

# La Variabilidad Genética del Cacao (*Theobroma cacao L.*) Nacional Boliviano.

*Windson July Martínez*

## RESUMEN

Se analizó la variabilidad genética del Cacao Nacional Boliviano (CBN) mediante la caracterización morfológica y la técnica molecular de microsatélites. Se evaluaron en una primera etapa 164 genotipos de CNB con diferente nivel de domesticación (57 silvestres, 107 cultivados). Se midieron in-situ 13 variables de fruto y semilla; se hicieron análisis univariados (ANOVA), y multivariados (componentes principales, conglomerados, discriminante canónico), para identificar las variables que más discriminan entre grupos y lugares de colecta. Se utilizaron 14 primeros para el análisis molecular con el método de microsatélites.

La variabilidad genética del cacao silvestre es alta, las características más relevantes son diámetro y largo de semilla, formas cundeamor y angoleta, ápice obtuso, constricción basal 49 % ausente, la rugosidad del mesocarpo 63 % intermedia, color de semilla 100% púrpura. Para el cacao cultivado la variabilidad es media. Las variables que más discriminan fueron diámetro de semilla y largo de la mazorca. El estudio de microsatélites, ubicó al CNB silvestre en un grupo diferente al Forastero y Trinitario (Grupo del Beni). Todos los primeros resultaron ser polimórficos 100 %.

## PALABRAS CLAVE:

Cacao, Cacao Amazónico Boliviano, *Theobroma cacao*, diversidad genética, microsatélites.

## AUTOR

Windson July Martínez es Docente de la Facultad de Agronomía, en la Universidad Mayor de San Andrés (UMSA), La Paz - Bolivia. [windsonjuly@gmail.com](mailto:windsonjuly@gmail.com)

## INTRODUCCIÓN

El cacao ha existido en Bolivia, en condiciones silvestres antes del siglo XVI, reportes de las expediciones del capitán Español Penranzures del año 1538, menciona que observó plantas de cacao en la cuenca del Río Beni y Mamore (Patiño 2002). Ha sido cultivado en Bolivia por los nativos por más de 240 años y fue fomentado por las misiones Franciscanas y Jesuitas a lo largo del río Beni (Cortés 1997; July 2007). El cultivo fue promovido por el gobierno de Bolivia en la década de 1960s, como la principal fuente de ingresos para los agricultores que colonizaron la región amazónica (Zeballos y Terrazas 1970), una situación que se mantiene hasta hoy.

En Bolivia, al cacao silvestre se le conoce con varios denominativos: “Cacao Criollo” “Cacao Nacional

Boliviano” “Chocolate” “Cacao Amazónico” “Cacao Silvestre” y “Cacao” propiamente dicho. El apelativo “Criollo” (nombre autóctono) no debe ser confundido con el grupo genético de los criollos centroamericanos, que tienen características diferentes.

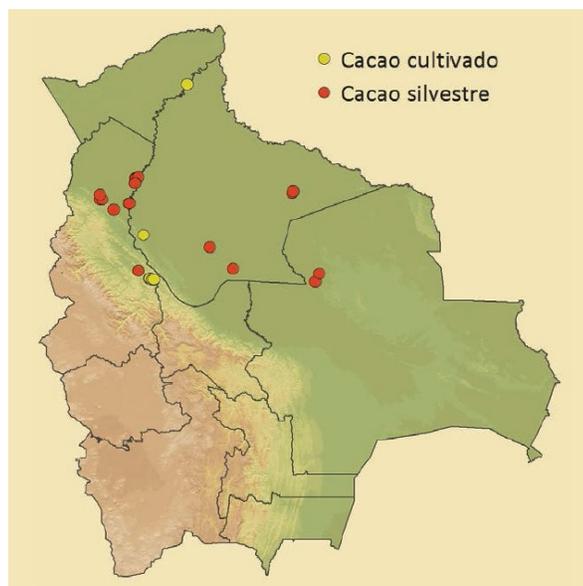
El cacao es el germoplasma tradicionalmente cultivado en Bolivia desde la época colonial pero su origen geográfico y genético las características morfológicas que lo distinguen de otros genotipos y su relación genética con los otros forasteros son desconocidos (July 2011). Sin embargo, con este estudio de descripción y otros anteriores sobre la variabilidad genética orientan a distinguir y describir el cacao Nacional Boliviano de los otros existentes en los países vecinos y Centroamérica.

## MATERIALES Y MÉTODOS:

### *Fase de campo:*

Para este estudio se tomó en cuenta las expediciones y las muestras de cacaos en fruto y hojas que el autor ha tomado desde el año 2007, la cual es parte de una investigación a largo plazo. Para llegar a los resultados de esta publicación se efectuaron varias expediciones complementarias a donde se reportan poblaciones de cacao en condiciones silvestres, caracterizando a las plantas que se agregan naturalmente en manchas o rodales conocidos localmente como “chocolatales”. Es así que para el presente estudio se hizo el esfuerzo de obtener muestras de todas las plantas de cacao conocidos por el autor (Figura 1), pero es probable que en otras áreas del territorio nacional se presenten formaciones similares que demanden una caracterización posterior.

Figura 1. Distribución de sitios de colecta.



Fuente: Conservación Internacional (2014).

Para evaluar los diferentes tipos de cacao *in-situ*, se utilizaron 12 descriptores morfológicos, 3 readecuados por; July (2007), parámetros que se describen a continuación:

### *Caracterización morfológica in-situ.*

Se utilizó una lista de descriptores para cacao publicadas por el Consejo Internacional de Recursos Fitogenéticos IPGRI (2000), y los descriptores cualitativos y cuantitativos publicados por Engels, et al (1980). De estos descriptores solo se utilizó 13 descriptores de fruto y semilla.

### *Características de fruto*

De cada accesión se evaluaron las mazorcas disponibles como mínimo tres mazorcas fisiológicamente maduras sin síntomas de enfermedad. Se evaluaron y registraron tres características cuantitativas (largo, diámetro, peso) y cuatro cualitativas (forma de mazorca, forma del ápice, forma de la base, color de la mazorca).

### *Características de la semilla*

De los frutos colectados *in-situ*, se contó individualmente la cantidad de semillas íntegras y vanas. Se determinó el peso fresco de estas semillas, de cada uno de los frutos se tomó 3 semillas, para registrar cinco características cuantitativas (número de semillas, largo, diámetro, peso húmedo, peso seco) y una cualitativa (color de almendra).

### **Análisis de datos morfológicos**

**Análisis de Varianza.** Para el estudio de las variables morfológicas se usó un diseño irrestricto al azar y ANOVA, el cual se guía del siguiente modelo:

$$Y_{ij} = \mu + S_i + \epsilon_{ij} \quad (1)$$

**Análisis en Conglomerados.** Para conformar grupos, mediante las características morfológicas y sitios, permite conocer la relación del cacao silvestre y en cultivo.

**Componentes Principales.** Para identificar las variables que más peso tuvieron, para diferenciar los tipos de cacao (silvestre, y cultivado). Con el gráfico Biplot se analizó la relación entre sitios y variables.

**Discriminante canónico.** Se utilizó para determinar las características morfológicas que discriminan a los grupos definidos *a priori*.

### Fase de laboratorio

La extracción de ADN de las muestras de hoja, se realizó en el laboratorio de Biología Molecular de la Unidad de Biotecnología y Recursos Fitogenéticos del CATIE, ubicado en Turrialba, Costa Rica y la secuenciación en los laboratorios del USDA/ARS-Beltsville, siguiendo la siguiente metodología:

**Extracción de ADN.** Se empleó tres Kits de extracción de ADN (Q – BIO gene, MP FastDNA Kit), utilizando el protocolo de extracción de ADN (July, 2007). Las muestras de ADN fueron cuantificadas y liofilizadas y enviadas a USDA/ARS-Beltsville.

**Cuantificación de ADN.** Se realizó a través de electroforesis en el gel de agarosa al 1 %, en una cámara de electroforesis marca KODAK, Bio MAX. HR2025. Para ello se preparó 110 ml de TBE 1X, Buffer 10 X, se agregó 1 gr de azarosa, se calentó por 1,5 minutos en microondas. Se preparó una bandeja de electroforesis donde se colocó 4 gotas de bromuro de etilo luego se corrió el gel. Se utilizó 20 µl de preparación (ADN, agua y búfer de carga 6x).

**Amplificación de ADN.** Para la amplificación de ADN se utilizó la metodología de PCR y se utilizaron los iniciadores para microsatélites seleccionados como estándares internacionales para la caracterización molecular de cacao (Loor y Amores 2003).

### Análisis de datos moleculares

El análisis se realizó con el software CEQ 800 Series Genetic Analysis System y el Estadístico INFOGEN con base a los datos obtenidos de las amplificaciones de ADN. Con el peso molecular de cada alelo se construyó una base de datos con las cuales se realizó el análisis de conglomerados y la prueba de consenso Mantel.

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se evaluaron en total 164 genotipos de CNB. La caracterización se realizó in situ en 19 lugares (11 lugares para el cacao silvestre y 8 lugares para el cultivado). Estos sitios están ubicados en tres macro regiones de Bolivia: Río Beni, Norte del departamento de La Paz, Beni y Alto Beni.

Los resultados obtenidos en la evaluación de 57 genotipos silvestres de CNB, de 11 lugares de colecta en dos zonas. El peso promedio de los frutos fue de 272,6 g. El peso máximo se obtuvo para la muestra de Cachichira (383,3 g) y el más bajo para la muestra de Macagua (227 g). El Largo del fruto varió entre 11,5 (San Silvestre) y 16,6 cm (Tequeje). El diámetro de fruto varió de entre 7 (Copacabana y Macagua) y 8,1 cm (Cachichira). El número promedio de semillas por fruto fue de 38 semillas, con un máximo de 43 semillas (Cachichira) y un valor mínimo de 34 semillas (Carmen del Emero y Paltal). El peso húmedo varió entre 65 (Carmen del Emero) y 95 g (Cachichira). El largo varió entre 1,8 (Copacabana) a 2,9 cm (San Silvestre). El diámetro menor de semilla (0,9 cm) lo obtuvieron los genotipos de Cachichira, Tequeje y Copacabana, mientras que el mayor (1,3 cm) fue para los genotipos de San Silvestre.

Solo las variables largo y diámetro de semilla presentaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ), entre lugares de colecta. Al respecto, Enríquez y Soria (1968) indican que los descriptores de semilla más importantes son el diámetro, el largo y el espesor de semillas. Son estas variables diámetro de semilla,

largo de semilla, largo de mazorca y número de semilla que marcaron para diferenciar a los cacaos silvestres estudiados, lo cual concuerda con lo citado por Morales y Rodríguez (1987) que indican, que el cacao colectado en los márgenes del río Beni presentan frutos amazónicos típicamente pequeños, con cáscara delgada y semillas pequeñas.

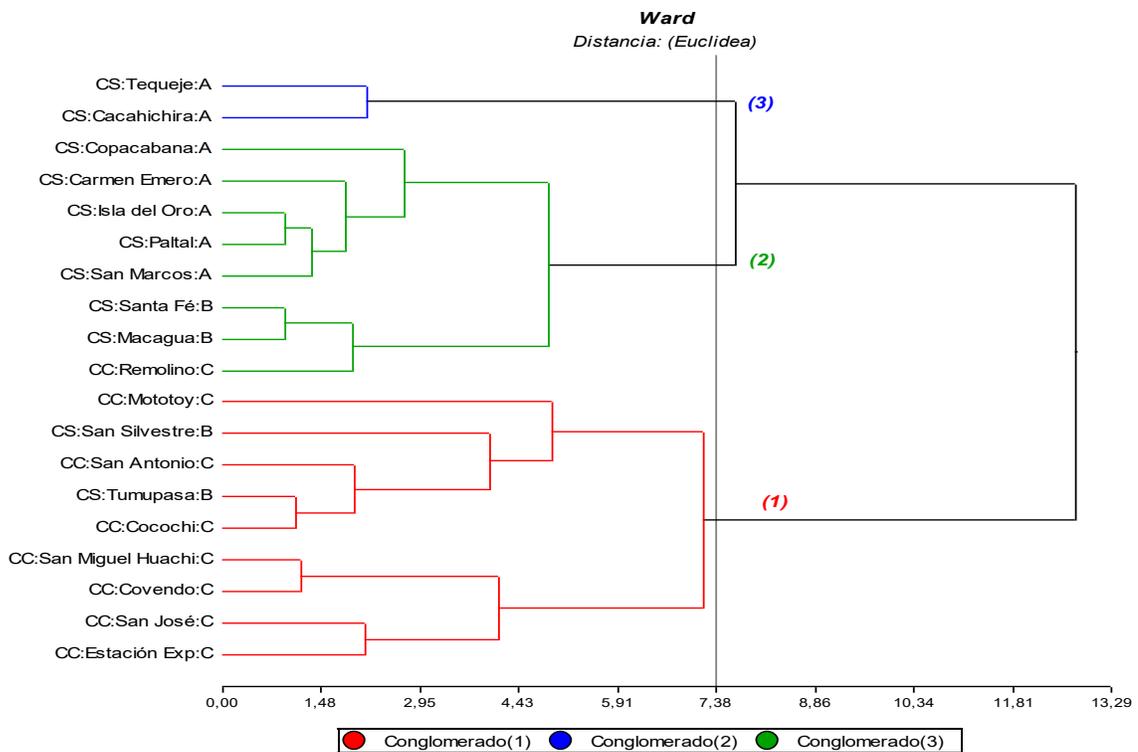
En cuanto a la forma de la mazorca, poseen frutos de forma cundeamor (40,4 %), sin constricción basal (41,1 %) y con una rugosidad intermedia (63,2 %). El ápice de los frutos fue agudo (29,8 %). El porcentaje de las accesiones con frutos de color verde fue de 100 %. El color de las semillas en su totalidad fue de color púrpura (100 %). Sobre las similitudes en la (Figura 2), muestra tres grupos a una distancia de 7,38. El grupo (1) de color rojo está conformado por genotipos procedentes de la zona de Alto Beni, lugares donde existe CNB en cultivo

(CC). También incluye genotipos silvestres de San Silvestre y Tumupasa.

El grupo (2) de color verde conformada por siete lugares que poseen genotipos silvestres, del río Beni. También incluye genotipos silvestres CS de Macagua y Santa Fé de la región Norte de La Paz, dentro del grupo solo los genotipos de Remolino están en cultivo y provienen de la región del Alto Beni. Probablemente la semilla de siembra fue llevada de alguno de los sitios donde se encuentra el cacao en forma silvestre.

El grupo (3) de color azul, agrupó genotipos silvestres de Cachichira y Tequeje ubicados en el río Beni. Este grupo se distingue por poseer características morfológicas particulares de semilla pequeña.

Figura 2. Dendrograma basado en las distancias Euclídea y método Ward para 19 lugares de colecta basado en 164 genotipos de Cacao Nacional Boliviano.



CS: cacao silvestre; CC: cacao en cultivo; A: río Beni; B: norte de La Paz; C: Alto Beni

Del análisis de componentes principales, se observó que las variables, largo y diámetro de semilla están asociados con el lugar de colecta de San Silvestre del Norte de La Paz, Las variables número de semilla y diámetro de semilla, presentan correlación positiva. Por su parte, Fowler (1952) y Quiroz y Soria (1994) señalan que el carácter más discriminante para el cacao nacional es el “diámetro de semillas” que lo diferencia de otros grupos genéticos. La variable Largo de mazorca se asocia con los genotipos silvestres de Cachichira. El peso húmedo, peso de mazorca y diámetro de mazorca están asociadas a los genotipos de Mototoy. Sin embargo, las variable número de semilla se asocia a los genotipos de Tequeje río Beni.

De la caracterización molecular, en clousters se agruparon cuatro grupos a una distancia de 1,39. El grupo 1, agrupó a genotipos cultivados de la región de Alto Beni: Covendo (18 genotipos), San José de Cogotay (3 genotipos), San Miguel de Huachi (9 genotipos), Remolino (2 genotipos), San Antonio (1 genotipo). Dentro de este grupo se ubican además un genotipo silvestre de Macagua y dos de Tumupasa, ambos colectados en el Norte del departamento de La Paz. Aparentemente el origen genético de estos materiales es el centro del río Beni entre las comunidades de Copacabana y Cachichira.

El grupo más diverso es el grupo 4, que agrupó a genotipos silvestres de la región Norte de La Paz: San Silvestre (4 genotipos), Macagua (4 genotipos), Tumupasa (2 genotipos), Santa Fé (2 genotipos). Posiblemente estos genotipos tienen su origen en el norte del río Beni, en las comunidades de Tequeje, Paltal, San Marcos y Cachichira. El grupo 3, está constituido principalmente por genotipos de la Estación Experimental – UMSA en Sapecho y un genotipo cultivado de Mototoy. El origen posible es el norte del río Beni en las comunidades: Isla del oro, Carmen del Emero, San Marcos, Tequeje y Paltal, donde se encuentran genotipos silvestres pertenecientes a este grupo. El grupo 2, agrupó a

clones testigo: Trinitarios (ICS-8, ICS-6), Forasteros de Perú (IMC-67, Pound 12, pound7), Ecuador (EET-400, SCA-6), Brasil (TJ-1, PA-121, Catongo Blanco) y un genotipo de Venezuela (OC-77) a estos se agruparon genotipos cultivados de San Antonio, Mototoy, Remolino y San José de Cogotay.

El polimorfismo detectado con todos los marcadores fue del 100%. El microsatélite que más bandas amplificó fue el CIR 37 con 22 bandas. En total se obtuvieron 184 bandas (alelos), dando en promedio 13 bandas por microsatélite, lo cual es más alto que lo reportado por Risterucci *et al.* (2000) con un promedio de 9,5 bandas polimórficas, pero menor a lo reportado por Montamayor (2001), con un promedio de 15 bandas. La mayor información se obtuvo con los *primers* CIR1, CIR24, CIR7 y CIR18. La menor probabilidad de que dos individuos compartan el mismo alelo por *primer* fue encontrada en el primer CIR1, lo que indica que dicho primer mostró un alto grado de confianza en el análisis de diferencias genéticas.

## CONCLUSIONES

Este estudio permitió describir las características morfológicas cuantitativas y cualitativas de fruto y semilla del Cacao Nacional Boliviano. Además, se identificó las variables que mas discriminan entre genotipos silvestres.

La variabilidad genética del Cacao Nacional Boliviano, es alta con los parámetros evaluados. Se identificó dos acervos genéticos el primero al norte del río Beni y el segundo sur del río Beni juntamente con los genotipos del norte de La Paz, con características morfológicas similares pero molecularmente diferentes, las características morfológicas que los distinguen son “diámetro y largo de semilla”, las formas de mazorca cundeamor y angoleta son las que predominan, la forma del ápice obtuso y agudo son las relevantes, la constricción basal 49 % ausente, la rugosidad del

mesocarpo el 63 % intermedia, el color de semilla 100% púrpura.

Del análisis de agrupamientos morfológicos existen características similares entre genotipos silvestres de las riberas del río Beni con los genotipos cultivados de Remolino de la región de Alto Beni, mientras los demás genotipos cultivados son similares a los genotipos silvestres del Norte de La Paz. Se podría concluir que los genotipos CBN cultivados de la región de Alto, tienen ancestros en la región Norte de La Paz y Sur del río Beni, esto se corroboró con los resultados de la caracterización molecular y se respalda con las observaciones hechas en los sitios de colecta.

Otra agrupación molecular importante, son los genotipos cultivados más alejados ubicados al extremo Norte del río Beni (Isla de Oro, Paltal, Tequeje, Carmen del Emero y San Marcos), presentan características moleculares similares a los genotipos de Estación Experimental de Sapecho Alto Beni, donde no existe información exacta de la procedencia de semilla de estos materiales.

El estudio molecular con 14 *primers* específicos para análisis de diversidad genética y mediante la técnica de SSR microsatélites, permitió ubicar al cacao nacional boliviano silvestre en otro grupo diferente al Forastero y Trinitario. El grupo se podrá denominar como “CACAO DEL BENI”.

Todos los marcadores resultaron ser polimórficos 100 % muy informativos para el análisis de diversidad genética, el primer que mas alelos identico fue el CIR37, y los que mas información brindaron fueron el CIR1, CIR24, CIR7, y CIR18, por lo que la técnica SSR microsatélites resultó ser óptima.

## BIBLIOGRAFIA

Engels, J; Bartley, B; Enríquez, J. 1980. Cacao descriptors, their status and modus operandi. Revista

Interamericana de Cooperación Agrícola. Turrialba, CR. 30 (2): p. 209 – 218.

Enríquez, G; Soria, J. 1968. The variability of certain bean characteristics of cacao (*Theobroma cacao* L). Euphytica, 17: 114-120.

Fowler, R. 1952. Características del cacao Nacional. Turrialba, CR. 2(4): 161-166.

Cortés, P. 1997. Algunos ejemplos del control gubernamental sobre los jesuitas tras la expulsión. 10 de junio de 1917. Cochabamba, BO. p 155.

IPGRI. (International Plant Genetic Resources Institute) (2000). Working procedures for cocoa germplasm evaluation and selection. Proceedings of the CFC/ICCO/IPGRI project Worksop 1998 Montpellier, FR. Eds Eskes, AB; Engels, JMM; Lass, RA. 176 p.

July Martínez, W. (2007). Caracterización morfológica y molecular del Cacao Nacional Boliviano y de selecciones élites del Alto Beni, Bolivia. Tesis M.Sc. CATIE. Turrialba, Costa Rica. 88 p.

Loor, R; Amores, F. 2003. Comparación de los niveles de homocigosis y heterocigosis entre cacaos (*Theobroma cacao* L) del genotipo nacional y otros existentes en Ecuador mediante el uso del marcador molecular denominado microsatélite (SSRS). In Copal 14 International Cocoa Research Conference Ghana v.1, p. 179-187.

Morales, D; Rodríguez, G. 1987. Informe del viaje de exploración y colección de recursos genéticos del cacao (*Theobroma cacao*) y frutas silvestres tropicales de Bolivia. Ministerio de Asuntos Campesinos. Instituto Boliviano de Tecnología Agropecuaria IBTA (IBPGR 87/141) La Paz, BO. 9p.

Patiño, M. (2002). Historia y dispersión de los frutales nativos del Neotrópico. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, CO. p. 328- 391.

Quiroz, J; Soria, J. 1994. Caracterización fenotípica del cacao Nacional del Ecuador. Quito EC. INIAP, Estación Experimental Pichilingue. Boletín Técnico no. 74.

Zeballos, H; Terrazas, E. 1970. El cultivo de cacao en el Alto Beni. Instituto nacional de colonización. Boletín de divulgación técnica No. 1. La Paz, BO. 57 p.