

**CENTRO AGRONOMICO TROPICAL DE INVESTIGACION Y  
ENSEÑANZA  
PROGRAMA DE EDUCACION PARA EL DESARROLLO Y LA  
CONSERVACION**

**ESCUELA DE POSGRADO**

**“CARACTERIZACION MOLECULAR Y MORFOLOGICA DE  
GENOTIPOS SUPERIORES CON CARACTERISTICAS DE  
CACAO NACIONAL (*Theobroma cacao L.*) DE ECUADOR.”**

**Por:**

**James Gonzalo Quiroz Vera**

**CATIE**

**Turrialba, Costa Rica**

**2002**

Quiroz, VJ. 2002 Caracterización molecular y morfológica de genotipos superiores con características de Cacao Nacional (*Theobroma cacao L.*) de Ecuador. Tesis Mag. Sci. CATIE. Turrialba, Costa Rica. 111 p.

**Palabras claves:** *Theobroma cacao*, Cacao, Caracterización, *Crinipellis pernicioso*, *Moniliophthora roreri*, Variedad, Marcadores moleculares, Recursos Genéticos, Variabilidad Genética, AFLP.

## RESUMEN

El cultivo de cacao es tradicional en el Ecuador, en la actualidad existen aproximadamente 370.000 ha, sembradas con una producción promedio de 90.000 TM por año, constituyéndose en el cuarto rubro de exportación, del cual el 75 % es considerado como cacao fino de aroma denominada “arriba” proveniente de la variedad de cacao conocida como Nacional.

Sin embargo, durante la primera y segunda mitad del siglo pasado, debido a la aparición de las enfermedades Escoba de bruja (*Crinipellis pernicioso*) y Monilia (*Moniliophthora roreri*), los productores comenzaron a sustituir la variedad tradicional por híbridos de origen trinitario con altos niveles de producción y con una aparente resistencia a las enfermedades antes mencionadas, provocando una pérdida paulatina de la variedad del cacao Nacional.

Ecuador y la comunidad internacional han reconocido la necesidad de mantener el mercado basado en la calidad, para lo cual durante 1996 el Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) conjuntamente con la empresa de Chocolates Nestle de Ecuador y el Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG), realizaron una recolección de genotipos de tipo Nacional en fincas de productores donde se identificaron árboles con edades que se presumieron superiores a 80 años, altos niveles de producción (80-120 mazorcas / árbol / año), y resistentes a Escoba de bruja (Quiroz 1996), los cuales sirvieron de base para este estudio.

Se caracterizó molecularmente 63 genotipos de cacao Nacional y de otros orígenes, de los cuales solo 51 clones fueron caracterizados morfológicamente debido a la falta de flores y frutos durante el periodo de evaluación, además, se incluyeron dentro de este estudio tres genotipos de referencia de los tipos genéticos Trinitario (UF-676), Forastero Amazónico (Matina) y el Criollo (Criollo-36).

Para la caracterización molecular se utilizó la técnica de marcadores moleculares AFLP con siete combinaciones “enzima-primers” reportadas por Risterucci (2000) y Motamayor

(2001), con el mayor número de bandas polimórficas en trabajos con los mismos marcadores moleculares en otros genotipos de cacao.

Se observó un alto grado de polimorfismo para las siete combinaciones de primers, reveladas por el método de tinción no radiactivo utilizando nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ). El número de bandas polimórficas totales fue de 321, con un mínimo de 29 bandas polimórficas para la combinación EACG/MCTT y un máximo de 59 bandas polimórficas para la combinación EAAG/MCAA. con un porcentaje promedio de polimorfismo de 70,79 %.

Con esta información se calculó la matriz de similaridad usando Nei & Li's (1979), el cual demostró que la distancia genética presente en los 63 clones de cacao tipo Nacional y de otros orígenes es muy amplia cuyo rango es de 0,832 para los clones más similares genéticamente y de 0,225 para los más diferentes. El dendograma UPGMA, para los 63 clones de cacao demuestran la no-conformación de grupos genéticos específicos, pero si separados por su origen y su constitución genética.

Cabe señalar que el grupo con el menor índice de similaridad entre ellos y con los demás clones en estudio fue el conformado por los genotipos UF-676, Criollo-36 con un 0,402 de similaridad, unido a este el clon CC-267 (Matina), con un grado de similaridad de 0,505, lo cual concuerda con lo reportado por Cruzillat (2000), y Lecertaud *et al.* (1996), quienes reportan que los cacaos Nacionales de Ecuador son independientes de los tres grupos genéticos conocidos y que el origen de esta variedad es aún desconocida.

Para la caracterización morfológica se utilizaron 34 variables cuantitativas y 13 cualitativas, se utilizó el tamaño de muestra para flores, frutos, semillas y hojas, recomendadas por Soria y Enríquez (1981) y el IBPGR (1981), para caracterizar clones y árboles de cacao.

Se observó que se conformaron cinco grupos bien definidos, el primero con 18 clones constituidos por genotipos CCAT y EB representando el 35,3 % de la variabilidad total. El grupo dos lo conformaron 10 clones con el 19,6 % de la variabilidad y está constituido mayoritariamente por los clones CCAT y EB con la salvedad que a este grupo se encuentran unidos los clones SCA-6 y SCA-12.

El grupo 3 conformado por 15 clones representa el 29,4 % de la variabilidad y consta de materiales de origen amazónico, subdividido en dos subgrupos, el primero (A) formado por cinco clones procedentes de la parte norte de la amazonía ecuatoriana y los clones EBC-138 y EBC-148 (Expedición Botánica Caquetá Colombia), y el otro subgrupo (B) formado por los

clones provenientes de las riveras de los ríos Tapiche, Tiputine, Napo, Bobonaza y el Clon Escobar.

El grupo cuatro constituido por cinco clones con el 9,8 % de la variabilidad total y finalmente el grupo cinco conformado por los clones UF-676, Matina muy relacionados entre sí y unido a este el Criollo-36 pero independientes de los demás materiales estudiados.

Finalmente se determinó que a través de la caracterización morfológica permitió identificar claramente 16 características que discriminan entre los clones de cacao tipo Nacional y otros orígenes, las cuales explican el 95,15 % de la variabilidad presente en la población en estudio. Las características más discriminantes fueron: Relación largo/ancho del sépalo, Largo de la lígula, Relación largo/ancho de lígula, Largo del ovario, Ancho del ovario, Número de óvulos por ovario, Relación largo/ancho de la mazorca, Peso de la cascara, Peso de la testa, Peso seco de la semilla, Largo de la semilla, Ancho de la semilla, Relación largo/ancho de la hoja, Relación largo/ LBA y Angulo basal.

Quiroz, V J. 2002. Molecular and morphological characterization for superior genotypes with cacao Nacional characteristics (*Theobroma cacao* L.) from Ecuador. Mag. Sci thesis. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 111p.

**Key words:** *Theobroma cacao*, characterization, *Crinipellis perniciosa*, *Moniliophthora roreri*, variety, molecular markers, genetic variability, AFLP

## SUMMARY

Cacao is a traditional crop in Ecuador, there are approximately 370.000 ha, which have an average production of 90.000 tm per year. It constitutes the fourth export commodity in Ecuador and the 75% is considered as a fine aroma cacao called “arriba”, which comes from the variety known as “cacao Nacional”.

During the first and second half of the last century, two diseases showed up, witches broom (*Crinipellis perniciosa*) and Monilia (*Moniliophthora roreri*). Because of that, farmers started to substitute traditional varieties for Trinitario hybrids which is characterized by high production levels and an apparent resistance to both diseases.

Ecuador and the international community have recognized the importance of quality products for markers. For this reason during 1996 the Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) in collaboration with Chocolates Nestlé de Ecuador Company and the Ministry of Agriculture and Livestock (MAG), collected the Nacional genotypes. Collection was in farms that were identified to have more than 80 years of planting, high yield levels (80 to 120 pods / tree / year) and resistant to witches broom (Quiroz, 1996). This material was used for this study.

In this study, 63 cacao Nacional genotypes and other origins were molecularly characterized. However only 51 clones were morphologically characterized since the left clones did not produce flowers and fruits during the evaluation period. In addition three genotypes of reference were included from the genetic groups “Trinitario” (UF 273), “Forastero Amazonónico” (Matina) and “Criollo” (Criollo 36).

For the molecular characterization the AFLP molecular markers with seven combinations of “enzyme-primer” as reported by Risterucci (2000) and Motamayor (2001) was used.

They reported the major polymorphic bands in studies with the same molecular markers in other cacao genotypes.

DNA was extracted based on MATAB method, by using small samples (1 cm diameter) from fresh and dry leaves which allow to obtain a concentration equal or higher than 80 ng / ul.

A high degree of polymorphism for the seven primer combinations was observed. They were revealed by a non-radioactive method with silver nitrate ( $\text{AgNO}_3$ ), in polyacrilamide gel. The total number of polymorphic bands were 452 for the seven combinations with spread of 44 bands for the combination EACG/MCTT and 89 for EAAG/MCAA. The polymorphism's average were 70,79% for the used combinations. With this information was calculated the similarity matrix by using Nei an Li's (1979) coefficient, then the dendrogram and a bootstrap analysis were generated.

The dendrogram for the 63 cacao clones showed a no specific genetic group conformation, separated from the origin or genetic constitution, with genetic distances from 0,225 to 0,832. In this study, it is important to mention that the less similarity among genotype groups were UF 273, Criollo 36 and clone CC 267 (Matina). This result is supported by the findings to Crouzillat (2000) and Lecertaud *et al.* (1996) who reported that the Nacional cocoas form Ecuador were independent from the three known genetic groups and the origin of this variety is even unknown.

For the morphological characterization, 34 quantitative characteristics and 13 qualitative characteristics were utilized. The minimal sample for flowers, fruits and seeds recommended by Soria and Enríquez (1981) and IBPGR (1981) were used to characterize clones and cocoa trees.

Based on the results obtained in the morphological characterization, five groups well defined were formed. The first is constituted by 18 clones mainly by CCAT and EB genotypes which represent the 35,3 % of the total variability. The second group is conformed by 10 clones with the 19,6% of the variability and is constituted mainly by clones CCAT, EB and the clones SCA-6 and SCA-12. The third group is conformed by 15 clones representing the 29,4% of the variability and is constituted by materials from the Amazonian region. It is subdivided into two subgroups, the first being formed by five clones which come from the north part of the Ecuadorian Amazonian region and the clones EBC-138 and EBC-148 (Botanical Expedition

Caqueta Colombia) and the second being formed by clones from the margin of the rivers Tapiche, Tiputine, Napo and Bobonaza and the Escobar clon.

The fourth group is conformed by five clones representing the 9,8% of the total variability. Finally the five group is conformed by clones UF-273 and Matina, Criollo-36 is very related to other but is independent from the rest of the studied materials.

It is possible to observe that the morphological characterization clearly permits to identify 13 discriminant characteristics namely: sepal length/wide relation, ligule length, ligule length/wide relation, ovary length, ovary wide, ovule per ovary number, pod length/wide relation, shell weight, test weight, dry seed weight, seed length, seed wide, leaf length/wide relation, length/ LBA relation and basal angle.