

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades



Obtención de un método de bajo costo basado en
microsatélites para la diferenciación molecular de cacao
(*Theobroma cacao* L.) criollo, forastero y trinitario en Guatemala

Trabajo de graduación en modalidad de tesis presentado por

Ingrid Marie Schrei Godoy

para optar al grado académico de Licenciada en Bioquímica y
Microbiología

Guatemala,
2017

Obtención de un método de bajo costo basado en
microsatélites para la diferenciación molecular de cacao
(*Theobroma cacao* L.) criollo, forastero y trinitario en Guatemala

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades



Obtención de un método de bajo costo basado en
microsatélites para la diferenciación molecular de cacao
(*Theobroma cacao* L.) criollo, forastero y trinitario en Guatemala

Trabajo de graduación en modalidad de tesis presentado por

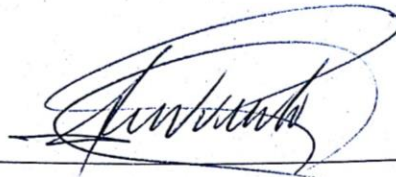
Ingrid Marie Schrei Godoy

para optar al grado académico de Licenciada en Bioquímica y
Microbiología

Guatemala,
2017

Vo. Bo. :

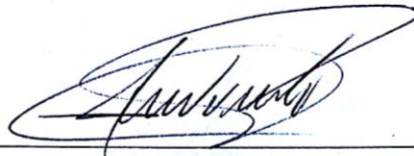
(f)



Andrés Weinfeld Ávalos Figueroa

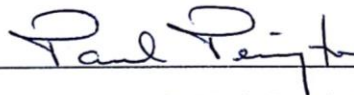
Tribunal Examinador:

(f)



Andrés Weinfeld Ávalos Figueroa

(f)



Pamela Marie Pennington

(f)



Dalia Mei Ling Lau Bonilla

Fecha de aprobación: Guatemala 05 de junio de 2017 /

ÍNDICE

	Página
LISTADO DE CUADROS	xii
LISTADO DE FIGURAS	xiii
RESUMEN	xiv
I. INTRODUCCIÓN	1
A. Antecedentes.....	2
1. Historia del cacao.....	2
2. Características del cacao.....	7
3. Importancia económica del cacao tipo criollo.....	10
4. Marcadores moleculares.....	12
B. Justificación.....	15
C. Objetivos	16
II. MÉTODOS	17
III. RESULTADOS	27
IV. DISCUSIÓN.....	36
V. CONCLUSIONES	40
VI. RECOMENDACIONES	41
VII. LITERATURA CITADA	42
VIII. APÉNDICES	47

LISTADO DE CUADROS

Cuadro 1. Comparación de algunas características importantes de los principales marcadores moleculares utilizados. Los microsatélites presentan, en conjunto, varias ventajas sobre otros marcadores para el fin de determinar variabilidad genética.....	14
Cuadro 2. Componentes de mezcla de reacción de PCR utilizado a lo largo del estudio...	24
Cuadro 3: Condiciones de amplificación de PCR	24
Cuadro 4: Cebadores seleccionados para realizar el estudio.....	27
Cuadro 5: Comparación del rendimiento de ADN obtenido a partir de los protocolos de obtención y almacenamiento de muestra de tejido foliar y extracción de ADN evaluados en el presente estudio, tomando en cuenta el tiempo de almacenamiento del tejido previo a su procesamiento.	30
Cuadro 6: Genotipo detectado para las muestras de referencia de las variedades Criollo, Forastero y Trinitario provistas por CATIE.....	35

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Principales regiones productoras de cacao durante la época precolombina.....	03
Figura 2: Izquierda: Ixcacau, diosa maya del cacao. Derecha: Cabeza del dios del maíz (Hun Hunapú) simulando ser un fruto de cacao, después de su decapitación.....	05
Figura 3. Características morfológicas de los tres tipos principales de cacao.....	09
Figura 4. Valor FOB anual en dólares para la exportación de cacao desde el año 2009 hasta agosto del 2014.....	12
Figura 5: Comparación de los métodos de extracción / almacenamiento de ADN en cuanto a pureza y concentración.....	31
Figura 6. Amplificación de ADN de los marcadores mTcCIR15, 26 y 8 (respectivamente) de nueve muestras aleatorias obtenidas de la finca La Cruz, almacenadas a -80°C durante un día previo a su extracción mediante el método de Doyle y Doyle.....	32
Figura 7. Amplificación de ADN de los marcadores mTcCIR 08, 15 y 26 (respectivamente) de muestras aleatorias (escritas en la parte superior de cada gel) obtenidas de la finca La Cruz, almacenadas en solución de NaCl-CTAB-azida y extraídas mediante el método de Doyle y Doyle.....	33
Figura 8. Visualización de productos de amplificación de muestras de referencia de cacao criollo, forastero y trinitario, extraídas por el método de Kumar Sahu.....	34

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue obtener un método de bajo costo basado en microsatélites para la diferenciación molecular de cacao (*Theobroma cacao* L.) criollo, trinitario y forastero. El uso de este método facilitará la identificación de árboles de cacao tipo criollo de manera rápida y confiable, lo que permitirá a los agricultores seleccionar los individuos que produzcan frutos de mejor calidad. Para esto, se evaluaron 20 marcadores microsatélites en tres muestras cacao de referencia: criollo, forastero y trinitario provistas por el CATIE (Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza) de Costa Rica. También se compararon distintos métodos de conservación de tejido foliar, a partir de muestras obtenidas de la finca “La Cruz” ubicada en Cuyotenango, Suchitepéquez, Guatemala. Se concluyó que el método óptimo para conservar hojas de cacao, ricas en polifenoles y polisacáridos, es en solución de CTAB-NaCl-azida, puesto que preserva la integridad de ADN, facilitando así su amplificación. Asimismo, la presencia de CTAB durante la extracción de ADN también es vital para mantener la muestra libre de polifenoles que pueden interferir con la amplificación mediante PCR. Todos los cebadores utilizados permitieron una efectiva amplificación; sin embargo, no todos resultaron ser polimórficos. A partir de la información obtenida, se determinó que los marcadores mTcCIR3, mTcCIR12 y mTcCIR223 permiten una discriminación adecuada de las variedades de cacao criollo, forastero y trinitario. Se recomienda que en un siguiente estudio se determine la longitud (en pares de bases) de los productos de amplificación de las muestras de la finca La Cruz, y así evaluar la efectividad del estudio en campo para determinar sus genotipos y clasificar los árboles según su variedad.

I. INTRODUCCIÓN

Guatemala forma parte del 5% de las plantaciones mundiales de cacao que cuentan con la variedad de tipo criollo. Esta es la más valiosa a nivel mundial, pues sus semillas son la materia prima para chocolatería fina; es por esto que el cacao de esta variedad es denominado “fino y de aroma”. Sin embargo, la selección de cacao de alta calidad en el país se basa únicamente en sus propiedades morfológicas y organolépticas, y no se tiene un método estandarizado para definir y asegurar la pureza de la variedad dentro de los individuos. Esta carencia de un método confiable para identificar la variedad es lo que impide que Guatemala forme parte de los países exportadores de cacao “fino y de aroma”, denominados por la Organización Internacional de Cacao. El uso de un método molecular para este fin permitiría, por tanto, identificar y seleccionar las variedades presentes en una finca de forma certera, en adición a su clasificación basada en las características morfológicas.

Por tanto, el objetivo de este estudio fue optimizar un método molecular, basado en una reacción de PCR, para facilitar la identificación de tres variedades de cacao. Se evaluaron 18 marcadores microsatélites en dos grupos de muestras: tres muestras de referencia de variedades puras de cacao criollo, trinitario y forastero, y un conjunto de 45 muestras aleatorias obtenidas del campo. En el primer grupo se identificó y comparó el tamaño (en pares de bases) de los alelos amplificados a partir de cada marcador, para así detectar polimorfismos entre las variedades. Estos resultados permitirán la selección de un conjunto mínimo de marcadores microsatélites que permitan distinguir entre las tres variedades. En el segundo grupo solamente se evaluó el método, para verificar la factibilidad de aplicarlo en muestras obtenidas del campo, en Guatemala. Además de la optimización de la reacción de PCR, a lo largo del desarrollo del proyecto se compararon distintos métodos tanto de toma y almacenamiento de muestra, como de extracción de ADN.

A. Antecedentes

1. Historia del cacao

a. Origen y distribución

Hasta la fecha, no se ha llegado a un consenso sobre el centro de origen del cacao. Cheesman (1944) y Portillo *et al.* (2000), por ejemplo, sugieren que el origen del cacao se encuentra en el Amazonas, y que a partir de esto se formaron dos grupos, el cacao tipo criollo, el cual se distribuyó hacia el norte, y los actualmente llamados forasteros, que se encuentran principalmente en países del sur de América (Motamayor *et al.*, 2008). Por otro lado, con base en la variabilidad genética encontrada en el norte de Venezuela se sugiere que este es su sitio de origen (ICCO, 2013). Otros autores consideran que es originario de América Central, principalmente Guatemala y México (Miranda, 1962), dado que es en estos países donde se encuentra el tipo de cacao “criollo” que significa “nativo” de estos países, de donde proviene su nombre.

Según a los relatos mitológicos (descritos posteriormente), se podría asegurar que el sitio de origen es en el que habitaban los mayas, puesto que estos lo consumían y conocían ampliamente desde hace miles de años y es a partir de estos relatos de donde se conoce mucho acerca de la morfología y utilidades del cacao; sin embargo, Motamayor *et al.*, (2002), con base en estudios sobre variabilidad genética en los que compara muestras de árboles de cacao de distintas regiones de América (desde Sudamérica hasta México), determinó que el cacao tipo criollo clasificado como nativo de la región maya es más parecido genéticamente a tipos criollo encontrados en toda la región centroamericana, y existe poca variabilidad genética entre muestras. Esto sugiere, en conjunto con otros estudios, se pudo haber originado en América del Sur y su dispersión hasta América Central fue consecuencia de migraciones y domesticación.

Esta domesticación y explotación del cultivo llevó a la formación de tres principales variedades de cacao, que por algunos son consideradas distintas subespecies (Whitkus *et al.*, 1998). Tras la colonización española, el potencial del fruto fue descubierto y explotado,

de modo que fue adquirido por otras regiones, como el Caribe, para cultivarlo ampliamente y satisfacer la demanda que recientemente había surgido en Europa (Marcano *et al.*, 2006). Dado que el cacao de interés era el tipo criollo, este era el que estaba presente en todos estos países; sin embargo, los cultivos en Trinidad fueron devastados a causa de un desastre natural y la introducción de una nueva variedad proveniente de la selva amazónica baja y su polinización con algunos de los criollos llevó a la formación de una nueva variedad, cacao Trinitario, el cual, aunque no era considerado puro ni de alta calidad, era productivo y se introdujo en regiones de Sudamérica. Esto llevó a cruces entre criollo y trinitario y es por esto que actualmente el cacao tipo “criollo puro” se encuentra únicamente en regiones centroamericanas (Yang *et al.*, 2011).

Aunque en Guatemala actualmente se cultiva cacao tanto en el sur-occidente como en el nor-oriente, durante la época precolombina las regiones productoras principales en Guatemala estaban comprendidas en la región sur-occidental (Suchitepéquez, Reatlhuleu, Quetzaltenango y San Marcos, Figura 1) (Guevara, 2010). Esto sugiere que actualmente el cacao tipo criollo puede ser encontrado en cultivos de esta región.

Figura 1. Principales regiones productoras de cacao durante la época precolombina.



Fuente: ANAKAKAW (2004).

El cacao tipo criollo es el de mayor interés comercial; sin embargo, actualmente por algunos autores se denomina cacao tipo criollo “antiguo” al tipo criollo puro, originario de centro América, y “moderno”, a una mezcla del criollo y trinitario (Marcano *et al.* 2006). Los agricultores buscan siempre escoger los árboles de mejor calidad, que cumplan tanto

con calidad como con productividad, resistencia a enfermedades, entre otros. Sin embargo, este interés de los agricultores ha llevado a una reducción de la variabilidad genética entre los cultivos (Leceteau *et al.*, 1997). Aunque se deben cultivar árboles con las mejores cualidades, es de vital importancia mantener su variabilidad genética, pues esto lleva a una mayor probabilidad de supervivencia de la especie (SIFUPRO, 2010). Un ejemplo del efecto negativo que tuvo esta falta de variabilidad genética en los cultivos se presenta en 1980 en Brasil, donde la enfermedad *Witches' Broom* llevó a la devastación de un cultivo completo de cacao, y en 1930, en Trinidad, el virus *Wollen Shoot* acabó con la industria (Aikokpodion, 2012).

b. Valor cultural del cacao en Guatemala

El cacao, después del maíz, es el cultivo de principal valor en la cultura maya; se tenía una diosa del cacao (Figura 2) y era considerado como el alimento de los dioses, de donde se deriva su nombre científico *Theobroma cacao*. Este fue definido por Carl von Linné en el siglo XVIII (Coe *et al.* 2005) la palabra *Theobroma* tiene una etimología de origen griego, que significa literalmente “alimento de los dioses”, mientras que *cacao* proviene del término “kakaw”, descifrado en 1974 por Loundsbury a partir del códice maya Dresde, en el cual observó jeroglíficos de dioses sosteniendo frutos y semillas de cacao (McNeil, 2006). A diferencia del papel del maíz en la civilización maya, los escritos sobre la mitología y los orígenes del cacao son limitados, aunque ambas mitologías están íntimamente relacionadas y en un punto convergen.

Como es de amplio conocimiento, en el Popol Vuh se relata que, según la cosmovisión maya, los hombres eran de maíz y estaban hechos para dar alimento a los dioses (Bellini, 2003), y se cree que el cacao era su principal alimento. Entre los códices y esculturas mayas es frecuente encontrar figuras representando a dioses sosteniendo un fruto de cacao, vasijas similares a las que se utilizaban para beberlo, e incluso existen varias representaciones de un árbol de cacao personificado en el dios del maíz (McNeil, 2006), en la que se observan frutos de cacao en sus extremidades y una piel con corteza de árbol, de modo que se refleja claramente la importancia del cacao en la cultura maya.

Según los relatos, recopilados por Gutiérrez (1991), el dios del maíz fue decapitado como sacrificio, y su cabeza fue colocada en un árbol de cacao, simulando ser uno de sus frutos (Figura 2) (Thompson, 2004). Esto llevó a que el árbol del cacao formara directamente parte del dios del maíz, de principal importancia en esta mitología. Se dice que cuando este dios (Hun Huhnapú) fue atrapado por demonios y llevado al inframundo, quiso permanecer con su pueblo, y su forma de hacerlo fue reencarnándose en el cacao. Es desde este momento en el que el fruto del cacao pasa a tener un valor muy alto, pues poseerlo equivalía a tener una pieza sagrada. (McNeil, 2006);

Figura 2. Izquierda: Ixcacau, diosa maya del cacao. Derecha: Cabeza del dios del maíz (Hun Hunapú) simulando ser un fruto de cacao, después de su decapitación.



Fue a partir de este punto en el que se comenzó a utilizar la semilla de cacao como elemento de trueque, convirtiéndose en la principal moneda entre los mayas. Por otro lado, se cree que el uso de las semillas de cacao como monedas fue establecido por Hernán Cortés cuando llegó a las tierras mayas y las monedas que él poseía no eran suficientes o no tenían el suficiente valor para pagar a sus soldados (Aranda, 2005). Es por esto que, cuando vio el alto valor que daban los mayas a estas semillas, decidió tomarlos como moneda para pagarles. A partir de esto, los españoles consideraban a estas semillas tan valiosas como el oro, según indica el cronista Fernández de Oviedo (Martínez, 1997), y esta era la forma de pago de los españoles a sus trabajadores; por ejemplo, en las Leyes de Indias, promulgadas

por los monarcas españoles (Horcasitas, 1974), estaba establecido que el pago consistía en 25 semillas por día de trabajo. Para tener una idea sobre el valor monetario que tenía el cacao, Aranda (2005) reporta que en el siglo XVI, un conejo equivalía a 10 semillas, a un esclavo se le pagaba con, y 2 zapotes equivalían a 1 semilla; a finales del siglo XVI, un real era equivalente a alrededor de 100 semillas.

Las semillas del cacao como principal moneda permaneció hasta mediados del siglo XIX (Thompson, 2004), aunque se cree que su uso como tal llegó hasta inicios del siglo XX. Según Lara (2005) el uso de una semilla como moneda permitía mantener los precios de forma estable, puesto que, si se tenía una producción muy alta de estas semillas, estas no eran destinadas al trueque, sino que los productores aprovechaban la ocasión para procesarlo y consumirlo como bebida en ceremonias. Esto refleja la característica cultura maya, en la que no se tenían gastos superfluos, más que los necesarios para rendir culto a los dioses (UNAM, 2005).

La preparación de cacao en forma de bebida fue llevada a cabo inicialmente por los mayas; esta consistía en moler los granos del cacao después de haber removido su corteza, para obtener así el llamado “licor de cacao” (Fins, 2013). A partir de algunos jeroglíficos también se pudo determinar la utilización de maíz como uno de los ingredientes para esta bebida; este se agregaba como forma de atol y se agitaban ambos componentes hasta generar una espuma, y esta era una bebida “privilegiada” cuyos únicos consumidores formaban parte de la élite mayor y, algunos consideran que también era consumida por soldados durante las guerras (Nájera, 2012). Dado que era considerada una bebida tan exclusiva y privilegiada, comenzó a utilizarse en ceremonias, principalmente en casamientos, y se cree que desde ahí comienza la relación entre el chocolate y el romance (World Cocoa Foundation, 2014).

2. Características del cacao

a. Morfología

El árbol del cacao es perteneciente a la familia Steriliaceae (EOL, 2012). Esta está conformada por árboles o arbustos leñosos y floreados, con hojas alternadas y flores generalmente actinomorfas, y pueden ser tanto bisexuales como unisexuales (Carr, 2013). Las características morfológicas generales del árbol (sin distinguir entre variedades) son: hojas alternadas, lisas y de ápice agudo; cojines florales desde 14-48 flores (Somarriva, *et al.*, 2010) directamente en el tronco, que consisten en 5 sépalos de color rosado y 5 pétalos amarillentos. Los frutos y semillas son los que presentan las principales diferencias entre variedades. El tamaño del fruto permanece en un rango desde 25-30 centímetros de largo, por alrededor de 10 cm de diámetro (Phillips-More *et al.*, 2012) y la coloración difiere entre cada variedad (descrito más adelante). El número de semillas también es variable entre cada tipo, desde 15-40; son estas las que contienen el valor principal de esta planta. La mayor parte de esta semilla está conformada por la llamada manteca de cacao, que es lo que da la principal materia prima para la producción de cacao (Minifie, 1989).

El cacao es una planta diploide, cuyo genoma consta de 390Mb (Couch *et al.*, 1993), distribuidas en diez pares de cromosomas. Respecto a su reproducción, según Montenegro (2007), la polinización por insectos es limitada, dado que los estambres no están totalmente descubiertos. CONABIO (1998) indica que en el 95% de los casos se da una polinización cruzada y en el 75% existe auto-incompatibilidad. Por otro lado, SIFUPRO (2010) indica que la polinización puede ser tanto autógena como alógama, y N'Goran (1994) sugiere que el entrecruzamiento de especies descrito anteriormente se debe a la auto-incompatibilidad en los organismos de tipo silvestre, a diferencia de los autocompatibles que generalmente se encuentran en las fincas, y esto causa nuevamente un efecto negativo en la variabilidad genética.

b. Propagación

Entre los insectos asociados a su polinización se encuentran pulgones, moscas y hormigas (EOL, 2012) pero, principalmente por *Forcipomyia spp.*, los cuales se movilizan en un área limitada, de alrededor de 10 metros (Somarriba, 2010). La flor es fértil después de 30 días, y si no es polinizada en los siguientes dos días, se marchita; la fertilización se lleva a cabo 36 horas después de la polinización, y se puede determinar que esta se llevó a cabo cuando se caen los pétalos y sépalos de la flor y se marchita el pistilo. El fruto se termina de formar después de 150-180 días de la fertilización; se puede observar una elongación y un posterior ensanchamiento (EOL, 2012).

Tradicionalmente, la propagación del cacao se da por medio de la siembra de sus semillas; se cree que la mayoría de los cultivos establecidos desde su domesticación se han establecido de esta manera (Miller, 2009). Sin embargo, con el fin de llevar a cabo un mejoramiento genético del cultivo que permita generar un árbol con características de interés (alta productividad o resistencia a enfermedades, por ejemplo), actualmente el método más utilizado para propagación de cacao es por injertos. Esta consiste en unir una yema de la planta de interés a un árbol patrón, 5 meses después de haberlo cultivado por semillas. Este debe ser seleccionado principalmente en base a su adaptabilidad al suelo y resistencia a enfermedades. La yema, por otro lado, proviene del árbol de interés, ya sea por su alta productividad o por la calidad de sus frutos; el método consiste básicamente en realizar un corte transversal al tronco del patrón e insertar el injerto, y permanece envuelta con una cinta plástica durante 20 días (Ramos y Gómez, 2002; Fhia, 2005).

3. Variedades de cacao

Las características morfológicas del fruto según cada variedad (criollo, trinitario y forastero) se presentan en la Figura 3. A pesar de que se han definido más variedades como producto de híbridos, estas continúan siendo las principales. La diferencia entre la morfología de las flores no permite distinguir entre las variedades, por lo que se usa principalmente el fruto para este fin. En el Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE) se tiene una colección de cacaos de referencia de las distintas

variedades, así como el catálogo de estos clones, donde se especifican tanto características florales como de la semilla y el fruto completo. Los frutos entre estas principales variedades se distinguen según la siguiente figura.

El de tipo criollo se caracteriza por tener surcos profundos, mesocarpio corrugado y ápice muy agudo, y el fruto maduro es de coloración amarilla / roja; sus semillas, por otro lado, son alargadas, de color blanco o blanquecinas. El de tipo forastero tiene una superficie más lisa y menos estriada, de color amarillo, suele ser más ancho y redondeado, con semillas aplanadas y largas. Por otro lado, el fruto del cacao de tipo trinitario, dado que es un cruce entre los dos anteriores, puede ser de color amarillo o rojo, superficie corrugada, ancho (a comparación de criollo) y sus semillas pueden ser tanto redondeadas o alargadas (Phillips-Mora *et al.*, 2012).

Figura 3. Características morfológicas de los tres tipos principales de cacao: criollo (sup. Izq.): el fruto puede ser tanto rojo como amarillo; forastero (sup. Der.): se presenta tanto el fruto inmaduro (izq.) como maduro (der.); y trinitario (inf.): el fruto maduro puede tener cualquiera de las dos coloraciones. Las semillas que se presentan adquieren esa coloración tras el proceso de fermentación y secado.



Fuente: McGregor (2013)

3. Importancia económica del cacao tipo criollo

a. Valor del cacao tipo criollo en el mundo

Como se mencionó anteriormente, el cultivo de cacao tipo criollo puro es el de principal interés. A pesar de que no es el más productivo ni resistente a enfermedades al comparar con las otras variedades, el cacao tipo criollo es considerado el de mejor calidad debido al sabor obtenido a partir de sus semillas. Tanto el criollo como el trinitario son llamados “cacao fino y de aroma”, denominación brindada por la Organización Internacional del Cacao (ICCO) (ICCO, 2012) mientras que el cacao de tipo forastero recibe la nominación de “cacao ordinario”, cuyo precio y valor es significativamente menor. Los países productores de cacao fino y de aroma deben ser reconocidos como tales por la ICCO, y actualmente son 17, de los cuales la mayoría se encuentran geográficamente entre México y el norte de Sudamérica (González, 2007); otros forman parte del continente africano.

El cacao fino y de aroma constituye apenas el 5-8% de la producción mundial de cacao (González, 2007), aunque otras estadísticas sugieren que el cacao tipo criollo “moderno” (que, como se mencionó anteriormente, consiste en una mezcla entre criollo y trinitario) forma el 70% de los cultivos totales alrededor del mundo (Marcano *et al.*, 2006). Esto sugiere la dificultad para encontrar muestras de cacao criollo y/o trinitario puro, dado principalmente a que sus características morfológicas son muy similares. Es por esto que los cultivos denominados fino y de aroma deben estar certificados, y la verificación de su pureza se realiza año con año, mediante técnicas moleculares (Kaufman, 2012).

Es importante mencionar que Guatemala no forma parte de estos 17 países certificados, aun cuando se considera que fue este país el que dio origen a la explotación del cacao desde los inicios de su civilización. Para el 2003, según el Instituto Nacional de Estadística (INE) el país contaba con 1,972 fincas, dentro de las cuales existen variedades puras, pero parecen no ser explotadas. Aunque se tengan estos cultivos dentro de las fincas, generalmente no se encuentran aisladas y esto lleva a la formación de nuevas variedades a causa de la polinización. Además, los mismos agricultores actualmente identifican los

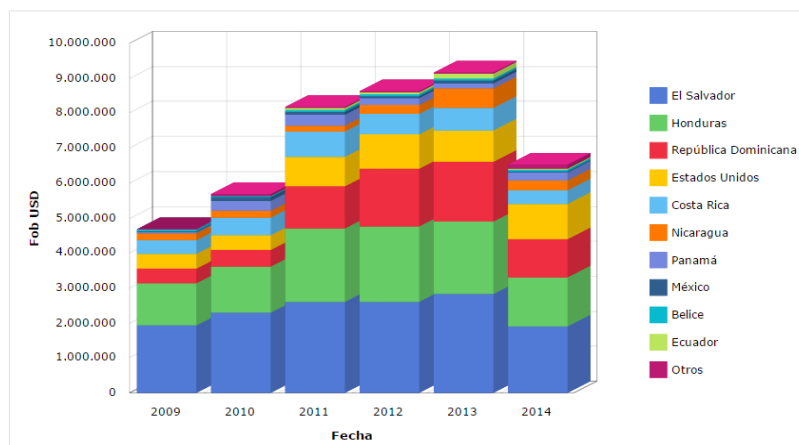
árboles “acriollados” según su fenotipo, no utilizan otros métodos para esto. Es por esto que Guatemala, a pesar de tener el potencial de ser un exportador del cacao de más alta calidad, no lo es y este solamente es procesado de forma artesanal (Palacios, 2006) y la materia prima es distribuida únicamente dentro del país.

b. Exportaciones desde Guatemala

En muchas ocasiones, distintas organizaciones han tratado de desarrollar estrategias para fomentar y explotar el potencial de Guatemala como un país productor de cacao. Tal es el caso de la organización “cluster del cacao”, que contaba con el apoyo del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza CATIE y el Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura, formado en 2006 con el objetivo de fomentar el interés por el cultivo. Otro proyecto, propuesto en conjunto por el Ministerio de Agricultura Ganadería y Alimentación (MAGA) y la Asociación Guatemalteca de Exportadores (AGEXPORT) llamado “Salvemos al Cacao” esperaba recuperar el valor de estas semillas; en 2004 se fundó ANAKAKAW (Asociación Nacional del Kakaw) con el fin de “convertir al cacao en un sector productivo reconocido mundialmente por la calidad de sus productos finales” (ANAKAKAW, 2008), entre varias otras organizaciones. Aunque no todas continúan siendo funcionales, sí se ha visto un aumento en la producción de cacao en los últimos años. El Banco Centroamericano de Integración Económica BCIE (2009) reportó un incremento de 800 a 1,350 TM, desde el 2001 al 2009, respectivamente. Además, en la figura 4 se presenta el incremento en dólares en las exportaciones de cacao desde el 2009 hasta el presente.

Esto refleja la efectividad de las iniciativas para explotar la producción de cacao en Guatemala, lo cual lleva a una mejora en la economía. Una explotación específicamente del cacao tipo criollo aumentaría el valor de estas exportaciones, y es por esto que en 2013, según un artículo publicado en Prensa Libre (2013), Mynor Otzoy Rosales, junto con su equipo de investigación, llevó a cabo un proyecto con el fin de generar un jardín clonal de cacao criollo en Cuyotenango, Suchitepéquez; sin embargo, no se logró acceder a la publicación original.

Figura 4. Valor FOB¹ anual en dólares para la exportación de cacao desde el año 2009 hasta agosto del 2014, a los países indicados en la leyenda.



Fuente: NCE (2014)

4. Marcadores moleculares como técnica de identificación de variedades de cacao

a. Importancia del uso de una técnica molecular para identificar variedades

La detección de los árboles de cacao de interés determinadas de forma empírica es muy limitante y variable, dado que estas propiedades pueden depender de características ambientales; es por esto que se requiere un método que permita determinar sus características genéticas. El material genético del cacao a pesar de pertenecer a la misma especie (*Theobroma cacao*) difiere. Entre individuos de la misma variedad, también se encuentran diferencias; debido a recombinaciones aleatorias del material genético, nunca se obtiene una secuencia exactamente idéntica. Las características fenotípicas o morfológicas de un organismo están dadas por su material genético, y es por esto que, aunque tanto el cacao tipo criollo como el trinitario y forastero, a pesar de pertenecer a la misma especie, poseen características morfológicas tan características. Además, en el material genético se puede determinar si un árbol de cacao posee solamente características

¹ FOB: Free on Board, se refiere al valor del producto sin tomar en cuenta los costos por transporte.

genéticas propias de un cacao tipo criollo, por ejemplo, o si contiene genes o partes del genoma de otra variedad, características que en algunos casos no pueden ser detectadas en base a sus características morfológicas. Es por esto que el uso de marcadores moleculares para determinar diferencias entre organismos de una misma población, o variedades de la misma especie se ha adoptado como una de las herramientas más efectivas para este fin.

Los marcadores moleculares consisten en segmentos específicos de ADN cuya secuencia difiere entre organismos (incluso de una misma población); llamadas, por tanto, secuencias polimórficas (Jiang, 2013). Anteriormente, se utilizaban isoenzimas para este fin, método que consistía en la identificación, mediante tinciones, de proteínas obtenidas de distintos individuos, que tuvieran la misma función, pero una movilidad electroforética distinta debido a un cambio en su conformación, reflejando así una secuencia de aminoácidos distinta (McClellan, 1998a) y McClellan, 1998b). Es una técnica indirecta para la detección de variación en el genoma; esta fue utilizada en algunos estudios (Warren, 1994; Ronning & Schnell, 1994) para determinar diversidad genética en cacao (Aikokpodion, 2012).

Sin embargo, debido a que las limitaciones de este método, principalmente el bajo número de marcadores que proporciona (Cornell University, 2003), actualmente se utilizan marcadores de ADN para estudios sobre diversidad genética de poblaciones o, en el caso de agronomía y semillas, para verificar la pureza de estas. Estos han sido ampliamente utilizados en cacao, principalmente para determinar diversidad genética. Entre estos se encuentran los polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLPs) (Motamayor *et al.*, 2002; Lerceteau *et al.*, 1997; N’Goran *et al.*, 2000), ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD), el cual ha permitido, además de determinar diversidad genética y relación entre poblaciones (N’Goran *et al.*, 1994, Russell *et al.*, 1993) distinguir genéticamente tanto entre organismos de distinta variedad, como entre clones criollos (Lerceteau *et al.*, 1997), microsátélites (SSR), utilizados ampliamente para determinar diversidad genética, identificar variedades y control de calidad para verificar pureza de las semillas (Cryer *et al.*, 2006; Aragón, 2009; Lambert *et al.*, 2009; Motilal *et al.*, 2010; Motamayor *et al.*, 2002, 2008) y polimorfismos de nucleótidos únicos (SNP). Tras la

publicación de su genoma (Argout *et al.* 2011) se han comenzado a utilizar SNPs para determinar diversidad genética e identificar germoplasmas de cacao (Takrama *et al.*, 2014; Irish *et al.*, 2014). Un mapa del genoma, en donde se pueden determinar las regiones específicas de todos estos marcadores está disponible en <http://cocoagendb.cirad.fr/gbrowse/cgi-bin/gbrowse/theobroma/>.

b. Marcadores microsatélites (SSR)

Los marcadores microsatélites han sido los más utilizados para estudios en cacao. Hasta la fecha, han sido reportados más de 500 marcadores microsatélites para esta especie (Lanaud *et al.*, 1999; Pugh *et al.*, 2004; Fouet *et al.*, 2011; Santos *et al.*, 2012), además de microsatélites del cloroplasto (Yang *et al.*, 2011). Los marcadores microsatélites consisten en repeticiones de pequeñas secuencias de 2 a 10 pares de bases de ADN (UAGC, 2012), y es esto lo que permite identificar fácilmente la variabilidad genética entre un grupo de organismos. Para esto, se diseña una secuencia de oligonucleótidos que se encuentre en regiones que flanqueen la región del microsatélite, y este sirve como cebador para amplificar esta región fácilmente mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Dado que el número de repeticiones varía ampliamente entre organismos, incluso hasta en cien pares de bases, es fácil de visualizar estas diferencias en un gel de agarosa; por otro lado, también pueden diferir solo entre dos pares de bases, lo cual es también perfectamente factible de visualizar en un gel de poliacrilamida (White & Kusukawa, 1997). Otra de las ventajas de estos marcadores es que permiten determinar heterocigocidad, característica denominada codominancia. En el Cuadro 1 se comparan algunas de las características de los marcadores mencionados.

Cuadro 1. Comparación de algunas características importantes de los principales marcadores moleculares utilizados. Los microsatélites presentan varias ventajas sobre otros marcadores.

Marcador	Variabilidad	Herencia	Reproducibilidad	Costo
RFLP	Media	Codominante	Alta	Medio
RAPD	Alta	Dominante	Baja	Bajo
AFLP	Alta	Dominante	Media	Medio
SNP	Alta	Codominante	Alta	Alto
Microsatélites	Alta	Codominante	Alta	Medio

Adaptado de Astorga (2008).

B. Justificación

La semilla del cacao (*Theobroma cacao* L.) de variedad criollo tiene un gran valor a nivel mundial, tanto por su calidad (denominado como “cacao fino y de aroma”) como por su dificultad para conseguirla, puesto que los cruces entre distintas variedades han llevado a lo largo de la historia a una reducción de los cultivos puros. Guatemala forma parte del 5% de plantaciones de cacao alrededor del mundo que cuentan con la variedad de tipo criollo. Sin embargo, en la mayoría de las fincas, estos han formado híbridos con forastero y trinitario. Estas dos variedades tienen alta productividad, pero el sabor del chocolate obtenido a partir de sus frutos tiene una baja calidad. Es por esto que las variedades híbridas son denominadas “ordinarias”, y no son las elegidas por los comerciantes. Actualmente, los agricultores se basan en características morfológicas para clasificar a los individuos como “criollo”, pero estas características no permiten garantizar que sea una variedad pura. En Guatemala no se cuenta con una técnica como respaldo que asegure su pureza. Es por esto que, a pesar de que Guatemala es un potencial exportador de cacao tipo criollo, no está reconocido por la Organización Internacional del Cacao como un país productor de cacao fino y de aroma.

Esto ha llevado a varias organizaciones e instituciones a tomar una iniciativa que permita explotar el potencial que tiene el cultivo de cacao en Guatemala, tanto para los agricultores como para la economía y posicionamiento del país. Entre estas se encuentra la organización “Cluster del cacao” establecida en 2006, el proyecto “Salvemos al Cacao” propuesto por Agexport y el MAGA, y la fundación ANAKAKAW, establecida en el año 2004. El nivel de exportaciones ha incrementado estos últimos años, pasando de USD 5.5 mil en 2010 a más de USD 12.5 mil actualmente (según el Ministerio de Agricultura y Ganadería de Guatemala); sin embargo, es importante implementar un programa de selección de los mejores cultivos de cacao en Guatemala, y cultivar cacao criollo puro, lo cual convertiría al país no solo en un en el productor de la mejor calidad de cacao.

Es por esto que es importante establecer una estrategia o una metodología que permita, en base a una referencia, identificar con certeza los árboles que produzcan la mejor

calidad de semillas, no solo según sus propiedades organolépticas o su morfología, sino en base a sus características genéticas. Una metodología en base a marcadores genéticos permitirá determinar de forma inequívoca a los individuos de tipo criollo. A partir de esto, podrá posteriormente establecerse un jardín clonal o destinar a cada finca un área específica para cacao “fino y de aroma” que se aisle a modo de evitar la formación de híbridos. Esto permitirá que sea producido en abundancia y vendido a un precio mucho mayor, mejorando así la calidad de cada finca y, con ello, la economía del país.

C. Objetivos

1. Objetivo general:

Optimizar un método molecular para la efectiva distinción de variedades de cacao criollo, forastero y trinitario.

2. Objetivos específicos:

- Generar un perfil genético de muestras de referencia de cacao criollo, forastero y trinitario mediante marcadores microsatélites.
- Seleccionar un conjunto mínimo de marcadores microsatélites que permitan discriminar entre las variedades de cacao criollo, forastero y trinitario.
- Optimizar una única receta y programa de PCR para amplificar el conjunto de marcadores seleccionados.
- Evaluar la aplicabilidad del método en individuos de cacao cultivados en Guatemala.

II. MÉTODOS

A. Selección de marcadores

Se realizó una extensa búsqueda de literatura (Motilal *et al.*, 2010; Marcano *et al.*, 2006; Motamayor *et al.*, 2013; Motamayor *et al.*, 2002; Aragón, 2009; Bruno *et al.*, 2008; Sereno *et al.*, 2006; Cryer *et al.*, 2006; Schnell *et al.*, 2005; Lambert *et al.*, 2009; Motamayor *et al.*, 2013; Aikokpodium *et al.*, 2009; Pugh *et al.*, 2004; Santos *et al.*, 2012, Ávalos *et al.*, 2012; Saunders *et al.*, 2004) en la que se evidencia el uso de marcadores microsatélites en análisis genético de cacao. Los marcadores analizados en las publicaciones estudiadas se evaluaron con base en varios criterios:

1. Nivel polimórfico: Se seleccionaron marcadores que en los diversos estudios tuvieran un PIC (contenido de información de polimorfismo) mayor a 0.5. Según Zhi-Peng *et al.* (2007), este valor indica que el locus evaluado es considerado altamente polimórfico, mientras que un valor entre 0.25 y 0.5 indica un polimorfismo medio.
2. Facilidad de amplificación mediante PCR punto final: Se descartaron los marcadores que, según la literatura evaluada, a pesar de haber sido clasificados como altamente polimórficos, presentaran dificultad, o requirieran condiciones especiales, para ser amplificados en la mayoría de muestras.
3. Ubicación genómica: Se seleccionaron dos marcadores por cada uno de los diez cromosomas (20 marcadores en total). Para esto se consultó el mapa de ligamiento del genoma de cacao publicado por Fouet *et al.* (2011).
4. Temperatura de anillamiento similar: Se seleccionaron marcadores que tuvieran una temperatura de anillamiento similar para facilitar su amplificación en conjunto.
5. Motivos mayores a dos pares de bases: En la medida de lo posible, se seleccionaron marcadores cuyos motivos fueran mayores a dos pares de bases para asegurar la detección de polimorfismos (McLever, *et al.* 2011).

B. Obtención y almacenamiento de muestras

1. Muestras de referencia del CATIE

Las muestras de referencia de las variedades de cacao criollo, forastero, y trinitario puro fueron provistas por cortesía del CATIE (Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza) de Costa Rica. Para su envío, estas fueron desecadas siguiendo un procedimiento estándar no descrito. Las muestras recibidas y analizadas en este estudio fueron: “Yucatan *greenhouse*” (criollo), “IMC-67 árbol 1” (forastero) y “UF-613 árbol 1” (trinitario), de la finca “La Montaña” del CATIE, Turrialba, Costa Rica.

2. Muestras cultivadas

Dentro de la finca La Cruz, Cuyotenango, Suchitepéquez, Guatemala, se seleccionaron al azar muestras que cumplieran con las características morfológicas de las tres variedades de cacao (criollo, forastero y trinitario, descritas en la sección *I.B.3* de la introducción). Se realizaron dos visitas a la finca. En la primera se seleccionaron 47 individuos a modo de evaluar la metodología de toma y almacenamiento de muestra *II.B.2.1* (descrita a continuación). En la segunda, se seleccionaron 45 individuos y se siguió la metodología descrita en la sección *II.B.2.2*.

Las dos metodologías evaluadas fueron las siguientes:

a. Hojas completas mantenidas en refrigeración

Durante la primera visita a la finca se siguió el siguiente protocolo:

- Seleccionar una hoja joven (color verde claro y textura suave) de cada árbol a muestrear.
- Cortarla con tijeras de podar pequeñas previamente desinfectadas con una hoja de papel mayordomo humedecida con alcohol etílico al 70%
- Colocarla dentro de una bolsa *ziploc* e identificarla con un número
- Amarrar una cinta con este mismo número al árbol del cual se tomó la muestra
- Colocar la bolsa *ziploc* con la muestra dentro de una bolsa grande que facilite el transporte de todas las muestras durante el resto del recorrido

- Al terminar el recorrido, colocar las muestras en refrigeración (4°C)
- Mantenerlas dentro de una hielera a alrededor de 4°C durante el transporte
- Al regresar al laboratorio, introducirlas dentro de un cuarto frío a 4°C durante el tiempo previo a su procesamiento.
- No más de 24 horas después de la toma de muestras, cortar alrededor de 4-5 discos de las hojas utilizando un tubo Eppendorf de 1.5 ml. Mantener el tejido dentro del tubo a una temperatura de 4 °C. Trabajar en cuadruplicado.
- Almacenar las muestras a 4°C durante la noche.

El siguiente día, macerar el tejido de la siguiente forma:

*Mientras los tubos no estén siendo procesados, deben permanecer siempre dentro de hielo.

- Con la ayuda de unas pinzas, introducir cada tubo abierto dentro de un termo con nitrógeno líquido
- Mantenerlas dentro del nitrógeno por alrededor de 30 segundos
- Con un pistilo de polipropileno previamente esterilizado, macerar los discos de hoja que estén congelados dentro del tubo
- Almacenar las muestras que se tomaron como réplica a -80 °C.
- Continuar con la sección *II.C.2* para la extracción de ADN.

Tras evaluar los resultados, durante la segunda visita a la finca se siguió el siguiente protocolo, establecido por Vázquez-Ovando *et al.* (2014) y Battarchajee *et al.*, 2004) para toma y almacenamiento de muestras:

b. Solución NaCl-CTAB-azida

1) Preparación de la solución

Se prepararon 45 ml de solución de almacenamiento NaCl (35% p/v) – CTAB (1.5% p/v) – azida (0.02% p/v) de la siguiente manera:

- Agregar 15.75 g de NaCl a un *beaker* de 100 ml. Aplicando temperatura y agitación, disolver lo más que se pueda en 30 ml de agua destilada. Dado que es una solución saturada, no se disolverá la sal por completo.
 - Cuando quede alrededor de 1 cm de NaCl precipitado, agregar lentamente a la solución 0.675 g de CTAB, y 0.009 g de azida.
 - Aforar a 45 ml.
 - Continuar con la agitación y temperatura hasta disolver y observar una solución altamente viscosa (como miel o aceite de motor, según lo describe Wolf (2002)). Esto puede tomar varias horas.
 - Esterilizar en autoclave a 121 °C por 15 minutos.
 - Esperar a que alcance una temperatura de alrededor de 40 °C para transferir a los tubos de toma de muestra.
- *Dada la alta viscosidad de la solución es necesario cortar, con tijeras previamente desinfectadas con alcohol etílico al 70%, la parte inferior de la punta de micropipeta (1000 µl) a utilizar.
- Asegurarse de mezclar nuevamente la sal precipitada en la solución antes de transferirla a los tubos de toma de muestra.
 - Con la pipeta, transferir 1000 µl de la solución a 40 tubos Eppendorf de 1.5 ml.
 - Almacenar los tubos 4 °C o temperatura ambiente.

2) Toma de muestra:

- Seleccionar una hoja joven (color verde claro y textura suave) del árbol seleccionado para muestra (según características en sección *I.B.3*).
- Limpiarla de ambos lados utilizando una toalla de papel humedecida con agua, seguido de una con alcohol etílico al 70%.
- Identificar las secciones más íntegras y limpias de la hoja.
- Con un tubo Eppendorf de 1.5 ml que contenga 1 ml de la solución de almacenamiento, prensar el tubo con la tapa, de modo que al cerrarlo, un disco de la hoja quede dentro de él. Si es necesario, para asegurarse de que el disco quede dentro de la solución, empujarlo con un palillo de madera limpio.

- Para realizar una sola extracción de ADN de ese individuo, repetir el paso anterior tres veces más. Para poder almacenar una réplica, tomar un total de 8 a 10 discos.
- Marcar el árbol muestreado con una cinta marcada con un número; identificar el tubo Eppendorf con este mismo número.
- Mantener las muestras a temperatura ambiente por no más de dos semanas. Para almacenarlas por un tiempo mayor, mantenerlas a 4°C. En este caso, se mantuvieron a 4°C durante 4 días previo a su procesamiento.

C. Extracción de ADN

Se extrajo ADN de un total de cuatro conjuntos de muestras:

- a. Las 3 hojas de referencia (IMC-67, UF-613 y Yucatán *greenhouse*) desecadas, provistas por CATIE.
- b. Tejido macerado del conjunto de 47 muestras de la finca “La Cruz” obtenidas siguiendo el método *II.B.2.1* (hojas completas, mantenidas en refrigeración) tras un día de almacenamiento a -80 °C.
- c. El tejido macerado de las mismas 47 muestras tras un mes y medio de almacenamiento a -80 °C
- d. Nuevo conjunto de 45 muestras de la finca “La Cruz” obtenidas y almacenadas siguiendo el método *II.B.2.2* (solución NaCl-CTAB-azida).

* Para muestras desecadas (conjunto *II.C.a.*) y muestras almacenadas en solución NaCl-CTAB-azida (conjunto *II.C.d*), se comenzó la extracción siguiendo la metodología descrita en la sección *II.C.1*. Para el resto de conjuntos de muestras, ya maceradas previo a su almacenamiento, se comenzó extracción en sección *II.C.2*.

1. Maceración del tejido vegetal

- En el caso de las muestras de tejido seco, cortar la hoja a utilizar en fragmentos de alrededor de 5 x 5 mm utilizando una cuchilla estéril, hasta obtener alrededor de 0.5 g de tejido.

- Para muestras almacenadas en forma de discos dentro de solución, con la ayuda de pinzas previamente desinfectadas con alcohol etílico al 70%, extraer 4 discos de tejido foliar del tubo con solución de almacenamiento. Colocarlas entre dos toallas de papel para cuidadosamente secar cualquier exceso de solución.
- Con las pinzas, introducir los discos (o fragmentos) de tejido en un nuevo tubo Eppendorf de 1.5 ml, debidamente rotulado.
- Utilizar unas pinzas de mayor tamaño para sostener el nuevo tubo con el tejido e introducirlo dentro de nitrógeno líquido por alrededor de 30 segundos.
- Sacarlo del nitrógeno e inmediatamente macerar la muestra con un pistilo de polipropileno previamente esterilizado.
- Colocar la muestra macerada dentro de hielo. No cerrar los tubos hasta que la muestra se haya atemperado en el hielo.

2. Protocolo de extracción de ADN, modificado de Doyle y Doyle (1962) por Laboratorio de Protección Vegetal de la Universidad del Valle de Guatemala:

*Es importante mantener las muestras dentro de hielo en todo momento, a no ser que se indique lo contrario.

- A cada tubo con tejido macerado, agregar 600 µl de buffer CTAB precalentado a 65°C.
- Agitar con vortex cada tubo para asegurar que todo el tejido haya entrado en contacto con la solución.
- Incubar a 55° C por 30 minutos con agitación constante.
- Después de dejar enfriar las muestras por 5 minutos a temperatura ambiente, agregar 500 µl de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1).
- Centrifugar a 13 krpm y 4 °C por 10 minutos.
- Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo sin tocar la interfase.
- Agregar 500 µl de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1).
- Centrifugar a 13 krpm y 4 °C por 10 minutos.
- Transferir sobrenadante a un nuevo tubo sin tocar la interfase. Agregar aproximadamente 1 volumen de isopropanol frío y 1/10 del volumen de acetato de amonio 7.5 M.
- Mezclar por inversión.

- Incubar a -20 °C por al menos una noche.
- Centrifugar a 13 krpm y 4 °C por 10 minutos.
- Descartar sobrenadante.
- Lavar pellet con 200 µl de etanol al 70% frío y centrifugar nuevamente a 13 krpm y 4 °C por 5 minutos.
- Descartar sobrenadante y dejar secar el *pellet*.
- Resuspender el pellet en 50 µl de buffer TE precalentado a 50 °C.
- Almacenar el ADN a 4 °C hasta su posterior uso.

3. Extracción de ADN por el método de Kumar Sahu (2012):

Tras evaluar los resultados, se extrajo nuevamente ADN de las muestras de tejido desecado (IMC-67, UF-613 y Yucatán *greenhouse*), siguiendo el mismo protocolo establecido por Kumar Sahu, *et al.* (2012). El ADN obtenido fue almacenado a 4° C.

D. Cuantificación de ADN

Se cuantificaron todas las muestras de ADN mediante espectrofotometría. Se diluyeron 5 µl de ADN en 495 µl de agua destilada, y se midió absorbancia a 260, 280 y 320 nm. Se calculó la concentración de cada muestra mediante la fórmula: $[\text{ng}/\mu\text{l}] = (A_{260} - A_{320}) \times \text{factor de conversión (50 ng}/\mu\text{l}) \times \text{factor de dilución (100)}$.

E. Amplificación de ADN

Mediante un PCR en modalidad *touchdown*, se amplificaron los 20 marcadores microsatélites seleccionados según la sección *II.A*. La reacción y condiciones de amplificación se basaron en las establecidas por Sereno *et al.*, (2006), y fueron modificadas durante el estudio hasta establecer el protocolo presentado en el siguiente cuadro:

Cuadro 2. Componentes de mezcla de reacción de PCR utilizado a lo largo del estudio.

Componente	Conc. inicial	Conc. Final	Vol. (ul)
Agua destilada estéril	--	--	13.8
Buffer PCR Novagen	10 X	1 X	2.5
Cloruro de Magnesio MgCl ₂	25 mM	1.5 mM	1.5
dNTPs	2.5 mM	0.2 mM	1
primer <i>Forward</i>	5 uM	0.4 uM	2
primer <i>Reverse</i>	5 uM	0.4 uM	2
Taq Polimerasa	5 U/ul	1 U	0.2
ADN	20 ng/ul	-	2
Volumen total:		25 ul	

Las condiciones de amplificación del PCR *touchdown* se resumen en el siguiente cuadro:

Cuadro 3. Condiciones de amplificación de PCR

Paso	Repeticiones	Temperatura	Tiempo
1	-	94 °C	4'
2	x10	94 °C	40''
		60 – 50 °C (-1 °C / ciclo)	40 ''
		72 °C	1'
3	x20	94 °C	40''
		50 °C	40''
		72 °C	1'
4	-	72 °C	7'

Inicialmente, el protocolo de amplificación se evaluó con dos marcadores, mTcCIR8 y mTcCIR15, en los cuatro conjuntos de productos de extracción (resumidos al inicio de la sección *II.C.*) Tras comparar los resultados (mostrados en el apéndice A) se procedió a trabajar únicamente con el siguiente conjunto de muestras:

1) ADN de tejido fresco almacenado en solución NaCl-CTAB-azida y extraído por método de Doyle y Doyle (1962).

2) Tejido seco extraído por método de Kumar Sahu *et al.* (2012).

F. Verificación de la amplificación de ADN

Para evaluar la efectividad del PCR, todos los productos se corrieron en electroforesis en geles de 7 cm de poliacrilamida al 10 % a 175 V por una hora, junto a una escalera Promega de 100 pb. La metodología de fijación y tinción consistió en:

- Mantener el gel sumergido en 150 ml de ácido acético glacial al 10% en constante agitación durante un mínimo de 20 minutos.
- Retirar y almacenar el ácido acético
- Dar al gel tres lavados de dos minutos en agua destilada.
- Mantener el gel 30 minutos en constante agitación dentro de 150 ml de solución de tinción al 0.1% previamente preparada con 225 µl de formaldehído al 37.5%.
- Almacenar nuevamente la solución de tinción y realizar un lavado del gel con agua destilada durante diez segundos.
- Retirar el agua y agregar 150 ml de solución de revelado (2.25 g Na₂CO₃, 225 µl de formaldehído al 37.5 % y 7.8 µl de tiosulfato al 10 %), preferiblemente a 4°C.
- Al poder distinguir claramente las bandas, antes de que el gel comience a tornar a una coloración café, agregar nuevamente la solución de ácido acético para detener la reacción.

G. Separación de fragmentos de ADN

Se eligieron al azar 14 de los 20 marcadores (mTcCIR3, mTcCIR6, mTcCIR8, mTcCIR10, mTcCIR11, mTcCIR12, mTcCIR15, mTcCIR17, mTcCIR21, mTcCIR22, mTcCIR26, mTcCIR135, mTcCIR223, mTcCIR1) y se seleccionaron estos productos de PCR en las muestras de referencia. Estos fueron separados en un gel de poliacrilamida desnaturalizante de 50 cm para evaluar la efectividad de este método en cuanto a discriminación de bandas e identificar polimorfismos entre las tres variedades. Se utilizó el equipo Sequi Gen-GT de Bio-Rad, la fuente de poder Thermo Electron Corporation

PS4000A Plus, siguiendo las especificaciones de cada equipo, y el mismo protocolo establecido por Creste *et al.* (2001), con las siguientes modificaciones:

- Se utilizó una cámara de 50 cm.
- La placa grande se trató con 50 μ l de solución Bind Silano, y se enjuagó dos veces con etanol al 95%.
- La placa unida al reservorio se trató dos veces con 2000 μ l de dimetilsulfóxido (DMS), y se enjuagó con etanol al 95%.
- Los geles consistieron en 80 ml de solución de acrilamida al 10 %, 33.63 g de urea, 450 μ l de APS 10 % y 45 μ l de TEMED.
- Las muestras se desnaturalizaron por 5 minutos a 95 °C.
- En cada pozo se cargaron 3 μ l de cada muestra.
- La corrida y pre-corrida se llevó a cabo a 100 V durante alrededor de 4 horas. Este tiempo dependió de que las muestras hayan recorrido el gel completo. El voltaje, por otro lado, dependió de la temperatura del gel, la cual estuvo siendo controlada para que no saliera del rango de 50-55 °C.
- La fijación se llevó a cabo en 1.5 L de ácido acético al 10 %.
- Se utilizaron 1.5 L de solución de tinción de plata al 0.15 %.
- Se reveló con solución de revelado al 3 %.

H. Identificación de fragmentos de ADN según su tamaño

El tamaño (en pb) de los fragmentos de ADN visualizados en los geles de 50 cm se calculó utilizando el software GelAnalyzer 2010a.

III. RESULTADOS

A. Selección de marcadores

Los marcadores y la secuencia de sus cebadores, seleccionados con base en los criterios establecidos en la sección II.A y la literatura consultada, fueron los siguientes:

Cuadro 4: Cebadores seleccionados para realizar el estudio. El cuadro contiene la siguiente información:

LG (linkage group), indica el número de cromosoma en el que se encuentra cada marcador; el motivo repetido en cada *loci*; Ta (temperatura de anillamiento); el tamaño esperado de cada fragmento, y dos referencias principales para cada uno. En su mayoría, el tamaño esperado está basado en los resultados obtenidos por Motilal *et al.*, 2010.

L G	Nombre del locus	Secuencia del cebador (5' → 3')	Motivo	Ta (°C)	Tamaño esperado (pb)	Referencias principales
1	mTcCIR15	F: CAGCCGCCTCTTGTTAG R: TATTTGGGATTCTTGATG	(TC) ₁₉	46	232	Aragón, 2009 Motilal <i>et al.</i> , 2010
	mTcCIR22	F: ATTCTCGCAAAACTTAG R: GATGGAAGGAGTGTAATAG	(TC) ₁₂ N ₁₄₆ (CT) ₁₀	46	240-265	Ávalos <i>et al.</i> , 2012 Zhang <i>et al.</i> , 2006
2	mTcCIR3	F: CATCCAGTATCTCATCC R: CTGCTCATTCTTTCATATCA	(CT) ₂₀ (TA) ₂₁	61	230	Efombagn <i>et al.</i> , 2008 Schnell <i>et al.</i> , 2005
	mTcCIR11	F: TTTGGTGATTATTAGCAG R: GATTTCGATTTGATGTGAG	(TC) ₁₃	46	206	Ávalos, <i>et al.</i> , 2012 Lambert <i>et al.</i> , 2009
3	MTcCIR13 5	F: ATTAGAGAGGGGGTAGATGA R: CTAGTGGGGTTGACATTTG	(AG) ₂₀	51	246	Motamayor <i>et al.</i> , 2008; Ávalos <i>et al.</i> , 2012
	mTcCIR21	F: GTCGTTGTTGATGTCGGT R: GGTGAGTGTGTGTGTTTGTCT	(TC) ₁₁ N ₅ (CA) ₁₂	61	157	Motamayor <i>et al.</i> , 2008; Lambert <i>et al.</i> , 2009
4	mTcCIR12	F: TTTCTGACCCCAAACCTGTAA R: TTCCAGTTAAAGCACATGAGGA	(CATA) ₄ N ₁₈ (TG) ₆	59	188-210	Ávalos <i>et al.</i> , 2012 Sereno <i>et al.</i> , 2006
	mTcCIR17	F: AAGGATGAAGGATGTAAGAGAG R: CCCATACGAGCTGTGAGT	(GT) ₇ N ₄ (GA) ₁₂	51	199-235	Ávalos, 2012 Motamayor <i>et al.</i> , 2008

Continúa en la siguiente página.

Cuadro 4 (continuación).

L G	Nombre del locus	Secuencia del cebador (5' → 3')	Motivo	Ta (°C)	Tamaño esperado o (pb)	Referencias principales
5	mTcCIR10	F: ACAGATGGCCTACACACT R: CAAGCAAGCCTCATACTC	(TG) ₁₃	46	211-255	Ávalos, 2012 Motilal <i>et al.</i> , 2010
	mTcCIR248	F: TGATAGATTTGCGTTTACA R: CCCAGAAAAGAAGAAGAT	(TG) ₈	48	190	Ávalos, <i>et al.</i> , 2012 Pugh 2004
6	mTcCIR6	F: TTCCTCTAAACTACCCTAAAT R: TAAAGCAAAGCAATCTAACATA	(TG) ₇ (GA) ₁₃	46	180-210	Ávalos <i>et al.</i> , 2012 Cryer, 2006;
	mTcCIR235	F: TTCGGATGGCAACTAACT R: AAAACAGCGGAACAGGTA	(AG) ₈	48	291	Ávalos <i>et al.</i> , 2012 Motamayor <i>et al.</i> , 2008
7	mTcCIR277	F: ACCAAGATCAAAGTCAAGAA R: GATAAGAACCAAGTGAAGAGA	(AG) ₁₆ AA (AG) ₁₁	51	294-304	Áragón, 2009; Motamayor <i>et al.</i> , 2008
	mTcCIR190	F: AAGAACTGAAGCACAAT R: CACAAAGAGCATAAACTG	(TG) ₁₂	46	151-179	Ávalos <i>et al.</i> , 2012 Motamayor <i>et al.</i> , 2008
8	mTcCIR1	F: GCAGGGCAGGCTCAGTGAAGCA R: TGGGCAACCAGAAAACGAT	(CT) ₁₄	51	206	Ávalos, 2012; Cryer, 2006
	mTcCIR26	F: GCATTCATCAATACATTC R: GCACTCAAAGTTCATACTAC	(TC) ₉ (CT) ₄ T T(CT) ₁₁	46	303/307	Motilal <i>et al.</i> , 2010 Cryer <i>et al.</i> , 2010
9	mTcCIR8	F: CTAGTTTCCATTTACCA R: TCCTCAGCATTTTCTTTC	(TC) ₅ TT(TC) ₁ 7TTT(CT) ₄	46	302	Aragón, 2009 Motilal <i>et al.</i> , 2010
	mTcCIR166	F: ATGAACCACTATGTAAGACC R: ATTCAAAGGATTAGCAG	(CT) ₀₉ (CA) ₀₈	48	215	Ávalos <i>et al.</i> , 2012 Motamayor <i>et al.</i> , 2008
10	mTcCIR37	F: CTGGGTGCTGATAGATAA R: AATACCCTCCACACAAAT	(GT) ₁₅	46	176-184	Motilal <i>et al.</i> , 2010 Lambert <i>et al.</i> , 2009
	mTcCIR223	F: GGTCCACACTCAACT R: TTATTCCATTTTCATTTACT	(TC) ₄ GC(TC) ₂ GC(TC) ₁₅	46	188-199	Motamayor <i>et al.</i> , 2008

B. Extracción y cuantificación de ADN

Se compararon los resultados de extracción a partir de dos distintos métodos de toma y almacenamiento de muestra de hojas frescas, obtenidas del campo, así como dos métodos de extracción para las hojas desecadas enviadas desde Costa Rica. Se obtuvo una concentración de 73.94 ± 31.78 ng/ul y una pureza de 1.61 ± 0.17 a partir de las muestras de hojas completas que fueron maceradas y procesadas para su extracción menos de 24 horas después de haber sido obtenidas. Este mismo ADN, como se indica en la sección de métodos, tuvo que ser almacenado en resuspensión en isopropanol a -20 °C; tras aislarlo nuevamente de esta resuspensión, su concentración y pureza disminuyeron a 69.64 ± 45.45 ng/ul y 1.56 ± 0.36 , respectivamente. Una réplica de estas mismas muestras, que estuvieron almacenadas durante un mes y medio a -80 °C, fueron procesadas nuevamente por el mismo método (Doyle y Doyle (1990)), resultando en una concentración de 71.63 ± 41.39 ng/ul y pureza de 1.64 ± 0.21 .

El segundo conjunto de muestras obtenidas del campo, que fueron almacenadas en solución de NaCl-CTAB-azida y su ADN extraído por el mismo método que en el conjunto anterior, resultó en una concentración promedio de 75.67 ± 43.54 ng/ul y 1.65 ± 0.31 de pureza, siendo estos los mejores resultados obtenidos. Por otro lado, las tres muestras de hojas desecadas procesadas por el método de Doyle y Doyle (1990) resultaron en una concentración promedio mínima, de 35.83 ± 9.17 ng/ul y pureza de 2.43 ± 0.49 , mientras que por el método de Kumar Sahu *et al.* (2012) se obtuvo un rendimiento promedio de 183.33 ± 84.54 ng/ul y una pureza de 1.55 ± 0.34 .

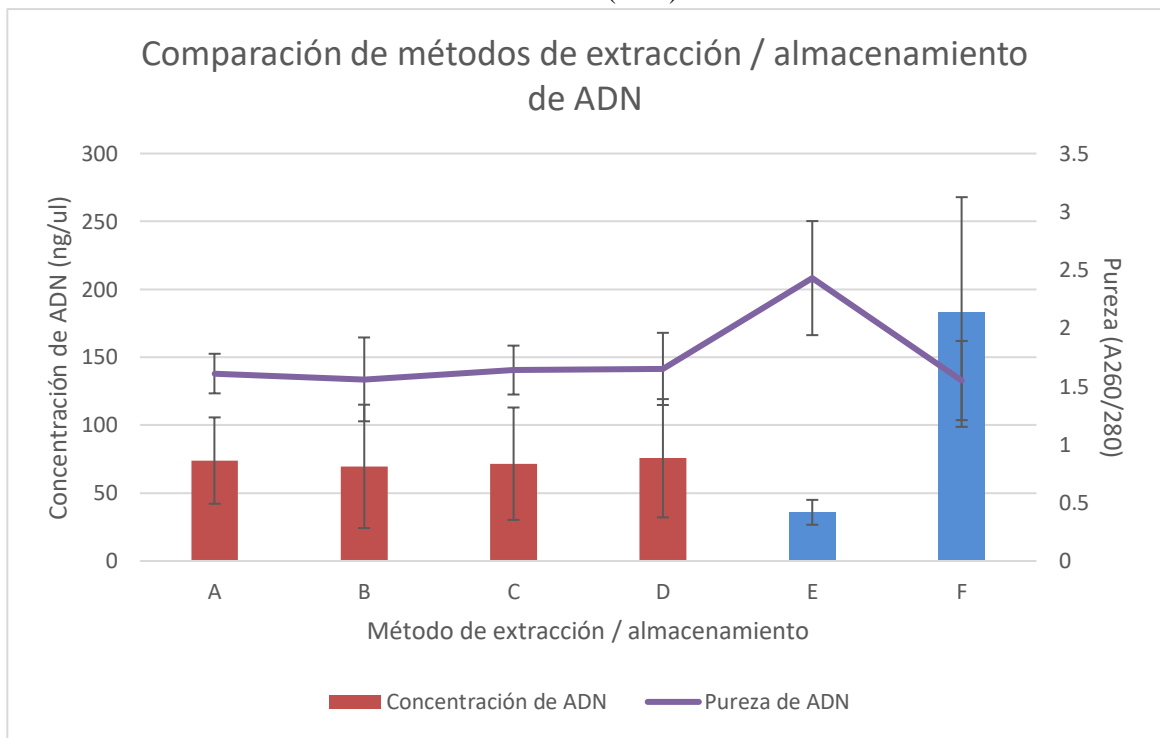
Los resultados se muestran resumidos en el siguiente cuadro.

Cuadro 5: Comparación del rendimiento de ADN obtenido a partir de los protocolos de obtención y almacenamiento de muestra de tejido foliar y extracción de ADN evaluados en el presente estudio, tomando en cuenta el tiempo de almacenamiento del tejido previo a su procesamiento. En negrita se resaltan las condiciones bajo las cuales fueron sometidas las muestras analizadas a lo largo de todo el estudio. Los datos crudos se presentan en el apéndice A.

	Forma y tiempo de almacenamiento entre el día de toma de muestra y el día de extracción de ADN.	Concentración de ADN (ng/μl)	Pureza (A ₂₆₀ /A ₂₈₀)
Muestras de hojas completas (sección <i>II.B.2.1</i>) de finca “La Cruz” extraídas por método de Doyle y Doyle, 1990 (sección <i>II.C.2.1</i>) (n=47).	Hojas maceradas, almacenadas un día a -80 °C.	73.94 ± 31.78	1.61 ± 0.17
	Hojas maceradas, almacenadas un día -80 °C. Tras la extracción, ADN almacenado un mes en isopropanol a -20 °C.	69.64 ± 45.45	1.56 ± 0.36
	Hojas maceradas, almacenadas 1.5 meses a -80 °C.	71.63 ± 41.39	1.64 ± 0.21
Muestras de finca “La Cruz” almacenadas en solución NaCl-CTAB-azida (sección <i>II.B.2.2</i>) y extraídas por método de Doyle y Doyle (<i>II.C.2.1</i>) (n=45).	Hojas cortadas en discos, almacenadas cinco días a 4 °C dentro de solución de almacenamiento.	75.67 ± 43.54	1.65 ± 0.31
Muestras de CATIE (hojas desecadas) extraídas por método de Doyle y Doyle (<i>II.C.2.1</i>) (n=6)	Hojas completas desecadas, almacenadas 2.5 meses a temperatura ambiente dentro de bolsa con sílica gel.	35.83 ± 9.17	2.43 ± 0.49
Muestras de CATIE (hojas desecadas), extraídas por método de Kumar Sahu (<i>II.C.2.2</i>) (n=6)	Hojas completas desecadas, almacenadas 2.5 meses a temperatura ambiente con sílica gel.	183.33 ± 84.54	1.55 ± 0.34

A continuación, se muestran estos mismos resultados representados de forma gráfica:

Figura 5. Comparación de los métodos de extracción / almacenamiento de ADN en cuanto a pureza y concentración. A-C: tejido fresco almacenado a -80°C extraído por método Doyle y Doyle; A: almacenado un día a -80°C; B: ADN almacenado un mes en isopropanol a -80°C; C: tejido almacenado 1.5 meses a -80° C. D: tejido almacenado cinco días a 4°C en solución NaCl-CTAB-azida; E: tejido seco extraído mediante método de Doyle y Doyle (1990); F: tejido seco extraído mediante método de Kumar Sahu *et al.* (2010).

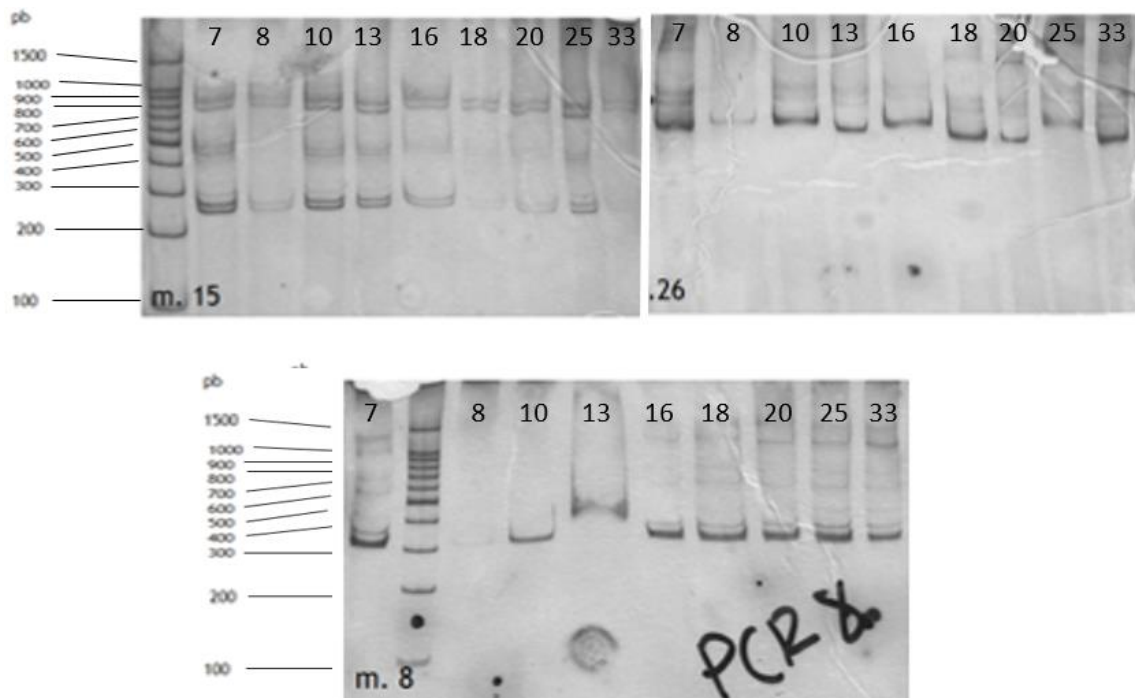


La diferencia observada entre los resultados obtenidos a partir de los cuatro grupos de hojas frescas sometidos al método de extracción por Doyle y Doyle, tanto en concentración como en pureza, es despreciable, independientemente del método de preservación. Por otro lado, para hojas secas, tanto la pureza como la concentración de ADN obtenidas por el método de Kumar Sahu se incrementó alrededor de cinco veces, a comparación del método de Doyle y Doyle.

C. Amplificación de ADN

Inicialmente, se llevó a cabo la amplificación de únicamente tres marcadores (mTcCIR8, mTcCIR15 y mTcCIR26) para nueve muestras seleccionadas al azar del primer grupo (hojas completas almacenadas en frío, procesadas un día después de haber sido seleccionadas), obteniendo un resultado exitoso (Figura 5).

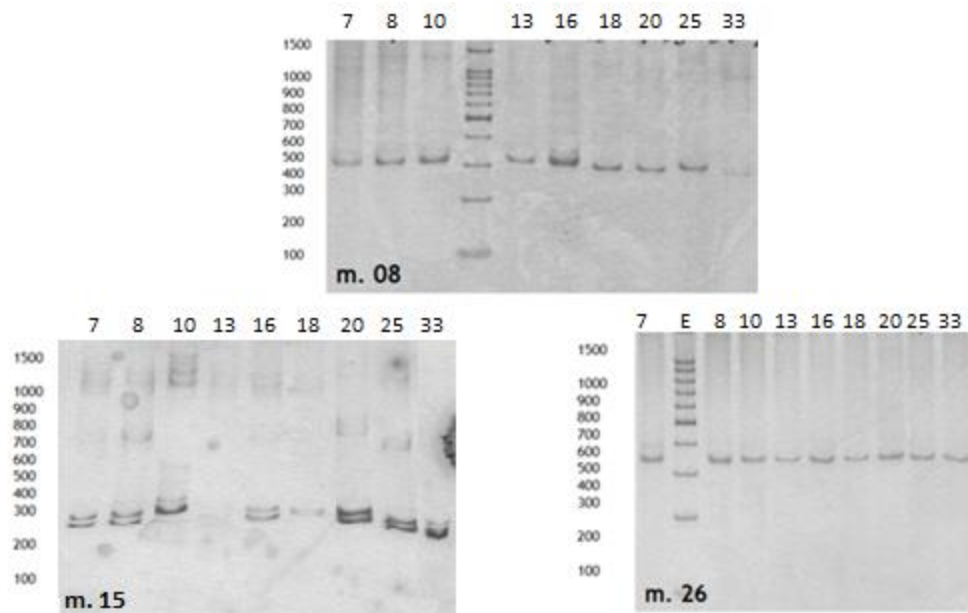
Figura 6. Amplificación de ADN de los marcadores mTcCIR15, 26 y 8 (respectivamente) de nueve muestras aleatorias obtenidas de la finca La Cruz, almacenadas a -80°C durante un día previo a su extracción mediante el método de Doyle y Doyle. Se utilizó una escalera molecular marca Promega de 100 pares de bases. En cada gel mostrado, de izquierda a derecha se encuentran: muestra 7, 8, 10, 13, 16, 18, 20, 25 y 33.



Tras evaluar la amplificación de estos marcadores en las mismas muestras de ADN después de que estas hayan sido almacenadas en alcohol isopropílico por un mes, no se obtuvo el mismo resultado. Se extrajo nuevamente una réplica de las mismas muestras, sin obtener resultados de amplificación. Se procedió a evaluar el segundo método de toma y almacenamiento de muestra: solución de NaCl-CTAB-azida. A partir del ADN extraído de estos tejidos, la amplificación de los dos marcadores seleccionados se llevó a cabo

adecuadamente, sin presentar ninguna dificultad. Los productos de amplificación observados en los geles de poliacrilamida se presentan en la figura 6. Se procedió a amplificar 15 marcadores más de estas mismas muestras. En el apéndice se presenta el número de muestra que amplificó para cada marcador; en promedio, se lograron amplificar el 59% de las muestras seleccionadas de la finca.

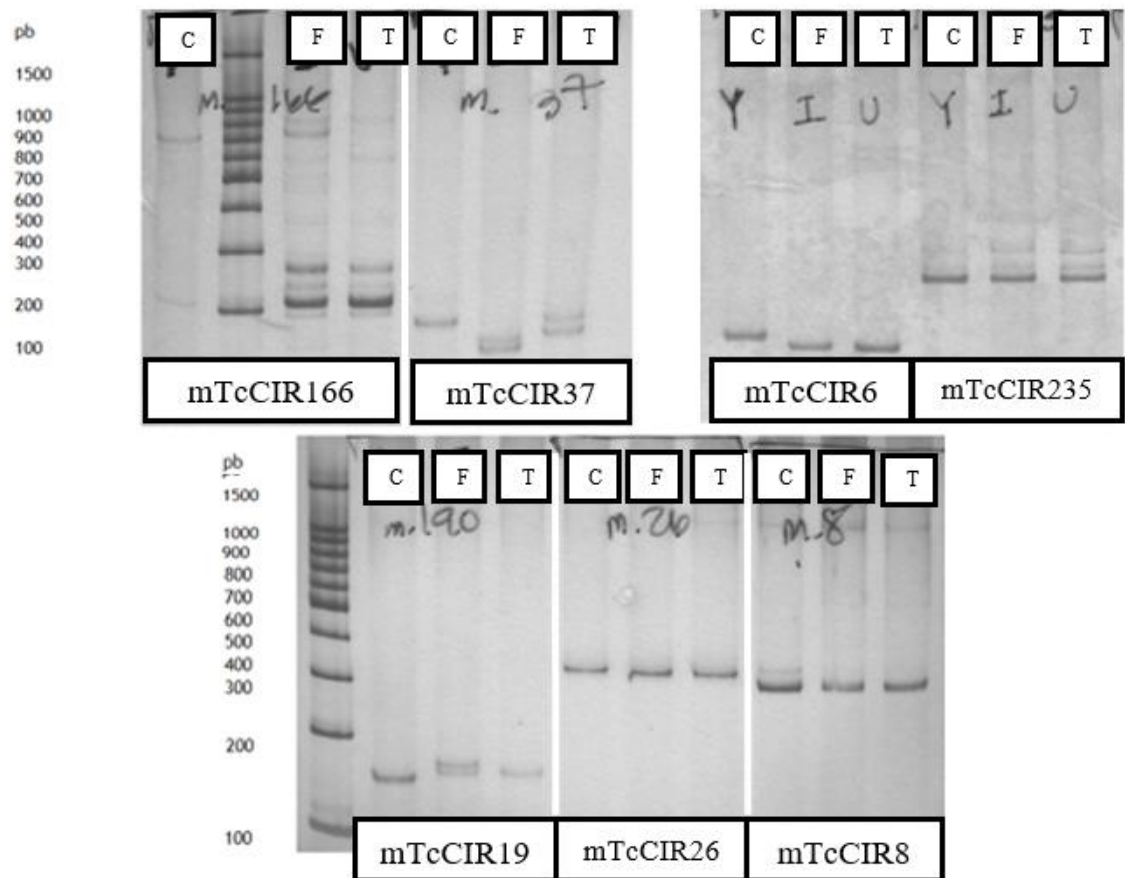
Figura 7. Amplificación de ADN de los marcadores mTcCIR 08, 15 y 26 (respectivamente) de muestras aleatorias (escritas en la parte superior de cada gel) obtenidas de la finca La Cruz, almacenadas en solución de NaCl-CTAB-azida y extraídas mediante el método de Doyle y Doyle. En la parte superior de cada gel se indica el número de muestra analizada. En la parte lateral izquierda, el tamaño, en pares de bases, basada en una escalera Promega 100 pb.



Por otro lado, la amplificación de los primeros dos marcadores para los productos de extracción de las muestras de referencia (hojas secas) mediante el método de Doyle y Doyle (rendimiento de 35.83 ± 9.17 y pureza de 2.43 ± 0.49) fue casi nula. Por esto se procedió a extraer las réplicas de estas mismas muestras por el método de Kumar Sahu, obteniendo el mayor rendimiento a comparación de los otros conjuntos de muestras evaluados (ver figura 7 y apéndice A). En el apéndice C se evidencia la efectividad de la amplificación del 100% de marcadores en el 100% de este conjunto de muestras. Se detectó

una relación directa entre el rendimiento y pureza de ADN obtenido tras los distintos métodos evaluados, y la facilidad y efectividad de la amplificación.

Figura 8. Visualización de productos de amplificación de muestras de referencia de cacao criollo, forastero y trinitario, extraídas por el método de Kumar Sahu. C: cacao criollo, F: cacao forastero, T: cacao trinitario. Escrito sobre cada gel se indica el número de marcador utilizado (mTcCIR 166, 37, 6, 235, 190, 26 y 8).



D. Separación de fragmentos de ADN

Mediante electroforesis en gel de poliacrilamida de 50 cm desnaturizante fue posible identificar el tamaño de los alelos de cacao criollo, trinitario y forastero de referencia a partir de los marcadores evaluados, con excepción del marcador mTcCIR11 y mTcCIR1, cuyos fragmentos fueron detectables únicamente para el individuo criollo. De

los 12 marcadores restantes, solamente en mTcCIR3, mTcCIR12 y mTcCIR223 se detectó una variedad de alelos entre las tres muestras analizadas (cuadro 6). En el resto de *locus* evaluados, se detectaron alelos específicos del cacao criollo, mas no fue posible hacer una distinción entre las otras dos variedades.

Cuadro 6. Genotipo detectado para las muestras de referencia de las variedades Criollo, Forastero y Trinitario provistas por CATIE. Se encuentran marcados con distinta coloración los marcadores que difirieron en tamaño según cada variedad.

Marcador	Tamaño del fragmento (pb)		
	Yuca (Criollo)	IMC-67 (Forastero)	UF-613 (Trinitario)
mTcCIR1	196	-	-
mTcCIR3	216	232	224
mTcCIR6	196	192	192
mTcCIR8	303	290	290
mTcCIR10	220	220	220
	215	215	215
mTcCIR11	206	-	-
mTcCIR12	184	202	212
mTcCIR15	239	249	251
	234	234	234
mTcCIR17	214	198	198
mTcCIR21	165	155	155
	160	145	150
mTcCIR22	246	243	243
	239	237	237
mTcCIR26	299	295	295
mTcCIR135	241	232	249
	241	227	227
mTcCIR223	175	204	207
	175	200	192

IV. DISCUSIÓN

A. Método de toma y almacenamiento de muestra de tejido foliar y extracción de ADN

Las muestras analizadas en este estudio se dividen en dos grupos: muestras frescas de campo, y hojas desecadas (muestras de referencia), las cuales fueron importadas en estas condiciones. La toma de muestra del primer grupo consistió en tomar la hoja entera y almacenarla en frío previo a su procesamiento para extracción de ADN mediante el método de Doyle y Doyle (1990). Estos métodos, con algunas modificaciones, ya han sido estandarizados para procesar tejidos de cultivos como arveja, teocinte, frijol, entre otros, en el laboratorio donde se llevó a cabo el estudio (Laboratorio de Protección Vegetal de la UVG). El método permite extraer ADN a partir de muestras de hojas completas almacenadas en frío durante varios meses, y a partir de tejido macerado y congelado, obteniendo niveles de pureza y rendimiento suficientemente altos para amplificar ADN mediante PCR. Sin embargo, como se observa en los resultados, este no fue el caso para las muestras de cacao, en las que se detectó una alta concentración inicial de ADN y adecuada amplificación, pero tras días de almacenamiento, no se logró amplificar nuevamente. Esto se debe a que la hoja de cacao, a diferencia de los otros tejidos trabajados en el laboratorio, tiene altos contenidos de metabolitos secundarios como polisacáridos y polifenoles. Entre estos, el polifenol oxidasa (Macedo *et al.* 2016), que al salir de la célula cuando esta es destruida mecánicamente (mediante la maceración), acelera el proceso de oxidación de la hoja y degradación del ADN. Además, los polifenoles generalmente interfieren con la actividad enzimática, en este caso la taq polimerasa. Por tanto, para obtener un producto de extracción íntegro y puro a partir de estas hojas, se requiere de un detergente catiónico, como el CTAB que entre en la célula y encapsule el ADN, impidiendo esta degradación y manteniendo una mayor integridad. Además, según Clarke *et al.*, (2009) en combinación con sal, permite la unión y remoción de los polisacáridos presentes en la célula. Es por esto que se siguió el método de toma de muestra y almacenamiento de solución CTAB-NaCl-azida, sugerido por Battarchajee *et al.*, (2004), Marasyoh *et al.*,

(2008) y Vásquez-Ovando *et al.*, (2014), para hojas con alto contenido de polifenoles y metabolitos secundarios, el cual permitió obtener la mayor concentración y pureza en comparación a las extracciones anteriores (75.67 ± 43.54 ng/ul y 1.65 ± 0.31 , respectivamente). Una alternativa para esta forma de almacenamiento es mantener las muestras completas y desecadas. Como se observa en los resultados de extracción y amplificación de las muestras de referencia, que fueron importadas desde Costa Rica, esta forma de almacenamiento permitió mantener el tejido y, por ende, su ADN íntegro durante dos meses y medio que fueron almacenadas. A pesar de que el método aplicado para este tipo de muestra es más costoso en cuanto a tiempo, los resultados de extracción son significativamente más altos (183.33 ± 84.54 contra 75.67 ± 43.54 ng/ul). Asimismo, las bandas de producto de PCR detectadas en el gel son mucho más definidas.

B. Método de amplificación de ADN

Tras la optimización de la reacción de PCR propuesta, el método fue efectivo para la amplificación de todos los marcadores evaluados en un promedio de 59% de muestras, tomando en cuenta tanto las muestras de campo como las muestras patrón (apéndice C). Por otro lado, en promedio, cada muestra pudo ser amplificada en el 64% de los marcadores evaluados. Sin embargo, es incorrecto concluir sobre la efectividad de este método de PCR a partir de resultados globales; si se concluyera a partir de estos promedios, podría decirse que el método evaluado en este estudio tuvo una efectividad de alrededor del 60%, impidiendo alcanzar el objetivo de desarrollar un método fácil y efectivo para la identificación de variedades. Es importante tomar en cuenta que en muestras como la 8, 11, 33 y en las tres de tres muestras de patrón se logró una amplificación del 100% de marcadores. Con una muestra que haya podido ser amplificada en todos los marcadores, se puede concluir que el método de reacción de PCR fue efectivo, y el caso de falta de amplificación se debe a: algún problema (degradación, contaminación o presencia de inhibidores) en el ADN de esa muestra en específico, como es el caso de la muestra número 3, que no fue amplificada en ningún marcador (apéndice C) o que el marcador que se está analizando corresponda a alelos nulos en esas muestras en específico.

De esto se concluye que el paso más crítico en un método de amplificación de ADN es una toma y almacenamiento de muestra adecuada y, posteriormente, un método de extracción que permita obtener los resultados óptimos. Si se cuenta con esto, podrán eliminarse estas variables al momento de evaluar la efectividad de la amplificación. A partir de este estudio, se recomienda que para hojas de cacao, se almacenen desecadas y se extraiga su ADN mediante el método propuesto por Kumar Sahu *et al.* (2012), combinación de métodos que resultaron ser totalmente efectivos para el objetivo del estudio.

C. Productos de amplificación

Tras llevar a cabo la amplificación mediante PCR, primero era necesario identificar su utilidad en cuanto a amplificar un alelo (en caso este esté presente). Para esto se utilizaron geles de poliacrilamida de 7 cm al 10%, a partir de los cuales se pudo detectar claramente presencia o ausencia del alelo (apéndice C). Este método, además, permitió estimar un tamaño del fragmento (en pb) para determinar si se amplificó el marcador esperado e identificar heterocigocidad en los individuos. Para fines de esta parte del estudio, el método resultó ser efectivo, permitiendo determinar: la utilidad de la reacción optimizada de PCR para amplificar los 17 marcadores seleccionados en muestras de tejido foliar de cacao almacenado y extraído por distintos métodos, y tener una idea de los marcadores polimórficos que podrían ser de utilidad para distinguir variedades.

Para evaluar este último punto y tener un tamaño de los fragmentos (en pares de bases) certero, se llevó a cabo una electroforesis en geles de poliacrilamida al 10%, desnaturalizantes, de 50 cm, de 14 marcadores elegidos al azar, para las tres muestras patrón únicamente. Los resultados se presentan en el apéndice B. Se puede observar que solamente 3 de los 14 marcadores (mTcCIR3, mTcCIR12 y mTcCIR223) analizados presentaron polimorfismos para las tres muestras patrón (criollo, forastero y trinitario). La diferencia en los tamaños es claramente detectable e inconfundible (por este método), siendo 8 pb la menor diferencia, y 32 pb la mayor. Esto permitiría concluir con el segundo objetivo del estudio: seleccionar un conjunto de marcadores mínimo que permita la distinción entre las tres variedades. Por tanto, a partir de este estudio, se seleccionarían estos tres marcadores

para, en la segunda parte del trabajo, poder agrupar las muestras tomadas del campo con su variedad correspondiente. Las limitaciones de recursos con las que se contó para este estudio impidieron analizar 6 de los 20 marcadores que se seleccionaron inicialmente; es importante que en la siguiente fase del estudio se analicen los marcadores restantes, entre los cuales podrían determinarse otros que serían útiles para la distinción de las variedades. A partir de los datos obtenidos en este trabajo, esta es la mayor información que se puede determinar; no es posible discutir sobre número de alelos por *locus* ni de heterocigosidad porque no se están analizando una población, únicamente tres muestras de variedades puras. Sin embargo, posteriormente, cuando se analice el tamaño de los fragmentos obtenidos a partir de las muestras de campo, las cuales sí pueden ser consideradas una población, sí es recomendable calcular estos índices.

V. CONCLUSIONES

- A. El método de almacenamiento de muestras de tejido vegetal para cultivos de cacao tanto dentro de solución de NaCl-CTAB-azida, como mantenerla desecada, es altamente efectivo para mantener su integridad, permitiendo una extracción de ADN exitosa.
- B. La optimización de la reacción de PCR del presente estudio permitió amplificar satisfactoriamente los alelos correspondientes a los veinte marcadores seleccionados.
- C. Los marcadores mTcCIR3, mTcCIR12 y mTcCIR223 detectaron polimorfismos entre las variedades de cacao criollo, trinitario y forastero, permitiendo distinguirlos satisfactoriamente a partir del tamaño de sus fragmentos.
- D. El método de electroforesis de acrilamida de 50 cm desnaturizante permitió detectar el tamaño exacto de los fragmentos amplificados y generar un perfil genético de variedades puras de cacao criollo, trinitario y forastero.

VI. RECOMENDACIONES

- A. Evaluar la efectividad de la extracción de ADN de tejido almacenado en solución de CTAB mediante el método establecido por Kumar Sahu *et al.* (2012) (el cual en el presente estudio fue aplicado solo a muestras desecadas).
- B. Detectar el tamaño de los alelos de los marcadores restantes en las muestras de referencia, para obtener un genotipo que abarque una mayor parte del genoma.
- C. Detectar el tamaño de los alelos de las muestras del campo según el conjunto de marcadores seleccionados para distinguir las variedades, y agruparlos según índice genético de Nei u otro aplicable.
- D. Aplicar este mismo método, con los marcadores seleccionados, a un mayor número de individuos de referencia (no solamente uno de cada variedad) para detectar si existe polimorfismo dentro de las mismas variedades.

VII. LITERATURA CITADA

- Aikokpodion, P.O. 2012. «Defining Genetic Diversity in the Chocolate Tree, *Theobroma cacao* L. Grown in West and Central Africa» *Genetic Diversity in Plants. Prof. Mahmut Caliskan*. 29 págs.
- Aragón, E. 2009. «*Genetic characterization of Theobroma cacao L. in Nicaragua*» Tesis University of Helsinki. 54 págs.
- Aranda, L. 2005. *El uso de cacao como moneda en la época prehispánica y su pervivencia en la época colonial*. http://www.mecd.gob.es/cultura-mecd/en/dms/mecd/cultura-mecd/areas-cultura/museos/mc/actasnumis/volumen-ii/edad-moderna/El_uso_cacao_como_moneda.pdf [16 de noviembre 2014]
- Argout, X. *et al.*, 2011. «The genome of *Theobroma cacao*». *Nature Genetics*. 43(2):101-108
- Astorga, M. 2008. «Estado actual del uso de marcadores moleculares en moluscos bivalvos de importancia para la acuicultura» *FAO Actas de Pesca y Acuicultura*. No. 12. Roma, FAO. Pp 277-287
- Ávalos, A., M.A. Porres, E. Pöll, E. Dardón, L.A. Arévalo, J.A. Rosales. «Caracterización agronómica, botánica y molecular de clones de cacao tipo criollo y mejorado de la zona sur de Guatemala» *Universidad del Valle de Guatemala*. 24:99-104.
- Banco Centroamericano de Integración Económica. 2009. *Oferta de cacao amigable con la biodiversidad en Guatemala*. <http://www.bcienegociosverdes.com/Almacenamiento/Biblioteca/254/254.pdf> [14 de noviembre 2014]
- Bellini, G. 2003. «"Hombres de maíz": entre mito y realidad» *Studi sulla narrativa hispanoamericana*. Editorial V&P Strumenti. P. 63
- Carr, G. 2013. *Sterculiaceae*. <http://www.botany.hawaii.edu/faculty/carr/sterculi.htm> [16 de noviembre 2014]
- Coe. 2005. «Kakaw: el chocolate en la cultura de Guatemala» Guatemala. Museo Popol Vuh, Universidad Francisco Marroquín. 25 pp.

- Creste, S., A. Tulmann, A. Figueira. 2001. «Detection of Single Sequence Repeat Polymorphisms in Denaturing Polyacrylamide Sequencing Gels by Silver Staining» *Plant Molecular Biology Reporter*. 19(2001)299-306
- Comisión Nacional para el Conocimiento de la Biodiversidad. 1998. *Theobroma cacao* L. http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info_especies/arboles/doctos/68-sterc03m.pdf [19_de noviembre 2014]
- Cornell University. 2003. *Using molecular marker technology in studies on plant genetic diversity*. http://cropgenebank.sgrp.cgiar.org/images/file/learning_space/molecular_markers/volume1/Isozymes.pdf [20_de noviembre 2014]
- Cryer, N.C., M.G. Fenn, C.J. Tumbull, M.J. Wilkinson. 2006. «Allelic size standards and reference genotypes to unify international cocoa (*Theobroma cacao* L.) microsatellite data» *Genetic Resources and Crop Evolution*. 53(2006):1643-1652
- Fundación Hondureña de Investigación Agrícola. 2005. *Producción de plantas de cacao por injerto*. Proyecto de control de moniliasis del cacao. La Lima, Cortés: FHIA, APROCACAO, PROMOSTA. 12 pp.
- Fins, L. 2013. *La historia del cacao y del chocolate*. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza CATIE. Turrialba, C.R. 36 pp.
- Fouet, O., M. Allegre, X. Argout, M. Jeannean, A. Lemainque, S. Pavék, A. Boland, A.M. Risterucci, G. Loor, M. Tahi, X. Sabau, B. Courtois, C. Lanaud. 2011. «Structural characterization and mapping of functional EST-SSR markers in *Theobroma cacao*». *Tree Genetics & Genomes*. 7(2011):799:817
- González, M.F. 2007. *La protección jurídica para el cacao fino y de aroma del Ecuador*. Corporación Editora Nacional. Quito, Ecuador. 159 pp.
- Guevara, F. 2010. *Estudio de los insectos polinizadores de cacao (*Theobroma cacao* L.) en los cultivos localizados en la ruta del cacao de la zona del suroccidente de Guatemala*. Proyecto Fodecyt No. 060-2007
- Gutiérrez, N. 1991. «Los Mayas: Historia, arte y cultura» *El Dios del Maíz*. Editorial panorama. P. 61
- International Cocoa Organization. 2012. *Fine or Flavour Cocoa*. <http://www.icco.org/faq/53-cocoa-beans/116-fine-or-flavour-cocoa.html> [20_de noviembre 2014]
- International Cocoa Organization. 2013. *The origin of the cocoa tree*. <http://www.icco.org/faq/51-cocoa-trees/114-what-is-the-origin-of-the-cocoa-tree.html> [21_de noviembre 2014]

- INE. 2003. «Áreas Cultivadas de Cacao en Guatemala (2003)» *Instituto Nacional de Estadística*. Censo 2003.
- Irish, B., S. Cosme, T. Oleksyk, D. Zhang, R. Goenaga. 2014. *Characterization of naturalized cacao populations in Puerto Rico*. <https://ashs.confex.com/ashs/2014/webprogram/Paper19329.html> [10 de noviembre 2014]
- Jiang, G. 2013. «Molecular Markers and Marker-Assisted Breeding in Plants» *Plant Breeding from Laboratories to Fields*. DOI: 10.5772/52583
- Kaufman, B. 2012. *DNA Markers in Purity Testing*. <https://www.seedtest.org/upload/cms/user/ISTA-June11-Seminar-1530-Kaufman.pdf> [17 de noviembre 2014]
- Kumar Sahu, S., M. Thangaraj, K. Kathiresan. 2012. «DNA Extraction Protocolo for Plants with High Levels of Secondary Metabolites and Polysaccharides without Using Liquid Nitrogen and Phenol» *ISRN Molecular Biology*. Vol. 2012. Article ID 203049. 6 pp.
- Lara, M. A. 2005. «Literatura y cultura mayas». Editorial Proyectos Académicos Institucionales. México, D. F. 436 pp.
- Lerceteau, E., T. Robert, V. Pétiard, D. Cruzillat. 1997. «Evaluation of the extent of genetic variability among *Theobroma cacao* accessions using RAPD and RFLP markers». *Theor Appl Genet*. 95:10-19
- Marcano, M., T. Pugh, E. Cros, S. Morales, E. Portillo, B. Courtois, J. C. Glaszmann, J. M. Engels, W. Phillips, C. Astorga, A.M. Risterucci, O. Fouet, V. González, K. Rosenberg, I. Vallat, M. Dagert, C. Lanaud. 2006. «Adding value to cocoa (*Theobroma cacao* L.) germplasm information with domestication history and admixture mapping». *Theor. Appl. Genet*. DOI 10.1007/s00122-006-0486-9
- Martínez, A. 2007. *Introducción al Estudio de la Moneda Hispanoamericana*. Gobierno de Aragón, Departamento de Educación y Cultura. 93 pp.
- McClellan, P. 1998a. *The Classes of Molecular Markers*. <http://www.ndsu.edu/pubweb/~mcclellan/plsc731/mapping/mapping1.htm> [15 de noviembre 2014]
- McClellan, P. 1998b. *Molecular Marker Overhead*. <http://www.ndsu.edu/pubweb/~mcclellan/plsc731/molecular-marker-overhead.pdf> [15 de noviembre 2014]
- McLever, L; J. Fondon; M. Skinner; H. Garner. «Evaluation of microsatellite variation in the 1000 Genomes Project pilot studies is indicative of the quality and utility of the raw data and alignments». *Genomics*. 97(4):193-199

- McNeil, C. 2006. «Chocolate in Mesoamerica: a cultural history of cacao». Gainesville, FL. University Press of Florida. 542 p.
- Miller, C. 2009. *An integrated in vitro and greenhouse orthotropic clonal propagation system for Theobroma cacao L.* <http://plantscience.psu.edu/research/labs/guiltinan/publications/thesis/miller> [13 de noviembre 2014]
- Minifie, B. 1989. *Chocolate, cocoa and confectionery*. Aspen Publication. 3ra edición. 1905 pp.
- Miranda, F. 1962. *Wild cacao in the Lacandona Forest, Chiapas, Mexico. Cacao (Turrialba)*. 7:7. CATIE. Costa Rica
- Montenegro, M. 2007. «Manual del Cultivo de Cacao». *Asociación gremial de exportadores de productos no tradicionales*. 85 pp.
- Motamayor, J.C., A.M. Risterucci, P.A. Lopez, C.F. Ortiz, A. Moreno, C. Lanaud. 2002. «Cacao domestication I: the origin of the cacao cultivated by the Mayas». *Heredity*. 89(2002):380-386
- Motamayor, J.C., P. Lachenaud, J. W. da Silva, R. Loor, D. Kuhn, J. S. Brown, R. J. Schnell. 2008. «Geographic and Genetic Population Differentiation on the Amazonian Chocolate Tree (*Theobroma cacao L.*)». *Plos One*. 3(10):e3311
- Motilal, L., D. Zhang, P. Umaharan, S. Mischke, V. Mooleedhar, L. Meinhardt. 2010. «The relic Criollo cacao in Belize – genetic diversity and relationship with Trinitario and other cacao clones held in the International Cocoa Genebank, Trinidad». *Plant Genetic Resources*. 8(2):106-115
- N’Goran, J.A., V. Laurent, A.M. Risterucci. C. Lanaud. 1994. «Comparative genetic diversity studies of *Theobroma cacao L.* using RFLP and RAPD markers». *Heredity* 73(1994):589-597
- Palacios, F. 2006. *Chocolate y Cacao. Oportunidades de negocios*. http://www.negociosgt.com/main.php?id=310&show_item=1&id_area=157 [21 de noviembre 2014]
- Phillips-Mora, W., A. Arciniegas-Leal, A. Mata-Quirós. 2012. *Catálogos de clones comerciales seleccionados por el CATIE para siembras comerciales*. Turrialba, C.R. 36 pp.
- Portillo, E., L. Segnini, R. Parra. 2000. «Importancia en la calidad y la denominación de origen en la producción de cacao en Venezuela». *Memorias del Primer Congreso Venezolano del Cacao y su Industria*. P. 179-188
- Ramos, G. & A. Gómez. 2002. *Propagación del cacao. Injerto parche*. Maracay, Ven., Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas. Centro de Investigaciones Agrícolas del estado de Mérida. 26 p.
- Ronning C.M., R.J. Schnell. 1994. «Allozyme diversity in a germplasm collection of *Theobroma cacao L.*» *J. Hered.* 85:291-295

- Russell, J.R., F. Hosein, E. Johnson, R. Waugh, W. Powell. 1993. «Genetic differentiation of cocoa *Theobroma cacao* L. populations revealed by RAPD analysis». *Molecular Ecology*. 2:89-97
- Sistema de Información de las Fundaciones Produce. 2010. *Identificación molecular de las poblaciones de árboles de cacao, del grupo "criollo", del Soconusco, Chiapas*. www.sifupro.org.mx/agendas/PROYECTO_CACAO_PRODUCER_2.docx [24 de noviembre 2014]
- Somarriba, E., R. Cerda, C. Astorga, F. Quesada, N. Vásquez, L. Orozco. 2010. *Sexual Reproduction of Cacao*. Turrialba, C.R. CATIE. 48 pp.
- Sereno, M. P. Albuquerque, R. Vencovsky, A. Figueira. 2005. «Genetic diversity and natural population structure of cacao (*Theobroma cacao* L.) from the Brazilian Amazon evaluated by microsatellite markers». *Conservation Genetics*. 00(2005):1-12
- Takrama, J., J. Kun, L. Meinhardt, S. Mischke, S. Opoku, F. Padi, D. Zhang. 2014. «Verification of genetic identity of introduced cacao germplasm in Ghana using single nucleotide polymorphism (SNP) markers». *African Journal of Biotechnology*. 13(21):2127-2136
- Thompson, J. E. 2004. «Historia y religión de los mayas». *Los dioses principales*. Duodécima edición. Editorial Siglo XXI. P. 350
- Universidad Autónoma de México. 2005. *Estudios de cultura Maya*. Universidad Autónoma de México. Instituto de Investigaciones Filológicas. Vol. 25-27
- Vázquez-Ovando, J., F. Molina-Freaner, J. Nuñez-Farfán, I. Ovando-Medina, M. Salvador-Figueroa. «Genetic identification of *Theobroma cacao* L. with high Criollo ancestry in Soconusco, Chiapas, Mexico». *Genetics and Molecular Research*. 13(4):10404-10414
- Warren, J. 1994. «Isosyme variation in a number of populations of *Theobroma cacao* obtained through various sampling regimes». *Euphytica*. 72:121-126
- Whitkus, R., M. de la Cruz, L. Mota-Bravo. 1998. «Genetic diversity and relationships of cacao (*Theobroma cacao* L.) in southern Mexico». *Theor. Appl. Genet.* 96(1998):621-627
- World Cocoa Foundation. 2014. *History of cocoa*. <http://worldcocoafoundation.org/about-cocoa/history-of-cocoa/> [21 de noviembre 2014]
- Yang, J., Motilal, M., H. Dempewolf, K. Maharaj, Q. Cronk. 2011. «Chloroplast microsatellite primers for cacao (*Theobroma cacao*) and other Malvaceae». *Am. J. Bot.* 98(12):e372-374

VIII. APÉNDICES

A. Concentración y pureza de ADN de pruebas de extracción aplicadas en el estudio

Cuadro A1. Muestras de referencia del CATIE. ADN extraído por método Doyle y Doyle (1990) a partir de hojas desecadas.

Muestra	A260	A280	A320	Concentración (ng/ul)	Pureza (A260/A280)
Yuca (1)	0.011	0.006	0.003	40	1.83
Yuca (2)	0.007	0.003	0.001	30	2.33
IMC-67 (1)	0.006	0.002	0.000	30	3.00
IMC-67 (2)	0.009	0.003	0.001	40	3.00
UF-613 (1)	0.012	0.005	0.002	50	2.40
UF-613 (2)	0.006	0.003	0.001	25	2.00
			Promedio	35.83	2.43
			Desviación estándar	9.17	0.49

Cuadro A2. Muestras de finca La Cruz. Hojas maceradas, almacenadas un día a -80 °C; ADN extraído por método Doyle y Doyle (1990).

Muestra	A260	A280	A320	Concentración (ng/ul)	Pureza (A260/A280)
1	0.041	0.032	0.019	110	1.28
2	0.019	0.011	0.003	80	1.73
3	0.008	0.004	0.002	30	2.00
4	0.015	0.009	0.004	55	1.67
5	0.029	0.019	0.011	90	1.53
6	0.019	0.011	0.004	75	1.73
7	0.017	0.011	0.050	165	1.55
8	0.013	0.009	0.004	45	1.44
9	0.019	0.013	0.007	60	1.46
10	0.017	0.012	0.007	50	1.42
11	0.013	0.008	0.004	45	1.63
12	0.011	0.007	0.003	40	1.57
13	0.012	0.008	0.004	40	1.50
14	0.018	0.011	0.002	80	1.64
15	0.015	0.009	0.004	55	1.67
16	0.012	0.007	0.002	50	1.71
17	0.014	0.007	0.002	60	2.00
18	0.021	0.012	0.004	85	1.75
19	0.013	0.008	0.003	50	1.63
20	0.014	0.008	0.002	60	1.75
21	0.013	0.008	0.003	50	1.63
22	0.038	0.024	0.013	125	1.58
23	0.024	0.015	0.006	90	1.60
24	0.017	0.010	0.005	60	1.70
25	0.027	0.019	0.011	80	1.42
26	0.003	0.002	0.002	5	1.50
27	0.024	0.015	0.006	90	1.60
28	0.024	0.017	0.012	60	1.41
29	0.017	0.010	0.004	65	1.70
30	0.026	0.015	0.009	85	1.73
31	0.021	0.013	0.006	75	1.62
32	0.017	0.014	0.012	25	1.21
33	0.021	0.013	0.006	75	1.62
34	0.016	0.010	0.005	55	1.60
35	0.037	0.027	0.019	90	1.37
36	0.022	0.014	0.008	70	1.57
37	0.020	0.016	0.006	70	1.25
38	0.017	0.009	0.003	70	1.89
39	0.020	0.012	0.005	75	1.67
40	0.016	0.009	0.003	65	1.78
41	0.030	0.019	0.009	105	1.58
42	0.025	0.016	0.008	85	1.56

Cuadro A3. Muestras de finca La Cruz. Hojas maceradas, almacenadas 1.5 meses a -80 °C, ADN extraído por el método de Doyle y Doyle (1990).

Muestra	A260	A280	A320	Concentración (ng/ul)	Pureza (A260/A280)
1	0.021	0.013	0.006	75	1.62
2	0.008	0.004	0.001	35	2.00
3	0.010	0.008	0.006	20	1.25
4	0.013	0.007	0.002	55	1.86
5	0.011	0.007	0.004	35	1.57
6	0.016	0.009	0.002	70	1.78
7	0.006	0.003	0.001	25	2.00
8	0.014	0.012	0.009	25	1.17
9	0.013	0.011	0.009	20	1.18
10	0.015	0.010	0.007	40	1.50
11	0.011	0.006	0.002	45	1.83
12	0.012	0.007	0.003	45	1.71
13	0.013	0.009	0.005	40	1.44
14	0.018	0.011	0.005	65	1.64
15	0.018	0.012	0.006	60	1.50
17	0.014	0.008	0.003	55	1.75
18	0.021	0.011	0.004	85	1.91
19	0.015	0.009	0.005	50	1.67
20	0.015	0.009	0.004	55	1.67
21	0.021	0.014	0.006	75	1.50
22	0.018	0.011	0.005	65	1.64
23	0.025	0.015	0.006	95	1.67
24	0.016	0.009	0.004	60	1.78
25	0.030	0.018	0.009	105	1.67
26	0.005	0.003	0.002	15	1.67
27	0.036	0.021	0.007	145	1.71
28	0.025	0.017	0.011	70	1.47
29	0.019	0.013	0.007	60	1.46
30	0.033	0.018	0.009	120	1.83
31	0.026	0.017	0.008	90	1.53
32	0.013	0.009	0.005	40	1.44
33	0.009	0.006	0.003	30	1.50
34	0.012	0.007	0.004	40	1.71
35	0.054	0.041	0.028	130	1.32
36	0.019	0.012	0.005	70	1.58
37	0.044	0.032	0.017	135	1.38
38	0.022	0.014	0.006	80	1.57
39	0.015	0.008	0.003	60	1.88
40	0.016	0.008	0.001	75	2.00
41	0.029	0.018	0.008	105	1.61
42	0.018	0.011	0.005	65	1.64
43	0.017	0.010	0.005	60	1.70

Cuadro A4. Muestras de finca La Cruz. Hojas Hojas maceradas, almacenadas un día -80 °C. Tras la extracción, ADN almacenado un mes en isopropanol a -20 °C.

Muestra	A260	A280	A320	Concentración (ng/ul)	Pureza (A260/A280)
1	0.068	0.056	0.030	56	1.87
2	0.123	0.018	0.009	18	1.94
3	0.033	0.003	0.003	3	1.00
4	0.099	0.055	0.037	55	1.49
5	0.106	0.046	0.033	46	1.39
6	0.076	0.060	0.038	60	1.58
7	0.065	0.031	0.025	31	1.24
8	0.063	0.045	0.033	45	1.36
9	0.098	0.064	0.048	64	1.33
10	0.085	0.065	0.049	65	1.33
11	0.085	0.059	0.044	59	1.34
12	0.090	0.062	0.047	62	1.32
13	0.079	0.056	0.041	56	1.37
14	0.059	0.047	0.030	47	1.57
15	0.068	0.060	0.047	60	1.28
16	0.080	0.065	0.053	65	1.23
17	0.064	0.054	0.045	54	1.20
18	0.121	0.107	0.077	107	1.39
19	0.114	0.084	0.068	84	1.24
20	0.097	0.078	0.061	78	1.28
21	0.092	0.077	0.062	77	1.24
22	0.153	0.106	0.080	106	1.33
23	0.160	0.139	0.103	139	1.35
24	0.082	0.067	0.052	67	1.29
25	0.174	0.134	0.098	134	1.37
26	0.068	0.037	0.036	37	1.03
27	0.095	0.085	0.049	85	1.73
28	0.115	0.071	0.049	71	1.45
29	0.053	0.031	0.016	31	1.94
30	0.220	0.099	0.052	99	1.90
31	0.056	0.027	0.015	27	1.80
32	0.045	0.022	0.011	22	2.00
33	0.034	0.014	0.005	14	2.80
34	0.048	0.017	0.011	17	1.55
35	0.332	0.192	0.144	192	1.33
36	0.069	0.057	0.031	57	1.84
37	0.099	0.086	0.051	86	1.69
38	0.053	0.040	0.021	40	1.90
39	0.070	0.054	0.032	54	1.69
40	0.051	0.034	0.013	34	2.62
41	0.089	0.079	0.048	79	1.65
42	0.093	0.065	0.039	65	1.67

B. Genotipo de muestras de referencia

Cuadro A5. Genotipo detectado para las muestras de referencia de las variedades Criollo, Forastero y Trinitario provistas por CATIE.

Marcador	Tamaño del fragmento (pb)		
	Yuca (Criollo)	IMC-67 (Forastero)	UF-613 (Trinitario)
mTcCIR1	196	-	-
mTcCIR3	216	232	224
mTcCIR6	196	192	192
mTcCIR8	303	290	290
mTcCIR10	220	220	220
	215	215	215
mTcCIR11	206	-	-
mTcCIR12	184	202	212
mTcCIR15	239	249	251
	234	234	234
mTcCIR17	214	198	198
mTcCIR21	165	155	155
	160	145	150
mTcCIR22	246	243	243
	239	237	237
mTcCIR26	299	295	295
mTcCIR135	241	232	249
	241	227	227
mTcCIR223	175	204	207
	175	200	192

C. Alelos detectados en cada muestra mediante cada marcador.

Con un “1” se identifican los marcadores amplificados cada muestra y con un “0” los que no amplificaron.

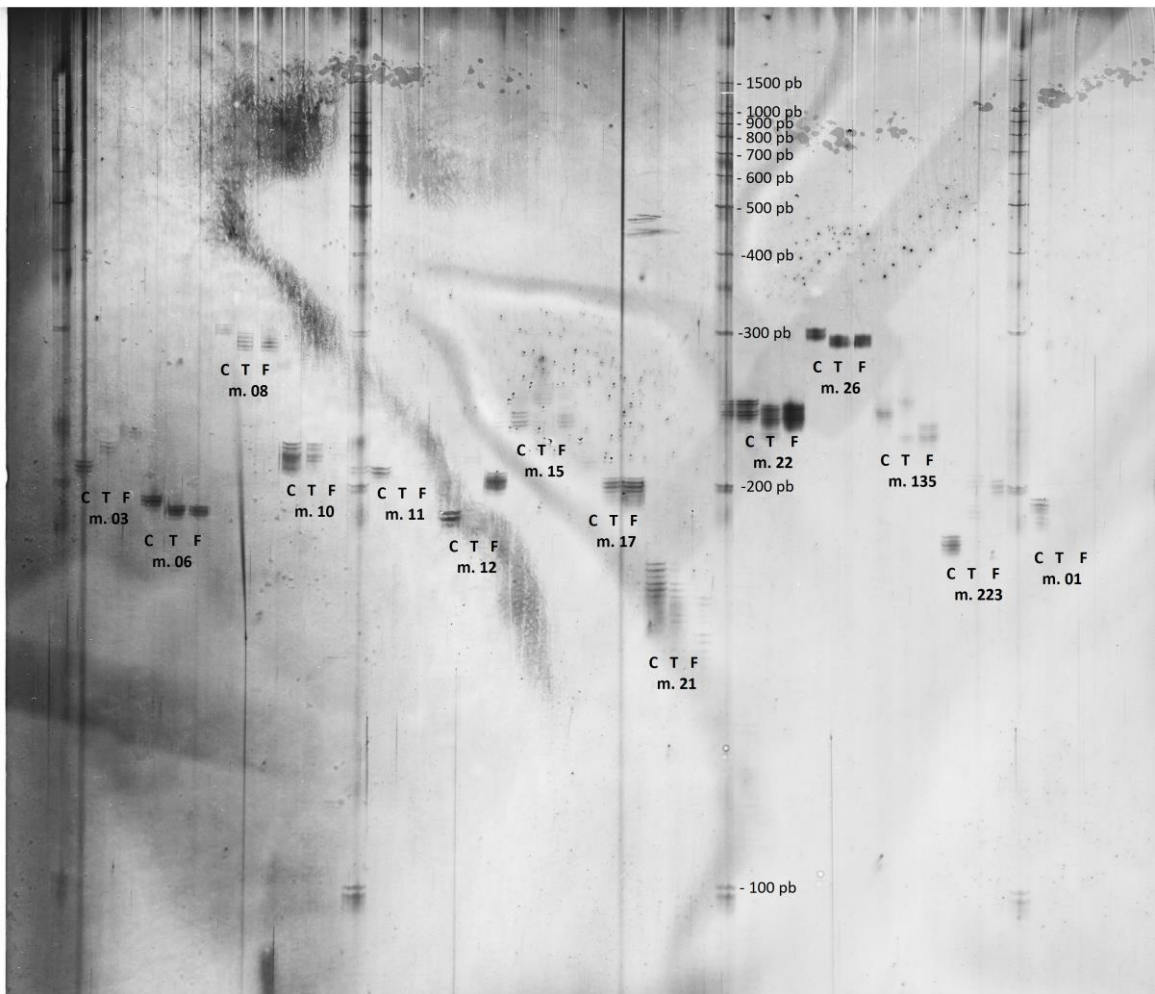
Al final de cada columna se representa en porcentaje el número de marcadores amplificados por cada muestra, mientras que al final de cada fila se presenta el porcentaje de muestras que fueron amplificadas por cada marcador.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
mTcCIR15	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0
mTcCIR22	1	1	0	0	-	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1
mTcCIR3	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	0
mTcCIR11	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0
mTcCIR135	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0
mTcCIR21	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0
mTcCIR12	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0
mTcCIR17	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0
mTcCIR10	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0
mTcCIR248	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0
mTcCIR6	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0
mTcCIR235	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0
mTcCIR277	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	-	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0
mTcCIR1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
mTcCIR26	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1
mTcCIR8	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0
mTcCIR223	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0
	41%	24%	0%	35%	12%	94%	94%	100%	94%	100%	76%	100%	76%	94%	76%	94%	71%	76%	29%	94%	88%	6%	65%	12%

	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	YUCA	IMC	UF
mTcCIR15	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1
mTcCIR22	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
mTcCIR3	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
mTcCIR11	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1
mTcCIR135	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	-	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
mTcCIR21	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1
mTcCIR12	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1
mTcCIR17	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1
mTcCIR10	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1
mTcCIR17	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1
mTcCIR10	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
mTcCIR248	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
mTcCIR6	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	-	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
mTcCIR235	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1
mTcCIR277	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1
mTcCIR1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1
mTcCIR26	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
mTcCIR8	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1
mTcCIR166	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	-	-	1	0	0	1	1	1	1
	94%	29%	6%	53%	47%	82%	59%	88%	100%	94%	88%	76%	82%	76%	88%	12%	71%	76%	24%	29%	47%	100%	100%	100%

D. Visualización de fragmentos de ADN en gel desnaturizante de 50 cm

Figura A1. Fragmentos de ADN visualizados en gel desnaturizante de poliacrilamida al 10%. Se colocó escalera Promega de 100 pb en cuatro pozos; los tamaños de esta están señalados solamente en uno. C: cacao criollo, F: forastero, T: trinitario. El número seguido de la letra “m” corresponde al número de marcador. Ej: m.03 equivale al marcador mTcCIR03.



E. Presupuesto del estudio

Cuadro A6. Presupuesto detallado para electroforesis en gel de poliacrilamida de 50cm.

Gel desnaturalizante 50 cm al 10%					
Solución	Cantidad	Reactivo		Costo	
Buffer TBE 5X	416 ml				
	22.46 g	Tris Base		Q	14.20
	1.94 g	EDTA		Q	4.19
	11.44 g	Ácido bórico		Q	29.19
Acrilamida 10%	80 ml				
	33.63 g	Urea		Q	44.61
	20.00 ml	Acrilamida 37%		Q	12.16
	16.00 ml	TBE 5X		Q	1.83
Fijación	1.5 L				
	150.00 ml	Ácido acético glacial		Q	16.08
Tinción	1.5 L				
	2.25 g	Nitrato de plata		Q	28.80
	2.25 ml	Formaldehído		Q	21.74
Revelado	1.5 L				
	45.00 g	Carbonato de sodio		Q	30.24
	2.25 ml	Formaldehído		Q	21.74
	78.00 ul	Tiosulfato de sodio 10%		Q	0.02
Persulfato 10%	1 ml				
	0.10 g	Persulfato de amonio		Q	0.33
Bind silano	0.2 ml				
	0.20 ml	Etanol 95%		Q	0.02
	0.99 ul	Ácido acético glacial		Q	0.00
	0.99 ul	γ-metacriloxi-propiltrimetoxisilano		Q	0.05
Formamida	0.15 ml				
	0.30 mg	Xilen cyanol		Q	0.02
	0.30 mg	Azul de bromofenol		Q	0.01
	3.00 ul	EDTA 0. 5M		Q	0.02
	0.14 ml	Formamida desionizada		Q	0.30
TEMED	0.045 ml				
	0.05 ml	Tetrametiletlenodiamina (TEMED)		Q	1.66
DMS	2 ml				
	2.00 ml	Diclorodimetilsilano (DMS)		Q	1.18
Escalera molecular					
	4.00 ul	Escalera molecular		Q	-
Costo por gel				Q	228.37

Cuadro A7. Presupuesto detallado para 4 electroforesis en gel de agarosa de 7cm.

Solución	Cantidad	Reactivo	Costo
Buffer TBE 5X	202.4 ml		
	10.93 g	Trisma Base	Q6.91
	0.94 g	EDTA	Q2.04
	5.57 g	Ácido bórico	Q14.20
Acrilamida 20%	22.8 ml		
	5.70 ml	Acrilamida 37%	Q3.47
	1.20 ml	TBE 5X	Q0.14
Fijación	0.3 L		
	30.00 ml	Ácido acético glacial	Q3.22
Tinción	0.3 L		
	0.30 g	Nitrato de plata	Q3.84
	0.45 ml	Formaldehído	Q4.35
Revelado	0.3 L		
	9.00 g	Carbonato de sodio	Q6.05
	0.45 ml	Formaldehído	Q4.35
	15.60 ul	Tiosulfato de sodio 10%	Q0.00
Persulfato 25%	1 ml		
	0.25 g	Persulfato de amonio	Q0.82
Formamida	0.15 ml		
	0.30 mg	Xilen cyanol	Q0.02
	0.30 mg	Azul de bromofenol	Q0.01
	3.00 ul	EDTA 5M	Q0.02
	0.14 ml	Formamida desionizada	Q0.30
TEMED	0.032 ml		
	0.03 ml	Tetrametiletlenodiamina	Q1.18
Escalera molecular			
	4.00 ul	Escalera molecular	Q16.67
Costo por gel			Q67.56

Cuadro A8. Presupuesto detallado por reacción de PCR.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)		
Cantidad	Reactivo	Costo
ul	Agua de PCR	0.02
ul	dNTPs 100mM	0.88
ul	NOVATAQ DNA polimerasa	2.28
ul	Cebadores	0.31
Costo por muestra		Q 3.49

Cuadro A9. Costo para la preparación de soluciones para extracción de ADN.

Extracción de ADN				
Solución	Cantidad	Reactivo		Costo
Cetab	100 ml			
	10.00 ml	Tris-HCL 1M pH 8	Q	7.56
	4.00 ml	EDTA 0.5M	Q	7.80
	8.20 g	NaCl	Q	3.40
	2 g	Cetab	Q	41.30
	1.00 g	PVP-40	Q	10.00
	0.20 ml	2-mercaptoetanol	Q	1.00
	100.00 ml	ddH2O	Q	0.01
Tris-HCl 1M (pH 8)	50 ml			
	7.88 g	Tris-HCL	Q	37.59
	0.8 g	NaOH	Q	0.14
	50.00 ml	ddH2O	Q	0.05
EDTA 0.5M (pH 8)	25.00 ml			
	4.65 g	EDTA disodico	Q	19.34
	0.80 g	NaOH	Q	0.14
	25.00 ml	ddH2O	Q	0.03
Cl	25.00 ml			
	24 ml	Cloroformo	Q	2.02
	1.00 ml	Iso-amyl	Q	0.36
Isopropanol	50 ml			
	50.00 ml	Isopropanol	Q	10.16
Etanol 70%	50.00 ml			
	35.35 ml	Etanol 99%	Q	3.19
	14.65 ml	ddH2O	Q	0.01
costo total (soluciones)				Q 149.15

Cuadro A10. Presupuesto detallado para electroforesis en gel de agarosa para verificar integridad de ADN.

Electroforesis en gel de agarosa			
Agarosa			7.56
Escalera			10.92
GelRed			1.20
Buffer (aprox)			5.00
Costo por gel			24.68

Cuadro A11. Detalle del presupuesto de materiales plásticos de laboratorio necesarios para llevar a cabo el proyecto.

Cantidad	Material	Subtotal
1	Tubos 0.2ml (1000u)	490.00
2	Tubos 1.5ml (500)	290.08
2	Puntas P1000 (1000u)	150.00
2	Puntas P100 (1000u)	300.00
2	Puntas P10 (1000u)	280.00
1	Guantes (100u)	98.00
1	Bolsas plásticas (muestreo)	100.00
Costo total		Q 1,708.08