

Avances en el estudio de las bases genéticas y organolépticas del cacao fino o de aroma en el Perú

J.A. Chia-Wong¹, K.J. Márquez-Dávila², H. Cárdenas-Salazar³, O.P. Hurtado-Gonzales¹, T. Huaman-Camacho¹, W. Cespedes-Del-Pozo⁴, R.P. Saavedra-Arbildo⁵, Y. Beraun-Cruz¹, M.S. Carranza-Cruz⁶, B.A. Gutarra Castillo⁷

¹Universidad Nacional Agraria de la Selva (Tingo María-Perú), ²Instituto de Investigaciones de la Amazonia Peruana (Tarapoto-Perú), ³Cooperativa Oro Verde (Lamas-Perú), ⁴ Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco (Cusco-Perú), ⁵Universidad Nacional de San Martín (Tarapoto-Perú), ⁶Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo (Lambayeque-Perú), ⁷Universidad Continental S.A.C. (Huancayo-Perú).

Resumen

Las variedades de cacao fino o de aroma en el Perú son utilizados para elaborar los mejores chocolates del mundo por sus exquisitas y poco comunes características organolépticas, Estas características permiten que el cacao peruano gane reconocimiento internacional y de ahí su gran valor económico. A pesar de esto, poco se sabe sobre los componentes genéticos y/o ambientales que contribuyen a la exclusividad de este valioso recurso económico. En el proyecto de investigación aplicada: “Estudio molecular de la diversidad genética de los cacaos aromáticos en el Perú con fines del fortalecimiento de su competitividad y aumento de la producción nacional de cacao de calidad”, financiado por Innóvate Perú del Ministerio de la Producción, se tiene como objetivos determinar la variabilidad genética y caracterización organoléptica de más de 100 tipos de cacao fino o de aroma que se cultivan a lo largo de las cinco principales regiones del Perú (Amazonas, Cusco, San Martín, Piura y Huánuco). Adicionalmente, la Universidad Nacional Agraria de la Selva en Tingo María y el Instituto de Investigaciones de la Amazonia Peruana en Tarapoto, hospedarán bancos de germoplasma y de propagación de esquejes para la difusión y estudios de estos valiosos recursos. Hasta inicios del 2017, ya se han recolectado más de 80 genotipos provenientes de las cinco regiones. Protocolos para análisis sensoriales que cumplan los más rigurosos estándares internacionales se han venido estableciendo. Por otro lado, técnicas de marcadores moleculares usando marcadores de DNA tipo SSR y SNPs, seguido por secuenciamiento de ADN, se vienen estableciendo. Estudios de asociación de fenotipo-genotipo formarán parte del conocimiento generado en este proyecto. Adicionalmente, estos conocimientos permitirán generar información genómica valiosa para salvaguardar nuestra biodiversidad nativa, otorgándole a los productores y sus asociaciones de herramientas para proteger sus recursos genéticos y a los potenciales mejoradores de cacao más luces en cuanto a la asociación genotipo-calidad. Se espera que a fin del proyecto, se cuente con los resultados de genotipificación de más de 100 genotipos de cacao fino o de aroma y mediante el resecuenciamiento se revelen SNPs particulares para cada grupo genético en cada región muestreada.

Introducción

La calidad del chocolate depende fundamentalmente de la calidad de la almendra. Según M&O Consulting (2008) muchos investigadores coinciden en afirmar que la calidad del cacao está influenciada por los siguientes componentes: el hereditario (cultivar o grupo de cacao), manejo de poscosecha (fermentado, secado y torrefactado), y los factores ambientales (suelo, clima y manejo de precosecha).

Las investigaciones en el aspecto molecular del cacao peruano son muy escasas. Zhang et al. (2006), Motamayor et al. (2008) estudiaron con microsatélites su diversidad genética. A través de un boletín, la Dra. Rosario Rojas y col. (UPCH) reporta haber llevado a cabo una genotipificación con AFLPs en tres subpoblaciones de cacao conocidas por su característico de fino y de aroma, “porcelana”, “chuncho” y “satipo”. Por otro lado, en el tema de estudios en el aspecto organoléptico del cacao peruano solo se ha ubicado en la literatura un reporte de Eskes et al. (2007), un artículo de Condori et al. (2014) y una tesis en la UNMSM (Loayza 2014).

Por ello, dada la escasez de investigaciones en cacao peruano a nivel organoléptico y molecular, se preconizó el proyecto de investigación aplicada titulado “Estudio molecular de la diversidad genética de los cacaos aromáticos en el Perú con fines del fortalecimiento de su competitividad y aumento de la producción nacional de cacao de calidad” financiado por contrato 317-2015 INNOVATE-PERÚ del Ministerio de la Producción, donde se plantearon los siguientes objetivos:

1. Determinar las diferencias entre las características organolépticas (baba y licor) y moleculares de los cacaos finos y de aroma en al menos 5 regiones del Perú.

2. Establecer bancos de germoplasma para continuar los estudios de asociación entre fenotipo y genotipo, y desarrollar programas de mejoramiento genético.
3. Proporcionar a los productores y a la comisión nacional de biopiratería, la información genotípica de sus cacaos que ayudará a proteger sus recursos genéticos. Esta información permite respaldar mediante un estudio y darle un valor agregado a su producción. También será valiosa para los fitomejoradores.

Materiales y Métodos

Dentro del proyecto mencionado se están desarrollando 4 tesis tituladas:

1. Estudio de las características organolépticas en baba y licor de una colección de cacao fino y de aroma (*Theobroma cacao* L.) de las regiones San Martín y Huánuco, ejecutada por el Ing. Hildebrando Cárdenas Salazar.
2. Caracterización morfológica de cacao fino de aroma proveniente de los departamentos de Amazonas, Cusco y Piura, ejecutada por el bach. Roland Pasquel Saavedra Arbildo.
3. Estudio de la estructura genética de una colección nacional de cacao fino y de aroma mediante microsátélites, ejecutada por la Ing. Yanet Beraun Cruz.
4. Determinación de haplotipos SNP's de colecciones nacionales de cacao (*Theobroma cacao* L.) fino y de aroma proveniente de las regiones de Piura, Cuzco, San Martín y Amazonas, ejecutada por la bach. Malú del Socorro Carranza Cruz.

La consecución de las metas en cada tesis aportará en los objetivos centrales del Proyecto INNOVATE-PERÚ 317-2015.

Para la colecta, se diseñaron áreas potenciales para la colecta de germoplasma de cacao. También se realizó el contacto con diferentes productores cuyos materiales han sido premiados en concursos de chocolate de calidad.

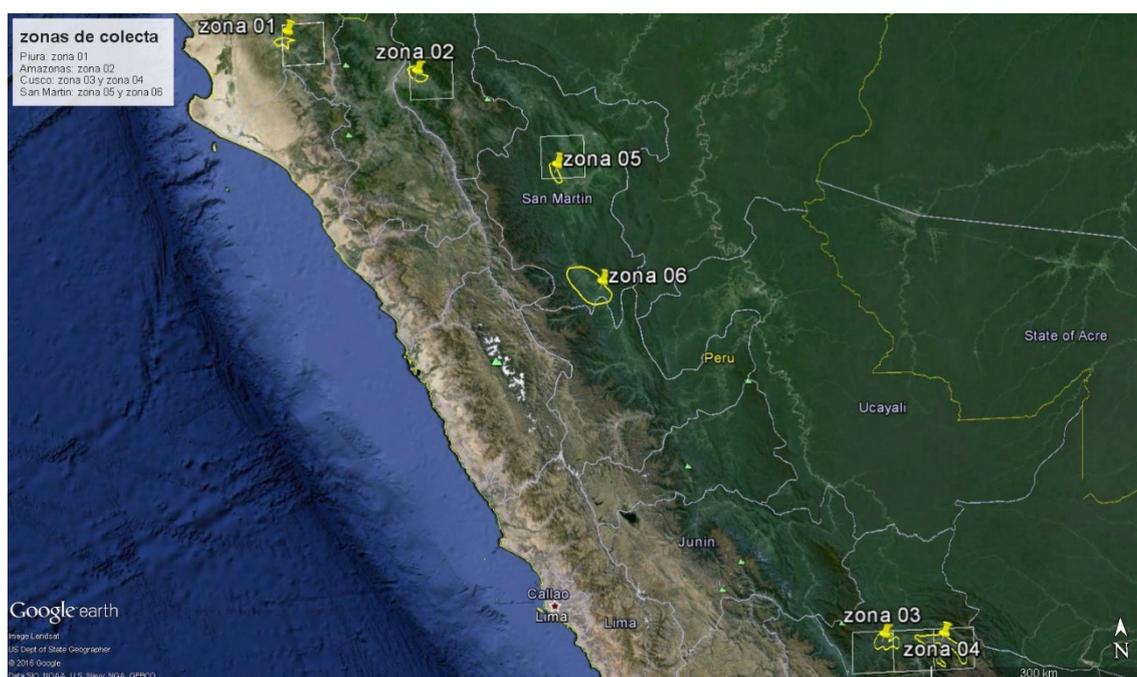


Figura 1. Mapa mostrando las zonas planificadas para la colecta del germoplasma de cacao

La cantidad de germoplasma reunido hasta el momento se colectaron la siguiente cantidad de materiales tanto en hojas, mazorca y varas yemeras:

Cuadro 1. Resumen de colectas por material y por ubicación geográfica

	Hojas	Mazorca	Varas yemeras
San Martín	28	28	28
KMD	6	6	6

Amazonas	21	21	21
Cusco	90	15	15
Loreto	2	2	2
Huánuco	12	12	12
Piura	14	14	14
Ecuador	1	1	0
Total	174	99	98

Contamos en este caso con un genotipo de Ecuador, que puede servir como outgroup para estudios de diversidad.

Se están caracterizando molecularmente 99 genotipos colectados y se están usando los microsatélites mostrados a continuación:

Cuadro 2. Lista de loci microsatélites que se están usando en la caracterización molecular.

Codigo	Secuencia	Rango de tamaño	Numero de alelos
mTc-UNICAMP02	GGTCCTCCAAGCTGAGTAACA	260-290	8
mTc-UNICAMP03	GCGATGCCAAAAGTTGTGTA	282-291	5
mTc-UNICAMP04	GCAGCGAGAGACAAAGATA	162-186	7
mTc-UNICAMP08	GGGAAACTGGGCATCACTTA	278-286	5
mTc-UNICAMP09	TTCGGCAGTTCGATCTATGA	148-190	6
mTcCIR15	CAGCCGCCTCTTGTTAG	221-256	10
mTcCIR26	GCATTCATCAATACATTC	285-310	8
mTcCIR37	CTGGGTGCTGATAGATAA	136-187	13
mTcCIR33	TGGGTTGAAGATTTGGT	265-348	12
mTcCIR57	TGTAGATGTGATTTTATAGTTTG	247-257	5
mTcCIR42	TTGCTGAAGTATCTTTTGAC	202-238	11
mTcCIR12	TCTGACCCCAAACCTGTA	188-251	10
mTcCIR243	ACAGCAGTAGACGCATTC	125-141	7
mTcCIR244	TGGCAATAACAATGAACA	240-270	13
mTcCIR3	CATCCCAGTATCTCATCCATTCAGT	206-247	15
mTcCIR58	TTTTTGGTGATGGA ACTAT	254-274	8
mTcCIR60	CGCTACTAACAACATCAAAA	190-218	8
mTcCIR9	ACCATGCTT CCTCCTTCA	274.00	4

A través de una red de colaboración se están caracterizando 154 genotipos a través de SNPs usando la plataforma de nanofluidos Fluidigm (Fang et al. 2013).

Paralelamente, se realizará la genotipificación con Secuence-Based Genotyping, a través de servicios por terceros. El análisis bioinformático se realizará junto con la tesista Malú Carranza. Una vez obtenida y discutida la estructura genética de los cacao finos y de aroma, se realizará un Whole genome resequencing de los genotipos más representativos de cada región, con la finalidad de obtener haplotipos con alto nivel de confiabilidad para señalar los orígenes geográficos de cada cacao.

Resultados

Los resultados de las mencionadas tesis están en proceso de redacción, sin embargo, podemos adelantar que los valores de calidad organoléptica son altos, la mayoría más de 70 puntos. La caracterización morfológica está ayudando a complementar los análisis moleculares.

Se han establecido 2 bancos de germoplasma, uno en Tarapoto y otra en Tingo María.

En el caso de los microsatélites, se han tenido muchos problemas técnicos en la estandarización de la extracción del ADN y del PCR.

Se cuenta con resultados parciales de genotipificación con SNPs a través del sistema Fluidigm.

Las muestras de ADN van a ser enviados al Centro de Genómica de la Universidad de Minnesota (USA) para un análisis SBG (Secuence-Based Genotyping).

Discusión

Un gran inconveniente para los estudios de genotipificación de cacao es la cantidad y calidad del ADN, en este caso eso está ocurriendo con los microsatélites. Por otro lado, el SBG también requiere un buen ADN. Esto genera inconvenientes acerca de la forma de conservación de las muestras foliares de cacao, por ejemplo, deshidratados en silicagel. Se requiere además para el SBG, realizar pilotos para determinar la enzima de restricción más adecuada para generar mayor cantidad de SNPs.

Agradecimientos

Este proyecto de investigación es financiado a través del Contrato 317-2015 del Programa Nacional de Innovación para la Competitividad y Productividad (Innovate Perú) del Ministerio de la Producción, del cual estamos muy agradecidos. Asimismo, reconocemos sinceramente el apoyo de diversos colaboradores, en Cusco (Ing. Carlos Valer Delgado – Fundo Valer), en Huánuco (Ing. Mendis Paredes Arce - Alborada y Sra. Carmen Beteta Rojas – Alcaldesa de Rondos), en Amazonas (Dra. Sigrun Karst - TAJIMAT e Ing. César Aguirre Camacho - CEPROAA).

Referencias Bibliográficas

Condori D, Asencios E, García G, Ruiz C, Saavedra Y y Rojas R. 2014. Optimización del proceso postcosecha del cacao "chuncho" peruano para el mejoramiento de la calidad organoléptica del licor de cacao. Revista de la Facultad Nacional de Agronomía Medellín. 67(2). p. 1085-1086.

Eskes AB, Guarda-S. D, García-C. L y Garcia-R. P. 2007. Is Genetic Variation for Sensory Traits of Cocoa Pulp Related to Fine Flavour Cocoa Traits? INGENIC Newsletter Issue No. 11 December. p. 22-27.

Fang W, Meinhardt L, Mischke S, Bellato CM, Motilal L and Zhang D. 2013. Accurate determination of genetic identity for a single cacao bean, using molecular markers with a nanofluidic system, ensures cocoa authentication. J. Agric. Food Chem.,DOI: 10.1021/jf404402v

Loayza-Lozano W. 2014. Influencia de la frecuencia de remoción, durante la fermentación, en la calidad sensorial del cacao (*Theobroma cacao* L.) de Satipo. Tesis para optar el Título Profesional de Químico. E.A.P. de Ingeniería Química. Facultad de Química e Ingeniería Química. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Motamayor JC, Lachenaud P, Da Silva E, Mota JW, Loor R, Kuhn DN, Brown JS y Schnell RJ. 2008. Geographic and genetic population differentiation of the amazonian chocolate tree (*Theobroma cacao* L.). Plos ONE. 2008; vol 3 (10): e3311. DOI: 10.1371/journal.pone.0003311.

M & O Consulting, 2008. Estudio de Caracterización del Potencial Genético del cacao en el Perú. Informe Final. Consultoría: 24/2007/PNRC/Lote 2. "Proyecto de Cooperación UE-Perú en materia de Asistencia Técnica relativa al Comercio - Apoyo al Programa Estratégico Nacional Exportaciones (PENX 2003-2013)". 136pp. <http://www.minag.gob.pe/direccion-general-de-competitividad-agraria/2.html>

Zhang D, Arévalo-Gardini E, Mischke S, Zúñiga-Cernades L, Barreto-Chávez A y Adriaola del Aguila J. 2006. Genetic Diversity and Structure of Managed and Semi-natural Populations of Cocoa (*Theobroma cacao*) in the Huallaga and Ucayali Valleys of Peru. Annals of Botany 98: 647–655. DOI: 10.1093/aob/mcl146.