



**UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA  
INDOAMÉRICA**

**FACULTAD DE CIENCIAS DEL MEDIO AMBIENTE  
CARRERA DE BIODIVERSIDAD Y RECURSOS GENÉTICOS**

**TEMA:**

---

**DIVERSIDAD GENÉTICA DE CACAO (*THEOBROMA CACAO*)**

---

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de Ingeniero en Biodiversidad y Recursos Genéticos

**Autor**

Sandoval Guillén Pablo David

**Tutora**

PhD. Oleas Gallo Nora Helena

QUITO – ECUADOR  
2022

**AUTORIZACIÓN POR PARTE DEL AUTOR PARA LA CONSULTA,  
REPRODUCCIÓN PARCIAL O TOTAL, Y PUBLICACIÓN ELECTRÓNICA DEL  
TRABAJO DE TÍTULACIÓN**

Yo, Pablo David Sandoval Guillén, declaro ser autor del Trabajo de Titulación con el nombre “Diversidad genética de cacao (*Theobroma cacao*)”, como requisito para optar al grado de Ingeniero en Biodiversidad y Recursos Genéticos y autorizo al Sistema de Bibliotecas de la Universidad Tecnológica Indoamérica, para que con fines netamente académicos divulgue esta obra a través del Repositorio Digital Institucional (RDI-UTI).

Los usuarios del RDI-UTI podrán consultar el contenido de este trabajo en las redes de información del país y del exterior, con las cuales la Universidad tenga convenios. La Universidad Tecnológica Indoamérica no se hace responsable por el plagio o copia del contenido parcial o total de este trabajo.

Del mismo modo, acepto que los Derechos de Autor, Morales y Patrimoniales, sobre esta obra, serán compartidos entre mi persona y la Universidad Tecnológica Indoamérica, y que no tramitaré la publicación de esta obra en ningún otro medio, sin autorización expresa de la misma. En caso de que exista el potencial de generación de beneficios económicos o patentes, producto de este trabajo, acepto que se deberán firmar convenios específicos adicionales, donde se acuerden los términos de adjudicación de dichos beneficios.

Para constancia de esta autorización, en la ciudad de Quito, a los 29 días del mes de marzo de 2022, firmo conforme:

Autor: Pablo David Sandoval Guillén

Firma:



Número de cédula: 172043703-5

Dirección: Pichincha, Quito, Tumbaco, El Arenal.

Correo Electrónico: [pablodsandoval@gmail.com](mailto:pablodsandoval@gmail.com)

Teléfono: +593992924866

## **APROBACIÓN DEL TUTOR**

En mi calidad de Tutor del Trabajo de Titulación “DIVERSIDAD GENÉTICA DE CACAO (*THEOBROMA CACAO*)” presentado por Pablo David Sandoval Guillén, para optar por el Título Ingeniero en Biodiversidad y Recursos Genéticos,

### **CERTIFICO**

Que dicho trabajo de investigación ha sido revisado en todas sus partes y considero que reúne los requisitos y méritos suficientes para ser sometido a la presentación pública y evaluación por parte del Tribunal Examinador que se designe.

Quito, 29 de marzo del 2022

.....  
PhD. Nora Helena Oleas Gallo

## DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Quien suscribe, declaro que los contenidos y los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación, como requerimiento previo para la obtención del Título de Ingeniero en Biodiversidad y Recursos Genéticos, son absolutamente originales, auténticos y personales y de exclusiva responsabilidad legal y académica del autor

Quito, 29 de marzo del 2022



.....  
Pablo David Sandoval Guillén  
172043703-5

## **APROBACIÓN TRIBUNAL**

El trabajo de Titulación, ha sido revisado, aprobado y autorizada su impresión y empastado, sobre el Tema: Diversidad genética de cacao (*Theobroma cacao*) previo a la obtención del Título de Ingeniero en Biodiversidad y Recursos Genéticos, reúne los requisitos de fondo y forma para que el estudiante pueda presentarse a la sustentación del trabajo de titulación.

Quito, 29 de marzo de 2022

.....

Santiago Patricio Bonilla Bedoya, Dr.  
LECTOR

.....

Natasha Alexandra Baer Guevara  
LECTORA

## **DEDICATORIA**

Dedicado a mi familia que me ha apoyado durante toda la carrera.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a la Universidad Tecnológica Indoamérica y a la Doctora Nora Oleas que, bajo el proyecto de diversidad morfológica, genética financiaron parte de esta tesis.

Agradezco a Natasha Baer por su apoyo en la fase de laboratorio, a Enmily Sanchez por colaborar en el análisis de los resultados y a Alejandro Solano quien me recibió en la reserva Mashpi Shungo. También a Cristian Melo por la colección de muestras de Pacto, Nicolás Peñafiel y Diana Flores por trabajar en el laboratorio.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

PORTADA.....	i
AUTORIZACIÓN PARA EL REPOSITORIO DIGITAL .....	ii
APROBACIÓN DEL TUTOR .....	iii
DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD .....	iv
APROBACIÓN TRIBUNAL .....	v
DEDICATORIA .....	vi
AGRADECIMIENTOS .....	vii
ÍNDICE DE CONTENIDO .....	viii
ÍNDICE DE TABLAS .....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS .....	x
RESUMEN EJECUTIVO.....	xi
ABSTRACT.....	xii
INTRODUCCIÓN .....	1
MÉTODOS .....	5
RESULTADOS .....	9
DISCUSIÓN .....	15
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....	17
REFERENCIAS.....	18



## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 . Parámetros genéticos para los grupos de muestras. ....	9
Tabla 2. Porcentaje de polimorfismo por loci para los grupos de muestras. ....	11

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mapa de las muestras tomadas en la parroquia de Pacto.....	5
Figura 2. Tipos de mazorcas de la Finca Agroforestal de Mashpi Chocolate Artesanal .....	6
Figura 3. Media de patrones alélicos entre los grupos de muestras .....	10
Figura 4. STRUCTURE de EETP-800 (1), EETP-801 (2) y CCN51 (3). .....	11
Figura 5. STRUCTURE HARVESTER de los grupos comerciales.....	12
Figura 6. STRUCTURE de las variedades de las fincas agroforestales de la parroquia de Pacto.	13
Figura 7. STRUCTURE HARVESTER de los grupos de muestras de las fincas agroforestales de la parroquia de Pacto.....	13
Figura 8. STRUCTURE de todos los grupos de muestras.....	14
Figura 9. STRUCTURE HARVESTER de todos los grupos de muestras .....	14

**UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA INDOAMÉRICA  
FACULTAD DE CIENCIAS DE MEDIO AMBIENTE  
CARRERA DE BIODIVERSIDAD Y RECURSOS GENÉTICOS**

**TEMA: DIVERSIDAD GENÉTICA DE CACAO (*THEOBROMA CACAO*)**

**AUTOR:** Pablo David Sandoval Guillén

**TUTOR:** PhD. Nora Helena Oleas Gallo

## **RESUMEN EJECUTIVO**

Ecuador es el tercer país con mayor producción de cacao a nivel mundial, que representa el 7% de esta. Una de las variedades que se cultiva en el Ecuador es el cacao nacional fino de aroma denominado “Arriba”. El cacao fino del Ecuador es cotizado por la industria chocolatera por su fuerte aroma floral y frutal. Por otro lado, Los sistemas agroforestales, buscan tener variedades de plantas y árboles con los cultivos, y así obtener beneficios ecológicos de los bosques además de beneficios económicos de los cultivos. El objetivo de este estudio es conocer la diversidad genética de cacao (*Theobroma cacao*) dentro de fincas agroforestales y comparar las variedades de cacao que se comercializan. Se recolectaron 104 muestras en total entre fincas agroforestales y variedades comerciales de cacao. Se usaron 14 microsatélites para realizar los análisis genéticos. Los análisis indicaron que el grupo de muestras de fincas agroforestales tenía una mayor variabilidad genética en comparación con las muestras comerciales. Este estudio contribuye a identificar a los sistemas agroforestales como reservorios de diversidad genética.

**DESCRIPTORES:** Diversidad, cacao, Ecuador, microsatélites, fincas agroforestales

**UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA INDOAMÉRICA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS DE MEDIO AMBIENTE**  
**CARRERA DE BIODIVERSIDAD Y RECURSOS GENÉTICOS**

**THEME: GENETIC DIVERSITY OF CACAO (*THEOBROMA CACAO*)**

**AUTHOR:** Pablo David Sandoval Guillén

**TUTOR:** PhD. Nora Oleas Gallo

**ABSTRACT**

Ecuador is the third-largest cocoa-producing country globally, accounting for 7% of world cocoa production. One of the varieties grown in Ecuador is the national fine aroma cocoa called "Arriba". The chocolate industry prizes Ecuador's fine cocoa for its intense floral and fruity aroma. On the other hand, agroforestry systems seek to have varieties of plants and trees with the crops, thus obtaining ecological benefits from the forests and economic benefits from the crops. This study aims to know the genetic diversity of cocoa (*Theobroma cacao*) within agroforestry farms and to compare the varieties of cocoa that are marketed. A total of 104 samples were collected between agroforestry farms and commercial cocoa varieties. Fourteen microsatellites were used for genetic analysis. The analyses indicated that the agroforestry sample group had higher genetic variability than the commercial samples. This study contributes to identifying agroforestry systems as reservoirs of genetic

Checked by

Lcda. Lucila Estefanía Quezada Tobar MSc.

EFL Teacher

Wednesday, March, 2nd 2022 8h55

Indoamerica University, Quito -Ecuador Campus

**KEYWORDS:** Diversity, cacao, Ecuador, microsatellites, agroforestry farms

## INTRODUCCIÓN

El cacao (*Theobroma cacao* L.) es la especie más importante en el ámbito económico de todo el género *Theobroma* y el tercer cultivo más importante de los trópicos (Loor-Solorzano, et al., 2012). Ecuador es el tercer país con mayor producción a nivel mundial y representa el 7% de esta. Además, el cultivo de cacao, significa una gran fuente de ingresos para las familias agricultoras del país, según el Instituto Nacional de Estadística y Censos (INEC) (Ochoa, 2019).

El cacao es de gran importancia por sus frutos, de cada mazorca se extrae alrededor de 30 a 50 semillas. Son utilizadas en diversas industrias como alimentaria, cosmética y farmacéutica. Estas industrias utilizan productos derivados del cacao, entre ellos están la manteca de cacao y torta de cacao o cocoa que se obtiene después de extraer los aceites naturales o bien la pasta de cacao para la elaboración de chocolates (González-Orozco et al., 2020).

Una de las variedades que se cultiva en el Ecuador es el cacao nacional fino de aroma denominado “Arriba”. El cacao fino es escaso, y constituye solo el 5 % de la producción mundial (Afoakwa et al., 2008). De este 5%, el 65% corresponde al cacao Arriba de Ecuador. El cacao fino del Ecuador es cotizado por la industria chocolatera por su fuerte aroma floral y frutal, gracias a esta característica se logra vender en grandes cantidades a esta industria, para fabricar los chocolates de alta gama que se venden en todo el mundo. Al ser un producto emblemático del Ecuador el cacao “arriba” ya tiene su denominación de origen protegiéndolo a nivel mundial (Paéz y Espinosa, 2015). Por otro lado, esta variedad de cacao, tiene una desventaja ya que es poco resistente frente a patógenos (Herrmann et al., 2014).

Por esta desventaja, se han desarrollado variedades resistentes, como la variedad denominada CCN51 (Colección Castro Naranjal 51), siendo está más resistente a condiciones ambientales variables, y enfermedades fúngicas como la escoba de bruja (*Moniliophthora perniciosa*) y vaina helada (*Moniliophthora roreri*) (Loor-Solorzano et al., 2018). Esta variedad tiene una mayor producción, pero no se considera como un cacao fino de aroma. La manera en la que se reproduce esta variedad es por clonación. El cultivo CCN51 representa un menor riesgo

para los agricultores y por este motivo la compra de plántulas de este cacao es mayor a nivel nacional para ser sembrado de forma intensiva (López, 2015).

Además, una de las principales limitantes para la producción de *Theobroma cacao* es el bajo rendimiento. Por este motivo, en los años 90 los investigadores de la Estación Experimental Tropical Pichilingue (EETP) del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) desarrollaron mejoramientos genéticos dando como resultados híbridos de cacao (Loor-Solorzano et al., 2019). La planta “E5/T1/R2/A3” fue el resultado de la cruce CCN51 X EET 233. Los clones resultantes de cacao se evaluaron durante cuatro años y sus principales características son crecimiento semi-erecto, floración dentro del primer y tercer trimestre del año, mazorca de color verde cuando es inmadura y amarilla en su madurez y producción temprana a los 14 meses de sembrado. Los clones se registraron con la denominación INIAP-EETP-800 “Aroma Pichilingue” y INIAP-EETP-801 “Fino Pichilingue” y se comercializan a nivel nacional desde el año 2016 (Loor-Solorzano et al., 2018). El trabajo de Motamayor et al., en 2008, propuso que el cacao se clasifica en 10 grupos genéticos y en el Ecuador podemos encontrar las variedades de cacao Criollo, Nacional, Trinitario y Forastero.

Para la identificación de los grupos genéticos, las relaciones evolutivas y brechas genéticas de las colecciones de germoplasma del cacao se utilizan marcadores moleculares como microsatélites (Boza et al., 2014). Los microsatélites son secuencias simples repetidas de segmentos cortos de ADN (de 1 a 10 pb) que aleatoriamente se repiten a lo largo del genoma de los seres vivos (Gartner, 2011). Estos segmentos de ADN son por lo general variables y útiles para medir el polimorfismo entre especies o variedades muy relacionadas en estudios de diversidad genética de poblaciones (Azofeita-Delgado, 2006).

Los primeros estudios sobre la diversidad genética del cacao fueron realizados con marcadores RAPD y RFLP, después los marcadores SSR y por último los marcadores SNP. En estas investigaciones acerca del *Theobroma cacao* se pudo determinar los diferentes grupos genéticos que existen, ya que antes se los clasificaba por sus características fenotípicas (López et al., 2021). Los estudios acerca de la diversidad y estructura poblacional de plantaciones de cacao, han aumentado ya que se han incrementado el número de cebadores de microsatélites. Por ejemplo,

se han desarrollado 268 secuencias de microsatélites por parte de Lanaud et al. (1999) y en 2004 Pugh desarrolló 201 adicionales.

Algunas fincas que no trabajan con monocultivos, realizan prácticas alternativas que se conocen como sistemas agroforestales. Estos sistemas agroforestales, buscan tener variedades de plantas y árboles con los cultivos, y así obtener beneficios ecológicos de los bosques además de beneficios económicos de los cultivos (Anchundia et al., 2018). Los beneficios ambientales del sistema agroforestal del cacao dependen del manejo. Un ejemplo son los sistemas de cacao de sombra los cuales influyen en la diversidad biológica tropical positivamente, por medio de la integración de árboles en las fincas y en el que el paisaje agrícola, se diversifica y sustenta la producción para incrementar los beneficios sociales, económicos y ambientales de agricultores de todos los niveles (Rice y Greenberg, 2000). Un ejemplo de esta práctica alternativa en el Ecuador es la finca de Mashpi Chocolate Artesanal, que produce cacao nacional fino de aroma entre muchas otras especies de bosques tropicales, de esta manera restaurando y conservando la diversidad de ecosistema. Además, potencialmente pueden ser reservorios de variedades genéticas de cacao, ya que las plantas no necesariamente se originan de clones comerciales.

Un problema que se ha identificado en el cultivo del cacao a nivel nacional es que, en varias ocasiones los agricultores desconocen el tipo de variedad de cacao con el que trabajan. Esto provoca que dentro del Ecuador existan varios viveros que venden especímenes sin un certificado de origen genético ocasionando confusiones sobre el tipo de cacao que tienen. Los agricultores dudan si es de la misma variedad, distinta o incluso una nueva (Parra et al., 2002). Por este problema la investigación se propuso identificar la diversidad genética de *Theobroma cacao* dentro de las fincas de Ecuador y comparar con las variedades genéticas comerciales. Con el fin que los resultados sean utilizados en el futuro para desarrollar estrategias de conservación.

**Objetivo general:**

Conocer la diversidad de cacao (*Theobroma cacao*) dentro fincas agroforestales y comparar las variedades que se comercializan de cacao.

**Objetivos específicos:**

- Estimar la diversidad genética de cacao en las fincas agroforestales de la parroquia de Pacto.
- Comparar la diversidad genética con las variedades comerciales.



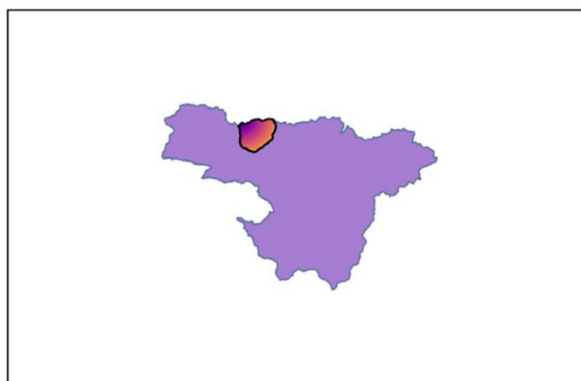
## MÉTODOS

### Áreas de Estudio.

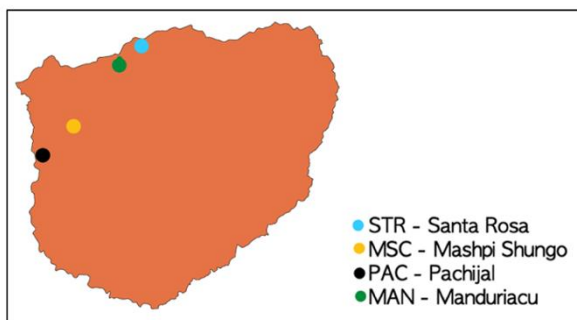
La parroquia de Pacto está ubicada en la Provincia de Pichincha a 70 km al noroccidente del Distrito Metropolitano de Quito. Las principales actividades económicas son agricultura, ganadería, pequeñas industrias manufactureras, pesca y silvicultura. Tiene un clima templado húmedo característico de la transición de la región andina al litoral. Presenta temperaturas que oscilan entre los 17°C y 22°C., y tiene una precipitación anual promedio de 2400 mm. Al estar en las estribaciones de la cordillera occidental presenta un relieve montañoso, su gradiente altitudinal va desde los 440 hasta los 1850 m.s.n.m. (Fadic, 2014).



Ecuador - Pichincha



Pichincha - Parroquia de Pacto



Parroquia de Pacto con las fincas muestreadas

**Figura 1.** Mapa de las muestras tomadas en la parroquia de Pacto.

Dentro de la ciudad de Quevedo ubicada en la provincia de Los Ríos, se encuentran la Estación Tropical Pichilingue del INIAP y el vivero local de plántulas de cacao. Quevedo tiene un clima tropical con gran cantidad de lluvia y con una temperatura promedio de 22.6°C. La precipitación anual es de 6182 mm. y su altitud de es 53 m.s.n.m. (Cruzatty y Vollmann, 2012).

### Toma de muestras.

El total de muestras recolectadas en las distintas áreas de estudio fueron 104. Estas muestras estas distribuidas de la siguiente manera: En la primera toma de muestras, en 2016, se recolectaron 3 en una finca vía Manduriacu, 62 dentro de la finca agroforestal de chocolate artesanal Mashpi, 4 en una finca en Pachijal, 11 en una finca del pueblo de Santa Rosa de Pacto (Figura 1). Por cada planta se recolectaron de 2 a 4 hojas jóvenes, se colocaron en fundas de papel con silica gel y cada funda tenía su etiquetado. La segunda toma de muestras se realizó el 09 de marzo del 2021 en la Estación Tropical Pichilingue del INIAP. Para esta recolección se compraron clones para poder extraer las hojas jóvenes, las variedades adquiridas fueron 8 clones EETP-800 Aroma y 8 clones de la variedad EETP-801 Fino. En el vivero de Quevedo se compraron 8 ejemplares de la variedad CCN51. Estas 24 plántulas de cacao compradas en la ciudad de Quevedo fueron llevadas a Quito al laboratorio de biología molecular de UTI sede Quito donde se extrajo las hojas jóvenes, se colocó en fundas de papel y dentro contenía silica gel.



**Figura 2.** Tipos de mazorcas de la Finca Agroforestal de Mashpi Chocolate Artesanal

### Extracción de ADN.

Se extrajo ADN de un total de 104 muestras siguiendo el protocolo CTAB para extracción de ADN descrito anteriormente por Doyle y Doyle (1987) y Cullings (1992). Para el procesamiento de muestras se utilizaron 10-20 mg de hojas que se encontraban secas y que estén en buen estado fitosanitario. El ADN extraído fue cuantificado en el equipo Quantus de Promega mediante fluimetría.

La extracción de ADN de las muestras de Los Ríos se realizó dos veces, ya que, la primera vez que se extrajo ADN de las muestras no cumplían con los parámetros de concentración requeridos por Macrogen. Por lo tanto, se realizó una segunda extracción de ADN, tan solo de 8 muestras de cada variedad recolectada en Los Ríos que estas son EETP-800 Aroma, EETP-801 Fino y CCN51. Estas 24 muestras si cumplieron con los parámetros de concentración de ADN necesaria y se continuó el proceso enviando las muestras a Macrogen para realizar el genotipado.

### Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Para este procedimiento se usó el método descrito por Lanaud et al. (1999). Se genotiparon 104 individuos y los siguientes catorce microsátélites: mTcCIR8, mTcCIR40, mTcCIR11, mTcCIR60, mTcCIR12, mTcCIR84, mTcCIR15, mTcCIR33, mTcCIR18, mTcCIR26, mTcCIR22, mTcCIR230, mTcCIR24, mTcCIR37, estos fueron desarrollados para el *Theobroma cacao* (Lanaud, 1999). Se usó el marcados HEX para: mTcCIR8, mTcCIR11, mTcCIR12, mTcCIR15, mTcCIR18, mTcCIR22, mTcCIR24 y el marcador 6-FAM para mTcCIR40, mTcCIR60, mTcCIR84, mTcCIR33, mTcCIR26, mTcCIR230 y mTcCIR37. Las secuencias de nucleótidos de los cebadores usados se muestran en el artículo de Saunders et al. (2004). Cada microsátélite se amplificó por separado, y posteriormente se usó un gel de agarosa al 1% para visualizar el producto de PCR por electroforesis. Finalmente, los productos de PCR fueron enviados a Macrogen en Corea del Sur para su genotipado. Una vez que Macrogen envió los resultados, los alelos fueron identificados con el Software Geneious versión 6.1.7.

### Análisis estadísticos:

Se realizó estadística descriptiva genéticas de las muestras con el programa GENALEX 6.5. Se obtuvieron estadísticas F, heterocigosidad, frecuencia de alelos, distancia genética, índice de Shannon, entre varios aspectos más (Peakall y Smouse, 2006).

Además, se estimó la estructura poblacional en el software STRUCTURE el cual utiliza un método bayesiano para correlacionar las frecuencias de los alelos y asignar a los individuos en grupos genéticos (Pritchard et al., 2000). Se analizaron siete grupos genéticos ( $k$ ) que son:  $k=1$ ,  $k=2$ ,  $k=3$ ,  $k=4$ ,  $k=5$ ,  $k=6$ ,  $k=7$ , y cada análisis de grupo genético se repitió veinte veces usando la Cadena de Markov Monte Carlo (MCMC, por sus siglas en inglés). Los análisis de STRUCTURE se realizaron tres diferentes, el primero fue con las muestras comerciales de cacao, el segundo fue con las muestras de las fincas y el tercer análisis se realizó con las 104 muestras juntas. Se realizaron estos diferentes análisis para observar la diversidad genética que tienen entre ellos y el tercer análisis se realizó para comparar entre las variedades comerciales y las variedades de fincas.

Para identificar el número más probable de  $k$  se usó el software STRUCTURE HARVESTER (Earl, 2011). Se usó el método de Evanno para estimar el mejor valor de  $k$  que se ajusta más probablemente a los datos (Earl y vonHoldt, 2012).

## RESULTADOS

### Análisis estadístico:

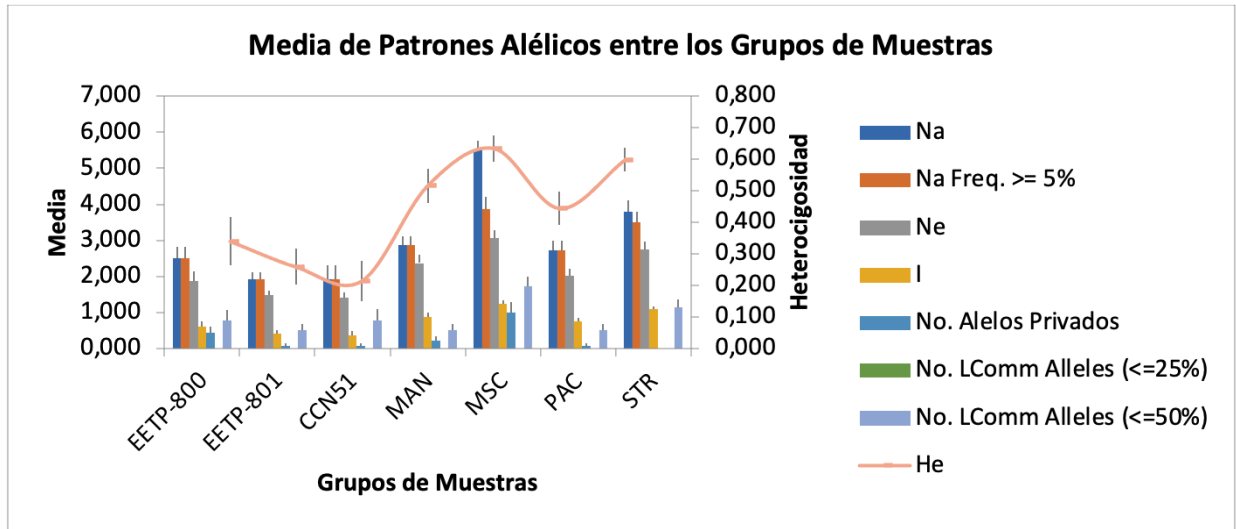
En total de los 14 marcadores moleculares utilizados se logró amplificar una media de 2.50 alelos para el grupo de muestras de INIAP-EETP-800 “Aroma Pichiligüe”, 1.93 alelos para INIAP-EETP-801 “Fino Pichilingüe” y CCN51, 2.86 alelos para MAN (Manduriacu), 5.50 para MSC (Mashpi), 2.71 alelos para PAC (Pachijal) y 3.79 para STR (Santa Rosa de Pacto) (Tabla 1). El promedio de alelos efectivos para EETP-800 es 1.87, EETP-801 es 1.47, para CCN51 es 1.42, MAN es 2.37, para MSC fue 3.05, PAC fue 2.02 y para STR fue de 2.74. Las medidas de heterocigosidad observada para los grupos de muestras fueron: EETP-800 de 0.26, EETP-801 de 0.23, CCN51 de 0.17, MAN de 0.667, MSC de 0.640, PAC de 0.464 y STR de 0.543 mientras que la heterocigosidad esperada fue de 0.340, 0.259, 0.214, 0.516, 0.635, 0.444 y 0.598 para los grupos de muestras EETP-800, EETP-801, CCN51, MAN, MSC, PAC y STR respectivamente.

**Tabla 1.** Parámetros genéticos para los grupos de muestras EETP-800, EET-801, CCN51, MAN, MSC, PAC, STR. (N) número de muestras, (Na) Número de alelos, (Nef) número de alelos efectivos, (I) Índice de Shannon, (Ho) Heterocigosidad observada, (He) Heterocigosidad esperada, (uHe) Heterocigosidad de una vía y (F) Índice de fijación.

Grupo de Muestras	N	Na	Nef	I	Ho	He	uHe	F
EETP-800	8	2.500	1.875	0.604	0.259	0.340	0.365	0.212
EETP-801	8	1.929	1.474	0.419	0.230	0.259	0.277	0.031
CCN51	8	1.929	1.417	0.359	0.170	0.214	0.229	0.198
MAN	3	2.857	2.368	0.879	0.667	0.516	0.619	-0.303
MSC	62	5.500	3.055	1.246	0.640	0.635	0.640	-0.007
PAC	4	2.714	2.023	0.752	0.464	0.444	0.508	-0.031
STR	11	3.786	2.740	1.084	0.543	0.598	0.628	0.100

Los patrones alélicos promedios entre poblaciones son datos que nos permite analizar la diversidad genética de las poblaciones estudias (Figura 3). Se pueden analizar distintos

parámetros entre ellos, los valores de heterocigosidad que en la figura 3 van de 0 a 0.800. El número de alelos diferentes varía entre grupos de muestras, siendo la finca agroforestal de Mashpi (MSC) el valor más alto con 5.500, Santa Rosa de Pacto (STR) con 3.786, Manduriacu (MAN) con 2.857, EETP-800 con 2.500 y con el menor valor de 1.929 EETP-801 y CCN51.



**Figura 3.** Media de patrones alélicos entre los grupos de muestras. Número de diferentes alelos (Na), número de diferentes alelos con una frecuencia  $\geq 5\%$  (Na Freq.  $\geq 5\%$ ), número de alelos efectivo (Nef), índice de Shannon (I), Número de alelos privados, heterocigosidad esperada (He) y heterocigosidad de una vía (uHe).

El análisis de porcentaje de polimorfismo para los loci demostró que la mayor población de polimorfismo se encuentra en las fincas agroforestales de Mashpi (MSC) y Santa Rosa de Pacto con un valor de 100%. El grupo de INIAP (EETP-800 Aroma, EETP-801 Fino), 92.86% MAN y PAC, en un menor porcentaje con 71.43% EETP-800, EETP-801 y por último la población de CCN51 con el 50% de polimorfismo para todos los locus analizados en este estudio (Tabla 2).

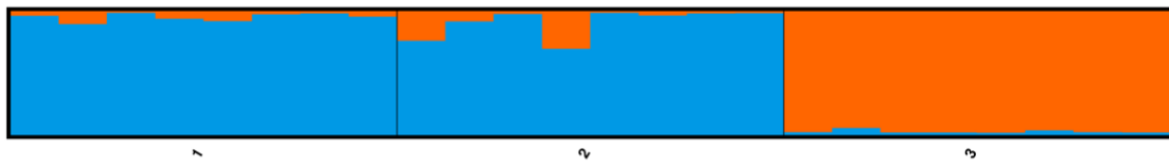
**Tabla 2.** Porcentaje de polimorfismo por loci para los grupos de muestras.

Población	Porcentaje de polimorfismo por loci
EETP-800	71.43%
EETP-801	71.43%
CCN51	50.00%
MAN	92.86%
MSC	100%
PAC	92.86%
STR	100%

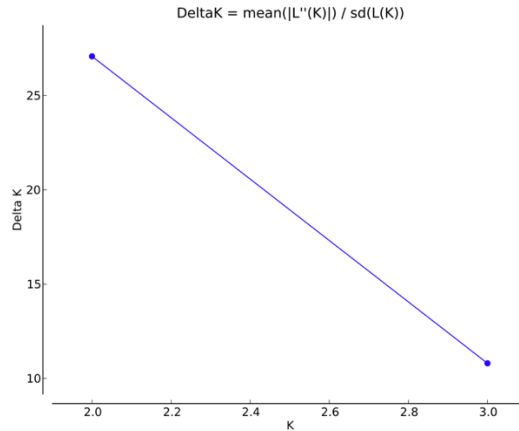
Análisis de STRUCTURE:

El primer análisis de STRUCTURE se corrió las muestras de las variedades 1, 2 y 3 juntas: INIAP (INIAP-EETP-800 “Aroma Pichilingue” y INIAP-EETP-801 “Fino Pichilingue”) comparten grandes similitudes genéticas (color azul). Por otro lado, los individuos CCN51 (color naranja) pertenecen puramente a otro grupo genético diferenciándose de las muestras de INIAP. Los individuos 801-1 y 801-4 de la población 2 comparten una parte genética con la población de los individuos de CCN51 (Figura 4). El método de Evanno para encontrar el  $\Delta K$  más óptimo fue de  $k=2$  con un valor de  $\Delta K=27$ (Figura 5). No se identificó ningún otro  $k$  como número de población probable.

K=2



**Figura 4.** Estructura poblacional por medio de STRUCTURE de EETP-800 (1), EETP-801 (2) y CCN51 (3).



**Figura 5.** STRUCTURE HARVESTER para los grupos de muestras EETP-800, EETP-801 y CCN51.

El segundo análisis de STRUCTURE se realizó con las muestras recolectadas en fincas agroforestales en la parroquia de Pacto. Dentro de este grupo se encontraban las fincas Manduriacu (MAN 1), Mashpi (MSC 2), Pachijal (PAC 3) y Santa Rosa de Pacto (STR 4) (Figura 6). Se pudo determinar que existe una similitud de la variabilidad genética en las cuatro fincas, no hay un grupo genético que predomine. El método de Evanno para encontrar el  $\Delta K$  más óptimo fue de  $k=2$  con un valor de  $\Delta K=15$  y  $k=3$  con un valor de  $\Delta K=7.4$  (Figura 7).

**K=2**

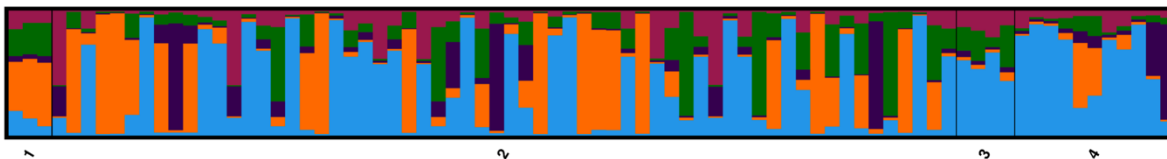


**K=3**

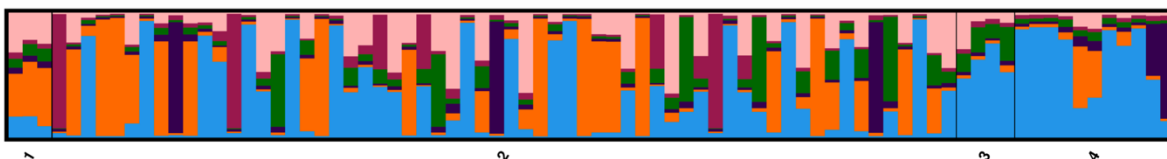




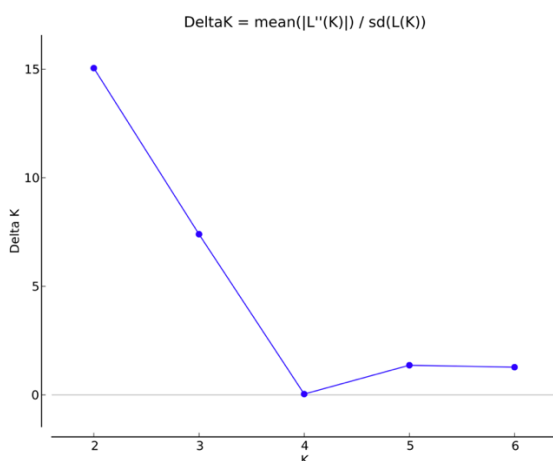
K=5



K=6



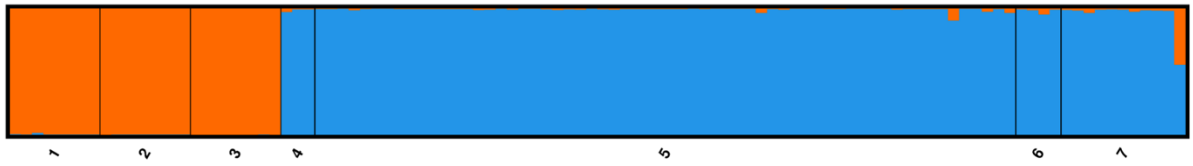
**Figura 6.** Estructura poblacional por medio de STRUCTURE de las variedades de las fincas agroforestales de la parroquia de Pacto. MAN (1), MSC (2), PAC, (3) y STR (4).



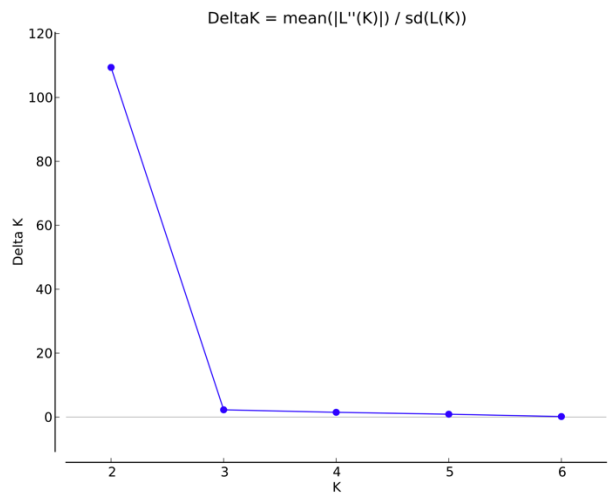
**Figura 7.** STRUCTURE HARVESTER de los grupos de muestras de las fincas agroforestales de la parroquia de Pacto.

El tercer análisis de STRUCTURE fue con las 104 muestras recolectadas en este estudio. El resultado fue que las muestras comerciales (color naranja) se diferenciaban con las muestras de las fincas agroforestales (color azul) (Figura 8). El individuo STR-011 de las muestras de Santa Rosa de Pacto demostró compartir una parte genética con el grupo de las muestras comerciales. El método de Evanno para encontrar el  $\Delta K$  más óptimo fue de  $k=2$  con un valor de  $\Delta K=110$  (Figura 9).

K=2



**Figura 8.** Estructura poblacional por medio de STRUCTURE de los grupos de muestras de EETP-800 (1), EETP-801 (2), CCN51 (3), MAN (4), MSC (5), PAC (6) y STR (7).



**Figura 9.** STRUCTURE HARVESTER de los grupos de muestras de EETP-800, EETP-801, CCN51, MAN, MSC, PAC y STR.

## DISCUSIÓN

La supervivencia de una especie para enfrentar la adversidad biótica o abiótica se da por la diversidad genética, ya que permite tener distintas cualidades que son necesarias para adaptarse al ambiente. Los estudios sobre diversidad genética son fundamentales para conocer si la continuidad de una especie será viable mediante el análisis del número de alelos ( $N_a$ ), número de alelos efectivos ( $N_{ef}$ ), heterocigosidad observada ( $H_o$ ) y heterocigosidad esperada ( $H_e$ ) (Ha, et al., 2015). Como es el caso de esta investigación donde el grupo de muestras de fincas agroforestales (MAN, MSC, PAC, STR) demostraron tener un mayor número de alelos con un promedio de 5.64, siendo la finca de Mashpi con el mayor número de alelos. El grupo de muestras de variedades comerciales (EETP-800, EETP-801, CCN51) mostraron tener un bajo número de alelos con 2.12 indicando poca diversidad genética.

Otros estudios realizados en Ecuador sobre la variedad de cacao Nacional como el de Loor et al. (2009) tiene un promedio de 4.22 alelos, mientras que Bonifaz et al. (2010) obtuvo un promedio de 5.7 alelos. Teniendo relación con los resultados obtenidos en el grupo de las fincas agroforestales confirmando que existe gran diversidad genética. Nuestros resultados sugieren que las prácticas agroforestales hacen que las fincas sean un reservorio de diversidad genética.

Los valores promedios de heterocigosidad observada ( $H_o$ ) versus la heterocigosidad esperada ( $H_e$ ) del grupo de muestras de las fincas agroforestales indican que existe una alta diversidad genética a comparación con el grupo de las variedades comerciales que demostraron tener una baja diversidad genética. En el estudio realizado por Zhang et al. (2009) obtuvieron un promedio de 0.461 ( $H_o$ ) y 0.513 ( $H_e$ ) indicando que encontraron déficit de heterocigotos, posiblemente por utilizar clones.

En el estudio de Loor et al. (2009) analizó muestras de cacao Nacional que fueron recolectadas a lo largo de la costa ecuatoriana. Concluyeron que el cacao Nacional actual tiene altos niveles de heterocigosidad y de diversidad genética. Por otro lado, Murillo et al. (2011) evaluaron clones de cacao y el resultado fue un promedio de 0.58 ( $H_o$ ) y 0.69 ( $H_e$ ). A pesar de haber estudiado clones, estas plantas contaron con una diversidad genética considerable. Otro estudio realizado

por Zhang et al. (2008) analizaron ejemplares de diferentes variedades (Nacional, Trinitario y Forastero del Alto Amazonas de Perú), con un resultado promedio de 0.51 (Ho) y 0.56 (He).

El cacao Nacional tiene un gran rango de genotipos a causa de la introducción de variedades foráneas esto se ve reflejado en los distintos estudios de diversidad genética realizados en Ecuador a lo largo de los años (Lerceteau et al., 1997, Crouzillat et al., 2000 y Loor et al., 2009). Los resultados muestran que los árboles de cacao de las fincas analizadas de Pacto no provienen de clones comerciales. Como el caso de la finca de Mashpi Shungo donde adquirieron las plantas de cacao de siete provincias y alrededor de 17 fincas diferentes. Las muestras de Santa Rosa de Pacto eran árboles de 27 a 30 años con semillas traídas de el Oro y Esmeraldas (A. Solano, comunicación personal, 26 de noviembre del 2021). Las muestras de Pachijal tenían árboles de más de 40 años. Todo esto explica porqué estas fincas tiene una gran diversidad genética.

## CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Los resultados de los análisis permiten conocer la diversidad del cacao dentro de las fincas agroforestales y compara las variedades que se comercializan. Demostrando que el grupo de muestras de las fincas agroforestales de cacao tiene una mayor variabilidad genética por el número de alelos por locus y su heterocigosidad observada. Se puede decir que las fincas agroforestales son un reservorio genético a diferencia de las variedades comercial y al ser clones su heterocigosidad es aún más baja.

Durante toda la investigación los valores estimados de los análisis nos permiten evaluar la diversidad genética de cacao dentro de las fincas agroforestales de la parroquia de Pacto, por sus altos valores de números de alelos efectivos, porcentaje de polimorfismo y número de alelos únicos.

Los agricultores deben evitar los monocultivos de una sola especie y variedad, se recomienda optar por prácticas como la agroforestería para tener cultivos más resilientes contra el cambio climático. Las prácticas que conllevan variedad de plantas en un solo mismo lugar tienen beneficios para el medio ambiente como también para los agricultores. Los beneficios son aumento de polinizadores en el lugar, control de plagas biológicos, retención del carbono, se pueden tener especies frutales o madereras para tener sus productos. Por, sobre todo, es importante que se mantenga la variabilidad genética de *Theobroma cacao* para poder asegurar su viabilidad en el futuro en el cual se pueda utilizar las diferentes características que se adapten al entorno que se encuentran.

Es importante que dentro de Ecuador se realicen monitoreos sobre las variedades de cacao que existen en el país. Así, se logra conservar y potenciar al cacao con fines económicos ya que en los últimos años han ido incrementando la venta y exportación de este producto.

## REFERENCIAS

- Afoakwa, E., Paterson, A., Fowler, M. y Ryan, A. (2008). Flavor formation and character in cocoa and chocolate: a critical review. *Crit. Rev. Food Sci.* 48: 840-857.
- Anchundia, D., Herrada, M., y Montalvan, E. (2018). Sistemas agroforestales con cultivo de cacao fino de aroma: entorno socio-económico y productivo. *Revista Cubana de Ciencias Forestales: CFORES*, 6(1), 103-115.
- Azofeifa-Delgado, Á. (2006). Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del trópico. *Agronomía mesoamericana*, 17(2), 221-242.
- Bonifaz, C., Bonilla, J., Ordóñez, E., y García, E. (2010). Identificación varietal de 41 plantas seleccionadas de cacao (*Theobroma cacao* L.) provenientes de cuatro cultivares distintos de la región amazónica ecuatoriana, mediante el uso de marcadores microsatélites. *Revista Tecnológica-ESPOL*, 23(1).
- Boza, E., Motamayor, J., Amores, F., Cedeno-Amador, S., Tondo, C., Livingstone, D. y Gutiérrez, O. (2014). Genetic characterization of the cacao cultivar CCN 51: its impact and significance on global cacao improvement and production. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 139(2), 219-229.
- Cullings, K. (1992). Design and testing of a plant-specific PCR primer for ecological and evolutionary studies. *Molecular Ecology*, 1(4), 233-240.
- Crouzillat, D., Phillips, W., Fritz, P., y Pétiard, V. (2000). Quantitative trait loci analysis in *Theobroma cacao* using molecular markers. Inheritance of polygenic resistance to *Phytophthora palmivora* in two related cacao populations. *Euphytica*, 114(1), 25-36.
- Cruzatty, L. y Vollmann, J. (2012). Caracterización de suelos a lo largo de un gradiente altitudinal en Ecuador. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*, 7(3), 456-464.
- Doyle, J., y Doyle, J. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19 (1), 11-15.
- Earl, D. (2011). Structure Harvester version 0.6.1. Disponible en internet [http://taylor0.biology.ucla.edu/structure\\_harvester](http://taylor0.biology.ucla.edu/structure_harvester).
- Earl D., y vonHoldt B. (2012). Structure harvester: a website and program for visualising structure output and implementing the Evanno method. *Conservation genetic resources*, 4, 359–361.
- Fadic, T. (2014). Análisis del Retorno Promocional del Producto Turístico Mashpi Lodge Manejado por la Empresa Turística Metropolitan Touring en el periodo 2012 – 2013. Recuperado de: <http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/8038/Tesis%20Diego%20>

Tamar% C3% ADz% 2C% 20An% C3% A1lisis% 20del% 20Retorno% 20del% 20Producto% 20Tur% C3% ADstico% 20de% 20Mashpi% 20Lodge.pdf?sequence=1&isAllowed=y.

- Gartner, G. (2011). Caracterización molecular de clones de *Theobroma cacao* L., por medio de marcadores moleculares microsatélites. *Revista Luna Azul (On Line)*, 32, 52-60.
- González-Orozco, C., Galán, A., Ramos, P., y Yockteng, R. (2020). Exploring the diversity and distribution of crop wild relatives of cacao (*Theobroma cacao* L.) in Colombia. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 67(8), 2071-2085.
- Ha, L., Vanlerberghe, L., Toan, H., Dewettinck, K., y Messens, K. (2015). Comparative evaluation of six extraction methods for DNA quantification and PCR detection in cocoa and cocoa-derived products. *Food Biotechnology*, 29(1), 1-19.
- Herrmann, L., Haase, I., Blauhut, M., Barz, N., y Fischer, M. (2014). DNA-based differentiation of the Ecuadorian cocoa types CCN-51 and Arriba based on sequence differences in the chloroplast genome. *Journal of agricultural and food chemistry*, 62(50), 12118-12127.
- Lanaud, C., Risterucci, A., Pieretti, I., Falque, M., Bouet, A., y Lagoda, P. (1999). Isolation and characterization of microsatellites in *Theobroma cacao* L. *Molecular Ecology*, 8(12), 2141-2143.
- Lerceteau, E., Flipo, S., Quiroz, J., Soria, J., Pétiard, V., y Crouzil, D. (1997). Genetic differentiation among Ecuadorian *Theobroma cacao* L. accessions using DNA and morphological analyses. *Euphytica*, 95(1), 77-87.
- Loor, R., Risterucci, A., Courtois, B., Fouet, O., Jeanneau, M., Rosenquist, E., ... y Lanaud, C. (2009). Tracing the native ancestors of the modern *Theobroma cacao* L. population in Ecuador. *Tree Genetics & Genomes*, 5(3), 421-433.
- Loor-Solórzano, R., Amores-Puyutaxi, F., Vasco-Medina, S., Quiroz-Vera, J., Casanova-Mendoza, T., Garzón-Catota, A., ... y Zambrano-Flores, F. (2019). INIAP-EETP-800 'Aroma Pichilingue', nueva variedad ecuatoriana de cacao fino de alto rendimiento. *Revista Fitotecnia mexicana*, 42(2), 187-189.
- Loor-Solorzano R, Fouet O, Lemainque A, Pavek S, Boccara M, et al. (2012) Insight into the Wild Origin, Migration and Domestication History of the Fine Flavour Nacional *Theobroma cacao* L. Variety from Ecuador. *PLoS One* 7(11): e48438. doi:10.1371/journal.pone.0048438
- Loor-Solórzano, R., Sotomayor Cantos, I., Jiménez Barragán, J., Tarqui Freire, O., Rodríguez Zamora, G., Casanova Mendoza, T., y Quijano Rivadeneira, G. (2018). INIAP-EETP-800 e INIAP-EETP-801 nuevos clones de cacao fino y de aroma con alto rendimiento. Mocache, Ecuador: INIAP, Estación Experimental Tropical Pichilingue, Programa Nacional de Cacao y Café. (Plegable no. 436).

- López, A. (2015). Producción y comercialización de cacao fino de aroma en el Ecuador - Año 2012-2014. In Intendencia Zonal 7 <http://www.scpm.gob.ec/biblioteca>.
- López, M., Gori, M., Bini, L., Ordoñez, E., Durán, E., Gutierrez, O., ... y Palchetti, E. (2021). Genetic Purity of Cacao Criollo from Honduras Is Revealed by SSR Molecular Markers. *Agronomy*, 11(2), 225.
- Motamayor, J., Lachenaud, da Silva e Mota, Loor, Kuhn, Brown J., y Schnell J. (2008). Geographic and genetic population differentiation of the Amazonian chocolate tree (*Theobroma cacao* L.). *PLoS One* 3:e3311.
- Murillo, J., Villa, D., Marín, S., Páez, F., y Gartner, G. (2011). Caracterización molecular de clones de *Theobroma cacao* L., por medio de marcadores moleculares microsatélites. *Revista Luna Azul*, (32), 52-60.
- Ochoa, J. (2019). Sector exportador de Cacao. Asociación Nacional de Exportadores de Cacao. Sector Exportador de Cacao – Ecuador. Recuperado de: <http://www.anecacao.com/es/estadisticas/estadisticas-actuales.html>.
- Paéz, L., y Espinosa, F. (2015). Ecuador tierra del Cacao. En L. Paéz, F. Espinosa, y S. Leisa (Ed.), Ecuador tierra del Cacao (1a ed., pág. 209). Quito, Ecuador: Trama ediciones.
- Parra, P., Gonzáles, M., Ortiz de bertorelli, L., Graziani de Fariñas, L. y Figueroa Ruiz, R. (2002). Caracterización de los tipos de cacao criollo, trinitario y forastero de Cumboto, Aragua, mediante patrones electroforéticos de isoenzimas. *Agronomía Tropical*, 52(3), 277- 297.
- Peakall, R. y Smouse, P. (2006). GENALEX 6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6 (1), 288–295. doi.org/10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x.
- Pritchard, J., Stephens, M., y Donnelly P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155(2), 945-959.
- Rice, R., y Greenberg, R. (2000). Cacao cultivation and the conservation of biological diversity. *AMBIO: A Journal of the Human Environment*, 29(3), 167-173.
- Saunders, J., Mischke, S., Leamy, E., y Hemeida, A. (2004). Selection of international molecular standards for DNA fingerprinting of *Theobroma cacao*. *Theoretical and Applied Genetics*, 110(1), 41-47.
- Zhang, D., Boccara, M., Motilal, L., Butler, D. R., Umaharan, P., Mischke, S., y Meinhardt, L. (2008). Microsatellite variation and population structure in the “Refractario” cacao of Ecuador. *Conservation Genetics*, 9(2), 327-337.



Zhang, D., Mischke, S., Johnson, E. S., Phillips-Mora, W., y Meinhardt, L. (2009). Molecular characterization of an international cacao collection using microsatellite markers. *Tree Genetics & Genomes*, 5(1), 1-10.