



Estandarización de una técnica para la certificación de jardines clonales de plantas de cacao (*Theobroma cacao*) usando marcadores moleculares rapd

Hernández Garcia Jessika Andrea ¹, Ariza Garcia Jherson, Cano Calle Herminsul de Jesús ¹, Contreras Pineda Jorge ²

¹ Escuela de Química Universidad Industrial de Santander.Colombia

²Facultad de Salud de la Universidad de Pamplona.Pamplona.Colombia

Resumen

Se estandarizó una técnica para certificación de jardines clonales de plantas de cacao utilizando marcadores moleculares RAPD, se analizaron las variedades CCN-51, TSH-565, ICS-60, ICS-95, IMC-67 y se compararon los clones existentes en el jardín clonal con sus lotes de injertación; para ello se utilizaron 8 primers capaces de generar mayor número de polimorfismos distinguidos mediante la electroforesis de productos de PCR. Los resultados obtenidos muestran que las variedades IMC-67, CCN-51, ICS-95 presentan mayores índices de similitud que las variedades ICS-60, TSH-565. Se encontraron que los índices de similitud están dentro del rango de confiabilidad reportado de los marcadores moleculares RAPD, permitiendo la certificación de estos lotes de injertación pertenecientes al jardín clonal del SENA sede Aguas Calientes municipio el Playón Santander, Colombia. Cabe destacar que la técnica RAPDs permite discriminar clones de aquellos individuos que no lo son.

Palabras clave: Polimorfismos, RAPD, caracterización molecular, extracción de ADN, amplificación de ADN.

Standardized technique for certification of gardens clonal cocoa plants (*Theobroma cacao*) using molecular markers rapd

Abstract

A standard technique was certificated for clonal gardens of cocoa plants using RAPD molecular markers, analyzing varieties CCN-51, TSH-565, ICS-60, ICS-95, IMC-67 comparing the existing clones in clonal garden with lots grafting. Eight primers were used, capable of generating greater number of polymorphisms distinguished by electrophoresis of PCR products. The results obtained show that the IMC-67 varieties, CCN-51, ICS-95 have higher rates of similarity with ICS-60 and TSH-565 varieties. We found that the similarity indices are within the range of reported reliability of RAPD molecular markers, allowing certification of these lots of grafting clonal garden belonging to SENA of the Aguas Calientes, Playón, Santander, Colombia. Importantly, the technique allows to discriminate clones RAPDs individuals who are not.

Keywords :Polymorphism, RAPD, molecular characterization, DNA extraction, DNA amplification

Padronização de uma técnica para certificação clonal de plantas jardins de cacau (*Theobroma cacao*) utilizando marcadores moleculares rapd

Resumo

A técnica foi jardins clonais para a certificação de plantas de cacau utilizando marcadores RAPD foram analisadas variedades CCN-51, TSH-565, ICS-60, ICS-95, IMC-67 e comparados os clones existentes no jardim clonal de enxerto com os seus itens, a 8 iniciadores foram utilizados, pode gerar um maior número de polimorfismos distinguidos por electroforese dos produtos de PCR. Os resultados obtidos mostram que o IMC-67 variedades, CCN-51, ICS-95 têm taxas mais altas de variedades similaridade ICS-60, TSH-565. Nós descobrimos que os índices de similaridade estão dentro do intervalo de confiança relatado de marcadores moleculares RAPD, que permita a certificação desses lotes de enxertia jardim clonal pertencente à cidade de Aguas Calientes baseada SENA Playón Santander, na Colômbia. É importante ressaltar que a técnica permite discriminar indivíduos clones RAPDs que não são.

Palavras-chave: polimorfismos, caracterização, RAPD molecular, a extracção de ADN, amplificação de DNA.

*Para citar este artículo: Hernández Garcia J.A, Ariza Garcia J, Cano Calle H.J, Contreras Pineda J. Estandarización de una técnica para la certificación de jardines clonales de plantas de cacao(*Theobroma cacao*) usando marcadores moleculares rapd .Bistua.2012.10(2):75-84.

+ Autor para el envío de correspondencia y la solicitud de las separatas: : Hernández Garcia J.A.Escuela de Química. Universidad Industrial de Santander. Colombia. email: jessyhernandez13@gmail.com.

Recibido: Enero 22 de 2012

Aceptado: Octubre30 de 2012

Introducción

La especie vegetal cacao, ha sido denominada en términos científicos (*Theobroma cacao* L), esta planta es originaria de la franja del trópico de América, Sin embargo, estudiosos afirman que los primeros arboles de cacao se originaron en amazonas, otros consideran que el nicho de formación de la especie es la región de Orinoco y algunos en el occidente del territorio colombiano. Es seguro que el hábitat en que se originó, está en el nuevo continente. (Sánchez, et al; 2005).

Existen aproximadamente unas 20 especies del género *Theobroma*, sin embargo solo 14 de ellas han sido clasificadas, entre ellas la más importante por su valor comercial es el cacao (*Theobroma cacao*) por que a partir de sus semillas se obtienen productos tan apreciados como el polvo de cacao o la

manteca de cacao, a partir de los cuales se elabora el chocolate (Botánica-online, 2008). Desde el punto de vista de la botánica, existen tres tipos de cacao, que a la vez determina tres clases de grano, clasificados según su calidad.

- a) Los tipos criollos
- b) Los forasteros
- c) Los trinitarios

Tradicionalmente, el cacao se ha multiplicado a través de la semilla sexual, originada de la polinización de una flor ocurrida en la naturaleza por acción de un insecto o del ser humano, para formar lo que ya denominamos un *híbrido*. (Echeverri, 2006). El ser humano ha querido resolver el problema de la variabilidad en la producción buscando plantas que produzcan una cantidad parecida



77

de frutos, ya que de otra forma sería imposible obtener cosechas abundantes. Es aquí donde el injerto (clonación) tiene su utilidad, pues pretende colocar en todas las plantas de la parcela una yema de una planta muy productiva, de mejor adaptación y con mayor resistencia a las enfermedades que tantos problemas causan a la cacaoicultura. 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. El injerto se compone de dos partes independientes y de composición genética diferente entre sí, las cuales llegan a formar una sola planta, un solo individuo. La *yema* (injerto) es tomada de una planta seleccionada por su producción (clon), la cual se va transformar en la copa del nuevo árbol. La otra, el *patrón* (porta-injerto), constituye la base o el soporte de la planta, por lo que conforma el sistema radicular, indispensable para el estado nutricional de la planta. El patrón debe ser seleccionado por su adaptabilidad a diferentes condiciones de suelo y clima, tolerancia a diferentes plagas y enfermedades radiculares (*Ceratocystis sp.* y *Phytophthora sp.*), y por su buen vigor vegetativo.

Actualmente existen diferentes estudios acerca de la compatibilidad y selección de una serie de plantas (*clones*, plantas madres de donde se van a obtener yemas) que están siendo utilizadas con éxito en varios países, como Colombia, Ecuador, Bolivia y Perú.

En el Servicio Nacional de Aprendizaje SENA sede Aguas Calientes, municipio el Playón Santander -Colombia, se producen injertos de 5 Clones diferentes que presentan mayor demanda para la producción de cacao en la región. Estos clones son el CCN-51, TSH-565, ICS-60, ICS-95, IMC-67.

La detección y análisis de la diversidad genética de los clones de cacao colombianos, se hace necesaria para el mejoramiento

genético del cultivo aprovechado en programas de selección y mejoramiento de productos basados en su calidad y en el reconocimiento de su procedencia, lo cual tiene implicaciones de propiedad industrial y comercial para aquellos cacaos nacionales, con los que se podrían producir cacaos especiales. Ello posibilita su utilización en forma sostenible, aprovechando la diversidad para la selección de nuevas variedades de interés, en cuanto a calidad y resistencia a patógenos (Sánchez, *et al*; 2007).

Sin embargo, los agricultores que poseen jardines clonales de esta planta, no cuentan con una certificación de la calidad genética proporcionada por un laboratorio en esta región del país, sino que utilizan metodologías tradicionales basadas en la combinación de aspectos agronómicos y morfológicos, siguiendo descriptores para esta especie. No obstante, esta caracterización ha sido cuestionada por basarse en caracteres fenotípicos, directamente influenciados por la heredabilidad del rasgo, factores ambientales, herencia multigénica, herencia cuantitativa y por la dominancia parcial en algunos caracteres, lo cual puede confundir la expresión de un rasgo genético (Osorio, *et al*; 2003).

Desarrollar una técnica estandarizada para la certificación de jardines clonales de plantas de cacao, utilizando amplificación al azar de fragmentos de ADN polimórficos (RAPD), hace posible caracterizar los individuos, así como evaluar relaciones filogenéticas entre los mismos de manera más eficiente.

El estudio de la diversidad genética basada en marcadores moleculares se presenta como una alternativa más precisa para la identificación de los materiales, ya que estas técnicas permiten la discriminación de los individuos en función del genotipo, independientemente del efecto ambiental o de las interacciones entre genes. Entre las metodologías desarrolladas, los RAPD ofrecen la ventaja adicional de ser una metodología



más rápida y sencilla, que no presenta el riesgo del uso de materiales radioactivos (Osorio, *et al*; 2005).

La técnica denominada amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD) utiliza indicadores ("primers") arbitrarios o semiarbitrarios para la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), método que logra la multiplicación in vitro de fragmentos definidos de ADN sin necesidad de recurrir a los vectores y su replicación en bacterias.

En el análisis PCR los iniciadores son usados para amplificar una secuencia específica del genoma, y en el análisis RAPD, el iniciador se usa para amplificar secuencias al azar de un patrón complejo de ADN. Los polimorfismos producidos por esta técnica se denominan marcadores RAPD, y pueden resultar de cualquier cambio en la secuencia o sitio de unión del iniciador (mutación puntual), lo que evita que el iniciador se una a la cadena, o también pueden ser el producto de cambios que alteren el tamaño o impidan la exitosa amplificación del ADN molde.

Esta tecnología ha sido utilizada para la catalogación de frutos, selección de variedades, y diferenciación de líneas clonales. (Claros, *et al*; 2009).

Esta técnica ha sido utilizada en varios trabajos concernientes a creaciones de bancos de germoplasma (Sánchez, *et al*; 2007), (Parminder, *et al*; 1995) análisis de la variabilidad genética de enfermedades (Grisales, *et al*; 2007), comparación de técnicas moleculares para la variabilidad genética de cacao (N'Goran, *et al*; 1994) estudios para el mejoramiento genético del cacao entre otros.

METODOLOGÍA

Material vegetal. Se utilizaron hojas jóvenes de 105 materiales de cacao pertenecientes a 5 variedades de clones (CCN-51, TSH-565, ICS-60, ICS-95, IMC-67). Estos se eligieron por ser los de mayor producción en la región de Santander, fueron colectados en el jardín clonal del Servicio Nacional de Aprendizaje SENA sede Aguas

Calientes municipio el Playón Santander, Colombia. De cada uno de estos 5 clones se tomaron 20 muestras aleatorias de lotes de injertación. En la tabla 1 se presenta el sumario de los materiales utilizados para esta caracterización. Las hojas fueron colectadas en papel manila transportadas bajo condiciones refrigeradas al laboratorio de bioquímica y microbiología, donde fueron lavadas con agua destilada y etanol, secadas y posteriormente maceradas en hielo seco hasta obtener un polvo fino el cual se almacena a -20°C para posteriores análisis.

Extracción y cuantificación de ADN. Para la extracción de ADN se utilizó el protocolo propuesto por (Giraldo, 2004) con algunas modificaciones. Se pesaron 100 mg de tejido foliar para luego homogenizar en un microtubo de 2.0 ml con 1.5 ml de 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%), se incubó la solución a 65 °C, por 2h posteriormente. Se centrifugaron las muestras a 6000 rpm durante 10 minutos para retirar el exceso de material vegetal (Centrífuga IEC-CL31 Multispeed con un rotor de microtubos AC2.14 estanco), la parte líquida es pasada a nuevos microtubos de 2.0 ml, se agregaron 500 µl de Cloroformo:Alcohol isoamílico 24:1 se separan las fases por centrifugación a 6000 rpm durante 12 minutos; la fase acuosa es traspasada a nuevos microtubos de 2.0 ml para adicionar 14 µl de proteinasa K 0.1 mg/ml se agitó por inversión, seguidamente se transfirió la nueva fase acuosa en microtubos de 1.5 ml, se realiza la precipitación del ADN adicionando 400 µl de Isopropanol frío dejándolo incubar a -20 °C por un tiempo de 1 hora, luego se centrifugó a 6000 rpm por 30 minutos. El sobrenadante fue eliminado y el Pellet de ADN fue lavado con 100 µl de Acetato de Amonio 10 mM en Etanol al 76%, se dejaron secar las muestras durante unos minutos para una posterior resuspensión en 200 µl de TE (Tris-Base10



mM pH 8.0, EDTA 1 mM pH 8.0). Finalmente se adicionó 5 μ l de Ribonucleasa A a 10 mg/ml se mezcló por inversión varias veces y se Incubaron a 37 °C por 30 minutos. El ADN es precipitado adicionando 400 μ l de etanol absoluto y 20 μ l de acetato de sodio 3M, se enfriaron las muestras durante 30 minutos a -20° C. El precipitado fue separado por centrifugación a 6000 rpm durante 30 minutos, el sobrenadante es eliminado, el pellet de ADN es lavado con etanol frío al 70 %, se dejó secar completamente al aire libre para una posterior resuspensión del ADN adicionando 20 μ l TE. El ADN extraído se almacenó a -20 °C para su posterior utilización La cuantificación del ADN se realizó usando como referencia Lambda DNA *Hind III* Digest fue verificada por electroforesis en gel de agarosa al 0,8%, tinción con Bromuro de Etidio y visualización en luz UV.

Amplificación de ADN y electroforesis.

La estandarización de las condiciones de amplificación por PCR empleó 8 primers que fueron elegidos por presentar el mayor polimorfismo para plantas de Cacao según (Grisales, et al; 2007). Dichos primers fueron sintetizados por IDT (Integrated DNA Technologies, Estados Unidos) descritos en la tabla 2 Las reacciones de amplificación se realizaron en un volumen final de 25 μ l conteniendo ADN genómico 7 ng primer 1.5 pm/ μ , dNTP mix 0.4 mM DMSO 5 % Buffer para PCR 1X, MgCl₂ 3.0 mM, Taq polimerasa (BIOLINE) 1.25 U/ μ l Las reacciones se realizaron en un termociclador modelo PTC-100 (MJ Reserch) programado con un paso de desnaturalización de 94°C durante 1 minuto, seguido de 45 ciclos de 1 minuto a 92°C, 1 min a 35°C, 2 min a 72°C y un paso final de 5min a 72°C Los productos de reacción fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 1,8% en buffer TBE 1X, durante 90 min. a 10 V/cm, para su visualización con luz UV, se realizó previa tinción con bromuro de etidio. 1.0 μ g/ml.

Análisis de datos. Cada variedad se analizó para la presencia (1) o ausencia (0) de cada

banda polimórfica detectada. Las bandas no polimórficas (es decir, uniformemente presentes en todas las variedades analizadas) no se computaron. Aquellas bandas pobremente resueltas en el gel o tenues se computaron como «dato perdido». Sólo se usaron en el análisis genético aquellas bandas intensas y claramente distinguibles. Todos los análisis estadísticos se realizaron empleando el programa Quantity one de BioRad. La matriz de similitud se construyó a partir de la matriz básica de datos binarios (MBD), empleando el coeficiente de Jaccard (Jaccard, 1908). 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). El dendrograma se generó con el algoritmo del método de agrupamiento no pesado de las medias aritméticas (UPGMA: *unweighted pair-group method of arithmetic average*) como está descrito por (Sneath, et al; 1973).

RESULTADOS Y DISCUSION

Para la extracción de ADN genómico de muestras de *Theobroma cacao*, se realizó una revisión bibliográfica de los protocolos de extracción existentes para este tipo de tejido, se procedió a establecer un protocolo de extracción de ADN genómico tomando como referencia la metodología propuesta por (cuatrecasas), con algunos cambios. Las modificaciones realizadas al protocolo original de extracción más relevantes fueron el aumento de la concentración de CTAB, esto permitió mayor accesibilidad a los organelos de las células dando como resultado una mayor concentración de ADN. Por otra parte considerando que los tejidos vegetales presentan un porcentaje considerable de compuestos fenólicos, que afectan la pureza del ADN extraído se utilizó PVPP al 1% dentro de la solución extractora ya que la acción de este permite absorción de dichos compuestos, evitando posibles contaminaciones en la extracción final. El



80

ADN inicialmente fue resuspendido en 40 μL de TE, se decidió concentrarlo realizando una precipitación etanólica y resuspenderlo en 20 μL de TE. Finalmente el total del ADN extraído fue de 95.4 ng por lo tanto la concentración del ADN extraído en el proceso estandarizado fue de 4.77ng/ μL . Las cantidades de ADN fueron adecuadas para su aplicación posterior. Así mismo, el ADN aislado presentó un elevado nivel de pureza por eliminación de los diferentes contaminantes coextraídos que pudieron inhibir la reacción de la enzima *Taq Polimerasa* en la PCR. Para establecer las condiciones óptimas de PCR se tomaron las propuestas por (Hernández, 2006) realizando ensayos para tres concentraciones de MgCl_2 (1.5, 3.0 y 4.5 mM) las mejores amplificaciones se obtuvieron con una concentración de MgCl_2 de 3.0 mM. Para la caracterización molecular se ensayaron 8 oligonucleótidos iniciadores (OPR-07, OPR-03, OPB-07, OPA-04, OPR-15, OPR-08, OPR-09, OPC-14) de la serie OP de Integrated DNA Technologies (IDT) que según la literatura mostraban alto grado de polimorfismo en la especie de *Theobroma Cacao*. Estos oligonucleótidos permitieron revelar diferencias entre las variedades de clones empleadas en este estudio; sin embargo el iniciador OPR-07 (5'-ACTGGCCTGA-3') presentó un patrón de bandas en cada una de las especies que permitieron realizar una mejor diferenciación entre clones razón por la cual fue el primer escogido para los estudios de RAPDs.

Para la certificación del jardín clonal es necesario comparar el ADN polimórfico del cual se obtuvieron las yemas para la injertación, con el ADN polimórfico de los lotes de injertación que se comercializan. El análisis estadístico de cada una de las variedades de *Theobroma cacao* fue realizado con el Software Quantity One de Bio-Rad no se tuvo en cuenta la intensidad de las bandas presentes para que los dendrogramas se originaran solo por la presencia o ausencia de

las bandas. Los análisis realizados a las 5 variedades de clones (CCN-51, IMC-67, TSH-565, ICS-60, ICS-95) mostraron que 3 de ellas (CCN-51, IMC-67, ICS-95) presentan alto grado de similaridad y los otros 2 (ICS-60, TSH-565) presentan una muy baja similaridad siendo muestras de un mismo lote lo cual sugiere que estas dos últimas variedades nos son clones. La comparación del conjunto de los productos de amplificación generados a partir de la utilización de primer OPR-07 para cada clon, se llevó a cabo mediante métodos de agrupamiento generando dendrogramas. El coeficiente de Jaccard muestra un buen ajuste a la matriz de similitud. La figura 1 muestra la electroforesis para los productos de amplificación de ADN polimórfico de la variedad CCN-51, se observa que la mayoría de las muestras presentan un gran número de bandas. Las muestras pertenecientes a esta variedad obtenidas de los lotes de injertación revelan un grado de similaridad considerable como se puede apreciar mediante el dendrograma (figura 2).

Existen dos grandes agrupamientos grupos A y B con un coeficiente de similitud del 0.50. Los subgrupo C y E presentan una similitud de 1 (máxima similitud) es importante resaltar que dentro del subgrupo C se encuentra la muestra del jardín clonal necesaria para la comparación. En cambio los subgrupos F y D presentan un coeficiente de similitud 0.86 y 0.92 respectivamente con los subgrupos C y E. Las variedades IMC-67 e ICS-95 presentaron un prototipo similar de dendrogramas con respecto al CCN.51. Las variedades ICS-60 y TSH-565 presentaron un bajo grado de similaridad entre clones del mismo lote de injertación, este comportamiento no es comparable con los presentados por las variedades CCN-51, ICS-95, IMC-67. Esta información se corroborará en la electroforesis para los productos de amplificación de ADN polimórfico y el dendrograma de la variedad ICS-60 (figura 3 y 4 respectivamente).



81

El coeficiente de similitud para la variedad ICS-60 se encuentra entre 0.37 para la muestra 6 y 0.88 aproximadamente para las muestras 1 y 4. Después de realizar los análisis estadísticos se procedió a evaluar la variabilidad genética. Los resultados obtenidos muestran que las variedades IMC-67, CCN-51, ICS-95 presentan mayores índices de similitud que las variedades ICS-60, TSH-565, sin embargo este coeficiente de similitud no alcanza su valor máximo (1), una posible causa es que no todas las bandas de una electroforesis presentan la misma intensidad lo que conlleva a que el análisis realizado con el Software discrimine aquellas bandas que posiblemente estén presentes, pero que su intensidad no sea considerable. La técnica RAPDs presenta valores de confiabilidad entre un 70-80% para el análisis de relaciones filogenéticas, cabe destacar que las tres primeras variedades analizadas se encuentran dentro del este rango, teniendo en cuenta las consideraciones anteriores es posible certificar genéticamente los lotes de injertación de las variedades IMC-67, CCN-51, ICS-95. Los lotes de injertación de las variedades ICS-60, TSH-565 mostraron un alto grado de polimorfismo, esto tiene como consecuencia un amplio rango del coeficiente de similitud. Siendo consecuentes con la metodología propuesta las 5 variedades de clones de *Theobroma cacao* recolectados recibieron el mismo tratamiento para el análisis de la variabilidad genética, lo que indica que los resultados obtenidos para estas 2 variedades no son consecuencia del procedimiento propuesto. Se puede decir que el alto grado de polimorfismo es debido a tratamientos no adecuados durante el proceso de injertación así como también la probabilidad de intercambios de clones entre los lotes presentes en el vivero. Como se mencionó anteriormente, la caracterización genotípica de la especie *Theobroma cacao* mediante la utilización de RAPD fue demostrada en trabajos previos. En la mayoría de estos trabajos se comparo la

relación filogenética entre diferentes variedades pertenecientes a esta especie para el mejoramiento de bancos de germoplasma, también se ha utilizado la técnica RAPD en estudios de comparación con otros marcadores moleculares (RFLPs, AFLPs, etc.). Dado que el interés primario de estos trabajos previos no fue la evaluación de la calidad genotípica de la especie, esta investigación se enfoco en aplicar una técnica que permita la certificación de jardines clonales de *Theobroma cacao* evaluando las relaciones filogenéticas entre lotes de injertación de una misma variedad y de esta forma poder valorar la calidad genotípica que es necesaria para el mejoramiento de cultivos y para la comercialización de cacao de excelente calidad.

CONCLUSIONES

El protocolo de extracción de ADN genómico con CTAB, es adecuado para obtener ADN de plantas de *Theobroma cacao* viable para su análisis usando marcadores moleculares ya que se obtiene 47.7ng por cada 0.1g de tejido foliar.

Las condiciones de PCR utilizadas para la amplificación de ADN de plantas de *Theobroma cacao* son apropiadas para la aplicación de la técnica RAPD. La concentración 3.0mM de cloruro de magnesio fue la indicada para el buen funcionamiento de la Taq – polimerasa y la utilización del primer OPR-07 permitió el análisis de la variabilidad genética entre los clones estudiados.

Mediante este trabajo se demuestra por primera vez la utilidad de los marcadores RAPD en la diferenciación e identificación entre clones de una misma variedad de *Theobroma cacao*, de importancia comercial en la región del Nororiente Colombiano.

Los resultados obtenidos del análisis realizado a cada uno de los lotes de injertación de las variedades de clones IMC-67, ICS-95, CCN-51 estuvieron en el rango de confiabilidad reportado de los marcadores moleculares RAPD permitiendo la certificación de estos



lotes de injertación pertenecientes al jardín clonal del Servicio Nacional de Aprendizaje SENA sede Aguas Calientes municipio el Playón Santander, Colombia.

A cada uno de las variedades de clones de los lotes de injertación se les aplico el mismo tratamiento de extracción de ADN y amplificación para la certificación genética usando los marcadores moleculares RAPDs, lo que permite concluir que los resultados obtenidos para las variedades ICS-60 y TSH-565 son debido a tratamientos erróneos en el proceso de injertación.

Este trabajo sienta las bases para la certificación de calidad genética de plantas fuera del tipo de *Theobroma cacao* mediante la técnica de RAPD, la cual es una metodología sencilla y de fácil implementación en un laboratorio medianamente equipado.

Se ha estandarizado la mejor metodología para demostrar que los clones que se ofrecen o que se están cultivando corresponden a los clones que se ofrecieron.

AGRADECIMIENTOS

Al Servicio Nacional de Aprendizaje SENA sede Aguas Calientes municipio el Playón Santander, Colombia, por brindarnos el material vegetal para los estudios realizados. A la Vicerrectoria de Investigación y Extensión de la Universidad Industrial de Santander por el financiamiento.

BIBLIOGRAFÍA

<http://www.botanical-online.com/botani.ico>

Octubre de 2008

<http://www.encuentros.uma.es/encuentros49/marcadores.html> Abril de 2009

Echeverri R J (2006). El injerto en la producción de cacao orgánico1. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología*. 78:101-105.

Giraldo C I. *et al* (2004). Determination of borojo sex (*Borojoa patinoi*, Cuatrecasas)

through molecular markers. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 4(2):9-14.

Grisales S, Afanador L (2007). Analysis of genetic variability in moniliophthora roveri with AP-PCR and RAPD in Antioquia, Colombia. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 9(2):15-32.

Hernandez R, *et al.* (2006). Analysis of genetic variation in clones of rubber (*Hevea brasiliensis*) from Asian; South and Central American origin using RAPDs markers. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 3(2):29-34.

Jaccard P (1908). Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bull. Soc. Vaud. Sci. Nat.* 44:223-270.

N'Goran J A K, Laurent A M (1994) Risterucci y C.Lanaud.Comparative genetic diversity studies of *Theobroma cacao* L. Using RFLP and RAPD markers. *Heredity*. 73:589-597.

Osorio M E. *et al.* (2003). Diversidad Genética de una Colección de Cacao Mediante RAPDS. *Revista Agronomía Trop*. 53(1): 5-16.

Osorio M E. *et al.* (2005) Estudio del Cacao (*Theobroma cacao* L.) Tipo Criollo de la Costa Central de Venezuela Mediante Amplificación Aleatoria de ADN Polimórfico.

Parminder S. *et al.* (1995). Use of RAPD for the study of diversity within plant germplasm collections. *Heredity*. 74:170-179

Sánchez I. *et al.* (2007). Análisis de la diversidad genética de accesiones de *Theobroma cacao* L. del banco de conservación a cargo de Corpoica. *Revista Corpoica – Ciencia y Tecnología Agropecuaria*. 8(2):26-3.

Sánchez I, *et al.* (2005). Un nuevo modelo para la identificación de la diversidad

genética de Cacao en Colombia. 1 ed. Colombia: CORPOICA C. I. Palmira, MINAGRICULTURA y CIAT 2005. p 9-11

Sneath P H A, Sokal R R (1973). Numerical taxonomy. *Freeman*

Nombre	Cantidad de clones de injertación tomados aleatoriamente	Cantidad de muestras tomadas del jardín clonal
CCN-51	20	1
TSH-565	20	1
ICS-60	20	1
ICS-95	20	1
IMC-67	20	1

Tabla 1. Sumario de materiales utilizados para esta caracterización.

Nombre del Primer	Secuencia	Cantidad
OPR-07	5'-ACTGGCCTGA-3'	0.31 mg
OPR-03	5'-ACACAGAGGG-3'	0.24 mg
OPB-07	5'-GGTGACGCAG-3'	0.27 mg
OPA-04	5'-AAATCGGGCT-3'	0.24 mg
OPR-15	5'-GGACAACGAG-3'	0.23 mg
OPR-09	5'-GGACAACGAG-3'	0.28 mg
OPR-08	5'-CCCGTTGCCT-3'	0.25 mg
OPC-14	5'-TGCCTGCTTG-3'	0.35 mg

Tabla 2: Primers utilizados para la amplificación del ADN según la metodología RAPD.

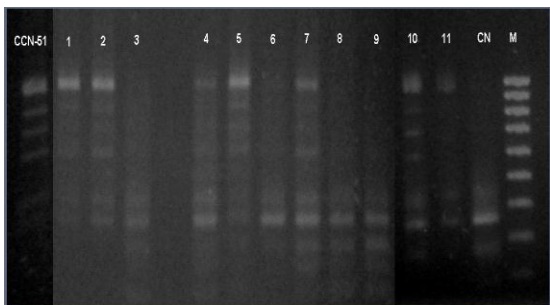


Figura 1: Electroforesis en geles de agarosa al 1.7% para productos RAPDs de la variedad CCN-51. Carril CCN-51: Productos RAPDs del jardín clonal. Carril 1-11: Productos RAPDs de los lotes de injertación. Carril CN: Control negativo (Reacción sin ADN). Carril M: Marcador de peso molecular de 1 Kb. Amplificación de ADN utilizando el primer OPR-07.

Figura 2 Dendrograma de UPGMA estimando las distancias genéticas entre las Muestras para la variedad CCN-51 obtenido utilizando el software Quantity One de Bio-Rad. Grupo A: Subgrupo C (Muestras 1, 2, 4, 5, 10, CCN-51). Subgrupo D (Muestra 7). Grupo B: Subgrupo E (Muestras 3, 6, 8, 9). Subgrupo F (Muestra 11).

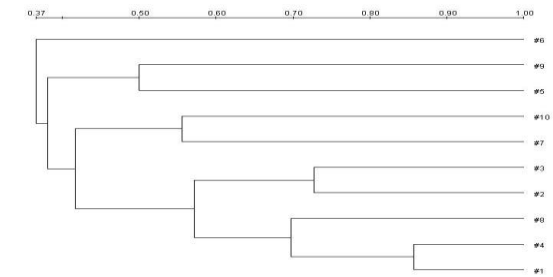
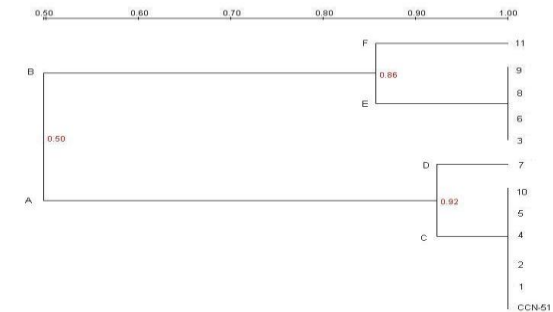


Figura 4: Dendrograma de UPGMA estimando las distancias genéticas entre las Muestras para la variedad ICS-60 obtenido utilizando el software Quantity One de Bio-Rad.

Figura 3: Electroforesis en geles de agarosa al 1.7% para productos RAPDs de la variedad ICS-60. Carril 1: Productos RAPDs del jardín clonal. Carril 2-10 : Productos RAPDs de los lotes de injertación. Carril CN: Control negativo (Reacción sin ADN). Carril M: Marcador de peso molecular de 1 Kb. Amplificación de ADN utilizando el primer OPR-07.

