

Caracterización fenotípica y genotípica de cultivares de cacao (*Theobroma cacao* L.) de Dibulla, La Guajira, Colombia

 Angélica Ramos Ospino¹,  Margarita Gómez Alvarez¹,  Elwi Machado-Sierra²,  Yani Aranguren^{2*}

¹ Universidad Libre Seccional Barranquilla. Barranquilla, Colombia

² Universidad Simón Bolívar. Barranquilla, Colombia

* Autor de correspondencia: Universidad Simón Bolívar. Facultad de Ciencias Básicas y Biomédicas. Laboratorio de Investigación en Microbiología. Sede principal Carrera 59 No. 59-65. Barranquilla, Colombia. yani.aranguren@unisimonbolivar.edu.co

Recibido: 13 de agosto de 2019

Aceptado: 30 de marzo de 2020

Publicado: 04 de septiembre de 2020

Editor temático: Andrés Cortes (Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria [AGROSAVIA])

Para citar este artículo: Ramos Ospino, A., Gómez Alvarez, M., Machado-Sierra, E., & Aranguren, Y. (2020). Caracterización fenotípica y genotípica de cultivares de cacao (*Theobroma cacao* L.) de Dibulla, La Guajira, Colombia. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 21(3), e1557. https://doi.org/10.21930/rcta.vol21_num3_art:1557

Resumen

En la Sierra Nevada de Santa Marta los cultivos de cacao están conformados mayoritariamente por cultivares híbridos comerciales y, aunque se encuentran cacaos nativos, estos son poco cultivados. Dada la necesidad de verificar si estos cultivares de cacao encontrados en la Sierra pertenecen al grupo genético tipo Criollo, se realizó una caracterización fenotípica y genotípica de cacaos del municipio Dibulla, La Guajira. Para esto, se muestrearon 11 cultivares en Mingueo. Los rasgos fenotípicos se evaluaron empleando descriptores UPOV para cacao. Los parámetros cualitativos y cuantitativos se cotejaron por análisis de conglomerado y análisis de componentes principales (ACP), y las variables cuantitativas se compararon a través de la prueba no paramétrica test de Mann-Whitney. Para evaluar las relaciones genéticas, se estandarizaron protocolos de biología molecular y se secuenció la región ITS. A partir de las secuencias, se realizaron agrupamientos por métodos de distancia y filogenéticos. Finalmente, se encontraron diferencias significativas entre las semillas ($p = 0,01$), y resalta la coloración blanca del cotiledón de los criollos en contraste con la coloración púrpura oscura de los híbridos. Asimismo, los análisis de conglomerados, ACP y los análisis de secuencias demostraron diferencias entre el grupo de los cacaos nativos y los híbridos comerciales cultivados; además, los cacaos nativos se emparentan con el grupo de cacao tipo Criollo.

Palabras clave: cacao Criollo, descriptores UPOV, fenotipo, genotipo, germoplasma

Phenotypic and genotypic characterization of cacao cultivars (*Theobroma cacao* L.) from Dibulla, La Guajira, Colombia

Abstract

In Sierra Nevada de Santa Marta, cacao plantations are comprised of commercial hybrid cultivars, and although native cacaos are found, they are not widely cultivated. Given the need to verify if these cacao varieties found in the Sierra region belong to the Criollo type genetic group, a phenotypic and genotypic characterization of cacao from the municipality Dibulla, La Guajira was carried out. For this, 11 cultivars were sampled in Mingueo. Phenotypic traits were evaluated using UPOV descriptors for cacao. The qualitative and quantitative parameters were compared through cluster and principal component analyses (PCA), and the quantitative variables through the non-parametric Mann-Whitney test. Molecular biology protocols were standardized, and the ITS region was sequenced to assess genetic relationships. From the sequences, groupings were carried out utilizing distance and phylogenetic methods. Finally, significant differences were found among the seeds ($p = 0.01$), and the white coloration of the cotyledon of the criollos or native stands out in contrast to the dark purple coloration of the hybrids. The cluster analysis, PCA, and sequence analysis groupings, showed differences between the group of native cacaos and commercial hybrids cultivated; in addition, native cacaos are related to the Criollo type group.

Keywords: Criollo cacao, genotype, germplasm, phenotype, UPOV descriptors

Introducción

El cacao *Theobroma cacao* L. es un árbol perteneciente a la familia Malvaceae, nativo de las regiones tropicales húmedas centrales y septentrionales de América del Sur (López-Medina, 2017). Según registros históricos, los procesos de domesticación, cultivo y consumo del cacao fueron iniciados por los mayas en México y Centroamérica, quienes lo consumían como una bebida llamada *xocoatl*, un precursor de los chocolates modernos (Motamayor et al., 2002; Young, 2008). No obstante, análisis genómicos indican que debe ser originario de la cuenca del Amazonas al noroeste de Sudamérica (Zarrillo et al., 2018).

Actualmente el cacao se cultiva en climas cálidos y lluviosos de América, África y Asia (Bhattacharjee & Kumar, 2007; Rodríguez-Medina et al., 2019), en sistemas agroforestales que permiten combinarlo con otros cultivos y especies nativas, en equilibrio con el medio ambiente (Jagoret et al., 2011; Navarro-Prado & Mendoza-Alonso, 2006; Roa-Romero et al., 2009; Romero & Urrego, 2016). El cacao es de gran importancia económica por su versatilidad de usos en la confitería artesanal, la industria cosmética y la agroalimentaria, como es el caso de la producción de chocolates, aceites y licores, respectivamente (Bennett, 2003). En Colombia, ha habido un aumento en el cultivo de cacao durante los últimos años, y para el 2017 se ubicaba como el séptimo productor del mundo (Food and Agriculture Organization [FAO], 2017). Este escenario hace que el cacao se convierta en una de las grandes apuestas sostenibles del mercado nacional e internacional, desde el punto de vista ambiental, social y económico; es decir, permite satisfacer todos los eslabones de la cadena productiva, garantizando una economía próspera, principalmente en regiones de posconflicto, promoviendo la paz y la sustitución de cultivos ilícitos (Rodríguez-Medina et al., 2019).

Se conocen tres tipos de cacao: el Criollo, originario de América del Sur y América Central; el Forastero, que procede de la cuenca del Amazonas; y el Trinitario, que surgió en Trinidad & Tobago como un híbrido de los dos primeros tipos (De La Cruz-Medina et al., 2012). La característica organoléptica más relevante del cacao Criollo es su sabor amargo, ácido y afrutado, con cotiledones blancos (Andrade-Aguirre & Angulo-Reynoso, 2007). Por su parte, el Forastero es el tipo de cacao más cultivado, estimándose que cubre más o menos un 85 % de la producción mundial, debido a que este tipo de cacao es más resistente a las enfermedades y plagas; con todo, su sabor es fuerte, amargo y ligeramente ácido (Romero & Urrego, 2016). El Trinitario es un tipo de cacao más resistente y productivo, pero de menor calidad que el Criollo (Andrade-Aguirre & Angulo-Reynoso, 2007).

Hasta finales del siglo XIX, el cacao Criollo era el más cultivado en Colombia, pero la presencia de enfermedades diezmoó este cultivo, que fue sustituido por el Forastero (Rodríguez-Medina et al., 2019). A partir de ese momento, se han recuperado y caracterizado materiales criollos que se han conservado en bancos de germoplasma; sin embargo, en la actualidad el cultivo comercial del tipo Criollo es restringido (Aranzazu et al., 2009; Oicatá, 1986; Perea et al., 2013; Rodríguez-Medina et al., 2019).

Las variedades vegetales contienen características diferenciales fisiológicas, morfológicas y genotípicas; de ahí la importancia de ser caracterizadas, estableciendo los rasgos particulares de un individuo o población, y de desarrollar programas de mejoramiento vegetal (Aranguren et al., 2010). Para realizar dicha caracterización, se deben utilizar variables morfológicas confiables, permitiendo así la diferenciación entre grupos. Estas variables están establecidas en las llamadas *Guías Técnicas para la Descripción Varietal* como las expedidas por la Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales (UPOV, 2011). La caracterización del germoplasma va acompañada con la determinación de los rasgos genéticos que permiten medir la variabilidad genética (Aranguren et al., 2010; Núñez-Colín & Escobedo-López, 2014). Para ello, se emplean marcadores moleculares, que son fragmentos de DNA que, por sí solos o combinados, pueden ser empleados para determinar la diversidad genética a través de la detección de sus polimorfismos (Azoifeifa-Delgado, 2006; Rocha, 2003).

Los polimorfismos de nucleótidos simples (o SNP, por sus siglas en inglés) son ampliamente empleados para genotipar y realizar selección asistida en mejoramiento genético de plantas, a partir de la secuenciación y análisis de regiones específicas del genoma (Chagné et al., 2007; De Wever et al., 2019; Poland & Rife, 2012). Las regiones ITS son secuencias de DNA ribosomal, fáciles de amplificar y alinear, utilizadas en el estudio de relaciones intra e interpoblacionales, puesto que muestran diferencias evolutivas y permiten obtener información filogenética y taxonómica de los individuos (Avendaño-Sánchez et al., 2015; Quijada et al., 2017).

En este estudio se tomaron muestras de los cacaos cultivados en el corregimiento de Mingueo, departamento de La Guajira, donde siembran cultivares de cacao comerciales y plantas de cacao nativas recolectadas en la Sierra Nevada, e identificadas por los agricultores como cacaos nativos tipo Criollo. No obstante, no existe evidencia de que estos sean del tipo Criollo, ya que este germoplasma no había sido caracterizado agrónomicamente. Por lo tanto, todos estos cultivares fueron caracterizados fenotípicamente empleando descriptores UPOV, y se realizó una evaluación genotípica por secuencias ITS, para identificar relaciones de parentesco entre los cacaos nativos de la región y los comerciales.

Materiales y métodos

El estudio se realizó a partir de los materiales cultivados en la colección de germoplasma de cacao en la finca Brisas del Mar, de la Asociación de Productores Orgánicos del Municipio de Dibulla (APOMD), ubicada a 48 m s.n.m. en el corregimiento de Mingueo, Dibulla, en el departamento de La Guajira. La finca se ubica en un área de bosque tropical, a 10 km en dirección nordeste del poblado de Mingueo. Se recolectaron 10 muestras de plantas de cacao, identificadas por los productores como 4 cacaos criollos, 5 clones comerciales y un híbrido desconocido (tabla 1). Adicionalmente, se obtuvo una muestra de cacao tipo Criollo cultivada en Becerril, Cesar, que fue empleada como referencia. El muestreo fue de tipo aleatorio simple, para efecto de la recolección de información y muestra. Los datos morfológicos de las plantas de cacao se tomaron *in situ*, de acuerdo con los criterios establecidos para el *T. cacao* por la UPOV (2011). Además, se colectaron hojas jóvenes para realizar el análisis genético.

Tabla 1. Muestras de cacaos colectadas

Código de muestra	Tipo de cacao	Georreferencia	
001	Híbrido ICS 39	11°09'46"N	73°22'32"O
002	Híbrido ICS 95	11°09'44"N	73°22'33"O
003	Híbrido ICS 39	11°09'46"N	73°22'32"O
004	Híbrido ICS 60	11°09'45"N	73°22'33"O
005	Híbrido CCN 51	11°09'45"N	73°22'34"O
006	Criollo	11°09'39"N	73°22'29"O
008	Criollo de Becerril	9°42'10"N	73°16'42"O
009	Híbrido desconocido	11°10'14"N	73°20'49"O
010	Criollo	11°10'12"N	73°21'04"O
011	Criollo	11°10'14"N	73°20'56"O
012	Criollo	11°10'14"N	73°20'58"O

Fuente: Elaboración propia

En la caracterización de la hoja, de cada planta se tomaron cinco muestras para la medición de cada variable. Se seleccionaron hojas con buen estado fitosanitario, ubicadas en el quinto nodo de ramas ubicadas en el árbol a la altura del pecho, en periodo de fructificación. Se tomó la medida del largo y ancho de la lámina foliar, así como los rasgos cualitativos: forma de la base, forma del ápice, intensidad del color verde. Igualmente, se colectaron frutos fisiológicamente maduros sin síntomas de enfermedad, y se midió la longitud, diámetro, grosor del epicarpio, concentración de sólidos solubles de la pulpa y pH. Asimismo, se valoraron las características cualitativas: forma de mazorca, forma del ápice, forma de la base, color de la mazorca, superficie, profundidad de los lomos y color de la pulpa. Además, se contó la cantidad de semillas íntegras por fruto. De cada fruto se tomaron cinco semillas y se evaluó longitud, ancho y grosor, así como el color del cotiledón y forma en sección longitudinal. Todas las mediciones de frutos y semillas se realizaron con un calibrador vernier digital; en la concentración de sólidos solubles se empleó un refractómetro y el pH se estimó con un pH-metro portátil. En la identificación de rasgos cualitativos como formas y colores se usó como referencia las guías del descriptor UPOV (UPOV, 2011) y del *Catálogo de cultivares de cacao* (García, 2009).

Los datos recopilados en la caracterización fenotípica fueron tabulados en Microsoft Excel™ y posteriormente analizados con herramientas estadísticas. Las variables cuantitativas de los cacaos híbridos comerciales y los cacaos criollos se compararon a través de la prueba no paramétrica test de U o Mann-Whitney. Adicionalmente, se realizaron análisis de clúster, empleando el programa PC-ORD versión 5.0. Para ello, se construyeron matrices calculando las distancias euclidianas y los agrupamientos por el método de Ward. Los datos cuantitativos fueron normalizados antes de calcular las distancias y se construyeron dendrogramas. Posteriormente, se aplicó estadística multivariada (Análisis de Componentes Principales [PCA]) empleando todos los rasgos evaluados.

Para la caracterización genotípica, se utilizaron hojas jóvenes de cada planta de cacao y se conservaron en tubos con sílica gel. Luego, se extrajo el ADN siguiendo el protocolo de Lodhi et al. (1994)

con modificaciones. Se cuantificó y determinó la pureza del ADN por espectrofotometría empleando un NanoDrop ND-2000. A partir de los cebadores disponibles en el banco de *primers* (iniciadores) del Laboratorio de Investigación en Microbiología de la Universidad Simón Bolívar, se realizó un análisis *in silico* sobre los diferentes genomas secuenciados de *T. cacao*, empleando la herramienta BLAST (Ye et al., 2012) y el algoritmo Clustal W, del programa Bioedit Sequence Aligment Editor Versión 7.0.5.3.

Luego, se probaron los cebadores por PCR y se seleccionó el par más específico y con mejor rendimiento de amplificación. Los *primers* seleccionados son el 86F 5'-GTGAATCATCGAATCTTTGAA-3' y 4R 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' (White et al., 1990). Posteriormente, se optimizó la reacción de amplificación agregando DMSO (Miranda et al., 2010). Los productos de PCR fueron purificados y secuenciados por método Sanger, a través de la empresa Macrogen en Corea del Sur. Una vez obtenidas las secuencias, se analizaron los cromatogramas para verificar su calidad, y se editaron eliminando los extremos de baja calidad, a través del programa BioEdit. Seguidamente a cada secuencia se le realizó un *Blast* (Ye et al., 2012) para verificar la identidad de las secuencias y descartar contaminación.

Finalmente, se construyeron dendrogramas por métodos de distancia (UPGMA, Neighbor Joining) y métodos filogenéticos (máxima verosimilitud y máxima parsimonia), mediante el programa Mega X (Kumar et al., 2018). Esto se hizo con el fin de determinar las relaciones de parentesco entre las secuencias ITS de cada cultivar. Se calculó el mejor modelo evolutivo y, a partir del árbol filogenético obtenido por el método de máxima verosimilitud bajo los parámetros del modelo evolutivo Tamura-3 y un *Bootstrap* de 1.500 repeticiones (Kumar et al., 2018), se construyó un árbol consenso para validar los resultados obtenidos por los otros métodos de agrupamiento. Además, se usó como grupo externo la secuencia de ITS de cacao (JQ228376) reportada en el GenBank.

Por otra parte, se hizo una búsqueda *in silico* de otros marcadores que podrían ser empleados en trabajos futuros en la discriminación entre cultivares de cacao. Para ello, se realizó una búsqueda de los genes *matK* y *rbcL*, así como los espaciadores intergénico *psbA-trnH* y *rpl32-trnL* en los genomas de cacao presentes en las bases de datos; a partir de ellos, se hicieron análisis por métodos filogenéticos.

Resultados y discusión

Caracterización fenotípica

La forma de las hojas fue uniforme dentro de cada individuo y de cada tipo de cacao evaluado. El largo de la hoja varió entre 271,2 y 392,6 mm, mientras que el ancho tuvo valores entre 90,0 y 132,6 mm. En total se observaron dos formas de la base y dos del ápice. Igualmente, en la intensidad del color de la hoja también se observaron dos variantes. La muestra de hoja obtenida de Becerril, identificada con el código 008, tuvo el menor tamaño con 287,0 mm de longitud y 90,6 mm de ancho. Además, la mayoría de las hojas de los cultivares evaluados posee la base obtusa, el ápice acuminado, con intensidad de color media. Aunque el tamaño de la hoja no es empleado para diferenciar los cultivares de cacao, las diferencias observadas, especialmente en el ancho del limbo, reflejan que existe un grado de variabilidad entre ellos.

Igualmente, la forma de los frutos fue homogénea dentro de cada individuo evaluado. La longitud en todos los cultivares varió entre 110 y 277 mm; el diámetro, entre 55 y 200 mm, y el grosor del epicarpio, entre

4,35 y 17,97 mm. Se observó diversidad en las formas del fruto, y la forma oblonga fue la más frecuente (figura 1). En la mayoría de los cultivares el estrangulamiento basal del fruto estuvo ausente o muy débil; se observaron dos formas de ápice, y la superficie del fruto que predominó fue la moderadamente rugosa. El color del fruto fue variado, sobresaliendo el amarillo. Los colores de la pulpa observados fueron blanco y crema claro (tabla 2). Esta diversidad de formas entre cultivares muestra la variabilidad que existe entre ellos, rasgos que permiten diferenciarlos e identificarlos.



Figura 1. Frutos de *Theobroma cacao* de cultivares del corregimiento de Mingueo. a. Criolo-12; b. Criolo-11; c. Criolo-6; d. CCN51-5; e. ICS60-4; f. ICS39-3; g. ICS95-2; h. ICS39-1.

Fuente: Elaboración propia

En relación con el número de semillas por fruto, el clon CCN51 es el que posee mayor cantidad de semillas, seguido del Criollo de Becerril (008), con 42 semillas; el cultivar con menor cantidad de semillas fue el híbrido ICS95 (tabla 2). El número promedio de semillas fue 30, con una longitud que osciló entre 29,76 y 21,53 mm, y un ancho entre 15,17 y 10,59 mm. El grosor de las semillas varió de 7,9 a 12,2 mm. En este sentido, el tamaño de las semillas de los criollos encontrados en Mingueo fue más grande que el de los híbridos. La mayoría de las semillas fueron ovales u oblongas, y el color del cotiledón predominante fue el púrpura oscuro, seguido del blanco. Todas las muestras de los cacaos identificados como criollos poseen cotiledones de color blanco (tabla 2). Las variantes morfológicas de las semillas observadas son características de cada cultivar y se reflejan en las características productivas y organolépticas de estos cacaos. De esta manera, sobresale la coloración de los cacaos criollos en relación con los híbridos comerciales (García, 2009).

Tabla 2. Características fenotípicas sobresalientes de los cultivares de cacao encontrados en Dibulla, La Guajira

Muestra	Ancho del limbo (mm)	Diámetro del fruto (mm)	Longitud de la semilla (mm)	Ancho de la semilla (mm)	Grosor de la semilla (mm)	Grados Brix	Forma de fruto	Color de fruto	Color de pulpa	Forma de la semilla	Color del cotiledón
ICS39-1	126,8 ± 9,2	92,0 ± 14,1	27,78 ± 2,35	13,54 ± 0,53	10,50 ± 0,85	21,5 ± 0,5	Oblonga	Amarillo verdoso	Crema claro	Oblonga	Púrpura oscuro
ICS95-2	123,2 ± 7,4	82,0 ± 18,3	23,36 ± 1,08	14,07 ± 0,65	10,47 ± 0,80	19,0 ± 0,1	Oblonga	Rojo medio	Blanco	Elíptica	Púrpura oscuro
ICS39-3	123,6 ± 8,2	81,0 ± 15,5	29,71 ± 1,96	13,08 ± 0,43	9,30 ± 0,17	19,5 ± 0,1	Oblonga	Naranja	Crema claro	Oblonga	Púrpura oscuro
ICS60-4	111,4 ± 8,6	78,0 ± 18,2	23,58 ± 1,88	13,20 ± 1,85	8,86 ± 1,05	21,5 ± 0,2	Elíptica	Amarillo verdoso	Blanco	Oval	Púrpura oscuro
CCN51-5	121,4 ± 25,3	96,5 ± 19,8	24,72 ± 1,07	13,59 ± 1,06	8,80 ± 1,09	16,2 ± 0,5	Oblonga	Rojo oscuro	Crema claro	Oblonga	Púrpura claro
CRI0-6	116,8 ± 14,9	60,0 ± 17,2	21,53 ± 1,16	14,35 ± 1,16	9,34 ± 1,81	16,0 ± 0,1	Oblonga	Amarillo	Crema claro	Oval	Púrpura oscuro
CRI0-8	90,6 ± 12,2	73,8 ± 6,4	22,04 ± 1,71	10,59 ± 0,29	7,90 ± 0,44	16,7 ± 0,0	Oboval	Amarillo	Crema claro	Oblonga	Café
HIB-9	132,6 ± 13,7	200,1 ± 29,1	29,76 ± 1,17	14,76 ± 1,31	10,60 ± 1,63	13,5 ± 0,6	Oblonga	Naranja	Blanco	Oblonga	Púrpura oscuro
CRI0-10	131,6 ± 21,3	73,0 ± 11,1	23,94 ± 2,14	15,17 ± 0,59	10,85 ± 1,12	18,2 ± 0,2	Oboval	Amarillo	Blanco	Oval	Blanco
CRI0-11	129,0 ± 24,6	71,0 ± 13,7	23,36 ± 1,44	13,12 ± 1,50	10,15 ± 0,96	15,3 ± 0,1	Oblonga	Amarillo	Blanco	Oval	Blanco
CRI0-12	122,4 ± 7,3	55,0 ± 9,1	23,08 ± 1,70	15,01 ± 0,77	12,20 ± 1,06	16,0 ± 0,1	Oblonga	Naranja	Crema claro	Oval	Blanco

Fuente: Elaboración propia

Los cultivares de cacao estudiados fueron agrupados en cacaos nativos y cacaos no nativos, y se compararon los rasgos cuantitativos entre los dos grupos. Según la prueba de Mann-Whitney, se acepta la hipótesis nula H_0 para las variables *longitud del fruto*, *longitud del limbo*, *grosor del epicarpio*, *número de semillas* y *pH*, es decir, no existen diferencias significativas entre los dos grupos de cacao ($p = 0,01$). Por otro lado, al comparar las variables *ancho del limbo*, *diámetro del fruto*, *°Brix* y *longitud, ancho y grosor de la semilla*, se rechaza la hipótesis nula, señalando que existen diferencias significativas con 99 % de confianza ($p = 0,01$) entre los cacaos criollos y los híbridos, para estas variables.

El análisis de agrupamiento mediante características fenotípicas cuantitativas por método de Ward forma dos grandes clados (figura 2): en un clado se ordenaron los cultivares criollos, incluyendo la variedad de cacao Criollo usado como control, y en el otro, los cultivares híbridos.

El PCA se realizó comparando las características cualitativas y cuantitativas (figura 3). La dispersión de las muestras indica que los parámetros con mayor influencia sobre la variabilidad son GS (grosor de la semilla), CC (grosor del cotiledón), LF (longitud del fruto), CF (color del fruto), FF (forma fruto), PLF (profundidad entre los lomos), LS (longitud de la semilla) y FLSL (forma longitudinal de la semilla). Asimismo, se observa una segregación de los cacaos criollos de los cultivares comerciales (figura 3).

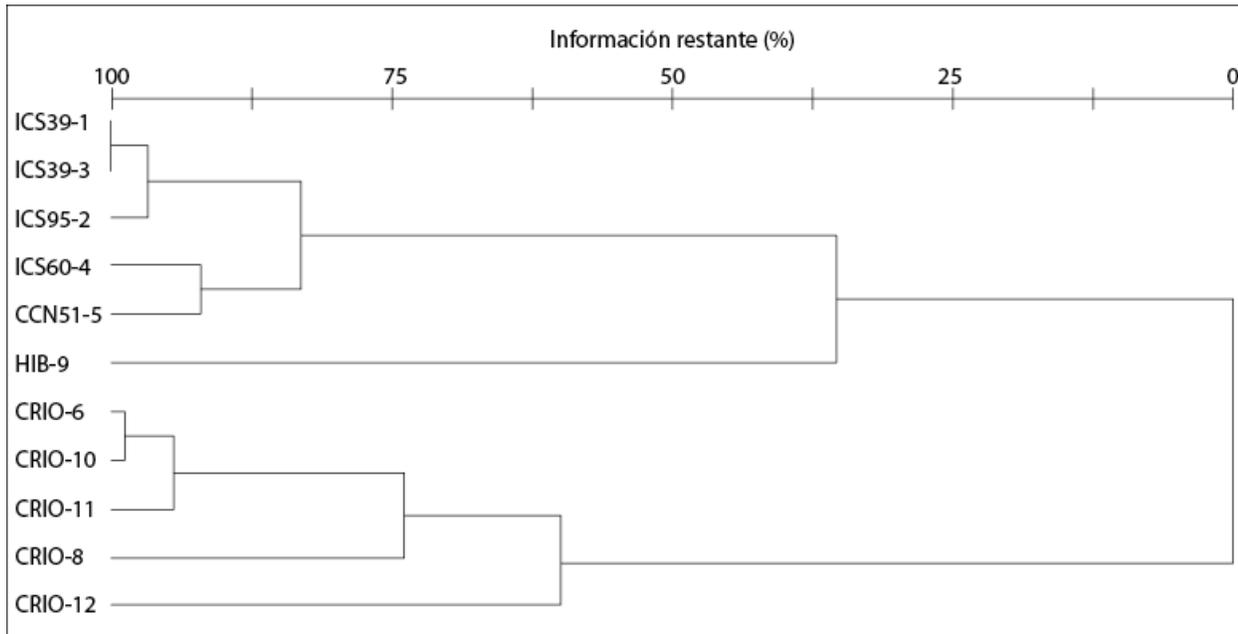


Figura 2. Dendrograma de los cultivares de cacao evaluados a partir de rasgos fenotípicos cuantitativos. Agrupamiento por método de Ward y distancia euclidiana. Fuente: Elaboración propia con PCORD

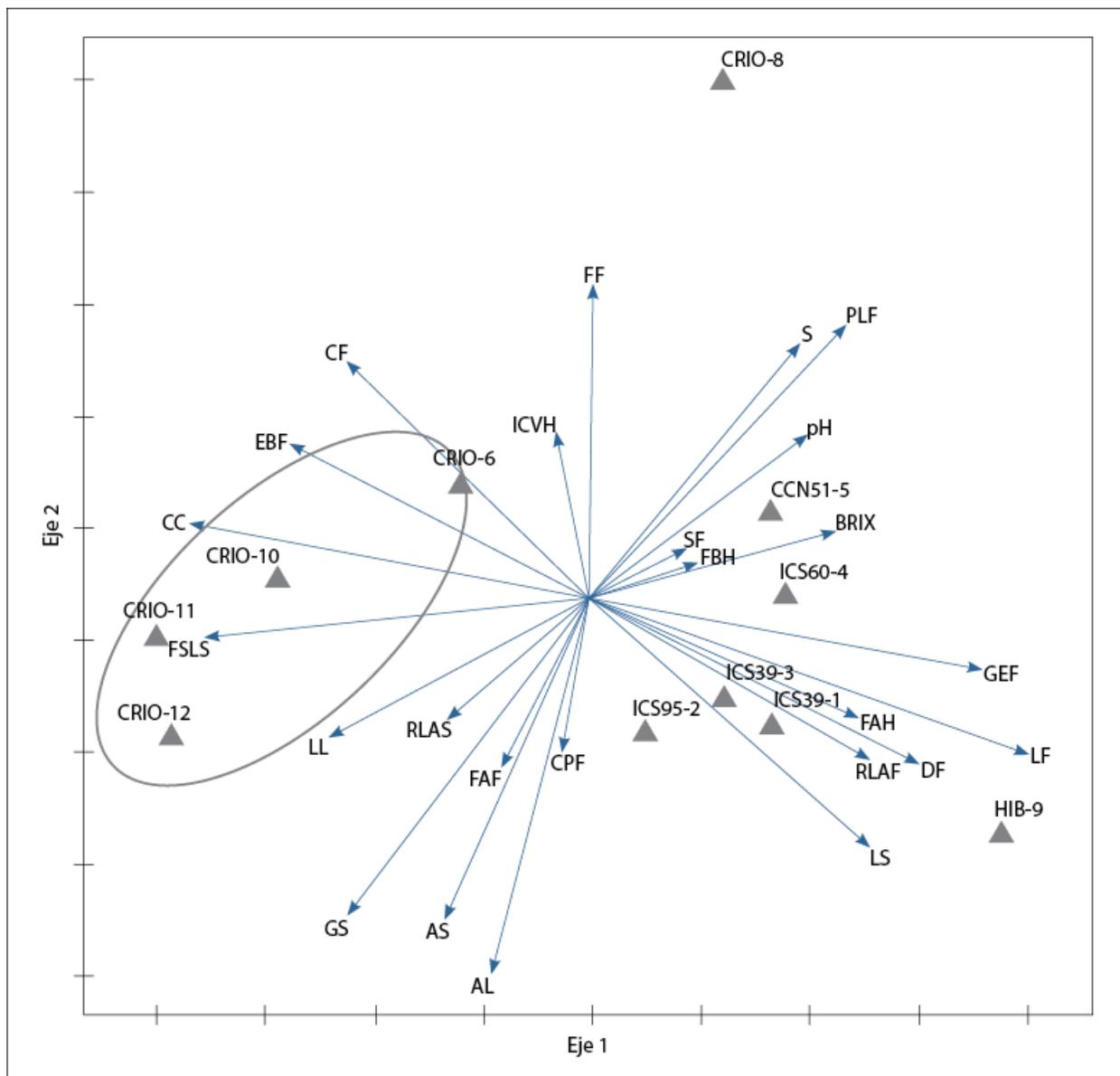


Figura 3. Análisis multivariado PCA a partir de características fenotípicas cuantitativas y cualitativas. Fuente: Elaboración propia con PCORD

Análisis genotípico

Inicialmente se realizaron algunas extracciones de ADN; sin embargo, el rendimiento y la calidad fueron muy bajas. Dentro de este procedimiento, las primeras extracciones orgánicas no separaron bien los ácidos nucleicos de los residuos celulares, pues al final del procedimiento se observaron grandes cantidades de un pellet blanco, y no se lograba amplificar la secuencia ITS a partir de estos ADN. Por este motivo, se realizaron varios ajustes y pruebas empleando diferentes concentraciones de PVP, sin obtener cambios significativos. Luego, se aumentó la concentración de 2-β-Mercaptoethanol al 1 % y el número de

extracciones orgánicas con cloroformo: AIA hasta cuatro veces. Así se obtuvieron mejores resultados, que fueron verificados por cuantificación espectrofotométrica.

Uno de los factores que afecta la extracción de ácidos nucleicos a partir de hojas de *T. cacao*, y que interfiere en la calidad y cantidad de ADN, es la alta concentración de polifenoles y polisacáridos en el tejido foliar de la planta (Henao et al., 2017; Martínez et al., 2013; Schrader et al., 2012). Una vez realizados los ajustes al protocolo de extracción, se obtuvieron los ADN; según la relación 260/280, estos aún contenían algunos contaminantes. Dada la presencia de estos residuos, se ajustaron las concentraciones de la muestra realizando diluciones para disminuir el efecto de inhibidor y mantener una concentración final de ADN de 10 ng/mL. Como han expresado algunos autores, este tipo de problema es común cuando se trabaja con esta especie (Chia-Wong, 2009; Martínez et al., 2013; Ruiz, 2014). Luego se ajustó el perfil térmico de la amplificación por PCR y todos los fragmentos se evidenciaron en los corridos electroforéticos. El tamaño de estas secuencias fue de 380 pb y corresponde con la región ITS2, ubicada entre la región 5,8S y la subunidad mayor del ribosoma (White et al., 1990). Esta región intergénica fue seleccionada porque permite observar variaciones intraespecíficas, debido a que posee menor presión selectiva que las regiones codificantes (Quijada et al., 2017; Zambrano, 2017).

Una vez obtenidas las secuencias, se realizaron análisis de agrupamiento por métodos de distancia y métodos filogenéticos UPGMA, Neighbor-Joining, máxima verosimilitud y máxima parsimonia. Se evaluaron los modelos de sustitución nucleotídica para estas secuencias y se determinó que el modelo evolutivo que mejor se ajusta es el de Tamura-3 (Tamura, 1992); a partir de estos parámetros, se construyeron los dendrogramas. En todos los métodos se formó un clado en donde se agrupan los cacaos criollos (incluyendo el de referencia de Becerril), que se distancia del clado de los cacaos híbridos comerciales. Además, la mayoría de los clados están estadísticamente soportados por todos los métodos. Así, se construyó un árbol mediante el método de máxima verosimilitud, ubicando los clados consenso y señalando la probabilidad para un *Bootstrap* de 1.500 réplicas para cada método (figura 4).

A pesar de que los ITS utilizados en el trabajo permitieron diferenciar al grupo de cacaos criollos de los comerciales, no permiten responder toda la historia evolutiva. Por esto, se realizó un análisis prospectivo *in silico* de otros marcadores, que permiten complementar este análisis y sentar bases para futuras investigaciones. Inicialmente, se hizo una búsqueda de los genomas de cloroplasto de cultivares de cacao y otras especies de la familia Malvaceae depositados en el GenBank (Benson et al., 2012). Para todos los análisis se usaron los mismos cultivares de cacao y las especies de la familia variaron en cada marcador. En estos genomas se realizó una búsqueda *in silico* y se determinó, por métodos filogenéticos, que los marcadores *matK* y *psbA-trnH* tienen variabilidad suficiente para ver diferencias entre tipos de cacao. Por otro lado, *rbcL* y *rpl32-trnL* no permiten resolver las diferencias entre cultivares de cacao.

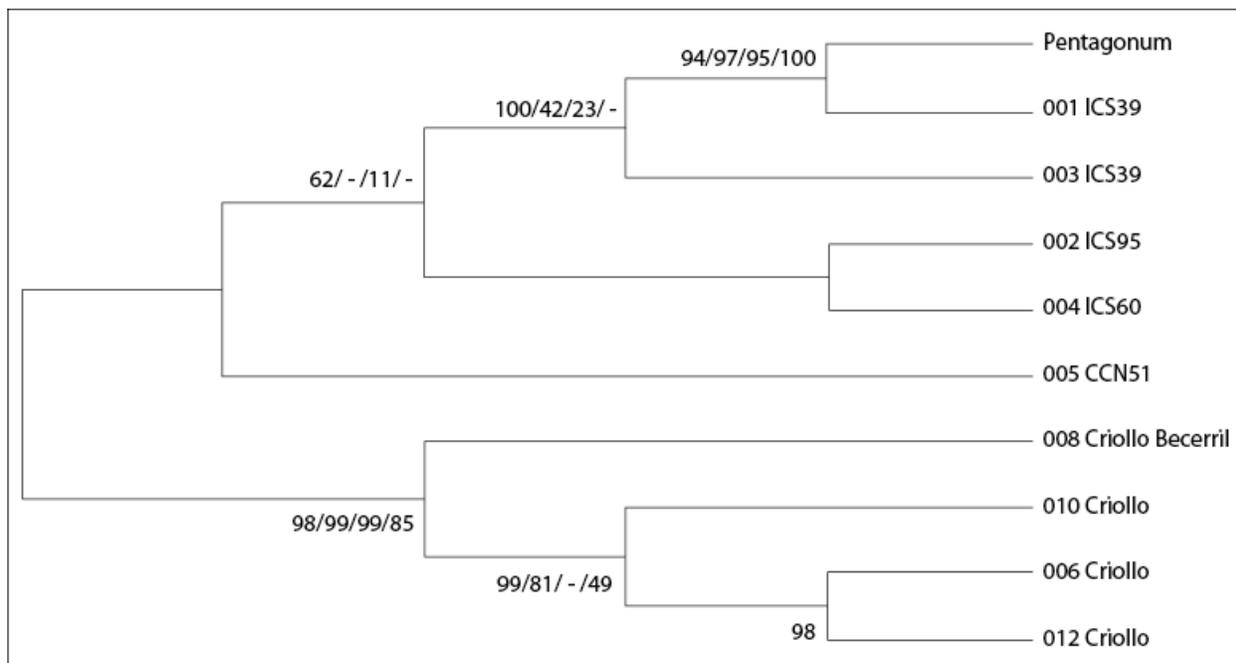


Figura 4. Análisis de parentesco entre cultivares de cacao de Dibulla, a partir de la región intergénica ITS. El árbol filogenético se construyó por el método de máxima verosimilitud, bajo los parámetros del modelo evolutivo Tamura-3 y un *Bootstrap* de 1.500 repeticiones. Los clados se validaron por los métodos de máxima verosimilitud, máxima parsimonia, UPGMA y Neighbor-Join, respectivamente.

Fuente: Elaboración propia con Mega X

En la Sierra Nevada de Santa Marta, el municipio de Dibulla cuenta con una diversidad biológica y unas características ambientales que favorecen una creciente y dinámica actividad agrícola. En este sentido, es necesario realizar programas de capacitación para la producción de cultivos de cacao de calidad a través de la identificación, selección y utilización de materiales recomendados a nivel internacional y, a su vez, la promoción del rescate de genotipos sobresalientes de tipo Criollo. Esto permitiría la conservación y multiplicación de germoplasma para iniciar programas de mejoramiento genético, con el objetivo de incrementar la calidad de los cacaos, así como la promoción de sistemas de cultivo eficientes y sostenibles en el tiempo. Este trabajo permite identificar los tipos de cacaos que se cultivan en la región, con el fin de promover su cultivo y dinamizar sus productos finales.

Al momento de caracterizar e identificar un cultivar, los rasgos fenotípicos son los más distintivos. El fenotipo se entiende como el conjunto de rasgos que son observables, ya sean morfológicos, fisiológicos o comportamentales, dentro de una especie o población; este depende del genotipo, y puede estar influenciado por factores ambientales y nutricionales (Botero & Arias, 2018). En este sentido, los individuos analizados se ubicaban en la misma parcela, en un ambiente uniforme, bajo condiciones de temperatura, humedad y radiación poco variables, bajo el mismo régimen de fertilización y con prácticas fitosanitarias orgánicas iguales; además, fueron colectados y medidos el mismo día. Por lo tanto, la variación fenotípica observada debe tener poca influencia ambiental.

Dentro de los cacaos nativos encontrados en Dibulla, se evidencian claramente rasgos propios del cacao tipo Criollo, que los diferencian de los cacaos comerciales (figuras 2, 3 y 4). Estos cacaos se caracterizan por poseer hojas cuya forma de la base y ápice es obtusa y acuminada, respectivamente; la longitud y ancho de dichas hojas son uniformes. Por otra parte, la mayoría de los frutos de este cacao tienen forma oblonga, la superficie es moderadamente rugosa y el estrangulamiento basal es débil (tabla 2). Además, se encontraron dos formas de fruto, uno con ápice entallado y otro con ápice agudo. En cuanto al tamaño, los frutos son más pequeños en longitud, ancho y grosor que los comerciales. Las semillas son uniformes, con forma oval y moderadamente alargadas, y su tamaño es semejante al de los comerciales (tabla 2). En cuanto a los cultivares comerciales evaluados, se observó que conservan la mayoría de las características morfológicas descritas por García (2009).

Asimismo, uno de los rasgos fenotípicos empleados para distinguir los cacaos criollos de otros tipos es el color del cotiledón (Avenidaño et al., 2014; Ventura et al., 2004). De acuerdo con esto, el color del cotiledón presentó una gran variación que se ve reflejada en el efecto sobre la distribución de las muestras en el PCA (figura 3). De este modo, se observó que los cultivares de cacaos comerciales presentaron coloración púrpura oscura, y los cacaos denominados criollos, cotiledón blanco (tabla 2).

En el caso del criollo 006, la caracterización fenotípica cualitativa mostró que este comparte características con algunos cacaos comerciales, como el color del cotiledón y la forma de la base de la hoja aguda, lo que sugiere que este criollo no sea puro, y que esté emparentado con un híbrido. Asimismo, el criollo 008 de Becerril posee algunas características semejantes al clon CCN 51, indicando que es originario de cruces entre Forasteros y Criollos (García, 2009). No obstante, son pocas las características fenotípicas que relacionan estos cultivares, y estas pueden ser características poligénicas; por lo tanto, habría que hacer más análisis genéticos para determinar el grado de parentesco. Por ello, se hace necesario hacer estudios poblacionales, que abarquen mayor número de muestras, una distribución más amplia, y la segregación de rasgos en la descendencia, para examinar distinción, homogeneidad y estabilidad.

Los ITS utilizados en el trabajo permitieron diferenciar al grupo de cacaos criollos de los comerciales; sin embargo, no terminan de responder toda la historia evolutiva (Zambrano, 2017). La pequeña región nuclear escogida no representa todo el genoma y, por lo tanto, no cuenta toda la evolución genética de la especie. El análisis de marcadores de DNA de cloroplasto (cpDNA) se ha utilizado cada vez más en genética de poblacionales para determinar su estructura, flujo de genes, frecuencia de haplotipos y relaciones filogenéticas (Gutiérrez-López et al., 2016). Por esta razón, se hizo una evaluación *in silico* de otros marcadores de secuencia del genoma de cloroplasto, que permitirán hacer en el futuro análisis más profundos y precisos entre cultivares de cacao. Los análisis filogenéticos realizados los marcadores *matK* y *trnH-psbA* podrían resolver mejor las diferencias entre cultivares de cacao y permitirían entender mejor el origen y las relaciones de parentesco de los cacaos de la región. Asimismo, en futuros estudios se podrían emplear otros marcadores como los microsatélites, que permiten estimar la diversidad genética (Aranguren-Díaz et al., 2018; Lanaud & Risterucci, 1999).

Conclusiones

La colección de cacaos criollos de la Asociación de Productores Orgánicos del Municipio Dibulla es un importante recurso fitogenético que debe ser preservado. El análisis fenotípico y genotípico evidencia que estos cultivares de cacaos nativos poseen diferencias con respecto a los cultivares comerciales. Además, este

germoplasma nativo se puede clasificar dentro del grupo genético de los cacaos tipo Criollo. Sin embargo, deben hacerse más estudios que permitan categorizarlo y certificarlo.

El presente trabajo fue una línea base para el conocimiento de los cacaos criollos de la Sierra Nevada de Santa Marta, que permitirán el desarrollo de nuevos estudios, para así profundizar en la denominación y certificación de estos tipos de cacao. En este sentido, se propone realizar más estudios empleando mayor número de individuos de cacao criollos, mediante el uso de los marcadores *matK* y *trnH-psb*, para establecer mejor las relaciones entre los cultivares de cacao y las variaciones intrapoblacionales.

Finalmente, la conservación de cultivares de cacaos nativos es de vital importancia, ya que contribuye a que la variabilidad de las especies perdure en el tiempo y puede favorecer programas de mejoramiento genético, para lo cual es fundamental la caracterización fenotípica y genotípica.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Asociación de Productores del Municipio Dibulla por su apoyo en la realización de este proyecto.

Descargos de responsabilidad

Las afirmaciones, juicios y opiniones expresados en este artículo corresponden a los autores, quienes manifiestan que no existen conflictos de interés.

Referencias

- Andrade-Aguirre, C. M., & Angulo-Reynoso, V. (2007). *La viabilidad económica del cultivo del cacao en México a través de una economía sostenible*. [Tesis de pregrado, Universidad de las Américas Puebla]. Repositorio Colección de tesis digitales. http://catarina.udlap.mx/u_dl_a/tales/documentos/lri/andrade_a_cm/
- Aranguren-Díaz, Y. C., Varani, A. M., Michael, T. P., & Miranda, V. F. O. (2018). Development of microsatellite markers for the carnivorous plant *Genlisea aurea* (Lentibulariaceae) using genomics data of NGS. *Molecular Biology Reports*, 45(1), 57-61. <https://doi.org/10.1007/s11033-017-4140-1>
- Aranguren, Y., Briceño, A., & Fermin, G. (2010). Assessment of the variability of Venezuelan guava landraces by microsatellites. *Acta Horticulturae*, 849, 147-154. <http://doi.org/10.17660/ActaHortic.2010.849.16>
- Aranzazu, H. F., Martínez, G. N., Palencia, C. G., Coronado, R., & Rincón, G. D. (2009). *Manejo del recurso genético para incrementar la producción y productividad del sistema de cacao en Colombia*. Federación Nacional de Cacaoteros-Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria-Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural.
- Avendaño-Sánchez, M., Espinoza-Velázquez, J., Gutiérrez-López, A., Flores-Gallegos, A. C., & Rodríguez-Herrera, R. (2015). Secuencias nucleotídicas de la región ITS en familias S. y PL de maíces poliembriónicos. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 6(3), 509-521. <http://www.scielo.org.mx/pdf/remexca/v6n3/v6n3a6.pdf>
- Avendaño, C., Cueto, J., Mendoza, A., Lopez, P., Sandoval, A., & Aguirre, J. (2014). *Graphic Handbook for Description of Cocoa Varieties (Theobroma cacao L.)*. Instituto de investigación forestales, agrícolas y pecuarias.

- Azofeifa-Delgado, Á. (2006). Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales el trópico. *Agronomía Mesoamericana*, 17(2), 221-241. <https://doi.org/10.15517/am.v17i2.5163>
- Bennett, A. B. (2003). Out of the Amazon: *Theobroma cacao* enters the genomic era. *Trends in Plant Science*, 8(12), 561-563. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2003.10.004>
- Benson, D. A., Cavanaugh, M., Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J., & Sayers, E. W. (2012). GenBank. *Nucleic Acids Research*, 41(D1), D36-D42. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1195>
- Bhattacharjee, R., & Kumar, P. L. (2007). Cacao. En C. Kole (Ed.), *Technical Crops* (pp. 127-142). Springer Berlin Heidelberg. <http://doi.org/10.1007/978-3-540-34538-1>
- Botero, K., & Arias, T. (2018). Uso de las ciencias ómicas para el mejoramiento genético de cultivos. *Revista de Ciencias Agrícolas*, 35(2), 64-78. <https://doi.org/10.22267/rcia.183502.92>
- Chagné, D., Batley, J., Edwards, D., & Forster, J. W. (2007). Single Nucleotide Polymorphism Genotyping in Plants. En N. C. Oraguzie, E.H.A. Rikkerink, S. E. Gardiner, H. N. De Silva (Eds.), *Association Mapping in Plants* (pp. 77-94). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-0-387-36011-9_5
- Chia-Wong, J. A. (2009). *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 maestría, Universidad Nacional Mayor de San Marcos]. <http://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/cybertesis/244>
- De La Cruz-Medina, J., Vargas-Ortiz, M., & Del Ángel-Coronel, O. (2012). *Cacao: operaciones poscosecha*. Food and Agriculture Organization Of the United Nations (FAO). <http://www.fao.org/3/a-au995s.pdf>
- De Wever, J., Everaert, H., Coppieters, F., Rottiers, H., Dewettinck, K., Lefever, S., & Messens, K. (2019). The development of a novel SNP genotyping assay to differentiate cacao clones. *Scientific Reports*, 9(1), 9512. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45884-8>
- Food and Agriculture Organization (FAO). (2017). *FAOSTAT Statistical Database*. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>
- García, L. (2009). *Catálogo de cultivares de cacao*. Ministerio de Agricultura.
- Gutiérrez-López, N., Ovando-Medina, I., Salvador-Figueroa, M., Molina-Freaner, F., Avendano-Arrazate, C. H., & Vázquez-Ovando, J. A. (2016). Unique haplotypes of cacao trees as revealed by trnH-psbA chloroplast DNA. *PeerJ*, 4, e1855. <https://doi.org/10.7717/peerj.1855>
- Henaó, A., Salazar, H., & Urrea, A. (2017). Quality of cocoa (*Theobroma cacao* L.) DNA from foliar tissue at different stages of development. *Acta Agronomica*, 67(2), 311-318. <https://doi.org/10.15446/acag.v67n2.63046>
- Jagoret, P., Michel-Dounias, I., & Malézieux, E. (2011). Long-term dynamics of cocoa agroforests: a case study in central Cameroon. *Agroforestry Systems*, 81(3), 267-278. <https://doi.org/10.1007/s10457-010-9368-x>
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547-1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Lanaud, C., & Risterucci, A. M. (1999). Isolation and characterization of microsatellites in *Theobroma cacao* L. *Molecular Ecology*, 8(12), 2141-2152. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.1999.00802.x>
- Lodhi, M. A., Ye, G.-N., Weeden, N. F., & Reisch, B. I. (1994). A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and *Vitis* species. *Plant Molecular Biology Reporter*, 12(1), 6-13. <https://doi.org/10.1007/BF02668658>
- López-Medina, S. E. (2017). Características germinativas de semillas de *Theobroma cacao* L. (Malvaceae) "cacao". *Arnaldoa*, 24(2), 609-618. <https://doi.org/10.22497/arnaldoa.242.24212>
- Martínez, A., Leshner, J., & Jiménez, M. (2013). Comparación de tres métodos para la extracción de ARN total a partir de hojas de cacao. *Artículo Original Biotecnología Vegetal*, 13(2), 93-98. <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/100/82>

- Miranda, V. F. O. de, Martins, V. G., Furlan, A., & Bacci Jr., M. (2010). Plant or fungal sequences? An alternative optimized PCR protocol to avoid ITS (nrDNA) misamplification. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 53(1), 141-152. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132010000100018>
- Motamayor, J. C., Risterucci, A. M., López, P. A., Ortiz, C. F., Moreno, A., & Lanaud, C. (2002). Cacao domestication I: the origin of the cacao cultivated by the Mayas. *Heredity*, 89(5), 380-386. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800156>
- Navarro-Prado, M., & Mendoza-Alonso, I. (2006). *Cultivo del Cacao en Sistemas Agroforestales*. ProDeSoc.
- Núñez-Colín, C., & Escobedo-López, D. (2014). Caracterización de germoplasma vegetal: la piedra angular en el estudio de los recursos fitogenéticos. *Acta Agrícola y Pecuaria*, 1(1), 1-6.
- Oicatá, M. (1986). *Caracterización de 62 clones nacionales de cacao existentes en el banco de germoplasma del CNI Palmira*. Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). <http://hdl.handle.net/20.500.12324/31979>
- Perea, A., Aranzazu, F., & Martínez, N. (2013). *Características de calidad del cacao de Colombia: Catalogo de 26 cultivares*. Federación Nacional de Cacaoteros.
- Poland, J. A., & Rife, T. W. (2012). Genotyping-by-Sequencing for Plant Breeding and Genetics. *The Plant Genome*, 5(3), 92-102. <https://doi.org/10.3835/plantgenome2012.05.0005>
- Quijada, A., Méndez-Cárdenas, G., Hernández-Baños, B., & Álvarez-Buylla, E. (2017). La región de los ITS del ADN ribosomal del núcleo (mrADN), fuente de caracteres moleculares en la sistemática de las gimnospermas. *Botanical Sciences*, 60, 159. <https://doi.org/10.17129/botsci.1527>
- Roa-Romero, H., Salgado-Mora, M., & Álvarez-Herrera, J. (2009). Análisis de la estructura arbórea del sistema agroforestal de cacao (*Theobroma cacao* L.) en el Soconusco, Chiapas - México. *Acta Biológica Colombiana*, 14, 97-109. <https://doi.org/10.15446/abc>
- Rocha, P. (2003). Marcadores moleculares, una herramienta útil para la selección genética de palma de aceite. *Palmas*, 24(42), 11-25.
- Rodríguez-Medina, C., Arana, A. C., Sounigo, O., Argout, X., Alvarado, G. A., & Yockteng, R. (2019). Cacao breeding in Colombia, past, present and future. *Breeding Science*, 69(3), 373-382. <https://doi.org/10.1270/jsbbs.19011>
- Romero, C., & Urrego, E. (2016). *Estudio del cacao en el Perú y en el Mundo*. Ministerio de Agricultura y Riego.
- Ruiz, X. (2014). *Diversidad Genética de cacao Theobroma cacao L. con Marcadores moleculares microsatélites*. [Tesis de maestría, Universidad Nacional de Colombia, sede Palmira]. Repositorio UNAL. <http://bdigital.unal.edu.co/39793/1/7211504.2014.pdf>
- Schrader, C., Schielke, A., Ellerbroek, L., & Johne, R. (2012). PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. *Journal of Applied Microbiology*, 113(5), 1014-1026. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x>
- Tamura, K. (1992). Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G+C-content biases. *Molecular Biology and Evolution*, 9(4), 678-687. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040752>
- Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales (UPOV). (2011). *Directrices para la ejecución del examen de la distinción, la homogeneidad y la estabilidad. Cacao 'Theobroma cacao' L.* Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales. https://www.upov.int/edocs/mdocs/upov/es/tc/47/tg_cacao_proj_4.pdf
- Ventura, M., González, A., & Batista, L. (2004). *Selección de árboles de cacao (Theobroma cacao) nativo e híbrido de buena calidad y rendimiento*. Instituto Dominicano de Investigaciones Agropecuarias y Forestales (IDIAF).
- White, T., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En I. MA, D. Gelfand, J. Sninsky & T. White (Eds.), *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (pp. 315). New York: Academic Press.

- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., & Madden, T. L. (2012). Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*, 13(1), 134. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-134>
- Young, A. M. (2008). The Chocolate Tree: A Natural History of Cacao. *Culture & Agriculture*, 30(1-2), 63-64. <https://doi.org/10.1111/j.1556-486X.2008.00009.x>
- Zambrano, J. (2017). *Relaciones filogenéticas entre tipos de cacao (Theobroma cacao L.): forastero, trinitario y nacional, basadas en marcadores morfológicos y secuencias nucleotídicas de la región ITS; y su posible uso en la identificación de clones*. [Tesis de grado, Universidad Técnica Estatal de Quevedo]. Repositorio Digital UTEQ. <http://repositorio.uteq.edu.ec/handle/43000/2722>
- Zarrillo, S., Gaikwad, N., Lanaud, C., Powis, T., Viot, C., Lesur, I., Fouet, O., Argout, X., Guichoux, E., Salin, F., Looor-Solorzano, R., Bouchez, O., Vignes, H., Severt, P., Hurtado, J., Yopez, A., Grivetti, L., Blake, M., & Valdez, F. (2018). The use and domestication of *Theobroma cacao* during the mid-Holocene in the upper Amazon. *Nature Ecology & Evolution*, 2(12), 1879-1888. <https://doi.org/10.1038/s41559-018-0697-x>