



UNAH
UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE HONDURAS



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
FIRENZE

Estudio de la diversidad genética de cacao criollo en Honduras con marcadores moleculares SSR

MSc. Erick Ordoñez
MSc. Marlon López
Dr. Edgardo Giordani

Programa



Introducción



Material y métodos



Resultados



Conclusiones

Introducción

La producción de cacao (*Theobroma cacao* L.) en Honduras ha aumentado en los últimos años, el cual es caracterizado por alta calidad organoléptica, fineza y aroma.



Origen del cacao

Diferentes autores han propuesto distintos orígenes para el cacao

1. Van Hall (1914) y Chessman (1944) sugieren que el cacao se originó en la zona del Alto Amazonas y fue luego llevado a Centro América.
2. Cuatrecasas (1964) propuso que las poblaciones centro y sur Americanas se desarrollaron de manera independiente.
3. Motamayor (2002) con el uso de marcadores moleculares sugiere que las poblaciones centroamericanas son descendientes de las poblaciones de América del sur



Mapa de ubicación de los probables centros de origen del cacao



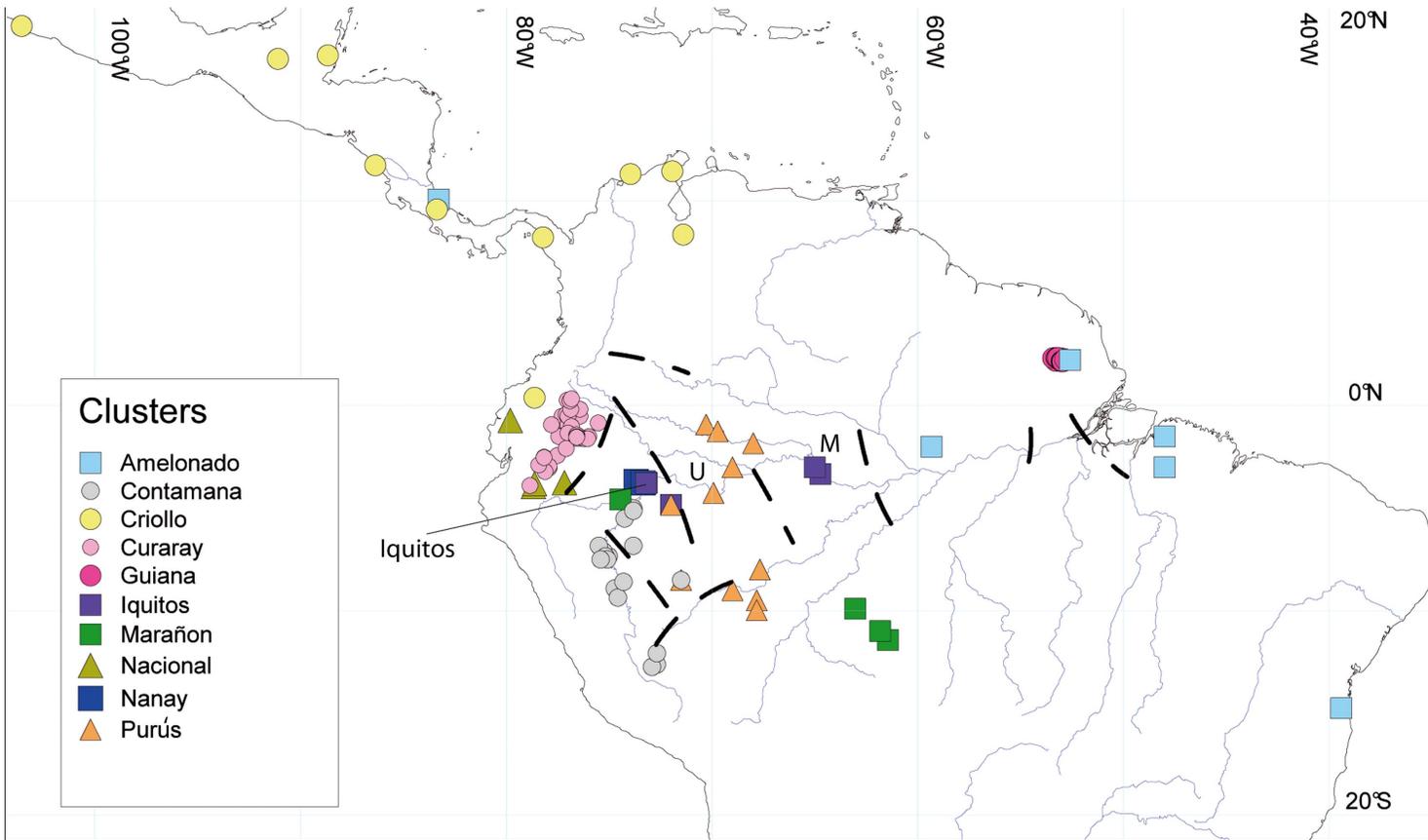
Clasificación tradicional

Las características morfológicas y la distribución geográfica, *Theobroma Cacao* L. se ha dividido en tres grupos principales: forastero, criollo y trinitario (N'goran et al, 1994)

A close-up photograph of a hand holding a large, orange, ribbed cacao pod. The pod is the central focus, showing its characteristic ridges and some dark spots. The background is a blurred green forest. A semi-transparent white circle is overlaid on the left side of the image, containing text.

Diversidad

Hoy, debido a cruces que se han hecho a lo largo de los años; de manera natural o dirigida, existe una gran variabilidad en el cacao, por lo tanto, se dificulta distinguir entre los grupos mencionados anteriormente basándose únicamente en las características fenotípicas.



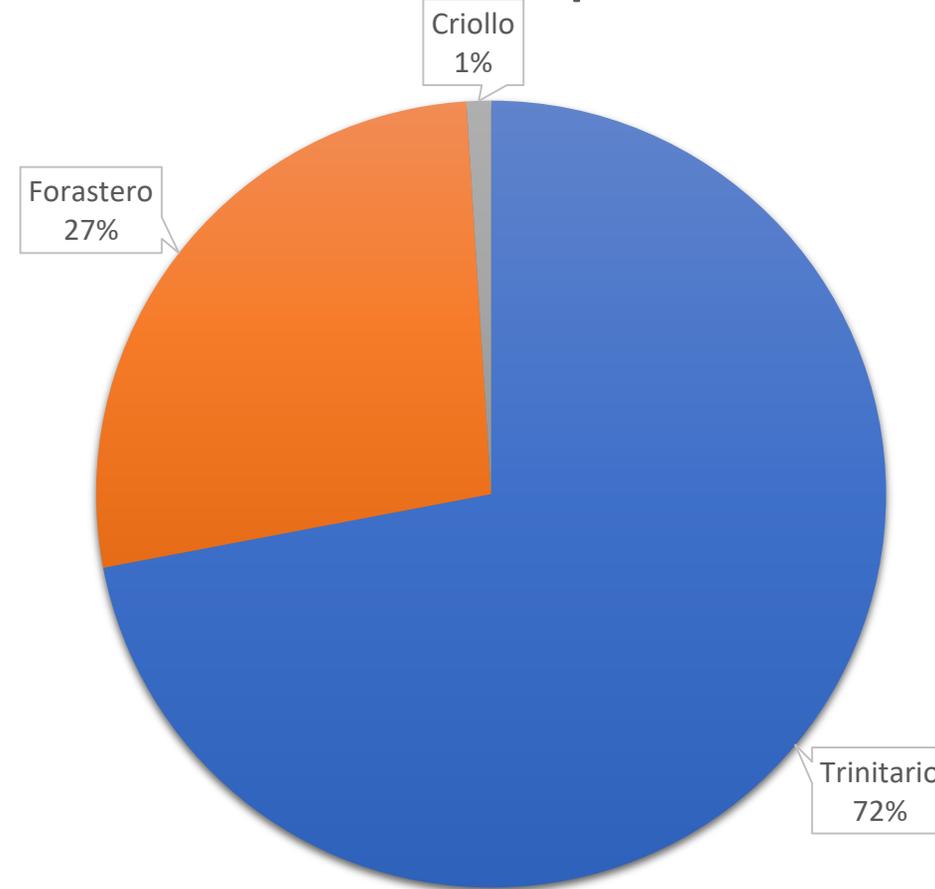
- Recientemente, Motamayor, et al., (2008), logro diferenciar el cacao en 10 grupos haciendo uso de estudios genéticos, lo que brinda una clasificacion mucho mas precisa.

Clasificación Moderna

Diversidad Fenotípica

Cacao	%
Trinitario	72
Forastero	27
Criollo	1

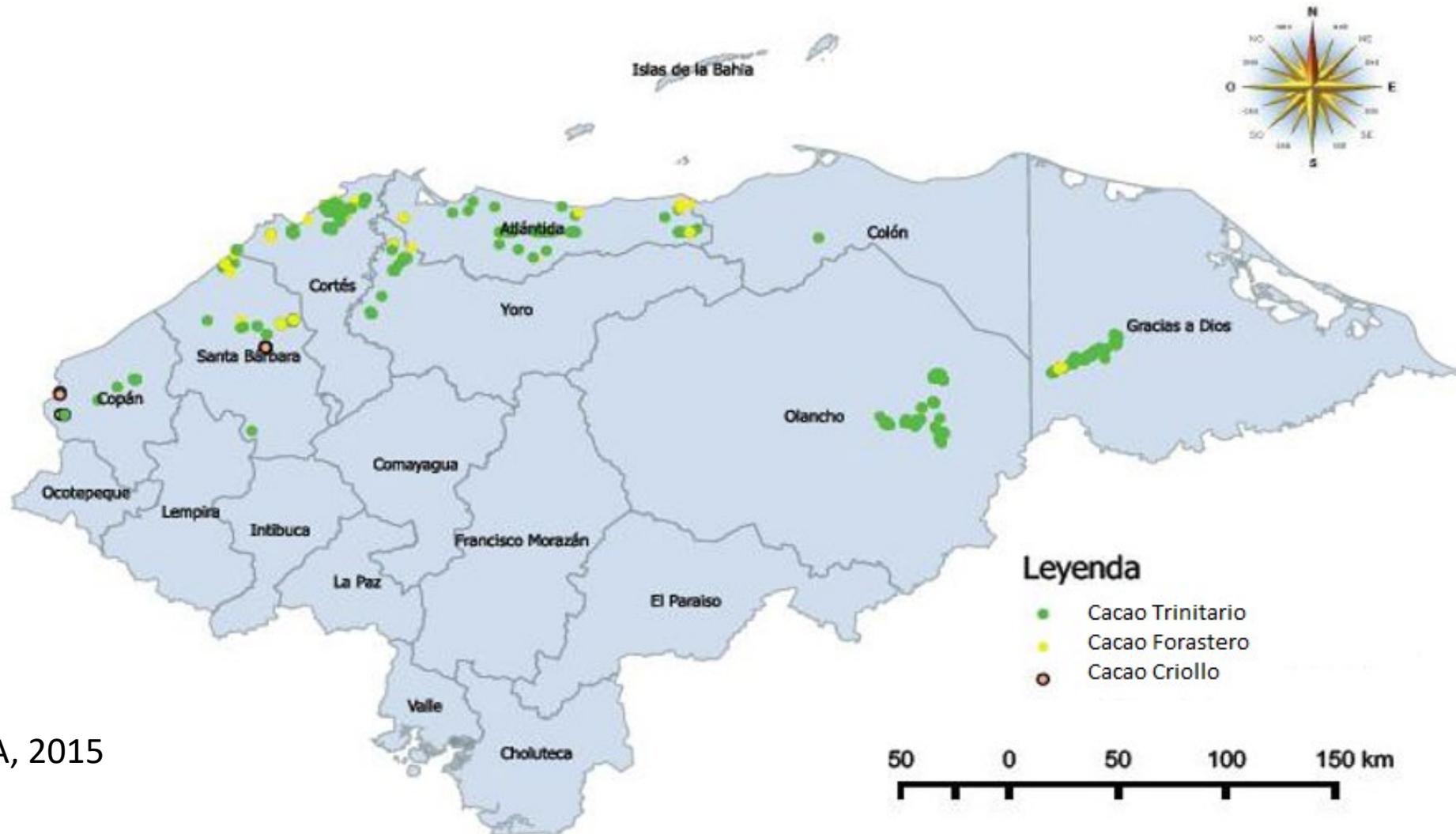
Diversidad Fenotípica de Cacao



(Dubon & Sanchez, 2016)

■ Trinitario ■ Forastero ■ Criollo ■

Distribucion del Cacao en Honduras



Fuente: FHIA, 2015

Marcadores

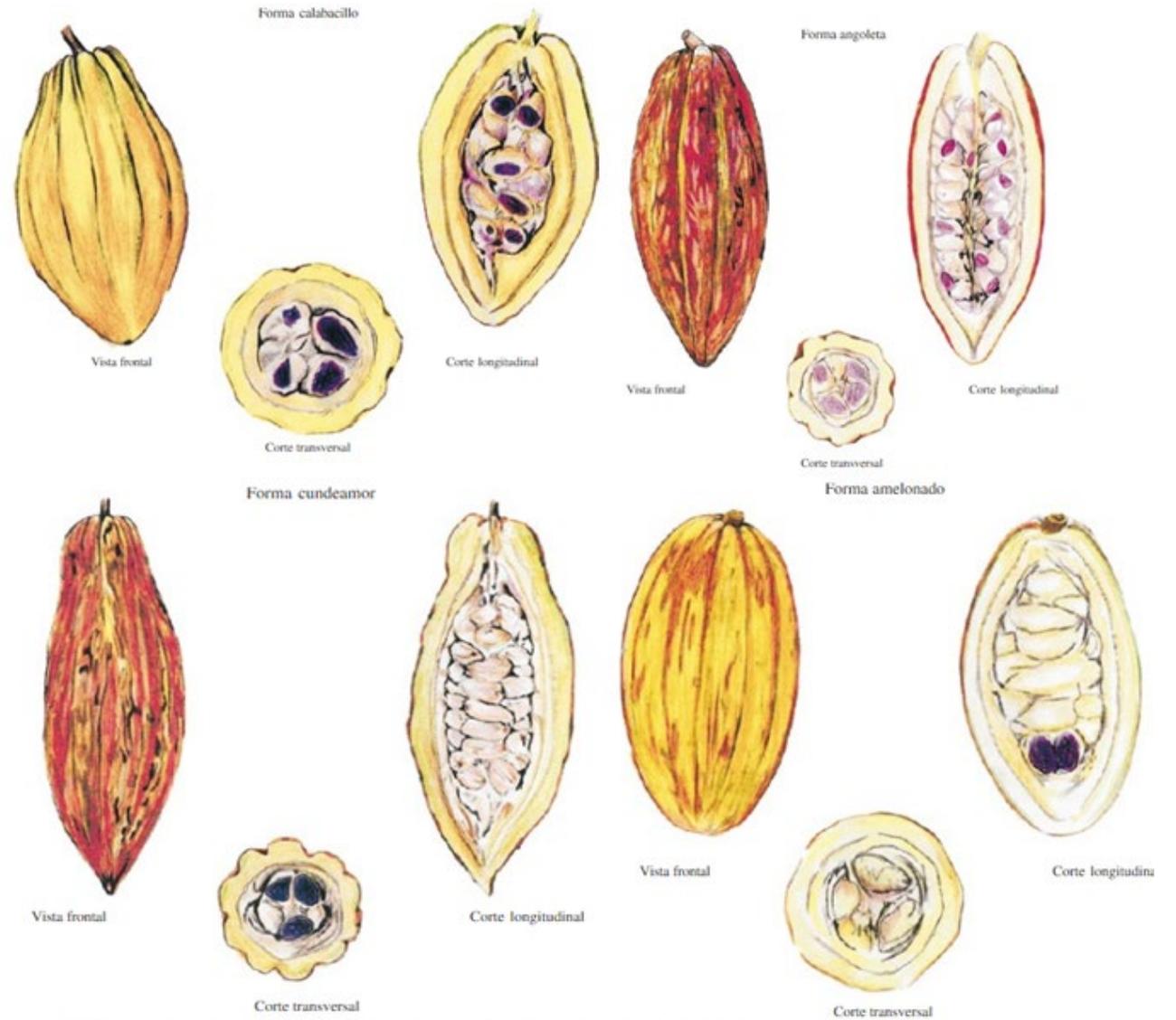


Marcadores Fenotípicos



Marcadores Moleculares

Marcadores Fenotipicos



Frutos de diferentes tipos de cacao forastero :cundeamor, angoleta, amelonado y calabacillo



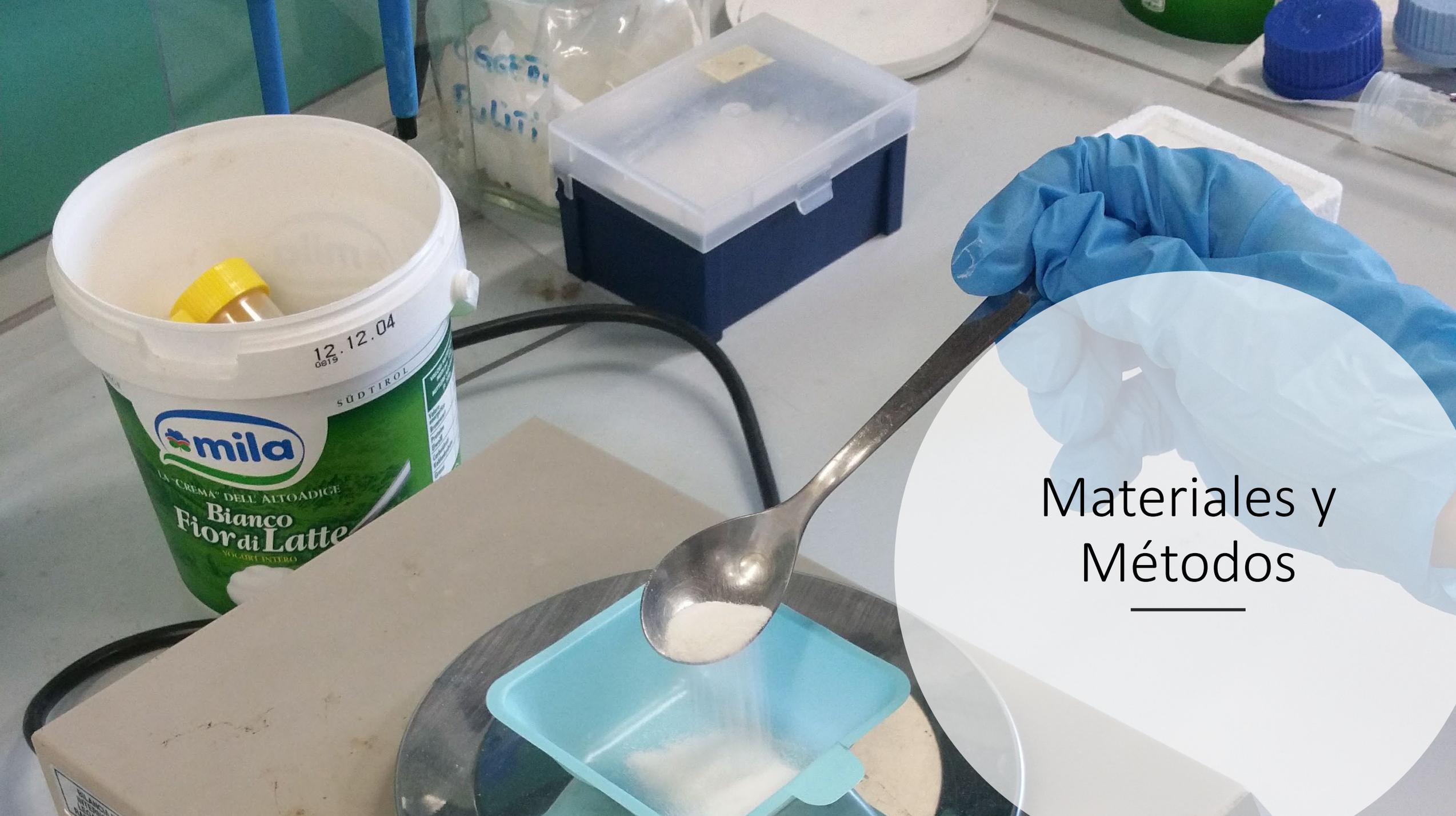
Marcadores Moleculares

- Un **marcador genético** o **marcador molecular** es un segmento de ADN con una ubicación física identificable (locus) en un cromosoma y cuya herencia genética se puede rastrear.
- Herramientas para estudiar la diversidad genética.



Objetivo

Evaluar la diversidad genética y pureza del cacao criollo en Honduras.



Materiales y Métodos

Colección de las muestras

Se colectó material de plantas previamente identificadas por FHIA

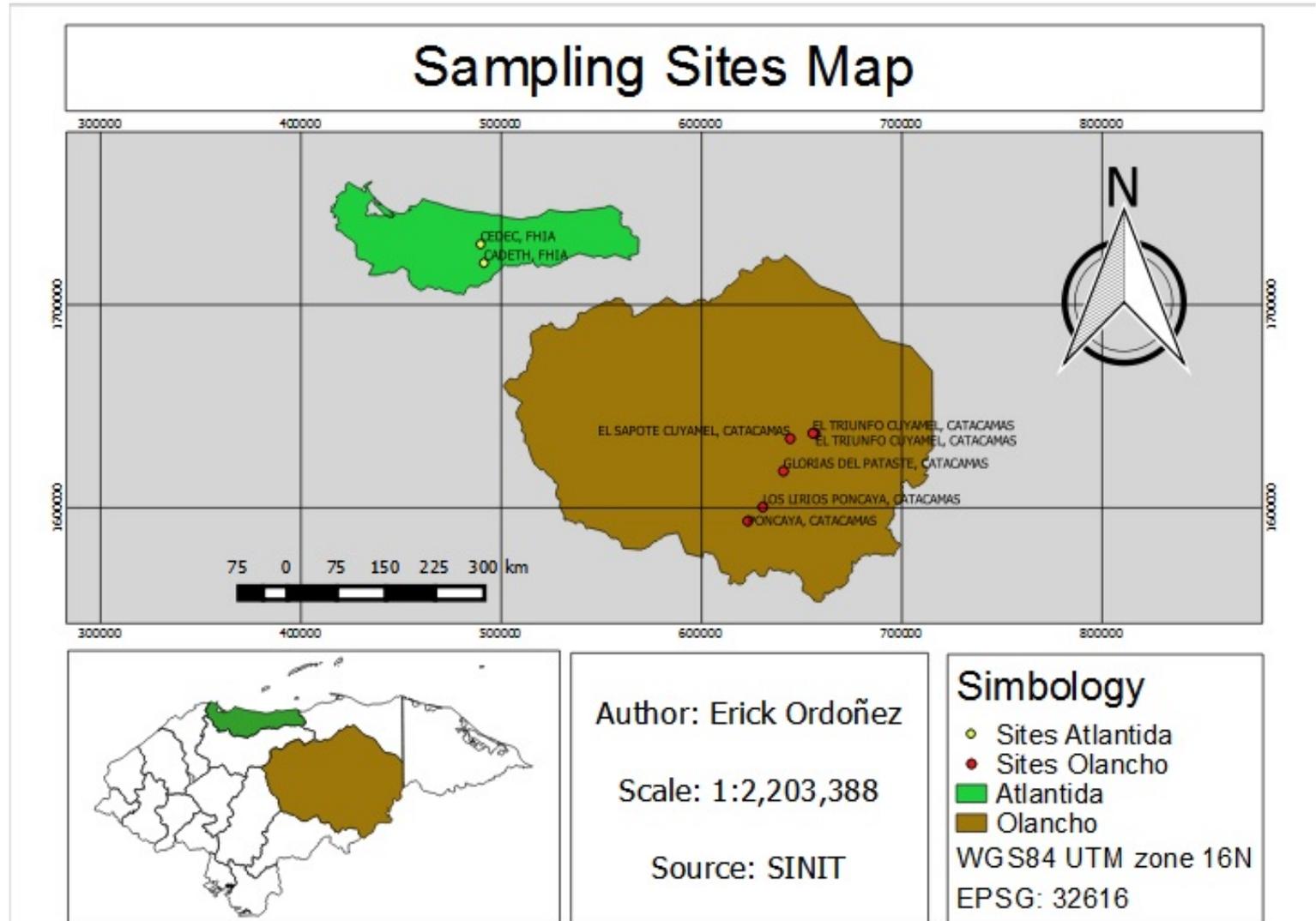
Se seleccionaron hojas jóvenes y sanas

Las hojas fueron introducidas en frascos de 15 ml y sumergidas en etanol al 96% como es propuesto por Bressan et al., (2014) y luego almacenadas a -20°C en el laboratorio de la Universidad de Florencia, Italia



Origen de las plantas muestreadas

- Atlántida
- Olancho
- Copan
- Santa Barbara
- Intibucá



Extracción ADN

El proceso de extracción de ADN se realizó con el protocolo brindado por Stratec Molecular “Smarter Nucleic Acid Sample Preparation”

Se hicieron ligeras modificaciones al protocolo





Muestra de ADN
extraído

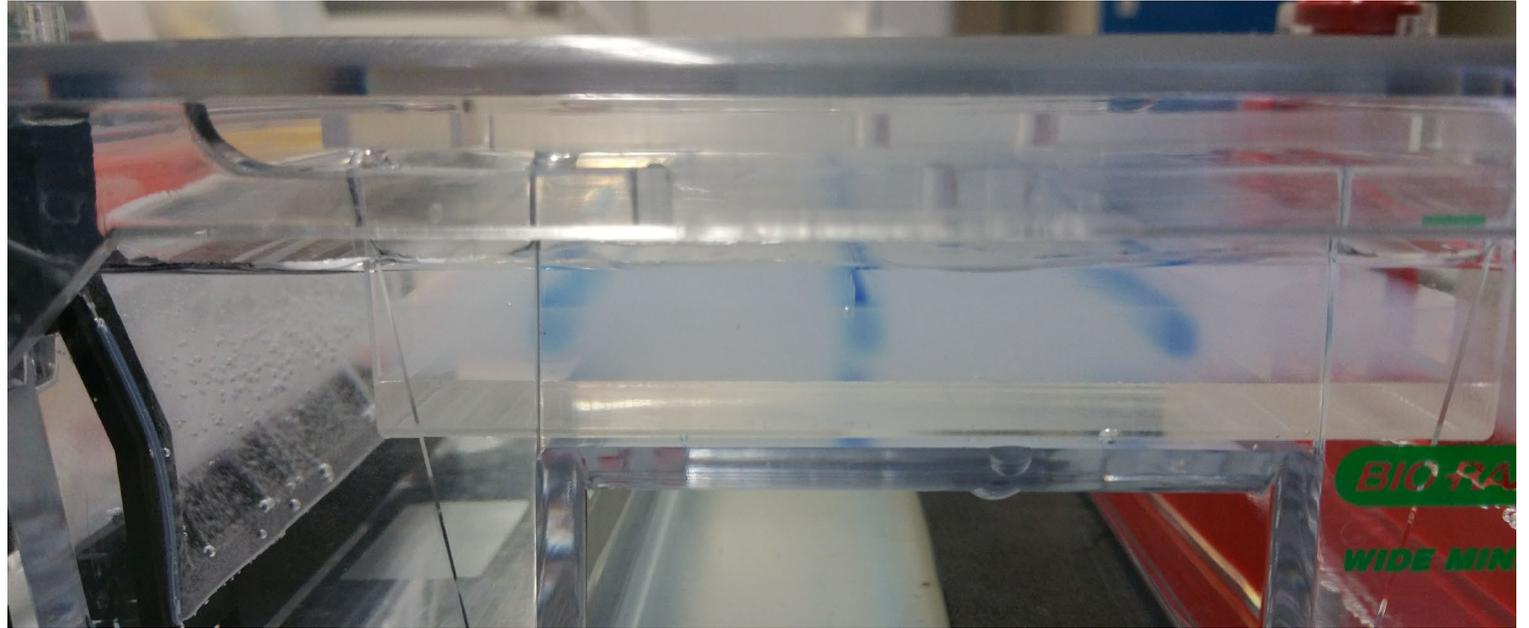
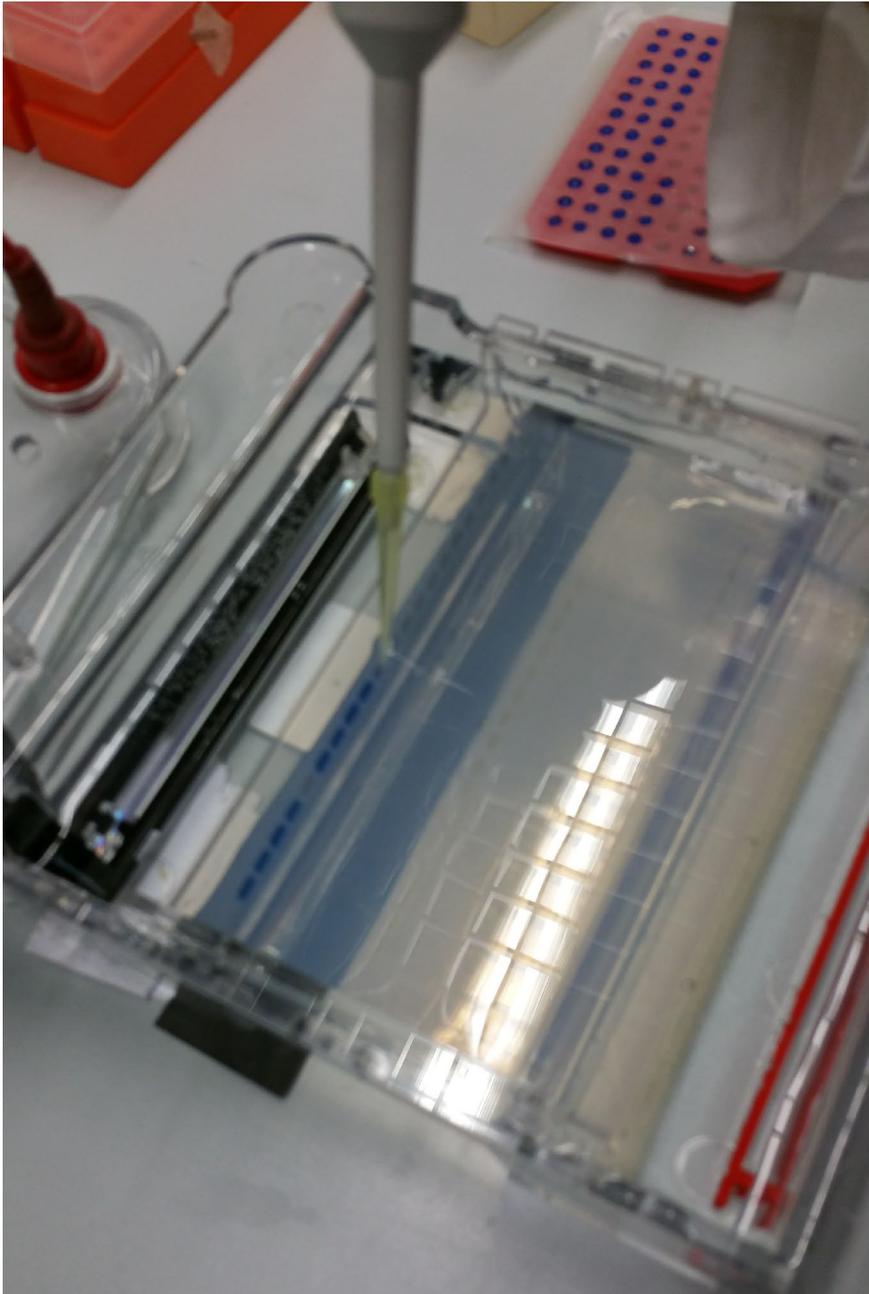
Evaluación Electroforesis

Evaluación con gel de agarosa

Sustancia	Volumen
Polvo de Agarosa	0.7 g
TEA 1X o TBE 1X	70 ml
Bromuro de etidio	10 μ l



GelDoc - 2000



Evaluación Electroforética

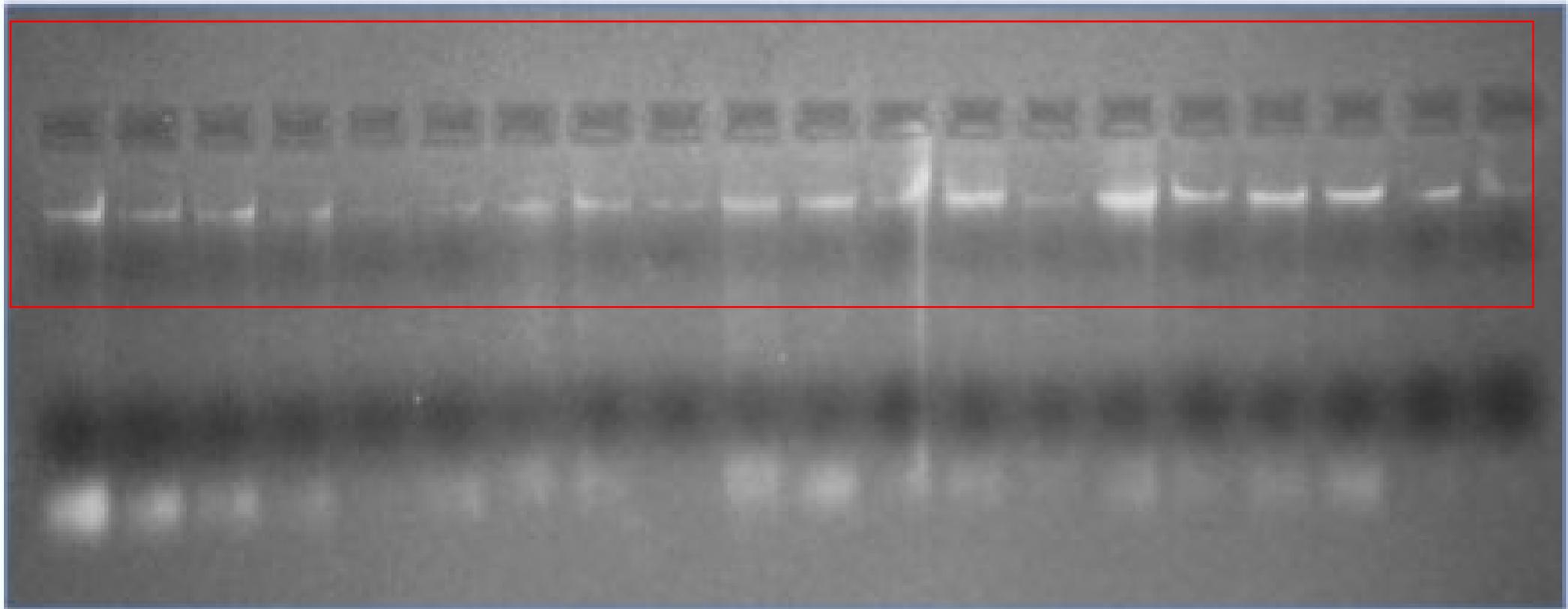


Figure 21. DNA extraction of samples conserved in ethanol (96%) evaluation by Quantity One 1-D software.

Amplificación PCR

- Gene Amp PCR System 2700
- Protocolo diseñado por Schuelke (2000)



Inicio del proceso
de amplificación

	10	100	1000	10000
1	10	100	1000	10000
2	20	200	2000	20000
3	30	300	3000	30000
4	40	400	4000	40000
5	50	500	5000	50000
6	60	600	6000	60000
7	70	700	7000	70000
8	80	800	8000	80000
9	90	900	9000	90000
10	100	1000	10000	100000

(Motamayor,2008)

Marcadores Moleculares SSR

mTcCIR6	mTcCIR26
mTcCIR7	mTcCIR33
mTcCIR8	mTcCIR37
mTcCIR11	mTcCIR40
mTcCIR12	mTcCIR60
mTcCIR18	mTcCIR115
mTcCIR22	mTcCIR158
mTcCIR24	mTcCIR168

Protocolo PCR

(Schuelke,2000)

#	Cycles	Program				
1	1 Cycle >	96°C 4 min				
2	14 Cycles >	96°C 40 sec >	43°C 40 sec	or	48°C 40 sec >	72°C 40 sec
		Label	Primer #	Primer #	Label	
		Pet	4	1	Ned	
		Vic	5	2	Pet	
		Vic	6	3	Pet	
		Ned	10	7	Pet	
		Vic	11	8	Ned	
		6FAM	12	9	6FAM	
		Ned	13	17	Vic	
		Ned	14	18	6FAM	
		6FAM	15			
		Ned	16			
		6FAM	19			
3	1 Cycle	Store 5 min 8°C		Add (M13)		
4	26 Cycles >	96°C 30 sec >	50°C 30 sec >	72°C 30 sec		
5	1 Cycle >	72°C 4min				
6	Store >	8°C forever				

Producto de amplificación

Nivel de intensidad

- Verde – Bajo
- Amarillo – Medio
- Rojo- Alto

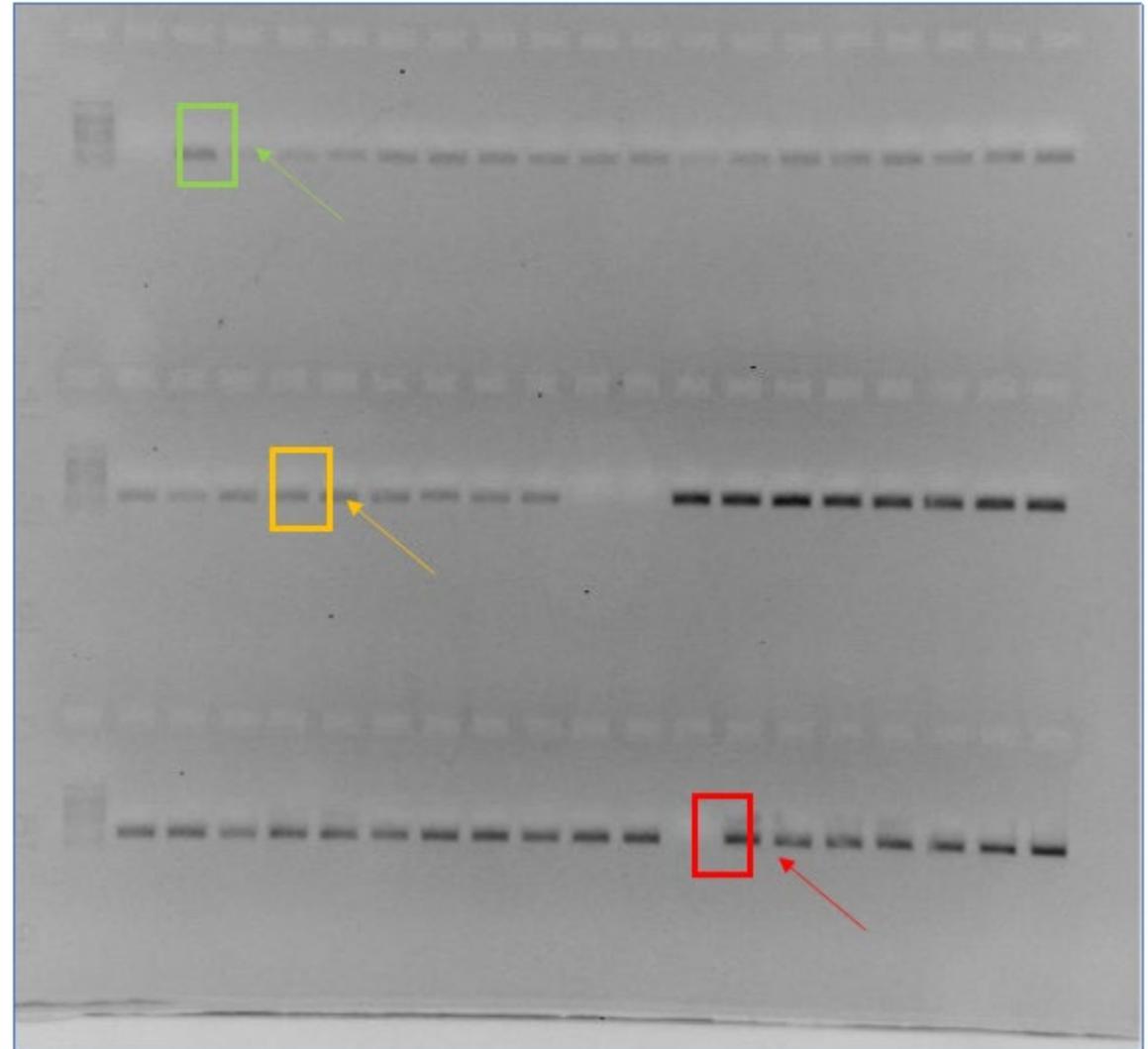
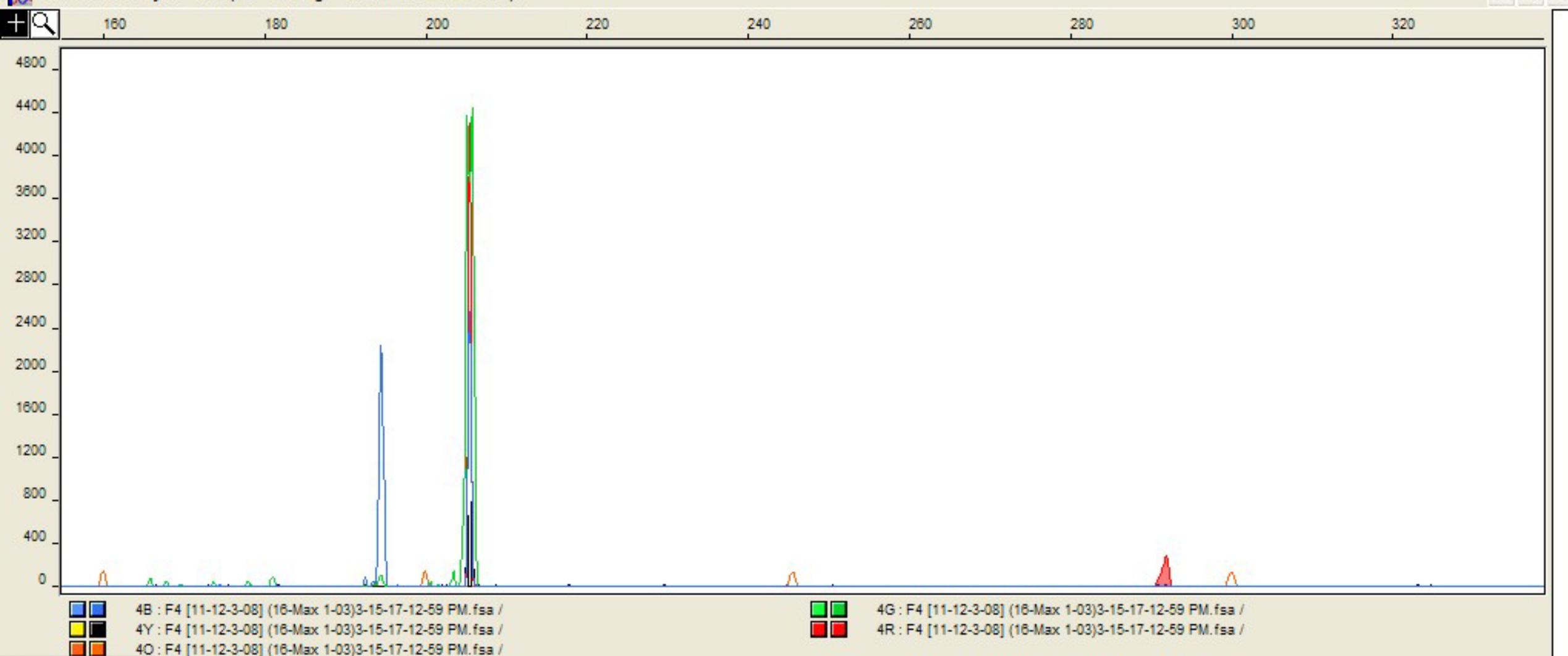


Figure 23. DNA amplification image of SSR 9 (Top) and SSR 7 (Bottom)*

Molecular Screening

Analizador genético ABI PRISM -
310





X: 318 Y: 3590

Dye/Sample Peak	Minutes	Size	Peak Height	Peak Area	Data Point
4B, 4	18.53	194.54	2460	14737	4507
4G, 11	18.92	205.11	8041	27494	4813
4G, 12	18.95	205.91	8047	26741	4821
4R, 3	18.93	205.51	5289	19928	4817
4R, 7	19.97	292.04	299	2814	5446

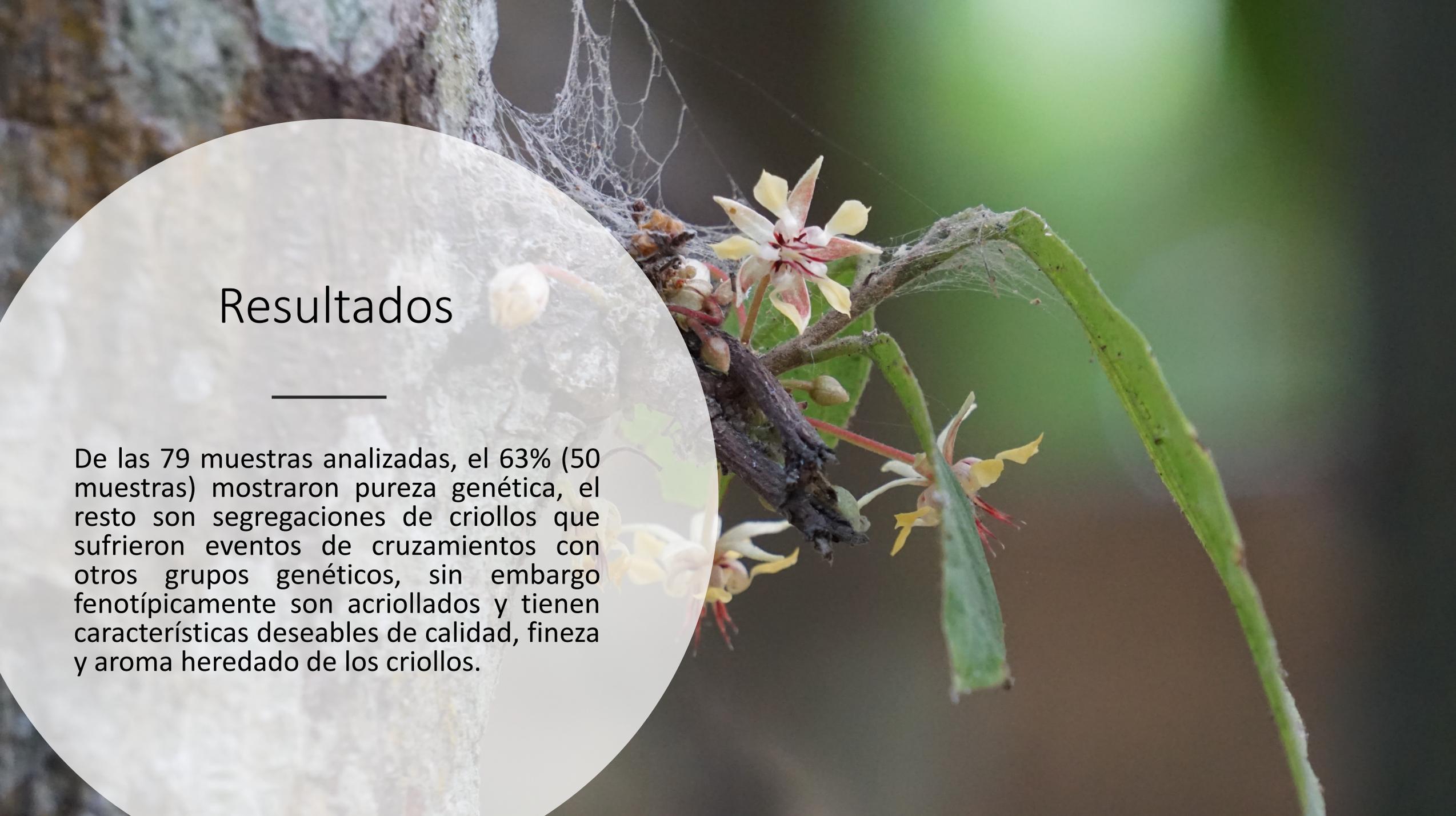
Software Utilizados

Los datos estadísticos fueron analizados mediante 2 softwares:

1. Mega 4 (Tamura et al., 2007)
2. Genalex 6.5 (Peakall y Smouse, 2006).



		CIR6		CIR7		CIR8		CIR11	
Criollo13 catie	Control	246	246	155	155	302	302	301	301
A3	Criollo	247	247	157	157	304	304	302	302
A4	Criollo	247	247	157	157	304	304	302	302
A5	Criollo	229	235	155	159	288	292	289	316
A6	Criollo	247	247	157	157	304	304	302	302
B2	Criollo	229	229	155	155	288	288	316	316
C1	Criollo	247	247	155	157	304	304	302	302
C4	Criollo	247	247	157	157	304	304	302	302
C5	Criollo	247	247	157	157	304	304	302	302
D1	Criollo	247	247	157	157	304	304	302	302
D2	Criollo	247	247	157	157	304	304	302	302
E1	Criollo	229	235	155	159	288	292	289	289
E2	Criollo	247	247	157	157	304	304	302	302
F1	Criollo	247	247	157	157	304	304	302	302
F2	Criollo	247	247	157	157	304	304	302	302
F3	Criollo	247	247	157	157	304	304	302	302
F4	Criollo	247	247	157	157	304	304	302	302

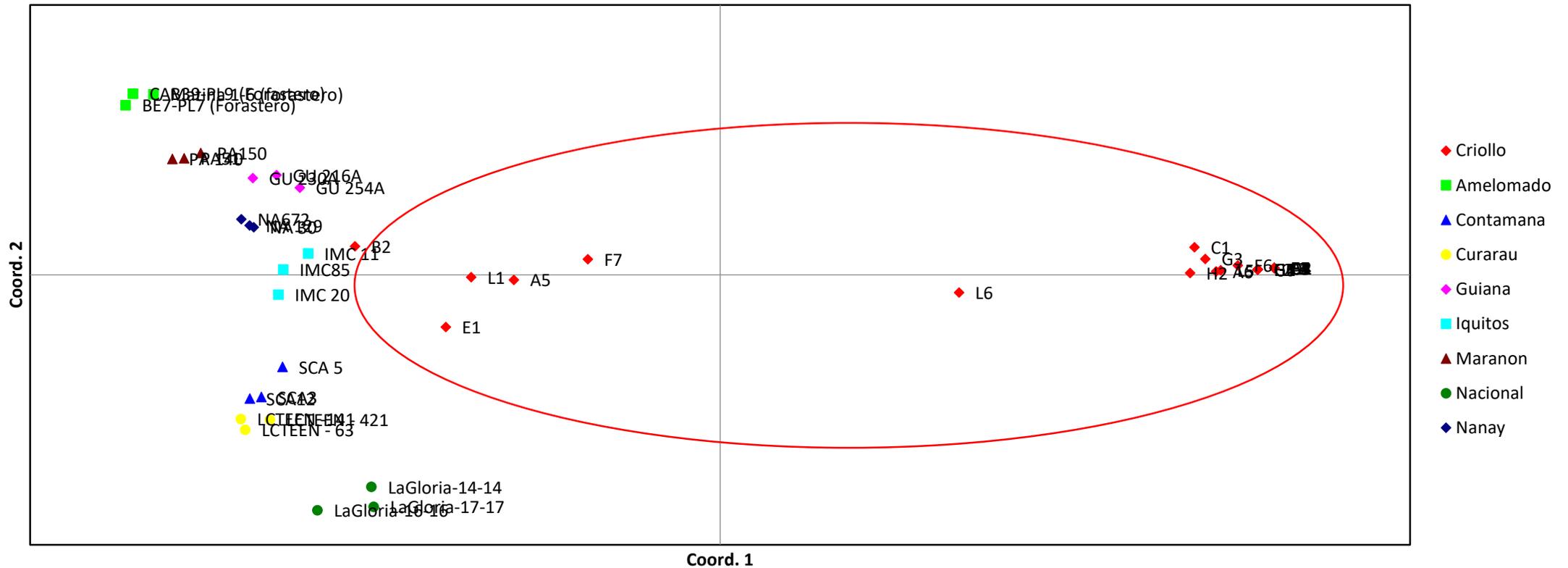


Resultados

De las 79 muestras analizadas, el 63% (50 muestras) mostraron pureza genética, el resto son segregaciones de criollos que sufrieron eventos de cruzamientos con otros grupos genéticos, sin embargo fenotípicamente son acriollados y tienen características deseables de calidad, fineza y aroma heredado de los criollos.

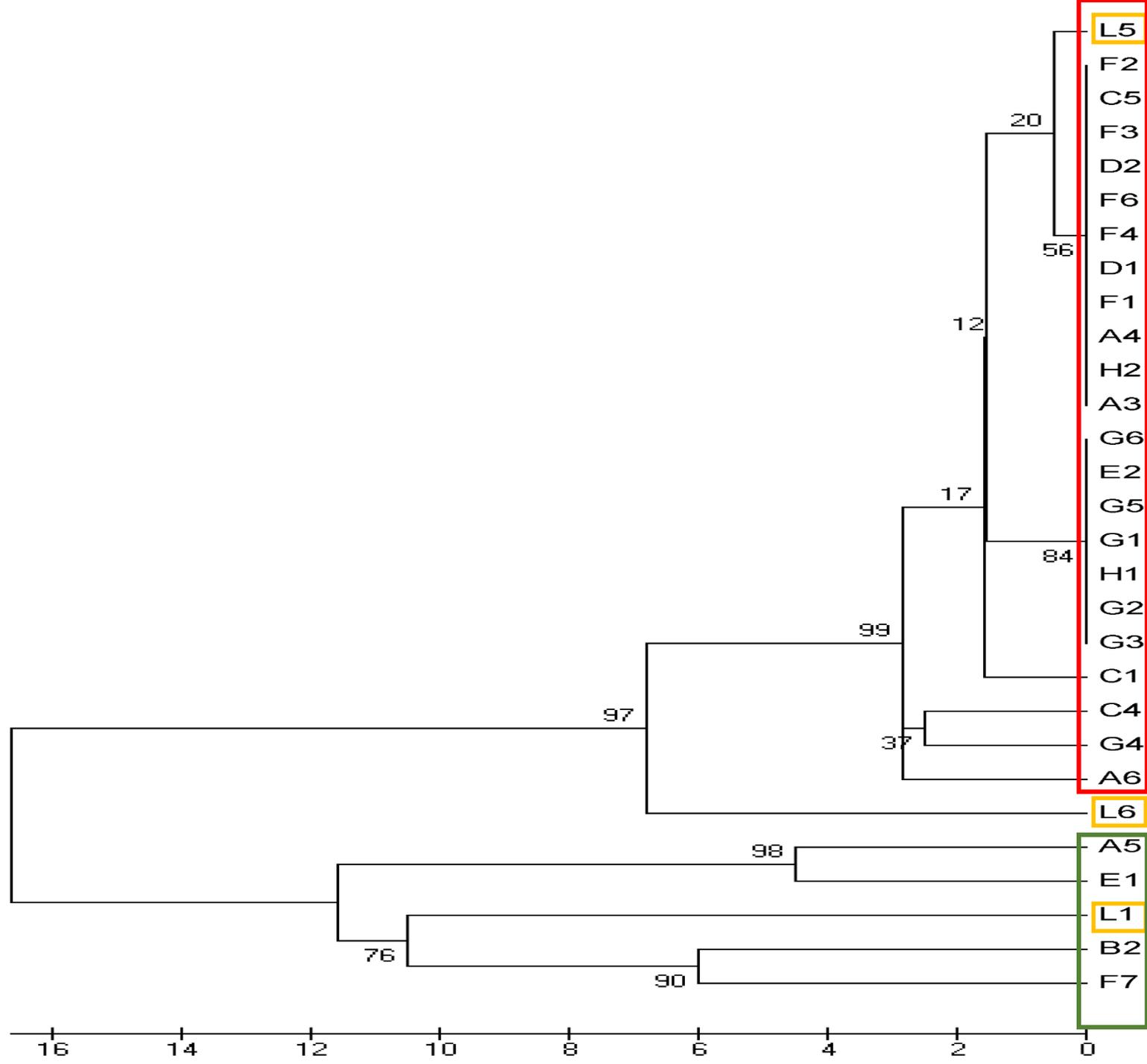
Segunda Colecta

Principal Coordinates (PCoA)



Dendrogram

- Generated with MEGA4 (Tamura et al., 2007).





Discusión

Los resultados muestran que existe una alta pureza genética en los arboles de cacao criollo muestreados, mostraron una alta homocigocidad y son genéticamente muy próximos.

Lo anterior puede deberse a su aislamiento y a su característica de auto compatibilidad sexual.

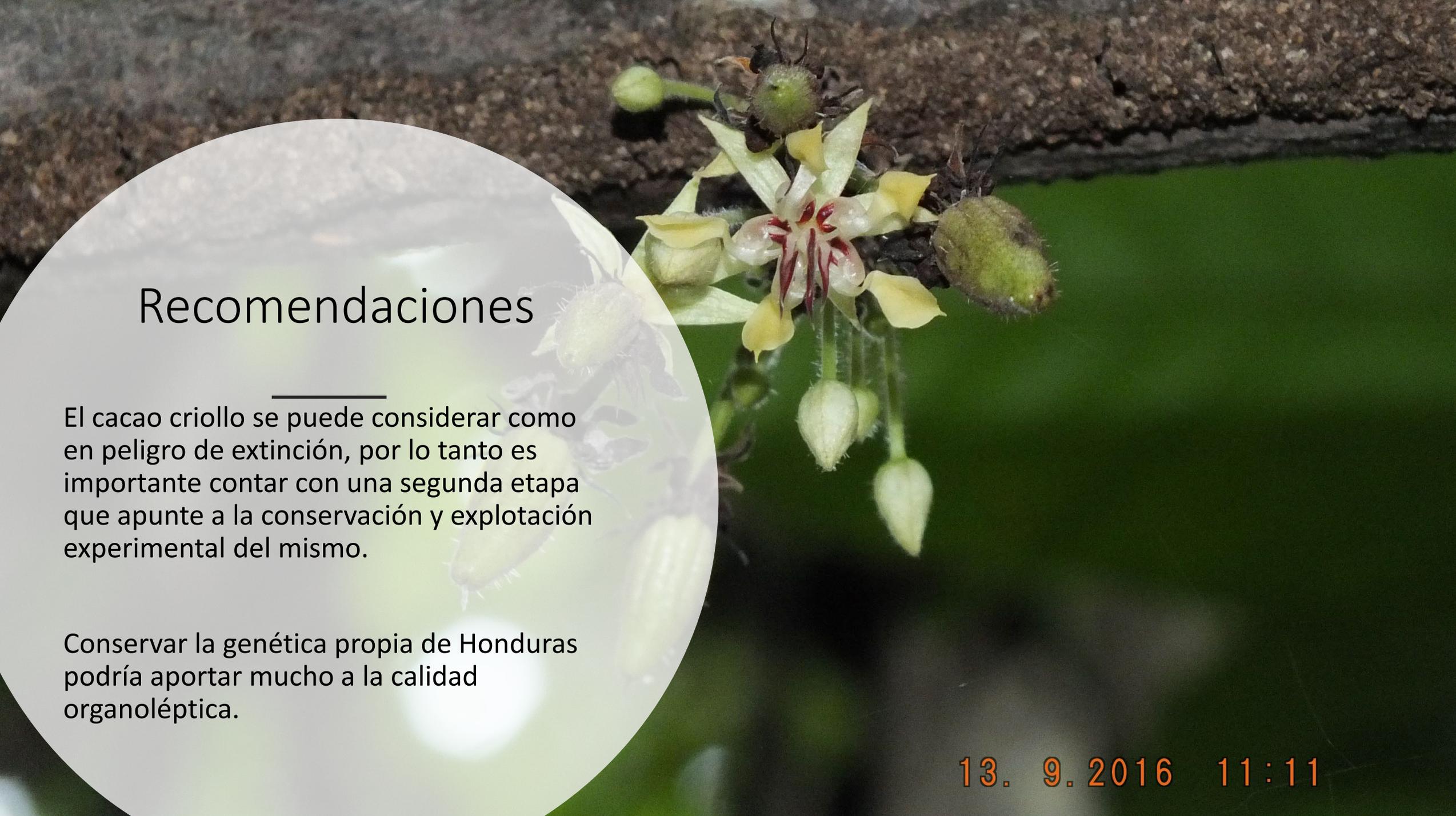


Conclusión

En parte de la población Criolla existe una variabilidad genética que se puede deber a las cruces que se han realizado de manera natural.

En Honduras existe una base genética promisoría que es importante para programas de mejoramiento genético de cacao.

Este estudio demuestra que en Honduras existe pureza genética analizada y hay una necesidad de hacer conservación *ex situ* como *in situ* de este material genético que debe ser evaluado para determinar cuáles de ellos pueden formar parte de un programa de mejoramiento genético.



Recomendaciones

El cacao criollo se puede considerar como en peligro de extinción, por lo tanto es importante contar con una segunda etapa que apunte a la conservación y explotación experimental del mismo.

Conservar la genética propia de Honduras podría aportar mucho a la calidad organoléptica.



PROCACAO

Agradecimientos Especiales

