

CENTRO AGRONOMICO TROPICAL DE INVESTIGACION Y
ENSEÑANZA
SUBDIRECCION GENERAL ADJUNTA DE ENSEÑANZA
PROGRAMA DE POSGRADO

USO DE MARCADORES MOLECULARES PARA LA CONSTRUCCION DE UN
MAPA DE LIGAMIENTO GENETICO EN CACAO *Theobroma cacao* L.

Tesis sometida a la consideración del Comité Técnico Académico del Programa de Estudios de Posgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, para optar al grado de

M A G I S T E R S C I E N T I A E

Por :

HELGA RODRIGUEZ RODRIGUEZ

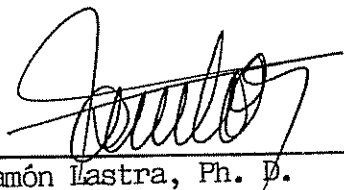
Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza
Turrialba, Costa Rica

1992

Esta tesis ha sido aceptada, en su presente forma, por la coordinación del Programa de Estudios de Posgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales Renovables del CATIE aprobada por el Comité Asesor del estudiante como requisito parcial para optar al grado de:

MAGISTER SCIENTIAE

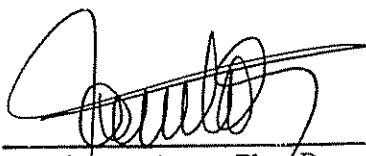
FIRMANTES:



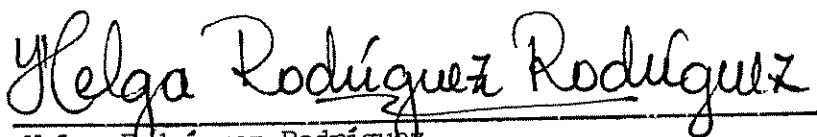
Ramón Lastra, Ph. D.
Profesor Consejero



Assefaw Newolde, Ph. D.
Jefe, Area de Posgrado



Ramón Lastra, Ph. D.
Director, Programa de Enseñanza



Helga Rodríguez Rodríguez
Candidato

DEDICATORIA

A mis padres por todo su amor
y comprensión en mi vida.

A mis hermanos y toda mi familia

A todos los que hicieron sentirme en familia en CATIE incluyendo
a la familia de cacao

AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mis sentimientos de gratitud a las siguientes personas e instituciones que apoyaron el presente trabajo de investigación:

Al Dr. Ramón Lastra, profesor consejero, por su decidido apoyo, entusiasmo, y empeño para obtener los fines de esta investigación.

Al Dr. Victor Villalobos Arámbula, miembro del comité asesor, por su interés en el desarrollo del trabajo .

Al Dr. Jorge Morera, miembro del comité asesor, por su constante colaboración en la fase de campo y por su interés en el éxito de la tesis.

Al Dr. Paul Fritz por su ayuda, comentarios y discusiones durante el desarrollo del trabajo. Igualmente a Doug Furtek y J. Osei por compartir parte de sus datos sin publicar.

A mis profesores y amigos de maestría del Laboratorio: Vicente Febres y José Eduardo Calzada, por compartir conmigo sus experiencias y valiosos conocimientos.

A los señores Edwin Castillo, Juanito, Antonio Salas y todas las personas del grupo cacao por su colaboración en el trabajo de campo.

A las personas que integran el Laboratorio de Cultivo de Tejidos en especial a Ana Abdelnur por su ayuda oportuna.

A las personas integrantes del Laboratorio de Biología Molecular Rigoberto Nuñez y Juan Carlos Ramirez.

A los señores Omar Vega, Victor Hugo por su cooperación en los asuntos relacionados con compras.

Al Sr. Francisco "Macho" Solano por el trabajo fotográfico.

A todos las personas de la Biblioteca Orton en especial a Rigoberto Aguilar.

A las personas del Centro de Cómputo del CATIE en especial a Johnny Pérez.

A todas las personas que laboran en CATIE.

Al gobierno de Holanda por su apoyo financiero.

A mis compañeros de fitomejoramiento.

A Salvador por los dibujos presentados y por su amistad.

A Henning Von Platen y Thomas Baumann por su ayuda en la edición del manuscrito final.

A todos los compañeros de la promoción 90-92 en especial Chava, Rafles, Gustavo, Gerardo y el Mae por hacer de esta experiencia un motivo más para seguir adelante y por los momentos inolvidables.

A Pocasangre por su cariño.

TABLA DE CONTENIDO	Pág
RESUMEN	vii
SUMMARY	viii
RESUMME	ix
LISTA DE CUADROS	x
LISTA DE FIGURAS	xii
1. INTRODUCCION	1
2. REVISION DE LITERATURA	3
2.1 El cacao	3
2.2 Mapeo genético	4
2.3 Fragmentos de Restricción de Longitudes Polimorficas RFLP	5
2.4 Fundamento teórico de los RFLP	7
2.4.1 Fragmentos de restricción	7
2.5 Herencia de los RFLP	10
2.6 Utilidad de un mapa de ligamiento basado en RFLP	10
2.7 Los RFLP como marcadores moleculares en la construcción de un mapa de ligamiento en cacao	11
2.8 ADN polimórfico amplificado al azar RAPD	12
2.8.1 Principios de la amplificación	15
3. MATERIALES Y METODOS.	17
3.1 Familia de cacao	17
3.2 Esquema general de la metodología RFLP	20
3.2.1 Aislamiento de ADN de cacao	20
3.2.2 Digestión del ADN	22
3.2.3. Transferencia del ADN	22
3.2.4 Aislamiento de las sondas	22
3.2.5 Marcación de las sondas con biotina	24
3.2.6 Hibridación	25
3.2.7 Detección	25
3.2.8 Análisis de los fragmentos RFLP	26
3.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	26
3.3.1 Protocolo para la amplificación del ADN	26

4.RESULTADOS	27
4.1.Aislamiento de ADN	27
4.2 Aislamiento de las sondas para los ensayos RFLP	29
4.3 Reacción encadena de la polimerasa (PCR)	36
4.3.1 Selección de 'primers' en los padres	36
4.3.2 Análisis de la progenie (Retrocruces)	38
5. DISCUSION	54
5.1 Aislamiento de ADN	54
5.2 Aislamiento de las sondas para los ensayos RFLP	56
5.2.1 Hibridación con la sonda 21 kD	58
5.3 Reacción encadena de la polimerasa (PCR)	59
5.3.1 Selección de 'primers' en los padres	59
5.3.2 Análisis de la progenie (Retrocruce)	61
6. CONCLUSIONES	64
7.RECOMENDACIONES	66
8. LITERATURA CITADA	68
9. ANEXOS	76
Anexo 1. Procedimiento para el aislamiento y purificación del ADN de cacao	76
Anexo 2. Digestión enzimática, electroforésis del ADN y Tranferencia o "Southern Transfer".	78
Anexo 3. protocolo para el aislamiento y purificación de las sondas	79
Anexo 4. Hibridación y detección con PhotoGene Nucleic Acid Detection System	81
Anexo 5. .Protocolo para PCR	83

RODRIGUEZ RODRIGUEZ, H. 1992. Uso de marcadores moleculares para la construcción de un mapa de ligamiento genético en cacao *Theobroma cacao* L. Palabras claves: cacao, *Theobroma cacao* L., sonda, mapa genético, RFLP, ADN, PCR, 'primers'.

RESUMEN

Los marcadores moleculares como los RFLP y los RAPD, permiten estudiar la segregación de regiones homólogas del genoma de los individuos de una población segregante, como la F₂ o un retrocruce. También, han facilitado iniciar la construcción de mapas de ligamiento genético en cultivos de importancia económica, incluyendo el cacao.

Los únicos requisitos para desarrollar mapas basados en estos marcadores son: (1) reproducción sexual y (2) una colección de sondas de copias únicas de ADN para los RFLP, ó un conjunto de 'primers' para el caso de RAPD.

El propósito del presente trabajo, fué identificar sondas y 'primers' que pudieran ser usados como marcadores moleculares en los padres de la familia de cacao que se encuentra en el CATIE, bajo el sistema de retrocruce. La familia se compone de los progenitores 'Catongo' y 'Pound 12', un cruce interclonal y una población segregante que fué retrocruzada hacia 'Catongo'.

Para el caso de los RFLP, se encontró que la sonda 21 kD era polimórfica en los retrocruces. Se evidenció un mayor polimorfismo cuando el ADN fué digerido con EcoRI en comparación con Hind III. Las demás sondas utilizadas no pudieron ser evaluadas dado que el fago que contenía el inserto de ADN del cacao, posiblemente digirió este ADN ó en otros casos perdió su capacidad infectiva en las bacterias y por lo tanto, fué imposible aislar la sonda.

En cuanto a los RAPD, se encontraron siete 'primers' polimórficos en los padres. Se seleccionaron los 'primers' que estaban ligados (presentes) en 'Pound 12' y no ligados (ausentes) en 'Catongo'. Al hacer el análisis en la población segregante, se encontraron bandas que se comportaron como marcadores dominantes.

También, se evaluaron en la población segregante, 'primers' seleccionados previamente, correspondientes al grupo de ligamiento #4. Con estos datos, se reunió información que será adicionada al mapa preliminar que ha sido generado para este grupo de ligamiento por la Universidad del estado de Pensilvania.

RODRIGUEZ RODRIGUEZ, H. 1992. Usage of molecular markers for the construction of a linkage map in cocoa *Theobroma cacao* L.

Key words: cocoa, *Theobroma cacao* L. probe, linkage map, RFLP, ADN, PCR, primers.

SUMMARY

Genetic markers as RFLP's and RAPD's enable the study of segregation of homologous regions in the genome of organisms from a segregating population as F2 or from a backcross. They have also been useful in the construction of linkage maps of important cultivars including cocoa.

The only requirements for map development based on these markers are: (1) sexual reproduction and (2) a probe collection of unique DNA for the RFLP's or a set of primers for RAPD's.

The purpose of this work was to identify probes and primers to be used as genetic markers in the parents of the cocoa family planted in CATIE, under a backcross system. The family is composed of the parents 'Catongo' and 'Pound 12', an interclonal cross and a segregating population that derives from a backcross to 'Catongo'.

In the case of RFLP's it was found that a cacao seed protein gene (21 kD) probe was polymorphic in the backcrosses. A major polymorphism was evident when the DNA was digested with EcoRI compared with Hind III. The other probes used could not be evaluated because the phage that contained the fragment of cocoa DNA possibly digested this DNA or in other cases lost its infective capacity in the bacterias thus, it was impossible to isolate the probes.

In the case of the RAPD's seven polymorphic primers were found in the parents. There was selection of the primers that were linked (present) to 'Pound 12' and not linked (absent) in 'Catongo'. When the segregating population was analyzed there were bands that behaved as dominant markers.

Also, selected primers corresponding to the linkage group #4 were evaluated in the segregating population. This data will be merged with the preliminary cocoa map generated by the Penn State University.

RODRIGUEZ RODRIGUEZ, H. 1992. Utilisation de marqueurs moléculaires pour la construction d'une carte génétique chez le cacao: *Theobroma cacao* L.

Mots clés: cacao, *Theobroma cacao* L, sondes, carte génétique, RFLP, ADN, PCR, primers.

RESUME

Les marqueurs moléculaires tels les RFLP ou les RAPD permettent d'étudier la ségrégation de régions homologues du génome d'individus issus d'une population ségréante (F2 ou rétrocroisement). Egalement, ils ont facilité l'initiation de l'élaboration de cartes de liaisons génétiques chez des cultures d'importance économique, y compris le cacao.

Les seuls besoins pour développer des cartes génétiques basés sur ces marqueurs sont: (1) la reproduction sexuée et (2) une collection de sondes de copies uniques d'ADN, dans le cas des RFLP ou un ensemble de "primers" dans le cas des RAPD.

Le but du présent travail fut d'identifier des sondes et des "primers" pouvant être utilisés comme marqueurs moléculaires chez les parents de la descendance de cacaoyers se trouvant au CATIE, au sein d'un schéma de rétrocroisement. La famille se compose des géniteurs "Catongo" et "Pound 12", d'un croisement interclonal, et d'une population ségréante rétrocroisée avec "Catongo".

Dans le cas de RFLP, une sonde de 21 kD fut polymorphique pour les rétrocroisements. Un meilleur polymorphisme a été mis en évidence lorsque l'ADN a été digéré avec EcoRI plutôt qu'avec Hind III. Les autres sondes utilisées n'ont pu être évaluées car le phage contenant l'insert d'ADN de cacao, a vraisemblablement digéré cet ADN ou, dans certains cas, a perdu sa capacité infectieuse dans les bactéries; ainsi, il fut impossible d'isoler ces sondes.

En ce qui concerne les RAPD, sept "primers" polymorphiques ont été trouvés chez les parents. Les "primers" liés (présents) dans "Pound 12" et non liés (absents) dans "Catongo" ont été sélectionnés. L'analyse de la population ségréante a révélé des bandes se comportant comme des marqueurs dominants.

Egalement, ont été évalués dans la population ségréante, des "primers" sélectionnés antérieurement, correspondant au groupe de liaison #4. Ces résultats constituent une information qui sera ajoutée à la carte préliminaire générée par ce groupe de liaison par l'Université de l'Etat de Pennsylvanie.

LISTA DE CUADROS

Cuadro		Pág.
1.	Características fenotípicas de los retrocruces utilizados en el estudio. Programa de mejora Genética de Cacao del CATIE, (Información suministrada por J. Morera).	19
2.	Características de las sondas de cacao utilizadas para la detección de los patrones RFLP.	23
3.	Longitud de los fragmentos observados al digerir el ADN proveniente de los retrocruces # 171; 170; 3; 100; 132; 185; 'CATIE 1000' y 'Catongo'. La digestión se realizó con Hind III y la hibridación con la sonda 21 kD correspondiente a un gen de reserva de proteína de semilla. Se encontró polimorfismo en la banda correspondiente a 19 Kb.	33
4.	Longitud de los fragmentos observados al digerir el ADN proveniente de los retrocruces # 171; 170; 3; 100; 132; 185; 'CATIE 1000' y 'Catongo'. La digestión se realizó con Eco RI y la hibridación con la sonda 21 kD correspondiente a un gen de reserva de proteína de semilla. Se encontró polimorfismo en las bandas correspondientes a 19,5; 7,8 y 3,2 Kb.	35
5.	Proporciones fenotípicas y genotípicas para el color de las hojas de plantas de cacao del cruce 'Catongo' y 'Pound 12'. CATIE, 1992.	42
6.	Segregación de fragmentos amplificados de longitud polimórfica en [(Catongo X Pound 12) X Catongo]. (Retrocruces). CATIE, 1992.	49
7.	Determinación de los Alelos usando la Reacción en Cadena de la Polimerasa. El 'primer' en este caso está ligado a 'Pound 12' y ausente en 'Catongo'. Además dadas las proporciones fenotípicas observadas en el campo (1:1) el tipo de cruce sería CC x CP. CATIE, 1992.	51

8. Datos transformados de los ensayos de RAPD de las retrocruzas de cacao finca experimental 'Cabiria'. Información proveniente de siete primers y once retrocruces. Clave: D=presente B=Ausente -=Datos faltantes. 52

LISTA DE FIGURAS

Figuras.		Pág.
1.	Ilustra el polimorfismo de un fragmento de restricción. Se tiene una región del cromosoma homólogo de la secuencia de ADN en dos cromosomas. Los dos segmentos contienen la misma secuencia la cual ha sido clonada (caja rayada). El sitio para la enzima R, en el lado derecho de la caja del cromosoma 2, ha sido eliminado por una alteración en la secuencia del ADN. En este caso, un fragmento más largo de ADN se ha producido en el cromosoma 2, cuando se ha digerido con la enzima R. El revelado final de la hibridación, permite ver que los fragmentos contienen la secuencia clonada. Tomado de Beckman y Soller, 1983.	8
2.	Esquema general de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (Polymerase Chain Reaction- PCR).	14
3.	Esquema general de la metodología RFLP.	21
4a.	Electroforesis horizontal de agarosa 1% de diferentes árboles pertenecientes a la familia de cacao del CATIE. La primera línea contiene el marcador lambda digerido con Hind III. En 0= ADN de Catongo; 1= ADN de Pound 12; 2= ADN RC # 2; 4= ADN RC #170; 5= ADN RC #180; 6 y 7 = ADN de RC # 3.	28
4b.	Electroforesis horizontal de agarosa 1% del ADN de cacao (2 μ g) digeridos con enzimas de restricción (10 U/g). Primera línea Marcador lambda digerido con Hind III. Las siguientes líneas de izquierda a derecha muestran diferentes ADN digeridos con EcoRI. La línea final contiene el marcador lambda digerido con PstE II.	28
5a.	Cuantificación de las sondas lambda ADN. De izquierda a derecha 1= Marcador lambda ADN digerido con Hind III; 2= Sonda #154; 3= Sonda #358; 4= Sonda #3510; 5= Sonda #3513; 6y7= Sonda #3514.	30

- 5b. Marcación de las sondas con biotina. En la primera fila de izquierda a derecha sondas biotinizadas #154 y 358; En la segunda fila sondas #3 510; 3513 y 3514. En la última fila lambda ADN control. 30
6. Análisis RFLP mostrando los pesos moleculares de los fragmentos en Kb, del ADN nuclear del cacao digerido con Hind III e hibridados con la sonda 21 kD. Se encontró polimorfismo en la banda de 19 Kb. A= Retrocruce 171; B= Retrocruce170; C= Retrocruce 3; D= Retrocruce 100; E= Retrocruce 132; F= Retrocruce 185; G= CATIE 1000; H= Catongo. 32
7. Análisis RFLP mostrando los pesos moleculares de los fragmentos en Kb, del ADN nuclear del cacao digerido con EcoRI e hibridados con la sonda 21 kD. Se presentaron tres bandas polimórficas en 19,5 Kb; 7,8 Kb y 3,2 Kb. A= Marcador Lambda/Hind III. B= Retrocruce 171; C= Retrocruce170; D= Retrocruce 3; E= Retrocruce 100; F= Retrocruce 185; G= CATIE 1000; H= Catongo; I= Marcador lambda/BstE II. 34
8. Prueba para seleccionar 'primers' al azar, para diferencias entre 'Catongo' y 'Pound 12'. A la izquierda el marcador escalera de peso molecular conocido (123 pb). Se utilizaron doce 'primer'es con secuencias de 10 pares de bases en las reacciones PCR. 'Catongo' líneas= B,D,F,H,J,M,O,Q,S,U,W; 'Pound12' líneas= C,E,G,I,L ,N,P,R,T, V,X; Se escogieron aquellos 'primers' que estuvieran ligados a 'Pound 12' y no ligados a 'Catongo' ('Primers' 01,03,06,08,09,10 y 11). 37
9. Patrones de segregación para una banda de ADN polimórfico (marcador RAPD) producido por el 'primer' 03. Electroforesis en agarosa 1,2% teñido con bromuro de etidio. A la izquierda el marcador escalera y en las líneas siguientes los RC#2,3,42,101,102,128,133,170,180,186,190. Se encontraron diferencias en el fragmento correspondiente a 615 pb. 39

10. Patrones de segregación para una banda de ADN polimórfico (marcador RAPD) producido por el 'primer' 06. Electroforesis en agarosa 1,2% teñido con bromuro de etidio. A la izquierda el marcador escalera y en las líneas siguientes los RC#2,3,42,101,102,128,133,170,180,186,190. Se encontraron diferencias en el fragmento correspondiente a 1599 pb. 40
11. Patrones de segregación para una banda de ADN polimórfico (marcador RAPD) producido por el primer 516. Electroforesis en agarosa 1,2% teñido con bromuro de etidio. A la izquierda el marcador escalera y en las líneas siguientes los RC#2,3,42,101,102,128,133,170,180,186,190. Se encontraron diferencias en el fragmento correspondiente a 984 pb. 43
12. Patrones de segregación para una banda de ADN polimórfico (marcador RAPD) producido por el 'primer' 537. Electroforesis en agarosa 1,2% teñido con bromuro de etidio. A la izquierda el marcador escalera y en las líneas siguientes los RC#2,3,42,101,102,128,133,170,180,186,190. Se encontraron diferencias en el fragmento correspondiente a 738 pb. 44
13. Patrones de segregación para una banda de ADN polimórfico (marcador RAPD) producido por el 'primer' 541. Electroforesis en agarosa 1,2% teñido con bromuro de etidio. A la izquierda el marcador escalera y en las líneas siguientes los RC#2,3,42,101,102,128,133,170,180,186,190. Se encontraron diferencias en el fragmento correspondiente a 861 y 984 pb. 45
14. Patrones de segregación para una banda de ADN polimórfico (marcador RAPD) producido por el 'primer' 551. Electroforesis en agarosa 1,2% teñido con bromuro de etidio. A la izquierda el marcador escalera y en las líneas siguientes los RC # 2,3,42,101,102,128,133,170,180,186,190. Se encontraron diferencias en el fragmento correspondiente a 730 pb. 46

15. Patrones de segregación para una banda de ADN polimórfico (marcador RAPD) producido por el 'primer' 553. Electroforesis en agarosa 1,2% teñido con bromuro de etidio. A la izquierda el marcador escalera y en las líneas siguientes los RC # 2,3,42,101,102,128,133,170,180,186,190. Se encontraron diferencias en el fragmento correspondiente a 553 pb. 48
16. Mapa preliminar de ligamiento genético para el grupo de ligamiento # 4. en *Theobroma cacao* L (Tomado de Fritz, *et al*, datos sin publicar). Se presenta información sobre las frecuencias de recombinación, distancias y orden de los marcadores. 53

1. INTRODUCCION

Con el propósito de evaluar el ácido desoxiribonucleico (ADN) que es el material genético de todos los organismos vivos y de muchos virus, los investigadores han desarrollado técnicas especiales que permiten estudiarlo directamente. Para ello, se han venido utilizando los marcadores moleculares, útiles en la construcción de mapas de ligamiento genético.

Un marcador molecular ó genético es una característica visible presente en un individuo que indica la constitución de un gen en particular (Smith, 1989). Cuando se tiene un gran número de marcadores a intervalos relativamente cortos en el genoma de una familia, es posible construir un mapa de ligamiento genético.

Los primeros marcadores moleculares utilizados fueron las isoenzimas. Las isoenzimas, son enzimas que comparten el mismo sustrato específico, pero que difieren en su movilidad electroforética. Por su parte, los RFLP (Fragmentos de Restricción de Longitudes Polimórficas) y los RAPD (ADN Amplificado al azar), representan una clase nueva de marcadores moleculares con los cuales se analiza directamente el genoma.

Los marcadores RFLP y RAPD, permiten estudiar la segregación de regiones homólogas del genoma de individuos en una población segregante como la F2 o un retrocruce. Los únicos requisitos para desarrollar mapas basados en RFLP o RAPD de un organismo son: (1) reproducción sexual y (2) una colección de sondas de copias únicas de ADN para los RFLP ó un conjunto de 'primers' para el caso de los RAPD .

Los marcadores RFLP y RAPD, permiten revelar el polimorfismo genético presente en los individuos y adicionalmente conocer la diversidad existente entre y dentro de las poblaciones (Tanksley, 1983). Polimorfismo a nivel molecular significa, diferencias en las longitudes de los fragmentos de ADN homólogos en individuos diferentes. Para discriminar diferencias individuales en los RFLP, se explota la técnica de hibridación ADN:ADN. A través de éste método, un fragmento de ADN es amplificado, marcado y luego

desnaturalizado para ser usado como sonda sobre una membrana, en la cual están inmovilizados los fragmentos de ADN digeridos, provenientes de las muestras que se van a analizar. Esta sonda, se unirá fuertemente a las secuencias de ADN complementario. Debido a que la sonda esta marcada, los fragmentos se pueden visualizar con una película de rayos X. Las diferencias detectadas entre individuos se llaman fragmentos de restricción de longitudes polimórficas ó RFLP (Tanksley, 1989).

El genoma de los eucariotes consta de diferentes clases de genes. La estrategia para detectarlos dependerá de la clase de sondas que se usen para examinar el genoma (Weising *et al*, 1991). Existen los ADN satélites, los transposones, los "grupos tandem", familias de multigenes y genes simples ó únicos. La óptima combinación sonda/clon/enzima de restricción que proporcione patrones de bandas diferentes (polimorfismo) se debe encontrar empíricamente.

En forma similar para los RAPD, inicialmente, se deben encontrar 'primers' que detecten polimorfismos en los padres y posteriormente, estudiarlos sobre la población segregante. La ventaja de esta metodología sobre los RFLP, es que no requiere hibridaciones para detectar el polimorfismo genético, sino que directamente en el ADN es posible evaluar las diferencias a nivel de segmentos homólogos en el genoma de diversos organismos.

Considerando los aspectos mencionados anteriormente se proponen como objetivos:

- 1) Identificar sondas/'primers' que puedan ser usadas como marcadores genéticos en la familia del cacao.
- 2) Determinar las mejores combinaciones sonda/enzima de restricción para revelar polimorfismos en los análisis RFLP.

2. REVISION DE LITERATURA

2.1 El cacao

El cacao tiene su Centro de Diversidad principal en América del Sur, en el Alto Amazonas de donde se extendió hacia el oeste y el norte del continente. En la actualidad, se reconocen tres poblaciones de cacao.

El Criollo, que resultó de la diseminación hacia Colombia, Ecuador, Venezuela, Centroamérica y México. El Forastero, localizado en el norte del Brasil y las Guayanas y finalmente el Trinitario, que se originó probablemente por la hibridación entre el Criollo y el Forastero en la isla de Trinidad y que corresponde a un tipo intermedio (Enriquez, 1985; 1987).

El mejoramiento tradicional del cacao toma tiempo debido al carácter perenne y la alta segregación del cultivo. Enfermedades como la mazorca negra, Moniliasis y la Escoba de Bruja que atacan severamente al cacao apuntan sobre la necesidad de buscar nuevas alternativas para dilucidar el comportamiento de los genes y la manipulación genética. (Figueira *et al* , 1992).

En el Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE) se encuentra una colección con 1148 cultivares de germoplasma de cacao (Morera, 1992). Por más de cuatro décadas se ha experimentado en todas las fases del cultivo. Cruzamientos biclonales, clones solos y retrocruces para determinar adaptación, altos rendimientos, precocidad, calidad de las almendras y resistencia a las principales enfermedades (Morera *et al*, 1990).

Esta circunstancia hace del CATIE uno de los Centros de Investigación, con el apoyo económico y tecnológico de otras instituciones a nivel mundial, con mayores posibilidades para la ejecución de diversos estudios preliminares, encaminados hacia la construcción de un mapa de ligamiento genético.

2.2 Mapeo genético

Un mapa genético es la representación de la organización aparente del material genético de una especie. Existen diferentes tipos de mapas basados en técnicas de la genética clásica y la biología molecular, que proporcionan información relacionada con esta organización.

Un mapa de ligamiento, representa la posición relativa de los genes en los cromosomas y está determinado por las relaciones de recombinación genética. Los mapas de ligamiento, pueden ser construidos basados en marcadores RFLP u otro tipo de marcadores moleculares, los cuales son asignados a grupos de ligamiento (grupo de genes que tienen sus loci en el mismo cromosoma) como se realizó inicialmente en humanos (White *et al* , 1985; Lewin, 1990).

Un mapa del ADN obtenido por medio de enzimas de restricción se conoce como mapa de restricción. Este mapa, representa la secuencia lineal de sitios en los cuales una enzima de restricción encuentra su secuencia específica de corte. La distancia a lo largo de dicho mapa se mide directamente en pares de bases para distancias cortas y para distancias más largas en kilobases.

Los dos tipos de mapas (restricción y ligamiento) son diferentes vistas del mismo material. La reunión de toda la información proveniente de los diferentes mapas, puede sobreponerse para formar un mapa con datos sobre la organización genómica de la especie. Esta es una labor a largo plazo e implica esfuerzos conjuntos entre diferentes grupos de investigación (National Research Council, 1990; Lewin, 1990).

A largo plazo, es muy posible que los mapas de ligamiento genético desarrollados para cultivos comerciales, contribuyan a desarrollar germoplasma con mayores posibilidades dentro de la agricultura sostenible, dentro de la cual, el cacao es un renglón importante para las pequeñas comunidades del trópico americano.

2.3 Fragmentos de Restricción de Longitudes Polimórficas RFLP

La técnica RFLP fue usada por primera vez en humanos, con el propósito de construir mapas de ligamiento genético en el cromosoma X y también, con el fin de diagnosticar algunas enfermedades genéticas como la distrofia muscular o la fibrosis cística dentro de las familias que padecían la enfermedad (Drayna y White, 1985; White *et al* ,1985). A partir de estos trabajos, los RFLP empezaron a ser usados como marcadores genéticos, y de esta manera se inició la construcción de un mapa en humanos. Después de estos estudios, (Botstein *et al* , 1980; Drayna y White, 1985; White *et al* ,1985) los marcadores RFLP se empezaron a aplicar a las plantas.

Existen dos clases de marcadores genéticos: los morfológicos y los moleculares (Tanksley, 1983). En plantas, los marcadores morfológicos como las espinas no son adecuados ya que su expresión está sujeta a variaciones del medio ambiente y sólo pueden ser evaluados en estado adulto. Los marcadores moleculares, pueden ser de dos tipos dependiendo del nivel en que los genes son detectados: las isoenzimas y los marcadores de ADN o polimorfismo de los fragmentos de restricción RFLP (Tanksley, 1983), y más recientemente los RAPD basados en la reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction-PCR) (Mullis y Fallona, 1987).

La construcción de un mapa de ligamiento genético utilizando RFLP, requiere el uso de sondas que revelen polimorfismo, para posteriormente realizar el análisis de segregación (Landry *et al* , 1987.; Landry *et al* , 1991). Este análisis de segregación con RFLP como marcadores se facilita por que: 1) en la mayoría de los casos los alelos se expresan de manera codominante, lo que permite identificar el genotipo de un determinado locus; 2) la gran variación alélica (polimorfismo) que se puede detectar y que es generada por el número casi ilimitado de combinaciones enzima/sonda; 3) ausencia de efecto epistático, lo que permite el seguimiento de todos los marcadores en una población; 4) ausencia del factor ambiental; 5) la mayoría de los marcadores son neutros fenotípicamente, lo que evita caracteres indeseados en los programas de mejora genética (Landry *et al* , 1987; Tanksley *et al* , 1989).

De especial interés, es el mapa genético desarrollado para *Arabidopsis thaliana*. Esta planta herbácea de poco valor agronómico, pero con gran cantidad de información de su genética tradicional, se convirtió en un modelo para especies herbáceas. Debido a que tiene un genoma pequeño, ciclo corto de regeneración, alta tasa de fertilidad, progenie numerosa y fácil crecimiento (Chang, et al , 1988).

El mapa basado en RFLP para *Arabidopsis* involucró los siguientes pasos, que han sido usados en la construcción de otros mapas: a) Colectar y seleccionar marcadores RFLP en los padres; b) Realizar cruces genéticos y c) Determinar el orden lineal de los RFLP y las distancias genéticas entre ellos examinando la segregación de los RFLP en la progenie (Tanksley et al , 1989). Este análisis se hace en la actualidad con un paquete estadístico llamado MAPMAKER (Lander et al , 1987).

Varios grupos de investigación han construido mapas de ligamiento basados en RFLP para *Arabidopsis* (Chang et al , 1988). El mapa actual, contiene 90 marcadores distribuidos al azar en sus 5 cromosomas. Para construirlo se usaron 280 sondas con un promedio de longitud de 12,5 Kb, 18 sondas simples y 8 genes clonados.

Otro mapa RFLP también fué construido, identificando 94 nuevos marcadores. Se usaron 85 cósmidos genómicos y 9 genes clonados por Hong-Gil Nam et al , 1989. Finalmente, para complementar el mapa se emplearon 17 sondas utilizadas por los constructores del primer mapa para facilitar el alineamiento de los mapas RFLP construidos en forma independiente (Chang et al , 1988).

En la actualidad se tienen mapas de ligamiento basados en RFLP para maíz y tomate (Helentjaris et al , 1986), lechuga (Landry et al , 1987), arroz (McCouch et al , 1988), papa (Gebhardt et al , 1989), soya (Apuya et al , 1988; Keim et al , 1990), y más recientemente se han iniciado trabajos en cacao (Mirazon, 1988; Mirazon et al , 1989; Febres, 1990).

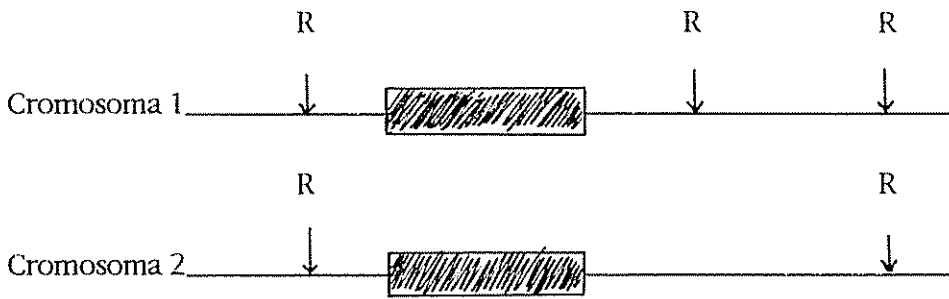
2.4 Fundamento teórico de los RFLP

2.4.1 Fragmentos de Restricción

Las endonucleasas de restricción, son enzimas que reconocen secuencias específicas de ADN, generalmente de 4 a 6 nucleótidos, que cortan el ADN de doble cadena en éstos sitios o sitios adyacentes (sitios de restricción). De esta manera, se originan fragmentos de longitudes definidas. Cualquier cambio a nivel de ácido nucleico que altere uno ó más sitios de restricción, ya sea por substitución ó inserción alterará la longitud del fragmento de restricción y esta es la clase de alteración genética que es detectada por los RFLP (Nathans y Smith, 1975; Botstein *et al* ,1980; Beckman y Soller, 1983; Soller y Beckman, 1986). Entre más repetida sea la secuencia de reconocimiento en el ADN, más frecuentemente será cortado por la enzima que reconoce dichas secuencias (Lewin, 1990).

Los fragmentos de ADN formados, se pueden separar de acuerdo con su tamaño a través de electroforesis en geles de agarosa. Debido a una mayor movilidad de los segmentos cortos, éstos migrarán más rápidamente que los largos. Cuando el ADN de un organismo superior se digiere con enzimas de restricción, se forman numerosos fragmentos de diferentes tamaños y una mancha continua se puede observar en el gel de agarosa (Beckman y Soller, 1983).

El patrón de ADN obtenido de la digestión, se transfiere del gel a un soporte sólido, como un filtro de nitrocelulosa (BRL Life Technologies, 1990a) o una membrana de nylon (BRL Life Technologies, 1990b; con el fin de poder llevar a cabo la hibridación (Sambrook, 1989) mediante una técnica llamada "Southern Transfer" (Southern, 1975). Luego esta membrana se expone a una sonda marcada que posee una secuencia homóloga a uno ó más fragmentos o a parte de éstos, de tal manera que se produzca la hibridación del ADN (Beckman y Soller, 1986). Posteriormente, el ADN se detecta con una película fotográfica en la cual aparecen las bandas donde ocurrió la hibridación y esta es la manera como se revela el polimorfismo (Figura 1.).



Fragmentos de Restricción visualizados después de la hibridación con una sonda clonada.

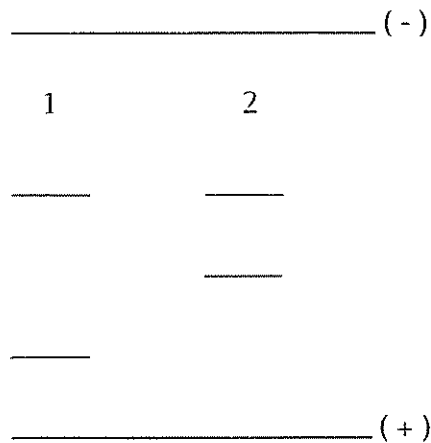


Figura 1. Ilustra el polimorfismo de un fragmento de restricción. Se tiene una región del cromosoma homólogo de la secuencia de ADN en dos cromosomas. Los dos segmentos contienen la misma secuencia la cual ha sido clonada (caja rayada). El sitio para la enzima R, en el lado derecho de la caja del cromosoma 2, ha sido eliminado por una alteración en la secuencia de ADN. En este caso, un fragmento más largo de ADN se ha producido en el cromosoma 2, cuando se ha digerido con la enzima R. El revelado final de la hibridación, permite ver que los fragmentos contienen la secuencia clonada. Tomado de Beckman y Soller, 1983.

Existen varias formas para marcar las sondas. La técnica se conoce como "Nick Translation", y se basa en la remoción de pequeños grupos de nucleótidos (aproximadamente 10), por una exonucleasa. Estos nucleótidos son reemplazados por otros nucleótidos marcados bajo la actividad de la ADN polimerasa I. Esta enzima tiene la propiedad de iniciar la replicación *in vitro* del ADN. Así, cuando la exonucleasa realiza un "agujero" en el ADN, la ADN polimerasa I inicia la síntesis de una cadena complementaria (Lewin, 1990). Los nucleótidos incorporados pueden estar o no marcados radioactivamente. Las sondas marcadas con isótopos radioactivos son muy sensibles pero riesgosas de manipular. Las técnicas no radioactivas como por ejemplo el uso de la biotina son menos sensibles, pero de más fácil uso.

En condiciones como las del CATIE, es más recomendable el uso de marcadores biológicos, ya que permiten almacenarse por un tiempo relativamente largo en comparación con las sondas marcadas radioactivamente y además, no representan peligro de manipulación y son de más fácil desecho que los radioactivos,

La detección del ADN se puede realizar por métodos colorimétricos como el BlueGene (BRL Life Technologies, 1990a.) ó luminiscentes como el PhotoGene (BRL Life Technologies, 1990b.) que son igualmente sensibles. Este último sistema, involucra el marcar una sonda con biotina la cual se hibrida al ácido nucleico. La biotina, se une a un conjugado estreptavidina-fosfatasa alcalina y al incorporar un substrato (PPD) para la fosfatasa alcalina, este substrato se defosforila emitiendo luz que puede ser detectada por una película fotográfica de rayos X. De esta manera, se visualizan las bandas de hibridación.

Las sondas de ADN usadas para los RFLP no tienen que ser homólogas de genes conocidos y esta es una de las ventajas de la técnica. Las sondas útiles, pueden ser secuencias al azar sin relación alguna con el locus que define la característica de interés. Por lo tanto, no es necesario aislar genes específicos con esta metodología. A pesar de ello, en los clones seleccionados para el estudio se debe cumplir una condición: los clones, deben contener una copia única o un bajo número de copias en el genoma (Botstein *et al* , 1980; Beckman y Soller, 1983; Beckman y Soller, 1986).

Las secuencias de copias únicas o de baja repetición que son utilizadas como sondas, pueden obtenerse de las bibliotecas de ADN complementario (ADNc), que se construyen a partir del ARN mensajero que es copiado a ADN a través de una transcriptasa reversa. También, se pueden obtener, a partir de las bibliotecas genómicas (ADNg), que se obtienen a partir del ADN de todo el genoma (Landry *et al* , 1987).

2.5 Herencia de los RFLP

El análisis de segregación con marcadores RFLP se facilita en la mayoría de casos, ya que los alelos se expresan y heredan en forma mendeliana codominante (Helentjaris *et al*, 1986). Esto permite identificar el genotipo de un determinado locus (homocigoto vs heterocigoto), como resultado de los cambios en un simple par de bases. Delecciones, adiciones y otros rearrreglos locales también manifiestan herencia mendeliana (Botstein *et al* , 1980; Beckman y Soller, 1983).

2.6 Utilidad de un mapa de ligamiento genético basado en RFLP

La utilidad de los marcadores genéticos tipo RFLP en mejoramiento vegetal, consiste en encontrar un fuerte ligamiento entre el marcador y un gen mayor. Con ello, se infiere la presencia del gen de interés por la presencia del marcador RFLP (Beckman y Soller, 1983; Beckman y Soller, 1986; Chang, *et al* , 1988; Gebhardt *et al* , 1989).

Los RFLP permiten rastrear genes simples y con ello la selección de los genotipos más convenientes para ser seleccionados en los programas de mejoramiento genético (Tanksley *et al* , 1986).

Otra ventaja de los marcadores RFLP, es que facilitan el estudio de las poblaciones segregantes de un cruce en etapas tempranas de desarrollo de la

planta y así determinar cuáles individuos poseen las características de interés antes de que se expresen (Tanksley *et al* , 1989).

Más aún, cuando se realiza una selección recurrente utilizando marcadores RFLP a lo largo del genoma, se pueden seleccionar aquellas plantas que no solamente posean los genes de interés, sino que también posean la mayor proporción de segmentos cromosómicos similares a los del padre recurrente. Por lo tanto, la máxima probabilidad de que el resto del genoma retorne hacia el padre recurrente (Helentjaris y Burr, 1989).

Adicionalmente, permiten estudiar caracteres de herencia poligénica. Los mapas de ligamiento de alta densidad basados en RFLP, hacen posible descomponer los caracteres cuantitativos en sus genes componentes. De esta manera, es posible identificar y medir el efecto de cada uno de ellos (Gelderman, 1975). Por consiguiente, dichos caracteres pueden ser tratados como genes simples, lo cual facilita el proceso de mejoramiento. Estos caracteres se conocen como QTL. (Quantitative Trait Loci) y están siendo estudiados en varias plantas como genes individuales (Lander y Botstein, 1991).

2.7 Los RFLP como marcadores en la construcción de un mapa de ligamiento genético en cacao

Desde 1989, se ha venido estudiando la aplicación de la técnica RFLP en cacao y se encontró que era posible detectar polimorfismo mediante distintas combinaciones sonda-enzima de restricción (Mirazon, 1988). Con este trabajo inicial se evidenció la potencialidad de la técnica en la caracterización de germoplasma en cacao (Mirazon *et al* , 1989).

Posteriormente, se estudiaron patrones RFLP de plantas de cacao *T. cacao* L. pertenecientes al banco de germoplasma de cacao del CATIE resistentes y susceptibles a Moniliasis *Moniliophthora roreri* [Cif & PAr] Evans *et al*. Se logró detectar polimorfismo con una de las sondas empleadas

que corresponde al gen de una proteína de reserva de semilla de 21 Kilodalton (kD).

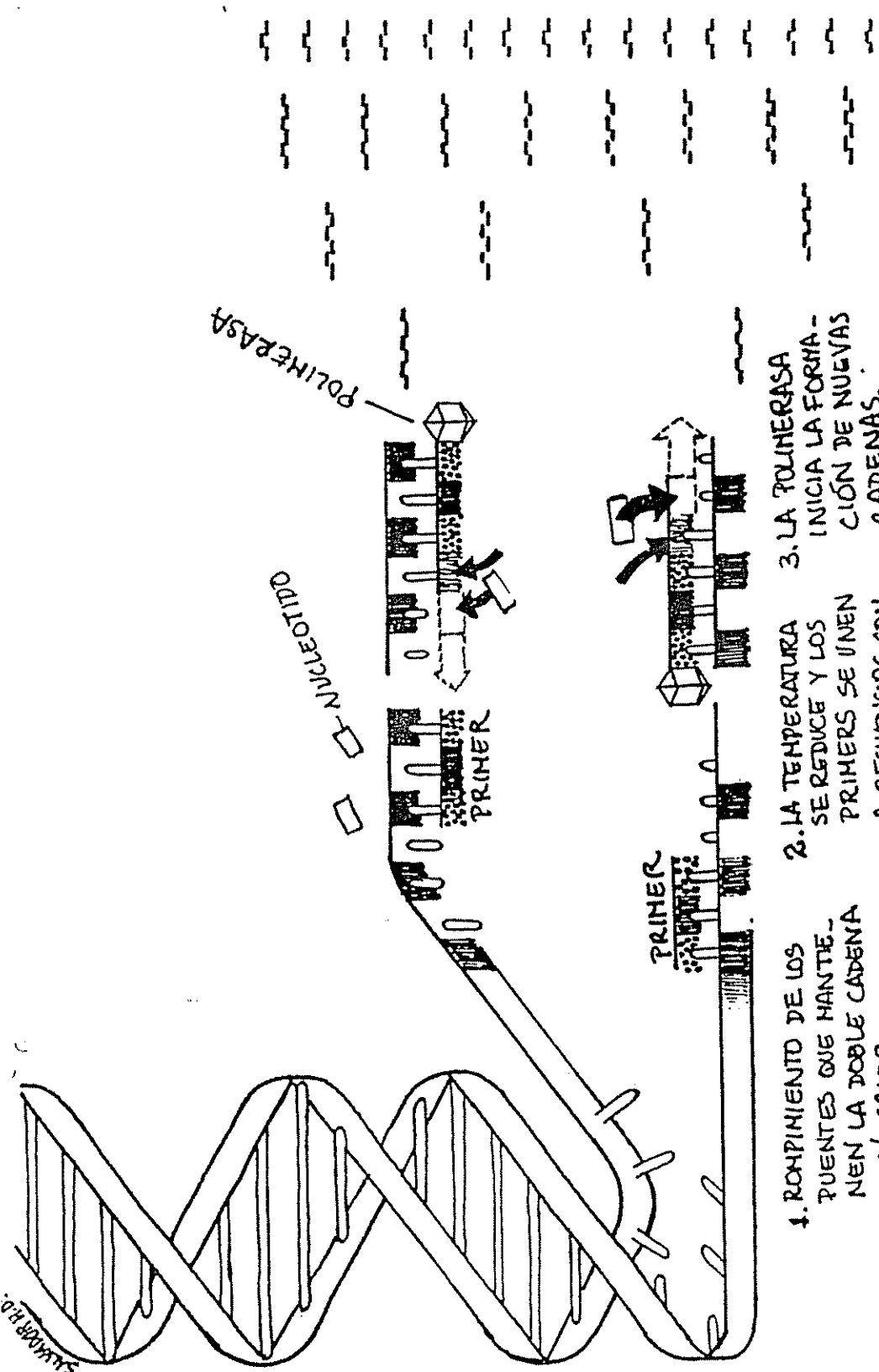
Se encontró que todas las enzimas de restricción usadas con esta sonda detectaban polimorfismo, lo cual es un indicador de rearrreglos en el genoma del cacao. Esta sonda, permitió separar los clones de cacao utilizados en seis grupos diferentes. Con ello, se demostró la utilidad de los RFLP en el análisis de la organización genómica, en estudios de taxonomía, caracterización de germoplasma, y construcción de un mapa de ligamiento genético (Febres, 1990).

En la actualidad se cuenta con un método alternativo para la amplificación del ADN que permite revelar polimorfismos en forma eficiente. Esta técnica llamada Reacción en Cadena de la Polimerasa (Polymerase Chain Reaction PCR) (Saiki *et al* , 1985; Mullis y Fallona, 1987) por sus siglas en inglés, es una de las herramientas más usadas en la construcción de mapas (Rose, 1990). También ha sido usada en la amplificación por "fingerprinting" o huellas digitales (Caetano-Anolles *et al*, 1991) y detección de polimorfismos (Figueira *et al*, 1992) en cacao.

2.8 ADN Polimórfico Amplificado al Azar - RAPD

Un marcador desarrollado recientemente por Williams *et al*, 1990, se conoce con el nombre de ADN Polimórfico Amplificado al Azar (Random Amplified Polimorphic DNA - RAPD), el cual utiliza la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es un procedimiento *in vitro* para la amplificación enzimática de un segmento específico de ADN.

Esta metodología, genera marcadores de ADN polimórficos amplificados al azar. Como resultado, se pueden localizar marcadores en grupos de ligamiento aún en genomas grandes. En el sistema de RAPD, un oligonucleótido simple de 10-15 pares de bases al azar se usa como 'primer' en los PCR. Los productos resultantes de la amplificación generalmente varían



1. ROMPIMIENTO DE LOS PUENTES QUE MANTIENEN LA DOBLE CADENA CON CALOR.
2. LA TEMPERATURA SE REDUCE Y LOS PRIMEROS SE UNEN A SECUENCIAS COMPLEMENTARIAS.
3. LA POLIMERASA INICIA LA FORMACIÓN DE NUEVAS CADENAS.
4. AL ELEVAR NUEVAMENTE LA TEMPERATURA, LAS CADENAS NUEVAS SE SEPARAN Y SE INICIA OTRO CICLO.

Esquema general de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (Polymerase Chain Reaction-PCR).

2.8.1 Principios de la Amplificación

La muestra de doble cadena de ADN la cual se va a amplificar, se conoce como ADN plantilla o patrón y es desnaturalizada mediante la incubación a alta temperatura. Las dos cadenas complementarias permanecen libres en solución hasta que la temperatura se reduce lo suficiente para que se puedan volver a unir a los 'primers'.

Los 'primers' se definen como el par de oligonucleótidos, que tienen la propiedad de alinearse a sitios específicos de la región que va a ser amplificada. Cada 'primer' se alineará a sólo una de las cadenas de ADN. La secuencia del 'primer' está determinada por la secuencia del ADN a estudiar en los límites de la región a ser amplificada. Los 'primers' se unen a cadenas opuestas y tienen sus terminaciones 3' cara a cara.

El número de ciclos determina teóricamente los niveles de amplificación. La amplificación total se puede expresar como $(1+X)^n$, donde n es el número de ciclos y X la eficiencia promedio de cada ciclo (Gingeras *et al* , 1990). La eficiencia de la técnica depende de cuatro variables:

- 1.) El número de ciclos, aunque hay que tener en cuenta que en los primeros ciclos el producto se incrementa más rápidamente que en los ciclos finales;
- 2.) Involucra la cantidad de ADN que va a ser amplificado. Las reacciones de PCR en muestras con concentraciones relativamente altas de ADN producen rendimientos más bajos de amplificación que en aquellas reacciones en que se usan bajas concentraciones y;
- 3.) Está relacionada con la longitud de la secuencia que va a ser amplificada. La eficiencia de la reacción de PCR es inversamente proporcional a la longitud del ADN que va a ser amplificado; y 4.) la eficiencia en la amplificación se correlaciona con las temperaturas usadas (Saiki *et al* , 1988).

En el caso del cacao, esta metodología ha sido usada con éxito por varios investigadores, con el propósito de determinar el nivel de variabilidad dentro del género (Wilde *et al* , 1991), para amplificar fragmentos de ADN polimórficos (Figueira *et al* , 1992), en la caracterización de clones de cacao

(Wilde *et al* , 1992), y en la construcción de un mapa de ligamiento genético (Fritz, Comunicación personal).

Brevemente, los pasos involucrados para la construcción de un mapa de ligamiento con el uso de RAPD incluyen: (1) identificación de 'primers' que revelen presencia/ausencia de una banda de polimorfismos entre los padres seleccionados (A- x aa) ; (2) evaluar los polimorfismos en un cruce de prueba, por ejemplo en los heterocigotos Aa y (3) realizar un análisis de segregación en la progenie F₂ y/o retrocruce. En el caso en que se deseara utilizar todos los marcadores posibles que revelarán los casos de entrecruzamientos, sería aconsejable construir dos mapas de ligamiento basado en los loci heterocigotos en cada padre.

Los grupos de ligamiento en cada mapa podrían entonces correlacionarse, escogiendo los productos PCR de varios loci en cada grupo de ligamiento, para generar RFLPs que pueden ser seguidos para ligamiento. Igualmente, los datos de los RAPDs pueden ser alineados con los datos RFLP para crear mapas de ligamiento saturados (Carlson *et al*, 1991).

En resumen, el sistema de marcadores RAPD muestra varias aplicaciones posibles en plantas como el cacao: (1) análisis de ligamiento genético; (2) estudios de diversidad genética (huellas digitales o "fingerprinting") (Caetano-Anolles *et al*, 1991); (3) generación de sondas de hibridación de ADN total para análisis RFLP; (4) generación de sondas de copia única RFLP o un marcador de simple copia RAPD de ADNc; y determinación del grado de heterocigocidad dentro de los árboles progenitores individuales (Carlson *et al*, 1991).

3. MATERIALES Y METODOS

El estudio se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular de la Unidad de Biotecnología del Programa de Agricultura Sostenible, ubicado en el Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), Turrialba.

Los árboles de los cuales se tomaron las muestras de hojas se encuentran en la colección de cacao, localizada en el banco de germoplasma del CATIE, finca Experimental "Cabiria" y en la finca experimental "La Montaña". Los progenitores y los retrocruces se encuentran sembrados en "Cabiria" y el cruce interclonal F1 en "La Montaña". El CATIE, está ubicado a 602 msnm, 83° 38' longitud oeste y 9° 53' latitud norte. El promedio anual de temperatura es de 21,5 °C, y un máximo promedio de 26,5 °C. La precipitación promedio anual de 2640 mm y una humedad relativa de 87%.

3.1 Familia de cacao

1. Progenitores

Se evaluaron los árboles progenitores del cruce interclonal 'Catongo' y 'Pound 12' ubicados en la colección de cacao del CATIE.

El clon 'Catongo' es originario de Urucuca Bahía Brasil, es de tipo Forastero con forma de mazorca del tipo calabacillo, color verde, moderadamente susceptible a *Phytophthora palmívora*, autocompatible y homocigoto recesivo para la característica de semillas blancas.

El clon 'Pound 12' es originario de Iquitos Perú, es de tipo Forastero, con forma de mazorca amelonada, color verde, heterocigoto para semillas púrpuras y blancas, susceptible a *P. palmívora* y autoincompatible.

2. Cruce interclonal

Se tomaron 7 árboles de la población interclonal 'Catongo' X 'Pound 12', establecida en "La Montaña" en 1977. Dicho experimento se estableció con el

objetivo de evaluar el efecto de dos tipos de sombra Laurel (*Cordia alliodora*) y Poró (*Erythrina poeppigiana*) sobre el desarrollo y rendimiento de los cruces interclonales (Morera y Mora, 1992). Los árboles seleccionados fueron los siguientes:

- | | |
|--------------------------------|--------------------------------|
| 1. Arbol #8 parcela 45 poró | 5. Arbol #13 parcela 42 laurel |
| 2. Arbol #9 parcela 45 poró | 6. Arbol #10 parcela 46 poró |
| 3. Arbol #15 parcela 46 poró | 7. Arbol #26 parcela 42 laurel |
| 4. Arbol #11 parcela 41 laurel | |

El cultivar 'CATIE 1000' que en el pasado había sido seleccionado de esta población de árboles, fué incluido en el estudio; ya que presenta algunos caracteres de importancia como alta resistencia a la enfermedad conocida como Mazorca Negra. Así mismo, estudios posteriores han mostrado que algunos árboles de este mismo cruce tienen la tendencia a segregarse para resistencia a *Phytophthora* (Láinez, 1991); para compatibilidad (Morera *et al.*, en prensa); para rendimiento (Morera y Mora, en prensa) y para aspectos fenológicos (Mora y Morera, en prensa).

3. Retrocruce

Se tomaron al azar plantas de una población total de 191 árboles retrocruzados en 1989 por el Programa de Mejora Genética de Cacao del CATIE. En el Cuadro 1. se presentan algunas de las características fenotípicas de estas plantas.

Para realizar estos retrocruces se tomaron flores del árbol #8, del cruce interclonal 'Catongo' X 'Pound 12' repetición 43, sombra laurel del experimento en "La Montaña". Se polinizaron varios árboles de 'Catongo' de una misma hilera del banco de germoplasma de cacao donde el clon 'Catongo' actuó como madre. Después de cosechar las mazorcas, se seleccionaron 191

Cuadro 1. Características fenotípicas de los retrocruces utilizados en el estudio.
Programa de Mejora Genética de Cacao del CATIE. (Información
suministrada por J. Morera).

Arbol	Altura verticilo (cm)	Diámetro tallo* (cm)	Color hojas nuevas
2	82	1,7	púrpura
3	94	1,5	púrpura
15	91	1,8	púrpura
42	126	2,3	verde
100	96	2,0	verde
101	73	1,4	verde
102	85	1,6	verde
128	93	1,6	púrpura
133	93	2,2	púrpura
151	87	1,4	púrpura
170	110	2,6	púrpura
171	110	1,1	verde
178	68	1,1	-
180	93	1,7	púrpura
185	79	1,6	verde
186	136	2,3	púrpura
190	97	2,3	verde

* Medición hecha a 30 cm de la base del suelo.

semillas. Las semillas, se sembraron en diciembre de 1990 en semillero y las plántulas fueron llevadas a campo definitivo en mayo de 1991 (Morera, comunicación personal).

De las 191 plantas retrocruzadas, se han realizado observaciones periódicas. Se encontró, que la proporción de brotación para color de hojas es de 1:1 verde:púrpura (Morera, comunicación personal).

En la actualidad el registro de la población retrocruzada ['Catongo' ('Catongo' X 'Pound 12')] es el siguiente: 122 árboles en buen estado; 39 árboles regulares; 14 árboles de pésimo desarrollo y 16 árboles muertos.

3.2 Esquema General de la metodología RFLP

La metodología general del procedimiento RFLP se muestra en la Figura 3. El primer paso consistió en aislar ADN nuclear de las células de las hojas jóvenes de cacao. Posteriormente, el ADN se digirió con dos endonucleasas de restricción, y luego se separaron los fragmentos por medio de electroforesis en geles de agarosa. El ADN se transfirió a una membrana donde se inmovilizó, para realizar las hibridaciones con las sondas marcadas. Finalmente, se detectaron los patrones RFLP.

3.2.1 Aislamiento de ADN de cacao

Se siguió la metodología de aislamiento, purificación y cuantificación propuesta por (Couch y Fritz, 1990; Febres, 1990). El protocolo para el aislamiento se encuentra en el Anexo1. En todos los casos el material inicial consistió de hojas frescas en estado joven. La concentración de ADN se estimó por medio de geles de agarosa 0,8% en presencia de 0,5 µg/ml de bromuro de etidio en buffer TAE 1X (40 mM Tris-Acetato, 1 mM EDTA pH 8,0). Se comparó la intensidad de la fluorescencia con un patrón de concentración conocida (ADN

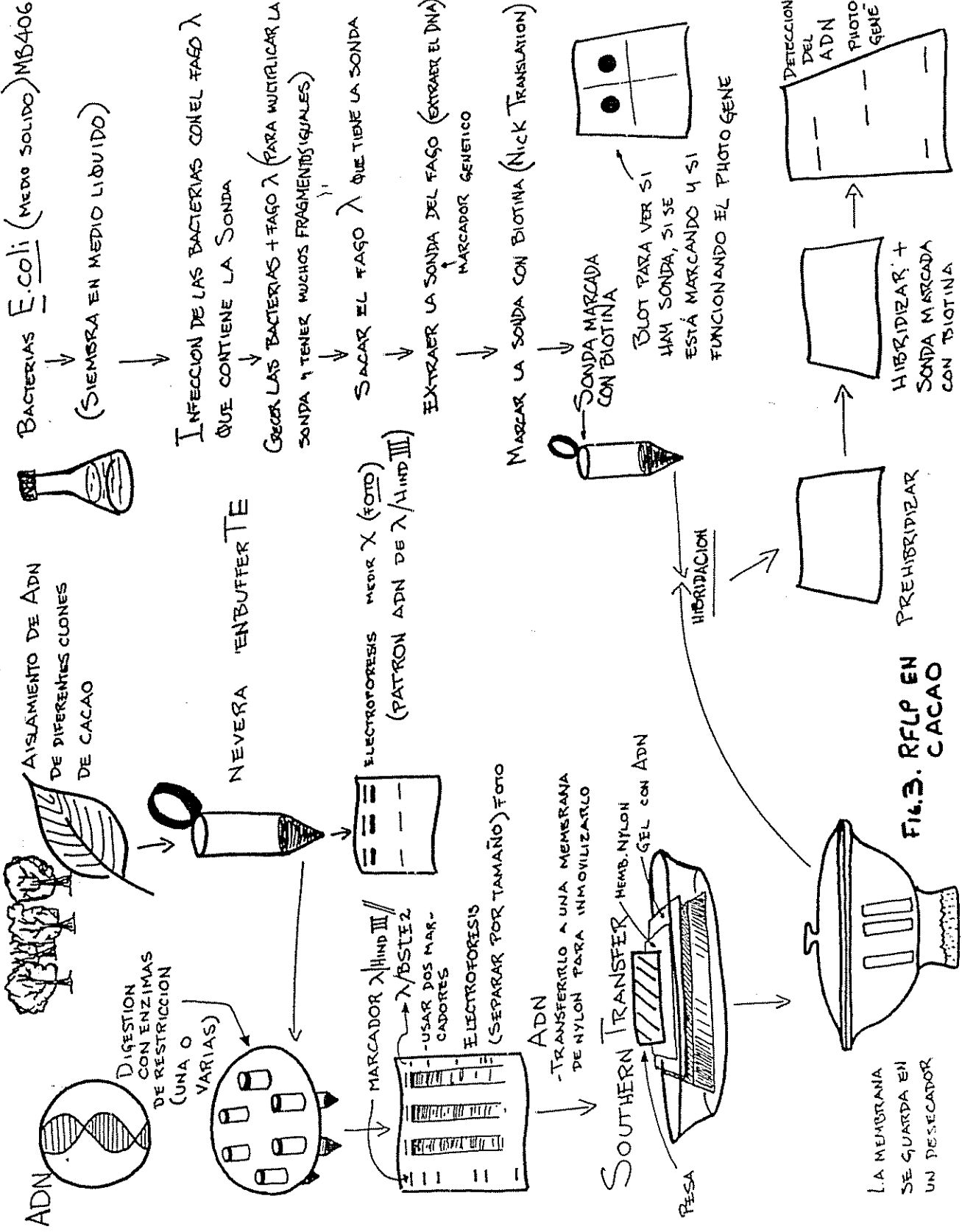


FIG. 3. RFLP EN CACAO

de lambda digerido con Hind III, BRL, Bethesda, MD., USA) al ser irradiado con una fuente de luz UV de 302 nm (Transilluminator UVP, TM-15 Inc., San Gabriel, Calif., USA), de acuerdo con Sambrook *et al.* (1989).

3.2.2 Digestión del ADN

Las enzimas de restricción utilizadas para la digestión del ADN fueron dos: a) EcoRI 5' -AATTC-3' y b) Hind III 5' -A AGCTT-3' (BRL, Bethesda, MD., USA).

Se seleccionaron estas enzimas dado el contenido de Adenina y Timina en el ADN genómico (Fritz *et al.*, 1991) y por acuerdo entre todos los laboratorios involucrados en la construcción del mapa genético en cacao.

En todos los casos se utilizaron 2 µg de ADN, el cual fue digerido con 10 unidades de EcoRI y Hind III a 37 °C durante 10 horas de acuerdo con las instrucciones del fabricante (BRL, Life Technologies), en un volumen final de 20 µl. La digestión se detuvo con 2 µl de 10X buffer: 50% (v/v), glicerol, 0,1 M EDTA, 1 % (p/v) SDS y 0,1 % azul de bromofenol. (Anexo 2).

3.2.3 Transferencia del ADN o "Southern Transfer"

Los fragmentos de ADN se transfirieron a una membrana de nylon reusable mediante la técnica descrita por Southern, 1975; el Manual de Instrucciones BRL Life Technologies, 1990 PhotoGene y Sambrook *et al.* (1989) con el propósito de inmovilizar los fragmentos de ADN. (Anexo 2.).

3.2.4 Aislamiento de las sondas

Las sondas utilizadas para el análisis de los RFLP se presentan en el Cuadro 2. Estas sondas fueron proporcionadas por el Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad del Estado de Pensilvania en 1989.

Cuadro 2. Características de las sondas de cacao utilizadas para la detección de los patrones RFLP.

CODIGO	VECTOR	LONGITUD DEL FRAGMENTO	ENZIMA QUE LIBERA FRAGMENTO CLONADO	OBSERVACIONES
151	LAMDA	13,0 + 0,04 Kb	Sfi	ADNc
	GEM-11			Amplificar en <i>E. coli</i> cw 251
154	GEM-11	13,7 + 0,19 Kb	Sfi	<i>E. coli</i> cw 251
353	GEM-11	11,6 + 0,05 Kb	Sfi	<i>E. coli</i> cw 251
354	GEM-11	14,7 + 0,00 Kb	Sfi	<i>E. coli</i> cw 251
356	GEM-11	15,9 + 0,04 Kb	Sfi	<i>E. coli</i> cw 251
357	GEM-11	15,5 + 0,05 Kb	Sfi	<i>E. coli</i> cw 251
3510	GEM-11	11,6 + 0,04 Kb	Sfi	<i>E. coli</i> cw 251
3514	GEM-11	14,6 + 0,05 Kb	Sfi	<i>E. coli</i> cw 251
21 kD	LAMBDA	1 Kb	EcoRI	<i>E. coli</i> cw 406
	GT 10			

Todas las sondas fueron obtenidas a partir de bibliotecas de ADNc. Las muestras del fago lambda fueron crecidas en junio de 1990 y contenían insertos de ADN de cacao. Las sondas fueron seleccionadas de una librería lambda Gem-11 debido a que hibridizaban con una cadena simple de ADNc preparada a partir de ARNm aislado de mazorcas después de 130 días de polinizadas. Estas sondas fueron almacenadas a -20 °C en el Laboratorio de Biología Molecular del CATIE y para el presente trabajo fueron amplificadas en *E. coli* cepa *cw 251*. Posteriormente, se realizó el aislamiento y purificación de la sonda según Febres, 1990 y Sambrook *et al*, 1989. (Anexo 3.).

3.2.5 Marcación de las sondas con biotina

Las sondas se marcaron con un método no radioactivo. Se utilizó biotina según las recomendaciones del fabricante BioNick™ Labeling System Bethesda Research Laboratories Life Technologies, Inc. Se tomaron entre 1-5 µg de ADN, y se colocaron con 5 µl de una mezcla dNTP 10X (0,2 mM dCTP, dGTP, dTTP, 0,1 mM dATP, 0,1 mM biotin-14-dATP, 500 mM Tris-HCl pH 7,8; 50 mM MgCl₂, 100 mM β-Mercaptoetanol, 100 µg/ml BSA (libre de nucleasas) y 5 µl de mezcla enzimática 10X (0,5 unidades/µl de ADN polimerasa I; 0,0075 unidades/µl de DNasa I; 50 mM Tris HCl pH 7,5; 5 mM de acetato de magnesio, 1 mM β-mercaptoetanol; 0,1 mM de fenilmetilsulfonil fluoruro 50% (v/v) de glicerol y 100 µg/ml de BSA.

El volumen final de la reacción fué de 50 µl, ajustándose con agua destilada estéril. La mezcla se incubó durante 1 hora a 16 °C y la reacción se detuvo con 5 µl de buffer de terminación de la reacción.

Con el propósito de separar los nucleótidos no incorporados de la sonda marcada, se usó el procedimiento de doble precipitación con etanol. Este método consiste en adicionar 1/10 del volumen de acetato de sodio 3M y 2 volúmenes de etanol absoluto preenfriado al tubo de reacción. Se mezcló y mantuvo a -20 °C durante 2 horas.

Posteriormente, se centrifugó a 15,000 gravedades por 10 minutos. Se removió el sobrenadante y el precipitado se resuspendió nuevamente en 50 μ l de agua estéril y se repitió el proceso anterior. Finalmente, la sonda se resuspendió en buffer TE y se almacenó a -20°C. Para comprobar si las sondas estaban marcadas se realizaron detecciones con membranas control de acuerdo con el procedimiento de PhotoGene (BRL, Life Technologies, 1990a.) (Anexo 4.).

3.2.6. Hibridación

Se siguieron los pasos descritos en el Manual de Instrucciones del PhotoGene : prehibridación, hibridación y posthibridación. (Anexo 4.).

3.2.7. Detección

La detección se realizó siguiendo la metodología propuesta en el Manual de PhotoGene. En este caso, la detección se realizó mediante una reacción química luminiscente basada en la alta afinidad que tiene la estreptavidina por la biotina. La estreptavidina está conjugada con la fosfatasa alcalina. La reacción enzimática puede ser visualizada mediante la adición de un substrato adecuado (4-metoxi-4-(3-fosfatofenil) espiro [1,2-dioxetano-3,2'-adamantanol]) en 0,75 M de 2-amino-2-metil-1-propanol y activadores). La membrana se incubó a temperatura ambiente por 3-5 horas y posteriormente se detecta la luminiscencia con una película KODAK MRM-1 Min-R Diagnostic Film para mamografía. (Anexo 4.).

Se rehibridizaron las membranas eliminando la sonda por calentamiento a 100 °C durante 15 minutos en 0,1X SSC; 0,1% SDS y finalmente, un lavado en 6X SSPE durante 5 minutos a temperatura ambiente. Las membranas se dejaron secar en papel 3 MM durante 1 hora y se guardaron en un desecador.

3.2.8 Análisis de los fragmentos RFLP

El peso molecular de las bandas observadas, se estimó mediante un ajuste de regresión con un modelo logarítmico a partir de los marcadores Lambda/HindIII y Lambda/BstEII con fragmentos de peso molecular conocido.

3.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa-PCR

Se realizó un ensayo manual de esta metodología empleando la TaqPolimerasa (Cetus Perkin Elmer), la cual es una polimerasa termoestable de 94 Kda, que cataliza la adición de desoxiribonucleótidos en la dirección 5'→3' en el extremo terminal 3'-OH del ADN plantilla. Posteriormente, se realizaron ensayos con un DNA Thermal Cycler Techne PHC-2 Dri- Block.

3.3.1 Protocolo para la amplificación de ADN

Para el procedimiento de la Reacción en Cadena de la Polimerasa, se preparó una mezcla patrón de todos los reactivos, y luego se tomaron alícuotas para las reacciones individuales. El protocolo seguido se explica en el Anexo 5.

Para el experimento, se emplearon 50 ng de ADN de 'Catongo', 'Pound 12'. y los retrocruces. Se utilizaron 12 diferentes 'primers'. Las temperaturas utilizadas fueron de 93 °C durante 1 minuto, 36 °C por 1 minuto y 72 °C por 2 minutos. Se realizaron 42 ciclos y un ciclo final a 72°C durante 10 minutos. Posteriormente, se corrieron las electroforesis en agarosa al 1.2%, 100 Voltios durante 1 hora. Finalmente, se calcularon los pesos moleculares basados en un marcador (123 bp DNA ladder, BRL, Life Tech, Inc.) de peso molecular conocido.

4. RESULTADOS

4.1 Aislamiento de ADN

Para la purificación del ADN, se modificó el procedimiento sugerido por Couch y Fritz, (1990). La primera variación, consistió en adicionar el cloruro de cesio antes del bromuro de etidio en los pasos previos a la centrifugación del gradiente de densidad. Una vez que se ajustó el gradiente de densidad de cloruro de cesio a 5.7, se procedió a adicionar y disolver el bromuro de etidio en las muestras y posteriormente se sometió a centrifugación.

El segundo cambio, consistió en realizar ésta centrifugación durante un mayor número de horas al recomendado en trabajos anteriores (Febres, 1990). Las muestras se centrifugaron durante 40-45 horas a 34,000 r.p.m y 4°C.

Estos dos cambios permitieron manipular las muestras con mayor facilidad, evitar la contaminación por bromuro de etidio dentro del laboratorio, obtener bandas de ADN en un 95% de los casos y aislar las bandas de ADN sin necesidad de utilizar luz ultravioleta para su visualización.

Con este procedimiento, se obtuvieron rendimientos de ADN entre 2-5 $\mu\text{g/g}$ de hojas de cacao. Las preparaciones de ADN fueron de muy buena calidad, sin degradación y con muy poca contaminación de ARN (Figura. 4a.). Los rendimientos, fueron independientes del color de las hojas (verde o púrpura). En cambio, bajo las condiciones utilizadas, los rendimientos estuvieron muy relacionados con la edad de las hojas (consistencia), estado fisiológico de la planta y los daños (hormigas o larvas de insectos) que presentaban las hojas al momento de tomar las muestras (Anexo 1.). Los mejores rendimientos (5 $\mu\text{g/g}$) se obtuvieron cuando se tomaron hojas sanas durante la época de lluvias. Las hojas jóvenes y expandidas dieron siempre los mejores resultados. No se pudo extraer ADN de hojas maduras de los árboles de campo, con esta metodología.

El método de cuantificación del ADN, comparando la luminosidad de una muestra de concentración desconocida, con el marcador lambda de

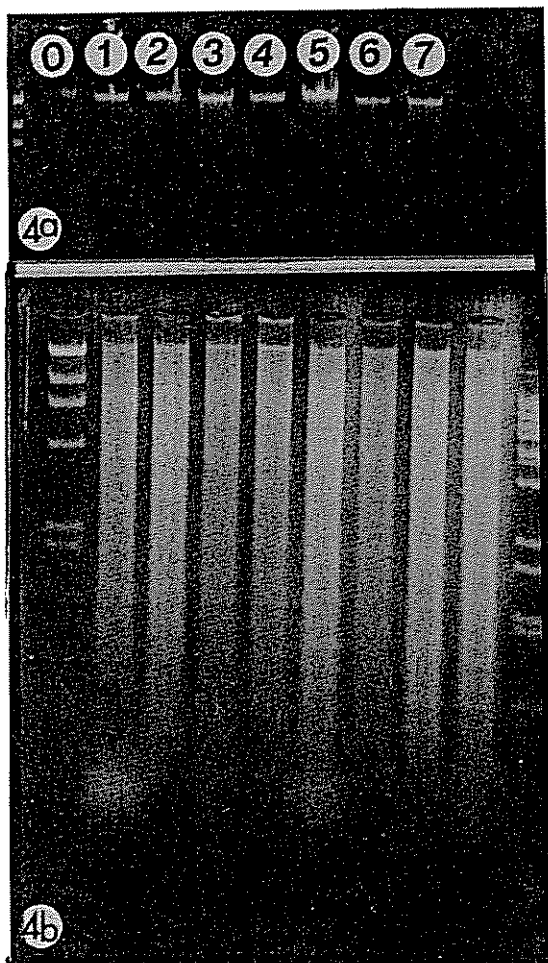


Figura. 4a. Electroforésis horizontal de agarosa 1% de diferentes árboles pertenecientes a la familia de cacao del CATIE. La primera línea contiene el marcador lambda digerido con Hind III. En 0= ADN de Catongo; 1= ADN de Pound 12; 2=ADN RC # 2; 4=ADN RC #170; 5=ADN RC #180; 6=vacio; 7 y 8= ADN de RC # 3.

Figura. 4b. Electroforésis horizontal de agarosa 1% del ADN de cacao (2 μ g) digeridos con enzimas de restricción (10 U/ μ g). Primera línea Marcador lambda digerido con Hind III. Las siguientes líneas de izquierda a derecha muestran diferentes ADN digeridos con EcoRI. La línea final contiene el marcador lambda digerido con PstII.

concentración conocida y digerido con Hind III en los geles, mostró ser el método más rápido y confiable para determinar la concentración y pureza del ADN.

Las muestras de todos los clones fueron digeridas totalmente con enzimas de restricción (10 U/ μ g) durante una hora de incubación a 37°C (Figura. 4b). Con ello, se probó el grado de pureza del ADN extraído. Las muestras que mostraban contaminación con ARN, fueron sometidas a una incubación con RNasa durante 30 minutos a temperatura ambiente, antes de usar la enzima de restricción. Las muestras de ADN obtenidas por esta metodología fueron usadas para los experimentos de RFLP y PCR.

4.2 Aislamiento de las sondas para los ensayos RFLP

De la colección de 10 sondas que se mantenían en la bacteria *E. coli* cepa 251, los siguientes son los resultados de las pruebas de lisis. El fago lambda conteniendo las sondas (#151 y #354) había perdido su capacidad de infectar las bacterias, ya que no se encontró ninguna colonia en los platos de cultivo. Tres de las sondas, también insertadas en el fago lambda e identificadas con los números 353, 356 y 357 infectaron las bacterias, pero al realizar el recuento de colonias se encontraron entre 6-10 colonias por caja de Petri. Se recogió el lisado, se concentró y éstos fagos se volvieron a inocular junto con las bacterias, con el propósito de volver a activar el fago. Sin embargo, en ninguno de los casos se obtuvo lisis total y como resultado fueron descartadas estas cinco sondas.

Cuando se cultivó el fago lambda, que contenía las sondas # 154; 358; 3510; 3513 y 3514, junto con las bacterias se encontró lisis total. El ADN de las sondas, que fué amplificado gracias al crecimiento bacterial, fué inicialmente cuantificado (Figura. 5a.). Posteriormente, marcado con biotina (Figura. 5b.) y finalmente hibridado con el ADN de los diferentes árboles de cacao inmovilizado en las membranas de nylon. La detección se realizó por el

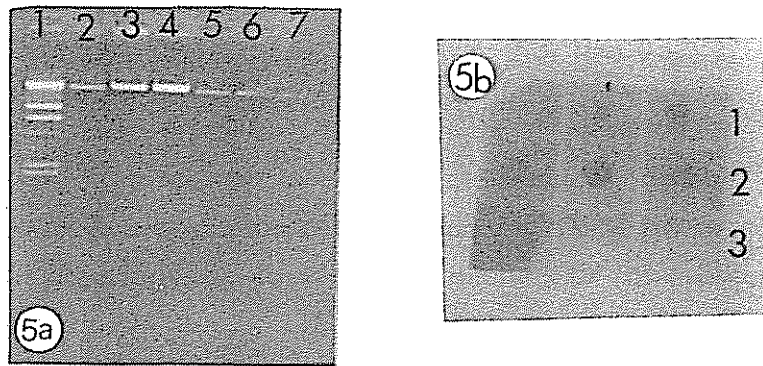


Figura. 5a. Cuantificación de las sondas lambda ADN. De izquierda a derecha 1= Marcador lambda ADN digerido con Hind III; 2= Sonda # 154; 3= Sonda #358; 4= Sonda #3510; 5= Sonda #3513; 6 y 7= Sonda #3514.

Figura. 5b. Marcación de las sondas con biotina. En la primera fila de izquierda a derecha sondas biotinizadas #154 y 358; En la segunda fila sondas #3510; 3513; y 3514. En la última fila lambda ADN control.

sistema de PhotoGene. Sin embargo, no se obtuvieron bandas de hibridación con ninguna de las sondas empleadas en las diferentes membranas.

Debido a que no se obtuvieron bandas de hibridación con las sondas empleadas, se repitió el ensayo con otra sonda. En esta nueva prueba, se utilizó la sonda 21 kD que corresponde a un gen de proteína de reserva de semilla. Para cada uno de los geles que contenían los fragmentos de digestión del ADN de las diferentes muestras de cacao, se encontró una ecuación de regresión y con estos datos se determinaron los pesos moleculares.

En la Figura 6. se muestra el resultado de la hibridación de esta sonda con el ADN de: 'Catongo', 'CATIE 1000', Retrocruces # 3, 100, 132, 170, 171 y 185, luego de la digestión con Hind III.

El Cuadro 3. presenta los pesos moleculares de los fragmentos detectados, luego de la hibridación con la sonda 21 kD. Se puede observar que en todos los ADN digeridos con Hind III provenientes de los árboles utilizados, se presentaron las bandas de 6,3; 5,0; 2,0 y 1,3 Kb, mostrando polimorfismo en la banda de 19,0 Kb.

La Figura 7. muestra el resultado de la hibridación de la sonda 21 kD con el ADN de: 'Catongo', 'CATIE 1000', Retrocruces 3, 100, 170, 171, 185, luego de la digestión con EcoRI.

En el Cuadro 4. se presentan los pesos moleculares de los fragmentos detectados. La banda de 19,5 Kb se presentó en el 'CATIE 1000' y el retrocruce 185. La banda de 7,8 Kb se presentó en los retrocruces 171; 170; 3; 100 y en el CATIE 1000. La banda de 3,2 Kb se presentó solamente en el 'CATIE 1000'. Las bandas de 16,5; 11,9; 9,8; 6,4; 3,5; 2,1 Kb se presentaron en todos los ADN de las plantas examinadas.

Al comparar las dos membranas, se observa un mayor número de fragmentos generados y mayor polimorfismo con EcoRI que con Hind III, utilizando la misma sonda en los mismos árboles. Este mismo comportamiento se encontró en otras membranas que se hibridaron con esta sonda, pero que debido al 'background' que se tuvo no se muestran los resultados.

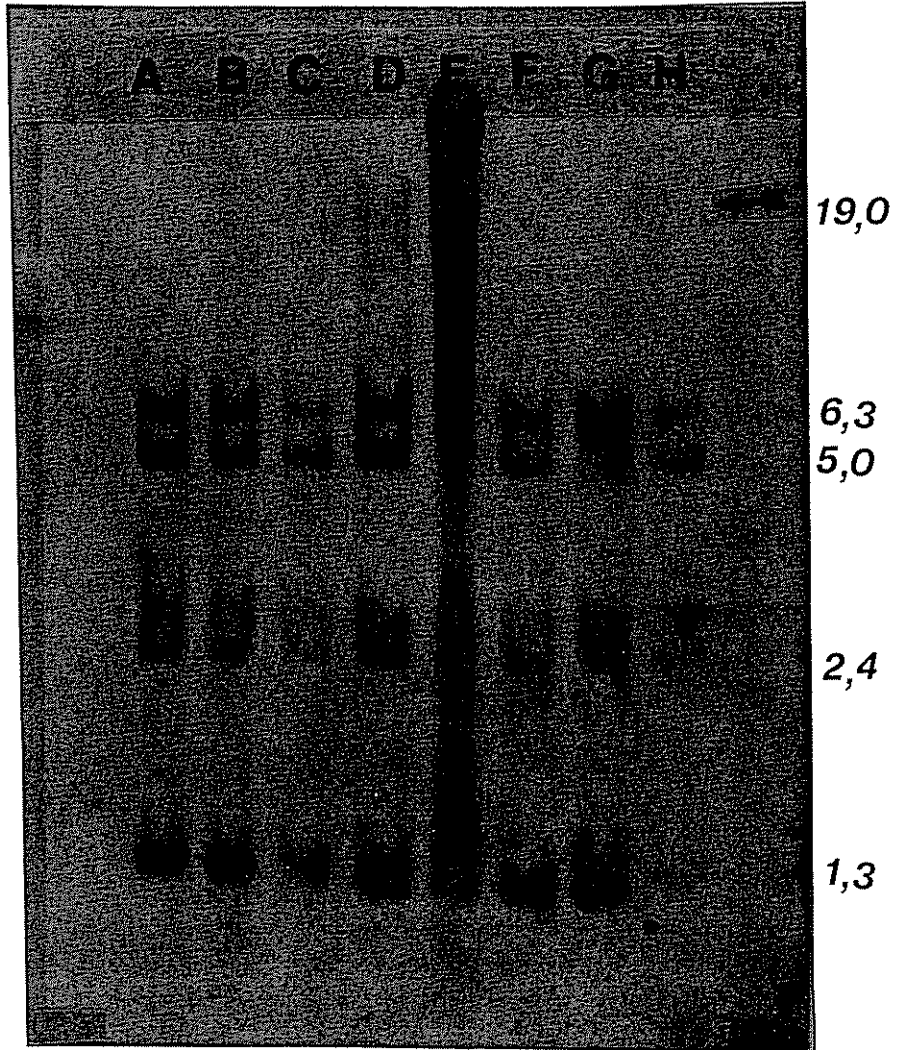


Figura. 6. Análisis RFLP mostrando los pesos moleculares de los fragmentos en Kb, del ADN nuclear del cacao digerido con Hind III e hibridados con la sonda 21 kD. Se encontró polimorfismo en la banda de 19 Kb. A= Retrocruce 171; B= Retrocruce 170; C= Retrocruce 3; D= Retrocruce 100; E= Retrocruce 132; F= Retrocruce 185; G= CATIE 1000; H= Catongo.

Cuadro 3. Longitud de los fragmentos observados al digerir el ADN proveniente de los retrocruces # 171; 170; 3; 100; 132; 185 y también del 'CATIE 1000' y 'Catongo'. La digestión se realizó con Hind III y la hibridación con la sonda 21 kD correspondiente a un gen de reserva de proteína de semilla. Se encontró polimorfismo en la banda correspondiente a 19 Kb.

Fragmento	Peso molecular (Kb)
1	19,0
2	6,3
3	5,0
4	2,4
5	1,3

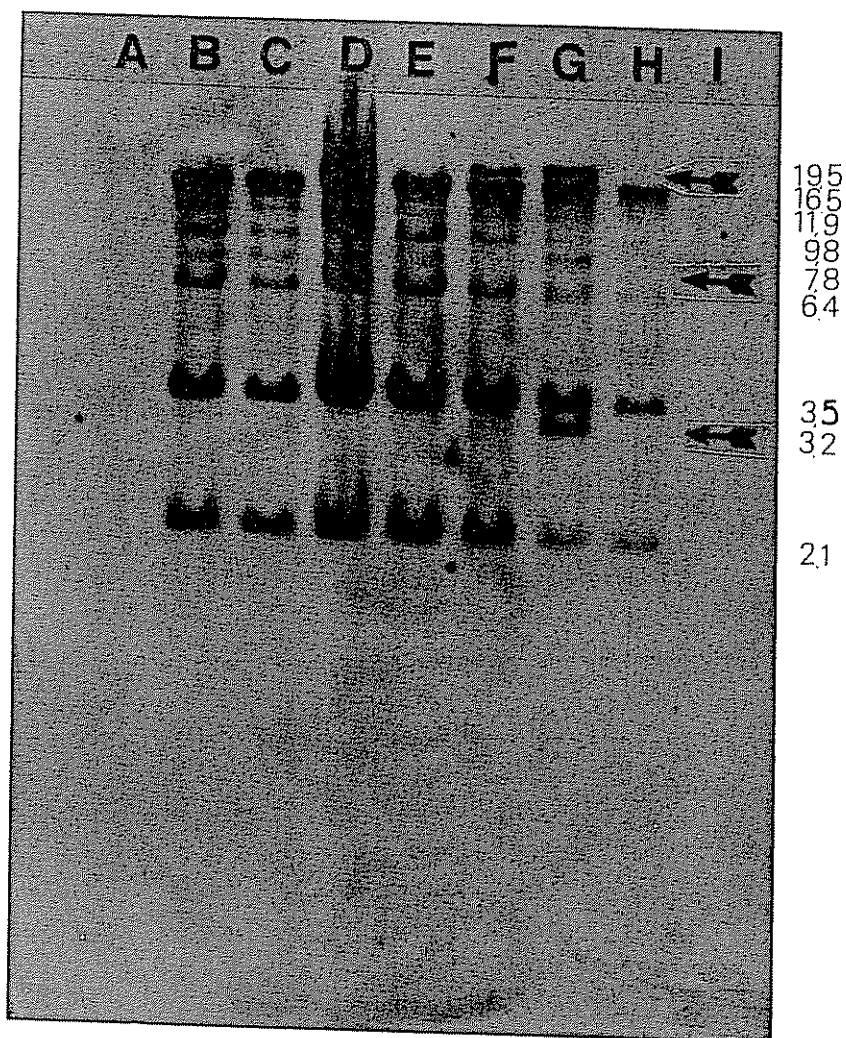


Figura. 7. Análisis RFLP mostrando los pesos moleculares de los fragmentos en Kb, del ADN nuclear del cacao digerido con *EcoRI* e hibridados con la sonda 21 kD. Se presentaron tres bandas polimórficas en 19,5 Kb; 7,8 Kb y 3,2 Kb. A= Marcador Lambda/*Hind* III. B= Retrocruce 171; C= Retrocruce 170; D= Retrocruce 3; E= Retrocruce 100; F= Retrocruce 185; G= CAHE 1000; H= Catongo; I= Marcador lambda/*BstE* II.

Cuadro 4 Longitud de los fragmentos observados al digerir el ADN proveniente de los retrocruces = 171; 170; 3; 100; 185 y también del 'CATIE 1000' y 'Catongo'. La digestión se realizó con EcoRI y la hibridación con la sonda 21 kD correspondiente a un gen de reserva de proteína de semilla. Se encontró polimorfismo en las bandas correspondientes a 19,5 Kb; 7,8 Kb y 3,2 Kb.

Fragmento	Peso molecular (Kb)
1	19,5
2	16,5
3	11,9
4	9,8
5	7,8
6	6,4
7	3,5
8	3,2
9	2,1

4.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa - PCR

4.3.1 Selección de los 'primers' en los padres

Con el fin de buscar 'primers' que mostraran polimorfismo con el ADN proveniente de los padres seleccionados ('Catongo' y 'Pound 12'), se probaron veinte 'primers' del juego A de los 20-mer (Operon Technologies, Alameda, USA).

De los veinte 'primers' utilizados, nueve no proporcionaron productos de amplificación. Los otros once 'primers' fueron polimórficos. Pero, solamente aquellos 'primers' que proporcionaron presencia de bandas en 'Pound 12' y ausencia de bandas en 'Catongo' para el mismo locus fueron seleccionados para los ensayos en la progenie.

Los 'primers' seleccionados para utilizarlos en el estudio de la progenie fueron los siguientes:

'primers'

5'-----3'

OPA-01 CAGGCCCTTC

OPA-09 GGGTAACGCC

OPA-03 AGTCAGCCAC

OPA-10 GTGATCGCAG

OPA-06 GGTCCTGAC

OPA-11 CAATCGCCGT

OPA-08 GTGACGTAGG

Este criterio de selección de 'primers' (ausencia/presencia) es arbitrario, dado que se hubieran podido seleccionar 'primers' que proporcionaran bandas presentes en 'Catongo' y ausentes en 'Pound 12', pero por conveniencia para el análisis de datos se utilizó el criterio contrario (Figura 8.).

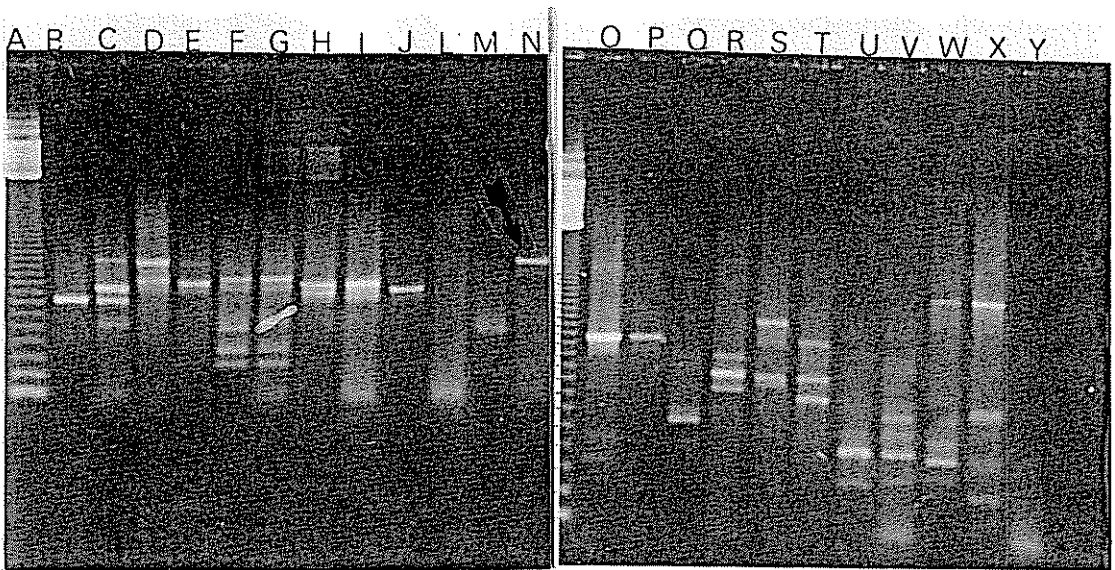


Figura. 8. Prueba para seleccionar 'primers' al azar, para diferencias entre 'Catongo' y 'Pound 12'. A la izquierda el marcador escalera de peso molecular conocido (123 pb). Se utilizaron once 'primers' con secuencias de 10 pares de bases en las reacciones PCR. 'Catongo' líneas= B,D,F,H,J,M,O,Q,S,U,W; 'Pound 12' líneas= C,E,G,I,L,N,P,R,T,V,X. Se escogieron aquellos 'primers' que estuvieran ligados en 'Pound 12' y no ligados en 'Catongo' ('primers' # 01,03,06,08,09,10 y 11).

4.3.2 Análisis de la progenie (Retrocruces)

El análisis de los retrocruces (RC) mediante los 'primers' ligados a 'Pound 12', se llevo a cabo mediante la amplificación por la técnica de PCR. Se realizaron PCR con los 'primers' OPA-01; OPA-03 y OPA-06 en los retrocruces = 2; 3; 42; 101; 102; 128; 133; 170; 180; 186; y 190. Con el 'primer' 02 no se obtuvieron productos de amplificación.

La Figura 9. muestra los productos de amplificación del OPA-03. No se obtuvo amplificación en el RC #102. Los resultados del experimento muestran diferencias en el fragmento correspondiente a 615 bp. Esta banda está presente en los RC # 2; 101; 102; 128; 133; 170; 180; 186; y 190 y la misma está ausente en el RC # 3.

En la Figura 10. se observan los productos de amplificación del OPA-06. Se encontraron diferencias en el fragmento correspondiente a 1599 pb. Las líneas 4 y 9 (RC 101 y RC 170) están vacías debido a que no se obtuvieron productos de amplificación. La banda está presente en los en los RC # 2; 3; 42; 102; 170; 186. Esta misma banda está ausente en los RC #128; 133; y 180. La última línea corresponde a una banda de un clon de cacao injertado. El ADN proveniente de este cacao, se extrajo por un método diferente (minipreparación) y se probó en este ensayo para ver si era posible amplificarlo.

Cuando se utilizaron los 'primers' obtenidos de la Universidad de British Columbia (UBC) (Cortesía del Dr. P. Fritz), los cuales eran polimórficos para 'Catongo' y 'Pound 12' Osei, J. (datos sin publicar) se encontraron bandas que segregaban en la población de retrocruces ensayados.

En vista de estos resultados, características, como semillas y flores blancas; así como hojas verdes en 'Catongo', y semillas, flores y hojas púrpura en 'Pound 12'; se podría pensar que están controladas por un gene simple. Al

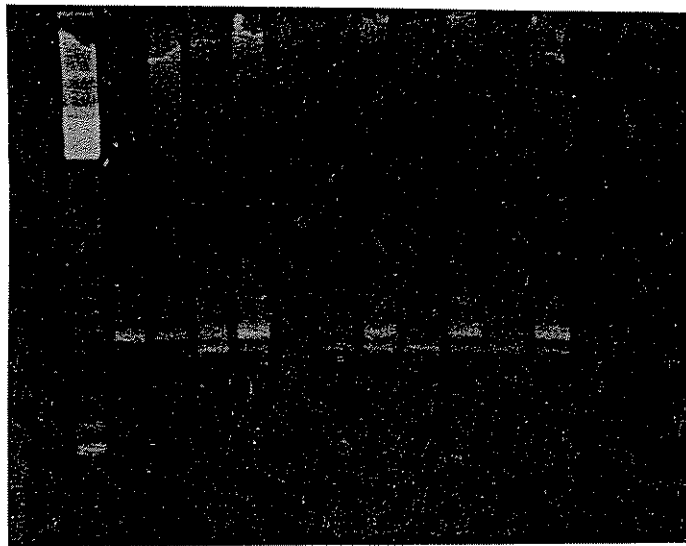


Figura. 9. Patrones de segregación para una banda de ADN polimórfico (marcador RAPD) producido por el 'primer' 03. Electroforésis en agarosa 1,2% teñido con bromuro de etidio. A la izquierda el macador escalera y en las líneas siguientes los RC # 2,3,42,101,102,128,133,170,180,186,190. Se encontraron diferencias en el fragmento correspondiente a 615 pb.

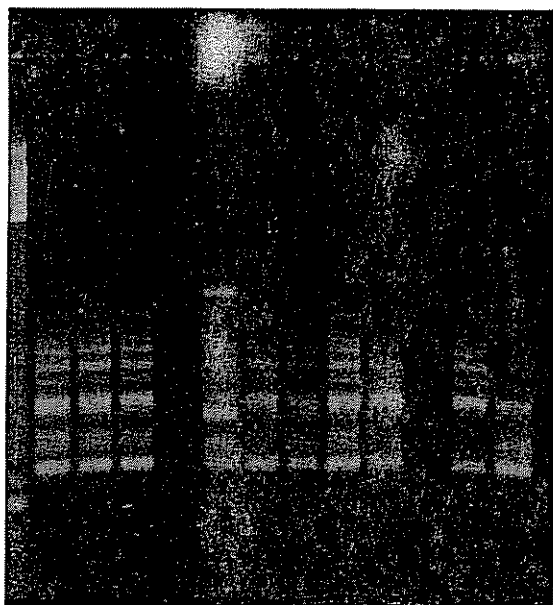


Figura. 10. Patrones de segregación para una banda de ADN polimórfico (marcador RAPD) producido por el 'primer' 06. Electroforesis en agarosa 1,2% teñido con bromuro de etidio. A la izquierda el marcador escalera y en las líneas siguientes los RC = 2,3,42,101,102,128,133,170,180,186,190. Se encontraron diferencias en el fragmento correspondiente a 1599 pb.

realizar el cruce, para el locus de un gen en particular y asumiendo homocigocidad en ambos clones y considerando el color púrpura de las semillas, flores y hojas como dominante sobre el color verde, las proporciones que se podrían predecir en la progenie de este cruce en relación al color de las hojas se presentan en el Cuadro 5.

Por esta metodología y examinando los patrones electroforéticos en la progenie de los cruces indicados, es posible determinar si un locus representado por un primer particular es homocigoto o heterocigoto. Si este exámen se realiza para un número lo suficientemente alto de loci, debería ser posible estimar el grado de heterocigocidad presente en los clones o árboles de cacao (Fritz, Comunicación personal).

Cuando se observó el ADN de los retrocruces amplificados con el primer 516 (UBC), se pueden ver diferencias en el fragmento correspondiente a 984 pb. Este fragmento está presente en los RC #3; 42; 128; 133; 170; 180; 190 y dicha banda está ausente en los RC # 2; 101; 102; y 186 (Figura 11.).

El ADN de los retrocruces amplificados con el primer 537 (UBC) muestran diferencias en el fragmento correspondiente a 738 pb. Esta banda está presente en los RC # 180 y 186 y ausente en los RC # 2; 3; 42; 101; 102; 128; 133; 170; y 190 (Figura 12.).

El ADN de los retrocruces amplificados con el primer 541 (UBC) muestran diferencias en los fragmentos correspondientes a 861 y 984 pb. El fragmento de 861 pb está presente en todos los retrocruces excepto en el RC # 102. El fragmento de 984 pb esta presente en los RC # 3; 42; 128; 133; 170; 180, 186 y 190 y ausente en los restantes (Figura 13.).

Cuando el ADN de los retrocruces amplificados con el primer 551 (UBC) fueron analizados, se observaron diferencias en el fragmento correspondiente a 730 pb. Esta banda está presente en los RC # 2; 3; 101; 133; 170; 180 y 190 y ausente en los RC # 42; 102; y 186. No se obtuvo amplificación en el RC # 102 (Figura 14.).

Cuadro 5. Proporciones fenotípicas y genotípicas para el color de las hojas de plantas de cacao del cruce 'Catongo' y 'Pound 12'. CATIE, 1992.

progenitor y/o cruce	Generación	proporción genotípica	proporción fenotípica
Catongo	padre	aa	verde
Pound 12	padre	AA	púrpura
Pound 12	padre	Aa	púrpura
Catongo X Pound 12	F1	Aa	púrpura
Catongo X Pound 12	F1	1 Aa:1 aa	1 púrpura:1 verde
Aa(F1)	F2	1aa:2Aa:1AA	3 púrpura:1 verde
Aa(F1)	RC 1*	1 aa:1 Aa	1 púrpura:1 verde
Aa(F1)	RC 2**	1 Aa:1 AA	Todas púrpura

*RC 1=[Catongo X(Catongo X Pound 12)]

**RC 2=[Pound 12 X (Catongo X Pound 12)]

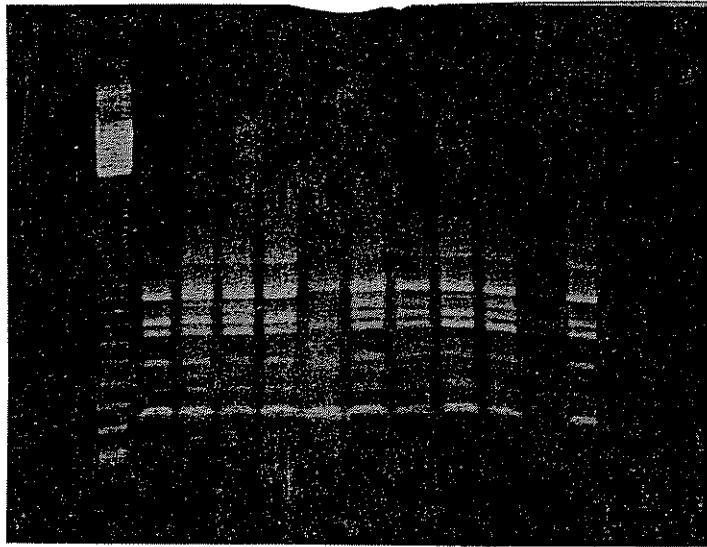


Figura. 11. Patrones de segregación para una banda de ADN polimórfico (marcador RAPD) producido por el primer 516 (UBC). Electroforesis en agarosa 1,2% teñido con bromuro de etidio. A la izquierda el marcador escalera y en las líneas siguientes los RC # 2,3,42,101,102,128,133,170,180,186,190. Se encontraron diferencias en el fragmento correspondiente a 984 pb.

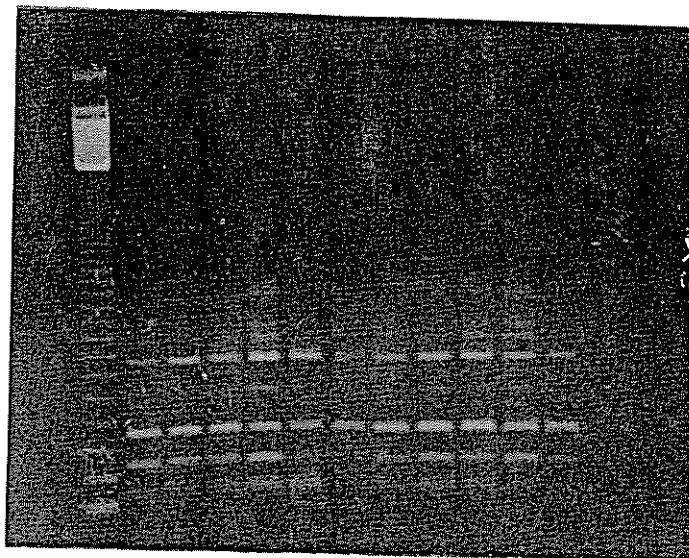


Figura. 12. Patrones de segregación para una banda de ADN polimórfico (marcador RAPD) producido por el primer 537 (UBC). Electrorésis en agarosa 1,2% teñido con bromuro de etidio. A la izquierda el marcador escalera y en las líneas siguientes los RC # 2,3,42,101,102,128,133,170,180,186,190. Se encontraron diferencias en el fragmento correspondiente a 738 pb.

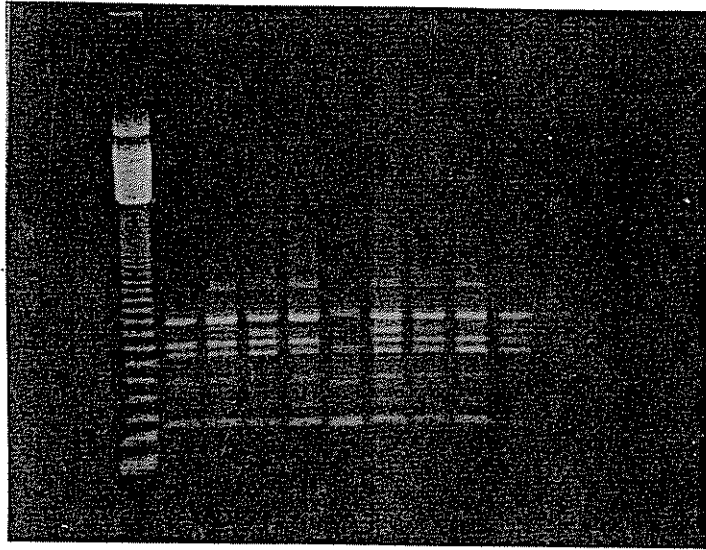


Figura. 13. Patrones de segregación para una banda de ADN polimórfico (marcador RAPD) producido por el primer 5-41 (UBC). Electroforésis en agarosa 1,2% teñido con bromuro de etidio. A la izquierda el marcador escalera y en las líneas siguientes los RC # 2,3,42,101,102,128,133,170,180,186,190. Se encontraron diferencias en los fragmentos correspondientes a 861 y 984 pb.

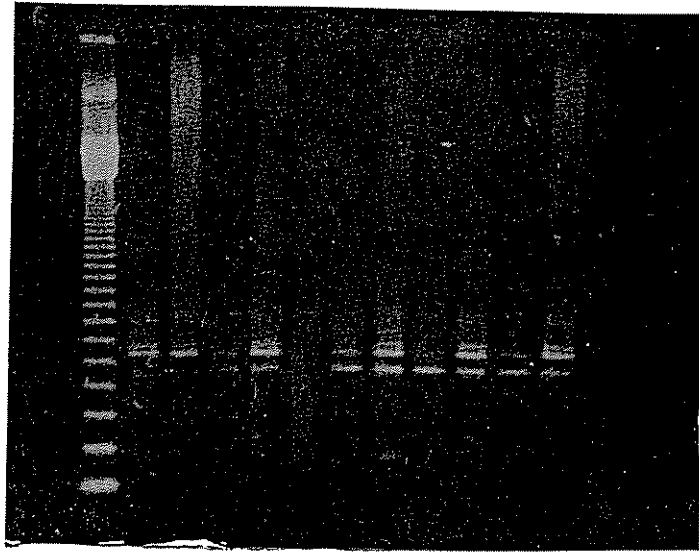


Figura. 14. Patrones de segregación para una banda de ADN polimórfico (marcador RAPD) producido por el primer 551(UBC). Electroforesis en agarosa 1,2% teñido con bromuro de etidio. A la izquierda el marcador escalera y en las líneas siguientes los RC = 2,3,42,101,102,128,133,170,180,186,190. Se encontraron diferencias en el fragmento correspondiente a 730 pb.

El ADN de los retrocruces amplificados con el primer 553 (UBC) muestra diferencias en el fragmento correspondiente a 553 pb. La banda está presente en los RC # 2; 42; 101; 102; 133; 170; 180; y 186 y ausente en los RC # 3; 128 y 190 (Figura 15.).

Los pesos moleculares de las bandas amplificadas, se determinaron mediante el marcador escalera de peso molecular conocido. El Cuadro 6. resume la longitud de los fragmentos polimórficos amplificados en la población estudiada del retrocruce [('Catongo' X 'Pound 12') X 'Catongo'].

Estos datos sobre presencia o ausencia de bandas, pueden ser codificados en una hoja de datos de acuerdo a las instrucciones dadas por los creadores del programa MAPMAKER (Lander *et al*, 1987). Si se observa el Cuadro 7. de determinación alélica, se puede notar que si el primer está ligado a Pound en un cruce como el que se sugiere para los retrocruces de el presente estudio, el cual es CC X CP; entonces si el primer está unido a 'Pound 12' (ligado o presente como una banda) quiere decir que es heterocigoto (CP) para esta característica. Esto se aplica en este caso particular, en que se han realizado los supuestos de homocigocidad de los padres.

De acuerdo con los datos de campo de los retrocruces (RC 1), la mitad de las plantas producen hojas verdes y la otra mitad hojas púrpura (1:1) (Jorge Morera, Comunicación personal). Estos resultados son consistentes con un gen simple que determina el color de las hojas, dicho gen está controlado de una manera dominante-recesiva, que se expresa tanto en el color de las hojas, semillas y flores y es homocigoto tanto para el 'Catongo' (AA) como para el 'Pound 12' (aa) en esta familia.

Consecuentemente, para investigar la zigocidad alélica utilizando los PCR y determinar si un locus es homocigoto o heterocigoto para un clon o una planta en particular; se pueden examinar en los patrones electroforéticos para la presencia o ausencia de fragmentos de ADN amplificados en lugar de observar el color de la semilla o de las hojas.

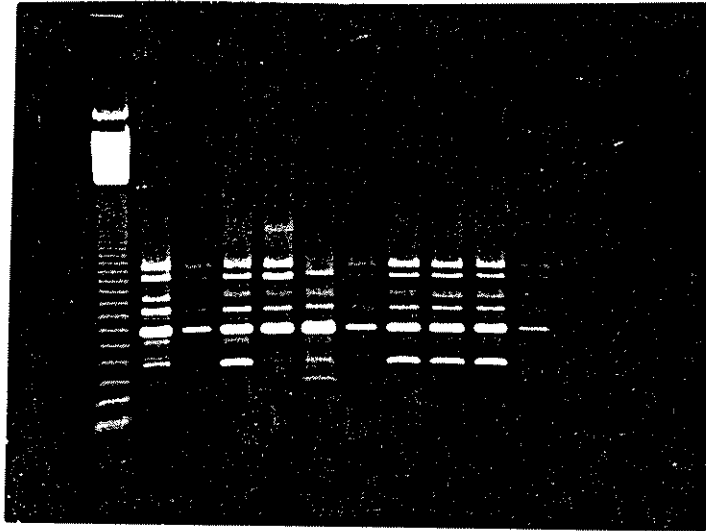


Figura. 15. Patrones de segregación para una banda de ADN polimórfico (marcador RAPD) producido por el primer 553 (URC). Electroforesis en agarosa 1,2% teñido con bromuro de etidio. A la izquierda el marcador escalera y en las líneas siguientes los RC 2,3,42,101,102,128,133,170,180,186,190. Se encontraron diferencias en el fragmento correspondiente a 553 pb.

Cuadro 6. Segregación de fragmentos amplificados de longitud polimorfica en (Catongo y Pound 12) X Catongo (Retrocruces). CATIE, 1992.

Primer #	Secuencia del primer	Tamaño del fragmento pares de bases (pb)
OPA-03	AGTCAGCCAC	615
OPA-06	GGTCCCTGAC	1599
516	AGCGCCGACG	984
537	CGAAAGGACT	738
541	GCCOCTTTAC	861
541	GCCOCTTTAC	984
551	GGAAGTCCAC	730
553	TCCGAGATCG	553

Las posibles combinaciones de loci entre los dos clones se presentan en el Cuadro 7. Estas combinaciones, pueden ser aplicables a cualquier característica e incluyen las siguientes posibilidades: (1) ambos homocigotos (2) ambos heterocigotos (3) 'Catongo' homocigoto y Pound 12 heterocigoto (4) 'Catongo' heterocigoto y 'Pound 12' homocigoto. Si se representa un sitio PCR con un 'primer' determinado para el 'Catongo' como C, y el sitio homólogo en el 'Pound 12' como P, la presencia o ausencia de fragmentos de ADN amplificados nos indica, si el "primer" se une a sólo uno de estos sitios.

Este polimorfismo es muy útil en la deducción de la condición alélica. Basado en la clave la cual denota 'B' = homocigoto para el alelo b de este locus y "D"= no homocigoto para el alelo b (cualquier genotipo aa o ab) los datos transformados con esta clave están en la Cuadro 8. Los datos obtenidos hasta la fecha, no son suficientes para generar un mapa preliminar. Dada la cantidad de 'primers' y número de árboles empleados en el presente trabajo, éstos datos serán usados para complementar un primer mapa que se ha desarrollado en la Universidad del Estado de Pensilvania por Fritz, *et al*, 1992 en el cual se examinaron 38 'primers' polimorficos ligados a P en 20 árboles pertenecientes a los retrocruces del CATIE.

Este mapa se encuentra en la Figura 16. y proporciona información concerniente a las frecuencias de recombinación, distancias y orden de los marcadores.

Cuadro 7. Determinación de los Alelos usando la Reacción en Cadena de la Polimerasa. El 'primer' en este caso está ligado a 'Pound 12' y ausente en 'Catongo'. Además dadas las proporciones fenotípicas observadas en el campo (1:1) el tipo de cruce sería CC X CP. CATIE, 1992.

CRUCE	Proporción en la progenie	Primer ligado a 'Catongo'	Primer ligado a 'Pound 12'
CC X PP	Todos CP	Todos	Todos
CP X CP	1CC:2CP:1PP	3:1 +/-	3:1 +/-
CC X CP	1CC:1CP	Todos	1:1 +/-
CP X PP	1CP:1PP	1:1 +/-	Todos

Cuadro 8. Datos transformados de los resultados de los ensayos de RAPD de los retrocruces de cacao Finca Experimental "Cabiria". Informacion proveniente de siete 'primers' y once retrocruces. Clave: D= Presente; B= Ausente; -= Datos faltantes.

'Primer'	Retrocruces											
	#	2	3	42	101	102	128	133	170	180	186	190
OPA-03		D	B	D	D	-	D	D	D	D	D	D
OPA-06		D	D	D	-	D	B	B	-	B	D	B
P 516		B	D	D	B	B	D	D	D	D	B	D
P 537		B	B	B	B	B	B	B	B	D	D	B
P 541		D	D	D	D	B	D	D	D	D	D	D
P 541		B	D	D	B	B	D	D	D	D	D	D
P 551		D	D	B	D	-	B	D	D	D	B	D
P 553		D	B	D	D	D	B	D	D	D	D	B

Data File: Gr0up 7 map
 Map Scale is 10.0 cM per cm
 Haldane Mapping Function
 Segment Break Dist \geq 999.9 cM
 Segment Break Frac \geq 50.0 %
 Log-Likelihood : -65.79
 Iterations : 6
 Longest Seg cM : 105.949
 Loop Tolerance : 0.010
 Inner Tolerance: 0.010

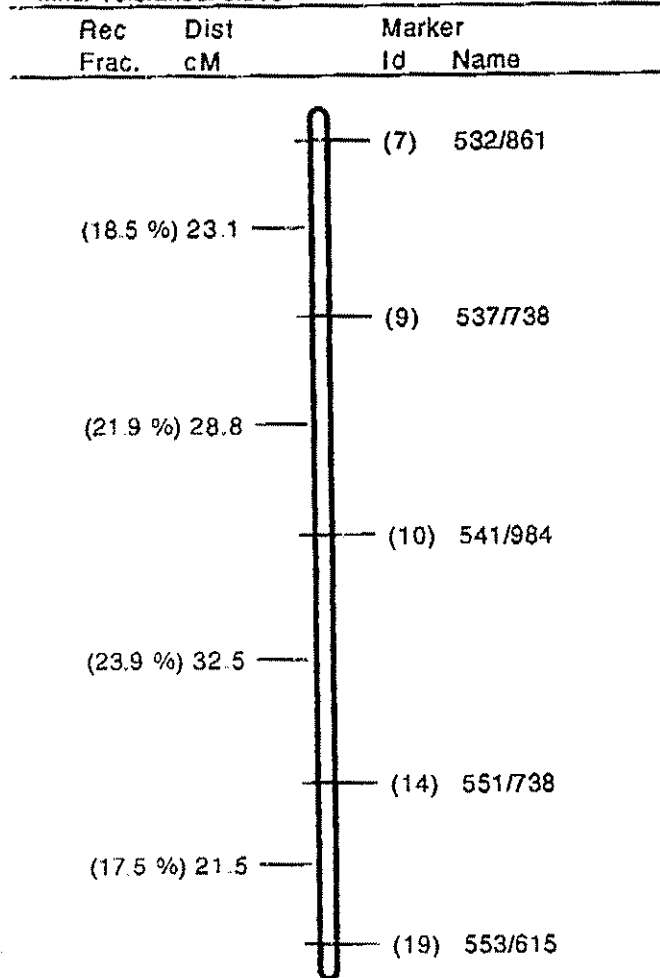


Figura. 16. Mapa preliminar de ligamiento genético para el grupo de ligamiento # 4. en *Theobroma cacao* L. (Tomado de Fritz, et al, datos sin publicar). Se presenta información sobre las frecuencias de recombinación, distancias y orden de los marcadores.

5. DISCUSION

5.1 Aislamiento de ADN

Diferentes métodos de aislamiento de ADN en cacao han sido descritos por varios autores (Couch y Fritz, 1990; Febres, 1990; Figueira *et al*, 1992; Wilde, *et al*, 1992). Cada una de estas metodologías, han encontrado diferencias en los rendimientos del ADN obtenido. Los rendimientos del ADN, han sido asociados con factores relacionados con la planta misma, el procedimiento, y la presencia de fenoles, látex, polisacáridos o compuestos mucilaginosos que hacen de la extracción de ADN de algunas plantas un proceso lento y en algunos casos complicado.

En cuanto a la planta misma, el estado fisiológico, la edad de la planta, edad de las hojas, daños al momento de tomar la muestra, y rapidez en el procesamiento de las muestras, han sido factores que influyen sobre los rendimientos (Varadarajan y Prakash, 1991). En el caso de las hojas maduras, de las cuales no se pudo extraer ADN, pudo deberse al hecho de que las células ya no están en división celular y por lo tanto contienen muy poco ADN en sus núcleos.

Durante el procedimiento para aislar el ADN, las membranas celulares se rompen para liberar los ácidos nucleicos. Este proceso también destruye otras membranas de vacuolas, plastidios, etc. Al romperse estos plastidios se liberan productos como polifenoles, secreciones mucilaginosas etc, que se encuentran compartimentalizadas en la célula. Bajo estas circunstancias, los ácidos nucleicos forman complejos con compuestos secundarios, polisacáridos y proteínas, algunos de los cuales llegan a oxidarse ligándose irreversiblemente al ADN, dando como resultado una matriz gelatinosa y en muchos casos oscura que hace que se pierda el ADN o el rendimiento sea muy bajo (Varadarajan, y Prakash, 1991).

Figueira *et al*, 1992 describen un método muy similar al descrito por Couch y Fritz, 1990 para aislar el ADN de cacao. Esta metodología incluye la dialisis del ADN contra buffer TE durante toda la noche, y con ello logran

eliminar los polisacáridos que se han asociado al ADN. Los rendimientos obtenidos están entre 2-10 $\mu\text{g/g}$ de material inicial, muy similares a los obtenidos en el presente trabajo.

La técnica de extracción (mezcla de reactivos, orden de agregado de los mismos durante el procedimiento), tiene una marcada influencia sobre las pérdidas de ADN durante el proceso (Webb y Knapp, 1990).

Dependiendo de los objetivos de la investigación, es posible obtener cantidades suficientes de ADN, de muchas muestras al mismo tiempo. Se emplean, los métodos llamados de minipreparaciones. En esta técnica, se aísla el ADN con la calidad suficiente para poder restringirlo, pero no tan puro como cuando se emplea el método del cloruro de cesio. Sin embargo, es suficientemente puro como para poder realizar PCR (Varadarajan, y Prakash, 1991).

Otros protocolos usados en cacao, involucran el uso del CTAB. Esta metodología no ha dado buenos resultados. Durante el desarrollo del trabajo se ensayó una metodología usando CTAB, pero el resultado fué una masa pegajosa de la cual no se pudo precipitar el ADN, experiencia que fué ya descrita por Febres, 1990.

En la actualidad, existe una metodología de minipreparaciones de ADN para cacao la cual es un método modificado de Edwards-NAR, 1991 por (Wilde y Russel's, Comunicación personal). Con este procedimiento, se puede obtener ADN suficiente para 50 reacciones PCR. Es un método rápido, sencillo y con el cual se pueden procesar muchas muestras al mismo tiempo. Ha sido probado con éxito en café y cacao (Wilde *et al*, 1992; Fritz, 1992).

Esta metodología aceleraría el procesamiento de preparación de las muchas muestras que son necesarias durante la construcción del mapa de ligamiento por medio de PCR. Posiblemente, para los ensayos con RFLP se deba mantener el grado de ADN del tipo 'cloruro de cesio' en la preparación de las muestras y continuar con la metodología convencional.

Las dos modificaciones introducidas a esta última metodología utilizando cloruro de cesio, proporcionaron rendimientos similares a los de Figueira, 1992 y Febres, 1990 (2-10 $\mu\text{g/g}$) y permite en la práctica manipular con menores riesgos el bromuro de etidio.

Por lo tanto, dependiendo del objetivo del trabajo, se deba continuar usando el método convencional para obtener ADN grado 'cloruro de cesio' para los trabajos con RFLP. Cuando el ADN obtenido vaya a ser usado con la técnica del PCR se podría aislar el ADN bajo la técnica descrita por Wilde, 1992.

5.2 Aislamiento de las sondas para los ensayos RFLP

El fago lambda en el cual estaban insertadas las sondas mostró dos comportamientos diferentes. En unos casos se obtuvo lisis total y en otros casos ocurrió posiblemente un proceso de lisogenia. Se conoce que durante el proceso de infección del fago lambda, se pueden presentar dos vías de replicación: (1) Un crecimiento lítico, donde el ADN viral es replicado cientos de veces sintetizándose el resto de los componentes del bacteriófago. A partir de dichos componentes se ensamblan nuevas partículas del bacteriófago liberando nuevas partículas así formadas mediante la lisis celular (Sambrook *et al*, 1989). (2) Un crecimiento lisogénico, donde el genoma del bacteriófago se integra al ADN huésped en un sitio específico por un proceso de recombinación. Este genoma se replica y transmite a la progenie de la bacteria como si fuera otro gen cromosómico. Durante la lisogenia sólo un gen se expresa: el gen *ci* el cual codifica para un represor (Sambrook *et al*, 1989).

También se sabe que existen dos proteínas (R y S) del bacteriofago que son necesarias para la lisis del huésped y liberación de la progenie. Una mutación en el gen S previene o retrasa la lisis (Sambrook *et al*, 1989). Al no obtenerse lisis en cinco de las sondas, se puede suponer también que pudo ocurrir una mutación de esta naturaleza en los fagos que contenían las sondas de cacao.

Otra posibilidad, es que el fago se hubiera degradado por el tiempo prolongado de almacenamiento a -20 °C. Se sabe que la mayoría de cadenas del bacteriófago lambda son estables por varios años cuando se almacenan a 4 °C en SM con cloroformo al 0,3%.

Sin embargo, muchos investigadores han encontrado que algunos recombinantes pierden la viabilidad cuando se almacenan en esta forma por unos pocos meses. Este problema, se evita con el uso de cloroformo fresco o con cloroformo que ha sido extraído con bicarbonato de sodio anhidro para remover productos de fotólisis. También se ha recomendado cada 2-3 meses revisar las soluciones stock y de tener facilidades almacenar el bacteriófago a -70 °C para periodos prolongados (Sambrook *et al*, 1989).

Posiblemente, en aquellos cultivos en que se encontraron pocas placas de lisis, los fagos continuaron su vía lisogénica, ó sufrieron una mutación ó posiblemente se inactivaron.

Dado que se logró aislar, cuantificar y marcar las sondas # 154; 358; 3510; 3513; y 3514. Estas se hibridaron con diferentes membranas, pero no se obtuvieron bandas de hibridación. Existe la posibilidad de que por alguna razón después de un periodo prolongado de almacenamiento, los fagos pueden perder parte del fragmento de ADN o digerir dicho fragmento haciendo imposible el proceso de hibridación.

Para conocer si en efecto el fragmento de ADN está presente en el fago, se debería someter al fago a un proceso de restricción con la misma enzima con la que fué insertado el ADN del cacao. Este paso no se realizó debido a que no se contaba con la enzima de restricción.

Para futuros procedimientos con el almacenamiento de las sondas, posiblemente sea necesario mantener las sondas tal como lo describe Sambrook *et al*, 1989 y mantener un duplicado de estas.

5.2.1 Hibridación con la sonda 21 kD

Tal como se mostró en los resultados, la digestión del ADN proveniente de los diferentes retrocruces con Hind III originó un menor número de fragmentos y el polimorfismo fué menor, en comparación con el polimorfismo encontrado al digerir el ADN de estos mismos retrocruces con EcoRI. LO mismo ocurrió con otras membranas que fueron utilizadas con la misma sonda (buffer de hibridación), pero que por razones del "background" que se tenía no se presentaron los datos.

Dado que uno de los objetivos de este trabajo era identificar la combinación sonda/enzima que originara mayores niveles de polimorfismo; de este ensayo se puede concluir que la digestión con Eco RI proporciona un mayor nivel de polimorfismo en la familia de cacao estudiada, que la digestión con la enzima Hind III.

Con base en los resultados obtenidos, se pueden realizar consideraciones prácticas para el futuro. Entre ellas las relacionadas con la construcción de librerías para la obtención de sondas. Las sondas derivadas de ADN copia (ADNc), tienen la ventaja sobre las sondas de librerías genómicas (ADNg), en que tienden a ser bastante conservadas evolutivamente entre las taxas relacionadas. Por lo tanto, son de gran valor en los estudios de RFLP. Una desventaja de las librerías de ADNc, es que codifican secuencias que no se transcriben en forma equivalente, dando como resultado repeticiones en la librería. De hecho, a partir de evaluaciones preliminares, se ha observado que algunas de las secuencias han sido duplicadas varias veces en la librería de ADNc de árboles de pino (Devey *et al*, 1991).

Una alternativa ventajosa podría ser el uso de secuencias al azar de ADN genómico como sondas. Estas sondas, detectan una mayor variabilidad, debido a que están constituidas principalmente por secuencias que no codifican ningún producto. Esta secuencias, tienden a acumular alteraciones genéticas y por lo tanto pueden detectar una distribución más al azar de los loci. Una desventaja de estas sondas, es que un número significativo de ellas podría repertirse en la librería. Para limitar el número de secuencias repetidas, se podrían usar enzimas de restricción sensibles a la metilación

como la BamHI y la PstI (Helentharis et al, 1988). Estas enzimas no cortan el ADN metilado en la citosina, el cual es prevalente en secuencias repetitivas (Devey et al, 1991).

El resultado obtenido de este trabajo, demuestra nuevamente que los RFLP en esta familia de cacao, puede proporcionar un número significativo de marcadores moleculares que pueden contribuir en la construcción de un mapa de ligamiento. Además, la literatura ha informado sobre las múltiples aplicaciones de los RFLP en el mejoramiento convencional. Se han encontrado marcadores RFLP asociados con: resistencia a *Phytophthora* en soya (Diers et al, 1992b.); resistencia a *Pseudomonas* en tomate (Martin et al, 1991); contenido de aceite y proteínas en soya (Diers, et al, 1992a.); y en la selección de padres basado en marcadores moleculares (Dudley et al, 1992) entre otras muchas aplicaciones.

5.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa - PCR

5.3.1 Selección de 'primer' en los padres

Los veinte 12-mer 'primer' (Operon Technologies, Inc. Alameda, USA), los cuales han sido diseñados para requerimientos de ADNs en contenido de C+G entre 60-70%, mostraron polimorfismos en casi todos los casos cuando se probaron con el 'Catongo' y el 'Pound 12'.

Se sabe que el tamaño del genoma del cacao es de aproximadamente 200,000,000 pares de bases (Couch, J. 1992). Si se asume que un gen consiste de 1000 pb, entonces en el ADN nuclear del cacao se esperarían 200,000 genes. Surge entonces la pregunta sobre cuántos marcadores se necesitarían para cubrir la mayor parte del genoma.

En general, el número de marcadores está relacionado con el tamaño del genoma, y el espaciamiento que haya entre los marcadores.

Los mapas genéticos se construyen basados en que tan frecuentemente, dos marcadores que pueden ser, tanto características físicas o

secuencias polimórficas de ADN, se heredan juntas cuando se estudia una familia. En un mapa genético, las distancias entre marcadores se miden en términos de frecuencias de recombinación. Un centimorgan (cM) representa un 1% de frecuencia de recombinación entre dos marcadores (Rose, E. 1990).

En soya por ejemplo, se ha completado un mapa genético con un total de 600 marcadores RAPD y RFLP, los cuales cubrieron 2700 cM. En maíz, se ha informado de un mapa con 209 marcadores basados en cuatro poblaciones F2, con un promedio de 113 plantas examinadas en la progenie (Beavis y Grant, 1991).

De aquí la importancia de encontrar el mayor número de marcadores RAPD o RFLP en los padres. El hecho de que con algunos de los 'primers' no se obtuvo amplificación, quiere decir que posiblemente sea necesario modificar algunos aspectos de la técnica como pueden ser modificaciones en la concentración de algunos componentes del buffer de reacción, uso de cosolventes, etc (Williams, 1989).

Carlson *et al*, 1992 realizaron modificaciones a la metodología de RAPD. Inicialmente, variaron la concentración de ADN, la concentración de magnesio, enzimas y 'primer', hasta obtener los resultados requeridos. También, encontraron que durante la amplificación del ADN, era mejor una denaturación de 7 minutos de las muestras a 94 °C, seguida de la adición de la enzima y luego 2 minutos adicionales a 94 °C con agitación. Finalmente, sometieron las muestras a 45 ciclos de amplificación y una amplificación final de 10 minutos a 72°C. Además realizaron amplificaciones secundarias por 20 ciclos y con ello lograron un nivel de resolución en los geles muy bueno.

En nuestro caso, los 'primer' seleccionados (Operon Life Technologies, Alameda, USA), funcionaron muy bien bajo las condiciones establecidas. Pero, es posible mejorar la eficiencia de la resolución, empleando algunas de las estrategias mencionadas anteriormente. Con los resultados obtenidos, se pudieron realizar los análisis respectivos en la población segregante.

Los 'primers', provenientes de La Universidad de British Columbia (UBC), los cuales ya habían sido examinados como polimórficos por Osei, J.

(Datos sin publicar), se analizaron junto con los 'primers' de la serie A en la progenie.

Los productos de amplificación en los padres ('Catongo' y 'Pound 12') produjeron diferentes patrones de amplificación. Un fragmento particular de ADN, el cual es generado para un individuo pero no para otro, representó un polimorfismo y este fragmento pudo ser usado como marcador genético. Estos marcadores, de la familia de cacao estudiada, se heredaron de manera Mendeliana tal como lo describió Williams *et al*, 1990.

Al analizar la segregación de estos marcadores en una progenie suficientemente numerosa de un cruce sexual, virtualmente se puede construir un mapa de ligamiento para cualquier especie. Por lo tanto, se espera continuar reuniendo información sobre los demás juegos de 'primers' proporcionados por Operon Technologies que tienen en la actualidad 500 'primers' en el mercado y otros 500 planeados. Con ello se busca reunir la mayor cantidad de marcadores RAPD en los padres de la familia de cacao del CATIE.

5.3.2 Análisis de la progenie (Retrocruce)

Se seleccionaron siete de los once 'primers' basados en el ligamiento del 'primer' a 'Pound 12'. Se contó con cinco 'primers' más. Aunque no en todos los padres se obtuvo un único producto, ciertos 'primers' revelaron más polimorfismos que otros (ejemplo OPA-01, OPA-06). En la progenie, fue fácil evaluar los marcadores (alelos que están segregando) por la presencia o ausencia de una banda de ADN parental coloreado con bromuro de etidio en los geles.

Es necesario, también junto con esta evaluación a nivel molecular realizar evaluaciones morfológicas de el mayor número de características fenotípicas. En la actualidad, el grupo de cacao del CATIE realiza evaluaciones periódicas de esta población segregante. Si bien, a la fecha es prematuro

realizar correlaciones, se espera encontrar muy pronto marcadores para características fenotípicas muy obvias como el color de las hojas nuevas.

Estas evaluaciones también permitirán la selección de plantas en edad temprana, para introducir las en planes de mejoramiento genético. Como se mencionó, esta es una de las potencialidades más grandes de esta técnica, cuando se trata de plantas perennes. Esta posibilidad, se basa en que se pueden escoger aquellas plantas que mayor cantidad de segmentos homólogos presenten hacia el padre recurrente, sin necesidad de esperar hasta la madurez de la planta (Carlson *et al*, 1991).

Los RAPD generados, con los 'primers' utilizados, permitieron obtener información que puede ser sumada a la información que ya se tiene sobre el grupo de ligamiento #4 (Figura. 16) del mapa de cacao generado por Osei, J. 1992. Desafortunadamente, los datos obtenidos aquí no son los suficientes para realizar una prueba de chi cuadrado para confirmar la consistencia de las proporciones. Sin embargo, los estudios realizados por Osei, 1992; muestran proporciones en la progenie de 1:1 para los marcadores seleccionados. Los datos fueron recopilados de 18 marcadores y 35 retrocruces en promedio (Fritz, comunicación personal).

En la segregación de la F1 en coníferas Carlson *et al*, (1992) encontraron un patrón de segregación 1:1 el cual correspondía a un patrón de segregación Mendeliana para los alelos en un cruce de prueba. En este caso cuando la madre es heterocigota para el alelo (presencia de banda) y el padre es homocigoto recesivo para el alelo (ausencia de banda) se confirmaron las proporciones. También, encontraron que algunos marcadores no mostraban la segregación 1:1 con algunos 'primers'. Este fenómeno no ha sido bien explicado, pero también ocurre con las isoenzimas y los RFLP (Tulsieram *et al*, 1991, citado por Carlson *et al*, 1992). Ellos sugieren que dichas aberraciones podrían ocurrir previo a la formación del cigoto.

También, encontraron otro resultado interesante. En los padres se pudo observar polimorfismo para una banda PCR, pero la banda fue persistente en toda la progenie F1. En este caso particular para la familia y el

tipo de cruce que ellos emplearon, sugieren que el cruce involucraba un alelo homocigoto en estado recesivo (Carlson *et al*, 1992).

En el análisis de segregación de la población de cacaos, los marcadores se comportaron como marcadores dominantes; y si suponemos las mismas proporciones encontradas por Osei, J. 1992 (datos sin publicar) para la progenie, se pueden realizar directamente consideraciones sobre la determinación de la cigocidad alélica. En el Cuadro 6. se observa que si se tienen las proporciones 1:1 para el 'primer' ligado a 'Pound' entonces se puede predecir para ese alelo su condición heterocigota.

Finalmente, dadas las limitaciones de número de datos, no fue posible utilizar el MAPMAKER. Este paquete ayuda a la construcción de mapas de ligamiento genético. Se basa en un análisis de ligamiento de puntos múltiples, con datos obtenidos de marcadores provenientes de poblaciones naturales (Lander *et al*, 1987).

Los 'primers' seleccionados pueden continuar usándose para evaluar las plantas que faltan de la población segregante y los datos que ya se generaron adicionarlos a los datos del mapa generado por Osei, J. 1992. De esta manera, se ha contribuido en la selección de 'primers' para la construcción de un mapa de ligamiento genético en cacao.

6. CONCLUSIONES

1. Las dos modificaciones introducidas al método de aislamiento de ADN, permitieron mantener rendimientos entre 2-5 $\mu\text{g/g}$, con la ventaja de evitar contaminaciones por bromuro de etidio en el laboratorio y eliminar las manipulaciones con luz UV durante el aislamiento de la banda.
2. El mantener sondas a -20°C , durante periodos prolongados de tiempo, puede causar la inactivación, digestión o vía lisogénica en los fagos Gt-11.
3. La enzima que mayor información proporcionó sobre polimorfismos en la familia de cacao estudiada fué la EcoRI.
4. La sonda 21 kD (inhibidor de la tripsina), es útil en la construcción de un mapa de ligamiento en esta familia. Se encontraron dos bandas que revelaban polimorfismo genético al ser digeridas por EcoRI. Una de ellas de 19,5 Kb y otra de 7,8 Kb.
5. Los operadores ensayados de la colección Operon Technologies juego A, en su mayoría son polimórficos en los progenitores 'Catongo' y 'Pound 12'.
6. Los marcadores RAPD en cacao, como en todas las demás plantas se heredan de manera Mendeliana (presencia o ausencia de bandas).
7. Los RAPD proporcionan información más rápida que los RFLP, lo cual conduce a trabajar más sobre esta primera metodología.
8. Los dos tipos de marcadores deben complementarse en la construcción del mapa de ligamiento.
9. Con cualquiera de los dos marcadores, se pueden seleccionar árboles de la población segregante que muestren mayor homología hacia el padre recurrente.

10. Las dos metodologías, pueden ser útiles en la identificación y caracterización de germoplasma.

11. En los PCR, la fase de búsqueda del 'primer' de la secuencia interés homóloga, ocurre antes de la amplificación, en orden inverso a lo que ocurre en la clonación (RFLP).

12. Los PCR, permiten variar las condiciones de rigidez de la prueba, antes de la amplificación, en orden inverso a lo que ocurre en la clonación clásica.

13. La implementación de la metodología de PCR, permite iniciar otro tipo de estudios como por ejemplo la detección de patógenos y la secuenciación directa.

7. RECOMENDACIONES

1. Para la elaboración del mapa de ligamiento en cacao, se deben utilizar todos los marcadores posibles, tanto morfológicos como moleculares. Por lo tanto, se debe continuar con el uso de los RFLP como marcadores genéticos, pero enfocados a genes específicos de interés para resistencia, o características de carácter cuantitativo.

2. Para los experimentos con RAPD, el aislamiento de ADN por medio de miniprepaciones (50 ng por reacción), posiblemente sea el más conveniente para procesar un número grande de muestras de la población segregante en cacao (191 plantas). Para los estudios de RFLP, dado que se requieren al menos 2 $\mu\text{g/g}$ y un alto grado de pureza, es necesario continuar con el método propuesto por Couch, 1989.

3. En el almacenamiento de las sondas es necesario evaluar la infectividad de los fagos cada 2-3 meses para verificar su actividad.

4. Los 'primers' de la colección Operon Technologies, Inc mostró un alto grado de polimorfismo en los padres de la familia de cacao estudiada, por lo tanto sería conveniente continuar usando este juego.

5. Intercambiar sondas polimórficas encontradas en otros laboratorios involucrados en la construcción del mapa de ligamiento.

6. Iniciar una segunda familia de cacaos, pero en esta oportunidad seleccionar el árbol de la población híbrida también con el uso de algunos marcadores moleculares y retrocruzarlo hacia Pound 12. Con ello se lograría un cubrimiento más amplio del genoma.

7. Continuar las evaluaciones de campo en los retrocruces para realizar correlaciones con los marcadores moleculares.

8. Los RAPD podrían complementar la información de la colección de germoplasma del CATIE para analizar la diversidad genética.

9. La técnica de PCR se podría utilizar para producir sondas de ADN para los análisis RFLP.

10. Los RAPD junto con los datos de campo podrían empezar a ser utilizados en la selección guiada por marcadores genéticos para iniciar la segunda familia de cacao.

11. Los resultados de todos los protocolos empleados podrían ser útiles en otros cultivos de importancia en el CATIE.

8. LITERATURA CONSULTADA

- APUYA, N. R.; FRAZIER, B. I.; KEIM, P.; JILL ROTH, E.; LARK, K. G. 1988. Restriction Fragment Length Polymorphism as genetic markers in soybean. *Glicine max* . (L) Merril. Theoretical and Applied Genetics (EE.UU.) 75: 889-901.
- BEAVIS, W. D.; GRANT, D. 1991. A linkage map based on information from four F2 populations. Newsletter 65:70-71.
- BECKMAN, S. J .; SOLLER, M. 1983. Restriction Fragment Length Polymorphism in genetic improvement: methodologies, mapping and costs. Theoretical Applied Genetics 67: 35-43.
- _____.; SOLLER, M. 1986. RFLP and genetic improvement of agricultural species. *Euphytica* (Holanda) 35: 111-124.
- 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*(EE.UU.) 32: 314-331.
- BRL LIFE TECHNOLOGIES. 1990a. PhotoGene Nucleic Acid Detection System. Instruction Manual. 26 p.
- _____. . 1990b. BlueGene Nonradioactive Nucleic Acid Detection System. Instruction Manual. 36 p.
- CAETANO-ANOLLES, G.; BRANT, J. B.; GRESSHOFF, P. M. 1991. DNA amplification fingerprinting: A strategy for genome analysis. *Plant Molecular Biology Reporter* (EE.UU.) 9(4): 294-307.
- CARLSON, J. E.; TULSIERAM, L. K.; GLAUBITZ, J. C.; LUK, V. W. K.; KAUFFELDT, C.; RUTLEGE, R. 1991. Segregation of Random Amplified DNA markers in F1 progeny of conifers. *Theoretical Applied Genetics* (EE.UU.) 83:194-200.

- CHANG, C.; BOWMAN, J. L.; DeJOHN, A. W.; LANDER, E. S.; MYEROWITZ, E. M. 1988. Restriction Fragment Length Polymorphism linkage map for *Arabidopsis thaliana*. Proceedings of the National Academy of Sciences (EE.UU.) 85: 6856-6860.
- COUCH, J. A. 1992. *Theobroma cacao* L. : Characterization of the DNA and Genome, Ph.D. Dissertation, Penn State University.
- COUCH, J. A.; FRITZ, P. J. 1990. Isolation of DNA from plants high in polyphenolics. Plant Molecular Biology Reporter (EE.UU.) 8(1): 8-12.
- DEVEY, M.E.; JERMSTAD, K. D.; TAUER, C. G.; NEALE, D. B. 1991. Inheritance of RFLP loci in a loblolly pine three-generation pedigree. Theoretical Applied Genetics (EE.UU.) . 83: 238-242.
- DIERS, B. W.; KEIM, P.; FEHR, W. R.; SHOEMAKER, R. C. 1992. RFLP analysis of soybean seed protein and oil content. Theoretical Applied Genetics (EE.UU.). 83: 608-612.
- DIERS, B. W.; MANSUR, L.; IMSANDE, J.; SHOEMAKER, R. C. 1992. Mapping *Phytophthora* resistance loci in soybean with restriction fragment length polymorphism markers. Crop Science (EEUU). 32: 377-383.
- DRAYNA, D.; WHITE, R. 1985. The genetic linkage map of the human X chromosome. Science (EE.UU.) 230: 753-758.
- DUDLEY, J. W.; SAGHAI MAROOF, M. A.; RUFENER, G. K. 1992. Crop Breeding, Genetics & Cytology. Crop Science (EEUU) 32 (2): 301-304.
- ENRIQUEZ, G. A. 1985. Curso sobre el cultivo del cacao. Turrialba, Costa Rica, CATIE. 239 p.
- _____. 1987. Manual del cacao para agricultores. San José, Costa Rica, CATIE/ACRI/UNED. 117 p.
- FEBRES, V. J. 1990. Marcadores genéticos en cacao para resistencia a la Moniliasis. Tesis Mag. Turrialba, Costa Rica, CATIE. 100 p.

- FIGUEIRA, A.; JANICK, J.; GOLDSBROUGH, P. 1992. Genome size and DNA polymorphism in *Theobroma cacao*. Journal of the American Society for Horticultural Science (EE.UU.) 21 p. (En impresión).
- FRITZ, P. J.; BOYER, C. D.; FURTECK, D. B. 1991. Molecular and Biochemical Markers for Genetic Analysis of *Theobroma cacao* L. United States, Department of Agriculture. 26 p.
- FRITZ, P. J.; FANJI, Z.; FURTECK, D. B. 1986. Biotechnology-Applications to the cacao plant. In: Symposium Cacao Biotechnology. (1986,). Proceedings. Ed. P. S. Dimick. p. 121-136.
- GEBHARDT, C.; RITTER, E.; DEBENER, T.; SCHACHTSCHABEL, U.; WALKEMEIER, B.; UHRIG, H.; SALAMINI, F. 1989. RFLP analysis and linkage mapping in *Solanum tuberosum*. Theoretical and Applied Genetics (EE.UU.) 78: 65-75.
- GINGERAS, T. R.; KWOH, D. Y.; DAVIS, G.R.1987. Hybridization properties of immobilized nucleic acids. Nucleic Acid Research (EE.UU.)15: 5373-5390.
- HELENTJARIS, T.; SLOCUM, M.; WRIGHT, S.; SCHAEFER, A.; NIENHUIS, J. 1986. Construction of genetic linkage maps in maize and tomato using Restriction Fragment Length Polimorphisms. Theoretical and Applied Genetics (EE.UU.) 72: 761-769.
- _____.; BURR, B. 1989. Development and application of molecular markers to problems in plant genetics. Eds. Helentjaris Timothy and Benjamin Burr. N.Y. , USA. Cold Spring Harbor Laboratory.165p. (Current Communications in Molecular Biology).
- HOFMANN, D.; WEISING, K. 1989. Extraction of Ethidium bromide from CsCl-purified DNA. Focus 12(1).
- HONG-GIL, N.; GIRAUDAT, J.; DENBOER, B.; MOONAN, F.; LOOS, W. D. B.; HAUGE, B. M.GOODMAN, H. M. 1989. Restriction Fragment Length Polymorphism linkage map of *Arabidopsis thaliana*. The Plant Cell (EE.UU.) 1:699-705.

- KEIM, P.; DIERS, B. W.; OLSON, T. C.; SHOEMAKER, R. C. 1990. RFLP mapping in soybean: Association between marker loci and variation in quantitative traits. *Genetics* (EE.UU.) 126: 735-742.
- LAINEZ MEJIA, J.R. 1991. Estudio de la descendencia del cruce interclonal de cacao "Catongo X Pound 12" bajo las condiciones de Turrialba, Costa Rica. Tesis Mag. Turrialba, Costa Rica, CATIE. 125 p.
- LANDER, E. S.; GREEN, P.; ABRAHAMSON, J.; BARLOW, A.; DALY, M. J.; LINCOLN, S. E.; NEWBURG, L. 1987. MAPMAKER: An interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genome* (Canadá)1:174.
- _____.; BOTSTEIN, D. 1991. Accurate and Efficient Mapping of Quantitative Trait Loci. In: *Current Communications in Molecular Biology*. . N.Y., USA. Cold Spring Harbor Laboratory. 89-96.
- LANDRY, B. S.; HUBERT, N.; ETOH, T.; HARADA, J.; LINCOLN, S. E. 1991. A genetic map for *Brassica napus* based on restriction fragment length polymorphisms detected with expressed DNA sequences. *Genome* 34: 543-552.
- LANDRY, B. S.; KESSELY, R. V.; FARRARA, B.; MICHELMORE, R. W. 1987. A genetic map lettuce *Lactuca sativa* L. with restriction fragment length polymorphism, isozyme, disease resistance and morphological markers. *Genetics* (EE.UU.) 116: 331-337.
- LEWIN, B. 1990. Isolating the gene. In *Genes IV*. Cambridge, Oxford University Press. p. 89-110.
- MARTIN, G. B.; WILLIAMS, J .G. K.; TANSLEY, S. D. 1991. Rapid identification of markers linked to a *Pseudomonas* resistance in tomato by using random primers and near isogenic lines. *Proceedings of the National Academy of Sciences* (EE.UU.) 88:2336-2340.

- McCOUCH, S. R.; KOCHERT, G.; YU, Z. H.; WANG, Z. Y.; KHUSH, G. S.; COFFMAN, W.R.; TANKSLEY, D. 1988. Molecular mapping of rice chromosomes. *Theoretical and Applied Genetics (EE.UU.)* 76:815-829.
- MIRAZON, M. 1988. *Theobroma cacao* : Genetic analysis using restriction fragment length polymorphisms. Thesis. M. Sc. The Pennsylvania State University. 85 p.
- _____.; GORA-MASLAK, G.; McHENRY, L.; FRITZ, P. J. 1989. *Theobroma cacao*: Protocols for RFLP Analysis. *Turrialba* 39: 519-525.
- MORA, A.; MORERA, J. A.; LAINEZ, J. 1992. Evaluación del cruce interclonal de cacao 'Pound 12' X 'Catongo'; en CATIE, Costa Rica. II. Fenología. XI International Cocoa Research Conference. Cote D'Ivory. 18-27th July, 1993. (En prensa).
- MORERA, J. A.; MORA, A. 1992. Evaluación de cacao híbrido bajo dos sistemas de sombra en Turrialba, Costa Rica. *Turrialba (Costa Rica)* 41(4):
- _____.; MORA, A.; LAINEZ, J. 1992. Evaluación del cruce interclonal de cacao 'Pound 12' X 'Catongo'; en CATIE, Costa Rica. I. Compatibilidad. XI International Cocoa Research Conference. Cote D'Ivory. 18-27th July, 1993. (En prensa).
- _____.; MORA, A.; LAINEZ, J. 1992. Evaluación del cruce interclonal de cacao 'Pound 12' X 'Catongo'; en CATIE, Costa Rica. III. Rendimiento. XI International Cocoa Research Conference. Cote D'Ivory. 18-27th July, 1993. (En prensa).
- _____.; PHILLIPS, W.; MORA, A.; PAREDES, A. 1990. Experiencia del CATIE en el uso de diseños y metodologías estadísticas sobre el cacao. Seminario Regional Diseños Experimentales y Metodologías Estadísticas en Cacao. San Pedro Sula, Honduras. Ed. por Ahmad R. Rafie, James Corven, Guillermo Villanueva. San José, C. R. : Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. 15-29.

- _____. ; 1992. Conservation of cocoa in field genebanks. *In*: Conservation, characterization and utilisation of cocoa genetic resources in the 21st century. 13-17th September, 1992.
- MULLINS, K. B.; FALOONA, F. A. 1987. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalysed chain reaction. *Methods in Enzymology* (EE.UU.) 155: 335-350.
- NATHANS, D.; SMITH, H. 1975. Restriction endonucleases in the analysis and restructuring of DNA molecules. *Annual Review of Biochemistry* (EE.UU.) 44:273-293.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL. 1990. Plant biotechnology research for developing countries. Washington, D.C. , National Academic Press. 44 p.
- ROSE, E. 1990. PCR and the Human Genome Project: The 1990 Cold Spring Harbor meeting on genome mapping and sequencing Amplifications-Perkin Elmer Cetus 5: 1-24.
- SAIKI, R. K.; SCHARF, S.; FALOONA, F.; MULLIS, K. B. HORN, G. T.; ERLICH, H. A. ARNHEIM, N. 1985. Enzymatic amplification of β -globin genome sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* (EE.UU.) 230: 1350-1354.
- SAMBROOK, J.; FRITSTH, E. F.; MANIATIS, T. 1989. *Molecular cloning. A Laboratory Manual*. 2nd. Ed. N.Y. USA. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 3 v.
- SMITH, J. S. C. 1989. Gene markers and their uses in the conservation, evaluation and utilization of genetic resources of maize (*Zea mays* L.). IBPGR Training courses. Lecture Serie 2. p. 125-135.
- SOUTHERN, E. M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology* (G.B.) 98: 503-517.

- TANKSLEY, S. D. 1983. Molecular markers in plant breeding. *Plant Molecular Biology Reporter* (EE.UU.) 1: 3-8.
- TANKSLEY, S. D.; YOUNG, N. D.; PATERSON, A. H.; BONIERBALES, M. W. 1989. RFLP mapping in plant breeding: New tools for an old science. *Bio/technology* (EE.UU.) 7: 257-263.
- VARADARAJAN, G. S.; PRAKASH, C. S. 1991. A rapid and efficient method for the extraction of total DNA from the sweet potato and its related species. *Plant Molecular Biology Reporter* (EE.UU.) 9(1): 6-12.
- WEBB, D. M.; KNAPP, S. J. 1990. DNA extraction from a previously recalcitrant plant genus. *Plant Molecular Biology Reporter* (EE.UU.) 8(3):180-185.
- WEISING, K.; BEYERMANN, B.; RAMSER, J.; KAHL, G. 1991. Plant DNA fingerprinting with radioactive and digoxigenated oligonucleotide probes complementary to symple repetitive DNA sequences. *Electrophoresis* (Alemania) 12: 159-169.
- WHITE, R.; LEPPERT, M.; BISHOP, D.T.; BARKER, D.; BERKOWITZ, J.; BROWN, C.; CALLAHAN, P.; HOLM, T.; JEROMINSKI, L. 1985. Construction of linkage maps with DNA markers for human chromosomes. *Nature* (G.B.) 313: 101-105.
- WILDE, J.; JOHNSON, E.; WAUGH, R.; POWELL, W. 1991. Characterization of cocoa clones using DNA-based markers. *Cocoa Growers Bulletin* (G.B.) 44: 29-35.
- _____.; JOHNSON, E.; WAUGH, R.; POWELL, W. 1992. Genetic fingerprinting of *Theobroma* clones using randomly amplified polymorphic DNA markers. *Theoretical and Applied Genetics* (EE.UU.) 83: 871-877.
- _____.; RUSSELS, S. 1992. Cocoa DNA miniprep. *Fotocopia*. 1p.
- WILLIAMS, J. F. 1989. Optimization strategies for the Polymerase Chain Reaction. *Focus* 7 (7): 762-767.

WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFLASKI, J. A.; TINGEY, S. V.
1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful
as genetic markers. *Nucleic Acid Research (G.B.)* 18(22):6531-6535.

ANEXO 1

Procedimiento para el aislamiento y purificación del ADN de cacao (Couch y Fritz, 1990; Febres, 1990).

1. Recolectar en el campo hojas jóvenes, expandidas sin daños o enfermedades.
2. Lavar las hojas en agua corriente y luego en agua destilada.
3. Pesar entre 8-10 g de hojas y eliminar la nervadura central y regiones necróticas.
4. Congelar con nitrógeno líquido en un mortero preenfriado a -20°C y pulverizar la muestra rápidamente.
5. Sin dejar descongelar añadir el material al buffer de extracción previamente enfriado en hielo y agitar suavemente. (Usar 5-15 ml de buffer de extracción por cada gramo de hoja inicial).
6. Homogenizar las muestras en un homogenizador durante 2 minutos y centrifugar a 1,000 gravedades durante 15 minutos a 4°C .
7. Resuspender el pellet en buffer de lisis (Usar de 1-3 ml de buffer por cada gramo de hojas iniciales).
8. Incubar en hielo durante 1 hora para lisar los núcleos.
9. Centrifugar a 17,000 gravedades durante 15 minutos a 4°C .
10. Recuperar el sobrenadante y ajustar la densidad de la solución a 1,57 g/ml con cloruro de cesio sólido. disolver el cloruro de cesio y agregar bromuro de etidio 70 μl por cada ml de solución. Agitar bien.
11. Purificar por medio de un gradiente de densidad de CsCl durante 40-50 horas a 32,000 r.p.m.
12. Remover la banda de ADN con una jeringa y extraer el bromuro de etidio según la técnica descrita por (Hofmann y Weising, 1989).
13. Precipitar el ADN con 2.5 volúmenes de etanol. Centrifugar a 10,000 g durante 15 minutos a 4°C . Lavar el precipitado en etanol 75% durante 5 minutos y resuspender en un volumen apropiado de buffer TE:10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.

14. Realizar la cuantificación del ADN en geles de agarosa 0,8%, 20 voltios a temperatura ambiente.

Buffer de extracción

0,1 M de citrato de sodio
0,35 M de glucosa
5 mM de EDTA
0,1 M de ácido dietilditiocarbámico
2% (p/v) polivinilpirrolidona 10,000
1% albúmina de suero bovino

pH final 6,0.

Buffer de lisis

Es el mismo buffer de extracción
más los siguientes componentes:
1 g/ml de cloruro de cesio
2% (p/v) de SDS

ANEXO 2

Digestión enzimática, electroforesis de ADN y Southern Transfer.

Se tomaron 2 µg de ADN de cada muestra y se digirieron con 10 unidades de EcoRI y HindIII de acuerdo a las recomendaciones de la casa comercial BRL. La digestión se realizó a 37 °C de 8-10 horas en un volumen final de 20 µl. La digestión se detuvo con 2 µl de buffer: 50% (v/v) de glicerol; 0,1 M de EDTA; 1% (p/v) de SDS y 0,1 % de azul de bromofenol.

Al terminar la digestión, las muestras se corrieron en un gel de agarosa 0,8% en TAE 1X (40 mM Tris HCl, 20 mM acetato de sodio, 1 mM EDTA, pH 7,8) durante 18-24 horas a 20 Voltios a 4 °C. Dentro del gel se incluyeron dos marcadores de peso molecular conocido: ADN de lambda digerido con EcoRI (BRL) y ADN de lambda digerido con BstE II (New England BioLabs, Beverly, Mass., USA) con un rango de 702-23,130 pb.

Los geles se iluminaron con una lámpara de luz UV (302 nm) y se fotografiaron con una cámara Polaroid modelo DS34 (Polaroid Corporation, Cambridge, Mass., USA) y película Polaroid tipo 667 para guardar un registro de los geles. Después de colorear con bromuro de etidio y tomar la foto, los geles se depuraron en una solución 0,2 N de HCl durante 10 minutos. A continuación se desnaturalizaron en una solución 1,5 M de NaCl; 0,5 M de NaOH durante 1 hora. Finalmente, los geles se neutralizaron en una solución 1 M Tris-HCl; 1,5 M de NaCl pH 7,4 durante 1 hora.

Posteriormente, se realizó un Southern Transfer que consiste en una cámara con una solución 10XSSC en la que se ha montado un puente de papel 3 MM. Sobre este papel se colocó el gel y luego la membrana. Sobre todo el sistema se colocó un peso aproximado de 500 g. La transferencia se realizó durante toda la noche. Los filtros se lavaron en una solución 6x SSC durante 5 minutos y se secaron al vacío durante 2 horas a 80 °C. Antes de ser descartados los geles se retiñeron en una solución de bromuro de etidio (0,5 µg/ml en TAE 1X) por 2-3 horas y fueron reexaminados bajo luz UV para determinar si la transferencia había sido completa.

ANEXO 3

Protocolo para el aislamiento y purificación de las sondas (Sambrook, 1989).

Esquema general de la sonda:

1. Multiplicación de *E. coli* cepa cw 251
2. Infección con el fago que contiene la sonda
3. Extracción del fago y purificación de la sonda

1. Multiplicación de *E. coli*.

Sembrar en platos de Petri la cepa en medio TB y dejar crecer toda la noche a 37°C en la oscuridad. Al siguiente día tomar una colonia individual e inocular en medio TB líquido. Incubar en baño de María a 37 °C, 110 r.p.m. en la oscuridad, durante toda la noche.

Al siguiente día centrifugar a 2,500 r.p.m durante 20 minutos. Resuspender el precipitado en 3 ml sulfato de magnesio 10 mM y ajustar la absorbancia a 2, midiendo la concentración en un espectrofotómetro de luz visible.

2. Infección con el fago que contiene la sonda.

Se toman 100 µl de bacterias y se mezclan con 100 µl de la solución que contiene el fago. Se agita en un vortex y se incuba a 37° C durante 20-30 minutos. Posteriormente se realiza un plateo de las bacterias en medio TB con agar suave. Se incuba durante toda la noche a 37 °C en la oscuridad. Al siguiente día se añaden 5 ml de la solución SM y se agita durante 2 horas a 50 rpm. Recoger la solución en tubos estériles. Parte de esta se puede conservar para infecciones posteriores agregando 100 µl de cloroformo por cada 6 ml de solución.

3. Extracción del fago y purificación de la sonda.

Las muestras que contienen cloroformo se centrifugan durante 15 minutos a 2500 rpm. Posteriormente, se agrega ADNasa a una concentración final de 1

$\mu\text{g/ml}$ y ARNasa a una concentración final de $1 \mu\text{g/ml}$. Se incuba durante 30 minutos a $37 \text{ }^\circ\text{C}$.

Agregar NaCl a una concentración final 1 M (29.2 g por 500 ml de cultivo). Disolver suavemente e incubar a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 1 hora. La adición del NaCl promueve la disociación del bacteriofago del debris bacterial y se requiere para una eficiente precipitación de las partículas del bacteriofago en el polietilenglicol.

Centrifugar a $11,000 \text{ g}$ durante 10 minutos a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ y pasar el sobrenadante a un tubo limpio. Agregar polietilenglicol (PEG) a una concentración final de 10% (1 g por cada 10 ml). Disolver suavemente e incubar 1 hora en hielo.

Centrifugar a $10,000 \text{ g}$ durante 10 minutos a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Descartar el sobrenadante y mantener los tubos invertidos al menos 5 minutos para permitir al fluido drenarse fuera del precipitado.

Resuspender en buffer TE, y transferir a tubos eppendorf. Añadir $5 \mu\text{l}$ de SDS 10% e incubar a $68 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 10 minutos. Añadir $21 \mu\text{l}$ de NaCl.

Extraer con volúmenes iguales de fenol:cloroformo estabilizado y cloroformo (cloroformo:alcohol isoamílico 24:1) .Extraer tantas veces como sea necesario hasta que desaparezca la interfase (proteínas). Precipitar con dos volúmenes de etanol y mantener a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ durante toda la noche. Al día siguiente centrifugar a $10,000 \text{ rpm}$ durante 15 minutos a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Resuspender en un volumen adecuado de TE y cuantificar el ADN mediante electroforesis en geles de agarosa 0,4%.

ANEXO 4

Hibridación y detección con PhotoGene Nucleic Acid Detection System

1. Prehibridación.

Colocar las membranas en bolsas de hibridación y prehibridar in 250 μ l de solución de prehibridación por centímetro cuadrado de membrana durante 2-4 horas a 42 °C.

2. Hibridación.

Calcular la cantidad de sonda necesaria para la hibridación: $\text{área de la membrana en cm} \times 50 \text{ ng de sonda/ml} \times 0,1 \text{ ml/cm membrana} = \text{ng de sonda}$.

Precipitar la sonda con etanol y disolver en 50 μ l de 2X buffer de hibridación por cm. Añadir un volumen igual de 20% de sulfato de dextran en formamida. Denaturalizar la sonda durante 10 minutos en agua hirviendo.

Eliminar la solución de prehibridación y reemplazarla con la solución de hibridación que contiene la sonda. Incubar durante la noche a 42 °C.

3. Posthibridación.

Lavar la membrana dos veces con 2 ml/cm de una solución 5X SSC, 0,5 % (p/v) SDS a 65 °C durante 5 minutos cada lavado.

Lavar la membrana una vez con 2 ml/cm 0,1X SSC, 1% (p/v) SDS a 50 °C durante 30 minutos. La temperatura de este lavado es crítica para determinar el nivel de rigidez de la hibridación.

Lavar la membrana una vez con 2 ml/cm de 2X SSC durante 5 minutos a temperatura ambiente.

4. Unión del conjugado estreptavidina-fosfatasa alcalina.

Lavar la membrana con 1 ml/cm de TBS-Tween 20 durante 1 minuto.

Incubar la membrana en 0,75 ml/cm de solución bloqueadora durante 1 hora a 65°C. Agitar las membranas durante el bloqueo.

Microcentrifugar el tubo que contiene el conjugado estreptavidina-fosfatasa alcalina (SA-AP) durante 4 minutos a temperatura ambiente. Con una pipeta estéril remover 7 µl SA-AP del sobrenadante para cada 100 cm de área de membrana. Diluir el sobrenadante SA-AP 1:1000 en TBS-Tween 20.

Incubar la membrana durante 10 minutos a temperatura ambiente. Agitar suavemente y cubrir completamente la membrana con el conjugado.

Lavar la membrana dos veces con 1 ml/cm de TBS-Tween 20, durante 15 minutos a temperatura ambiente.

Lavar la membrana en el buffer final de lavado diluyendo la solución 10X a una concentración final 1:10 con agua destilada. Lavar la membrana con 1ml/cm durante 60 minutos agitando suavemente.

Secar la membrana en papel de filtro 3MM para remover el exceso de buffer. Colocar la membrana en un PhotoGene Development Folder.

Pipetear 0,01 ml/cm de reactivo de detección sobre la membrana. Mantener en la oscuridad a 23-25 °C durante 3 horas.

Realizar exposiciones cada 2, 5,10 y 30 minutos hasta obtener la señal deseada.

Buffer de prehibridación (100 ml)		Buffer de hibridación
Formamida	50% (v/v)	50% (v/v)
NaCl	0.9 M	1.8 M
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	0.06 M	0,12 M
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	0.006 M	0,012 M
Ficoll	0,1% (w/v)	0,2 % (w/v)
Polyvinilpyrrolidone	0,1% (p/v)	0,2 % (w/v)
BSA	0,1% (p/v)	0,2 % (w/v)
Sarcosyl	1,0% (w/v)	2 % (w/v)
Esperma denaturalizada de salmón	200 µg/ml	400µg/ml+Sonda

pH del buffer 7,4

Anexo 5

Protocolo PCR (Osei, J. 1992 Datos sin publicar).

Protocolo para la amplificación de ADN de cacao en un volumen final de 50 μ l.

1. Buffer de reacción 10X

Solución madre	volumen en 10X	Concentración
1% de gelatina	100 μ l	0,1 %
1 M Tris pH 8.3	100 μ l	100 mM
1 M KCl	500 μ l	500 mM
1 M MgCl ₂	15 μ l	15 mM
Agua	285 μ l	
Total	1000 μ l	

2. Mezcla de dNTP 10 X

Solución madre	Volumen en 10X
10 mM dATP	20 μ l
10 mM dCTP	20 μ l
10 mM dGTP	20 μ l
10 mM dTTP	20 μ l
Agua	20 μ l
Total	100 μ l

3. Mezcla de reacción

Componente	Cantidad
Agua	*
10X buffer de reacción	5 μ l
10X dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	5 μ l
Primer 50 ng/ μ l	6 μ l
ADN 60 ng/ μ l	*
Aceite mineral	50 μ l

Taq polimerasa 2.5 U	5 μ l

Cuando se tiene esta mezcla completa, se denatura el ADN durante 10 minutos a 96 °C antes de agregar la Taq polimerasa.

Los productos PCR se corrieron en geles de agarosa 1,2 % y 0,5X de TBE. Los geles se corrieron a 100 V durante 1 hora y 45 minutos. Se utilizaron 2 µl de buffer (1% SDS p/v; 0,1% de azul de bromofenol p/v; 100 mM EDTA; 50% de glicerol v/v).