

**CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE DIFERENTES TIPOS DE CLONES DE CACAO
PRESENTES EN EL SENA SEDE AGUAS CALIENTES**

LUISA FERNANDA DELGADO MUÑOZ

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE QUÍMICA

BUCARAMNGA

2012

**CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE DIFERENTES TIPOS DE CLONES DE CACAO
PRESENTES EN EL SENA SEDE AGUAS CALIENTES**

LUISA FERNANDA DELGADO MUÑOZ

Tesis para optar por el título de Químico

Director

HERMINSUL CANO CALLE

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE QUÍMICA

BUCARAMANGA

2012

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por darme la fuerza para salir adelante y poner en mi camino a gente maravillosa

A mi familia por toda la buena energía que siempre me dio, en especial a mi tía Solange y a mi primo Edison.

A mi mamá que siempre me brindo su apoyo, comprensión y nunca dejo de creer en mí, quien me ayudo a luchar y nunca desfallecer.

A mis sobrinos Valentina y Juan Esteban por brindar alegría a mi vida.

Al amor de mi vida Cesar Augusto Luna Caceres, mi esposo, la motivación de levantarme cada día, quien estuvo siempre a mi lado, me, dándome además de su amor, toda su colaboración, por quien respiro cada día, a quien dedico todos mis logros, quien hace que todos mis días sean felices, a el que con una palabra convierte un día gris en un día soleado, por ser el motor que me da la fuerza para salir adelante.

A mis amigas Cristina y Diana por brindarme su amistad atreves de estos años, por escucharme y aconsejarme, por reír con mis alegrías y llorar con mis tristezas.

A mi amigo yorguin por apoyarme cuando más lo necesite y con quien se que cuenta sin importar las circunstancias.

A mis amigos del GIFTEX, Didy, Mario, Gato, Jorge, Chucu, por sus consejos y su alegría, nunca encontrare unos amigos como ustedes.

Al profesor Alirio Palma y al Profesor Herminsul Cano, por ser además de mis maestros grandes amigos a quienes quiero y respeto.

Tabla de contenido

INTRODUCCIÓN.....	13
1. MARCO TEÓRICO	15
1.1. CACAO	15
1.1.1. Orígenes.....	15
1.1.2. Clasificación del Cacao.....	16
1.1.3. Propagación del cacao	17
1.1.3.1. Reproducción sexual	17
1.1.3.2. Reproducción asexual vegetativa.....	18
1.1.3.2.1. Propagación vegetativa natural	18
1.1.3.2.2. Propagación vegetativa artificial	18
1.1.4. Partes y proceso de injertación de clones de plantas de Cacao	20
1.2. VARIABILIDAD GENÉTICA DE PLANTAS (TÉCNICAS MOLECULARES).	22
1.2.1. Marcadores Moleculares.....	22
1.2.2. Características de los marcadores	22
1.2.3. Tipos de Marcadores moleculares	22
1.2.3.1. Clases de marcadores moleculares	23
1.3. PRINCIPIOS BÁSICOS PCR (REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA)..	24
1.3.1. Pasos de la PCR.....	25
1.3.2. Componentes de la reacción	26
1.3.3. Importancia de los componentes en la reacción	26
1.3.4. Requisitos del primer.....	28
1.4. PRINCIPIOS BÁSICOS DEL RAPD	29
1.5. FUNDAMENTOS PARA LA ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA	30
1.5.1. Principios de la electroforesis en gel de agarosa.	30
1.5.1.2. Tampón de electroforesis	31
1.5.1.3. Concentración de agarosa.....	31
1.5.1.4. ADN estándar.	32
1.5.1.5. Tampón de carga.....	32
1.5.2. Análisis Estadístico.....	33

2. ESTADO DEL ARTE	35
3. OBJETIVOS.....	38
3.1. OBJETIVO GENERAL.....	38
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	38
4. METODOLOGÍA	39
4.1. TRATAMIENTO DE MUESTRAS Y EXTRACCIÓN DE ADN DE PLANTAS CACAO	39
4.2. CUANTIFICACIÓN DEL ADN EXTRAÍDO	40
4.3. APLICACIÓN DE LA METODOLOGÍA RAPD	41
4.4. DETERMINACIÓN DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA	42
5. RESULTADOS Y ANÁLISIS	44
5.2. CUANTIFICACIÓN DEL ADN EXTRAÍDO.	45
5.3. AJUSTE PARA REALIZACIÓN DE LA TÉCNICA RAPD.....	47
5.4. ESTUDIO DEL ADN OBTENIDO DE LOS CLONES DEL THEOBROMA CACAO, L	48
UTILIZANDO RAPDs.....	48
5.5. COMPARACIÓN DE CRITERIOS PARA LA DETECCIÓN DE BANDAS	55
6. CONCLUSIONES.....	57
7. RECOMENDACIONES.....	58
8. BIBLIOGRAFÍA.....	59
9. ABREVIATURAS.....	65
10. ANEXOS	67

TABLA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Características fenotípicas del Theobroma Cacao</i> [12].....	16
Figura 2 <i>Tipos de propagación del Theobroma Cacao,l.</i> [16].....	17
Figura 3 <i>Producción Nacional de Cacao por Departamentos en Colombia 2008-2009.</i> [21]	19
Figura 4 imágenes del proceso de injertación en las plantaciones de cacao. [23].....	20
Figura 5 <i>Clasificación de marcadores moleculares</i> [34].....	23
Figura 6 <i>Ciclos fundamentales de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).</i>	27
Figura 7 <i>Imagen Tap-polimerasa</i> [41].....	27
Figura 8 <i>Cámara de electroforesis horizontal para preparar geles de agarosa y preparación del gel.</i>	31
Figura 9 <i>Transformación de las imágenes de los geles en señales</i> [54].....	34
Figura 10 <i>Precipitado de ADN.</i>	45
Figura 11 <i>Electroforesis cuantificación del ADN</i>	45
Figura 12 <i>Tamaño en pares de bases de los fragmentos *Hind III del ADN del Fago Lambda.</i>	46
Figura 13 <i>Electroforesis productos RAPDs clon CCN-51</i>	48
Figura 14 <i>Diagrama intensidad CCN-51</i>	49
Figura 15 <i>Diagrama 3D CCN-51</i>	49
Figura 16 <i>Dendrograma de UPGMA CCN-51</i>	50
Figura 17 <i>Electroforesis productos RAPDs clon IMC-67</i>	51
Figura 18 <i>Diagrama intensidad IMC-67.</i>	51
Figura 19 <i>Diagrama 3D IMC-67.</i>	51
Figura 20 <i>Dendrograma de UPGMA IMC-67</i>	52
Figura 21 <i>Electroforesis productos RAPDs clon ICS-95</i>	53
Figura 22 <i>Diagrama intensidad ICS-95</i>	53
Figura 23 <i>Diagrama 3D ICS-95</i>	53
Figura 24 <i>Dendrograma de UPGMA ICS-95</i>	54
Figura 25 <i>Comparación Dendogramas clon CCN-51</i>	55
Figura 26 <i>Comparación Dendogramas clon ICS-95</i>	55
Figura 27 <i>Comparación Dendogramas clon IMC-67</i>	56

TABLA DE TABLAS

Tabla 1 <i>Estadística acerca de la producción Nacional registrada de cacao en grano [21]</i>	19
Tabla 2 <i>Matriz de compatibilidad de los clones más utilizados por FEDECACAO [24]</i>	21
Tabla 3 <i>Características principales de los clones más utilizados en Colombia [25]</i>	21
Tabla 4 <i>Clasificación de marcadores moleculares y sus características [34]</i>	24
Tabla 5 <i>Concentración recomendada de gel de agarosa para separar moléculas ADN lineales</i>	32
Tabla 6 <i>Concentración y Volumen de cada uno de los componentes de la electroforesis para la cuantificación del ADN.</i>	40
Tabla 7 <i>Condiciones de la electroforesis de cuantificación</i>	40
Tabla 8 <i>Condiciones para la metodología RAPD [70]</i>	41
Tabla 9 <i>Primer utilizado para la amplificación del ADN según la metodología RAPD</i>	41
Tabla 10 <i>Programa utilizado en el termociclador para la estandarización de la técnica</i>	42
Tabla 11 <i>Condiciones para la electroforesis de los fragmentos amplificados</i>	42
Tabla 12 <i>Relaciones tamaño del fragmento, porcentaje y cantidad de AND en 1 µg λ/ *HindIII.</i> ...	46

LISTA DE ANEXOS

Anexo A	67
Anexo B	67
Anexo C	68
Anexo D	68
Anexo E.....	69
Anexo F.....	69
Anexo G.....	70

RESUMEN

TITULO:

CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE DIFERENTES TIPOS DE CLONE DE CACAO PRESENTES EN EL SENA SEDE AGUAS CALIENTES*

AUTOR:

LUISA FERNANDA DELGADO MUÑOZ**

Palabras claves: Cacao, Marcadores moleculares, RAPDs, Variabilidad genética.

DESCRIPCIÓN

Debido a la incursión del cacao en otros ambientes diferentes a la confitería, se aumento la siembra de este cultivo indiscriminadamente, afectando la calidad de los productos terminados, trayendo como resultado variabilidad en los cultivos. Ante esta situación se desea identificar los tipos de variedades presentes en las fincas, tomando como base técnicas genotípicas. Estas técnicas no son influenciadas por el ambiente, el cual es variante y poco cuantificable. Por esta razón, el presente estudio tuvo como objetivo, caracterizar diferentes tipos de clones de cacao empleando la reacción en cadena de la polimerasa, con marcadores moleculares RAPDs. Estos últimos, permiten identificar los clones por medio de comparación de bandas. Adicionalmente, se hizo una comparación entre el método de detección de bandas visual y el método basado en las intensidades.

Los resultados obtenidos mostraron una alta similaridad entre las muestras del jardín clonal y los lotes de injertación. Esto se pudo apreciar, ya que la mayoría de muestras presenta porcentajes por encima de los esperados, corroborando que la metodología utilizada es eficaz para caracterizar diferentes tipos de clones de cacao. Con respecto a la comparación de métodos, se demuestra por medio de los dendogramas, que el mejor método para identificar bandas es el basado en las intensidades, ya que este aporta mayor confiabilidad a los resultados por no ser un método subjetivo.

*Tesis de Grado.

**Facultad de Ciencias, Programa de Química, Director: Herminul Cano Calle.

SUMMARY

TITLE:

GENETIC CHARACTERIZATION OF DIFFERENT TYPES OF CLONES OF CACAO SENA
BASED HOT WATER*

AUTHORS:

LUISA FERNANDA DELGADO MUÑOZ**

Keywords: Cocoa, Molecular markers, RAPDs, Genetic variability.

DESCRIPTION:

Due to the introduction of cocoa in other environments other than confectionery, was increased planting of this crop indiscriminately, affecting the quality of finished products, resulting in variability in crops. In this situation is desired to identify the types of varieties in farms based genotyping techniques, which are not influenced by the environment, which is variant and little measurable. So this study aims to characterize different types of cocoa clones employing chain reaction of polymerase, using RAPD molecular markers which can identify clones by comparison of bands, further characterize the clones we made a comparison between the method of detecting visual band and the method based on the intensities.

The results show a high similarity between samples of the clonal garden and batches of grafting, because most have ratios above the expected corroborating that the methodology is effective to characterize different types of cocoa clones, For a comparison of methods, is shown by the dendrograms that the best method to identify the bands is based on the intensities as this provides more reliability to the results for not being a subjective method.

*Degree Thesis

**Faculty of Sciences, Program of Chemistry , Director: Herminul Cano Calle.

INTRODUCCIÓN

El árbol *Theobroma cacao* L. es originario de los bosques húmedos de América Tropical y se cree que su propagación se origino en la región nororiental de Colombia, Centro-América y México.

Existen varios tipos de cacao destacándose los criollos, forasteros y trinitarios. Se sabe que todo el cacao producido antes de 1825 provenía del tipo `Criollo'. En 1825 se introducen variedades inferiores a las regiones del Oriente, provenientes de Trinidad y probablemente originarias de zonas situadas en las cuencas de los ríos Amazonas y Orinoco. Dicho cacao se le denominó `Forastero' o `Trinitario'. [1]

A nivel mundial y nacional el *Theobroma cacao* ha adquirido gran importancia económica, debido a su extensa gama de productos y su gran versatilidad. Ya que ahora no solo se utiliza como bebida o dulce en la confitería, si no como medicamentos en los cuales se hace uso de los componentes del cacao como los flavonoides, que ayudan a tratar la diabetes y estimular el flujo sanguíneo previniendo ataques al corazón, derrames cerebrales, entre otros [2], y los antioxidantes que son utilizados en cosmetología en forma de aceites, jabones, brillos labiales y en cremas para tratamientos anti arrugas. [3]

Debido a este incremento internacional y a la necesidad de suplir la demanda interna, Colombia, en particular la región de Santander, han aumentado las hectáreas de siembra de cacao. Muestra de ello son las 29.800 toneladas producidas entre el 2007 y 2008 según la ICCO, con base en cifras de Fedecacao. [4]; además del incremento en las ventas, el cacao es un cultivo con grandes ventajas tales como: la no imposición de cuotas en el Tratado de Libre Comercio (TLC) y la conservación del arancel 0. Asimismo el gobierno incluyó al cacao en el paquete de cultivos tardíos que quedaron libres de impuestos sobre la renta durante 10 años y para el cual existen líneas especiales de crédito en Finagro. Todo esto encaminado a la necesidad de suplir la demanda interna, sustituir cultivos ilícitos e incrementar la exportación de productos terminados. [5]

Sin embargo la siembra de cacao ha sido indiscriminada sin tener en cuenta la compatibilidad de clones, la resistencia a plagas, etc. trayendo consigo graves consecuencias como improductividad de hectáreas y la alta variabilidad genética. Lo que genera diferentes grados de frecuencia de fenotipos y genotipos, lo cual se ve representado en la diversa calidad de los productos ofrecidos. Esto es consecuencia del mal indexado, ya que en dichos cultivos se presentan fenotipos muy similares [6],

dando como resultado la imposibilidad de garantizar un producto con propiedades típicas de un determinado clon.

Ante esta situación los agricultores desean identificar los tipos de clones presentes en sus cultivos por medio de técnicas diferentes a las utilizadas hoy en día, ya que estas técnicas se basan en el fenotipo, el cual no permite diferenciar exactamente un clon de otro. [7]

Con miras a solucionar este problema se propuso utilizar la *Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)* empleando el marcador molecular *RAPD (Amplificación Aleatoria del ADN Polimórfico)*, el cual está basado en el genotipo. Esta técnica es rápida, fácil y confiable, la cual proporciona fragmentos de *ADN* de alto peso molecular, que serán separados mediante electroforesis, permitiendo la visualización de los resultados para un posterior análisis estadístico utilizando dendrogramas que relacionen los posibles polimorfismos presentes entre los clones. [8]

En dicho procedimiento la interpretación de los datos obtenidos es sencilla, pues tiene como bases las secuencias de *ADN* amplificadas y no amplificadas. [9]

El propósito fundamental de dichos resultados es mejorar y renovar la producción de cacao, utilizando esta vez materiales clonales productivos, resistentes a enfermedades y con calidad de grano de cacao aceptable en los mercados nacionales e internacionales, brindando con esto nuevos aportes a los cacaoteros. [10].

1. MARCO TEÓRICO

1.1. CACAO

1.1.1. Orígenes

El género americano *Theobroma L.* de la familia *Sterculiaceae* está integrado por 22 especies en el ámbito mundial, con hábitat restringido a bosques húmedos del Neotrópico.

Esta especie presenta la mayor distribución geográfica, encontrándose desde los estados centro-occidentales hasta el oriente del país. La región con mayor representación específica está comprendida entre Costa Rica y el noroeste de Colombia. De las 22 especies citadas actualmente, la más conocida e importante es *Theobroma cacao, l.*, utilizada para la elaboración de chocolate y otros productos de importancia económica. Esta especie se ha cultivado desde la época precolombina en Centroamérica, aunque se estima que no es nativa de esta región. Al parecer, su crecimiento y propagación natural se extendió desde la región Amazonas-Guayana hasta el sur de México, donde fue introducida a Venezuela alrededor de 1750. [11]

Nombres comunes: Cacao, Cacaotero, Cacao Criollo, Cacao Calabacillo, Cacao Forastero, Cacao Trinitario.

Uso: De las semillas tostadas y procesadas se extrae el chocolate. Ornamental, elaboración de jabones, astringente, emoliente.

Hábitat: Suelos húmedos, semihúmedos y secos. Muy común en haciendas de grandes cultivos. Algunas veces aislados en jardines y patios familiares.

Fenología: Florece y fructifica en los meses enero, abril, mayo, junio, julio, agosto y noviembre. [12]. Ver figura 1.

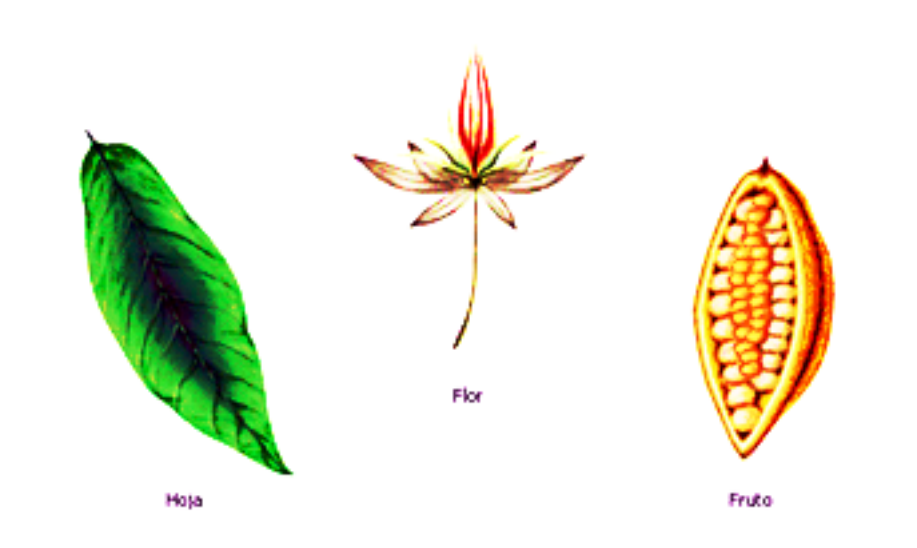


Figura 1. Características fenotípicas del *Theobroma Cacao* [12]

1.1.2. Clasificación del Cacao

Existen 2 formas de clasificar el cacao, según su genotipo o su fenotipo. El primero se caracteriza por tener en cuenta el linaje genético, el cual es determinado por su origen histórico y el segundo toma en cuenta el lugar donde fue cultivado el árbol del cual se obtuvo el cacao. Universalmente el cacao se clasifica según características fenotípicas de la mazorca, la flor y las semillas; Con base en esto existen 3 variedades principales de cacao: criollo, forastero y trinitario. [13]

●**Criollo:** desarrollado en el norte de Sudamérica y Centro América, caracterizado por un fruto frecuentemente alargado, con punta pronunciada, doblada y aguda; la superficie es generalmente rugosa, delgada, de color verde frecuentemente con salpicaduras de rojo a púrpura oscuro y marcada por 10 surcos muy profundos. Los granos son grandes, gruesos, de sección casi redonda con los cotiledones blancos o muy ligeramente pigmentados. De este tipo se obtiene el chocolate de más alta calidad, tiene baja producción y es muy susceptible a enfermedades.

●**Forasteros:** proveniente de la Cuenca Amazónica. El fruto es generalmente de forma ovalada y corta, de color verde o amarilla al madurar, con una superficie lisa. Pericarpio espeso y difícil de cortar a causa de un mesocarpo fuertemente lignificado; granos pequeños y más o menos aplastados, tienen un color entre púrpura claro y oscuro. Este tipo forma un grupo complejo, tanto en sus formas silvestres como cultivadas. Dada su alta producción, el tipo forastero domina la industria mundial.

●**Trinitarios:** localizado en Trinidad. Este tipo es altamente variable dado su origen híbrido. Fue clasificado como tipo Forastero, es de origen reciente y puede ser reproducido artificialmente. Es probable que se trate de una población segregante, que se originó de un cruce entre Forastero y Criollo. En el comercio es conocido como "cacao fino" y su sabor de excelencia. [14]

1.1.3. Propagación del cacao

Existen 2 tipos de reproducción: vegetativa o asexual, y sexual o generativa (ver figura 2). La reproducción asexual no implica la unión de células, y en ella los individuos se desarrollan para dar otros idénticos a ellos. La reproducción sexual implica la unión de células germinales especiales, los gametos. Además, genera variabilidad genética debido a la meiosis. [15]

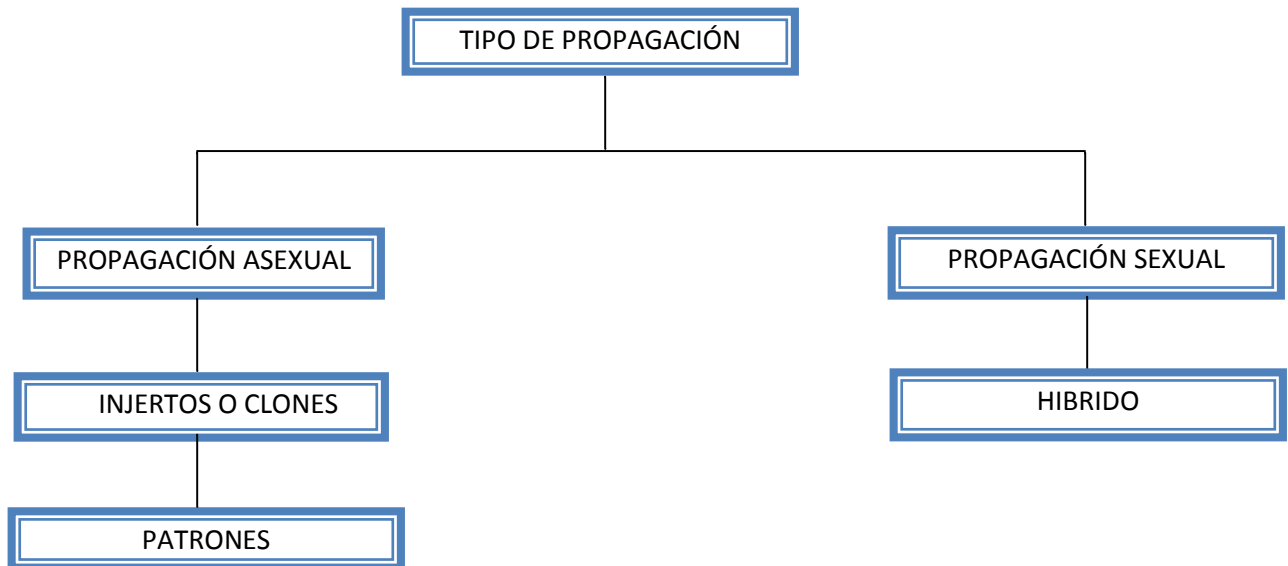


Figura 2 Tipos de propagación del *Theobroma Cacao*,l. [16]

1.1.3.1. Reproducción sexual

En las plantas, los gametos masculinos y femeninos son producidos por un mismo individuo (especies monoicas) o por dos individuos diferentes (especies con sexos separados o dioicos). Estas situaciones se parecen a aquellas encontradas en algunos animales hermafroditas. Pero en el caso de las plantas, la distribución de sexos, y por ende su determinismo, se complica por la alternación de generaciones y por el hecho de que la sexualización puede afectar a una u otra de ellas.

En el reino vegetal, donde los individuos son en general haploides, existe alternación de generaciones heteromórficas (haploides y diploides). La fusión de los gametos implica el desplazamiento de por lo menos uno de ellos, pudiendo establecerse una relación entre el modo de desplazamiento de los gametos y la naturaleza del medio en el que viven las plantas: medio acuático

o medio terrestre. Aún en un mismo medio determinado, los modos de fecundación son diferentes. [17]

Dicho desplazamiento se da generalmente por una "mosquita" (*Forcipomya spp.*, *Ceratopogonidae*), que se ha encontrado en todas las áreas donde se cultiva el cacao. Los áfidos y varias especies de hormigas (*Crematogaster sp.* y *Ectatomma tuberculatum*) también efectúan la polinización. [18]

1.1.3.2. Reproducción asexual vegetativa

Además de la reproducción por semillas, las plantas también pueden reproducirse por propagación vegetativa, que consiste en el desprendimiento natural o artificial de partes de una planta, que son capaces de crecer hasta formar una nueva planta semejante a la planta original. Las plantas propagadas asexualmente constituyen un clon. Todas las plantas que forman un clon son genéticamente idénticas en herencia y tienen las mismas características de la planta progenitora original. Esto significa que una variedad puede conservar perfectamente todas sus características, aún cuando tal variedad sea totalmente heterocigota, de modo que si se presenta una mutación o un cruzamiento favorable, se puede seleccionar de inmediato y sostenerla como variedad (por ejemplo, naranjas o uvas sin semilla). [19]

La propagación vegetativa se divide en 2 subclases: propagación vegetativa natural y propagación vegetativa artificial.

1.1.3.2.1. Propagación vegetativa natural

La propagación vegetativa natural es de varios tipos según la parte de la planta que intervenga. Las más comunes son: por tallos, bulbos, raíces y hojas.

1.1.3.2.2. Propagación vegetativa artificial

Los humanos recurren a otros medios de reproducción para obtener cosechas de mejor calidad y con mayor cantidad. Algunos de los tipos más comunes de reproducción vegetativa son: por estaca, acodo e injerto. [20]

A pesar de utilizarse la reproducción vegetativa artificial, en Colombia la producción de cacao es diversa, ya que en una misma plantación podemos encontrar tanto clones como híbridos. Esto conlleva a una producción variable, pues en las plantaciones naturales es difícil ver una misma producción en todos los árboles, ya que se dan plantas que pueden llegar a formar 40 y 50 frutos

[19], pero hay otras que no producen nada o son pocas las mazorcas aprovechables en ellas. A pesar de esta variabilidad, el departamento de Santander presenta la mayor producción en Colombia. (Ver tabla 1 y figura 3).

PRODUCCIÓN NACIONAL DE CACAO EN GRANOS 2008-2009(toneladas)			
Departamento	2008	2009	%
Santander	18,179	17.272	47.8
Huila	3.323	3.009	8,3
Arauca	4.179	3.967	11
N. Santander	1,453	1.339	3,7
Antioquia	2.052	2.030	5,6
Tolima	2.114	2.059	5,7
Nariño	1,970	1.795	5
Caldas	600	491	1,4
Valle	353	452	1,3
Cundinamarca	849	551	1,5
Cesar	944	882	2,4
Meta	622	676	1,9
Cauca	286	263	0,7

Tabla 1 Estadística acerca de la producción Nacional registrada de cacao en grano [21]

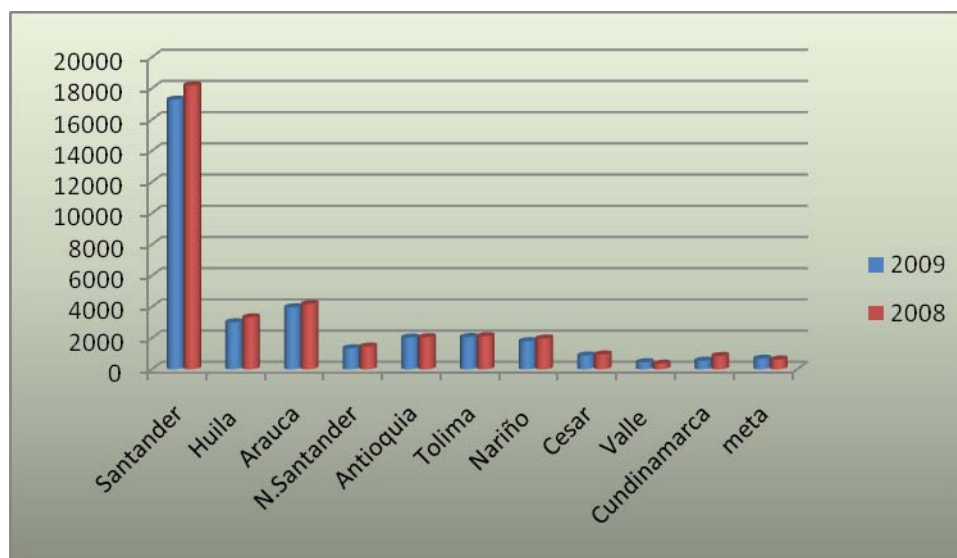


Figura 3 Producción Nacional de Cacao por Departamentos en Colombia 2008-2009. [21]

Debido a este problema en los cultivos, los miembros de las asociaciones cacaoteras y demás personas involucradas en este negocio, se han propuesto introducir en sus cultivos plantas que produzcan una cantidad afín de frutos, para obtener con esto cosechas numerosas teniendo como

base el proceso de injertación. Dicho proceso permite ubicar en todas las plantas de la zona, una yema proveniente de una planta con buenas características de producción, adaptación y resistencia a enfermedades. Para ello, se coloca sobre una planta identificada como *patrón* una yema, que será la encargada de formar las ramas y en general la copa de la planta. Por eso, el éxito de esta labor radica en la selección de la planta que dará origen a todas las copas de su parcela. [22]

1.1.4. Partes y proceso de injertación de clones de plantas de Cacao

La yema y el patrón (ver figura 4) son las partes que componen el injerto, siendo independientes una de la otra y con composición genética diferente, las cuales forman una sola planta. La primera conocida como clon es tomada de una planta seleccionada por su buena producción, la cual se convertirá en la copa del nuevo árbol, encargada de formar las ramas, las hojas, las flores y los frutos. La otra, el patrón conocido como porta- injerto, formará la base o el soporte de la planta conformando el sistema radicular.



A) Yema (clon)

B) Patrón (porta-injerto)



Figura 4 imágenes del proceso de injertación en las plantaciones de cacao. [23]

El patrón debe ser seleccionado por su adaptabilidad a diferentes condiciones de suelo y clima, tolerancia a diferentes plagas y enfermedades radiculares (ver tabla 3) y por su buen vigor vegetativo. Se recomiendan que las semillas provengan de los clones *IMC-67*, *PA-121*, *PA-46*, *PA-150*, *Pound 7*, *Pound 12*, *EET 399*, *EET-400* y *SPA-9*, por su tolerancia a los hongos de la raíz (ver tabla 2). La semilla del patrón se debe obtener de una plantación sembrada para este fin. [24]

Padre ♂	Madre ♀											
	CCN 51	EET 8	ICS 1	ICS 39	ICS 60	ICS 95	IMC 67	SC 6	SCC 59	SCC 61	TSH 565	
CCN 51	C	C	C	C	C	C	C	C	C	I	C	C
EET 8	I	I	I	I	I	C	C	I	I	I	I	C
ICS 1	I	I	C	C	C	C	C	C	C	C	I	C
ICS 39	I	I	C	I	I	C	I	I	I	I	I	C
ICS 60	I	I	C	I	I	I	I	I	I	I	I	I
ICS 95	C	C	I	C	C	C	I	C	I	C	C	C
IMC 67	C	C	C	C	C	C	I	C	C	C	C	C
SC 6	I	I	I	I	I	C	I	I	I	I	I	C
SCC 59	C	I	C	C	C	C	C	C	C	I	C	C
SCC 61	C	I	C	I	I	C	C	I	C	I	I	C
TSH 565	I	C	C	C	C	C	C	C	I	C	C	I

Notas:C= Compatible;I= Incompatible

Tabla 2 Matriz de compatibilidad de los clones más utilizados por FEDECACAO [24]

Características	ICS60	ICS95	IMC67	TSH565	CCN51
Origen	Nicaragua	Trinidad	Perú	Trinidad	Ecuador
Compatibilidad	AI	AC	AI	AI	AC
Color mazorca	Verde	Rojo	Verde	Rojo	Rojo
Color semilla	Púrpura	Violeta	Púrpura	Púrpura	Púrpura
Almendras Mazorca Kg-1	37	41	42	39	48
Cacao Seco Kg -1	20	18	21	24	—
Peso de una mazorca (g)	1,3	1,4	1,2	1,2	1,4
Mazorca arbol-1- año-1	2,6	3,2	2,6	2,5	—
Altitud recomendada (m)	>400	100-1200	100-1200	>800	—
<i>Monilia</i>	T	T	T	S	T
<i>Phytophthora</i>	S	T	S	T	T
<i>Ceratosystis</i>	S	S	T	T	T

Notas: AC = autocompatible; AI = autoincompatible; R = resistente; T = tolerante; MS = moderadamente susceptible; S = susceptible.

Tabla 3 Características principales de los clones más utilizados en Colombia [25]

1.2. VARIABILIDAD GENÉTICA DE PLANTAS (TÉCNICAS MOLECULARES).

1.2.1. Marcadores Moleculares

Se reconoce como marcador a cualquier molécula, orgánica o inorgánica, que sea característica de un organismo o proceso, existen varias clases de marcadores, entre los que encontramos: marcadores morfológicos y moleculares, los primeros son utilizados para estimar la variación morfológica existente en una población, pero poseen grandes desventajas, ya que estos son influenciados por el ambiente y tiene como base el fenotipo de la población, cual es variante y poco cuantificable. [26]

Los marcadores moleculares por su parte corresponde a cualquier gen cuya expresión permite un efecto cuantificable que puede detectarse fácilmente, pueden evaluarse desde los primeros estados de desarrollo del individuo, aplicándose a todo el individuo o solo parte de él. Bajo el grupo de los marcadores moleculares encontramos 3 tipos; los marcadores bioquímicos, los marcadores de *ADN* y marcadores genéticos, aclarando que no todos lo marcadores genéticos son moleculares ya que solo se puede hablar de marcadores genéticos cuando se transmiten según las leyes básicas de la herencia mendeliana. [27]

1.2.2. Características de los marcadores

- | | |
|---|---|
| (A) polimorfismo | (E) facilidad en la expresión, y simplicidad en la identificación y análisis |
| (B) herencia mendeliana | (F) co-dominancia |
| (C) insensibilidad a la influencia y efectos ambientales | (G) posibilidad de detección en las primeras fases de desarrollo de la planta. [28] |
| (D) ausencia de efectos en el desarrollo de la planta, es decir comportamiento como un gen neutro | |

1.2.3. Tipos de Marcadores moleculares

Marcadores bioquímicos: incluyen las proteínas y las isoenzimas o aloenzimas ,las proteínas son los productos primarios de los genes y se forman mediante los procesos de transcripción y traducción, por lo que se ven menos influenciados por el medio ambiente. Las isoenzimas son diferentes variantes moleculares de una misma enzima presentes en una especie, las cuales desempeñan la misma actividad pero puede tener diferentes propiedades. [29]

Marcadores genéticos: caracteres o genes que debido al ligamiento pueden usarse para indicar la presencia de otro gen. También se conocen biomoléculas que se pueden relacionar con un raso genético. [30]

Marcadores de ADN: se basan fundamentalmente en el análisis de las diferencias en pequeñas secuencias del ADN entre individuos. Constituyen la nueva generación de marcadores moleculares, solucionando el problema de la carencia de marcadores que tenían las isoenzimas.

Las técnicas empleadas para ello son muy diversas y dan el nombre a los distintos tipos de marcadores, los cuales pueden ser de carácter dominante o codominante [31]. Un marcador molecular **monomórfico** es invariable en todos los organismos estudiados, pero cuando presenta diferencias en el peso molecular, actividad enzimática, estructura, o sitios de restricción, se dice que es **polimórfico**. A veces el grado de variación es tal que se denominan **hipervariable**. [32]

1.2.3.1. Clases de marcadores moleculares

Dentro de los marcadores moleculares encontramos 2 clases, los basados en la PCR y los no basados en la PCR [33]. (Ver tabla 4 y figura 5)

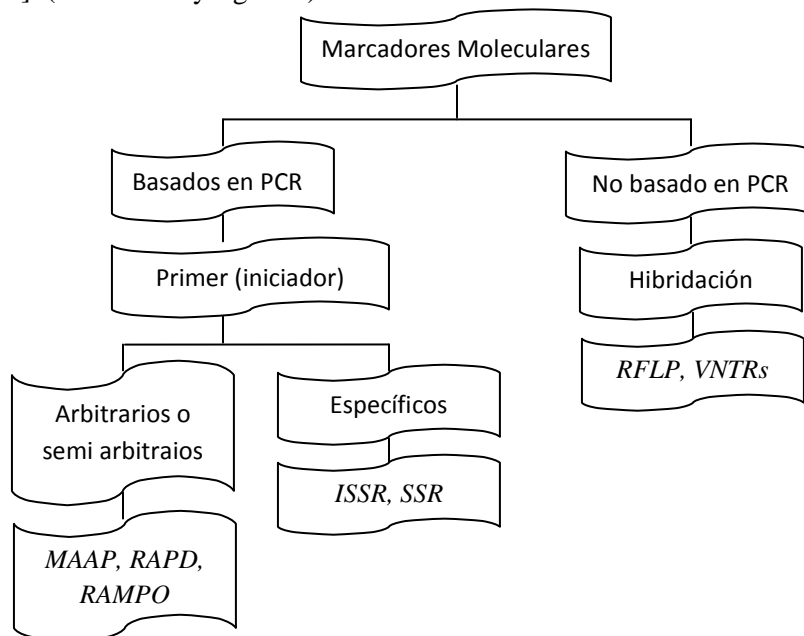


Figura 5 Clasificación de marcadores moleculares [34]

Características	RFLP	Mini satélites	micro satélites	RFLP-PCR	RAPD
Principio	Digestión con Enzimas de restricción, Southern blot e hibridación	Digestión con Enzimas de restricción, Southern blot e hibridación	Amplificación por <i>PCR</i> de secuencias repetidas simples	Amplificación por <i>PCR</i> de locus simple y digestión con Enzimas de restricción	<i>PCR</i> con partidores arbitrarios.
Tipo de polimorfismo	Cambios de bases en sitios de restricción, inserciones y deleciones	Cambios de bases, inserciones y deleciones	Diferencias en longitud debido a número de unidades repetidas	Cambios de bases en sitios de restricción, inserciones y deleciones	Cambios de bases en sitios de unión del partidor al templado inserciones y deleciones
Polimorfismo	Moderado	Bajo	Alto	Moderado	Moderado a Bajo
Nº loci detectados	1 a 3	Muchos	1	1	1 a 10
Dominancia	Codominante	Dominante	Codominante	Codominante	Dominante
Conocimiento del genoma estudiado	Ninguno	Ninguno	Si	Si	No
Dificultad técnica	Intermedia	Intermedia	Baja	Baja	Intermedia
Costo de desarrollo	Intermedio	Intermedio	Alto	Alto	Bajo

Tabla 4 Clasificación de marcadores moleculares y sus características [34]

1.3. PRINCIPIOS BÁSICOS *PCR* (REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA)

Es utilizada para multiplicar (sintetizar) in vitro fragmentos específicos de *ADN* para detectar una secuencia o gen de interés en el genoma del individuo en estudio. Se basa en la amplificación de fragmentos de *ADN* a partir de secuencias de nucleótidos denominadas (primers), que son capaces de reconocer una secuencia blanco para la cual es complementaria. [35], una de las característica de la *PCR* es la sustitución de la enzima primasa por unos iniciadores o “primers” diseñados

previamente, esto se hace fundamentalmente para iniciar el proceso de polimerización en genes y en sitios predefinidos específicamente.

1.3.1. Pasos de la PCR

Desnaturalización: Es una etapa crítica ya que es muy importante que el *ADN* molde se desnaturalice completamente ósea se de la ruptura de los enlaces de hidrógeno. Para lograrlo de manera adecuada se recomiendan temperaturas de 94°C durante 30 segundos a 1 minuto .Cuando la muestra tiene alto contenido de G + C puede aumentar el tiempo o la temperatura.

Sin embargo hay que tener en cuenta que la actividad de la enzima decrece de manera muy rápida a partir de los 95°C, por lo que a estas temperaturas o superiores es aconsejable disminuir el tiempo de incubación. En la práctica se suele añadir un período de desnaturalización antes de comenzar los ciclos para asegurarnos que se produce a lo largo de toda la muestra de *ADN*. Esta etapa suele ser de 5´a 94°C. [36]

Hibridación: la temperatura y el tiempo van a depender de 3 factores relacionados con los oligonucleótidos: la composición de bases, el tamaño y la concentración. En la práctica, la temperatura de hibridación puede oscilar entre 45°C y 65°C, durante un tiempo comprendido entre 30 segundos y 1 minuto. La reducción de la temperatura en este paso facilitará la unión de los primers a las cadenas .La temperatura y el tiempo requerido para el alineamiento de estos depende de la composición, tamaño y concentración de las moléculas iniciadoras. Una temperatura de alineamiento óptima es 5°C por debajo del T_m de los primers. Debido a que las *ADN* polimerasas son activas en un amplio rango de temperaturas, la extensión de los primers puede ocurrir a bajas temperaturas incluyendo el paso de alineamiento. El rango de actividad de las enzimas varia en dos órdenes de magnitud entre 20 y 85°C. Las temperaturas de alineamiento en el rango de 55 a 72°C generan buenos resultados. [37]

Elongación: En la mayoría de las reacciones, la etapa de extensión se realiza a 72°C. Teóricamente esta temperatura puede variar entre 70-72°C. El tiempo de extensión depende del tamaño de la amplificación. Se puede estimar un tiempo de 1 minuto para elongar 1 Kb.En la práctica es normal que al final de todos los ciclos se realice una última elongación de 5´a 72°C.En general la extensión o alargamiento de la molécula iniciadora(primer) se da por medio de la enzima Taq polimerasa. La extensión del primer se realiza tradicionalmente a 72°C. Las estimaciones para la tasa de incorporación de nucleótidos a 72°C varia de 35 a 100 nucleótidos por segundo dependiendo del buffer, pH, concentración de sales y la naturaleza del templado. Un tiempo de extensión de un minuto es considerado suficiente para productos de hasta 2 kb de longitud. Sin embargo, tiempos

mayores de extensión pueden ser útiles cuando la concentración del sustrato es muy pequeña o cuando la concentración del producto excede la concentración de la enzima. [38].

El último paso se efectúa a 72° C, temperatura a la cual, la *Taq polimerasa* actúa, insertando los diferentes nucleótidos complementarios en el orden que le va indicando la cadena que actúa como molde.

El método de *PCR* incluye las tres etapas mencionadas anteriormente las cuales son definidas por tiempos y temperaturas específicas (Figura 6). Cada una de estas etapas es crítica y es repetida de 30 a 40 veces en ciclos térmicos. [39]. Dicho proceso se efectúa en un termociclador, el cual se encarga de realizar los cambios de temperatura necesarios para que se desarrollen las etapas mencionadas. Los ciclos se repiten la cantidad de veces que sea necesario, hasta obtener la cantidad de copias de *ADN* que se requieran.

1.3.2. Componentes de la reacción

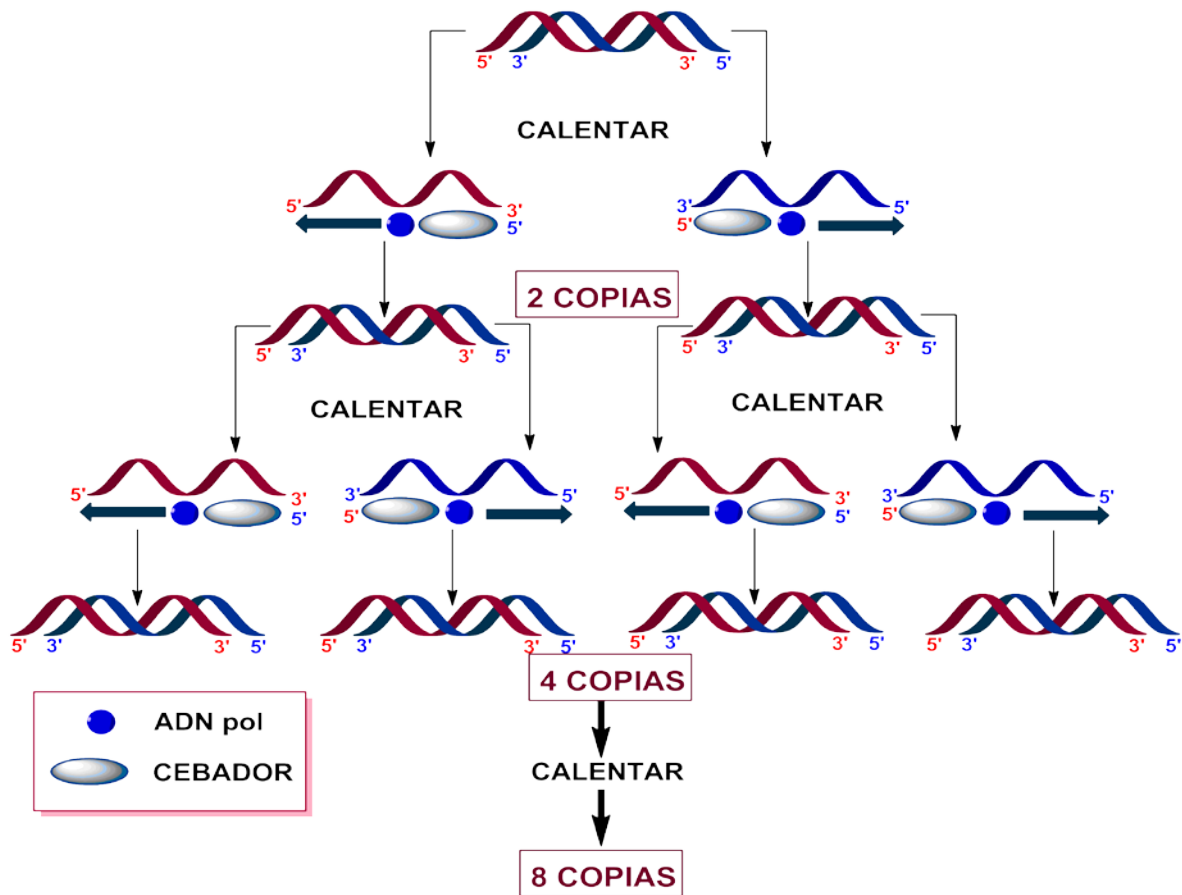
- Polimerasa
- *ADN* de doble cadena
- 2 Oligonucleótidos (primers)
- *DNA* polimerasa resistente al calor (*Taq Polimerasa*)
- Desoxiribonucleotidos (*dATP*, *dTTP*, *dGTP* y *dCTP*).
- Buffer o amortiguador
- Sales($MgCl_2$).[40]

1.3.3. Importancia de los componentes en la reacción

Polimerasa: Es la enzima que dirige la síntesis de *ADN*, desde una cadena simple de *ADN* sintetiza la complementaria. Para ello necesita al menos una pequeña fracción de cadena doble de *ADN* para iniciar la síntesis. Esto es posible, si de forma voluntaria se propone una pequeña fracción de oligonucleótidos que sean complementarios de una porción, éstos se unirán después de la desnaturalización a la doble cadena y crecerán hacia el extremo 3' del *ADN* por la posición de los nucleótidos correspondientes suministrados y, a través de la acción de la polimerasa, se hace la amplificación del fragmento deseado [37]

Primers: es un oligonucleótido, con la propiedad de localizar y unirse a sitios complementarios del *ADN* desnaturalizado. Debe tener un contenido al menos de un 50% de guanina- citosina para funcionar correctamente, la buena selección de estos primers dará como resultado un alto polimorfismo.

TÉCNICA PCR



Nota: ADN pol=Polimerasa

Figura 6 Ciclos fundamentales de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

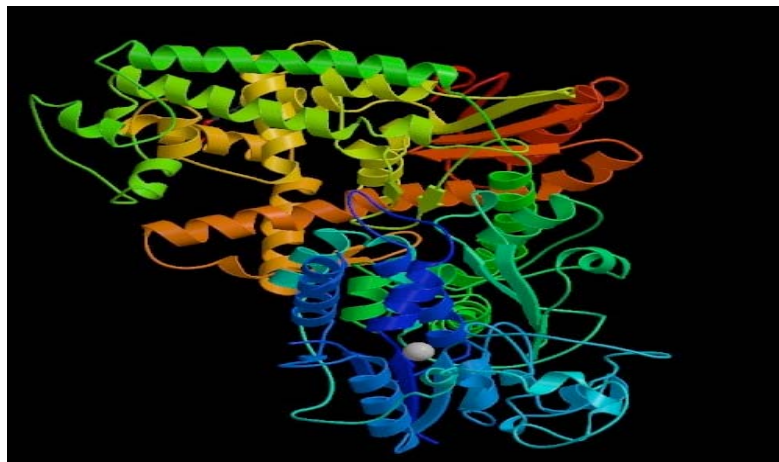


Figura 7 Imagen Tap-polimerasa [41]

1.3.4. Requisitos del primer

- Especificidad: dependiente de su longitud
- Secuencia única dentro del *ADN* que será amplificado
- Composición de bases: entre 45% y 55 % de G/c.
- No debe haber regiones de *poliG* o *poliC*: pueden promover el reconocimiento no específico.
- Evitar regiones *poliA* y *poliT*: interfieren con el complejo del primer- templado, bajando la eficiencia de la amplificación.

Cloruro de Magnesio: la concentración del ion magnesio debe ser optimizada ya que afecta el alineamiento de los primers, la temperatura de disociación de las cadenas (tanto del templado como la del producto de *PCR*), la especificidad del producto, la formación de dímeros de primer, la actividad y fidelidad de la enzima.

Taq Polimerasa: es una enzima ADN polimerasa dependiente termoestable. Tiene la propiedad de restituir la doble cadena de ADN usando una cadena simple como molde a partir de un punto determinado, requiere: magnesio libre en la unión con el templado, los primers y los dNTPs(ver figura 7)

Buffer de PCR: Concentración recomendada 10-50 mM de Tris-HCl (pH entre 8.3 -8.8).

Tris: Buffer iónico bipolar que tiene un pKa de 8.3 a 20°C, sin embargo el verdadero pH de una buffer 20mM de Tris (pH 8.3 a 20°C) varía entre 7.8 y 6.8 durante las condiciones típicas del termociclador. Hasta 50 mM de KCl puede ser incluido en la mezcla de reacción para facilitar el alineamiento de los primers. NaCl a 50 mM o KCl arriba de 50 mM inhibe la actividad de la *Taq polimerasa*. [42]

La *PCR* posee ventajas importantes a la hora de realizar un experimento, pues la cantidad y calidad de la muestra de *ADN* que va a ser amplificado no necesita ser alta, ya que una sola célula o un lisado celular crudo (molde de *ADN* con una longitud de unos pocos cientos de pares de bases) son adecuados para una amplificación exitosa. El principio que se toma como base es que la muestra contenga al menos una cadena de *ADN* intacta que abarque la región que va a ser amplificada y que las impurezas sean suficientemente diluidas como para no inhibir la polimerización. [43]

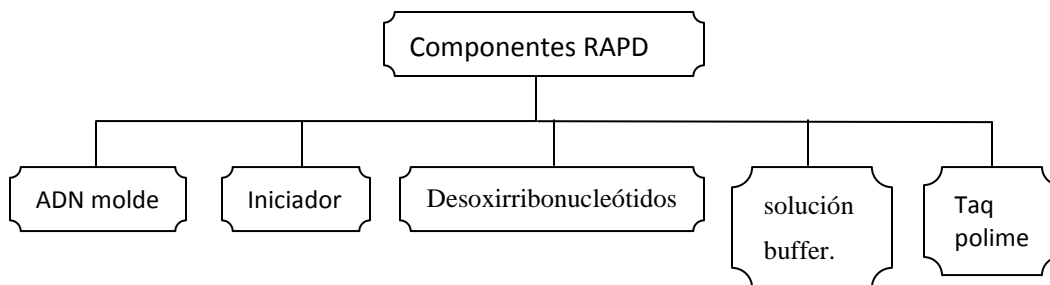
1.4. PRINCIPIOS BÁSICOS DEL RAPD

Los marcadores *RAPD* están inscritos dentro de la categoría de marcadores basados en la *PCR* usando cebadores arbitrarios, se caracteriza por utilizar solo un primer, el cual posee generalmente 10 bases y amplifica secuencias al azar de un patrón complejo de *ADN*, Con esta técnica no se busca ningún fragmento de *ADN* específico, ya que el cebador se adherirá al *ADN* patrón en secuencias complementarias de ubicación desconocida. [44]

Las principales aplicaciones incluyen la obtención de huellas genéticas; (fingerprinting) para la diferenciación de variedades y poblaciones; el análisis de la estructura y diversidad genética en poblaciones naturales, mejoramiento de bancos de germoplasma; el establecimiento de relaciones filogenéticas entre diferentes individuos y especies; la construcción de mapas genéticos de alta cobertura genómica y la localización de genes de interés económico, entre otros.

Una de las ventajas de este marcador es la interpretación de sus datos, ya que están basados en secuencias de *ADN* amplificadas y no amplificadas, produciendo datos binarios que son fáciles de manejar para su análisis [9]. Dichos datos se clasifican utilizando el método de clasificación *UPGMA* que es el más usado y el que produce menor distorsión al compararse con la matriz original de similaridad [45].

Los fragmentos resultantes de la amplificación se pueden separar en geles de agarosa para obtener perfiles electroforéticos que variarán según el polimorfismo de los distintos individuos o grupos de individuos, proporcionando una huella dactilar característica. Esta técnica es muy cómoda, rápida, requiere poco *ADN*, no presupone conocimientos previos sobre la secuencia, y se pueden distinguir rápida y simultáneamente muchos organismos. Sus inconvenientes son que los fragmentos amplificados no suelen corresponder a *ADN* ligado a algún carácter y que no da información sobre el número de copias que el *ADN* genómico contiene de la secuencia amplificada [31].



*Factores que influyen en la eficiencia de los marcadores RAPD [46]

- Número de ciclos de amplificación
- Temperatura
- Cantidad de *ADN* inicial
- Longitud del *ADN*
- Iniciador

1.5. FUNDAMENTOS PARA LA ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA

Es la más utilizada para analizar y caracterizar ácidos nucleicos de distintas procedencias. Los geles se comportan como un tamiz molecular y permiten separar moléculas cargadas en función de su tamaño y forma. Así, moléculas de *ADN* de diferente tamaño van a emigrar de forma distinta. Además, si en dicha electroforesis se aplican marcadores de peso molecular (fragmentos de *ADN* de tamaño conocido) se puede calcular el tamaño aproximado del *ADN* en estudio.

Muchas macromoléculas biológicas importantes poseen grupos ionizables y a un pH determinado, existen en solución como especies cargadas eléctricamente, sean cationes (+) o aniones (-). Según la naturaleza de la carga neta, las partículas cargadas migraran hacia el cátodo o hacia el ánodo. [47]

La distancia recorrida por cada fragmento de *ADN* va a ser inversamente proporcional al logaritmo de su peso molecular. Es importante la utilización de marcadores de tamaño conocido ya que nos permitirán calcular los pesos moleculares de las muestras de *ADN* problema.

En el caso de los geles de agarosa, se le añade bromuro de etidio, sustancia que se intercala entre las bases del *ADN* y es fluorescente cuando se ilumina con luz ultravioleta. Tras la electroforesis, se visualiza el gel con una lámpara de luz UV, y se observan las bandas correspondientes a las muestras de *ADN* amplificado y los marcadores de peso molecular (Ver figura 8). [48]

1.5.1. Principios de la electroforesis en gel de agarosa.

1.5.1.1. Agarosa

Es un coloide natural que se extrae de las algas productoras del agar, por poseer un peso molecular grande (~ 12000 Da) se clasifica como un polisacárido lineal. Una característica física importante es su fragilidad para la manipulación. Estos geles permiten una electroforesis rápida, pero con resolución limitada dando como resultado bandas que tienden a ser difusas y a esparcirse. [49]

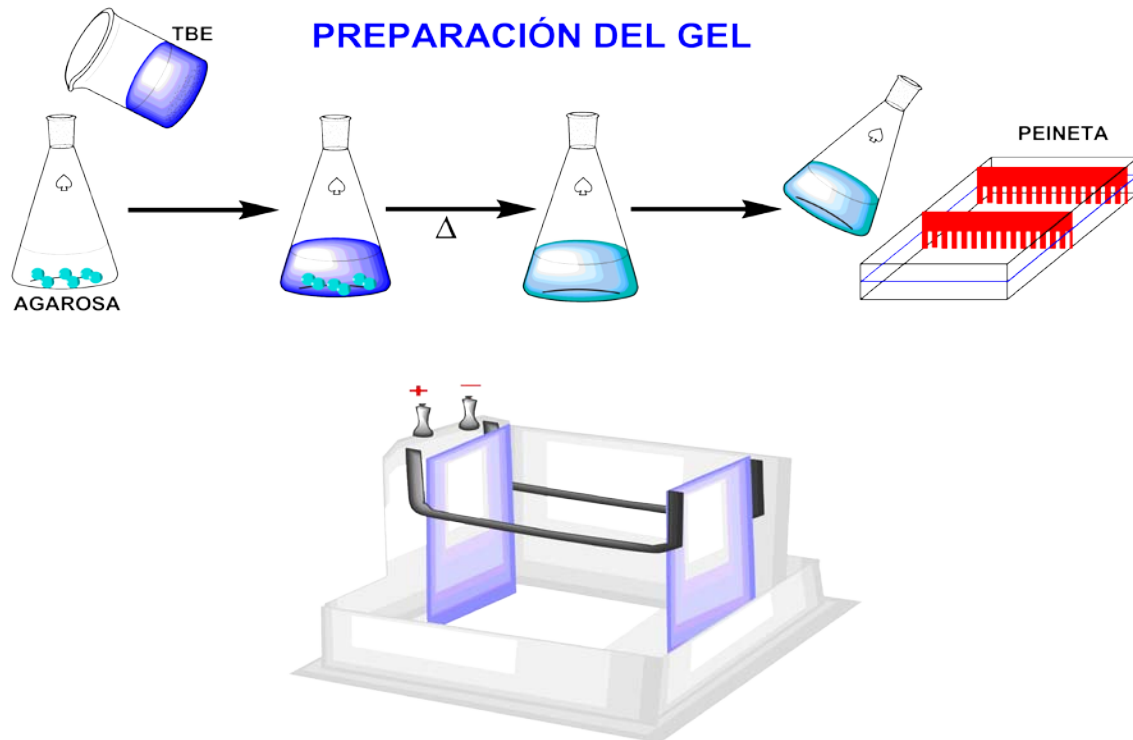


Figura 8 Cámara de electroforesis horizontal para preparar geles de agarosa y preparación del gel.

1.5.1.2. Tampón de electroforesis

El tampón de electroforesis es de gran importancia, pues de él dependen la velocidad, acidez, basicidad, entre otros. Por ejemplo la velocidad es influenciada por la fuerza iónica. Ya que cuando no están presentes iones en el tampón la conductividad eléctrica es poca y el *ADN* migra con poca velocidad, observándose en algunos casos el no desplazamiento de este. Por el contrario cuando en el tampón la fuerza iónica es elevada, la conducción eléctrica aumenta y genera una importante cantidad de calor. Lo que provoca la fundición del gel ocasionando la desnaturalización del *ADN*. Cuando se trata de acidez y basicidad se debe tener en cuenta la electrolisis del agua, pues esta genera protones en la proximidad del ánodo e iones hidroxilos en la proximidad del cátodo; en este caso el tampón evitará que el entorno anódico se acidifique y el catódico se haga más básico a lo largo de la electroforesis.[50]

1.5.1.3. Concentración de agarosa

La concentración de agarosa permite que un fragmento de *ADN* de tamaño determinado (fragmentos que contengan de 20 a 50000 pb) migre a diferentes velocidades. En los geles horizontales, la agarosa se emplea por lo general en concentraciones comprendidas entre un 0.7% y

un 3% (Ver tabla 5). [51]

%de agarosa	Tamaño de ADN (pb)
0.75	10.000-15000
1.0	500-10.000
1.25	300-5000
1.5	200-4000
2.0	100-2500
2.5	50-1000

Tabla 5 Concentración recomendada de gel de agarosa para separar moléculas ADN lineales

1.5.1.4. ADN estándar.

La distancia de migración del ADN está sujeta al peso molecular del material inicial es por esto que debe cargarse un ADN estándar que actúa como un marcador de tamaño conocido, el cual contiene un número determinado de segmentos de ADN conocido, facilitando la determinación del tamaño de ADN desconocido. Este ADN estándar debe ser cargado en los pozos del gel situados en el extremo izquierdo y derecho.

1.5.1.5. Tampón de carga.

El tampón de carga tiene en la electroforesis 3 propósitos: Aumentar la densidad de las muestras para que las gotas de ADN caigan uniformemente en el pocillo, incorporar un colorante a la muestra (lo cual simplifica el proceso de carga) y desplazarse hacia el ánodo a una velocidad previsible por medio de un campo eléctrico

Las muestras de ADN que se cargan en el gel deben tratarse de la siguiente manera:

- Mezclarse con el tampón el cual contiene usualmente agua, sacarosa y un colorante (cianol de xileno, azul de bromofenol, verde de bromocresol, etc.)
- La cantidad máxima de ADN que puede cargarse depende del número de fragmentos
- La cantidad mínima de ADN que puede detectarse mediante fotografía de los geles teñidos con bromuro etidio es de aproximadamente 2 ng en una banda de 0.5 cm de ancho.
- Si una banda de este ancho contiene más de 500 ng de ADN, la ranura estará sobrecargada y se producirá poca visualización o bandas no definidas [52].

1.5.2. Análisis Estadístico

Cuando se realiza un experimento se obtiene datos, que de no ser correctamente analizados no brindarán ninguna información, es por esto que aparte de analizarlos es importante colocarlos en el contexto adecuado para convertirlos en información útil.

Es aquí donde la quimiometría toma importancia, pues es esta la disciplina que cumple con dicha finalidad

La quimiometría química es la disciplina que utiliza la matemática, la estadística y la lógica formal para:

- Diseñar o seleccionar procedimientos experimentales óptimos
- Proporcionar la máxima información química relevante a partir del análisis de datos químicos.
- Obtener conocimiento de sistemas químicos.[53]

Una de las principales áreas de trabajo de la quimiometría es el reconocimiento de patrones, el cual tiene como objetivo fundamental la identificación de relación y/o vínculos entre objetos utilizando principalmente el reconocimiento de patrones para esto se emplea diferentes métodos de trabajo, los cuales se dividen en:

1. Análisis exploratorio de datos
2. Métodos de clasificación

1) Análisis Exploratorio de Datos: se utiliza para poner de manifiesto y resaltar la información contenida en una matriz de datos multidimensional.

2) Métodos de Clasificación: construye modelos capaces de pronosticar la pertenencia de un objeto a una categoría, y se divide en supervisados y no supervisados.

Para el análisis de los datos obtenidos en esta tesis, se utilizó el método de clasificación no supervisada. Ya que esta no requiere información a priori sobre la existencia de clases entre los objetos,

Clasificación No Supervisada: No se necesita de información a priori sobre la existencia de clases entre los objetos, encontrando las posibles clases existentes en la matriz de datos a partir del agrupamiento de objetos con similares características. Entre los métodos empleados por la quimiometría, en la clasificación no supervisada se encuentra el Análisis de Cluster el cual depende de una definición cuantitativa de la similitud entre pares de objetos o grupos en formación.

Muchas veces los resultados de los cluster son presentados en forma de dendograma. En donde los objetos son organizados en filas acorde a su similitud.

Dichos dendogramas son construidos por un software, el cual en este caso tiene como estudio la identificación de bandas, la determinación del criterio de identificación de bandas se puede hacer de

2 formas, una tomando como bases un análisis visual de bandas y otro tomando como base los diagramas de intensidades y 3D que ofrece el software Quantity one.

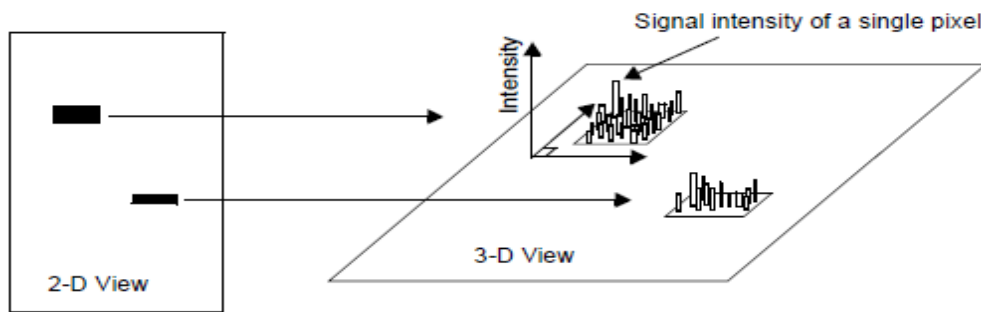


Figura 9 Transformación de las imágenes de los geles en señales [54]

Las coordenadas X e Y son los pixeles horizontales y verticales en la imagen, y la Z es la señal de intensidad. (Ver figura 9)

2. ESTADO DEL ARTE

Usos y aportes de los marcadores moleculares en el mejoramiento de especies forestales

El uso de marcadores moleculares se presenta como una técnica muy utilizada en el análisis de variedades, caracterización y determinación de paternidad en diferentes cultivos. Este tipo de técnica está basada en la *PCR*, la cual permite obtener fragmentos de *ADN* de mejor calidad. Cultivos en los cuales se ha utilizado dicha reacción es el borojo (*Borojoa pationi cuatrecasas*), para determinar el sexo, ya que no es distinguible fenotípicamente por ser dioico. En dicho estudio se utilizaron 56 plantas adultas y 74 plantas del vivero de la Universidad Tecnológica de Pereira, empleando *AFLP* para diseñar un par de marcadores ligados al sexo masculino de 20 y 22 pb. Los resultados mostraron que, la presencia de marcadores moleculares específicos para sexo masculino, fueron consistentes en los 2 grupos de *ADN* formados para machos y para hembras, ya que se obtuvo una sola banda de longitud esperada (173pb) [55].

Otro tipo de implementación de la *PCR* es en el análisis de variedades genéticas, en el cual se utilizan diferentes marcadores moleculares. En el caso de (*phaeoisariopsis Griséola*) se utilizaron 5 primers *RAPD* y 7 primers *RAMS* para 131 aislamientos recolectados de África y Latinoamérica. Los resultados presentados en este estudio mostraron que los aislamientos Afro-Andinos no son un grupo separado, sino aislamientos típicos andinos que han co-evolucionado para colonizar el fríjol. [56]. Otro de los tantos cultivos donde la *PCR* es una técnica altamente utilizada es teca (*Tectona grandis Linn f*), en el cual se realizó un ensayo de progenie de 7 años de edad, compuesto por 27 familias del Instituto de Desarrollo Agrario (Oricujajo, Labrador San Mateo), utilizando 7 microsatélites, donde solo se pudo obtener datos con 3 pares de primers (*TG-AC01*, *TG-AG16* y *TG-ATC02*), con los que se registró un promedio de 8,33 alelos por locus. El Contenido de Información Polimórfica (*PIC*) tuvo un valor promedio de 0,64, lo cual indica que los loci son bastante polimórficos, mostrándose un claro agrupamiento de familias, sugiriendo un alto parentesco de la población investigada [57].

En otros estudios realizados, por ejemplo a la judía, se caracterizaron las plantas de la tercera generación, ya que se deseaba observar la eliminación del acervo genético, ya que en el tipo de varietal judía (*ganxet*) se introdujeron genes de resistencia a enfermedades. Para observar dicha eliminación se utilizó el marcador *RAPD* con 41 primers, siendo útiles 14, mostrando una similitud del 79% [58].

Por otro lado, en el Tabaco se caracterizaron dos nuevas variedades de tabaco, por medio del *RAPD*, tipo *Flue Cured* y otra de tabaco negro. Dicho análisis determinó la identificación de tres variedades de tabaco y sus progenitores usando 64 *primers*, de los cuales 5 permitieron la separación de las variedades en dos grupos de acuerdo con el tipo de tabaco: los Virginia (*Flue Cured*) y los Negros, mientras que un grupo de nueve *primers* separó cada variedad y estableció las relaciones genéticas con sus progenitores, revelándose en total 214 productos polimórficos.

Los estudios realizados muestran que el *RAPD* es una técnica apropiada para establecer diferencias genéticas entre las variedades de tabaco, además pueden ser propuestas como un análisis complementario en la caracterización morfoagronómica, con el fin de cumplir los requisitos de los estándares internacionales para el registro de semillas, establecidos para la identificación de variedades de tabaco.[59]

La *PRC* es utilizada también en bacterias y hongos, para determinar su influencia, propagación y perjuicio en los cultivos. Por ejemplo, la *Moniliophthora roreri* mostró una alta similitud entre las poblaciones de 170 aislamientos de 12 municipios de Antioquia, Colombia. Los valores de diversidad y diferenciación genética en la población, muestran una introducción reciente de *M. roreri* en las plantaciones de cacao, utilizando como marcador molecular *RAPD*. Los 4 *primers* utilizados generaron patrones de bandas con tamaños entre 250 y 2000 pb, los datos obtenidos tuvieron un nivel de similitud de 0.73% [60]. En hongos, es utilizado también el marcador molecular *RAPD* para identificar fragmentos de *ADN* posiblemente relacionados con virulencia (como *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* y *Paecilomyces fumosoroseus*), que tienen un alto potencial como controlador biológico de insectos (*diatraea saccharalis*) en caña de azúcar. Se estudiaron cuarenta *primers* de las series *OPD* y *OPE*, a través de un análisis de perfiles de amplificación de segmentos de *ADN* de los 3 hongos aislados del insecto, encontrándose 8 bandas comunes a los tres materiales biológicos, con un promedio de 68 fragmentos.[61]

Para el *Theobroma cacao*, el cultivo de interés en este trabajo, se han realizado estudios semejantes de análisis y caracterización usando marcadores moleculares. Un ejemplo de esto se realizó en la finca experimental la Buseta, donde se estudió la diversidad genética de 20 accesiones de cacao con base en marcadores *RAPD* con nueve *primers*, obteniendo un total de 67 bandas con un buen nivel de repetibilidad. De ellas el 88% (59) bandas mostraron perfiles polimórficos. [62]

En la estación experimental la Suiza Corpoica, también se caracterizaron 100 genotipos de cacao mediante *RFLPs*, *RAPDs* y *SSR*), utilizando 25 microsatélites publicados previamente. El porcentaje

de amplificación obtenido fue del 100%, lo que permitió identificar 168 alelos. Los niveles de polimorfismo variaron entre 2 y 14 alelos por locus con un promedio de 6,72. [63]

Asimismo, en la estación experimental Agrícola Tulumayo, se tomaron 50 accesiones de diversas procedencias genéticas y geográficas. Los resultados mostraron que según el origen geográfico, se separaron 44 accesiones en dos poblaciones. Se experimentaron con estos genotipos 59 primers ISSR disponibles en las mismas condiciones *PCR*, resultando 13 *primers ISSR* con un perfil de amplificación aceptable, de los cuales se eligieron los 5 mejores para amplificar las muestras, logrando una diferenciación de cacao Nacional del Internacional, obteniéndose un total de 73 bandas amplificadas, de las cuales 66 fueron polimórficas.[64]

Del mismo modo, en la estación experimental de Ocumare se caracterizaron genotipos de cacao criollos pertenecientes a la Costa central venezolana, empleando marcadores moleculares tipo *RAPD* (*OPA-04*, *OPB-07* y *OPC-14*). Dichos primers revelaron la mayor cantidad de fragmentos amplificables y reproducibles, donde la organización de los grupos está estrechamente relacionada con los sitios de recolecta. Cada marcador produjo división de los materiales genéticos, observándose una similitud entre los diferentes primers, los resultados mostraron que el primer *OPC14* fue el que mostro la mejor distribución grupal de los individuos de acuerdo con lo esperado. [65]

También en la estación experimental el Trueno se analizaron 145 materiales pertenecientes al banco de germoplasma *ex situ* del género *Theobroma el copoazú* (*T grandiflorum*) y el maraco (*T bicolor*). A partir de un número inicial de 20 primer, se seleccionaron los 5 capaces de generar mayor número de polimorfismos, para generar 114 bandas que lograron distinguir entre más del 99% de los materiales analizados: 57 bandas para (*T. grandiflorum*) (84,2% polimórficas), 45 bandas para *T. bicolor* (26,7% polimórficas) y 12 bandas compartidas entre las dos especies (58,3% polimórficas), destacándose el primer *OPR-07* el cual mostro 15 bandas totales (93,3% polimórficas). [66]

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar y Clasificar genéticamente Clones de CACAO utilizando Marcadores Moleculares *RAPD*.

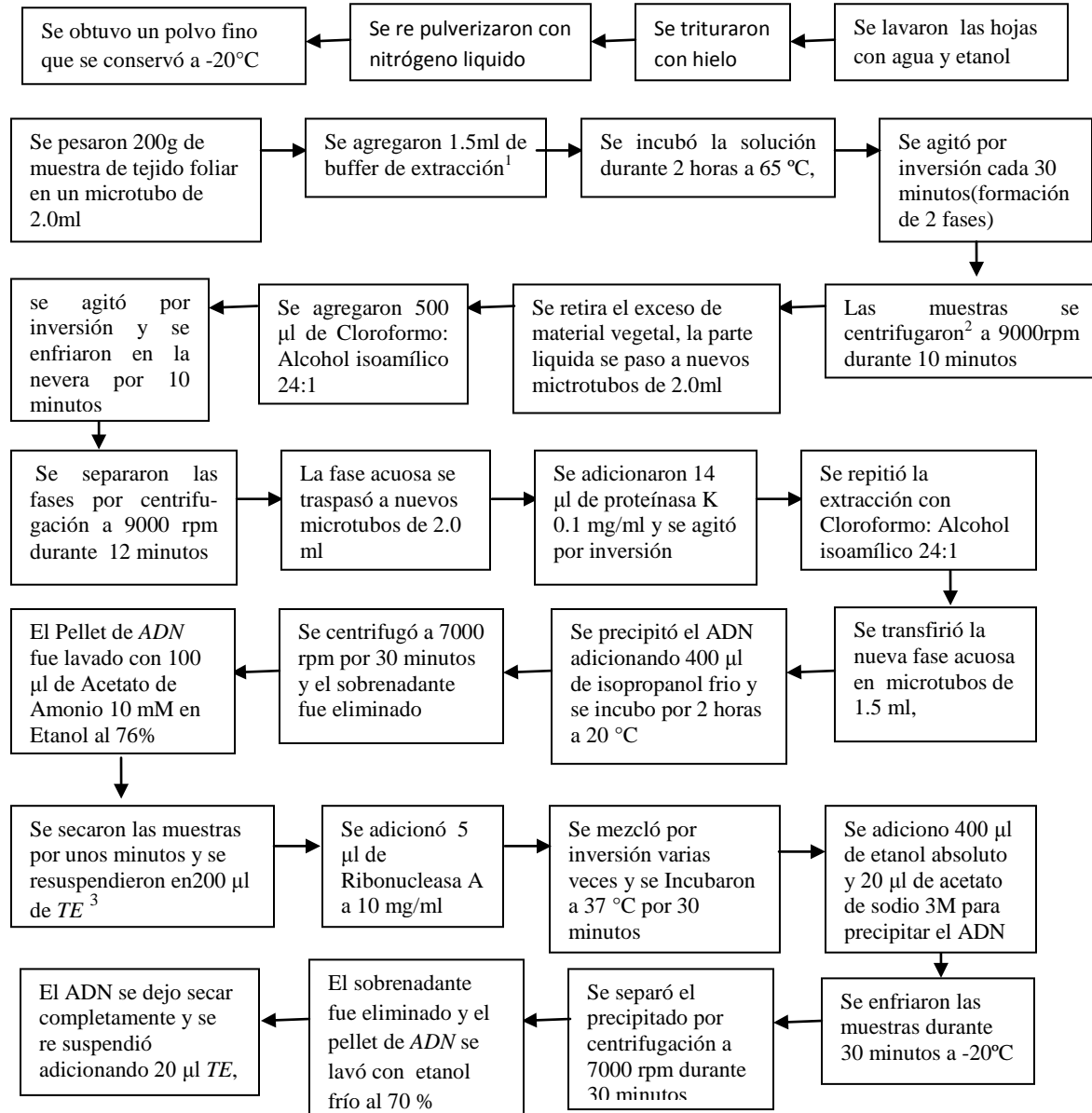
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Optimizar el proceso de extracción, del *ADN* obtenido de la planta de Cacao (*Theobroma cacao,l*).
- Comparar la variabilidad genética entre la planta original y sus posibles clones de plantas de Cacao (*Theobroma cacao,l*).
- Comparar metodologías estadísticas para el análisis genético de los clones

4. METODOLOGÍA

4.1. TRATAMIENTO DE MUESTRAS Y EXTRACCIÓN DE ADN DE PLANTAS CACAO

Lugar de recolección: SENA		Muestras totales: 24	
Sede aguas calientes		Tipo de muestra: hojas	
Clon	<i>CCN-51</i>	<i>ICS-95</i>	<i>IMC-67</i>
Jardin clonal	1	1	1
Lotes injertados	7	7	7



¹ buffer de extracción: 3% CTAB, NaCl 1.4 M, 2-mercaptoetanol 0.2%, EDTa 20 mM pH 8.0, Tris-Base 100 mM pH 8.0, PVPP 1%.

² Centrífuga IEC-CL31 Multispeed con un rotor de microtubos AC2.14 estanco

³ TE: Tris-Base 10 mM pH 8.0, EDTA 1mM pH 8.0

El diagrama anterior muestra el protocolo utilizado en esta tesis, tomando como base el protocolo propuesto en [55] el cual fue elegido por mostrar mayor reproducibilidad, rendimiento y grado de pureza. [64] [67] [68] [69] [70] [71], en este se optimizó la eliminación de polisacáridos, residuos fenólicos, acción de proteínasa K y se ajustó las metodologías en las fases de: macerado manual con hielo seco y retritución con nitrógeno líquido, cantidad y calidad de las muestras, cantidad y concentración de buffer de extracción, tiempo de incubación, tiempo y revoluciones por minuto en la centrífuga y enfriamiento. Cabe anotar que al finalizar el proceso de extracción el ADN extraído se almacenó a -20 °C para su posterior utilización en la cuantificación y análisis por RAPD.

4.2. CUANTIFICACIÓN DEL ADN EXTRAÍDO

Para hallar la concentración del ADN extraído es necesario tener 2 patrones de comparación, para esto fue necesario preparar una solución Stock de *Lambda ADN Hind III Digest* a 0.5 µg/µl (ver tabla 6), y a partir de esta se prepararon dos diluciones de 0.05 y 0.10 µg *Lambda ADN Hind III Digest* en un volumen final de 10 µl. Estas diluciones fueron calentadas a 65°C durante 5 minutos y luego enfriadas rápidamente sobre hielo antes de ser sembradas en los pozos.

La escogencia de las muestras de ADN para la cuantificación fue aleatoria, de las 21 muestras existentes se tomaron 7 y se prepararon 10 µl de cada una de ellas para la electroforesis.

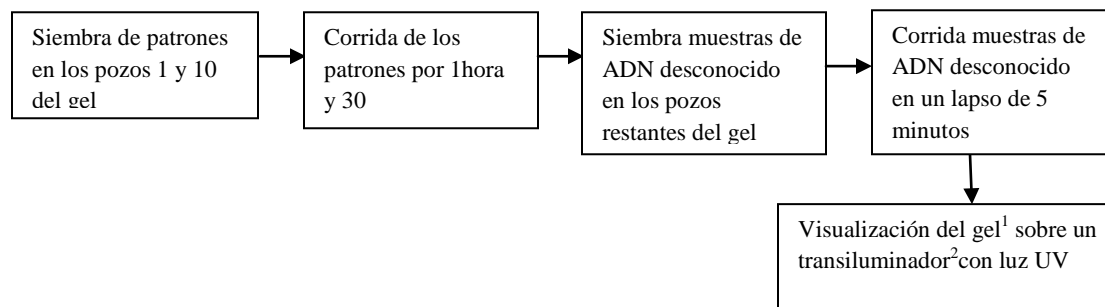
	Solución Stock Lambda ADN Hind III Digest 0.05 µg	Buffer de carga para electroforesis (µl)	Agua destilada y desionizada (µl)	Volumen final (µl)
Dilución 1: Lambda DNA Hind III Digest 0.05 µg	1	2	7	10
Dilución 2: Lambda DNA Hind III Digest 0.10 µg	2	2	6	10
Muestra de ADN de concentración desconocida	8	2	0	10

Tabla 6 Concentración y Volumen de cada uno de los componentes de la electroforesis para la cuantificación del ADN.

Gel de agarosa :	0.75 % disuelta en TBE 1X a pH 8.0
Volumen del gel:	100 ml
Buffer de corrida TBE 1X a pH 8.0 :	300 ml
Tamaño de pozo:	6 mm.
Voltaje:	10 V/cm
Tiempo de corrida :	1 hora y 35 minutos

Tabla 7 Condiciones de la electroforesis de cuantificación

Cuando se desea hallar la concentración de *ADN* desconocido, se recomienda hacer la corrida únicamente con los patrones y cargarlos en los pozos extremos del gel.



¹ Para la visualización del *ADN* se agrega 2 gotas de solución Bromuro de etidio 1.0 µg/ml a la solución del buffer de carga con la agarosa antes de gelificar,

²TRANSILLUMINATOR, 312nm Marca Spectroline,

4.3. APLICACIÓN DE LA METODOLOGÍA RAPD

Las reacciones de amplificación contenían las condiciones mostradas en la tabla 8 y se realizaron en un volumen final de 25 µl.

<i>ADN</i> genómico	7 ng
Primer	1.5 pm/µl
<i>dNTP</i> mix	0.4 mM
<i>DMSO</i>	5 %
Buffer para <i>PCR</i>	1X
MgCl ₂	3.0 mM
Taq <i>ADN</i> polimerasa *	1.25 U/µl.

Tabla 8 Condiciones para la metodología RAPD [70]

*BIOLASE DNA Polymerase de BIOLINE, Estados Unidos

La escogencia del primer utilizado tiene como fundamento, experimentos realizados con dicha planta y bajo las mismas condiciones de trabajo [71] en donde se demostró que el primer *OPR-07* es el primer que presenta mayor grado de polimorfismo. Dicho primer fue sintetizado por *IDT* descrito en la tabla 9.

Nombre del Primer	Secuencia	Cantidad
OPR-07	5'-ACTGGCCTGA-3'	0.31 mg

Tabla 9 Primer utilizado para la amplificación del *ADN* según la metodología RAPD.

Para la realización de la *PCR* se programó el termociclador con las condiciones mostradas en la tabla 10

Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)
1	94	1
45	92	1
	35	1
	72	2
1	72	5

Tabla 10 Programa utilizado en el termociclador para la estandarización de la técnica.

Los fragmentos de *ADN* amplificados por la *PCR* se separaron en la electroforesis que se realizó siguiendo los parámetros de la tabla 11.

Gel de agarosa	1.7 % disuelta en <i>TBE</i> * 1X a pH 8.0
Volumen del gel	100 ml
Buffer de corrida	<i>TBE</i> *1X a pH 8.0
Buffer de carga	4 µl
Tamaño de pozo	6 mm
Volumen de siembra	20 µl
Voltaje de la electroforesis	10 V/cm
Tiempo de corrida	1 hora y 30 minutos
Marcador de peso molecular	<i>ADN Ladder</i> 100 pb 7 µl

Tabla 11 Condiciones para la electroforesis de los fragmentos amplificados
* *Tris-Borato-EDTA*

Los fragmentos de *ADN* amplificados fueron visualizados de la misma forma que en la cuantificación de *ADN*.

4.4. DETERMINACIÓN DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA

Los fragmentos amplificados que comigran por presencia del mismo primer *RAPD* se conocen con el término «banda de *RAPD*».

En esta tesis se usaron solo aquellas bandas intensas y claramente distinguibles (bandas polimórficas), aquellas que no eran uniformes (bandas no polimórficas) no se computaron y aquellas bandas pobremente resueltas o tenues se computaron como «dato perdido».

Las bandas polimórficas detectadas para cada variedad, se analizaron con el criterio de presencia (1) y ausencia (0) de bandas.[72]

El software Quantity one de Bio-Rad se utilizó para realizar el análisis estadístico tomando como criterio la intensidad de las bandas y el peso molecular, este programa construye la matriz de similitud a partir de la matriz básica de datos binarios (MBD), empleando el coeficiente de Jaccard [73]. El coeficiente de similitud de Jaccard varía entre 0 (todas las bandas entre los genotipos son diferentes) y 1 (todas las bandas entre los genotipos son idénticas). Como resultado del análisis se obtiene el dendograma, el cual se generó con el algoritmo del método de agrupamiento no pesado de las medias aritméticas (UPGMA) [74]

5. RESULTADOS Y ANÁLISIS

5.1. REALIZACIÓN DE LA METODOLOGÍA A SEGUIR PARA LA EXTRACCIÓN DE ADN DE CLONES DE PLANTAS DE *THEOBROMA CACAO*, L.

Para la metodología de la extracción de ADN genómico de las muestras de cacao se tomaron como base protocolos propuestos en diferentes artículos relacionados con extracción para material genético de *Theobroma cacao* y otras plantaciones [6] [75] [76] [77].

Para obtener mejores resultados y adecuar los protocolos a las condiciones de trabajo en el laboratorio se realizaron ciertas modificaciones tales como: aumento en la cantidad de material a extraer, el cual mejora la cantidad de ADN extraído, aumento en la concentración de detergente mejorando la solubilización de proteínas, tejidos y membranas que puedan atrapar el ADN y aumento en la velocidad de las revoluciones en la centrifugación que mejora la separación del ADN de los tejidos, proteínas ácidos nucleídos entre otros. Para corroborar la efectividad del nuevo protocolo se realizaron extracciones de prueba con hojas de cacao, seguida de electroforesis mediante el uso de marcadores moleculares (*RAPD*) [78] observándose presencia de ADN en estas. Debido a estos resultados se procedió a efectuar el protocolo a todas las 21 muestras recolectadas

Las modificaciones efectuadas al protocolo original de extracción mostraron mejorías tanto en la cantidad como en la calidad de ADN, presentando cambios específicos como:

*Aumento en la concentración de ADN debido a la mayor accesibilidad del detergente a los organelos de las células, esto se debe al aumento en la concentración del CTAB, el cual por ser un detergente catiónico tiene la capacidad de co-precipitar selectivamente con el ADN al cambiar la concentración de sal en la solución amortiguadora, por ejemplo en condiciones de baja fuerza iónica tiene como preferencia la unión con el ADN y en condiciones de alta fuerza iónica tiene tendencia a formar complejos con proteínas y polisacáridos.[79]

*Aumento en la calidad del ADN eliminando las proteínas y el ARN que afectan los análisis en la cuantificación y en la amplificación de este, esto debido a la utilización de Proteínasa K y Ribonucleasa.

*Aumento en la pureza del ADN extraído debido a la utilización de PVPP al 1% en la solución extractora, la cual absorbe compuestos fenólicos presentes en los tejidos vegetales evitando así posibles contaminaciones en la extracción final.[80]

*Mejoramiento en la purificación del *ADN* debido a la utilización de la solución de acetato de amonio en etanol en el paso final antes de resuspender , lo que permite limpiar el *ADN* de posibles carbohidratos que estén presentes, solubilizándolos y eliminándolos junto con el sobrenadante.[75]

Los cambios realizados en la extracción tuvieron como fin obtener una mejor y mayor cantidad de *ADN*, que se comprueba en la figura 10 la cual muestra la formación del pellet de *ADN* después de realizar la precipitación etanólica. Los resultados de la electroforesis para la cuantificación (figura 11) ratifica la presencia de *ADN* después de realizar el proceso de extracción estandarizado.

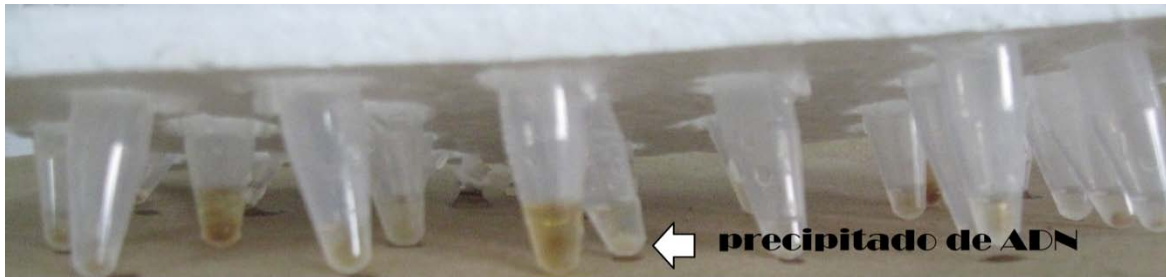


Figura 10 *Precipitado de ADN.*

5.2. CUANTIFICACIÓN DEL *ADN* EXTRAÍDO.

Dicho proceso se realizo haciendo uso del método visual, el cual tiene como base la comparación de intensidades de las bandas del *ADN* extraído con las bandas de un *ADN* de concentración conocida que se utiliza como marcador, en esta ocasión se hizo uso del *ADN del Fago Lambda* cortado con la enzima *Hind III*, ya que es uno de los más utilizados para dicho proceso [73]. Los resultados de la electroforesis de cuantificación se observan en la figura 11.

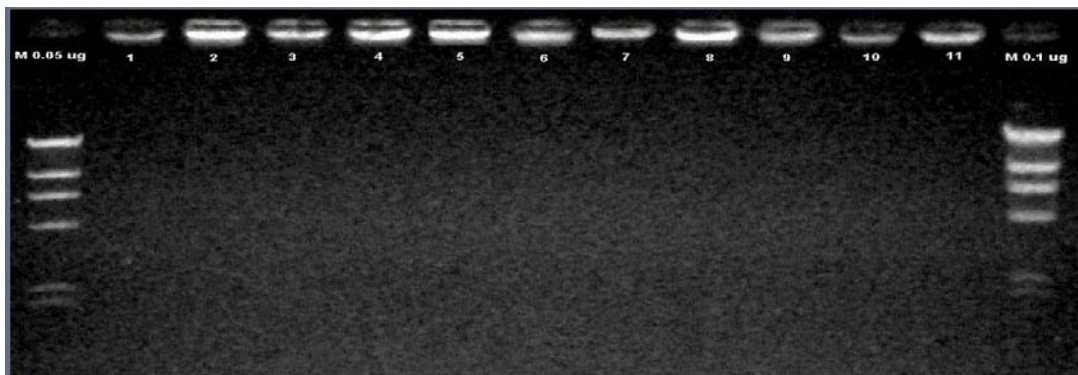


Figura 11 *Electroforesis cuantificación del ADN*

Para conocer el valor de la concentración del *ADN* extraído se prepararon 2 soluciones del marcador con concentraciones diferentes uno de 0.05 (carril 1) y 0.1 (carril 13) μg . Esto se hizo con el fin de

tener patrones que permitieran determinar la concentración del *ADN* extraído por medio de la comparación de intensidades de las bandas. Para esto se tomaron 11 muestras de *ADN* aleatorias de las 21 recolectadas y se corrió la electroforesis con agarosa al 0.75%, este porcentaje se eligió tomando como base los datos contenidos en la tabla 5 y teniendo en cuenta que el *ADN* genómico posee un gran tamaño.

Con base en la cantidad de pares de bases que proporcionan las bandas que presenta el marcador (ver figura 12), se halló la concentración del *ADN* extraído, comparando las intensidades de este con el marcador.

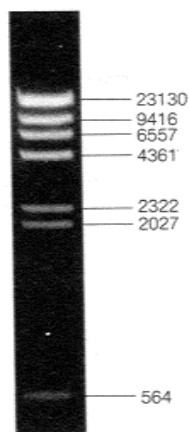


Figura 12 Tamaño en pares de bases de los fragmentos *Hind III del *ADN* del Fago Lambda.
*Inserto del marcador Lambda DNA Hind III digest de Sigma – Aldrich, Inc.

BANDA	Tamaño del fragmento(bp)	%	Cantidad de ADN por banda(ng)
1	23130	47.7	477
2	9416	19.4	194
3	6557	13.5	135
4	4361	9.0	90
5	2322	4.8	48
6	2027	4.2	42
7	564	1.1	11

Tabla 12 Relaciones tamaño del fragmento, porcentaje y cantidad de *AND* en 1 µg λ/ *HindIII.
*Inserto del marcador λ/HindIII BIOTOOLS - Biotechnological & Medical Laboratories, S.A

Tomando como base la tabla 12 donde se muestra el tamaño de *ADN* en pares de base y la cantidad de *ADN* por banda, se cuantificó el *ADN* extraído de los clones de *Theobroma Cacao,l.* de la siguiente manera:

- Teniendo en cuenta las intensidades presentes en los carriles 1-11 de la electroforesis de cuantificación (ver figura 12) ,se observó que la segundaa banda del marcador

correspondiente a 9416 pb (ver tabla 12) en el carril 13 es semejante a la de los clones de *Theobroma Cacao,l*.

- Con base en la tabla 12 se observa que para 1µg del marcador, la banda número 2 representa 194 ng en un volumen de 10 µL, efectuando una relación directa se determinó que para 0.1 µg la cantidad de ADN en esta banda es de 19.4 ng, y la concentración del ADN extraído en un volumen de 20µL es de **1.94ng/ µL**. El cambio de volumen de 10 µL a 20 µL se debe a que el ADN se resuspendió para poderlo conservar mejor.

$$0,1 \mu \text{ del marcador} \frac{194 \text{ ng de ADN}}{1 \text{ del marcador}} \frac{20 \mu\text{l}}{10 \mu\text{l}} = 38,8 \text{ ng del ADN extraído.}$$

$$\text{Concentración de ADN extraído: } \frac{38,8 \text{ ng del ADN extraído}}{20 \mu\text{L de solución}} = 1.94\text{ng/ } \mu\text{L}$$

5.3. AJUSTE PARA REALIZACIÓN DE LA TÉCNICA RAPD.

Tomando como base los experimentos realizados anteriormente con la especie *Theobroma Cacao,l* [6, 8, 43, 44, 55, 65,66], se decidió modificar algunos de los protocolos propuestos para acondicionar estos al laboratorio donde se realizó la experiencia.

Una de las modificaciones fue la optimización de la concentración de MgCl₂ que según la literatura debe estar en un rango de 0,5 a 4,5 mM, para este proyecto se tomó la concentración 3,0 mM ya que mostró la mejor amplificación, resolución y definición de banda.

Esta modificación se realizó debido a que la concentración del ion magnesio afecta: el alineamiento de los primers, la temperatura de disociación de las cadenas (tanto del templado como del producto de PCR), la especificidad del producto, la formación de dímeros de primer y la actividad y fidelidad de la enzima; ya que la *Taq polimerasa* requiere magnesio libre en la unión con el templado, los primers y los dNTPs.

Con base en la literatura se escogió para el análisis de RAPD's el iniciador OPR-07 (5'-ACTGGCCTGA-3') de la serie OP de Integrated DNA Technologies (IDT) que mostró mayores productos de amplificación y un patrón de bandas en los ensayos realizados por triplicado en las diferentes variedades de clones, lo que permitió realizar un mejor análisis de los polimorfismos presentes en dichas especies. (Ver anexo1)

5.4. ESTUDIO DEL ADN OBTENIDO DE LOS CLONES DEL *THEOBROMA CACAO, L* UTILIZANDO *RAPDs*.

Mediante la comparación de patrones de bandas es posible identificar la semejanza entre clones, ya sea entre el patrón (padre) y la yema (hijo) o entre clones de la misma yema; siendo el primer caso el de interés para este proyecto. Para esto se hizo necesario conocer el *ADN* polimórfico del patrón y el *ADN* polimórfico de las yemas de los clones recolectados.

Dichas comparaciones se realizaron por medio de un análisis estadístico de cada una de las variedades de *Theobroma Cacao, l*, haciendo uso del Software Quantity One de Bio-Rad, en el cual se tomó como criterio prioritario la presencia o ausencia de las bandas por medio del análisis de intensidades.

Los resultados obtenidos de las comparaciones, mostraron que entre las 3 variedades de clones estudiados hay un alto grado de similaridad. Al realizar las comparaciones entre el conjunto de los productos de amplificación utilizando el primer OPR-07 , se observó que la mayoría de las muestras comparten un gran número de bandas.

Las figuras 13,17 Y 21 muestran las electroforesis para los productos de amplificación de *ADN* polimórfico de las variedades CCN-51, IMC-67 Y ICS-95.

Para todos los geles el carril identificado con el nombre (CCN-51,ICS-96,IMC-67) serán los productos *RAPDs* obtenidos del jardín clonal (Padre) ,los carriles restantes serán los obtenidos por los lotes de injertación (hijos),el carril identificado como CN será el que corresponda al control negativo en el cual se da la reacción sin *ADN* y el carril identificado como M será el marcador de peso molecular de 1Kb.[73]

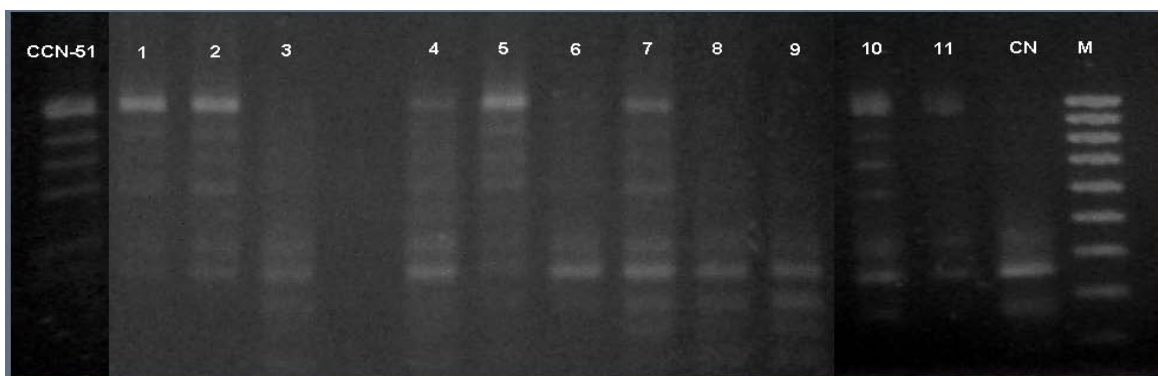


Figura 13 Electroforesis productos *RAPDs* clon CCN-51

Para obtener los dendogramas se utilizó la metodología de intensidades, la cual permite identificar con mayor confiabilidad las bandas (ver figura 14 y ver figura 15)

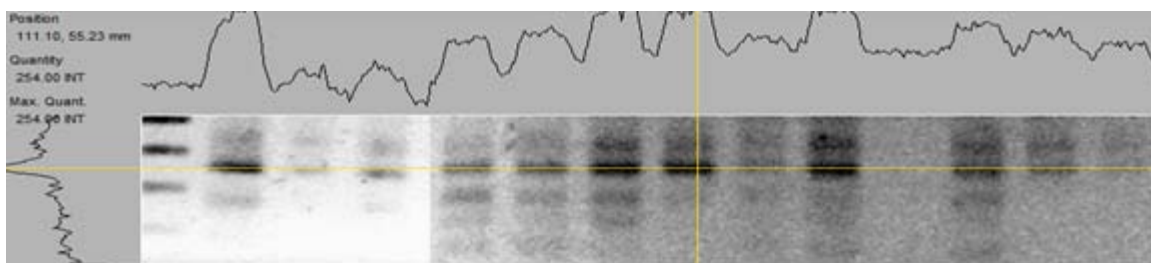


Figura 14 Diagrama intensidad CCN-51

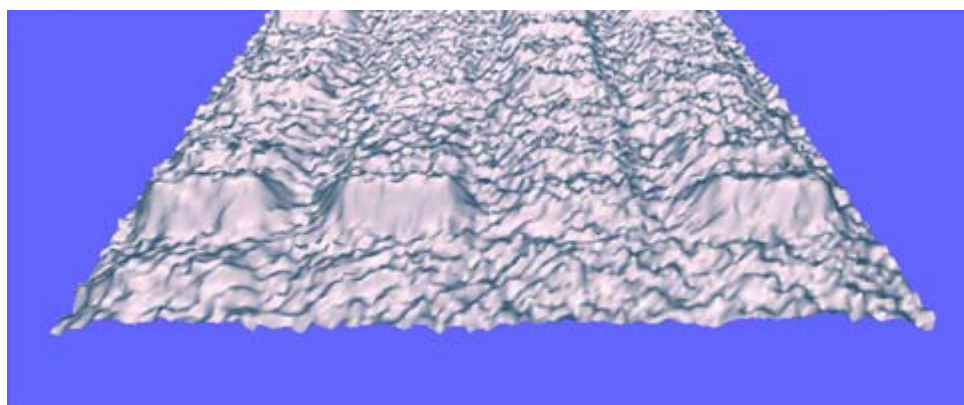


Figura 15 Diagrama 3D CCN-51

Las distancias genéticas entre las muestras para la variedad CCN-51, obtenida utilizando el software Quantity One de Bio-Rad. **Grupo A:** Subgrupo C: [Subgrupo J (muestras 1 y 11) y Subgrupo K (muestra 4)] y Subgrupo D: [Subgrupo L (muestras 2 y 10) y Subgrupo M (muestra 12)], **Grupo B:** Subgrupo E: {Subgrupo G (muestras 6,8 y 9) y Subgrupo H [Subgrupo N (muestra 3) y Subgrupo Ñ (muestra 5)]} y Subgrupo F:(muestra 7).

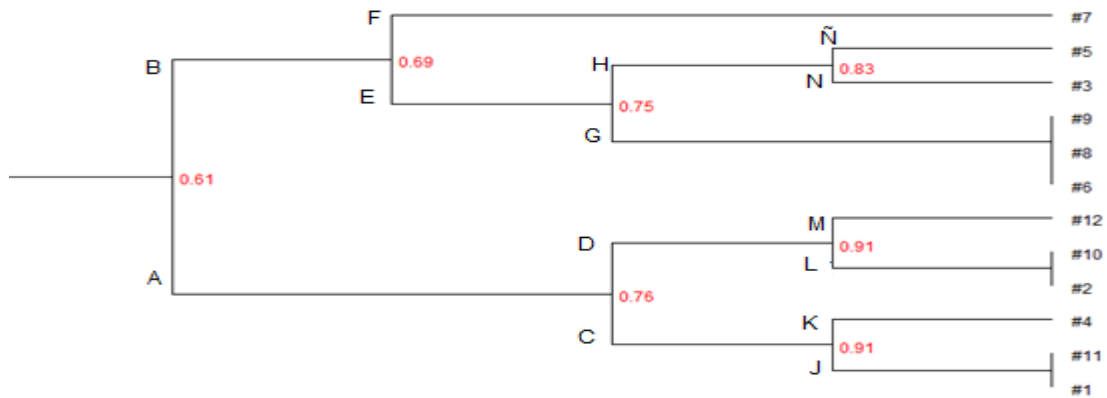


Figura 16 Dendrograma de UPGMA CCN-51

Al analizar las muestras pertenecientes a la variedad CCN-51, se observa un grado de similaridad considerable como se muestra en la figura 16. Se presentan dos grandes agrupamientos (*Cluster*) grupos A y B con un coeficiente de similitud del 0.61.

Los subgrupos C y D presentan una similitud de 0.76 entre ellas, Los subgrupo E y F presentan una similitud de 0.69 entre ellas, Los subgrupos H y G presentan una similitud de 0.69 entre ellas, Los subgrupos J y K presentan una similitud de 0.91 al igual que los subgrupos L y M por ultimo los subgrupos N y Ñ presentan una similitud de 0.83 entre ellas. Con base en estos resultados se puede deducir que los lotes de injertación si pertenecen a la variedad CCN-51.

Para los clones IMC-67 y ICS-95 en el proceso de trituración de las muestras se observo que estas no presentaron un polvo uniforme, lo cual dificulto el proceso de extracción pues el solvente no pudo interactuar uniformemente con toda la muestra, además debido a que las muestras estuvieron guardadas aproximadamente durante 2 meses , (proceso de extracción, *PCR* y *RAPDs* para cada clon) algunas absorbieron humedad, debido a la constante abertura del refrigerador donde estaban contenidas y a la inestabilidad eléctrica que presenta la universidad durante los días sábados , domingos festivos.

Debido a estos inconvenientes para el clon IMC-67 se amplificaron solo ocho muestras y para el clon ICS-95 solo 4, ya que estas mostraron la mayor cantidad de *ADN*, durante el proceso de extracción y amplificación, ya que la integridad del *ADN* es importante para el proceso de amplificación por *PCR*.

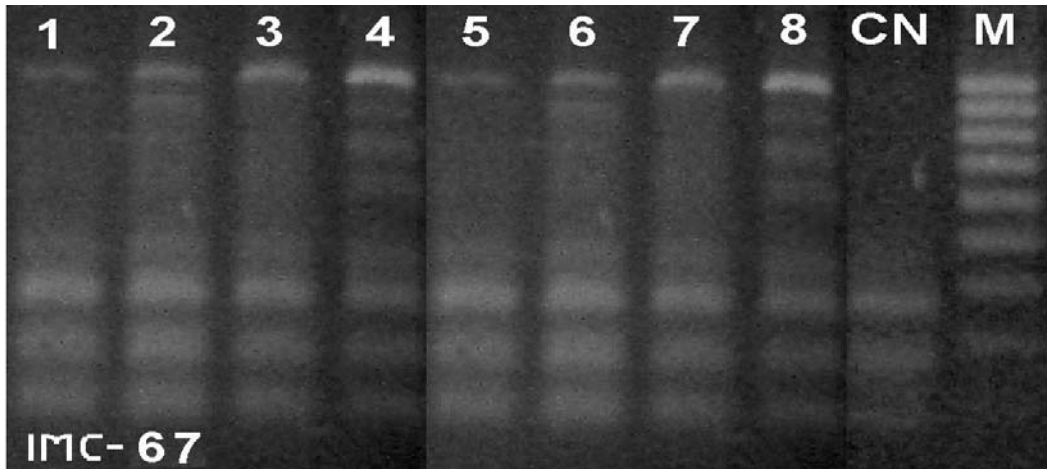


Figura 17 Electroforesis productos RAPDs clon IMC-67

Para obtener los dendogramas se utilizo la metodología de intensidades, la cual permite identificar con mayor confiabilidad las bandas (ver figura 18 y ver figura 19)

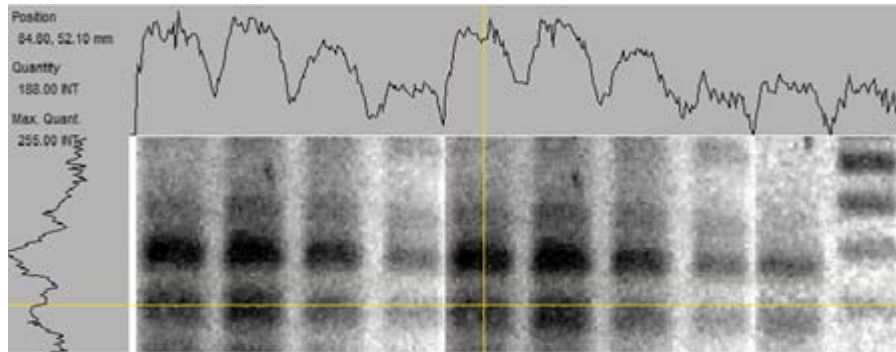


Figura 18 Diagrama intensidad IMC-67.

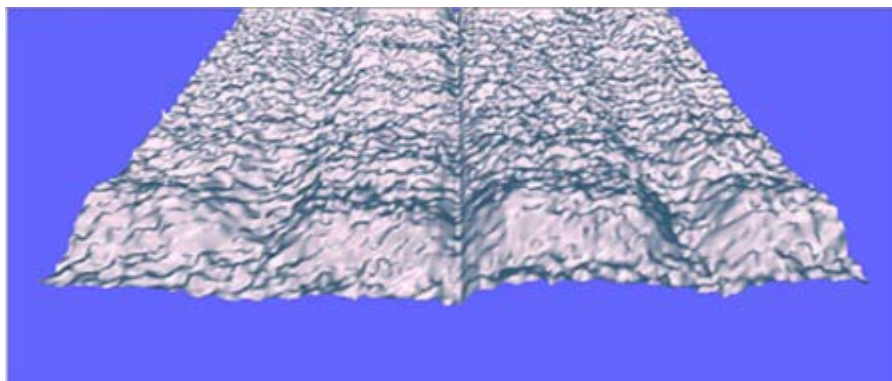


Figura 19 Diagrama 3D IMC-67.

Las distancias genéticas entre las muestras para la variedad IMC-67 obtenido utilizando el software Quantity One de Bio-Rad. **Grupo A:** Subgrupo C: [Subgrupo G (muestras 6 y 8) y Subgrupo H (muestra 7)] y Subgrupo D: (muestras 1 y 4), **Grupo B:** Subgrupo E: [Subgrupo I (mues 3) y Subgrupo J (muestra 5) y Subgrupo F:(muestra 2).

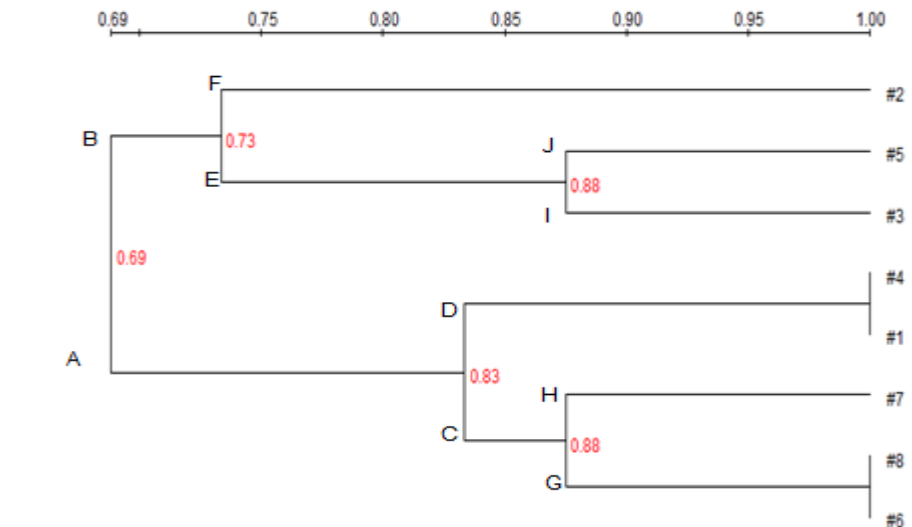


Figura 20 Dendrograma de UPGMA IMC-67

Al analizar las muestras pertenecientes a la variedad IMC-67, se observa un grado de similitud considerable como se muestra en la figura 20. Se presentan dos grandes agrupamientos (*Cluster*) grupos A y B con un coeficiente de similitud del 0.69.

Los subgrupos C y D presentan una similitud de 0.83 entre ellas, Los subgrupos E y F presentan una similitud de 0.73 entre ellas, Los subgrupos H y G presentan una similitud de 0.88 entre ellas, al igual que los subgrupos I y J. Con base en estos resultados se puede deducir que los lotes de injertación si pertenecen a la variedad IMC-67.

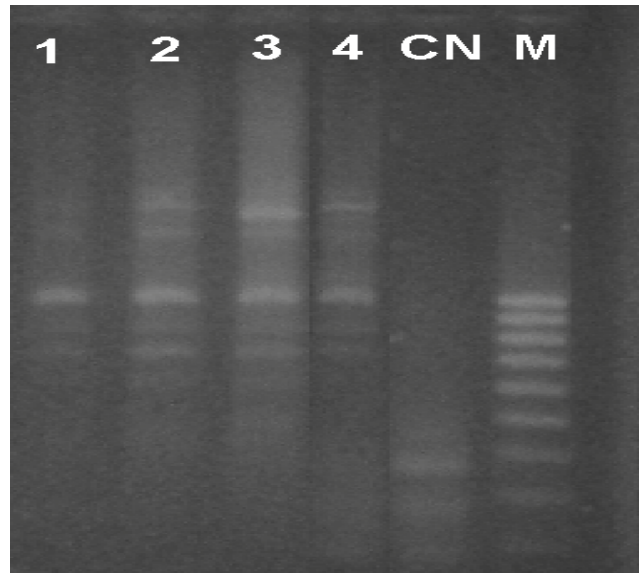


Figura 21 Electroforesis productos RAPDs clon ICS-95

Para obtener los dendogramas se utilizó la metodología de intensidades, la cual permite identificar con mayor confiabilidad las bandas (ver figura 22 y ver figura 23)

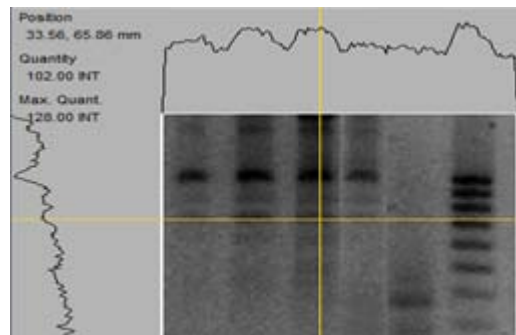


Figura 22 Diagrama intensidad ICS-95

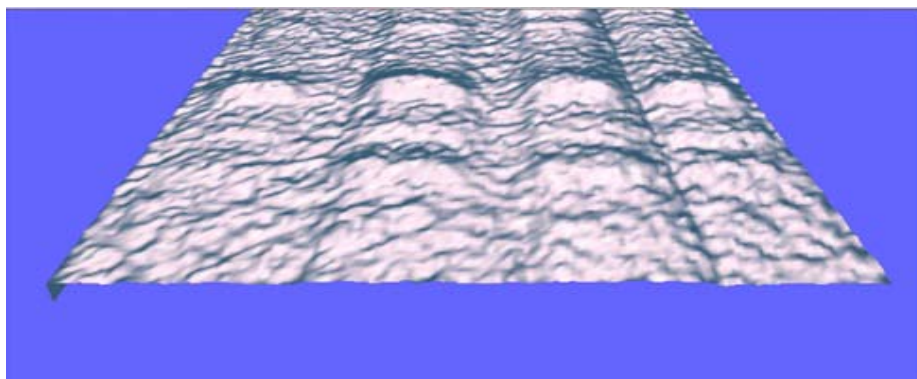


Figura 23 Diagrama 3D ICS-95

Las distancias genéticas entre las muestras para la variedad IMC-67 obtenido utilizando el software Quantity One de Bio-Rad. **Grupo A:** Subgrupo C: (muestras 1 y 3) y Subgrupo D: muestra 4 **Grupo B** muestra 2.

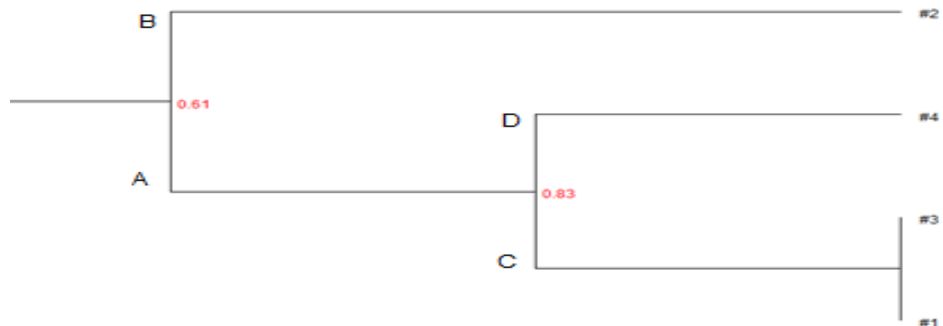


Figura 24 Dendrograma de UPGMA ICS-95

Al analizar las muestras pertenecientes a la variedad ICS-95, se observa un grado de similitud considerable como se muestra en la figura 19. Se presentan dos grandes agrupamientos (*Cluster*) grupos A y B con un coeficiente de similitud del 0.69.

Los subgrupos C y D presentan una similitud de 0.83 entre ellas, Los subgrupo E y F presentan una similitud de 0.73 entre ellas, Los subgrupos H y G presentan una similitud de 0.88 entre ellas, al igual que los subgrupos I y J. Con base en estos resultados se puede deducir que los lotes de injertación si pertenecen a la variedad ICS-95.

Aparte de las electroforesis y los dendogramas, se proporcionaron en este proyecto datos adicionales como las matrices de similitud y tablas donde se relacionan la ausencia y presencia de bandas para cada una de las variedades (Ver anexos del 2-7).

Con base en los análisis estadísticos se evaluó la variabilidad genética de cada uno de los clones estudiados, el clon CCN-51 presento un alto índice de similitud, lo que nos lleva a pensar que por ser el primero en ser analizado fue el que menor contaminación tubo, tanto en la absorción de humedad como en los cambios de temperatura del *ADN* extraído y el *ADN* amplificado ya que esto causa posibles degradaciones.

Para los clones IMC 67 y ICS-95 se observo un índice de similitud bastante alto a pesar de que no alcanzo su valor máximo, ya que los problemas anteriormente mencionados generaron en la electroforesis bandas no definidas y poco intensas.

Además de los problemas anteriormente mencionados, se observó en las imágenes de electroforesis que en el control negativo hubo amplificación, lo que indica posibles contaminaciones en el ambiente de trabajo, en los reactivos o en los instrumentos utilizados, esto se ve reflejado en el índice de similitud alcanzado.

5.5. COMPARACIÓN DE CRITERIOS PARA LA DETECCIÓN DE BANDAS

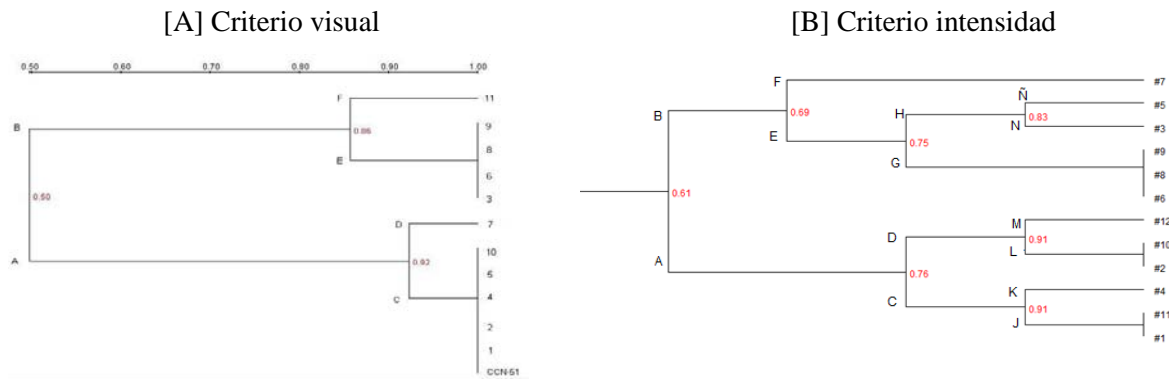


Figura 25 Comparación Dendogramas clon CCN-51

Analizando la figura 25 , se observa la formación de 2 grupos [A Y B,] y 4 subgrupos [C,D,E,F] cuando se realiza por medio del criterio visual , por el contrario con el criterio de intensidad se observa la formación de 2 subgrupos[A Y B] Y 12 subgrupos [C,D,E,F,G,H,I,J,K,L,M ,N Y Ñ] .

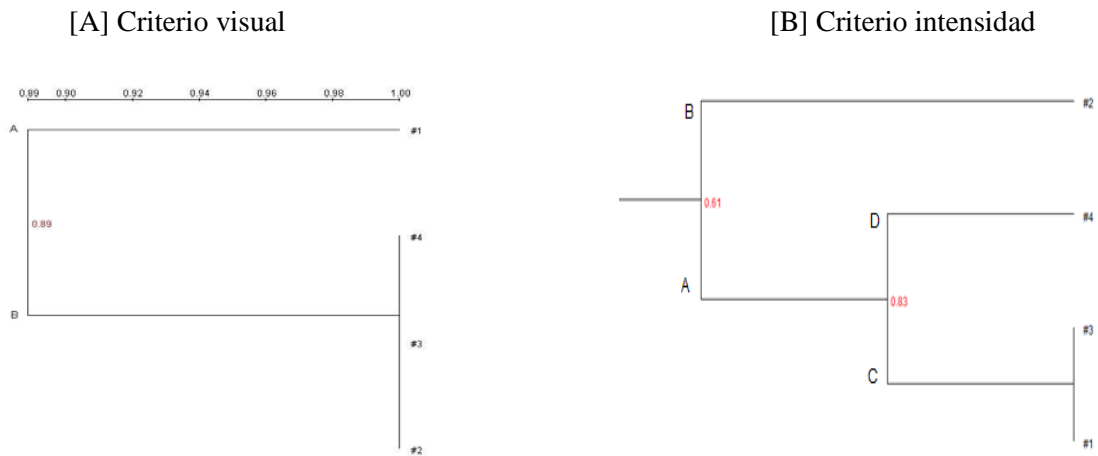
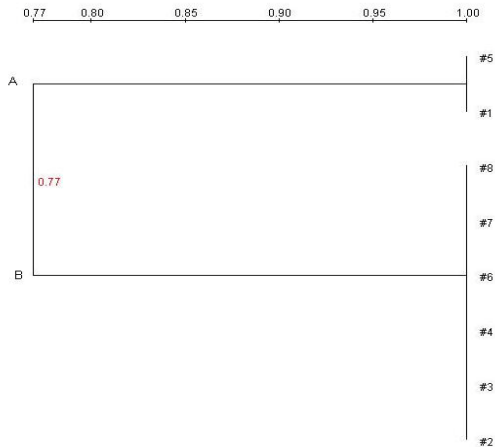


Figura 26 Comparación Dendogramas clon ICS-95

Analizando la figura 26, se observa la formación de 2 grupos [A Y B,], por el contrario con el criterio de intensidad se observa la formación de 2 subgrupos [A Y B] Y 2 subgrupos [C,D] .

[A] Criterio visual



[B] Criterio intensidad

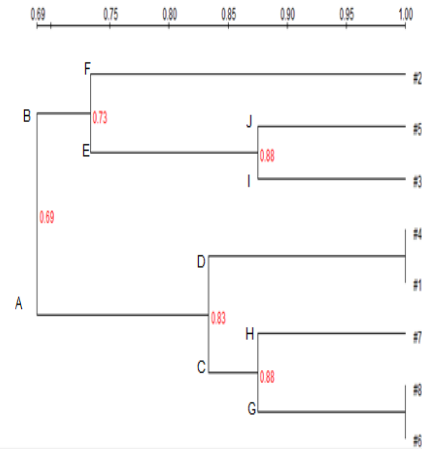


Figura 27 Comparación Dendogramas clon IMC-67

Analizando la figura 27, se observa la formación de 2 grupos [A Y B,] por el contrario con el criterio de intensidad se observó la formación de 2 subgrupos [A Y B] Y 2 subgrupos [C,D,E,F,G,H,I,J] .

Analizando los dendogramas podemos observar para todas las variedades de clones una mayor cantidad de subgrupos cuando se utilizó el criterio de intensidades ,debido a que el software tomo bandas que no pudieron ser visibles o detectables para el ojo humano .Proporcionando así resultados más confiables y verídicos.

6. CONCLUSIONES

- La metodología de extracción propuesta optimizo dicho proceso, ya que el ADN que se obtuvo fue de mejor calidad y cantidad, Además el marcador OPR-07 para el análisis de la variabilidad genética, mostro un alto polimorfismo, ya que permitió comparar los clones nombrados en este estudio, sin necesidad de utilizar otro primer o mezclas de ellos.
- El mejor método para realizar el análisis de variabilidad genética es el que tiene en cuenta las intensidades, ya que relaciona directamente un padre con un hijo como se observan en los dendogramas de las 3 variedades,(CCN-51 muestra #1 y muestra #11,IMC-67 muestra #1 y muestra #4,ICS-95 muestra #1 y muestra #3),mostrando una mayor confiabilidad en los resultados ya que no involucra errores del operador
- Para la variedad CCN-51 la semejanza entre el padre y los hijos en el grupo A es de un 0.76%, lo que indica que la gran mayoría de los hijos pertenecen a esta variedad
- Para la variedad IMC-67 la semejanza entre el padre y los hijos en el grupo A es de un 0.83%, lo que indica autenticidad en la paternidad, ya que la metodología RAPDs tiene como índice de veracidad 0.80.
- Para la variedad ICS-95 la semejanza entre el padre y los hijos en el grupo A es de un 0.83%, lo que indica autenticidad en la paternidad, ya que la metodología RAPDs tiene como índice de veracidad 0.80.
- Teniendo en cuenta los resultados obtenidos se puede concluir que la técnica RAPDs es eficaz para *caracterizar genéticamente diferentes tipos de clones de cacao*, valorando las relaciones filogenéticas entre lotes de injertación de una misma variedad.

7. RECOMENDACIONES

Para obtener mejores resultados y evitar los problemas presentados en esta tesis es necesario:

- Realizar la trituración hasta obtener un polvo uniforme y realizar la extracción seguidamente de este paso para evitar posibles absorciones de humedad.
- Tener un lugar el cual sea exclusivo para experimentos de *ADN*, lo cual permite controlar las temperaturas de conservación tanto de las muestras como de los reactivos a utilizar.
- Acondicionar o buscar un lugar donde se realice un *pre-PCR* y *pos-PCR* lo cual evitará la presencia de bandas en el control negativo.

8. BIBLIOGRAFÍA

- [1] MORENO A.; “*La Investigación Venezolana en Cacao: Situación actual del mejoramiento genético, Estación. Experimental Miranda, sección de Mejoramiento Genético, Caucagua I Congreso Venezolano del Cacao y su Industria SIMPOSIO: “La Investigación Venezolana en Cacao: Situación Actual”*”, Rev. Fac. Agron. v.24, **1998**, v.24 n.1
- [2] VALENZUELA A.; “*El chocolate un placer saludable, A Chocolate a healthy pleasure*”, Rev. Chilena de nutrición. , **2007**, vol.34, n.3, pp. 180-190
- [3] [www.eluniversal.com/belleza.shtml/Venezuela\(21/07/2010\)](http://www.eluniversal.com/belleza.shtml/Venezuela(21/07/2010))
- [4] http://www.dinero.com/negocios/hora-del-cacao_26712.aspx,(07/10/2010).
- [5] Mejía F., LA.; Arguello C., O,” *Tecnología para el Mejoramiento de Sistemas de Producción de Cacao*”. Bucaramanga, Colombia. Publicación CORPOICA – Ministerio de Agricultura. 144 p.”, **2000**
- [6] OSORIO M., SALAZAR E.,ZAMBRANO Y, DEMEY J.; “*Diversidad Genética de una Colección de Cacao Mediante RAPDS*”, Revista científica agronomía tropical **2001**,volumen 53 numero 1.
- [7] N' GORAN J., LAURENT A.; “*Comparative Genetic Diversity Studies of Theobroma Cacao L.using RFLP and RAPD markers*”, *Heredity* 73, 589–597, **1994**
- [8] OSORIO, M.E., SALAZAR, E. ZAMBRANO, A.Y. ; DEMEY, J.R. , “*Estudio del cacao (Theobroma cacao L.) tipo criollo de la Costa central de Venezuela mediante amplificación aleatoria de ADN polimórfico,Resúmenes del IV Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal*”,**2001**.
- [9] McDONALD B.;”*The Population Genetics of Fungi: Tool and Techniques. Symposium Population Genetics of Soilborne Fungal Plant Pathogens.Phytopathology*” 87 (4): 448-452), **1997**.
- [10] ARANZAZU .F; RINCON .D, MARTINEZ .N; “*Auto compatibilidad e Intercompatibilidad Sexual de Materiales de Cacao. Modelo para de Materiales Clónales de Cacao más usados en Colombia. FEDECACAO*, **2008**.
- [11] CUMANA L.,BAUDILLO R. R; Revisión Taxonomica Del Genero (*Theobroma Sterculiaceae*) en Venezuela, Acta Bot. Venez. **2005**, v.30 n.1
- [12] ARISTEGUIETA, L; “*Familias y Géneros de los Arboles de Venezuela*”.Edición Especial del Instituto Botánico.**1964**
- [13] DUBLIN, P;” *Cacao Hanbook of Plant Cell Culture.*”, edición 3, Macmillan, **1984**.

- [14] VERA, J. A.; “*Botánica y Clasificación del Cacao. In Suarez, C*”, ed. Manual del Cultivo del cacao. Programa Nacional del Cacao. Quevedo, INIAP . p 16-26, **1987**.
- [15] CHÁVEZ A., MANSILLA J.; Ministerio de Agricultura Programa Para el Desarrollo de la Amazonia PROAMAZONIA “Manual del Cultivo del Cacao” Perú, pág. 13, **2004**.
- [16] PEREA J. VILLAMIL , VILLAMIZAR A., RAMIREZ O., "Caracterización físicoquímica de materiales regionales de cacao colombiano", Biotecnología En El Sector Agropecuario Y Agroindustrial *ed: Editorial Universidad Del Cauca*.9 fasc.1 p.35 - 42 ,**2011**.
- [17] HOWELL, S.H; “*Genética de Plantas y su desarrollo*”. Cambridge Univ. Press. MA., Estados Unidos, **1998**.
- [18] MARTINEZA, NARVAEZ Z, SPINELLI G;”*Mosquitas Polinizadoras (Diptera: Ceratopogonidae) del Cacao Colectadas en Comunidades piaroa en Amazonas*”, Venezuela. Bol Entomol Venez 15(2):249-253, **2000**
- [19] HARTMANN, H.T. (Ed.);” *Propagación de Plantas: Principios y Prácticas*”. Prentice Hall 7^a ed. Prentice , **1997**.
- [20] ECHEVERRI, R. JORGE; “*El Injerto en la Producción de Cacao Orgánico*”; Revista Manejo Integrado de Plagas y Agroecología p. 101-105, **2006**., edición 78
- [21] BAQUERO E.;” *Situación Nacional e Internacional del Cultivo de Cacao*”, REVISTA INGENIERÍAS & AMAZONIA Vol. 4 No. 1 **2011** .
- [22] PALENCIA, G , MEJÍA L, ARGUELLO, O; “*Propagación del árbol de cacao. Tecnología para el Mejoramiento del Sistema de Producción de Cacao*”. Corpoica. Bucaramanga, CO. p. 65-72. **2000**.
- [23] MEJÍA, L.; “*Métodos de Injertación de Cacao*”. Publicación Corpoica. Bucaramanga, CO. 24 p. **2000**.
- [24] PINZÓN J., ARDILA J.;” *Guía Técnica para el Cultivo del Cacao*”, Cuarta edición, **2009**.
- [25] ARANZAZU F., MARTÍNEZ N., RINCÓN D.,PALENCIA G.;”*Materiales de cacao en Colombia, su compatibilidad sexual y modelos de siembra*”. **2009**
- [26] KARP, A.; EDWARDS, K.; “DNA markers: a global overview. In: G. Caetano- Anollés, P.M”, edición DNA markers: protocols, applications and overviews. Gress- hoff, p. 1-13. , **1998**, basado en la Recopilación de GreenFacts sobre Cultivos Genéticamente Modificados
- [27] Everythingbio.com / glos / definición (6/12/2010)
- [28] GONZÁLEZ J.; Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo,**1982** *Revista Pastos Vol 12, No 1*

- [29] AZOFEIFA, D. ÁLVARO; “*Uso de Marcadores Moleculares en Plantas, Aplicaciones en frutales del trópico*”. *Agronomía mesoamericana* 17(2): 221-242. **2006** ISSN: 1021-7444.
- [30] RAMOS L. Y TORRES A.; Qué son los Marcadores Moleculares, Volumen XVIII. Núm. 1, Pp. 41-46. **2007**.
- [31] Gonzalo C. D. , Marcadores moleculares: Qué son, cómo se obtienen y para qué valen. Investigador Contratado en el Dpto. de Biología Molecular y Bioquímica (Universidad de Málaga) Consultado en www.ndsu.nodak.edu/insctruct/mcclean/plsc431/markers/ y opbs.okstate.edu/~melcher/MG/MG01.html.**2010**
- [32] PICCA, AURORA; HELGUERA, MARCELO; et al. Marcadores Moleculares. II.-Capitulo 4 Biotecnología y Mejoramiento Vegetal Pág. 61, **2007**.
- [33] Revista Acutic #15 fundamento de la reacción en cadena de la polimerasa, **2001**.
- [34] CUSHWA y MEDRANO, “*Aplicattions of Ramdom Amplified Polymorphic DNA (RAPD) assay for genetic analysis of livestock species*” *Rev Animal Biotechnology* 7(1):11-31, **1996**.
- [35] AIDA VANESSA WILCHES M;” *Descripción de algunas herramientas moleculares y sus aplicaciones*”, Serie técnica No. 15. **2004**.
- [36] Biotecnología en el Sector Alimentario, genoma España, sector agroalimentario pag.51-58 **2005**.
- [37] Métodos Físico-Químicos en Biotecnología, Universidad Nacional de México **2004**.
- [38] ERILICH, H.A. y N. ARNHEIM; “*Genetic Analysis Using the Polymerase Chain Reaction*”, *Ann. Rev. Genet.* 26:479-506, **1992**.
- [39] LOPEZ, K. Y; “*Diagnóstico por PCR de los Virus IHHNV y WSSV en Colecciones Biológicas e Histológicas de Camarón Blanco Litopenaeus Setiferus (Lineaeus, 1767)*”. Campeche: 23 p. Universidad Autónoma de Campeche. Facultad de ciencias Químico biológicas. Departamento de Biología, **2006**.
- [40] ERILICH, H.A.; “*PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplifications*”, Stockton Press, NY, E.U. **1989**.
- [41] http://www.inbiohw.com.ar/plus_dna.htm (15/7/2010)
- [42] GOMORI, G; “*Preparation of Buffers for Use in Enzyme Studies. Methods Enzymology.*1, 138-146. **1955**.
- [43]BOITEAUX, I.; FONSECA, M.; SIMÓN, P.;”*Effects of Plants Tissue and DNA Purification Method on Randomly Amplified Polymorphic DNA-Based Genetic Finger Printing Analysis in Carrot*” *J. amer .soc.hort .sci .124(1):32-38.1999*.
- [44] MORENO, Y, MELGAREJO, L. M; “*et al.Molecular Characterisation of a Germplasm Bank for Theobroma Genus Using the RAPD technique*”,*Revista Colombiana de Biotecnología*. Vol. 6. Nº 2. P 15-24, **2004**.

[45]HENRÍQUEZ M.;"Análisis de Diversidad Genética de Patógenos con énfasis en (*Phaeoisariopsis Griseola*), agente causal de la Mancha Angular"

[46]DORADO G.,RALLO P.,HERNANDEZ P. ;"Desarrollo de marcadores moleculares y herramientas genómicas para la trazabilidad, identificación y mejora del olivo, la aceituna y el aceite de oliva". **2001**

[47] WESTERMEIER, R; "Electroforesis in Practice", Guide to Methods and Applications of DNA and Protein Separation, VCH, Weinheim. **1997**.

[48]MATHEWS, C. K., Van Holde, K.E ; et Ahern, K.G **2003**. Bioquímica (3 edición). pp. 204

[49] Universidad Metropolitana de ciencias de la Educación. **2009**.

[50] SOMMA, M; y QUERCI, M. Análisis de la presencia de organismos genéticamente modificados en muestras de alimentos. Sesión N° 5 Electroforesis en gel de agarosa **2005** Organización Mundial de la Salud Oficina Regional para Europa

[51][http://translate.google.es/translate?hl=es&langpair=en%7Ces&u=http://www.vivo.colostate.edu/hbooks/genetics/biotech/gels/agardna.html\(7/9/2010\)](http://translate.google.es/translate?hl=es&langpair=en%7Ces&u=http://www.vivo.colostate.edu/hbooks/genetics/biotech/gels/agardna.html(7/9/2010))

[52] PADILLA C. PEÑA, DIEZ J., MARTINEZ E., BARCENA J.,GARCIA C.; Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa. Aislamiento y caracterización electroforética de DNA plasmídico

[53]TALAVERA I., RODRIGUEZ J. ; Reconocimiento de Patrones en la Quimiometría ,**2008**

[54]Quantity one, user guide for version 4.6.3;Bio-Rad Laboratories.(2006

[55] GIRALDO I., RENGIFO L.;" Determinación del sexo en borjò (*Borojoa Pationi Cuatrecasas*) mediante marcadores", **2004**.

[56]HENRÍQUEZ M.; "Análisis de diversidad genética de patógenos con énfasis en(*Phaeoisariopsis Griseola*) , agente causal de la mancha angular".Rev de Biotecnología,**2002**, Vol 1

[57] GONZALES B;" Caracterización genética con microsatélites de un ensayo de progenie de teca (*Tectona grandis Linn f*) en san mateo de la alajuela", **2007**.

[58] E.SANCHEZ .A.ALMIRALL,F CASAÑAS Y F.NUEZ;" Selección asistida aplicada a un caso real de judía :Marcadores moleculares para genes de resistencia combinados con marcadores de fondo genético". **2006**

[59]FERNANDEZ G., AFANADOR L.,JARAMILLO N.,MARQUEZ E. , TINOCO J.,ORDUZ S.;"Caracterización por RAPD de tres variedades de tabaco (*Nicotiana tabacum L.*) obtenidas por cultivo de anteras in vitro". Revista Colombiana de Biotecnología, **2002**,4(1): 61 – 70.

- [60] Grisales S. , Afanador L.;" *Análisis de Variabilidad genética en (Moniliophthora Roreri) con AP-PCR Y RAPD* " , Rev.Colomb.Biote Vol 9, No 2 ,**2007**
- [61]DÁVILA M., ZAMBRANO K., CASTILLO M.;" *Uso de la técnica RAPD para la identificación de fragmentos de ADN posiblemente relacionados con la viruela den hongos entomopatógenos*".Rev Bioagro,vol 13,pag93-98,**2001**
- [62]CARRANZA M , MOTTE E.,CEDEÑO V., CEVALLO O., SAUCEDO S. , CANCHIGNIA H. ; "*Estudio de la Diversidad Genética de 20 Acciones de Cacao (Theobroma cacao L.) Mediante AP-PCR de la Colección del Centro del Cacao de Aroma Tenguel en la Finca Experimental La Buseta*". revista UICYT.**2007**
- [63] SÁNCHEZ I., ZÁRATE L., GALLEGO G., TOHME J., "*Análisis de la diversidad genética de accesiones deTheobroma cacao L. del banco de conservación a cargo de Corpoica*"K, Revista Corpoica-Ciencia y Tecnología Agropecuaria, **2007**, 8, 26.
- [64] CHIA J., "*Caracterización molecular mediante marcadores ISSR de una colección de 50 árboles clonales e híbridos de cacao (Theobroma cacao L.) de la UNAS-Tingo María*", Tesis de Maestria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, **2009**.
- [65]OSORIO M, E. SALAZAR, A.Y.ZAMBRANO,J.R DEMEY ;" Estudio del cacao (*Theobroma cacao L.*) tipo criollo de la costa central de Venezuela mediante Amplificación Aleatoria de ADN Polimórfico". Rev. agronómica tropical, **2003**.
- [66] MORENO Y., MELFAREJO L. M., HERNÁNDEZ M., QUINTERO L., VARGAS G., "*Caracterización molecular de un banco de germoplasma del género Theobroma mediante la técnica RAPD*", Revista Colombiana de Biotecnología, **2004**, 6, 15.
- [67] DOYLE, J.J. and DOYLEo, J.L., "*Isolation of plant DNA from fresh tissue*", Focus, **1990**, 12, 13.
- [68] NIETO J., RAMOS L., MOTTE E., "*Extracción y purificación de ADN de Tectona grandis l. para su empleo en la técnica RAPD*", Foresta Veracruzana, **2005**, 7, 1.
- [69] COLLINS G.G, SYMONS, R.H; "*Extraction of nuclear DNA from grape vine leaves by modified procedure*". Plant. Mol. Biol. Rept., **1992**, 10, 233.
- [70]PALACIOS D. ;" Comparación de diferentes metodos de extracción de ADN para la detección de transgenicos en alimentos mediante tecnología PCR ",**2008**
- [71] VELASCO R., "*Marcadores moléculaires y la extracción de ADN*", Colombia Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial, ed. Universidad del cacao, **2005**, vol 3, 11.

[72] HERNANDEZ C, AFANADOR L., ARANGO R, LOBO M., “*Analisis de la variacion genetic en clones de cacao (Hevea brasiliensis) de Asia, Suramerica y Centroamerica usando marcadores RAPD*”, Revista Colombiana de Biotecnología, **2006**, 3, 29.

[73] HERNÁNDEZ J. , ARIZA J ;”*Estandarizacion de una técnica para la certificación de jardines clonales de plantas de cacao (THEOBROMA CACAO), Usando Marcadores Moleculares RAPD*” **2009**

[74] JACCARD, P. Nouvelles recherches sur la distribution florale. En: Bull. Soc.Vaud. Sci. Nat. Vol. 44 **1908**, p. 223-270.

[75] MARTÍNEZ, M.C; PLATA, M.I.; HOPP, H.E. “*Identificación Molecular de Patrones Genéticos en Distintas Muestras de Arándanos (Vaccinium sp.)*”. Revista de Investigacion Agropecuaris. **2007**, 36, 3.

[76] SNEATH, P.H.A., SOKAL, R.R., Numerical taxonomy. Freeman, San Francisco, California, Estados Unidos. **1973**.

[77] FREDERICK M. AUSUBEL, Roger Brent, Robert E. Kingston, David D. Moore, J.G. Seidman, John A. Smith, Kevin Struhl. Current Protocols in Molecular Biology. Capitulo 2. p. 148,159-160,**1998**

[78] CIMMYT., Protocolos de laboratorio: Laboratorio de Genética Molecular Aplicada del CIMMYT. Tercera edición. México, D.F.: CIMMYT ,**2006**

[79] GIRALDO, CLARA I. *et al*; “*Determination of Borojo Sex (Borojoa patinoi, Cuatrecasas) Through Molecular Markers*”; En: Revista Colombiana de Biotecnología Vol. 4 No. 2 p. 9-14,**2004**

[80] SAMBROOK, J. y D. RUSELL.; Molecular Cloning: a Laboratory Manual. 3era ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. Vol. I, Chapter 5, 5.1 - 5.86 pp. **2001**

[81] Quantity one, user guide for version 4.6.3;Bio-Rad Laboratories.**2006**

9. ABREVIATURAS

ICCO :	Organización Internacional del Cacao
FEDECACAO:	Federación Nacional de Cacaoteros
TLC:	Tratado de Libre Comercio
PCR:	Reacción en Cadena de la Polimerasa
MAAP:	<i>Caracterización con " Amplicones " Múltiples Arbitrarios</i>
RAPD:	<i>Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos Amplificados</i>
RAMPO:	<i>Amplificación Aleatoria del Polimorfismo de Microsatélites</i>
RFLP:	<i>Polimorfismo de la Longitud de los Fragmentos de Restricción</i>
AND:	<i>Acido Desoxiribonucleico</i>
SSR:	Secuencias Simples Repetitivas o Microsatélites
ISSR:	Secuencias Intercaladas entre Microsatélites
VNTRs:	Número Variable de Repeticiones en Tándem
dATP :	<i>5`-trifosfato de deoxiadenosina</i>
dGTP :	<i>5`-trifosfato de deoxiguanosina</i>
dCTP:	<i>5`-trifosfato de deoxicitidina</i>
CORPOICA:	Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria
CTAB:	Bromuro de Alquiltrimetilo mixto-Amonio
EDTA:	Tetracetato de Etilindiamina
TE:	Tris-EDTA(Amortiguador)
TBE:	Tris-Borato EDTA
IDT :	Integrated DNA
ICS=	Imperial College Selection
IMC=	Iquitos Maraño Collection
EET=	Estación Experimental Tropical

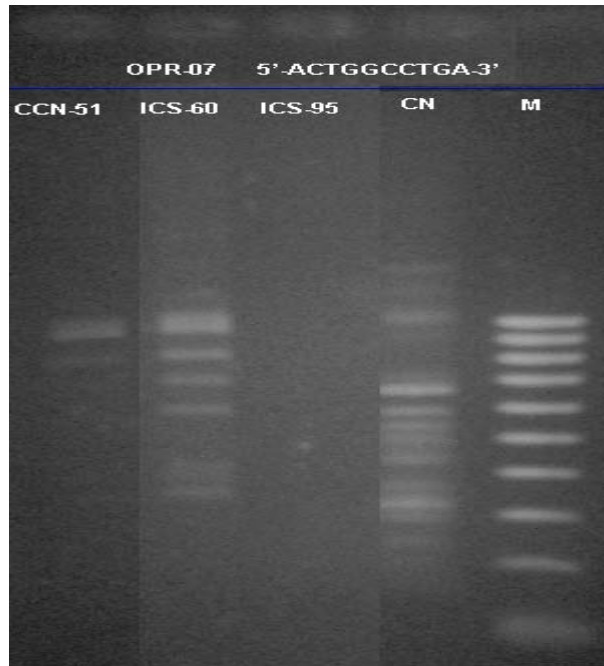
CCN= Colección Castro Naranjal

TSH= Trinidad Selection Hybrid

10. ANEXOS

Anexo A

Electroforesis los productos amplificados de los 3 clones de Theobroma cacao utilizando RAPD con el primer OPR-07.



Anexo B

Matriz de similaridad entre carriles para la variedad CCN-51 utilizando el coeficiente Dice.

ccn-51-1 (Raw 1-D Image) Calculation Method Dice Coefficient June 22, 2011

Lane												
1	100.0	83.3	83.3	90.9	66.7	50.0	54.5	50.0	50.0	83.3	100.0	72.7
2	83.3	100.0	66.7	72.7	50.0	66.7	72.7	66.7	66.7	100.0	83.3	90.9
3	83.3	66.7	100.0	72.7	83.3	66.7	72.7	66.7	66.7	66.7	83.3	72.7
4	90.9	72.7	72.7	100.0	54.5	36.4	60.0	36.4	36.4	72.7	90.9	60.0
5	66.7	50.0	83.3	54.5	100.0	83.3	54.5	83.3	83.3	50.0	66.7	54.5
6	50.0	66.7	66.7	36.4	83.3	100.0	72.7	100.0	100.0	66.7	50.0	72.7
7	54.5	72.7	72.7	60.0	54.5	72.7	100.0	72.7	72.7	72.7	54.5	80.0
8	50.0	66.7	66.7	36.4	83.3	100.0	72.7	100.0	100.0	66.7	50.0	72.7
9	50.0	66.7	66.7	36.4	83.3	100.0	72.7	100.0	100.0	66.7	50.0	72.7
10	83.3	100.0	66.7	72.7	50.0	66.7	72.7	66.7	66.7	100.0	83.3	90.9
11	100.0	83.3	83.3	90.9	66.7	50.0	54.5	50.0	50.0	83.3	100.0	72.7
12	72.7	90.9	72.7	60.0	54.5	72.7	80.0	72.7	72.7	90.9	72.7	100.0

Anexo C

Matriz de ausencia (0) y presencia (1) de bandas para la variedad CCN 51.

Band Type Report For: CNN-51-1.1sc

	Lane 1	Lane 2	Lane 3	Lane 4	Lane 5	Lane 6	Lane 7	Lane 8	Lane 9	Lane 10	Lane 11	Lane 12
	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	#10	#11	#12
Band Type 1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Band Type 2	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1
Band Type 3	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0
Band Type 4	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1
Band Type 5	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0
Band Type 6	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1
Band Type 7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Band Type 8	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0
Band Type 9	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0

Matching Tolerance: 4.00% 2011-06-22/10:35:54

Anexo D

Matriz de similaridad entre carriles para la variedad IMC- 67 utilizando el coeficiente Dice.

imc67-1 (Raw 1-D Image) Calculation Method Dice Coefficient June 22, 2011

Lane									
1	100.0	53.3	75.0	100.0	62.5	87.5	75.0	87.5	
2	53.3	100.0	66.7	53.3	80.0	66.7	80.0	66.7	
3	75.0	66.7	100.0	75.0	87.5	62.5	75.0	62.5	
4	100.0	53.3	75.0	100.0	62.5	87.5	75.0	87.5	
5	62.5	80.0	87.5	62.5	100.0	75.0	87.5	75.0	
6	87.5	66.7	62.5	87.5	75.0	100.0	87.5	100.0	
7	75.0	80.0	75.0	75.0	87.5	87.5	100.0	87.5	
8	87.5	66.7	62.5	87.5	75.0	100.0	87.5	100.0	

Anexo E

Matriz de ausencia (0) y presencia (1) de bandas para la variedad IMC-67.

Band Type Report For: imc67-1.1sc

	Lane 1	Lane 2	Lane 3	Lane 4	Lane 5	Lane 6	Lane 7	Lane 8
	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8
Band Type 1	1	1	1	1	1	1	1	1
Band Type 2	0	1	1	0	1	0	1	0
Band Type 3	1	0	0	1	0	1	0	1
Band Type 4	0	1	1	0	1	0	0	0
Band Type 5	1	1	0	1	0	1	1	1
Band Type 6	1	0	1	1	1	1	1	1
Band Type 7	1	1	1	1	1	1	1	1
Band Type 8	0	1	0	0	1	1	1	1
Band Type 9	1	0	1	1	0	0	0	0
Band Type 10	1	1	1	1	1	1	1	1
Band Type 11	1	0	1	1	1	1	1	1

Matching Tolerance: 4.00%

2011-06-22/12:30:28

Anexo F

Matriz de similaridad entre carriles para la variedad ICS-95 utilizando el coeficiente Dice.

Ics 95-1 v2 (Raw 1-D Image) Calculation Method

Dice Coefficient June 22, 2011

Lane			
1	100.0	66.7	100.0
2	66.7	100.0	66.7
3	100.0	66.7	100.0
4	83.3	50.0	83.3

Anexo G

Matriz de ausencia (0) y presencia (1) de bandas para la variedad ICS-95.

Band Type Report For: ICS-95-1 v2.1sc

	Lane 1 #1	Lane 2 #2	Lane 3 #3	Lane 4 #4
Band Type 1	1	0	1	1
Band Type 2	1	1	1	0
Band Type 3	1	1	1	1
Band Type 4	1	1	1	1
Band Type 5	1	1	1	1
Band Type 6	1	0	1	1

Matching Tolerance: 4.00%

2011-06-22/11:53:54