



**UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO  
UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA**

**Caracterización molecular y diversidad  
genética de cacao Nacional del banco de  
germoplasma de Tenguel-Guayas Ecuador**

**Autores:**

**Mercedes Carranza Patiño**

**Gerardo Gallego**

**Jaime Muñoz Florez**

**Jaime Morante Carriel**

**José Nieto Rodríguez**

**Nicolás Cruz Rosero**

**Patricia Zapata**

**X CONGRESO LATINOAMERICANO DE AGRONOMÍA  
17, 18 Y 19 DE JULIO DEL 2019 UTEQ-ECUADOR**

**Introducción**  
**Objetivo**  
**Hipótesis**

**Resultados**  
**Discusión**  
**Conclusiones**

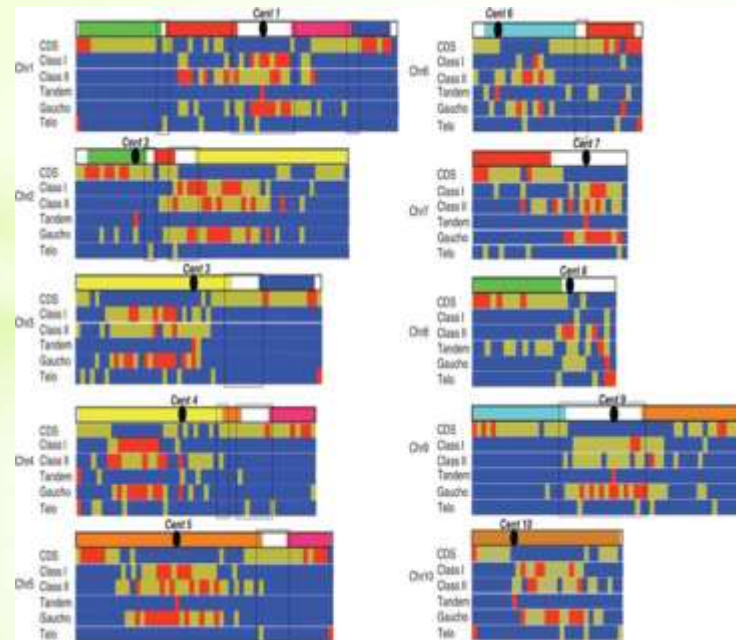
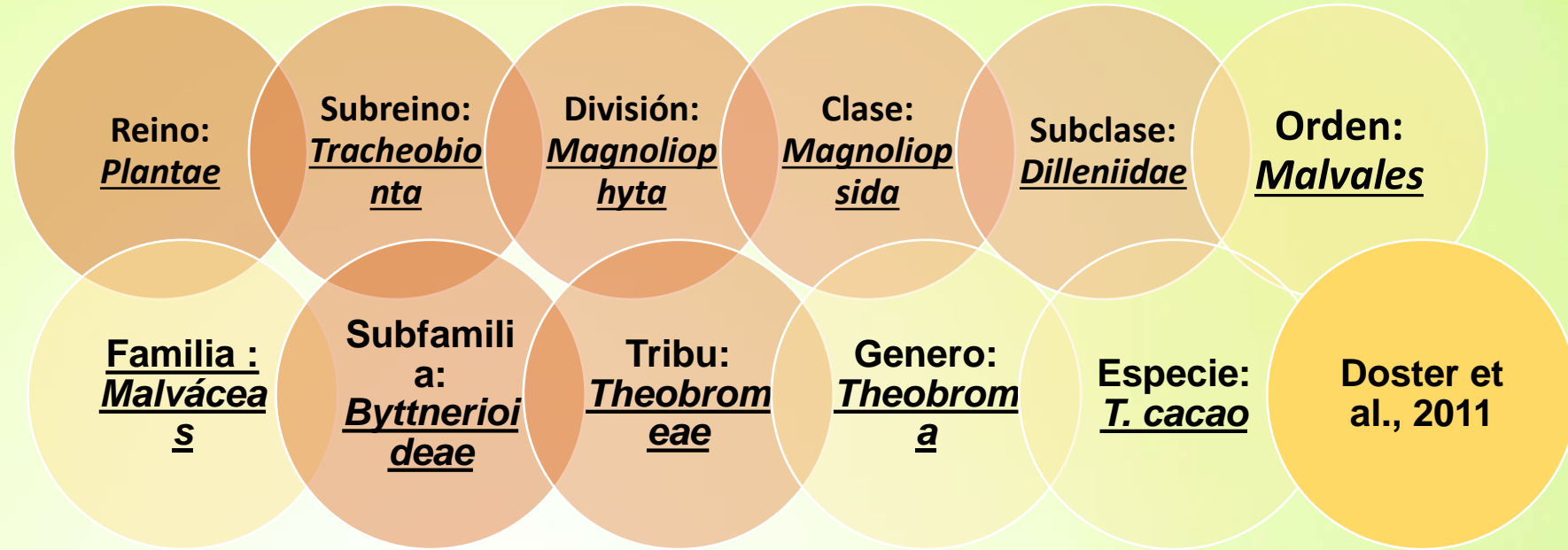
**Materiales y**  
**Métodos**

**Ubicación geográfica**  
**Material vegetal**  
**Extracción de ADN**  
**Genotipificación**  
**Análisis de datos**





# Clasificación Taxonómica



**Genoma del Cacao**  
Argout et al., 2011

- Especie diploide (n10)
- 10 cromosomas
- Tamaño del genoma (430 Mb)
- 38,737 genes

# ORÍGEN DEL CACAO

1914- 1944

## VanHall(1914) y Chessman(1944)

1. Sugieren que el cacao se originó en la zona del Alto Amazonas y fue luego llevado a Centro América.

1964

## Cuatrecasas

2. Propuso que las poblaciones centro y sur Americanas se desarrollaron de manera independiente.

2002

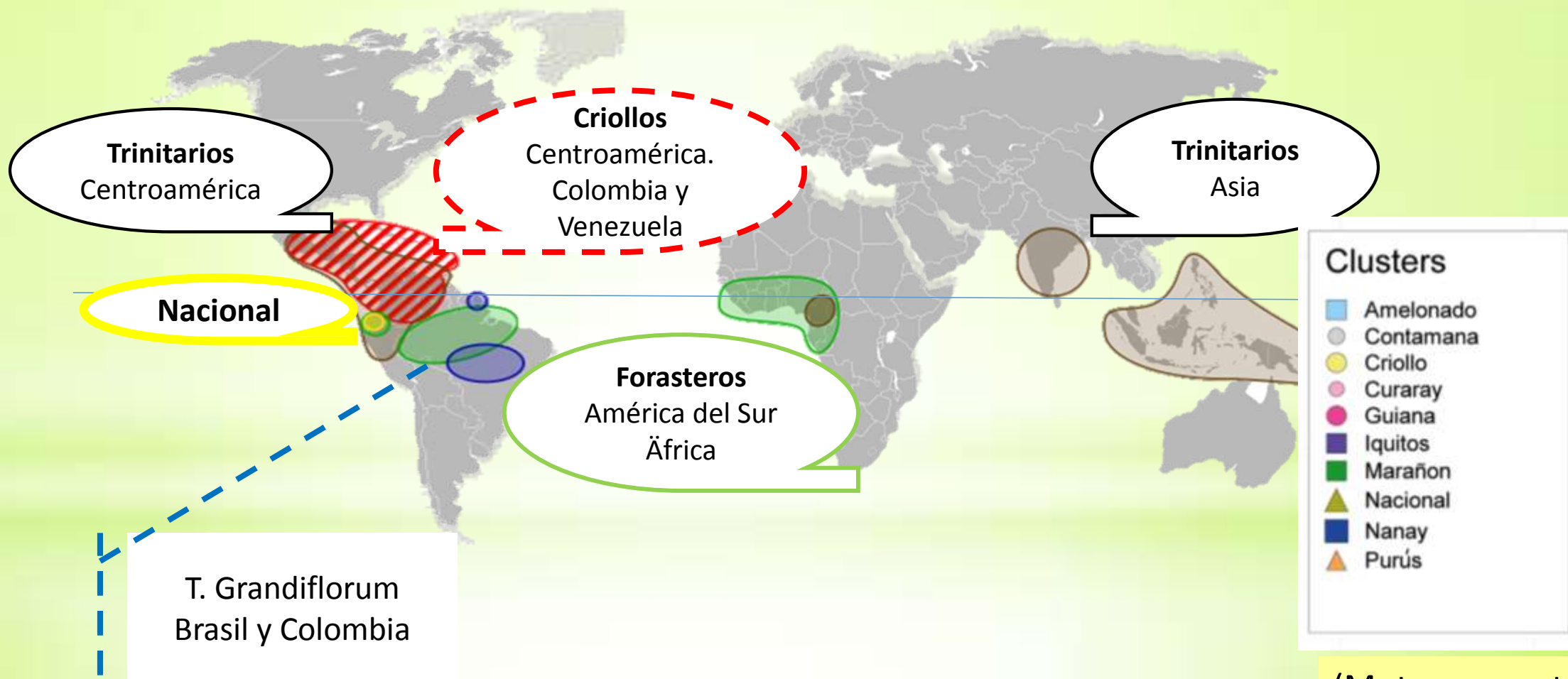
## Motamayor

3. Con el uso de marcadores moleculares sugiere que las poblaciones centroamericanas son descendientes de las poblaciones de América del sur



# DISTRIBUCIÓN MUNDIAL DEL CUTIVO DE CACAO

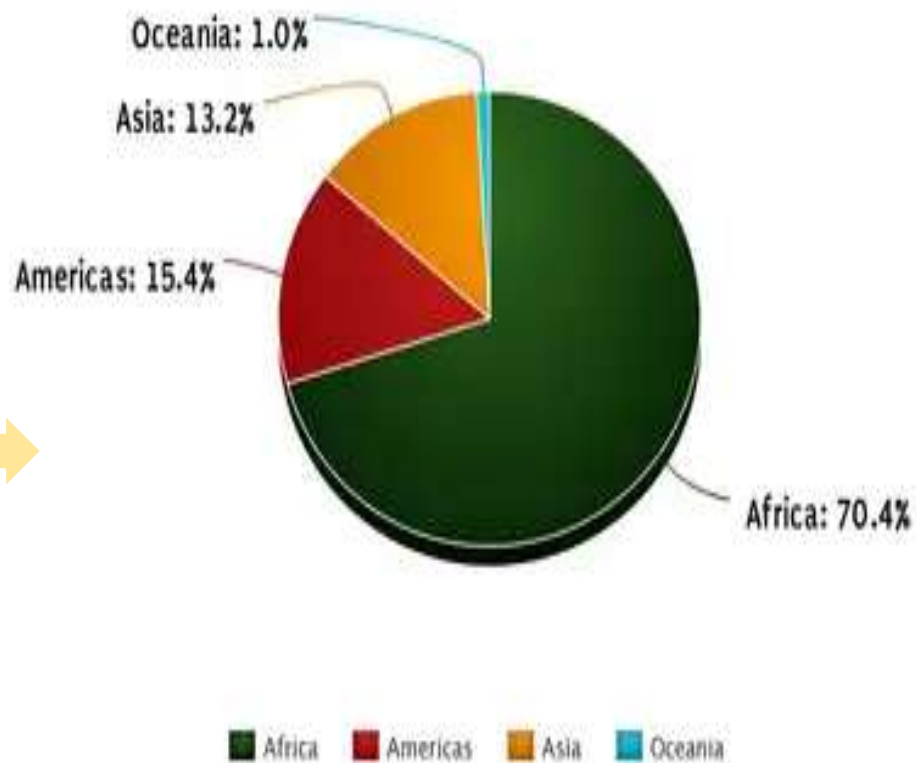
I  
N  
T  
R  
O  
D  
U  
C  
I  
O  
N



(Motamayor et al., 2008)

# PRODUCCIÓN DE CACAO A NIVEL MUNDIAL

Producción de cacao por continente



Demanda mundial: 1 a 4,3 millones (1961-2014) (United cacao 2015)-

Las plantaciones cacao presentan alta  
variabilidad

Diferente grado  
de  
incompatibilidad



Polinización  
cruzada natural  
Entomófila  
(0,1 a 0,3%  
polinizada.



Forma de reproducción sexual que  
da lugar a la segregación y  
recombinación genética.



# Diversidad genética base de la sobrevivencia de las especies

INTRODUCCIÓN

Importante contar con estudios que estimen la diversidad genética y agromorfológica



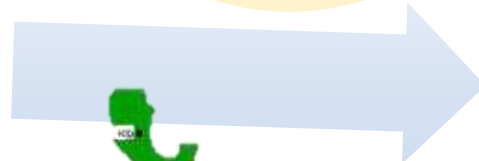
Búsqueda de tolerancia o resistencia a plagas y enfermedades, rendimiento.



Mejorar la calidad de lo que se produce

En América Latina existe la genética para producir cacaos finos y corrientes

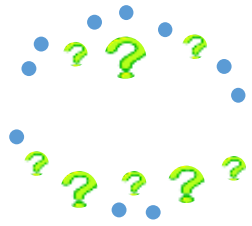
No existe un debido control para las enfermedades.



No se cuenta con oferta de clones resistentes a enfermedades (World Bank, 2014).







# El cacao ecuatoriano ha sido catalogado como cacao fino de sabor y aroma

Atractivo para el mercado internacional  
Agricultor conozca qué tipo de plantaciones tiene.

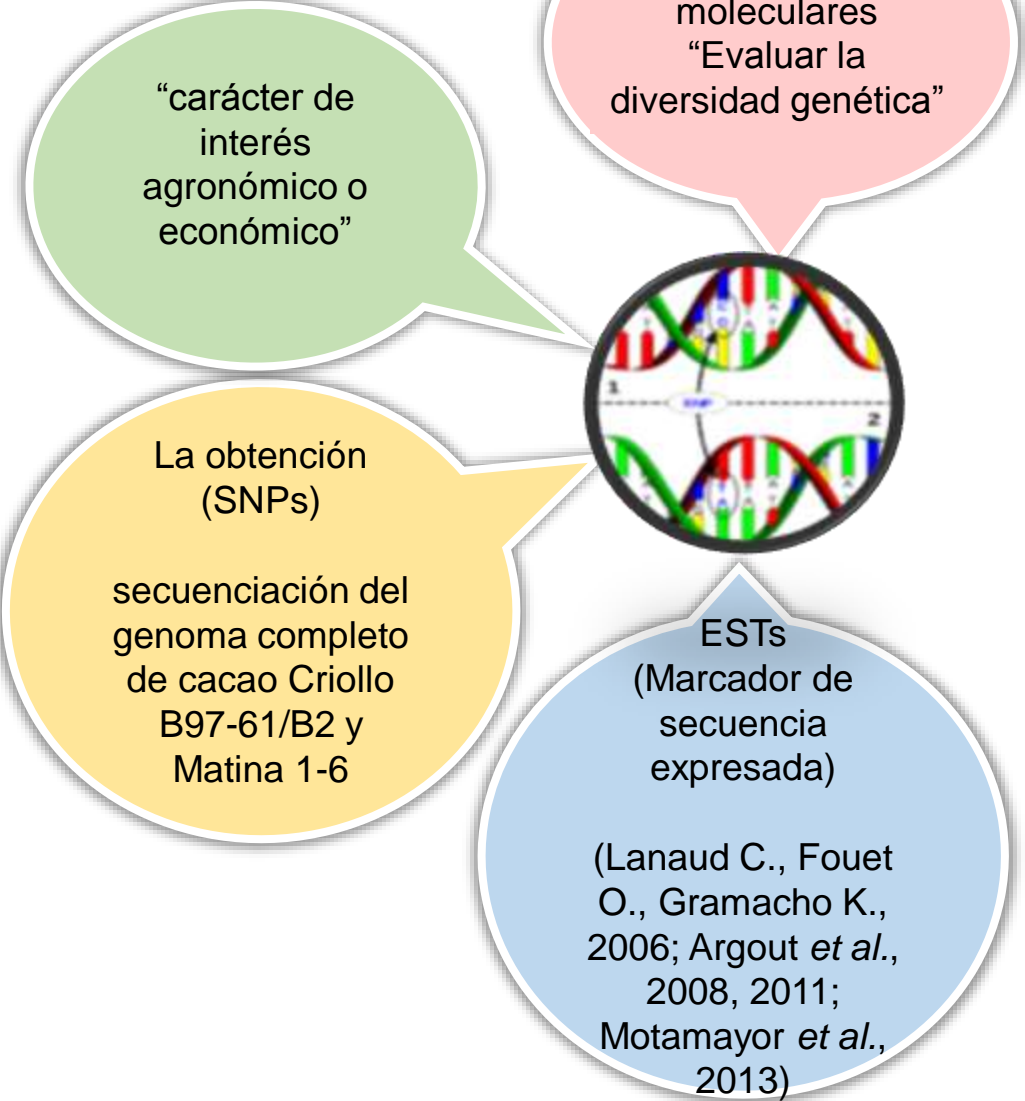
Evaluación parcial de la diversidad genética de cacao Nacional  
Base la información agromorfológica que existe



# Mejoramiento genético de cacao

Dos vías: Rendimiento y calidad. Aumento de resistencia a plagas y enfermedades (Royaert *et al.*, 2011)

INTRODUCCIÓN



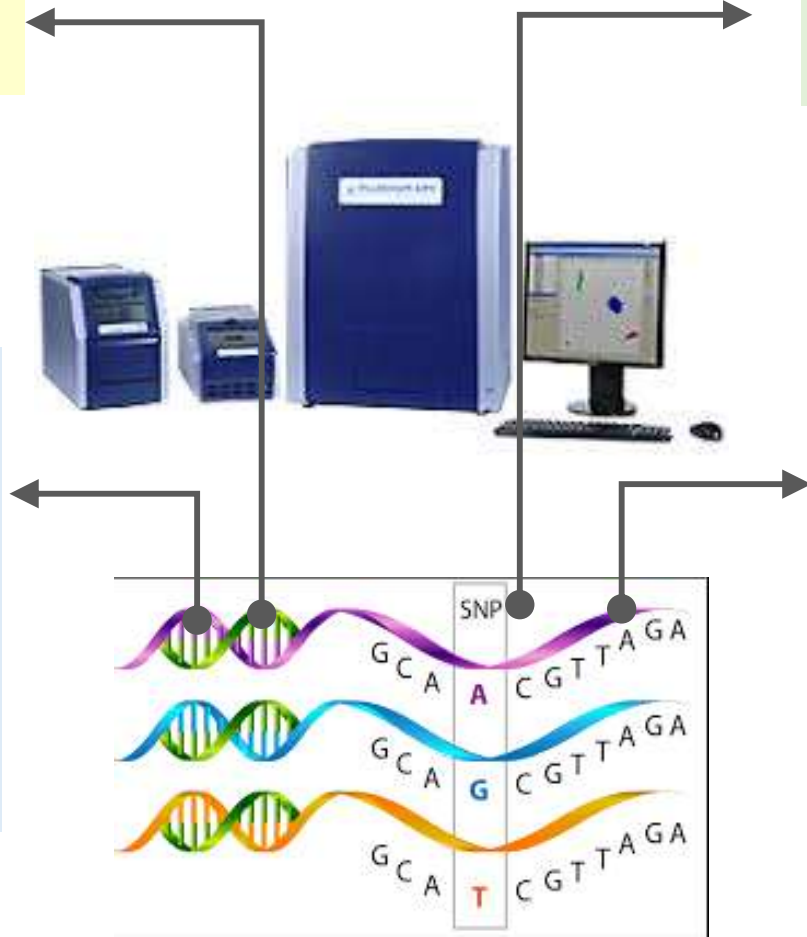
# SECUENCIA DE SIMPLE NUCLEÓTIDO (SNPs)

I  
N  
T  
R  
O  
D  
U  
C  
I  
Ó  
N

Son cambios en un solo nucleótido y es la forma más frecuente de polimorfismo en los genomas de las plantas

Realizar ensayos de manera automatizada y estandarizada en laboratorios

- USOS:**
- Identificación de materiales dentro de colecciones
  - Seguimiento a los programas de mejoramiento genético.
    - Caracterización de parentales y líneas derivadas (Ji *et al.*, 2012).



**Países**

Colombia, Honduras, Nicaragua, Brasil, Costa Rica, han utilizado marcadores SNPs, con alta eficiencia en la caracterización de genotipos.

(Ji *et al.*, 2012; DuVal *et al.*, 2017; Osorio-Guarín *et al.*, 2017; Mata-Quiroz *et al.*, 2018)

## Objetivo

- Determinar la diversidad genética y caracterizar genotípicamente 80 introducciones y 19 controles de cacao Nacional de Ecuador, como complemento a estudios morfoagronómicos de esta variedad, con fines de selección para programas de mejora genética.

## Hipótesis

- La caracterización molecular entre accesiones productivas y tolerantes a escoba de bruja y monilia definirá la estructura genéticas de poblaciones de *T. cacao* variedad Nacional.

# Material vegetal

## BANCO DE GERMOPLASMA TENGUEL



Parroquia Tenguel cantón Guayaquil provincia del Guayas a: 30° 00' latitud sur y 79 ° 47' longitud occidental

**80**

**13,08 ha sembradas. 5280 árboles de cacao.**

Superficie 14.5 ha de 7000 árboles de cacao introducido de diversos sectores del país.

882 presentan características de cacao Nacional

## FINCA LA REPRESA



**19**

Recinto Fayta, kilómetro 7,5 vía Quevedo -San Carlos, provincia de Los Ríos. a 01°03'18" de latitud sur y 79°25'24" de longitud oeste,

CIAT (C-Criollo, C-Trinitario 1, C-Trinitario 2, C-Contamana).

# Material vegetal



**Hojas de cacao**



**Sílica Gel**



**Recolección**

# Material vegetal

## Cacao Nacional Ecuador

N°	Introducción	N°	Introducción	N°	Introducción	N°	Introducción
1	L10H28	21	L20H50	41	L29H7	61	L33H49
2	L11H25	22	L20H53	42	L29H47	62	L33H56
3	L12H8	23	L21H6	43	L29H48	63	L33H65
4	L12H27	24	L21H38	44	L30H1	64	L34H67
5	L12H28	25	L21H56	45	L30H3	65	L40H49
6	L12H29	26	L21H57	46	L30H25	66	L42H80
7	L12H30	27	L23H36	47	L30H45	67	L44H88
8	L13H11	28	L24H12	48	L30H46	68	L45H11
9	L13H37	29	L24H14	49	L30H9	69	L46H66
10	L15H31	30	L24H19	50	L32H54	70	L46H68
11	L15H32	31	L25H45	51	L31H66	71	L46H70
1	L15H34	32	L25H59	52	L32H48	72	L46H75
13	L16H48	33	L25H60	53	L32H65	73	L48H23
14	L17H25	34	L25H64	54	L32H68	74	L48H92
15	L17H30	35	L26H64	55	L32H72	75	L49H4
16	L17H36	36	L27H19	56	L33H8	76	L49H86
17	L17H38	37	L27H48	57	L33H25	77	L49H98
18	L18H36	38	L28H22	58	L33H26	78	L51H59
19	L18H58	39	L28H48	59	L33H45	79	L52H98
20	L20H49	40	L29H4	60	L33H47	80	L53H4



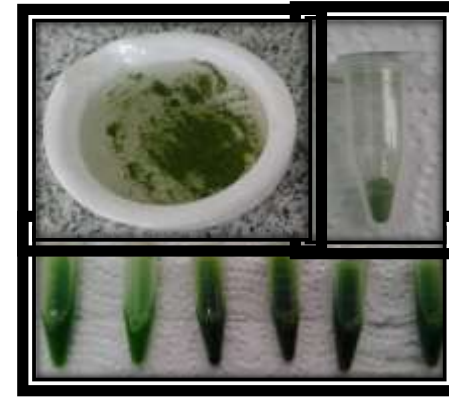
**Controles de Cacao**

N°	Introducción /variedad	código	N°	Introducción /variedad	código
1	Trinitario(L48H89)	(1-06)	11	Forastero IMC-67	(1-1)
2	Trinitario (L18H53)	(14-09)	12	Forastero (103)	(1-4)
3	Trinitario (ISS 95-IMC67- Canelo)	(24-2)	13	Forastero (109)	(1-15)
4	Trinitario	(28-4)	14	Forastero (L11H19)	(1-21)
5	Trinitario	(29-4)	15	Onzole-Criollo	8PL4
6	CCN51	(2-2)	16	Onzole-Criollo	88PL1
7	CCN51	(2-3)	17	Onzole-Criollo	78PL1
8	CCN51	(2-4)	18	Onzole-Criollo	79PL2
9	CCN51	(3-4)	19	Onzole-Criollo	5PL1
10	CCN51	(3-5)			

# Extracción de ADN y control de calidad de las muestras

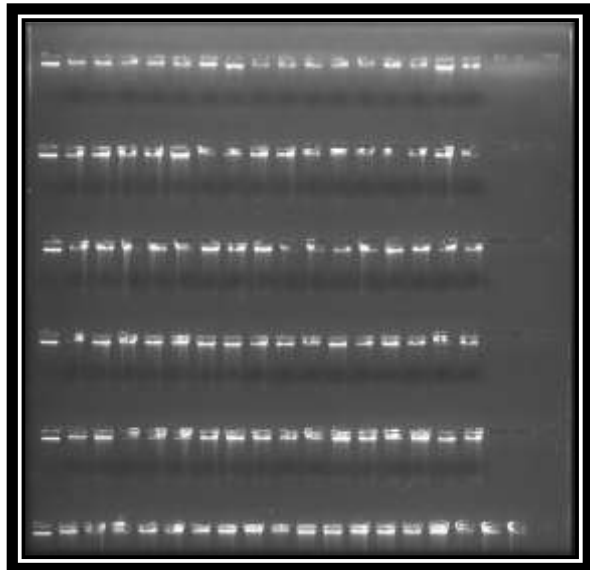


Michiels *et al.*, 2003) modificado por (Zapata, 2016).



**Control de calidad ADN:** Guía práctica para genotipado de SNPs Sistema EP1 y SNPtype Assays de Fluidigm versión F\_03 (Corporación Fluidigm, 2018)

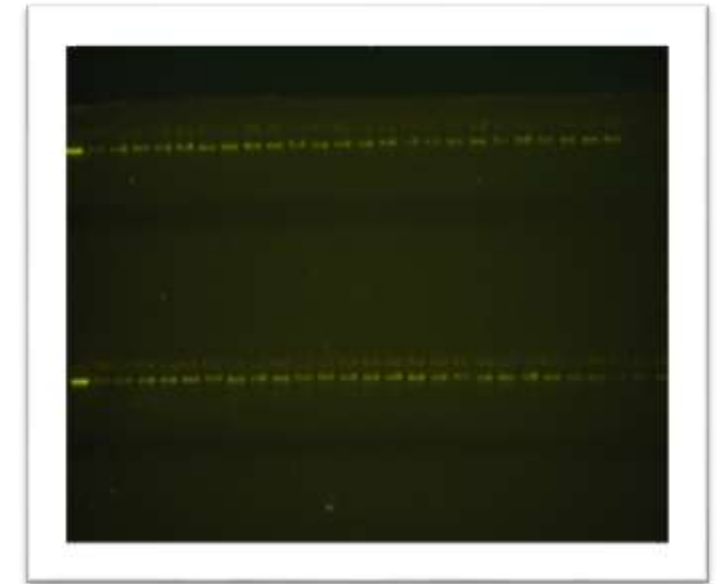
Electroforesis en gel (gel de agarosa 1%, TBE 0.5 Teñidos con SYBR Safe) 0,5%



Cuantificación por espectrofotometría (Synergy-H1m).



Dilución de muestras 60 ng/μL





# Marcadores moleculares SNPs y Genotipificación

Sistema EP1 y SNPtype Assays de Fluidigm versión F\_03. Metodología de detección alelo-específica

Pre amplificación mediante PCR de las regiones genómicas que contienen los SNPs (PCR-molde

## Plataforma Fluidigm EP1 System.



Tabla 2-3. Composición del arreglo de SNPs para genotipar cacao variedad Nacional de Ecuador

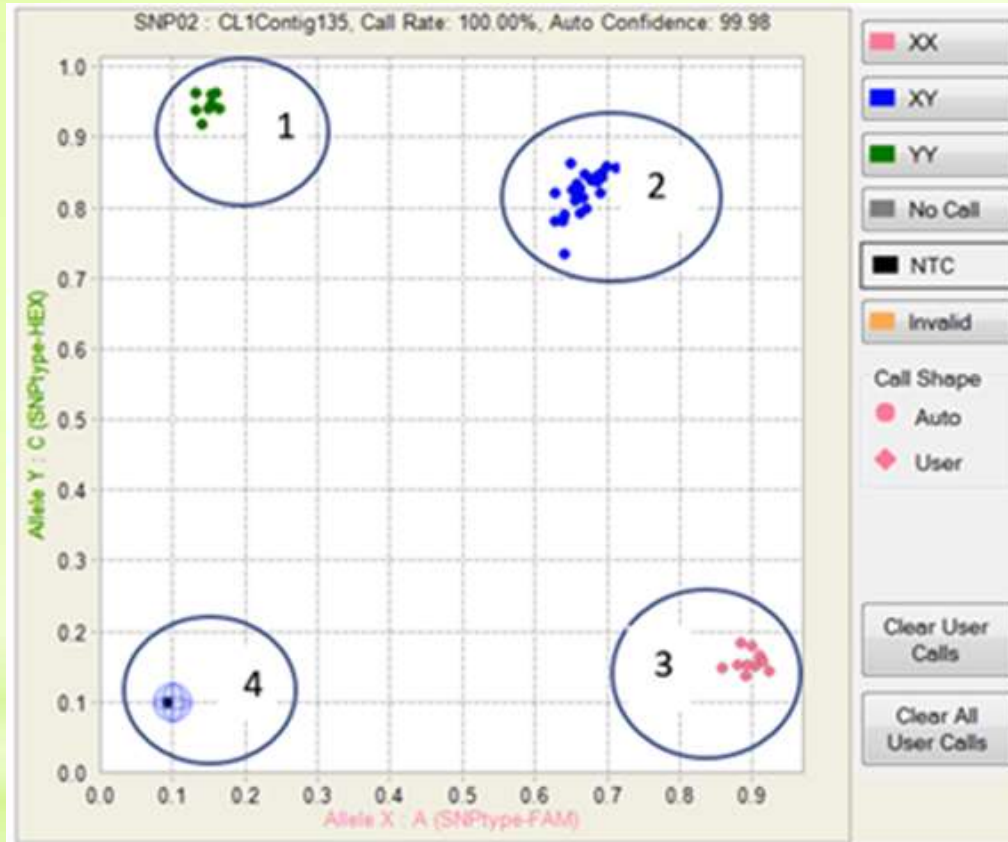
No	SNP ID (USDA)	Crom	A1	A2	No.	SNP ID (TropGene)	Crom	A1	A2
1	CL317Contig1	1	A	C	49	TcSNP865	1	T	C
2	CL527Contig1	1	T	C	50	TcSNP1058	1	A	C
3	CL77Contig2	1	A	C	51	TcSNP510	1	C	G
4	CL276Contig1	1	A	T	52	TcSNP418	1	A	G
5	CL3336Contig1	1	A	C	53	TcSNP316	2	A	T
6	CL1454Contig1	1	C	G	54	TcSNP1159	2	A	C
7	CL1125Contig2	2	A	G	55	TcSNP206	2	A	G
8	CL646Contig2	2	T	C	56	TcSNP798	2	A	T
9	CL1Contig69	2	T	C	57	TcSNP152	2	T	C
10	CL1002Contig1	2	T	C	58	TcSNP353	2	A	G
11	CL1Contig277	2	T	C	59	TcSNP437	2	A	T
12	CL4Contig14	3	C	G	60	TcSNP689	3	A	G
13	CL1312Contig1	3	C	G	61	TcSNP595	3	A	G
14	CL209Contig1	3	C	G	62	TcSNP928	3	T	C
15	CL132Contig1	3	A	G	63	TcSNP413	3	T	C
16	CL3696Contig1	4	A	T	64	TcSNP395	4	T	C
17	CL552Contig2	4	A	T	65	TcSNP344	4	T	C
18	CL359Contig1	4	C	G	66	TcSNP382	4	T	C
19	CL588Contig1	4	T	C	67	TcSNP1209	4	T	G
20	CL2987Contig1	4	A	T	68	TcSNP174	4	A	G
21	CL695Contig1	5	T	G	69	TcSNP475	5	C	G
22	CL1Contig128	5	C	G	70	TcSNP736	5	T	C
23	CL318Contig1	5	A	G	71	TcSNP1111	5	A	G
24	CL1086Contig1	5	A	G	72	TcSNP28	5	T	G
25	CL218Contig1	5	A	G	73	TcSNP1453	5	T	G
26	CL581Contig1	6	T	C	74	TcSNP602	6	T	C
27	CL456Contig1	6	T	C	75	TcSNP1212	6	T	C
28	CL745Contig1	6	T	C	76	TcSNP1390	6	T	C
29	CL171Contig2	6	T	C	77	TcSNP1383	7	A	G
30	CL192Contig2	6	T	C	78	TcSNP1063	7	A	T
31	CL423Contig1	6	A	G	79	TcSNP791	7	A	T
32	CL532Contig1	7	A	G	80	TcSNP1201	7	T	G
33	CL2205Contig1	7	T	C	81	TcSNP1194	7	T	G
34	CL858Contig1	8	T	G	82	TcSNP606	7	A	G
35	CL235Contig1	8	T	C	83	TcSNP189	8	A	G
36	CL1Contig129	8	T	C	84	TcSNP23	8	T	C
37	CL8Contig4	9	C	G	85	TcSNP1309	8	T	C
38	CL1Contig135	9	A	C	86	TcSNP269	8	A	G
39	CL1957Contig1	9	C	G	87	TcSNP899	8	A	G
40	CL918Contig1	9	T	C	88	TcSNP1064	9	A	G
41	CL1600Contig1	9	T	G	89	TcSNP264	9	A	T
42	CL139Contig1	9	T	C	90	TcSNP184	9	T	G
43	CL1030Contig1	9	T	C	91	TcSNP1305	9	A	G
44	CL639Contig1	10	A	C	92	TcSNP1517	9	T	C
45	CL88Contig2	10	A	G	93	TcSNP731	10	A	G
46	CL1Contig113	10	T	G	94	TcSNP1041	10	C	G
47	CL282Contig2	10	T	G	95	TcSNP653	10	A	G
48	CL702Contig1	10	T	C	96	TcSNP1392	10	T	C

Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA) y de la compañía Fluidigm Corp. (San Francisco, California, USA) (Illic *et al.*, 2012; Fong *et al.*, 2014);

Banco de datos Tropgene del Centro de Investigación CIRAD (Ruiz *et al.*, 2004).

## Análisis de los Datos

Análisis de las fluorescencias Programa *Fluidigm SNP Genotyping Analysis Software versión 4.1.3.*



**Figura 2-2.** Gráfica de fluorescencia para el SNP CL1Contig135. 1 Homocigoto CC), 2 (Heterocigoto AC), 3 (homocigoto AA) y 4 (Control sin ADN)

Pertinencia de los marcadores SNPs estadísticos descriptivos.

Frecuencia del Alelo Mayor

Diversidad genética

Heterocigosidad observada ( $H_o$ )

Heterocigosidad esperada ( $H_e$ )

Contenido de información polimórfica (PIC); Software Power Marker V 3.25 Liu y Muse 2005)



## Análisis de datos

Distribución de las muestras: *PowerMarker*

Las distancias genéticas pareadas, comparando por pares los perfiles genéticos y transformando las diferencias encontradas en valores de distancias (Beerli, 2005).

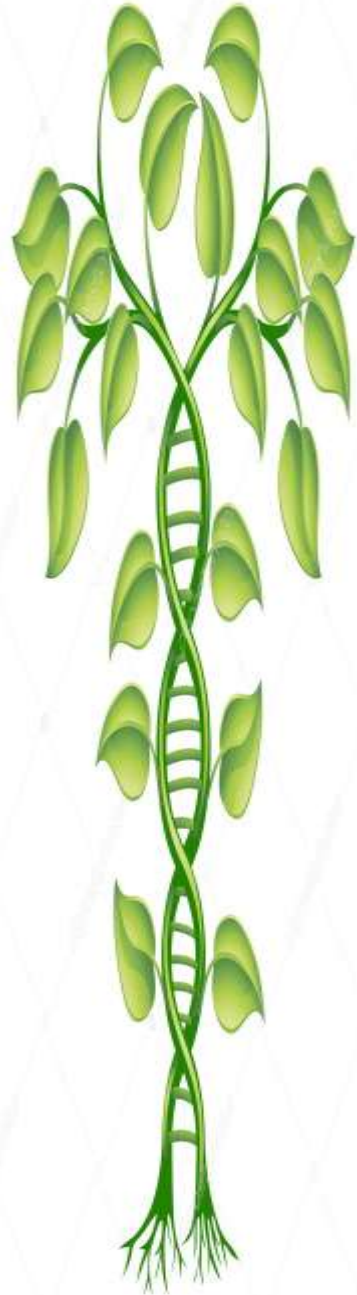
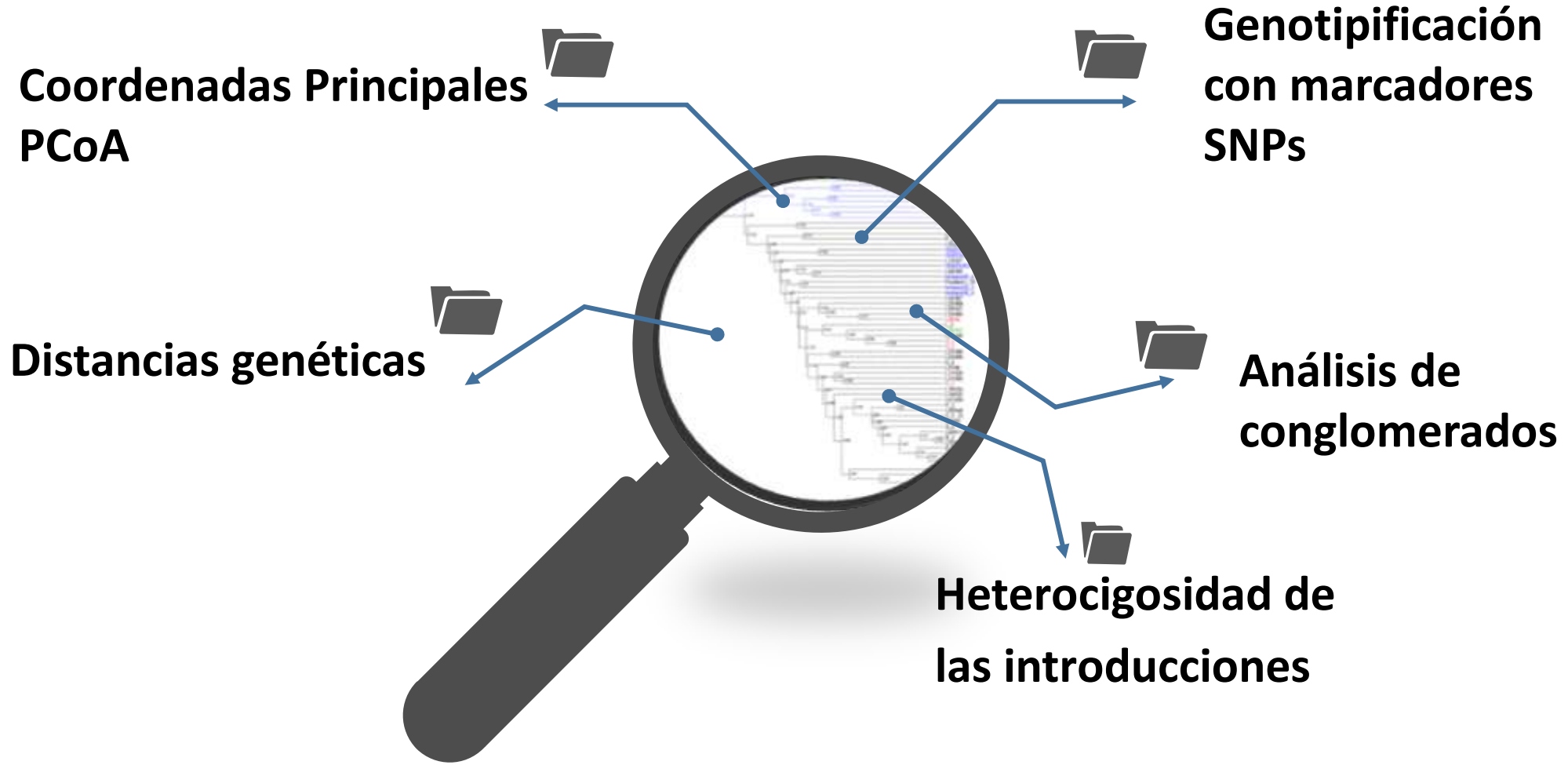
Estándar de Rogers (1972) que no asume fuerzas evolutivas *a priori* útil para evaluar colecciones (Reif, Melchinger, y Frisch, 2005).

Este estándar distribuye las muestras en un rango de 0 a 1, donde 0 significa que no existen diferencias genéticas y 1 que hay una total diferenciación entre los individuos.

La matriz numérica resultante de este análisis fue agrupada en un dendrograma o árbol de distancias, por medio del algoritmo UPGMA.

Los arboles resultantes fueron editados en el programa FigTree V1.4.2 (Rambaut, 2016).

# • Resultados y discusión



# Resultados y discusión

## Genotipificación con marcadores SNPs

Tabla 2-4, Estadísticos descriptivos para los 95 SNPs evaluados para 99 materiales de cacao

SNP	Fre Alelo Mayor	Genoti Observ	H	PIC	SNP	Fre Alelo Mayor	Genoti Observ	H	PIC
CL695Contig1	0,500	3	0,677	0,375	CL581Contig1	0,616	3	0,626	0,361
CL1454Contig1	0,505	3	0,788	0,375	TcSNP1209	0,626	3	0,667	0,359
CL1Contig129	0,505	3	0,768	0,375	TcSNP413	0,626	3	0,667	0,359
CL858Contig1	0,505	3	0,545	0,375	CL276Contig1	0,631	3	0,677	0,357
CL317Contig1	0,540	3	0,859	0,373	CL359Contig1	0,874	3	0,111	0,196
TcSNP475	0,596	3	0,646	0,366	TcSNP1392	0,99	2	0,02	0,02
TcSNP791	0,601	3	0,535	0,365	TcSNP28	0,995	2	0,01	0,01
TcSNP1111	0,606	3	0,667	0,363	TcSNP1383	0,995	2	0,01	0,01
CL8Contig4	0,611	3	0,657	0,362	TcSNP865	0,995	2	0,01	0,01
TcSNP1305	0,611	3	0,737	0,362	TcSNP1201	0,995	2	0,01	0,01
CL745Contig1	0,616	3	0,566	0,361	Mean	0,685	2,9	0,479	0,289

SNPs TcSNP353 (excluído) (He) 0,378.

Osorio-Guarín, Berdugo-Cely, *et al.*, (2017) (PIC) rango de 0.113 para TcSNP1383 a 0.460 para TcSNP709.

Cosme *et al.*, (2016) (PIC > 0.4) Colección de cacao colombiana.



# Resultados y discusión

## • Análisis de conglomerados

**Tabla 2-5.** Grupos de introducciones que comparten los mismos perfiles genéticos de acuerdo a la función “Matching Multilocus Genotypes” de GeneAlex

Grupo	Número	Código/grupo	Código/Introducción
A	4	A-4	L21H57, L20H53, L20H50, L20H49
B	3	B-3	L40H49, L18H36, L17H30
C	13	C-13	Forstero1_21, L44H88, L33H49, L33H47, L33H26, L33H25, L32H65, L32H54, L32H48, L26H64, L25H64, L25H60, L25H59
D	5	D-5	L33H45, L30H3, L29H7, L29H4, L28H48
E	4	E-4	Forastero 1_4, L46H75, L33H8, L30H25
F	3	F-3	L46H70, L17H36, L15H31
G	2	G-2	L30H46, L30H45
H	4	H-4	L46H68, L24H19, L24H14, L24H12
I	2	I-2	L48H23, L21H38
J	3	J-3	L18H58, L17H25, L13H37
K	3	K-3	L17H38, L13H11, L12H8
L	2	L-2	L28H22, L27H19
M	5	M-5	CCN513_5, CCN513_4, CCN512_4, CCN512_3, CCN512_2
N	2	N-2	L49H98, L42H80
O	2	O-2	L53H4, L52H98
P	3	P-3	L12H30, L12H29, L12H28

PI y Plsib, conjunto de 21 SNPs

Con 95 SNPs PI  $2.4E-31$  y un Plsib  $1.1E-16$

Incluyen parientes (Plsib 0.00008)

(Ji *et al.*, 2013) 84 variedades de cacao de sabor fino Honduras y Nicaragua, 31 clones de las colecciones internacionales de cacao como referencias; 26 SNPs con un 99,99% de confianza son suficientes.





# • Resultados y discusión

## Heterocigosidad

Grupo F-3 (L46H70, L17H36, L15H31)  
64,6%

Grupo P-3 (L12H30, L12H29, L12H28)  
25,3%




Ji *et al.*, (2013) reportaron 20,6% variedades de Honduras y Nicaragua

Similares Osorio-Guarín, *et al.*, (2017) analizando 565 introducciones de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria AGROSAVIA




Figura 2-3. Porcentaje de heterocigosidad de as introducciones evaluadas


- **Resultados y discusión**  
**Heterocigosidad**



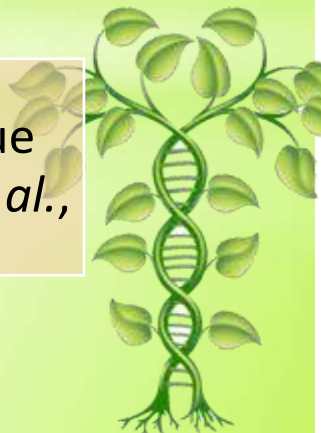
Valores bajos de heterocigosidad han estado asociados al grupo morfológico Criollo de Centro América. Probablemente asociado reducción en la eficacia biológica y a autofecundaciones sucesivas o por cruce entre parientes



Valores altos se han encontrado frecuentemente en individuos del grupo Forastero de la región de la alto Amazonas (Livingstone *et al.*, 2017).



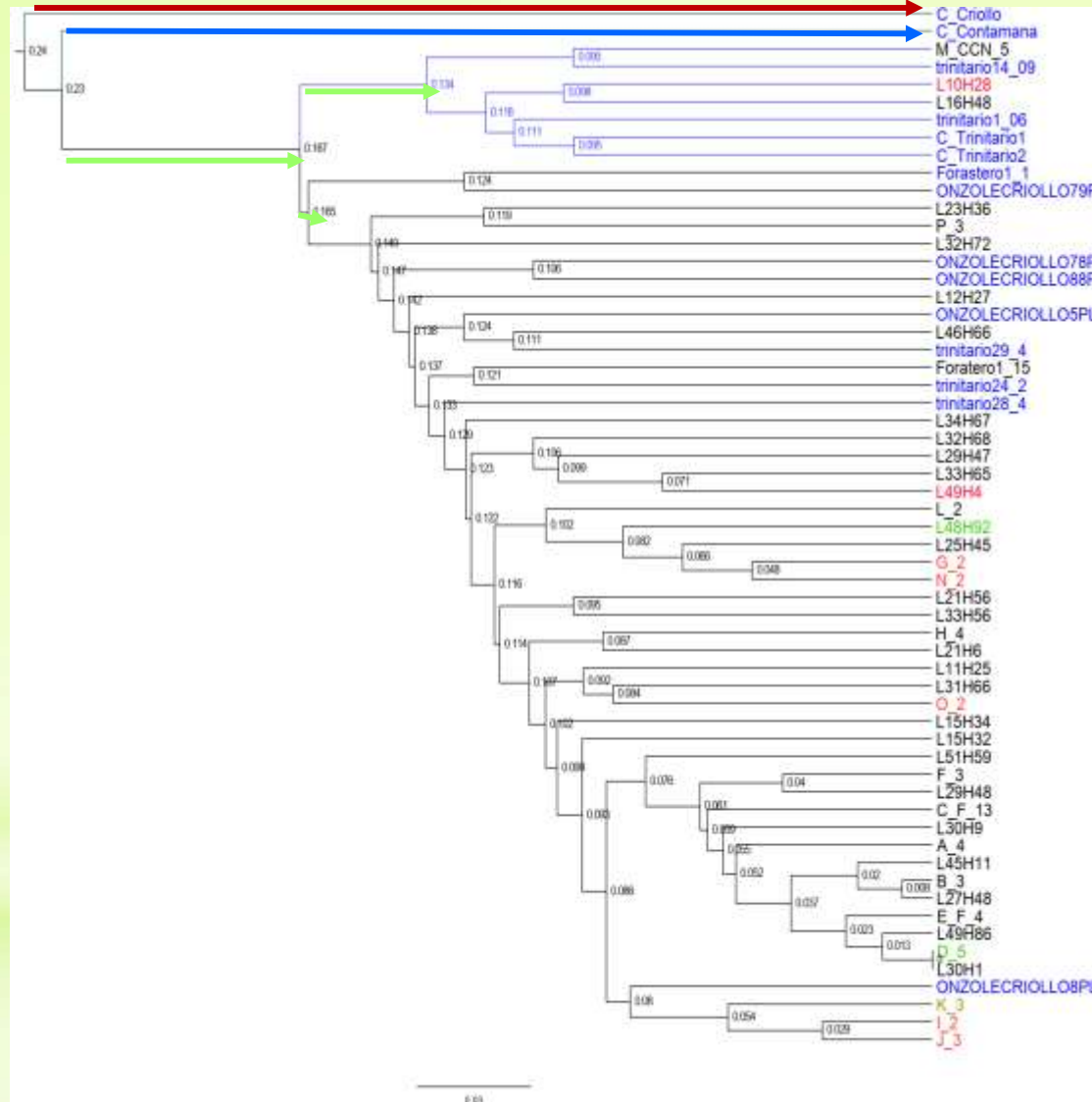
Los niveles de heterocigosidad obtenidos en este estudio se explican en parte por las características de autoincompatibilidad que presentan algunos materiales de cacao, lo que impide altas frecuencias de autopolinización o consanguinidad (Scheltema, 1989; Ruiz *et al.*, 2015).



# • Resultados y discusión

Distancias genéticas reducidas entre las introducciones 0.24

Osorio-Guarín, Berdugo-Cely, et al.(2017) acerca de que el genotipo Criollo es el grupo más diferenciado genéticamente



CCN51 (M-CCN51-5)  
Trinitario14\_09,  
C-Trinitario 1,  
C-Trinitario 2,  
Trinitario1\_06,  
L10 H28 y L16h48.

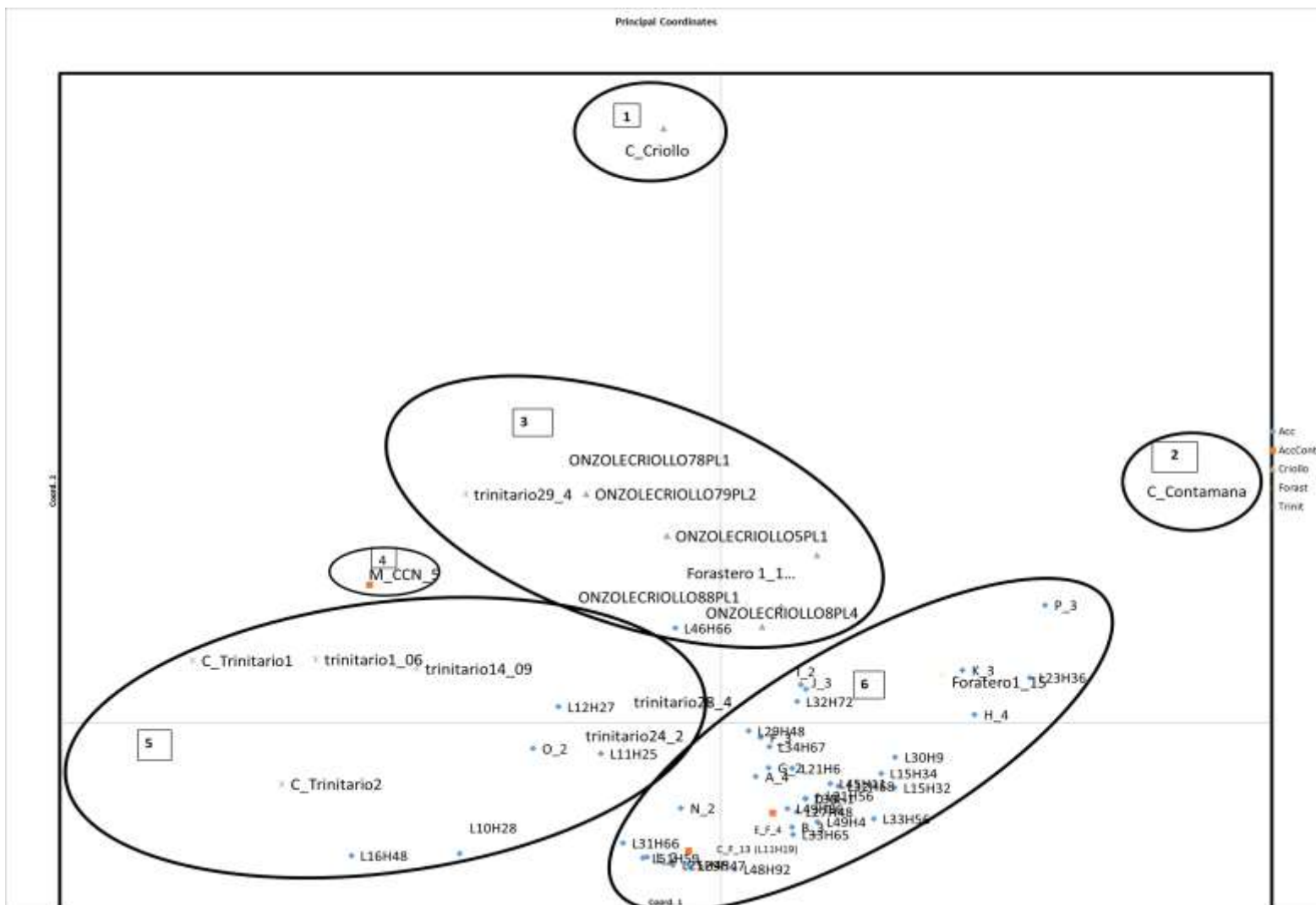
Nacional  
(Onzole-Criollo),  
Trinitarios (39-4),(24-2) (28-4)  
Forasteros.

Loor et al. (2009) para cacao Nacional y por Ruiz *et al.* (2015) al reportar que dentro de los individuos de cacao hay bajos niveles de diferenciación genética, sin embargo altos niveles de heterocigosidad



**Figura 2-4.** Dendrograma de distancias genéticas elaborado con el estándar de Rogers (1972)

# • Resultados y discusión



En el (PCoA) el plano de los tres primeros ejes principales representó 33.79%, 22.00% y 13.55% de la variación total respectivamente

Romero., Bonilla., Santos., Peralta, y Zhong, (2010) quienes afirman que existe relación genética del cacao Nacional del Ecuador con los grupos Criollos y Forasteros.



**Figura 2-5.** Diagrama de Coordenadas Principales PCoA de Introducciones de cacao variedad Nacional y otras variedades de cacao.

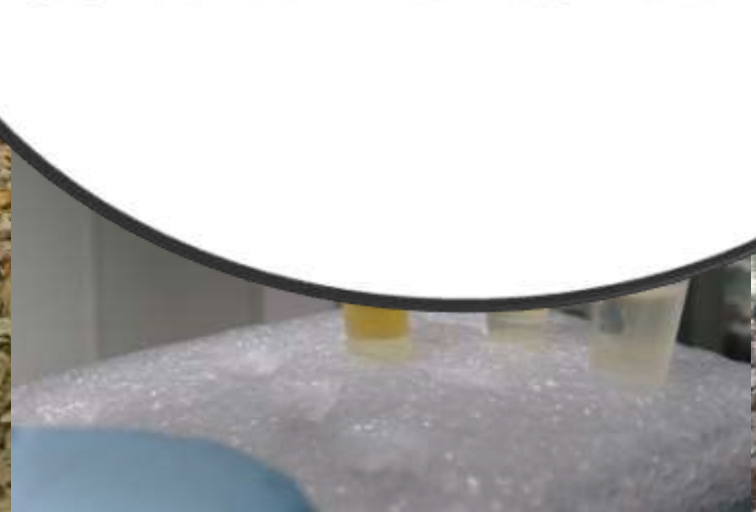
# Conclusiones

- Los análisis realizados indican que el conjunto de marcadores SNP usados fueron eficientes en la caracterización de las introducciones de cacao, ya que permitieron la obtención 99 perfiles genéticos incluyendo los perfiles de 80 introducciones de cacao Nacional cultivado en Ecuador.
- Se identificaron introducciones idénticas genéticamente que posiblemente provengan de un mismo clon.
- La distribución genética de las muestras sugiere que el cacao Nacional evaluado corresponde a introducciones que comparten información genética con materiales tipo trinitarios, posiblemente debido a la historia de hibridación temprana de este grupo.

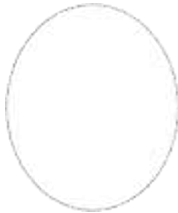




Muchas GRACIAS



# Conclusiones



La comparación de los datos genéticos obtenidos con la información morfo agronómica, geográfica y de otras características de interés agronómico, permitirá seleccionar introducciones de cacao sobresalientes en cuanto a productividad y tolerancia a enfermedades, lo cual servirá de base en programas de mejoramiento genético

Se facilitará la comparación de perfiles moleculares con otras variedades de cacao fino de aroma de otros bancos de germoplasma de cacao en Ecuador , América Latina y el Caribe

