

Relaciones de parentesco en híbridos F_1 de cacao (*Theobroma cacao* L.) por marcadores moleculares

Relation of kinship in F_1 hybrids of cocoa (*Theobroma cacao* L.) by molecular markers

Alfonso Azpeitia Morales*^o, Hugo Armando Gasca González**, Emiliano Villordo Pineda**

RESUMEN

Es importante incluir en los programas de mejoramiento de plantas la relación del parentesco por marcadores moleculares. Con base a lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue establecer relaciones de parentesco entre híbridos F_1 de cacao de las cruces ICS 95 × INIFAP 1 e INIFAP 1 × ICS 95. Los marcadores utilizados fueron microsátelites (SSR): mTcIR 8 y mTcCIR 24 así como secuencias simples inter repetidas (ISSR): UBC 829, UBC 835 y UBC 841. Los resultados mostraron 100% de alelos polimórficos entre los parentales materno y paterno. Estos marcadores permitieron identificar las relaciones de parentesco en 58 híbridos F_1 de un total de 61. De acuerdo a los marcadores utilizados y sus valores correspondientes al contenido de información polimórfica (PIC), estos fueron informativos, lo que avala que los marcadores utilizados en la presente investigación sean confiables y que permitan identificar híbridos con base a su parentesco.

ABSTRACT

It is important to include in breeding programs the selection by the relationship of kinship by molecular markers. Based on the above, the objective of this study was to establish relations of kinship between hybrids F_1 of cocoa of crosses ICS 195 x INIFAP 1 and INIFAP 1 x ICS 95. The markers used were based on microsatellite (SSR): mTcIR mTcCIR 8 and mTcCIR 24 as well as inter simple sequence repeats (ISSR): 829 UBC, UBC 835 and UBC 841. The results showed 100% of polymorphic alleles between maternal and paternal parent. These markers allowed to identify 58 hybrids F_1 of a total of 61. According to the markers used and their corresponding values of polymorphic information content (PIC), these were informative, which guarantees that the markers used in this investigation are reliable and they allow to identify hybrids based on their kinship.

INTRODUCCIÓN

En México, el cacao (*Theobroma cacao* L.) se cultiva en 59 892 ha, mientras que en el estado de Tabasco se cuenta con una superficie establecida de 40 867 ha, Chiapas con 18 782 ha y Guerrero con 243 ha (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera/ Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación [SIAP/Sagarpa], 2016).

Para la industria chocolatera nacional, el cacao representa la materia prima para la elaboración del chocolate y su calidad ha sido preferida por esta industria (Barrón, Azpeitia, López & Mirafuentes, 2014). Sin embargo, desde la llegada de la “moniliasis” (*Moniliophthora roreri*) a México en el norte de Chiapas en febrero de 2005, ha provocado pérdidas en la producción del 40% (Phillips-Mora *et al.*, 2006). Este problema ha generado desaliento entre los productores por el desconocimiento del manejo de la enfermedad.

Recibido: 10 de agosto del 2016
Aceptado: 26 de septiembre del 2017

Palabras clave:

Cacao; marcadores moleculares; mejoramiento genético.

Keywords:

Cocoa; molecular markers; genetic improvement.

Cómo citar:

Azpeitia Morales, A., Gasca González, H. A., & Villordo Pineda, E. (2017). Relaciones de parentesco en híbridos F_1 de cacao (*Theobroma cacao* L.) por marcadores moleculares. *Acta Universitaria*, 27(6), 66-77. doi: 10.15174/au.2017.1552

* Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Km 1 Carretera Huimanguillo-Cárdenas, CP. 86 400. Huimanguillo, Tabasco. Correo electrónico: azpeitia20032003@yahoo.com.mx

** Universidad Politécnica de Guanajuato, Av. Universidad Sur 1001 Comunidad Juan Alonso.

^o Autor de correspondencia.

De la superficie cosechada en el año 2014 se ha reportado una disminución de la producción debido al abandono y derribó de las plantaciones en un 2.71% debido a la afectación de la “moniliasis” (Barrón *et al.*, 2014).

Este problema podría incrementarse y ocasionar una disminución de las zonas cultivadas, lo que provocaría indirectamente un deterioro ambiental por la disminución en la captura de carbono que proporciona este agroecosistema. Los efectos devastadores de este patógeno en cacao han sido dramáticos y documentados en diferentes países de América del Sur y Centroamérica (Phillips-Mora & Wilkinson, 2007).

De acuerdo a los reportes, la moniliasis tiene su origen entre Colombia y Ecuador. Existen reportes del año de 1817 en Colombia, sobre la aparición de la enfermedad en el oriente y centro del país (Phillips-Mora, Aime & Wilkinson, 2007), para el año de 1895 se registra el primer indicio de la presencia de una enfermedad cuya descripción coincide con la “moniliasis” (Suárez, 1982). Además de su dispersión en estos países, el hongo está presente en Venezuela, Perú, Panamá, Nicaragua, Costa Rica y Honduras, donde es uno de los principales factores que limitan el rendimiento hasta en un 40% de la producción de cacao en las áreas afectadas.

En estudios de resistencia a moniliasis, solamente el 0.3% de genotipos estudiados han mostrado resistencia a esta enfermedad (Debouck, Ebert, Barandiarán & Ramírez, 2008), por lo que representa una fuerte limitante del rendimiento para los agricultores (Jaimes & Aranzazu, 2010).

En los últimos 25 años de investigación en el mundo, se han identificado clones resistentes a la moniliasis con distinto origen genético y/o geográfico. Estos clones se han cruzado progresivamente para obtener variedades con niveles crecientes de resistencia en Costa Rica, aprovechando de esta forma el carácter predominante aditivo que tiene esta característica del cacao, estos estudios han adquirido recientemente relevancia mundial por ser la moniliasis una de las enfermedades más graves del cultivo de cacao que ha afectado a la zona productora de América y por su posible diseminación al continente Africano (Phillips-Mora, Arciniegas-Leal & Mata-Quirós, 2012).

En la actualidad existen genotipos reportados como resistentes a la moniliasis como ICS 95 (Trinidad y Tobago), UF 273 (Costa Rica), PA 169 (Perú), EET 233 (Ecuador) y EET183 (Ecuador); estos materiales fueron introducidos por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) en el año 2006 a México y han mostrado

producción de 0.7 kg de grano seco por árbol para el clon PA 169, 1 kg para el clon UF 273 y 1.5 kg en el clon ICS 95 y después de cinco años de evaluación han mostrado resistencia. Por su parte, el Centro Agronómico de Investigación y Enseñanza (CATIE), ha reportado la formación de híbridos denominados CATIE-R1, CATIE-R4, CATIE-R6, CC-137, ICS-95 T1 y el PMCT-58, con resistencia de al menos el 75% (Phillips-Mora *et al.*, 2012).

Por otra parte, se ha encontrado solo una resistencia de un tercio del 1%, es decir, 0.3% de 600 hibridaciones realizadas en el programa de mejoramiento genético del CATIE, de este estudio, después de 15 años de evaluación se seleccionaron seis clones trinitarios (CATIE-R1, CATIE R-4, CATIE R-6, CC-137, ICS-95 y el PMCT-58) de buena producción del orden de una tonelada/ha y resistencia del menos 75% a la moniliasis (Debouck *et al.*, 2008; Phillips-Mora *et al.*, 2012). De acuerdo con Somarriba *et al.* (2010), con polinizaciones manuales se tiene la ventaja de poder escoger los árboles que serán el padre y la madre de las semillas, por lo tanto se obtienen semillas híbridas de calidad cruzando los mejores árboles padre y madre. La generación de híbridos clonados permitiría producir cacao en ambientes infestados con moniliasis, en donde la única alternativa hasta hace poco era el abandono o cambio de actividad de las plantaciones (Phillips-Mora *et al.*, 2012); por ello es de suma importancia incorporar genes de resistencia a la moniliasis a genotipos mexicanos altamente productivos, pero adicionalmente es importante incluir en los programas de mejoramiento genético, la selección de híbridos por medio de la relación del parentesco por medio de marcadores moleculares, esto permitirá confirmar que los individuos corresponden a una familia de acuerdo a los progenitores utilizados (Schnell *et al.*, 2004).

Al respecto, un marcador genético es una diferencia fenotípica controlada genéticamente. Un marcador puede utilizarse con doble finalidad, para marcar o señalar el locus que controla la diferencia fenotípica y/o para marcar otro locus próximo que controle algún carácter de interés (Nuez & Carrillo, 2000). En cacao, los microsátélites o simples *loci* de repetición de secuencia (SSR, por sus siglas en inglés) han sido utilizados y fueron descritos por primera vez por Hamada, Petrino, & Kakunaga (1982) como secuencias cortas de ADN constituidas por motivos de 1 a 6 nucleótidos repetidos en tándem. Estas secuencias no se transcriben a ARN y las funciones que se les atribuye se incluyen la regulación génica y la de actuar como señales para la conservación génica y la recombinación (Jeffreys, Wilson & Thein, 1985; Victoria, Da Maia & De Olivera, 2011). Estos se encuentran en todo el genoma de la mayoría

de los eucariotas y en menor medida en procariotas y pueden variar desde uno hasta seis nucleótidos de longitud y se clasifican como mono-, di-, tri-, tetra-, penta- y hexanucleótido. Ellos están repetidos en tándem (generalmente 5-20 veces) en el genoma con una longitud de repetición mínimo de 12 pares de bases (Wang, Weber, Zhong & Tanksley, 1994).

Por otra parte, los *Inter Simple Sequence Repeats* (ISSRs), descrita por Zietkiewicz, Rafalski & Labuda (1994), son un tipo de marcador genético que permite obtener los niveles de variación en las regiones microsatélite que se encuentran dispersas en varios genomas, particularmente el nuclear. Estas regiones consisten en repeticiones en tándem de motivos simples como (CT)*n* o (CA)*n*, ubicadas entre secuencias no repetitivas del genoma nuclear eucarionte (Zietkiewicz *et al.*, 1994). Dentro del programa de mejoramiento genético de cacao del INIFAP y derivado de la investigación de resistencia a moniliasis se desarrollaron una serie de cruzas usando como progenitores masculinos: ICS 95, PA 169 y UF 273 y como madres se usaron los genotipos INIFAP 1, INIFAP 8 e INIFAP C y, a su vez, se realizaron cruzas recíprocas con énfasis a crear nuevos híbridos resistentes a esta enfermedad (Barrón *et al.*, 2014). Los criterios de selección una vez que inicien su producción (tres años) es con base a su resistencia en campo, nivel de resistencia por inoculaciones controladas en frutos, búsqueda de genes asociados a la resistencia y rendimiento, principalmente. Sin embargo, es imprescindible identificar los híbridos F₁ de estas poblaciones. Los híbridos F₁ en cacao a pesar de que provienen de una familia (fruto) y son producto de una fecundación controlada, sus individuos presentan diferencias entre ellos, por lo que es importante identificar a los individuos que serán sometidos a evaluación en campo para tener la certeza de su proge y no evaluar individuos desconocidos. Con base a lo anterior, el presente trabajo tuvo como objetivo establecer relaciones de parentesco entre híbridos F₁ de cacao, producto de las cruzas ICS 95 × INIFAP 1 e INIFAP 1 × ICS 95.

MATERIALES Y MÉTODOS

La formación de híbridos se desarrolló de acuerdo al protocolo descrito por Barrón *et al.* (2014). Las hibridaciones se realizaron desde febrero de 2012 y finalizaron en agosto de 2013 en el Campo Experimental Huimanguillo, perteneciente al INIFAP. Este campo experimental se localiza en el estado de Tabasco, en el km 1 de la carretera Huimanguillo-Cárdenas, sus coordenadas son 17°51'04.52"N 93°23'46.96" O, a una elevación de 20 msnm. En esta zona se cuenta con clima cálido húmedo, con temperatura anual de 25 °C

y con una precipitación pluvial de 2200 mm; los suelos son tipo gleysoles, acrisoles y fluvisoles.

Material Biológico

La colecta de hojas jóvenes de cacao se realizó de la plantación de híbridos establecida en el Campo Experimental Huimanguillo, INIFAP, México; las cuales fueron enviadas para su análisis a la unidad de biotecnología del INIFAP localizada en el Campo Experimental Bajío. Se les asignó un número para identificarlas durante las pruebas de laboratorio y se almacenaron a -20 °C. En este trabajo se reporta únicamente la información generada de las cruzas ICS 95 × INIFAP 1 (INI 1, 24 híbridos) INIFAP 1 × ICS 95 (37 híbridos), dando un total de 61 híbridos analizados. Estos híbridos corresponden a plantas con mayor desarrollo debido a que fueron las primeras cruzas realizadas a principios de febrero de 2012.

Aislamiento de ADN

A partir del tejido foliar se realizó el aislamiento de ADN de acuerdo al método descrito por Doyle & Doyle (1987).

Cuantificación y Calidad del ADN

Los aislados del ADN de las diferentes muestras de hojas de cacao se analizaron empleando el NANO-DROP 8000 (Thermo Fisher Scientific Inc., 81 Wyman Street Waltham, MA 02454 USA). Para determinar su concentración en ng/μL y su relación de absorbancia A260/A280 (tasa de absorbancias a 260 nm sobre 280 nm). Se estableció como rango de pureza del DNA entre los valores de 1.8 a 2.0 y una concentración mínima requerida de > 200 ng/μL, a partir de estas se realizó diluciones a 10 ng/μL. La determinación de la calidad e integridad del ADN se llevó a cabo en electroforesis en gel de agarosa. La concentración fue de 1.5% en buffer SB 1X. La agarosa se fundió a 100 °C, cuando bajó la temperatura necesaria para su manipulación se vertió y se dejó solidificar en la charola de electroforesis con los peines colocados. En los pocillos del gel se cargaron 10 μL de la muestra a 10 ng/μL previamente mezclados con 4 μL de Biotina-orange. En cada extremo se cargó 4 μL de marcador de peso λ (100 ng) con 2 μL de Biotina-orange. Se corrió el gel a 200 voltios y se capturó la imagen del DNA en el foto documentador BIO-RAD (Bio-Rad Laboratories, 1000 Alfred Nobel Drive Hercules, CA 94 547 USA).

Microsatélites

La selección de los SSR se realizó de acuerdo al número de alelos y el Contenido de Información Polimórfica (PIC, por sus siglas en inglés) con las siguientes

condiciones: menor número de alelos y que su PIC sea cercano a 1, lo que nos indica que es un marcador altamente informativo. Los ISSR se seleccionaron de acuerdo a los resultados obtenidos por Chia-Wong, García, Suni & Eskes (2011) (tabla 1). El cual utilizó 63 ISSR de los cuales 13 obtuvo resultados sobresalientes.

Selección de los SSR e ISSR para las cruza

Para llevar a cabo la selección de los marcadores por cruza (ICS 95 × INIFAP1 e INIFAP 1 × ICS 95), los progenitores fueron amplificados por medio de PCR de acuerdo a su temperatura de alineamiento de cada marcador. La PCR fue llevada a cabo en un volumen final de 20 µL por reacción: 1X Taq Buffer, 0.2 mM de dNTPs, 3 mM de MgCl₂, 1 U Taq polimerasa (Invitrogen, Life Technologies Corporation, 5791 Van Allen Way, Carlsbad, CA 92 008 USA), 1 µM de marcador y 20 nanogramos (ng) de ADN. Para correr la PCR, se utilizó un termociclador Veriti® Thermal Cycler (Life Technologies Corporation, 5791 Van Allen Way, Carlsbad, CA 92008 USA) programado de acuerdo a la temperatura de alineamiento de cada marcador. Los fragmentos amplificados con 8 µL de Biotina-orange se separaron mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1.5% en buffer SB 1X. Se cargó 250 ng con marcador de peso molecular (1 Kb plus). Se corrió a 160 voltios por 90 min y se capturó la imagen del ADN en el fotodocumentador BIO-RAD (Bio-Rad Laboratories, 1000 Alfred Nobel Drive Hercules, CA 94 547 USA). Posteriormente, se obtuvieron los pesos moleculares mediante el programa Kodak Digital Science 1D.

Tabla 1.
Lista de los SSR e ISSR utilizados para el estudio molecular de las cruza de *Theobroma cacao* L.

Marcador	Nombre	Pb	Número de Alelos	PIC	Cita
SSR	mTcCIR8	288-304	6	0.92	Saunders Mischke, Leamy & Hemeida (2004)
SSR	mTcCIR24	185-203	7	0.95	Cryer, Fenn, Turnbull & Wilkinson (2006)
SSR	mTcCIR6	222-247	9	0.96	Opoku, et al. (2007)
SSR	mTcCIR26	272 - 308	8	0.85	Martínez (2007)
ISSR	UBC829				Chia-Wong et al. (2011)
ISSR	UBC830				Chia-Wong et al. (2011)
ISSR	UBC835				Chia-Wong et al. (2011)
ISSR	UBC841				Chia-Wong et al. (2011)

Fuente: Elaboración propia.

Análisis de resultados por el método de agrupamiento

Para el análisis de los resultados, la información genética se decodificó en matrices binarias de presencia / ausencia del total de los alelos presentes tanto en los progenitores como en la descendencia para cada cruza estudiada. Se asignó el número 1 (uno) si en el individuo esta presente el alelo y 0 (cero) para la ausencia. Se les asignó el valor de 9 (nueve) a las amplificaciones considerados como datos no definidos o datos perdidos. Con el programa de NTSYS-pc 2.0 (*Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, Applied Biostatistics Inc., NY, EUA*) (Rohlf, 1997) se generó una matriz de similitud con el algoritmo SimQual y el coeficiente de similaridad (SM). Para la identificación de los híbridos se tomó como indicador $\leq 90\%$ de similitud con respecto al parental materno ♀ y para las autofecundaciones $> 90\%$. Las semejanzas genéticas a nivel de ADN fueron agrupadas por el método de *Un-weighted Pair-Group Method using Arithmetic Averages* (UPGMA) en la opción de SAHN, para de ahí derivar la formación del dendrograma de similaridad entre los alelos del estudio.

Análisis molecular

Método de agrupamiento

Este fue realizado de acuerdo a Skroch, Twang & Nienhuis (1992), de donde se obtuvo una matriz de disimilaridad o distancias genéticas que contiene las distancias entre todos los posibles pares de individuos, posteriormente se graficó el dendrograma a partir de la matriz de disimilaridad.

Contenido de Información Polimórfica (PIC)

El valor PIC toma en cuenta los alelos polimórficos de una población para detectar su polimorfismo (Anderson, Churchill, Autrique, Tanksley & Sorrells, 1993). Los valores PIC para los alelos considerados altamente informativos tuvieron un valor $PIC > 0.50$; razonablemente informativos $0.50 > PIC > 0.25$; y con baja confianza informativa $PIC < 0.25$ (Botstein, White, Skolnick & Davis, 1980). En el presente trabajo se usó la versión simplificada para el cálculo del PIC de Lagercrantz, Ellegren & Anderson (1993), en donde se asume que los alelos son homocigotos y la fórmula usada para calcular el PIC fue: $PIC = 1 - \sum p_i^2$, donde p_i es la frecuencia de cada alelo (Warburton & Crossa, 2002). Por medio de marcadores de ADN tipo SSR e ISSR y a través de los algoritmos SimQual (matriz de similitud genética) y UPGMA (agrupamiento por similitudes) se desarrolló un dendrograma para cada cruza. Con la matriz de similitud genética y el dendrograma se

identificaron los individuos que se consideran como autofecundaciones, así como los individuos en cada población que presumiblemente son segregantes derivados de la cruce de sus respectivos progenitores, siendo estos los individuos los que el programa de mejoramiento de cacao considerará continuar en las investigaciones en el desarrollo de variedades resistentes a la moniliasis.

RESULTADOS

Análisis de los microsatélites (simples loci de repetición de secuencia, SSR)

En la figura 1, se presentan las amplificaciones de los marcadores con cada uno de los progenitores y en la tabla 2, se muestran los pesos moleculares de los alelos de los progenitores en mTcCIR 6 (A), mTcCIR 8 (B), mTcCIR 24 (A) y mTcCIR 26 (B).

Análisis de las secuencias simples inter repetidas (ISSR)

En la figura 2 se presentan las amplificaciones de los marcadores UBC 829 (A), UBC 830 (B), UBC 835 (A) y UBC 841 (B) con cada uno de los progenitores.

En la tabla 3 se muestran los pesos moleculares de los alelos de los progenitores en UBC 829, UBC 830, UBC 835 y UBC 841.

Los marcadores utilizados en este estudio a base de los microsatélites y *secuencia simples inter repetidas* se encontró que los marcadores SSR: mTcCIR 6, mTcCIR 8 y mTcCIR 24; así como los ISSR: UBC 829, UBC 835 y UBC 841 mostraron el 100% de alelos polimórficos entre los parentales materno y paterno de cada cruce, solamente el marcador mTcCIR 26 no fue detectado.

El Contenido PIC detectó el polimorfismo dentro de las cruces analizadas y este parámetro permitió la identificación de híbridos en F₁. En la tabla 4 se presentan los valores PIC de los marcadores en cada población de *Theobroma cacao* L. Los valores PIC para los SSR se consideran como razonablemente informativos y los ISSR se consideran altamente informativos (PIC > 0.50).

Análisis de la población ICS-95 ♀ × INI-1 ♂ y contenido PIC

Con base en el dendrograma (figura 3), se definieron tres grupos, A B y C, donde en el grupo A se encuentra el parental materno (ICS-95-♀) y sus descendientes 41, 59, 92, 241, 338 y 355. De acuerdo al índice de similitud (tabla 5) se determinó entre el 50% y 56% de identidad genética de los descendientes con respecto a ICS-95-♀, ya que presentan aproximadamente la mitad de la información genética para el parental paterno

(INI-1-♂). Cabe señalar que el descendiente 241 presentó el 72% de identidad con respecto a ICS-95-♀. En el grupo B, en el dendrograma, se agrupan el parental paterno (INI-1-♂) y los descendientes 58, 179, 183 y 249, los cuales presentan el 85% de similitud genética con respecto a INI-1-♂, lo que nos indica que estos descendientes son producto de la cruce artificial entre los parentales ICS-95 ♀ × INI-1 ♂.

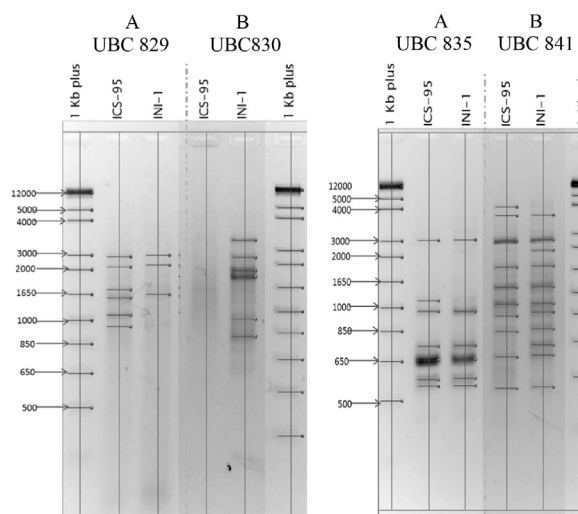


Figura 1. Imagen de los gels con la amplificación de los progenitores con los microsatélites mTcCIR 6 (A) y mTcCIR 8 (B) en la parte izquierda y la amplificación de los progenitores con los microsatélites mTcCIR 24 (A) y mTcCIR 26 (B) en la parte derecha. En cada carril se cargó 17 µL de PCR de cada progenitor. Se corrió a 160 volts en buffer SB 1X. En el primer carril se observa la escala de tamaños en pares de base del marcador de peso 1 KB plus.

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 2. Pesos moleculares de los alelos de los progenitores en mTcCIR 6 (A), mTcCIR 8 (B), mTcCIR 24 (A) y mTcCIR 26 (B). Los pesos moleculares marcados con * son alelos polimórficos.

Marcador	Genotipos	
	ICS-95	INI-1
mTcCIR 6		
	905*	857*
	857*	
mTcCIR 8		
	943*	2169
	524	1166
		902*
		513
mTcCIR 24		
	670*	710*
		660*
mTcCIR 26		
	860	850

Fuente: Elaboración propia.

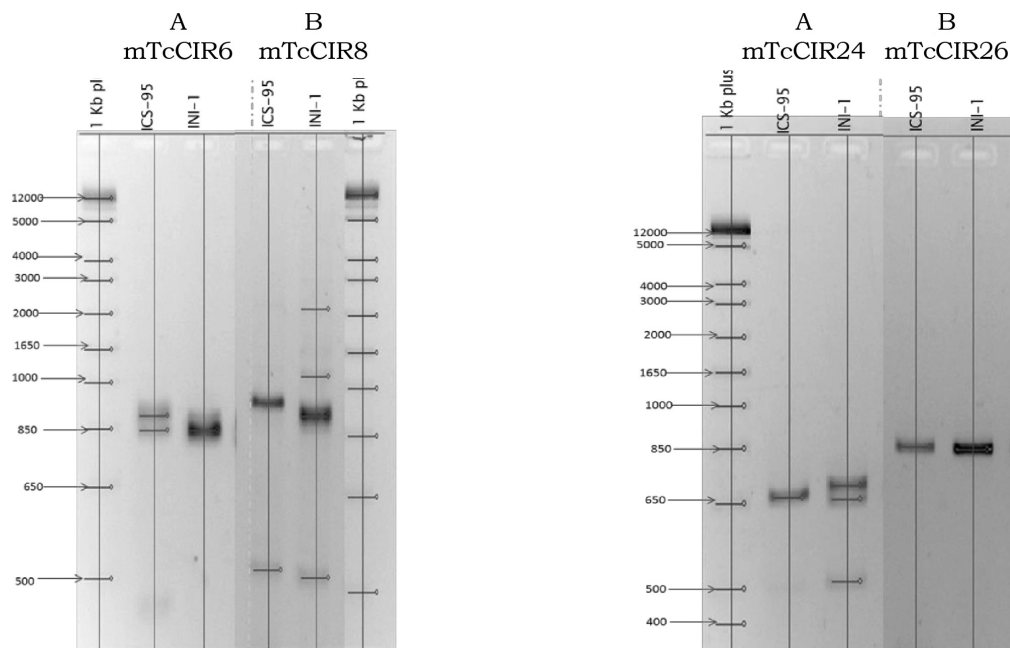


Figura 2. Imagen de gel con la amplificación de los progenitores con los ISSR UBC 829 (A) y UBC 830 (B) en la parte izquierda y en la parte derecha se observa la imagen con los ISSR UBC 835 (A) y UBC 841 (B). En cada carril se cargó 17 µL de PCR de cada progenitor. Se corrió a 160 volt en buffer SB 1X. En el primer carril se observa la escala de tamaños en pares de base del marcador de peso 1 KB plus.

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 3.

Peso molecular de los alelos de los progenitores en UBC 829, UBC 830, UBC 835 y UBC 841. Los pesos moleculares marcados con * son alelos polimórficos.

Genotipo	Marcador (Pb)				
	UBC 829	UBC 830	UBC 835	UBC 841	UBC 841
ICS-95	2725.1*	-	2761.4*	4081.5	4081.5
	2088.3*	-	1064.4	3718.2	3718.2
	1666.2*	-	921*	2722.2*	2722.2*
	1475.5*	-	691.8*	1770.4*	1770.4*
	1053.5	-	611.8*	1333.4*	1333.4*
	927.1	-	582.1	1005*	1005*
Inifap 1 (INI 1)			556.6	891.3*	891.3*
				786.8	786.8
				635.8	635.8
				548.1	548.1
	2833.3*	3380.2*	2800.5*	3742.4	3742.4
	2152.2*	2671.1*	921*	2800.5*	2800.5*
	1555.6*	1949.5*	695.8*	2191	2191
		1862*	619.8*	1792.4*	1792.4*
		992.3	587.7	1353.2*	1353.2*
		860.3	559.4	1016.9*	1016.9*
			916.1*	916.1*	
			806.7	806.7	
			699.8	699.8	
			643.8	643.8	
			553.8	553.8	

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 4.
Valores PIC de los marcadores en cada población de *Theobroma cacao* L.

Población	Marcador						
	mTcCIR 6	mTcCIR 8	mTcCIR 24	UBC 829	UBC 830	UBC 835	UBC 841
ICS-95 X INI-1	0.42	0.49	0.48	0.73		0.74	0.71
INI-1 X ICS-95	0.47	0.50	0.47	0.87		0.75	0.83

Fuente: Elaboración propia.

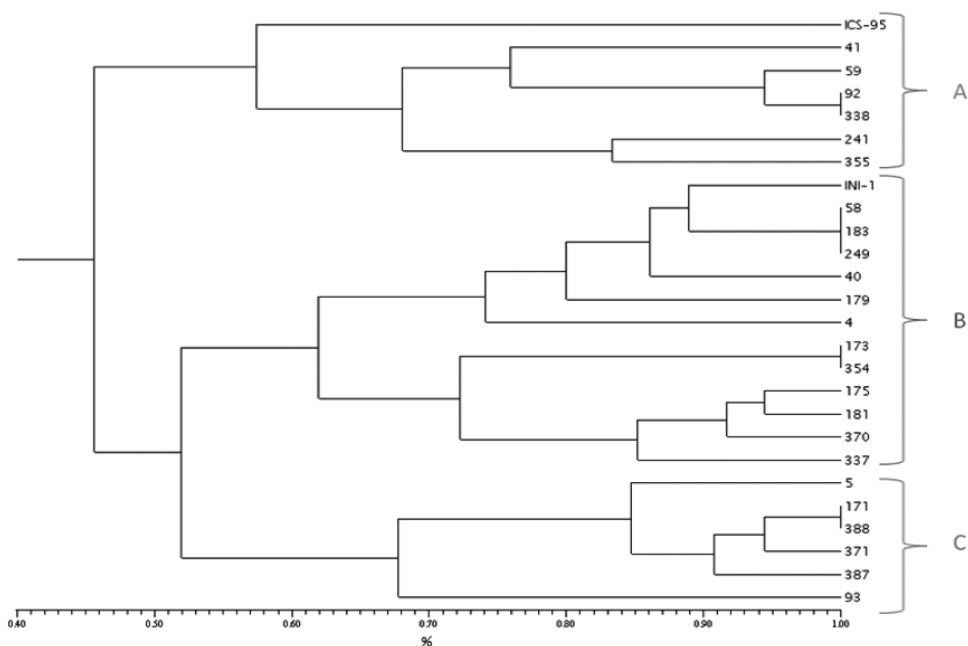


Figura 3. Dendrograma de similitud genética de la población ICS-95 X INI-1.
Fuente: Elaboración propia.

Tabla 5.
Matriz de similitud en híbridos procedentes de la cruce ICS-95 X INI-1.

Híbrido	Índice de similitud genética		Grupo de similitud		
	ICS 95	INIFAP 1	ICS 95	INIFAP 1	
4	0.28	0.83	A		
5	0.56	0.56			C
40	0.33	0.78		B	
41	0.56	0.56	A		
58	0.22	0.89		B	
59	0.50	0.61	A		

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 5.
 Continuación.

Híbrido	Índice de similitud genética		Grupo de similitud		
	ICS 95	INIFAP 1	ICS 95	INIFAP 1	
92	0.56	0.56	A		
93	0.56	0.56			C
171	0.39	0.72			C
173	0.67	0.44		B	
175	0.39	0.61		B	
179	0.11	0.89		B	
181	0.44	0.67		B	
183	0.22	0.89		B	
241	0.72	0.39	A		
249	0.22	0.89		B	
337	0.33	0.78		B	
338	0.56	0.56	A		
354	0.67	0.44		B	
355	0.56	0.56	A		
370	0.50	0.61		B	
371	0.44	0.67			C
387	0.39	0.72			C
388	0.39	0.72			C

Fuente: Elaboración propia.

Finalmente, los descendientes que se agrupan en el tercer conjunto (grupo C) presentan un rango de identidad entre el 39% - 56% con respecto a INI-1-♂, los que se consideran como híbridos de la cruce. Con base en estos resultados, se considera que todos los segregantes de esta población son derivados de la cruce de los parental ICS-95-♀ × INI-1-♂.

En la tabla 6 se observa el indicador PIC para los marcadores moleculares utilizados en el estudio de la población ICS-95-♀ × INI-1-♂, donde los ISSR se consideran altamente informativos (PIC>0.50), ya que presentan un rango del 0.71 y 0.74 de información polimórfica. Mientras que los SSR se consideran como razonablemente informativos, los cuales están entre los valores 0.42 y 0.49.

Tabla 6.
 Valores PIC de los marcadores utilizados en la población ICS-95 X INI-1.

Población	Marcador	PIC
ICS-95 X INI-1	mTcCIR 6	0.42
	mTcCIR 8	0.49
	mTcCIR 24	0.48
	UBC 829	0.73
	UBC 835	0.74
	UBC 841	0.71

Fuente: Elaboración propia.

Análisis de la población INI-1-♀ × ICS-95-♂ y contenido PIC

En base al dendrograma, esta población se dividió en dos grandes grupos, A y B. En la figura 4 se muestra el dendrograma del grupo A donde se encuentra el parental materno (INI-1-♀), en el que podemos definir dos subgrupos A₁ y A₂.

En la tabla 7 se muestran los individuos pertenecientes a los subgrupos A₁ y A₂. En el subgrupo A₁ presentan un rango entre el 71% - 92% de similitud con respecto a INI-1-♀, de los cuales los individuos 306 y 259 se consideran como autofecundaciones, ya que presentan el 92% de similitud de su información genética con respecto a INI-1-♀; mientras que el resto de los segregantes son híbridos.

El subgrupo A₂, presenta un rango del 42% - 71% de similitud con respecto al parental materno, los cuales se consideran como híbridos (tabla 7).

En el grupo B se encuentra el parental paterno (ICS-95-♂), donde podemos definir dos subgrupos B₁ y B₂ (figura 5).

Los segregantes del subgrupo B₁ presentan un rango del 58% - 96% con respecto a ICS-95-♂, donde los descendientes 45, 303 y 319 presentan el 100%, 96% y 92% respectivamente, por lo tanto, fueron considerados como autofecundaciones. Los individuos del subgrupo B₂ presentan un rango entre el 0.46 y 0.75% de similitud con respecto a ICS-95-♂ (tabla 7).

En la tabla 8 se observa el valor PIC de los marcadores moleculares de la población INI-1-♀ × ICS-95-♂, donde los SSR se consideran como razonablemente informativos, los cuales presentan un rango 0.47 y el 0.50 de información polimórfica, cumpliendo con la condición de: 0.5 > PIC > 0.25. Mientras que los ISSR UBC 829, UBC 835 y UBC 841 se consideran como altamente informativos.

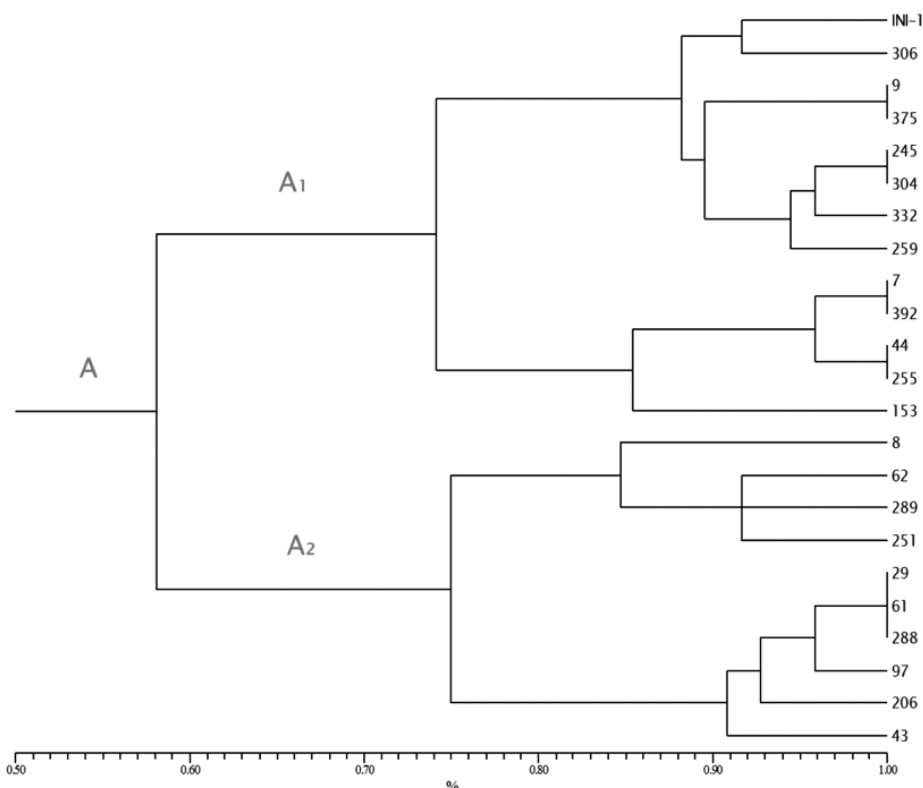


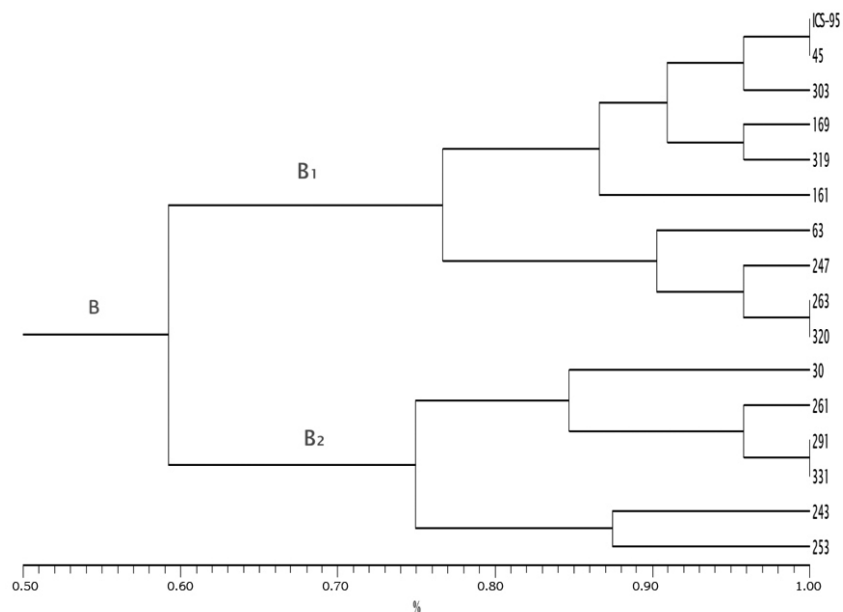
Figura 4. Dendrograma de similitud genética del grupo A en la población INI-1 X ICS-95. Fuente: Elaboración propia.

Tabla 7.
 Matriz de similitud genética del grupo A (A_1 y A_2) y B (B_1 y B_2) en la población INI-1 X ICS-95¹.

A					
Individuo	A_1		Individuo	A_2	
	INI-1 (%)	ICS-95 (%)		INI-1 (%)	ICS-95 (%)
7	0.75	0.29	8	0.71	0.33
9	0.83	0.21	29	0.5	0.54
44	0.71	0.33	43	0.5	0.54
153	0.71	0.33	61	0.5	0.54
245	0.88	0.17	62	0.58	0.46
255	0.71	0.33	97	0.46	0.58
259	0.92	0.13	206	0.42	0.63
304	0.88	0.17	251	0.58	0.46
306	0.92	0.13	288	0.5	0.54
332	0.83	0.21	289	0.67	0.38
375	0.83	0.21			
392	0.75	0.29			
B					
Individuo	B_1		B_2		ICS-95 (%)
	INI-1 (%)	ICS-95 (%)	INI-1 (%)	ICS-95 (%)	
45	0.04	1	30	0.38	0.67
63	0.21	0.83	253	0.48	0.56
161	0.21	0.83	261	0.33	0.71
169	0.08	0.88	291	0.38	0.67
243	0.46	0.58	320	0.29	0.75
247	0.33	0.71	331	0.38	0.67
263	0.29	0.75			
303	0.08	0.96			
319	0.13	0.92			

¹ Autofecundación

Fuente: Elaboración propia.


Figura 5. Dendrograma de similitud genética del grupo B en la población INI-1 X ICS-95.

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 8.
Valores PIC de los marcadores utilizados en la población INI-1 X ICS-95.

Población	Marcador	PIC
INI-1 X ICS-95	mTcCIR 6	0.47
	mTcCIR 8	0.50
	mTcCIR 24	0.47
	UBC 829	0.87
	UBC 835	0.75
	UBC 841	0.83

Fuente: Elaboración propia.

DISCUSIÓN

El desarrollo de cruzamientos controlados para estudios genéticos es esencial para el mejoramiento genético del cacao y los resultados hacen necesario confirmar que la descendencia F_1 corresponda a híbridos de padre y madre conocidos. En la actualidad, el uso de marcadores moleculares hace posible esta identificación, la cual ha sido demostrada para confirmación parental de diferentes accesiones en bancos de germoplasma (Motilal & Boccara, 2004; Turnbull *et al.* 2004) y de cruzas importantes como SCA6 × ICS1 para la resistencia a la enfermedad escoba de bruja *Moniliophthora perniciosa* (Stahel) Aime & Phillips-Mora (Schnell *et al.* 2004). La identificación de híbridos verdaderos con determinado grado de parentesco a su progenitor femenino y masculino permitirá su caracterización y evaluación en campo, sin que involucre trabajo de investigación con falsos híbridos. Los marcadores utilizados en este estudio a base de los microsátelites y secuencia simples interrepetidas se encontró que los SSR: mTcCIR 8 y mTcCIR 24 así como los ISSR: UBC 829, UBC 835 y UBC 841 mostraron el 100% de alelos polimórficos entre los parentales materno y paterno de cada craza, solamente el marcador mTcCIR 24 no fue detectado, estos resultados son similares a lo reportado por Zhang *et al.* (2009) y Guiltinan (2007), quienes han señalado que los marcadores SSR son los más aceptados y confiables para la caracterización molecular del cacao y de utilidad para establecer relaciones de parentesco en cruzamientos como se ha observado en el presente trabajo. Los SSR se han estado utilizando para caracterización de germoplasma del cacao (Zhang *et al.*, 2009) y su aplicación de estos marcadores ha permitido entender mejor la variación genética.

En el presente trabajo fue posible identificar 58 híbridos verdaderos con determinado grado de parentesco a su progenitor femenino y masculino y determinar su índice de similitud genética por medio de microsátelites e ISSR, sin embargo, se observó mayor poliformismo utilizando los ISSR. El elevado poliformismo que

presentan estos marcadores y la posibilidad de poder detectar ambos alelos paternos y maternos, los hace muy útiles para identificaciones individuales, ya que resulta muy poco probable que dos individuos elegidos al azar, si son analizados para una serie de marcadores, compartan todos sus alelos (Aranguren-Méndez, Román-Bravo, Isea, Villasmil & Jordana, 2015).

Se han reportan que los valores PIC de los SSR son altamente informativos con un rango del 0.92-0.96 (Sauders *et al.*, 2004; Cryer *et al.*, 2006; Opoku *et al.*, 2007). En este estudio se encontraron valores PIC de 0.42 a 0.49 y de 0.47 a 0.50 en las cruzas ICS 95 × INI 1 y su craza recíproca respectivamente, estos valores diferenciales se debe básicamente al acervo genético entre el trabajo de los autores citados y el presente estudio. El análisis de 61 descendientes de cacao realizado en este trabajo, provenientes de cruzas controladas y con el empleo de los SSR e ISSR ha permitido conocer su similitud genética de estos a sus progenitores masculino o femenino, lo cual representa un avance importante en el mejoramiento genético del cacao en México para avanzar en el proceso de obtención de híbridos para resistencia a moniliasis.

CONCLUSIONES

Con base en estos resultados, se considera que todos los segregantes de la población ICS 95 × INI 1 son derivados de la craza. El indicador PIC para los marcadores moleculares utilizados en el estudio de la población ICS-95 × INI-1, específicamente para los ISSR se consideraron altamente informativos (PIC > 0.50), ya que presentan un rango del 0.71 y 0.74 de información polimórfica. Mientras que los SSR se consideran como razonablemente informativos, los cuales están entre los valores 0.42 y 0.49. Con referencia a la craza INI 1 × ICS 95, los individuos 45, 306 y 259 se consideraron como autofecundaciones, ya que presentan el 100%, 92%, respectivamente de similitud de su información genética con respecto a INI-1-♀. Con la utilización de microsátelites e ISSR fue posible identificar 58 híbridos verdaderos.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt) FOMIX-CCYTET y Gobierno del estado de Tabasco a través del proyecto con clave TAB-2010-C20-144013.

REFERENCIAS

- Anderson, J. A., Churchill, G. A., Autrique, J. E., Tanksley S. D., & Sorrells, M. E. (1993). Optimizing parental selection for genetic linkage maps. *Genome*, 36(1), 181-186.

- Aranguren-Méndez, J. A., Román-Bravo, R., Isea, W., Villasmil, Y., & Jordana, J. (2015). Los microsatélites (STR's), marcadores moleculares de ADN por excelencia para programas de conservación: Una revisión. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal*, 13(1), 30-42.
- Barrón García, Y. P., Azpeitia Morales, A., López Andrade P. A., & Mirafuentes-Hernández, F. (2014). Metodología adaptada para la formación de híbridos F₁ de cacao (*Theobroma cacao* L.) en Tabasco. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 5(5), 765-777.
- Botstein, D., White, R. L., Skolnick, M., & Davis, R. W. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*, 32(2), 314-331.
- Chia-Wong, J. A., Garcia, C. L., Suni, N. M., & Eskes, B. (2011). Characterization of *Theobroma cacao* L. collection at Tingo Maria using ISSR molecular markers. *Revista Aporte Santiaguino*, 4(2), 195-202.
- Cryer, N. C., Fenn, M. G. E., Turnbull, C. J., & Wilkinson, M. J. (2006). Allelic size standards and reference genotypes to unify international cocoa (*Theobroma cacao* L.) microsatellite data. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 53(8), 1643-1652.
- Debouck, D., Ebert, A., Barandiarán, E., & Ramírez, M. (2008). La importancia de la utilización de la diversidad genética vegetal en los programas de investigación agrícola en América Latina. *Recursos Naturales y Ambiente*, 53, 46-53.
- Doyle, J. J., & Doyle, J. L. (1987). A rapid ADN isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19(1), 11-15.
- Guiltinan, M. J. (2007). Cacao. In: Pua E.C. & Davey M.R. (Eds.) *Biotechnology in Agriculture and Forestry. Transgenic Crops V. Section III.2*, 60. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.
- Hamada, H., Petrino, M. G., & Kakunaga, T. (1982). A novel repeated element with Z-ADN-forming potential is widely found in evolutionary diverse eukaryotic genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79(21), 6465-6469.
- Jaimes, Y., & Aranzazu, F. (2010). Manejo de las enfermedades del cacao (*Theobroma cacao* L.) en Colombia con énfasis en monilia (*Moniliophthora roreri*). Colombia: Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (CORPOICA).
- Jeffreys, A. J., Wilson, V., & Thein, S. L. (1985). Individual-specific 'finger-prints' of human ADN. *Nature*, 316, 76-79.
- Lagercrantz, U., Ellegren, H., & Anderson L. (1993). The abundance of various polymorphic microsatellite motifs differs between plants and vertebrates. *Nucleic Acids Research*, 21(5), 1111-1115.
- Martínez, W. J. (2007). Caracterización morfológica y molecular del Cacao Nacional Boliviano y de selecciones élites del Alto Beni, Bolivia. Tesis, Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE). Turrialba, Costa Rica.
- Motilal, L. A., & Boccara, M. (2004). Screening and evaluation of SSR primers in gel systems for the detection of off-types in cocoa field. *Ingenic Newsletter*, 9, 21-24.
- Nuez, F., & Carrillo, J. M. (2000). Los marcadores genéticos en la mejora vegetal. España: Editorial Universidad Politécnica de Valencia. Sociedad Española de Ciencias Hortícola.
- Opoku, S. Y., Bhattacharjee, R., Kolesnikova-Allen, M., Motamayor, J. C., Schnell I. R., Ingelbrecht, I., Enu-Kwesi, L., & Adu-Ampomah, Y. (2007). Genetic Diversity in Cocoa (*Theobroma cacao* L.) Germplasm Collection from Ghana. *Journal of Crop Improvement*, 20(1-2), 39-40.
- Phillips-Mora, W., Arciniegas-Leal, & Mata-Quirós, A. (2012). Catálogo de clones de cacao seleccionados por el CATIE para siembras comerciales. Costa Rica: Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE).
- Phillips-Mora, W., Aime, M. C., & Wilkinson, M. J. (2007). Biodiversity and biogeography of the cacao (*Theobroma cacao*) pathogen *Moniliophthora roreri* in Tropical America. *Plant Pathology*, 56(6), 911-922.
- Phillips-Mora, W., Coutiño, A., Ortiz, G. F. López, A. P., Hernandez, J., & Aime, M. C. (2006). First report of *Moniliophthora roreri* causing frosty pod rot ("moniliasis" disease) of cocoa in México. *Plant Pathology*, 55(4), 584.
- Phillips-Mora, W., & Wilkinson, M. J. (2007). Frosty pod of cacao: a disease with a limited geographic range but unlimited potential for damage. *Phytopathology*, 97(12), 1644-1647.
- Rohlf, F. J. (1997). NTSYS-pc numerical taxonomy and multivariate analysis system version 2.1 manual. New York: Applied Biostatistics.
- Saunders, J., Mischke, S., Leamy, E., & Hemeida, A. (2004). Selection of international molecular standards for DNA fingerprinting of *Theobroma cacao*. *Theoretical and Applied Genetics*, 110(1), 41-47.
- Schnell, R. J., Heath, M. A., Johnson, E. S., Brown, J. S., Olano, C. T., & Motamayor, J. C. (2004). Frequency of off-type progeny among the original ICS 1 x SCA6 reciprocal families and parental clones used for disease resistance selection in Trinidad. *Ingenic Newsletter*, 9, 34-39.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera/Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. (SIAP/ Sagarpa). (2016). Anuario estadístico de la producción agrícola. Recuperado el 18 de marzo de 2017 de <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-producción-agrícola-por-cultivo>
- Skroch, P., Tivang, J., & Nienhuis, J. (1992). Analysis of Genetic Relationships Using RAPD Marker Data. Crop Science Society of America -American Society for Horticultural Science - American Genetic Association Minneapolis, Mn.
- Somarriba, Chávez, E., Cerda Bustillos, R., Astorga Domian, C., Quesada Chaverri, F., & Vásquez Morera, N. (2010). Reproducción sexual del cacao. Costa Rica: Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE).
- Suárez, C. C. (1982). El problema de la moniliasis y su combate en el Ecuador. En: Enríquez, G. A. (Ed.). La moniliasis de cacao, 70-78. Costa Rica: Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE).
- Turnbull, C. J., Butler, D. R., Cryer, N. C., Zhang, D., Lanaud, C., Daymond, A. J., Ford, C. S., Wilkinson, M. J., & Hadley, P. (2004). Tackling mislabeling in cocoa germplasm collections. *Ingenic Newsletter*, 9, 8-11.
- Victoria, F. C., Da Maia, L. C., & De Olivera, A. C. (2011). In silico comparative analysis of SSR markers in plants. *BMC Plant Biology*, 11(1), 11-15.
- Warburton, M., & Crossa, J. (2002). Data analysis in the CIMMYT applied biotechnology center for fingerprinting and genetic diversity studies. México: Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT).
- Wang, Z., Weber, J., Zhong, G., & Tanksley, S. (1994). Survey of short tandem DNA repeats. *Theoretical and Applied Genetics*, 88, 1-6.
- Zhang, D., Mischke, S., Johnson, E. S., Phillips-Mora, W., & Meinhardt, L. (2009). Molecular characterization of an international cacao collection using microsatellite markers. *Tree Genetics & Genomes*, 5, 1-10.
- Zietkiewicz, E., Rafalski, A., & Labuda, D. (1994). Genome fingerprinting by simple sequence repeats (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 20(2), 176-183.