Análisis RAPD de la diversidad genética de *Theobroma cacao* L. de una población del Litoral Ecuatoriano

Mercedes Carranza[1], Emmerick Motte[2], Virna Cedeño[2], Orly Cevallos[1], Silvia Saucedo[1], Hayron Canchignia [1], Ariel Escobar[1].

[1]Unidad de Investigación, Laboratorio de Biotecnología, Universidad Técnica Estatal de Quevedo. Quevedo, Los Ríos, Ecuador. susycespinosa@yahoo.es

[2]Laboratorio del Programa de Biotecnología. Universidad de Guayaquil. Guayaquil (Guayas, Ecuador)

Recibido: 2010-06-01, aprobado: 2010-08-31

RESUMEN.- En este estudio, los análisis con marcadores RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA) fueron usados para estimar la diversidad genética y la relación de 20 accesiones de *Theobroma cacao* L. de la variedad Nacional en la finca (La Buseta) ubicada en la Parroquia Tenguel provincia del Guayas. Las plantas fueron seleccionadas con criterios de productividad, resistencia, susceptibilidad a enfermedades causadas por hongos como *Ceratocystis fimbriata*, *Moniliophtora roreri* y *Crinipelis perniciosa*. Se utilizaron 14 primers, de los cuales nueve amplificaron, generando 67 bandas de las cuales 59 (88%) fueron polimórficas. Los resultados indican la formación de dos grupos de accesiones A y B, en el grupo A se incluyen dos accesiones y, en el grupo B se encuentran 18 de los cuales incluyen 2 subgrupos B1 y B2. E el subgrupo B1 se incluye la accesión (L-22-H-40), y en el subgrupo B2 están incluidas las accesiones que poseen características de productividad. El nivel de diversidad génica más alto se obtuvo con los primers OPC 04 (0,80), OPC 07 (0,82) y el nivel más bajo fue OPC 01 (0,37). Las accesiones (L-22-H-40; 0,75; L-34-H-07; 0,86) y el (L-42-H-60; 0.72) presentaron los niveles de variabilidad génica más altas, siendo los valores más bajos los mostrados por las accesiones (L-26-H-64; 0,48) y (L-23-H63; 0,47). El valor de la diversidad total (Ht) obtenida para las 20 accesiones de *T. cacao* L. mediante RAPD fue de 0,636.

PALABRAS CLAVE: accesiones, génica, polimórficas, subgrupos.

ABSTRACT.- In this study, the analysis with RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA) was used to estimate genetic diversity and relationships of 20 accessions of *Theobroma cacao* L. National variety on the farm (the minibus) located in the parish Tenguel province of Guayas. Plants were selected on criteria

of productivity, resistance, susceptibility to diseases caused by fungi such as *Ceratocystis fimbriata*, *Moniliophtora roreri* and *Crinipelis perniciosa*. We used 14 primers, nine of them amplified, generating 67 bands of which 59 (88%) were polymorphic. The results indicate the formation of two groups of accessions A and B. The group A includes two accessions while in B are 18, divided in two subgroups B1 and B2. The subgroup B1 includes the accession (L -22-H-40) and the subgroup B2 includes accessions that have productivity features. The highest level of genetic diversity was obtained with the primers OPC 04 (0.80), OPC 07 (0.82) and the lowest was OPC 01 (0.37). Accessions (L-22-H-40; O.75; L-34-H-07; 0.86) and (L-42-H-60; 0.72) had levels of genetic variability quite large, reaching the lowest values shown by the accessions (L-26-H-64; O.48) and (L-23-H63; O.47). The value of the total diversity (Ht) obtained for the 20 accessions of T. cacao L. RAPD was 0.636.

KEYWORDS: Accessions, gene, polymorphic, subgroups

INTRODUCCION

El cacao (*Theobroma cacao* L.) es una de las principales plantas perennes de uso agroindustrial que se cultiva en la mayoría de países que se encuentran en la zona intertropical; tiene gran importancia dentro de la economía del Ecuador que es exportador desde 1830 del cacao fino de aroma a base de la variedad conocida como Nacional (1). En la actualidad la superficie cultivada en el país de cacao se estima en aproximadamente 362 120 hectáreas, con una producción anual de 95 000 TM y un rendimiento de 0.27 TM/ha-1, lo que significa 5,40 quintales por hectárea al año (2). El Banco de germoplasma de cacao variedad "Nacional" existente en la finca experimental "La Buseta", propiedad de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, es el resultado de la colección sistemática de muestras representativas de cacao Nacional existentes en la región desde la década del 40 por la United Fruit. Sin embargo, esta caracterización se ha basado en caracteres fenotípicos, directamente influenciados por factores ambientales, herencia multigénica, herencia cuantitativa y por la dominancia parcial de algunos caracteres, la cual puede confundir la expresión de un rasgo genético (3).

El mejoramiento genético en cultivos perennes puede tomar varios años y en el caso del cacao puede llevar de diez a doce años hasta lograr un nuevo cultivo; este proceso puede ser acelerado mediante el uso de técnicas moleculares, las cuales han demostrado ser herramientas útiles para el mejoramiento genético y para la selección de varieda-

des con características importantes Con la identificación de marcadores moleculares asociados a *loci* que codifican tanto para características cualitativas como cuantitativas (QTL´s), por su acrónimo en inglés, es posible realizar una selección asistida por marcadores (4).

El presente trabajo busca identificar y caracterizar clones de cacao de la variedad Nacional de las cuales existen registros de comportamiento en campo, utilizando marcadores moleculares RAPD´s, la cual es una herramienta adecuada para estudios genéticos, ya que destacan en la mayoría de los casos las limitaciones de los métodos tradicionales (5); además, se lograría una mejor reclasificación de los materiales en grupos de determinadas tendencias y sería de incalculable ayuda para trabajos a mediano plazo en la obtención de progenies con características estabilizadas gracias al descarte de plántulas inestables con las cuales se podría iniciar programas de mejoramiento genético. El objetivo de este estudio fue estimar la diversidad genética de una colección de *Theobroma cacao* L. variedad Nacional usando marcadores RAPD´s.

MATERIALES Y METODOS

Las muestras foliares de las 20 accesiones de cacao fueron recolectadas e identificadas en la Finca "La Buseta" ubicada en la Parroquia Tenguel provincia del Guayas, Ecuador, Figura 1; posteriormente llevadas al Laboratorio del Programa de Biotecnología de la Universidad de Guayaquil para la extracción de ADN. Las accesiones fueron seleccionadas en base a los siguientes criterios: productivo, tolerante, susceptible y resistente a *Monillia*, susceptible y resistente a *Ceratocystis* y susceptible a *Crinipellis*.

Figura 1. Ubicación geográfica de los principales bancos de germoplasma de cacao Nacional y plano de la finca La Buseta (centro de cacao de aroma Tenguel) Provincia del Guayas de donde se seleccionaron las accesiones de *Theobroma cacao* L.

El análisis estadístico se basó en la codificación de cada banda polimórfica representada a través de las variables presencia (1) o ausencia (0) los mismos que fueron procesados con el método de agrupamiento UPGMA (*Unweighted Paired Prouping Method with Arithmetic Average*) y el coeficiente de similitud de Nei & Li (1979) (6). Se registraron por inspección en una matriz de datos binarios en el programa Ntedit del paquete estadístico Ntsys pc ver. 2,0 (*Applied Biostatistics Inc,* 1998). No se tomaron en cuenta polimorfismos que involucren datos dudosos.

Para la extracción de ADN de cacao se probaron algunos protocolos aplicados a tejidos vegetales, con la finalidad de obtener ADN de buena calidad y aplicable a todas las muestras sometidas al proceso de extracción. El protocolo modificado (Doyle & Doyle 1990) (7) fue el que mejores resultados dio en cuanto a la calidad y concentración del ADN. La integridad y concentración del ADN fueron analizadas por electroforesis en minigeles de agarosa al 1,2% en tampón TAE 1X. La electroforesis se realizó a 90 V por 30 min. (8).

Las muestras de ADN fueron amplificadas utilizando el protocolo propuesto por Faleiro (2001) (10); 40 ciclos cada uno constituido por el primer segmento 94º C 4', segundo segmento 15´´ a 94 ºC, 30´´ a 36 ºC 90 ´´ a 72 ºC, tercer segmento 7 minutos a 72 ºC, y Conservación a 4 ºC). A cada muestra se colocó 3 ml de una mezcla de azul de bromofenol (0,25%; 10). Para la mezcla de la AP-PCR en cada tubo de reacción se colocó una alícuota de los siguientes componentes: ADN (5 ng/ml) 1,00 ml 10X buffer, 5 ml 50mM ClMg, 5 ul primer (1,0 mM), 2,00 ml dNTPs (2,5 mM cada uno), 4,00 ml Taq polimerasa Invitrogen (5 U/ml) 0,2 ml, agua ultra pura 31,8m volumen final: 50,00 ml. Se probaron 14 primers (OPA-02, OPA-04, OPA-07, OPA-12, OPA-15, OPA-16, OPC-01, OPC-04, OPC-08, OPC-09, OPC-10, OPC-07, OPC-13, OPC-14), mismos que han sido empleados en trabajos anteriores de caracterización y diversidad genética de cacao realizados por (Faleiro *et al.* 2002 y Araujo *et al*. 1999) (9), respectivamente.

RESULTADOS Y DISCUSION

La extracción de ADN de cacao se la realizó a partir de hojas de cacao en estado intermedio de madurez, las cuales mostraron los mejores resultados, con el protocolo modificado de Doyle y Doyle (1990), se obtuvo ADN de buena calidad y cantidad, sin degradación, que migró en el gel de agarosa como una banda única de alto peso molecular (Figura 2).

Utilizando las condiciones óptimas de amplificación fue posible analizar la diversidad genética de 20 accesiones de

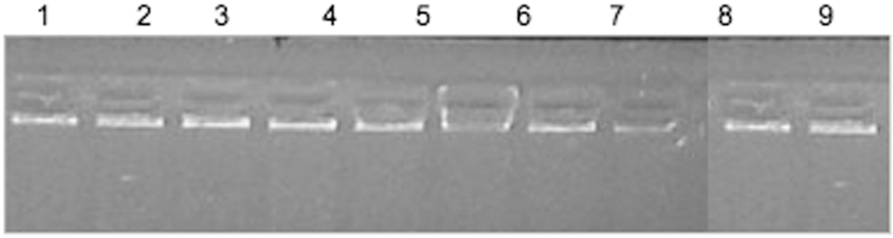

Figura 2. Bandas de ADN a partir de la extracción de 10 accesiones de *Theobroma cacao L* con el método modificado de Doyle y Doyle (1990).

cacao. De los nueve primers utilizados se generaron un total de 67 bandas con un buen nivel de repetitividad. De ellas el 88% (59) bandas mostraron perfiles polimórficos (Tabla 1).

Sobre los 14 primers probados se pudo obtener marcadores RAPD´s dirigidos a tres de las 20 accesiones, de los cuales nueve primers (OPA-15, OPC-07, OPC-9, OPC-4, OPA-O3, OPC-1, OPA-12, OPC-13 y OPA-7) amplificaron bandas claras y reproducibles. Estos primers fueron aplicados a las 20 accesiones con dos repeticiones mostrando perfiles polimórficos. (Figura 3).

Los datos obtenidos con los nueve primers permitieron la construcción de un dendrograma que mostró las relaciones génicas entre las 20 accesiones de cacao (Figura 4). Este dendrograma mostró dos grandes grupos A y B, el grupo A se incluyó a las accesiones (L-30-H-62) que fenológicamente poseen características de susceptibilidad a *Cri-*

Código Operón	Productos amplificados		Polimorfismo
	Monomórficas	Polimórficas	(%)
OPA-15	1	8	87
OPA-03	2	9	77
OPC-04	2	3	33
OPC-13	1	5	80
OPA0-07	0	6	100
OPC-09	1	7	85
OPA-12	0	8	100
OPC-01	1	7	85
OPC-07	0	6	100
TOTAL	**8**	**59**	

Tabla 1. Productos RAPD amplificados con nueve primers decaméricos en 20 accesiones de *Theobroma cacao* L. existentes en la finca la Buseta.

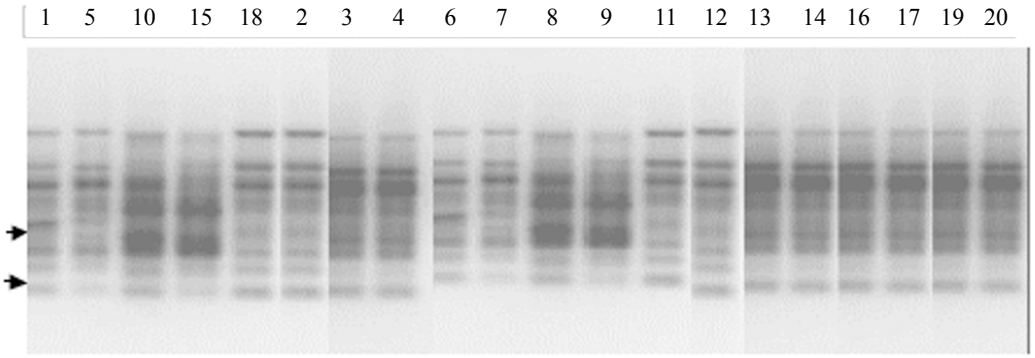

Figura 3. Perfiles RAPDs obtenidos con el primer OPA- O3. Carril 1 al 20 accesiones de *Theobroma cacao* L Se marcan con una flecha algunas bandas Monomórficas (Ver tabla 1 para la identificación de las accesiones) .

nipellis y la accesión (L-34-H07) resistencia a *Ceratocystis*, y en el grupo B se encuentran las 18 accesiones restantes el cual incluye dos subgrupos B1 y B2, en el subgrupo B1 se incluye la accesión (L-22-H40) el cual fenológicamente posee características de resistencia a *Crinipellis*. Y el subgrupo B2 en donde están incluidos las accesiones que poseen características de productividad. Los primers que produjeron los niveles más altos de diversidad fueron OPC 04 (0,80) y OPC 07 (0,82). El primer que reportó el nivel más bajo fue OPC 01 (0,37). Las accesiones que presentaron los niveles de variabilidad más altos fueron (L-22H-40; 0,75; L-34-H07; 0,86) y (L-42-H60; 0,72) mientras que los valores más bajos los mostraron las accesiones (L-26-H64; 0,48) y (L-23-H63; 0,47). La diversidad génica total (Ht) obtenida para las 20 accesiones de cacao mediante RAPD´s fue de 0,636.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos permiten concluir que el mejor protocolo de extracción de ADN de *Theobroma cacao* L. fue el propuesto por Doyle y Doyle (1990) con modificaciones desarrolladas en nuestro laboratorio.

Los primers OPC-4 y OPC-7 mostraron los niveles de diversidad más altos. Los niveles de diversidad media para los primers usados en todas las muestras fue de (Ht=0.63). Los porcentaje de bandas polimórficas para las 20 accesiones de cacao fue 88% con los nueve primers. Las accesiones con características de productividad mediante el análisis RAPD fueron agrupadas en el mismo grupo B2.

Con el propósito de contribuir con la selección asistida por marcadores (MAS) es imperioso desarrollar otros marcadores moleculares hasta alcanzar la cobertura completa del genoma de

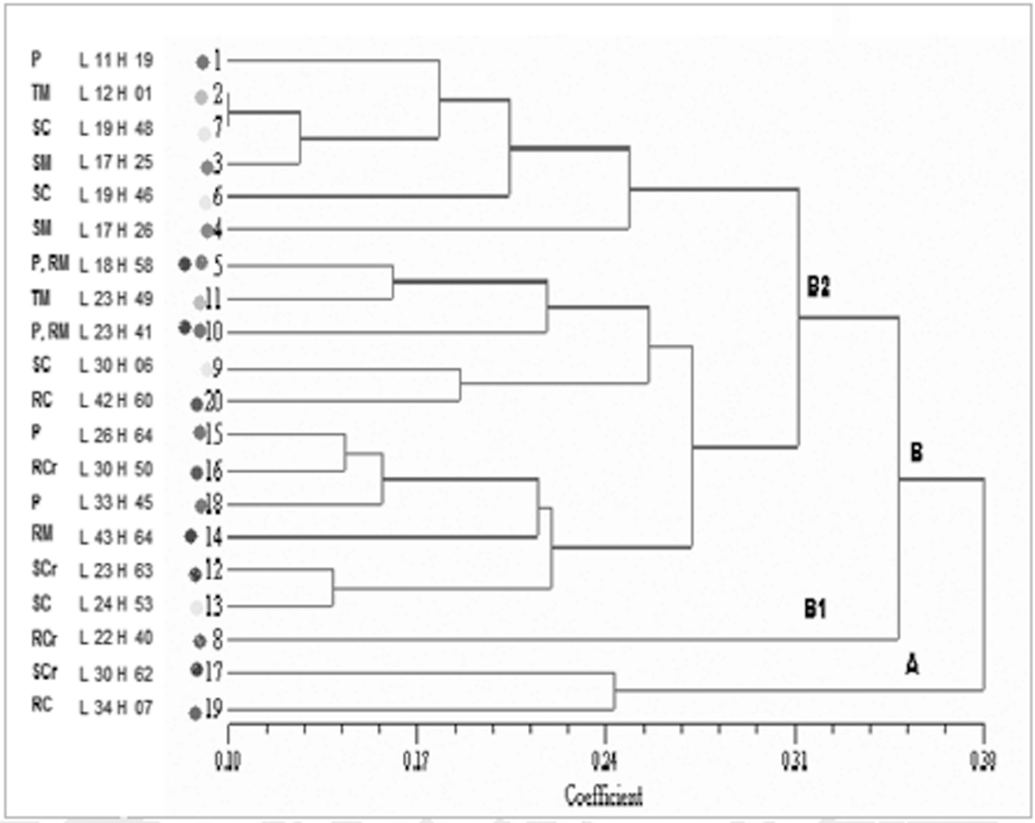

Figura 4. Dendrograma de las 20 accesiones de *Theobroma cacao* L. basado en los RAPDs obtenidos con el coeficiente de similitud de Nei y Li y el método de agrupamiento UPGMa (los números indican a cada accesión, las letras A y B representan cada una de los grupos principales del árbol y las letras B1 y B2 corresponden a los sub grupos). RCr resistencia *Crinipellis*, RC resistencia a *Ceratocystis*, P Productores, SC susceptible a *Ceratocystis*, SCr susceptible a *Crinipellis*, RM resistencia a *Monillia* TM Tolerante a *Monillia*, SM susceptible a *Monillia*

Theobroma cacao L. como los AFLP (Amplificación de fragmentos de longitud polimórfica) y SSCP (Polymerase chain reaction single- strand conformation polymorphism).

LITERATURA CITADA

1. AMORES, F. 1999. La dificultad para establecer el rumbo tecnológico que han limitado el impacto económico de la investigación de cacao durante los últimos 50 años Quito - Ecuador, tesis de maestría. Universidad Internacional SEK pág. 188.
2. SICA. 2005. Servicio de información agropecuaria del Ministerio de Agricultura y Ganadería del Ecua-

dor. Ecuador: Producción mundial de cacao. Fuente:1991-1995- Sistema Estadístico Agropec. Nacional - INEC-1996-1999 Direcciones Provinciales -MAG- DIA *Proyecto ECUANECACAO- Elaboración: Proyecto SICA/MAG- Ecuador (www.sica.gov.ec) 14/septiembre/2005.

3. WILDE, J. R. WAUGH Y POWELL. 1992. Genetic fingerpriting of Theobroma clones using randomly amplified polymorphic dna MARKERS. Theor. Apll. Genet 83: 87.877.
4. FALEIRO, F. 2001. Proyecto BIOMOL/CEPEC/CEPLAC El uso de Técnicas Moleculares para la búsqueda de variedades resistentes a enfermedades de escoba de bruja en cacao. Ilhéus, Brasil, CEPLAC
5. WILLIAMS, J.G.K. LIVAK, K. RAFASKI, J. TINGEY, S. 1990 DNA polymorphic GOMEZ, P. 1998. amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers Nucleic Acids. Reserach 18: 341-345.
6. NEI, M. Y W.H. LI. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proc. Natl. Acad. Sci. 76: 5269-5273.
7. DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12: 13-15.
8. FERREIRA, M. Y GRATTAPAGLIA, D. 1998. Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético. p 100-105. EMBRAPA. Brasil..
9. ARAUJO, L. G., PRABHU, A.S. & FILLIPI, M.C. 1999. Genetic analysis of leaf blast resistance in somaclones of rice cultivar Araguaia. Fitopatología Brasileira 24:182-184.
10. FALEIRO, F., ARAUJO, I., BAHIA, R., SANTOS, R., YOMADA, M. Y ANHERT, D. 2002. Otimização da extração e amplificação de DNA de *Theobroma cacao* L. visando obtenção de marcadores RAPD. Agrotrópica (Brasil) 14(2): 31-34.