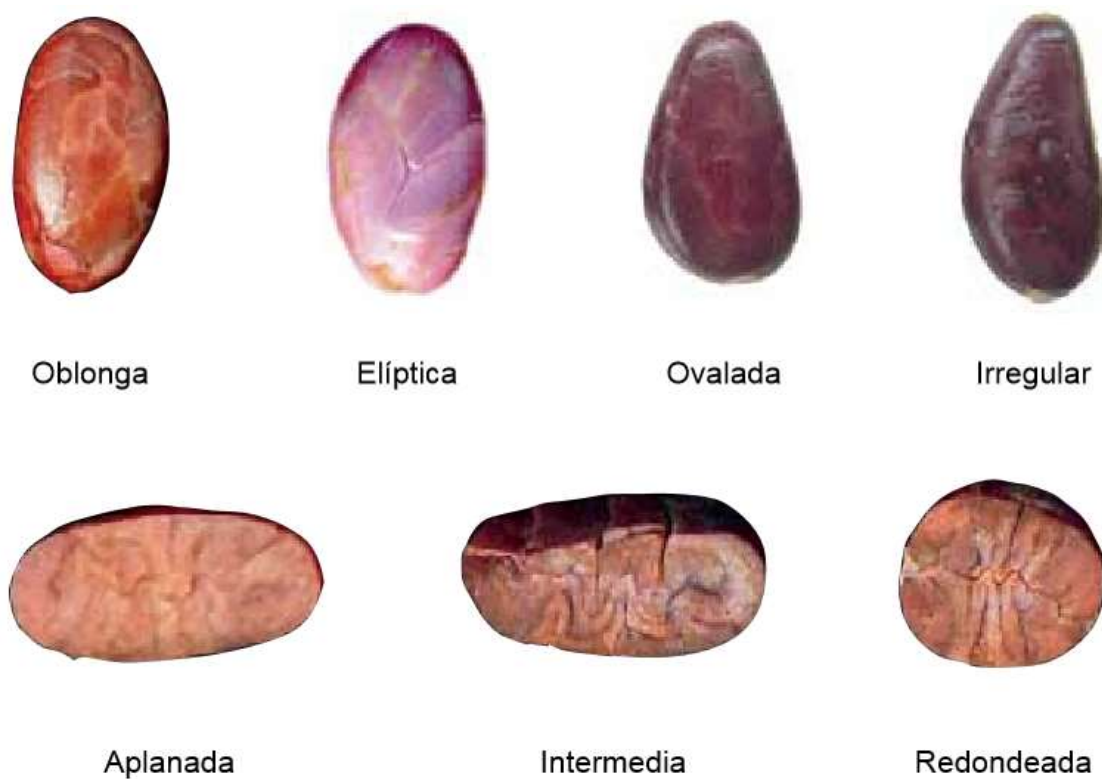


Figura 7. Forma de la semilla (parte superior) y forma del corte transversal (parte inferior).
(Descriptores morfológicos de Engels *et al.* 1980, y Philips – Mora *et al* 2012).

Anexo 7. Fotografías de la investigación



Foto 1. Caracterización morfológica del fruto.



Foto 2. Caracterización morfológica de las plantas.



Foto 3. Caracterización morfológica de la hoja.



Foto 4. Extracción de ADN genómico.



Foto 5. Transfiriendo el sobrenadante a un nuevo tubo.



Foto 6. Lavado del pellet