

**ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO**

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA  
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**IDENTIFICACIÓN DE MARCADORES  
MOLECULARES MICROSATÉLITES PARA LA  
DETECCIÓN DE MEZCLAS DE ALMENDRAS DE  
CACAO (*Theobroma cacao* L.) TIPO NACIONAL CON LA  
VARIEDAD CCN-51.**

**Previa a la obtención de Grado Académico o Título de:**

**INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA**

**ELABORADO POR:**

**DAVID ALEJANDRO JARRÍN ESCUDERO**

**SANGOLQUÍ, JUNIO DE 2013**

## RESUMEN

La comercialización de cacao (*Theobroma cacao* L.) en Ecuador requiere de una herramienta que permita la identificación efectiva de la mezcla de almendras entre cacao CCN-51 y las de Tipo Nacional, con el fin de contribuir al control y mejoramiento de la calidad. Por lo expuesto, la presente investigación propone el uso de marcadores moleculares para diferenciar las mezclas físicas entre las almendras. Se analizó un total de 44 fincas productoras de cacao Tipo Nacional y 19 de CCN-51, provenientes de distintas zonas de las provincias de Los Ríos, Bolívar, Cotopaxi y Guayas. Se probaron tres métodos de extracción de ADN en almendras para seleccionar el de mejor expresión; siendo el protocolo de Doyle y Doyle (1987) modificado por Faleiro et al. (2002), el que mejor resultado produjo. La amplificación se realizó con ocho micro satélites y su corrida se analizó en geles de poliacrilamida, usando: a) un sistema convencional que involucra el revelado por tinción con Nitrato de Plata y b) un sistema semiautomatizado de revelado por fluorescencia. No se encontraron alelos exclusivos para CCN-51; pero entre los alelos pertenecientes a este genotipo, dos mostraron una baja frecuencia en el de Tipo Nacional (mTcCIR 58 – 258 y mTcCIR 12 - 199). Contrariamente en las muestras de Tipo Nacional se encontraron once alelos específicos. La probable presencia de alelos de CCN-51 en las fincas de Tipo Nacional fue detectada mediante el estudio de alelos compartidos. La variabilidad mostrada por las almendras de Tipo Nacional en los análisis multivariados, probablemente represente una dificultad para el desarrollo de este modelo, pero podrá ser superado con un análisis más extenso del genoma.

## ABSTRACT

The marketing of cocoa (*Theobroma cacao* L.) in Ecuador requires of a tool that enables identification of the actual mixture of beans between cocoa CCN-51 and the National Type, in order to contribute to the control and quality improvement. For the foregoing reasons, the present research proposes the use of molecular markers to differentiate the physical mixtures between the beans. We analyzed a total of 44 farms producing cacao National Type and 19 CCN-51, coming from different areas of the provinces of the Los Ríos, Bolívar, Cotopaxi and Guayas. Three methods were tested for DNA extraction in beans to select the best expression; being the protocol of Doyle and Doyle (1987) as amended by Faleiro et al. (2002), the best result produced. The amplification was conducted with eight micro satellites and its run was analyzed in polyacrylamide gels, using: a) conventional system that involves the revealed by staining with Silver Nitrate and b) a semi-automated system of revealed by fluorescence. Not unique alleles were found to CCN-51; but between the alleles belonging to this genotype, two showed a low frequency in the National Type (mTcCIR 58 - 258 and mTcCIR 12 - 199). Contrary the samples of National Type were found eleven specific alleles. The probable presence of alleles of CCN-51 in the National Type farm was detected through the study of allele sharing. The variability shown by the beans of National Type in multivariate analyzes, probably represents a difficulty for the development in a future of this model, but can be overcome with a more extensive analysis of the genome.