

UNIVERSIDAD CATOLICA SANTA MARIA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS BIOQUÍMICAS Y BIOTECNOLOGÍA

PROGRAMA PROFESIONAL DE INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA

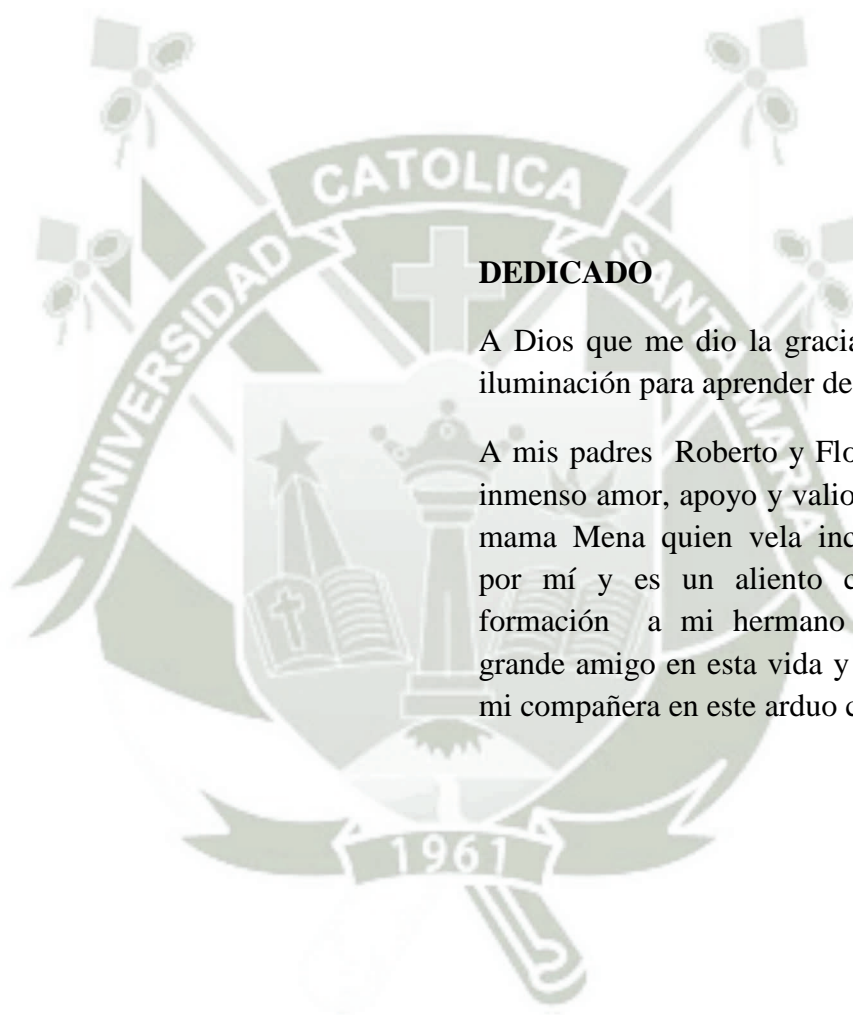


“Polimorfismo en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP) en la caracterización de ochenta accesiones de *Theobroma cacao* L. (cacao) del banco de germoplasma del Instituto de Cultivos Tropicales (ICT).”

TESIS PARA OPTAR AL GRADO PROFESIONAL DE:
Ingeniero Biotecnólogo.

PRESENTADO POR EL BACHILLER:
Juan Ezequiel Gallegos Díaz

**Arequipa-Perú
2013**



DEDICADO

A Dios que me dio la gracia de la vida y la iluminación para aprender de su creación.

A mis padres Roberto y Flor, gracias por su inmenso amor, apoyo y valioso ejemplo, a mi mamá Mena quien vela incondicionalmente por mí y es un aliento constante en mi formación a mi hermano Edwin mi más grande amigo en esta vida y a Bertha por ser mi compañera en este arduo camino.

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto de cultivos Tropicales (ICT) por permitirme realizar el trabajo de tesis en sus instalaciones.

A mi asesor de tesis Dra. Rosario Valderrama.

Al jefe de laboratorio del Instituto de Cultivos Tropicales Msc. Boris Gutarra

A los amigos que laboran e investigan en la estación experimental “Juan Bernito”

A mis profesores universitarios.



INDICE

ABREVIATURAS.....	XI
RESUMEN.	XIII
ABSTRACT.....	XV
INTRODUCCION	1
HIPOTESIS.....	4
OBJETIVOS	5
I MARCO TEORICO	7
1.1 Importancia del cacao;	7
1.2 Características del cacao	13
1.2.1 Taxonomía y nomenclatura.....	13
1.2.2 Hábitat y Agronomía.....	18
1.2.3 Morfología y Botánica	19
1.3 Principales grupos cultivados de cacao en el mundo	22
1.3.1 Cacao Criollo	22
1.3.2 Cacao Forastero.....	23
1.3.3 Cacao Trinitario	23
1.4 Centro de Origen.....	25
1.5 Fuentes de variabilidad	26
1.5.1 Evolutiva	27
1.5.2 Geográfica.....	27
1.5.3 Domesticación.....	27
1.6 Recursos fitogenéticos	28
1.7 Mantenimiento de recursos genéticos del cacao	29
1.8 Mejoramiento Genético	36
1.9 Caracterización de los Recursos Genéticos	39
1.10 Generalidades acerca del ADN	43
1.11 Caracterización Molecular	44

1.12 Polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados (AFLP)	46
1.13 Electroforesis en geles de poliacrilamida.....	49
1.14 Análisis estadístico.....	51
1.15 Análisis poblacional.....	52
II. MATERIALES Y MÉTODOS	53
2.1 Localización de muestreo	53
2.2 Material vegetal	56
2.3 Aislamiento del ADN	57
2.4 Purificación del DNA	57
2.5 Calidad del ADN.....	58
2.6 Determinación de la pureza y concentración del ADN.....	58
2.7 Aplicación del método de AFLP.....	59
2.7.1 Digestión del ADN.....	59
2.7.2 Ligación de adaptadores.....	59
2.7.3 Amplificación pre selectiva (+1/+1)	60
2.7.4. Amplificación selectiva (+3/+3)	61
2.8 Electroforesis en gel denaturante de poliacrilamida (PAGE)	64
2.9 Colecta de los datos moleculares y determinación de valores descriptivos	65
2.10 Análisis estadístico.....	65
III RESULTADOS Y DISCUSION	67
3.1 Acciones de cacao	67
3.2 Aislamiento, purificación y calidad del ADN.....	68
3.3 Amplificación de muestras por AFLP	71
3.4 Recolección de datos.....	74
3.5 Polimorfismo de los Marcadores AFLP.....	77
3.6 Análisis de similaridad y Agrupamiento.....	80
3.7 Análisis de la variabilidad molecular entre poblaciones.....	86
3.7.1 Porcentaje de loci polimórfico (%PPL)	87
3.7.2 Diversidad genética (h), número de alelos observados (na) y número de alelos efectivos (ne).....	88
3.7.3 Proporción de la diversidad genética (Gst).....	90

3.7.4 Distancias genéticas (Nei 1973).....	92
CONCLUSIONES	94
RECOMENDACIONES	95
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	96
ANEXOS.	115



INDICE DE TABLAS

TABLA N° 1: PRODUCTOS DERIVADOS DEL CACAO Y SUS DIFERENTES USOS EN LA INDUSTRIA.	8
TABLA N° 2: PRODUCCIÓN DE CACAO EN TONELADAS (TM), HECTÁREAS CULTIVADAS (HA) Y RENDIMIENTOS (T/HA) DE CACAO POR DEPARTAMENTOS EN LOS AÑOS 2010 Y 2011.	12
TABLA N° 3: CLASIFICACIÓN EN SECCIONES TAXONÓMICAS DEL GENERO THEOBROMA Y UBICACIÓN DE LA ESPECIE DEL CACAO.	15
TABLA N° 4: GRUPOS DE CACAO Y DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA.	17
TABLA N° 5: COMPARACIÓN DE RFLP, RAPD Y AFLP.	49
TABLA N° 6: CODIFICACIÓN, GRUPO GENÉTICO Y ORIGEN DE LAS 43 MUESTRAS DE CACAO PERTENECIENTES AL GRUPO TOCACHE Y MARISCAL CÁCERES.	53
TABLA N° 7: CODIFICACIÓN Y ORIGEN DE LAS MUESTRAS DE CACAO PERTENECIENTES A LA COLECCIÓN DE GENOTIPOS SILVESTRES COLECTADOS EN LA AMAZONIA PERUANA.	55
TABLA N° 8: CODIFICACIÓN, GRUPO GENÉTICO Y ORIGEN DE LAS MUESTRAS DE CACAO PERTENECIENTES AL GRUPO DE HÍBRIDOS INTERNACIONALES.	56
TABLA N° 9: COMPONENTES DE LA REACCIÓN PARA DIGESTIÓN DEL ADN. EL BUFFER DE DIGESTIÓN Y ENDONUCLEASAS (EcoRI, MseI) PROPORCIONADAS POR EL KIT FERMENTAS.	59
TABLA N° 10: SECUENCIAS FORWARD (F ²) Y REVERSE (R ²) DE CADA TIPO DE ADAPTADOR.	59
TABLA N° 11: COMPONENTES DE REACCIÓN DE LIGACIÓN. PROPORCIONADAS POR EL KIT FERMENTAS.	60
TABLA N° 12: SECUENCIA DE LOS CEBADORES DE PRE CORRIDA DE EcoRI Y MseI.	60
TABLA N° 13: COMPONENTES DE REACCIÓN PARA LA AMPLIFICACIÓN PRE SELECTIVA (+1/+1) POR PCR DE LOS PRODUCTOS DE DIGESTIÓN/LIGACIÓN. PROPORCIONADOS POR EL KIT FERMENTAS.	61

TABLA N° 14: PROGRAMA REALIZADO POR EL TERMOCICLADOR AMPLITRONYX 6 (NYXTECHNIK INC.), PARA LA AMPLIFICACIÓN PRE ESPECIFICA DE LAS MUESTRAS DE ADN DE CACAO.....	61
TABLA N° 15: SECUENCIA DE LOS CEBADORES UTILIZADOS PARA LA SELECCIÓN ESPECÍFICA, PROPORCIONADOS POR EL KIT FERMENTAS.....	62
TABLA N° 16: COMBINACIONES PRIMER SELECTIVOS DE EcoRI (E) Y MseI (M), SE EFECTUARON LAS COMBINACIONES MARCADAS CON “X”.....	62
TABLA N° 17: COMPONENTES DE REACCIÓN PARA LA AMPLIFICACIÓN SELECTIVA (+3/+3) POR PCR. PROPORCIONADOS POR EL KIT FERMENTAS.....	63
TABLA N° 18: PROGRAMA REALIZADO POR EL TERMOCICLADOR AMPLITRONYX 6 (NYXTECHNIK INC.), PARA LA AMPLIFICACIÓN ESPECIFICA DE LAS MUESTRAS DE ADN DE CACAO.	64
TABLA N° 19: FRAGMENTO DE LA MATRIZ OBTENIDA CON LA ASIGNACIÓN DE DATOS BINARIOS A LAS BANDAS AMPLIFICADAS EN LOS GELES DE POLIACRILAMIDA.	75
TABLA N° 20: NÚMERO DE BANDAS REVISADAS Y ESCOGIDAS PARA LAS 9 COMBINACIONES DE CEBADORES ESPECÍFICOS DE AFLP, EN EL ESTUDIO DE LAS 80 ACCESIONES DE <i>THEOBROMA CACAO L.</i>	76
TABLA N° 21: RESULTADOS DEL CONTENIDO DE INFORMACIÓN DE POLIMORFISMO OBTENIDO DE LOS 9 PARES DE CEBADORES ESPECÍFICOS DE AFLP, EN LA CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE 80 ACCESIONES DE <i>THEOBROMA CACAO L.</i>	78
TABLA N° 22: NÚMERO DE LOCI POLIMÓRFICO Y PORCENTAJE DE LOCI POLIMÓRFICO DE LAS 5 POBLACIONES DE <i>THEOBROMA CACAO L.</i> ANALIZADAS	87
TABLA N° 23: REPORTE DE NÚMERO DE ALELOS OBSERVADOS, NÚMERO DE ALELOS EFECTIVOS Y DIVERSIDAD GÉNICA DE Nei. DENTRO DE CADA UNA DE LAS POBLACIONES Y EN CONJUNTO.....	88
TABLA N° 24: PROPORCIÓN DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA (Gst) ENTRE POBLACIONES COMPARADAS.	90
TABLA N° 25: PROMEDIO DE LA HETEROCIGOSIS ESPERADA EN LA POBLACIÓN TOTAL PARA TODOS LOS LOCI (Ht) Y PROMEDIO DE LA HETEROCIGOSIS ESPERADA DENTRO DE SUBPOBLACIONES PARA TODOS LOS LOCI (Hs).....	91

TABLA N° 26: MATRIZ DE IDENTIDADES GENÉTICAS Y DISTANCIAS GENÉTICAS
NORMALIZADAS (UNBIASED) DE NEI92



INDICE DE FIGURAS

FIGURA N° 1: PULPA Y MAZORCA DE CACAO, SE PUEDEN APRECIAR LOS GRANOS ESPARCIDOS DENTRO DE LA MAZORCA. (FUENTE: ARCHIVO GRAFICO PROPIO).	10
FIGURA N° 2: PRINCIPALES ZONAS PRODUCTORAS DE CACAO UBICADAS DENTRO DEL TERRITORIO PERUANO. (FUENTE: MINANG 2003).	11
FIGURA N° 3: LOCALIZACIÓN DEL ORIGEN DE LA CLASIFICACIÓN BOTÁNICA PARA EL CACAO. CON MARCADOR SSR (FUENTE: MOTOMAYOR ET AL., 2008)	18
FIGURA N° 4: ÁRBOL DE CACAO EN LA ESTACIÓN EXPERIMENTAR “EL CHOCLINO “. (FUENTE: ARCHIVO GRAFICO PROPIO)	21
FIGURA N° 5: GRUPOS GERMOPLASMICOS NATURALES DE CACAO Y SU LOCALIZACIÓN EN UN MAPA DE CENTRO Y SUR AMÉRICA. (FUENTE: LACHENAUD P.,1997).	24
FIGURA N° 6: UBICACIONES DEL MUESTREO DE ACCESIONES DE CACAO REALIZADO EN LAS PROVINCIAS DE MARISCAL CÁCERES Y TOCACHE, REALIZADAS POR EL INSTITUTO DE CULTIVOS TROPICALES DEL PERÚ (ICT). (FUENTE: ADAPTACIÓN DE WWW.MAPASPERU.COM).....	33
FIGURA N° 7: UBICACIÓN DEL MUESTREO DE ACCESIONES DE CACAO REALIZADO EN LOS RÍOS TRIBUTARIOS AMAZÓNICOS EN LAS EXPEDICIONES REALIZADAS POR EL INSTITUTO DE CULTIVOS TROPICALES DEL PERÚ (ICT) ENTRE JULIO DEL 2008 Y OCTUBRE DEL 2009. (FUENTE: ADAPTACIÓN DE WWW.MAPASPERU.COM).....	34
FIGURA N° 8: ENTRADA DEL BANCO DE GERMOPLASMA DE GENOTIPOS SILVESTRES COLECTADOS EN LA AMAZONIA PERUANA, DE PROPIEDAD DEL INSTITUTO DE CULTIVOS TROPICALES (ICT). (FUENTE: ELABORACIÓN PROPIA)	35
FIGURA N° 9: MÉTODO AFLP DETALLADO POR ETAPAS. (FUENTE: SAUNDERS J. ET AL., 2000)	48
FIGURA N° 10: IMAGEN DE UN GEL DE AGAROSA PREPARADO PARA VERIFICAR LA CALIDAD DEL ADN DE <i>THEOBROMA CACAO L.</i> EXTRAÍDO.	68
FIGURA N° 11: IMAGEN DE LAS ETAPAS DE LISIS Y PRECIPITACIÓN DE ADN DE CACAO CON ISOPROPANOLCADA (1) PRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS, (2) PRECIPITACIÓN DE ADN CON ISOPROPANOL, (3) FORMACIÓN DE PELLET DE ADN	69

FIGURA N° 12: HOJAS DE CACAO (*THEOBROMA CACAO L.*), DESECADAS PARA LA EXTRACCIÓN DE ADN.....70

FIGURA N° 13: ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA AL 10% MOSTRANDO LOS PATRONES DE AMPLIFICACIÓN DEL PAR DE CEBADORES E-AAG/M-CTA CON LOS GENOTIPOS CUYOS CÓDIGOS SE MUESTRAN EN LA PARTE SUPERIOR DEL CARRIL EL MARCADOR DE PESO MOLECULAR O'GENERULER 50 BP DNA SE APRECIA EN AMBOS EXTREMOS Y EN LA PARTE CENTRAL.72

FIGURA N° 14: IMÁGENES DE LA PREPARACIÓN DE UN GEL DE POLIACRILAMIDA EN UNA CÁMARA DE ELECTROFORESIS VERTICAL (1), CÁMARA DE ELECTROFORESIS EN FUNCIONAMIENTO CONECTADA A UNA FUENTE DE PODER (2).74

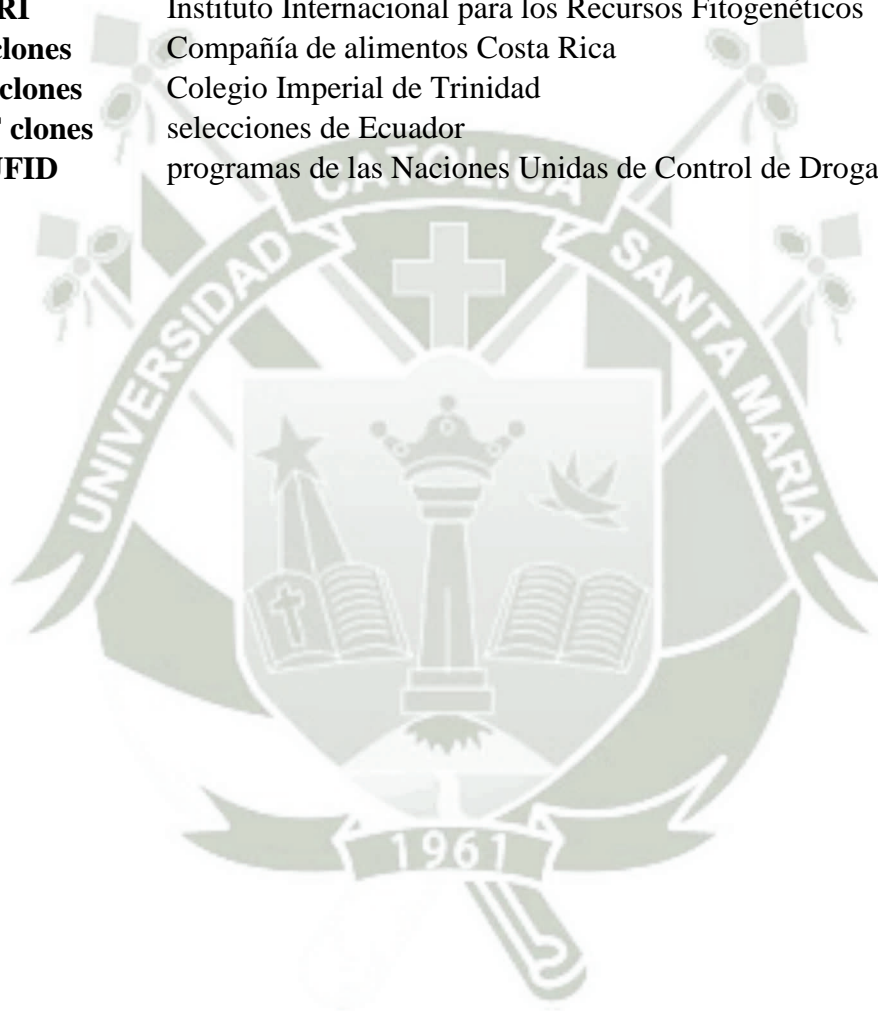
FIGURA N° 15: DENDOGRAMA PROPUESTO PARA LAS 80 ACCESIONES DE *THEOBROMA CACAO L.* DEL BANCO DE GERMOPLASMA DEL INSTITUTO DE CULTIVOS TROPICALES (ICT), CON EL MÉTODO NO JERARQUIZADO DE NEIGHBORUR JOINING.....81

FIGURA N° 16: DENDOGRAMA UPGMA DE LAS SUBPOBLACIONES ANALIZADAS. MARISCAL CÁCERES (POP1), TOCACHE (POP2), AMAZÓNICOS (POP3), TRINIDAD-COSTA (POP4) Y PERÚ-ECUADOR (POP5).93

ABREVIATURAS

ADN	Acido desoxirribonucleico
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism (polimorfismo de la longitud de los fragmentos amplificados)
ARN	Ácido ribonucleico
CATIE	Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza
CIRAD	Centre de coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement
CTAB	Cetyl trimethyl ammonium bromide
DGPA	Dirección General de Promoción Agraria
DNTP	Mezcla de desoxirribonucleótidos (dATP, dCTP, dGTP y dTTP)
E.E.A.	Estación Experimental Agrícola
EDTA	Etilen Diamino Tetra Acetic acid (ácido etilendiamino tetraacético)
Gst	Diferenciación genética poblacional
ha	(has) Hectárea (hectáreas)
IBPGR	International Board for Plant Genetic Resources
ICCO	International Cocoa Organization
IPGRI	International Plant Genetic Resources Institute
ISSR	Interspread Single Sequence Repeats (secuencias intercaladas entre microsatelites)
kb	Kilobases (mil pares de bases)
m.s.n.m.	Metros sobre el nivel del mar
MAS	Marker Assisted Selection
mg	Miligramos
MINAG	Ministerio de Agricultura (Perú)
ng.	Nanogramo
PAGE	Polyacrilamide Gel Electrophoresis (electroforesis en gel de poliacrilamida).
PCR	Polimerase Chain Reaction (reacción en cadena de la Polimerasa)
PIC	Polymorphism Index Content (índice de contenido polimórfico)
QTL	Quantitative Trait Loci (loci de caracteres cuantitativos)
r.p.m.	revoluciones por minuto
RAPD	Randomly Amplified Polimorphism DNA (polimorfismo en el ADN amplificado al azar)
RFLP	Restriction Fragment Length Polimorphism (polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción)
SSR	Single Sequence Repeats (secuencias simples repetitivas o microsátélites)
USDA	United States Department of Agriculture
TBE	Tris Borate EDTA buffer (tampón de electroforesis Tris Borato)

	EDTA)
TE	tampón Tris-EDTA
TM	Toneladas métricas
µg.	Microgramo
µl.	Microlitro
UPGMA	Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Averages
UNALM	Universidad Agraria De La Molina
IBT	Instituto De Biotecnología
APG	Angiosperm Phylogeny Group
IPGRI	Instituto Internacional para los Recursos Fitogenéticos
UF clones	Compañía de alimentos Costa Rica
ICS clones	Colegio Imperial de Trinidad
EET clones	selecciones de Ecuador
PNUFID	programas de las Naciones Unidas de Control de Drogas



RESUMEN.

La amazonia peruana contiene una gran biodiversidad en diferentes cultivos entre ellos el cacao (*Theobroma cacao L.*), esta planta es poseedora de elevada importancia económica y social, las tareas de mejoramiento genético han demandado una adecuada caracterización, obteniéndose muchos trabajos a nivel morfológico, sin embargo la caracterización molecular aún es insuficiente a pesar de existir en la actualidad varias metodologías para este objetivo, siendo la principal limitante la disponibilidad de materiales para su aplicación. En el presente estudio se realizó con la finalidad de caracterizar molecularmente 80 accesiones de cacao del banco de germoplasma del Instituto de Cultivos Tropicales (ICT), localizado en la ciudad de Tarapoto departamento de San Martín, este material tiene diferentes procedencias genéticas y geográficas como son: grupo ICT (provincias Mariscal Cáceres y Tocache), Grupo amazónico (Ríos tributarios de la amazonia Peruana) y Grupo híbridos internacionales (Trinidad y Tobago, Costa Rica, Ecuador y Perú). Por tanto se utilizó los marcadores AFLP (Polimorfismo en la longitud de los fragmentos Amplificados), que por su naturaleza dominante permitieron discriminar la diversidad existente entre las accesiones y poblaciones de cacao. La extracción del ADN se trabajó según el protocolo de Doyle & Doyle (1990), la amplificación por AFLP incluyó 4 pasos importantes: digestión de las muestras con enzimas de restricción EcoRI y MseI, unión de adaptadores en los puntos de corte con una enzima de ligación (ligasa T4), amplificación pre selectiva y finalmente una amplificación selectiva. Se usaron 13 cebadores selectivos, cuyos productos fueron

separados por electroforesis de poliacrilamida, y teñidos en solución de nitrato de plata. A partir de las imágenes obtenidas de los geles revelados se confeccionó una matriz binaria para los 9 mejores pares de cebadores específicos obtenidos, recolectándose un total de 135 loci de los cuales 97 mostraron polimorfismo. El análisis del poder discriminante de los cebadores mostró valores óptimos, ya que se registraron índices de contenido polimórfico (PIC) de hasta 0.28 para el par de cebadores EcoRI-ACA/MseI-CAT con un 83 % de loci polimórfico. El análisis de agrupamiento y variabilidad poblacional se ejecutó utilizando dos paquetes estadísticos: PAST versión 2.1b y POPGENE v1.32, con el primer programa se estableció la similitud entre las accesiones con el coeficiente de Jaccard, posteriormente se estableció un dendrograma por el método no jerárquico de Neighbour-Joining, resaltando así que las accesiones de los ríos Amazónicos se separaron marcadamente de las accesiones de las provincias de Mariscal Cáceres y Tocache, los híbridos internacionales se distribuyeron en el total de grupos obtenidos en el dendrograma. Los parámetros de la variabilidad poblacional se calcularon con la ayuda del programa POPGENE, las accesiones se agruparon en 5 poblaciones usando como criterio la procedencia geográfica de estas, las poblaciones se denominaron: Mariscal Cáceres, Tocache, Amazónicas, Trinidad-Costa y Ecuador-Perú. Se determinó que la población Mariscal Cáceres posee mayor variabilidad que el resto de poblaciones ($h = 0.20$), en términos de distancia genética la población de Trinidad-Costa referenció estos resultados al mantener una clara distancia con respecto a las 4 poblaciones, curiosamente la población correspondiente a Ecuador-Perú mostraron cierta cercanía a la Población Amazónica. Finalmente la proporción de diversidad genética (G_{st}) indicó que la variación detectada se debe a diferencias entre las poblaciones (23 %).

Palabras claves: *Theobroma cacao* L., AFLP, variabilidad.

ABSTRACT

The Peruvian Amazon has a great biodiversity in different crops including cocoa (*Theobroma cacao* L.), this plant is possessed of a great economic and social importance, breeding tasks have demanded their proper characterization, obtaining many jobs at morphological, however the molecular characterization is still inadequate although there are currently several methods for this purpose, the main limiting the availability of materials for your application. This study was conducted in order to molecularly characterize 80 accessions of cacao germplasm bank of Instituto de Cultivos Tropicales (ICT), located in the city of Tarapoto in San Martin department, this material has different genetic and geographic backgrounds and they are: ICT group (Mariscal Cáceres and Tocache), Amazon group (tributaries of the Amazon River Peru) and hybrids group international (Trinidad and Tobago, Costa Rica, Ecuador and Peru). For this purpose we used AFLP markers (Polymorphism Amplified fragment length), which by its dominant nature to discriminate the diversity among the accessions of cacao populations. DNA extraction was carried out according to the procedure of Doyle & Doyle (1990). AFLP amplification included 4 major steps: digestion of the samples with restriction enzymes EcoRI and MseI, union adapters breakpoints in an enzyme ligation (ligase), pre selective amplification and finally selective amplification. 13 selective primers were used; the products were separated by polyacrylamide electrophoresis and stained in a solution of silver nitrate. The images obtained from the gels revealed a binary matrix was made for the best 9 specific primer pairs obtained, there were a total of 135 loci of which 97 showed polymorphism. Discriminant power analysis of the

primers showed optimum values, as rates were polymorphic content (PIC) of up to 0.28 for EcoRI-ACA/MseI-CAT primer pair with 83 % of polymorphic loci, we performed the analysis grouping and population variability using two statistical packages: PAST v1.32 and POPGENE version 2.1b, with the first program was established similarity among accessions with the Jaccard coefficient, then a dendrogram was established by the non-hierarchical method neighbour-Joinning, thus highlighting the Amazonian Rivers accessions markedly separated accessions of Mariscal Cáceres and Tocache, international hybrids were distributed in all the groups obtained in the dendrogram. The population variability parameters were calculated with the help of the program POPGENE, the accessions were grouped into five populations using as criteria the geographical origin of these, these were called: Mariscal Cáceres, Tocache, Amazonian, Trinidad – Costa and Peru -Ecuador. It was determined that the population Mariscal Cáceres has greater variability than other populations ($h = 0.20$), in terms of population genetic distance from Trinidad - Costa referencing these results to maintain a clear distance from the 4 populations, curiously the population corresponding to Ecuador - Peru showed some proximity to the Population Amazon. Finally the proportion of genetic diversity (G_{st}) indicated that the detected variation is due to differences among populations (23 %).

Keywords: *Theobroma cacao* L., AFLP, variability

INTRODUCCION

El cacao es considerado como uno de los cultivos perennes más importantes del planeta (Almeida A. y Valle R., 2007). *Theobroma cacao L.* (cacao) es el cultivo de mayor importancia comercial a nivel mundial de las 22 especies que comprenden el género *Theobroma* (Schnell R. et al., 2005), *Theobroma* que en griego significa “Alimento de los Dioses” de la familia de las bitneriáceas (Ogata N., 2006). La demanda actual del cacao viene en aumento incluso por la agroindustria nacional que importa un promedio de 3 500 TM al año de grano de cacao debido a que la producción nacional no consigue cubrir la demanda. En la actualidad la superficie sembrada de cacao es de 92, 460 ha; con producción de 44,338 toneladas con rendimiento promedio de 480 kg/ha. (MINAG, 2012). La constante demanda y la creciente producción del grano de cacao, lleva a plantear estrategias para mejorar la calidad en los siguientes aspectos: Mejoras ambientales, búsqueda de cacao fino, mejores técnicas de pos cosecha, mejora del cacaotero peruano.

El Perú es uno de los centros de diversidad del cacao, pero las campañas de colecta y caracterización de germoplasma promisorio son escasas (Chia J., 2009). Es un aspecto de mucha importancia conservar y utilizar racionalmente el banco de germoplasma del Instituto de Cultivos Tropicales (ICT) ya que este contiene accesiones de cacao

provenientes de recolecciones propias, y representativas de zonas productoras y nativas de la amazonia peruana. Es importante realizar un estudio de la diversidad genética en poblaciones que representa el banco de germoplasma así como identificar los materiales más distantes genéticamente, evitar duplicados y detectar pérdida de diversidad en la población inicialmente recolectada.

Como actividad económica en crecimiento, requiere el empleo de técnicas y estrategias que le permitan solucionar problemas para ser eficiente. Dentro del contexto la biotecnología ofrece interesantes herramientas para el mejoramiento genético de los organismos cultivables, para realizar una mejor selección de organismos reproductores que posean las mejores características en tasa de crecimiento, de conversión alimenticia y de resistencia a enfermedades, entre otras. La filosofía que se adopta en cuanto al mejoramiento genético de cacao es la de lograr generar variedades superiores “plantas élite” que reemplacen a las variedades tradicionales”, para lograr esto es necesario un mejor conocimiento de la diversidad genética.

La diversidad genética del cacao comprende el conjunto de poblaciones silvestres y domesticadas, con distinto origen genético y grado evolutivo, que ocupan un nicho ecológico específico y, que teniendo características semejantes y distintivas, se muestran variables o diferentes. La diversidad genética del cacao juega un rol muy importante para:

- a) La conservación del germoplasma nativo y mejorado.
- b) La utilización del germoplasma promisorio con fines de propagación clonal.
- c) Como fuente de genes para los programas de mejora genética.
- d) Una mejor comprensión de relaciones de similitud o disimilitud taxonómica.
- e) La elaboración de mapas genéticos.
- f) El aislamiento, clonación, secuenciación de genes, etc.

Los programas de mejoramiento del cacao enfocaron su atención en características fenológicas de interés agronómico las cuales, están fuertemente influenciados por el ambiente. A partir de la década de los ochenta del siglo pasado se empezaron a incorporar marcadores moleculares como herramientas auxiliares en los estudios y programas relacionados con esta planta.

El análisis de la diversidad genética usando marcadores moleculares, permite determinar perfiles genéticos a nivel del ADN (“genotipificación” o ADN “fingerprinting”), muy útiles para la identificación y diferenciación inequívoca de cualquier accesión en un banco de germoplasma. La ventaja de la genotipificación sobre la caracterización morfológica, es que no depende de la edad de la planta, ni del estado de desarrollo de ella o del ambiente (año o lugar) donde ésta se cultiva. Esta herramienta molecular permite la identificación de accesiones duplicadas y aquellas con posible rotulado dudoso (García L., 2011). Los marcadores moleculares se basan en tres diferentes estrategias de detección del polimorfismo: hibridación del ADN, reacción en cadena de la polimerasa y secuenciamiento de ADN. Sin embargo, cada una de las mencionadas técnicas tiene ventajas y desventajas que deben evaluarse según la aplicación y condición (Karp A. et al., 1997; Spooner D., 2005). La técnica denominada AFLP (amplified fragment length polymorphism) ha sido exitosa para generar marcadores moleculares que son aplicados en estudios genéticos en una amplia gama de disciplinas.

HIPOTESIS.

Debido a que AFLP es una técnica adecuada para generar marcadores moleculares y dilucidar la variabilidad genética en diferentes especies vegetales, es posible que con la aplicación de esta técnica se pueda obtener de una manera eficiente la diversidad de 80 accesiones de *Theobroma cacao* L. (cacao) del banco de germoplasma del Instituto de Cultivos Tropicales (ICT).



OBJETIVOS

Objetivo General.

Determinar la variabilidad de 80 accesiones de *Theobroma cacao* L. (cacao) del banco de germoplasma del Instituto de Cultivos Tropicales (ICT), con el uso de marcadores moleculares AFLP.

Objetivos específicos.

1. Evaluar el polimorfismo obtenido con los marcadores AFLP utilizados.
2. Analizar la similaridad y agrupamiento entre las accesiones de *Theobroma cacao* L. (cacao).
3. Analizar la variabilidad entre poblaciones de *Theobroma cacao* L. (cacao).



I MARCO TEORICO

1.1 Importancia del cacao; Las actividades que se generan alrededor del árbol cacaotero son de suma importancia tanto económica como social, cultural y ambiental, ya que de esta planta se pueden derivar muchos beneficios tanto para las personas que la cultivan y comercian así como para el entorno biológico de este. A partir de las semillas se obtiene el cacao en grano del cual se obtiene cuatros productos intermedios como son: el licor de cacao, manteca de cacao, pasta de cacao y cacao en polvo; el mercado de chocolate es el mayor consumidor de cacao en términos de equivalencia en granos, pero los productos son muy utilizados en diversas áreas.

El cacao contiene cerca de 300 compuestos volátiles incluyendo ésteres, hidrocarburos, lactonas, monocarbonilos, piroles etc. Los compuestos que dan el sabor son ésteres alifáticos, polifenoles, carbonilos aromáticos insaturados, pirazinas y teobromina. El cacao también contiene cerca de 18% de proteínas (8% digeribles); grasas, aminas y alcaloides incluyendo teobromina (0.5 a 2.7%), cafeína (0.25 a 1.43%), tiramina, dopamina, salsolinol, trigonelina, ácido nicótico y aminoácidos libres, taninos, fosfolípidos, alcaloides (principalmente teobromina), taninos y otros constituyentes, la cáscara de cacao posee un pigmento que es un poliflavonoglucósido. Este pigmento es

requerido por ser resistente al calor y a la luz, estable a pH de 3 a 11 y muy usado como colorante de alimentos (Leung A., 1980; López A. et al., 1984) e incluso como alimento de ganado (Aregheore E., 2002). Los principales productos de cacao se detallan en la tabla 1.

La pulpa adherida a la mazorca del fruto del cacao (Fig.1) constituye un valioso insumo que puede ser utilizado en la nutrición y la gastronomía ya que el fruto del cacao es una pulpa de buenas características organolépticas, actúa como espesante natural y enriquece la amplia gama de potajes de la comida peruana.

Tabla N° 1: Productos derivados del cacao y sus diferentes usos en la industria.

PRODUCTO	USOS DEL CACAO Y SUS DERIVADOS
Manteca de cacao	Elaboración de chocolate y confitería, también puede ser usada en la industria cosmética (cremas humectantes y jabones), y la industria farmacéutica.
Pulpa de cacao	Productos de bebidas alcohólicas y no alcohólicas.
Cascara	Puede ser usado como comida para animales
Cenizas de cascara de cacao	Puede ser utilizado para elaborar jabón y como fertilizante de cacao, vegetales y otros cultivos.
Jugo de cacao	Elaboración de jaleas y mermeladas
Polvo de cacao	Puede ser usado como ingrediente en casi cualquier alimento: bebidas chocolatadas, postres de chocolate como helados y mousse, salsa, tortas y galletas.
Pasta de licor de cacao	Se utiliza para elaborar chocolate.

(Fuente: Requena J., 2012 “El cacao y sus derivados”)

Además se ha reportado que el cacao posee actividad antibacteriana en la cáscara (Cuéllar O. y Guerrero G, 2012), también se han realizado trabajos de obtención de

espumas de poliuretano para uso hortícola, así como actividad biodegradativa (Padrón G. et al., 2004).

En la actualidad, el cacao en grano es la materia prima para las industrias chocolatera, de cosméticos y farmacéutica. Los productos del cacao, al mismo tiempo que constituyen un placer al ingerirlos, también presentan un valor nutritivo, relacionado con la cantidad y el tipo de proteínas, carbohidratos, grasas, minerales y vitaminas que contiene. Igualmente es valorado por su contenido de flavonoides los cuales presentan una alta biodisponibilidad, lo que significa que pueden ser absorbidos por el organismo rápidamente (Posada J. et al. 2006).

Al cacao y el chocolate se les han atribuido más de cien usos medicinales en los últimos 475 años. Su larga historia en el tratamiento médico ha sido muy controversial, siendo prescritos principalmente para los siguientes padecimientos:

- Para ganancia de peso en pacientes desnutridos o portadores de enfermedades desgastantes como la tuberculosis.
- Para estimular el sistema nervioso central en personas que sufren de apatía y/o depresión, acción que ahora podría ser atribuida a la feniletilamina, teobromina y la cafeína que posee el chocolate.
- Para calmar, suavizar y tranquilizar a los pacientes identificados como “sobrestimulados”, especialmente aquellos que sufren de trabajo extenuante o “actividad mental abundante”. En este caso, es posiblemente el sabor agradable lo que ocasiona un efecto relajante.
- Para mejorar la digestión y tránsito intestinal, estimular los riñones y acelerar el flujo de orina, ablandar las heces e, incluso, la curación o reducción de las hemorroides.
- Para enmascarar el desagradable sabor de algunos fármacos, siendo popularmente referido como “un poco de chocolate hace pasar la medicina”.



Figura N° 1: Pulpa y mazorca de cacao, se pueden apreciar los granos esparcidos dentro de la mazorca. (Fuente: Registro gráfico propio).

En el mundo anualmente se produce 2,3 millones toneladas de cacao. Los principales países productores de cacao en grano crudo, excepto para siembra son: Costa de Marfil (30%), Indonesia (14%), Nigeria (13%), Ghana (10%), Camerún (7%) y Países Bajos (5%), Ecuador (4%), Bélgica (4%), Nueva Guinea (2%), seguidos por Colombia (2%), México (1%) y Perú (0.9%). En el Perú las zonas productoras más importantes del país se encuentran localizadas en las regiones de San Martín (26 mil TM), Cuzco (8 mil TM), Ayacucho (6 mil TM), Junín (6 mil TM), Amazonas (4 mil TM), Huánuco (2 mil TM). (MINAG, 2011). La ubicación de las zonas productoras se aprecia en la figura 2.

El consumo de este producto se da principalmente en países desarrollados, por ejemplo: los Estados Unidos, Alemania, Francia y el Reino Unido, que abarcan más del 50 % de la demanda mundial (DGPA, 2007). Asimismo, los compradores en los países consumidores son los principales transformadores y productores del chocolate, colocando a las compañías transnacionales como dominantes transformadoras y productoras de chocolate.

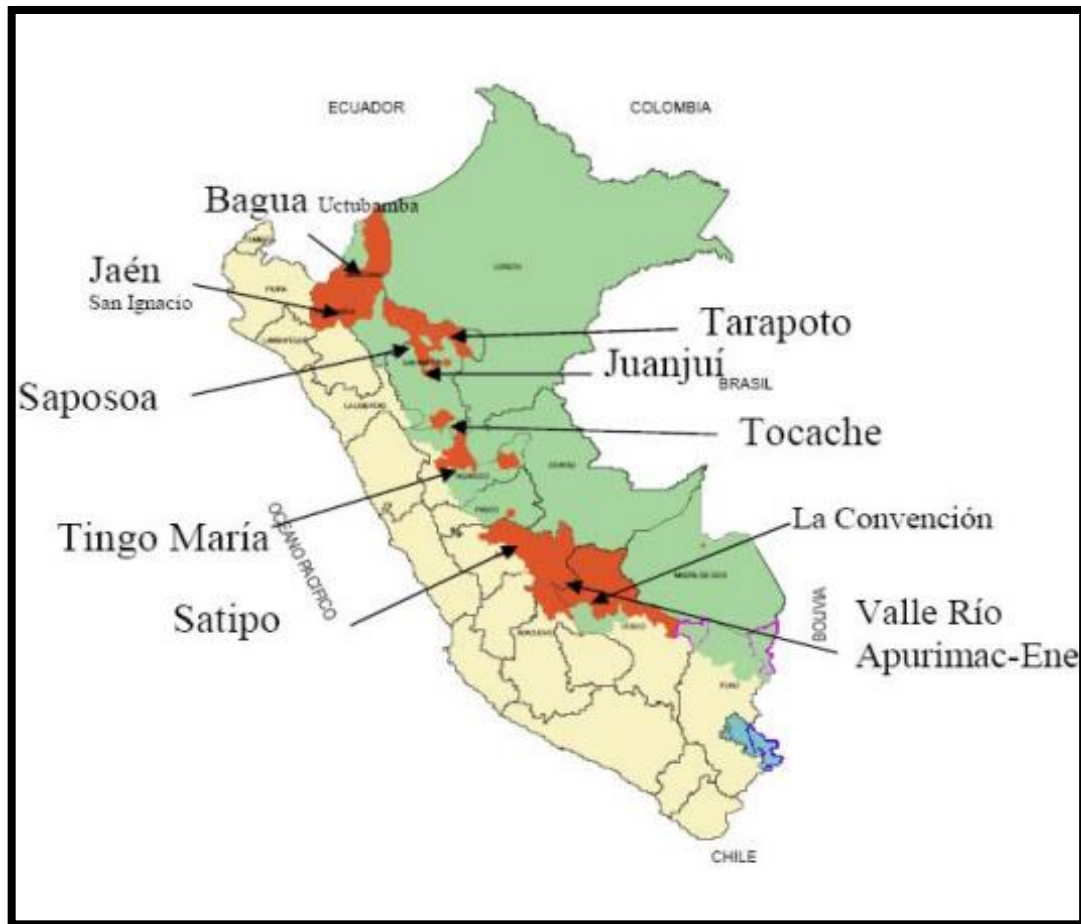


Figura N° 2: Principales zonas productoras de cacao ubicadas dentro del territorio Peruano. (Fuente: MINANG 2003).

En el Perú la producción de cacao incrementó de 8,000 toneladas en 1985 a 22,134 toneladas en 1995. En forma concurrente, el área cultivada en el país aumentó de 17,800 ha en 1985 a 34,786 ha en 1995. En la actualidad la superficie sembrada de cacao es de 92, 460 ha; con una producción de 44,338 TM y un rendimiento promedio de 480 kg/ha; cifras que nos indican que existe una brecha de 58% de adopción de las tecnologías que no permitan llegar a rendimientos óptimos mínimos de 1 tonelada/ha (Tabla 2); situación que se debe en gran parte al limitado o nulo acceso que tienen los agricultores a las tecnologías existentes para la producción óptima de cacao, en las que se contempla

sistemas de producción acordes con el equilibrio de la naturaleza, con la menor dependencia a insumos externos que encarezcan los costos de producción; que permitan el incremento y conservación de la biodiversidad y que realmente sea una alternativa para el pequeño productor de la selva Peruana (Arévalo E., 2011). Sin embargo, el valor de las exportaciones de cacao y todas sus presentaciones sumaron 111 millones 646 dólares, generando alrededor de 5.7 millones de jornales anuales, beneficiando directamente a más de 30 mil familias e indirectamente a 150,000 personas. La importancia económica y social de la cadena del cacao radica en su aporte al valor bruto de la producción, que durante 2011 fue de S/. 130 millones. (MINAG, 2012).

El Perú ha sido calificado por la Organización Internacional del Cacao, como un país productor y exportador de cacao fino y de aroma, logrando exportar el 36% del cacao fino y de aroma que se produce a nivel mundial. Asimismo, como segundo productor de cacao orgánico, orienta su producción a mercados de comercio justo; además la producción de cacao se da todo el año, pero los picos más altos a nivel nacional se alcanzan durante los meses de Abril a Julio (MINAG, 2012).

Tabla N° 2: Producción de cacao en toneladas (TM), hectáreas cultivadas (Ha) y rendimientos (T/Ha) de cacao por departamentos en los años 2010 y 2011.

Región	Mil TM		Mil Ha		Rend. T/Ha	
	2010	2011	2010	2011	2010	2011
San Martín	21	26	25	29	0.9	0.9
Cusco	7	8	21	22	0.3	0.4
Ayacucho	6	6	9	9	0.7	0.7
Junín	4	6	9	9	0.5	0.7
Amazonas	3	4	6	6	0.4	0.7
Huánuco	2	2	4	4	0.5	0.5
Cajamarca	1	1	1	0	0.8	0
Ucayali	1	2	1	2	0.9	0.9
otros	1	1	1	2		
Total	47	56	77	84		

(Fuente: MINAG 2011)

Además de la relevancia industrial, el cacao es medular también desde la perspectiva social y ambiental, pues su cultivo está vinculado, por sus requerimientos edafoclimáticos, a países, básicamente en desarrollo localizados en la franja ecuatorial de América, Asia y África y del que dependen una gran cantidad de agricultores (Efombagn M. et al., 2009). Los cacaotales son valiosos para la conservación de la biodiversidad, ya que debido a su alta diversidad vegetal proveen de hábitats, nichos y alimentos para otras especies de plantas y animales; amortiguan las áreas protegidas; y sirven de conexión entre los ecosistemas intactos y manejados del paisaje.

El cultivo de cacao se muestra además como un arma para combatir el narcotráfico, ya que viene siendo promovido en las regiones peruanas identificadas tradicionalmente con el cultivo de la hoja de coca; los agricultores cocaleros, quienes por años resistieron operativos de erradicación de sus cultivos de hoja de coca, han cambiado su actitud gracias al Programa de Desarrollo Alternativo (PDA), impulsado por la Agencia de Desarrollo Internacional de los Estados Unidos (USAID por sus siglas en inglés). La premisa del PDA, que hoy opera en las regiones de San Martín, Huánuco, Ayacucho y Ucayali, es: “abandonar el cultivo de coca a cambio de apoyo técnico y económico para cultivar el café y el cacao, además de asistencia para mejorar la infraestructura regional”.

Todas estas características han abierto nuevas oportunidades para la producción de cacao en América Tropical, gracias a mejores precios internacionales, lo que ha suscitado mayor apoyo externo e interno al cultivo. Igualmente hay una creciente demanda por cacaos diferenciados de alta calidad, con sello orgánico, mercado justo o denominación de origen (Arciniegas A. y Phillips W., 2006; Cherfas J., 2007).

1.2 Características del cacao

1.2.1 Taxonomía y nomenclatura; El cacao es una planta leñosa antes clasificada en la familia *Sterculiaceae* (Cuatrecasas J., 1964), y actualmente reclasificada en la familia *Malvaceae* (Alverson W. et al., 1999), La familia *Sterculiaceae* es reconocida en el Perú

por presentar alrededor de 12 géneros y 74 especies (Brako L. y Zarucchi J., 1993) principalmente arbustos y árboles. Los taxones endémicos se encuentran en varias regiones, principalmente en bosques muy húmedos montanos, bosques muy húmedos premontanos, bosques húmedos amazónicos, matorral desértico y mesoandina, entre los 100 y 2800 m de altitud. Las cuales han sido poco coleccionadas, y sólo *Theobroma cacao* ha sido descrita taxonómicamente.

En el tratamiento taxonómico se indican las secciones acompañadas de claves, descripciones, ilustraciones con detalles de flores y frutos e información del uso, hábitat y fenología de las especies *Theobroma bicolor* Humb. & Bonpl., *Theobroma cacao* L., *Theobroma grandiflorum* (Willd. Ex Spreng.) Schum., *Theobroma obovatum* Klotzsch ex Bernoulli, *Theobroma speciosum* Willd. ex Spreng. Y *Theobroma subincanum* Mart.

La clasificación del cacao según Cronquist, (Arca M., 2000; Días L., 2001):

Reino:*Plantae*

División:*Magnoliophyta*

Clase:*Magnoliopsida*

Orden:*Malvales*

Familia:*Sterculiaceae*

Sección:*Theobroma*

Género:*Theobroma*

Especie:*Theobroma cacao* L.

Entre los trabajos más completos del género *Theobroma* se puede citar el de Bernoulli G. (1869) quien por primera vez presenta una monografía donde describe una clasificación natural para 18 especies separadas en cinco secciones: *Cacao*, *Glossopetalum*, *Oreanthes*, *Rhytidocarpus* y *Telmatocarpus*; para ello considera como caracteres básicos la forma de los pétalos, la posición y forma de los estaminodios y el número de anteras. Schumann K. (1886) en la Flora Brasiliensis, señala descripciones

detalladas de 12 especies, tomando como características básicas las mismas consideradas por Bernoulli, las clasifica ubicándolas en las secciones *Herrania* y *Eutheobroma*. Chevalier A (1946), usando los mismos caracteres básicos y la división propuesta por Bernoulli, realiza una reorganización de 13 especies que ubica en las secciones *Cacao*, *Oreanthes*, *Rhytidocarpus* y *Telmatocarpus*.

Cuatrecasas J. (1964), en una revisión más precisa y crítica del género, establece la validez de las especies y su respectiva sinonimia. Este autor toma como base los caracteres señalados por Bernoulli, pero hace un estudio más exhaustivo, detallado y completo, tomando en cuenta tipo de germinación (hipogea y epigea), forma y pubescencia de las hojas, tipo de polen y fruto, que lo llevan a citar 22 especies válidas para *Theobroma*, ubicadas en seis secciones: *Andropetalum*, *Glossopetalum*, *Oreanthes*, *Telmatocarpus*, *Theobroma* y *Rythidocarpus*. El detalle de esta clasificación se muestra en la tabla 3.

Tabla N° 3: Clasificación en secciones taxonómicas del genero *Theobroma* y ubicación de la especie del cacao.

Sección	N° Especies	Especies
<i>Andropetalum</i>	1	<i>T. mammosum</i>
<i>Glossopetalum</i>	12	<i>T. angustifolium</i> , <i>T. canumanense</i> , <i>T. chochoense</i> , <i>T. cirmolinae</i> , <i>T. glandiflorum</i> , <i>T. hylaeum</i> , <i>T. nemorale</i> , <i>T. obovatum</i> , <i>T. simiarum</i> , <i>T. sinuosum</i> , <i>T. stipulatum</i> y <i>T. subincanum</i> .
<i>Oreanthes</i>	5	<i>T. bernoullii</i> , <i>T. glaucum</i> , <i>T. sylvestre</i> y <i>T. Velutinum</i>
<i>Rhytidocarpus</i>	1	<i>T. bicolor</i>
<i>Telmatocarpus</i>	2	<i>T. gileri</i> y <i>T. Microcarpum</i>
<i>Theobroma</i>	1	<i>T. cacao</i>

(Fuente: Cuatrecasas J., 1964 citado por Chia J., 2009)

El género *Theobroma* presenta la mayor distribución geográfica, encontrándose desde las regiones de Loreto, Amazonas y San Martín, siendo el principal foco geográfico los afluentes del Río Huallaga y Marañón. (Región alta del río Amazonas, incluyendo Río Nanay, Río Morona, Río Marañón, Río Ucayali y sus afluentes). (Evans H. et al., 1998).

Existen otros estudios que contradicen los ya mencionados como es el caso de (Motamayor J. et al., 2002; Sounigo O. et al., 2005; Lachenaud P. et al., 2007; Guitinan et al., 2008) que reportan al *T. cacao* como perteneciente a la familia Malvaceae sensu lato y por tanto ya no dentro de las Sterculiaceae. Según el Royal Botanical Garden of Edinburgh, la familia Malvaceae sensu lato estaría conformada por las familias Malvaceae sensu stricto, Sterculiaceae, Bombacaceae y Tiliaceae. Esto nos lleva a mostrar el Sistema de clasificación APG (del inglés “Angiosperm Phylogeny Group”):

Clado 1: *Angiospermas*

Clado 2: *Eudicots*

Clado 3: *Core Eudicots*

Clado 4: *Rosids*

Clado 5: *Eurosids II*

Orden: *Malvales*

Familia: *Malvaceae*

Género: *Theobroma*

Especie: *T. cacao* L.

Morris D. (1882), fue el primer botánico que señaló dos grandes grupos para esta especie: Criollo y Forastero utilizando un criterio de diferenciación por “cultivares” (Braudeau J., 1975). Cheesman E., (1944) sugirió la siguiente clasificación en cuatro grupos básicos: Criollo centroamericano, Criollo sudamericano, Forasteros amazónicos y Trinitarios.

Tabla N° 4: Grupos de cacao y distribución geográfica.

Grupo de Cacao	Distribución Geográfica
Criollo ancestrales	Sur de México
Criollo modernos	América central, Colombia y Venezuela
Amazonas o Forastero del Alto Amazonas	Perú, Ecuador, Colombia, Bolivia y Brasil
Guyanas o Forastero del Bajo Amazonas	Meseta de las Guyanas, Venezuela, Surinam, Guyana Francesa y Brasil
Nacional	Zona costera del Ecuador

(Lachenaud, 1997 y Motomayor J. et al., 2002)

La clasificación propuesta por Lachenaud P., (1997) se muestra en la tabla 4, que sustentándose sobre la base de estudios moleculares y argumentos paleoclimáticos, paleográficos y geobotánicos, aportó una clasificación en grupos o compuestos germoplásmicos con su respectiva distribución geográfica. Excluye aquí al Trinitario, por ser un híbrido entre Criollo y Forastero. Motamayor J. et al. (2002) en un estudio molecular usando RFLP y SSR, llegaron a la diferenciación del cacao de tipo Criollo en dos: Criollos Ancestrales y Criollos Modernos.

Motamayor J. et al. (2008) usó marcadores moleculares (106 microsatelites) sobre 1.241 accesiones para determinar la diversidad genética del cacao, proponiendo una nueva clasificación del germoplasma de cacao en 10 grupos siendo así: Marañón, Curaray, Criollo, Iquitos, Nanay, Contamana, Amelonado, Purús, Nacional y Guiana. (Fig. 3). Este aporte dio una mejor visión de la estructura poblacional del cacao y es de mucha ayuda para futuros programas de fitomejoramiento.

El cacao ha sido cultivado en América y todos los tipos o razas que se encuentran hoy no son más que variedades o cultivares de los que apenas es posible conocer su origen y su historia. (Braudeau, 1981 citado por Chia J., 2009). Finalmente se puede agregar que pese a la abundancia de clasificaciones la posición sistemática exacta y el contexto

evolutivo de *Theobroma cacao* dentro del género *Theobroma* no han sido aun completamente clarificados (Faleiro F. et al., 2002).

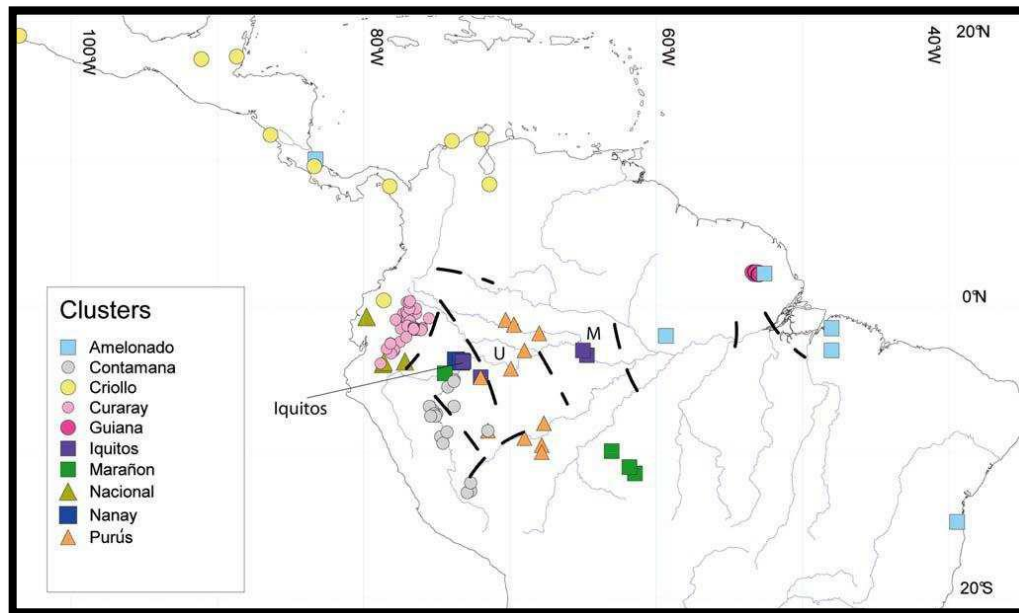


Figura N° 3: Localización del origen de la clasificación botánica para el cacao. Con marcador SSR (Fuente: Motamayor et al., 2008)

1.2.2 Hábitat y Agronomía; El cacao (*Theobroma cacao L.*) es una planta autóctona del Nuevo Mundo, Es un árbol nativo de los bosques húmedos del Sur de América. Se cree que el centro de origen del cacao se encuentra localizado en los bosques tropicales de la Región Amazónica de Perú, Colombia y Ecuador, debido a la alta diversidad genética que ha sido reportada en estos sitios (Cheesman E., 1944; Cuatrecasas J., 1964; Motamayor J. et al., 2002)

Actualmente distribuida a lo largo de las regiones lluviosas de los trópicos, se desarrolla bien hasta los 20° de latitud en ambos hemisferios (Bartley B., 2005). Las mejores plantaciones están localizadas entre de latitud norte y 10° sur. En América el cacao se cultiva desde el sur de México hasta Brasil y Bolivia (Ochse J. et al. 1974). La distribución natural del cacao en Suramérica alcanza hasta los 15° de latitud sur, en los ríos Alto Beni y Mamoré del territorio boliviano y por el norte hasta cerca de los 10° de

latitud en los límites de los llanos venezolanos por las vertientes bajas de las sierras de Parimá, que dividen a Venezuela de Brasil (Soria V., 1996).

Crece en topografía plana u ondulada encontrándose en terrenos que sobrepasan el 50 % de pendiente, en cañadas, a orilla de arroyos. Exige temperaturas medias anuales elevadas con fluctuaciones pequeñas, una gran humedad y una cubierta que le proteja de la insolación directa y de la evaporación. La precipitación debe ser de 1,300 a 2,800 mm por año con una estación seca corta, menor de 2 meses y medio. El clima debe ser constantemente húmedo, con temperatura media diaria entre 20 y 30 °C, con una mínima de 16 °C. Para su pleno desarrollo exige suelos profundos (1 m como mínimo), fértiles y bien drenados. Deben evitarse suelos arcillosos, arenosos, mal drenado o muy superficial con presencia de rocas y un nivel freático poco profundo. Suelos: negro rocoso, café-rojizo barroso, aluvial. (Publicado en: Species Plantarum 4ta Edición 1830).

Por último el cacao es considerada como especie primaria y umbrófila, no es un árbol de espacios abiertos; la planta Evoluciono bajo circunstancias de dosel cerrado. Este árbol es cultivado bajo la sombra de árboles más grandes pues requiere protección para su desarrollo normal y producción; comparte el segundo y tercer estrato de las selvas tropicales.

1.2.3 Morfología y Botánica; El cacao es un árbol leñoso, fuerte, de porte relativamente bajo, es una planta alógama, de ciclo vegetativo perenne y diploide, Tiene un número cromosómico $2n=20$ (Arguello et al. 2000). Las especies del género *Theobroma* son árboles ramificados con hojas simples y con un fruto indehiscente carnosos (mazorca)(fig. 4).

Theobroma cacao es un árbol o arbusto semicaducifolio crece hasta un promedio de 15 metros de altura, y en cultivo se mantienen normalmente a 4 y 10 metros, (Duke J., 1983) El tallo es glabro o parcialmente pubescente en ejes jóvenes (Rice et al., 2000). La corteza es oscura, gris-café. Las ramas son cafés y finamente vellosas. Las hojas son coriáceas (o cartáceas) simples, enteras (o ligera e irregularmente sinuadas),

angostamente ovadas a obovado-elípticas, ligeramente asimétricas, 17 a 48 cm de largo y 7 a 10 cm. de ancho, alternas y glabras o laxamente pubescentes en ambas caras. La base de las hojas es redondeada a ligeramente cordada, ápice largamente apiculado; el pecíolo es de 14 a 27 mm de largo, las estípulas son lineares y caducas. Las inflorescencias son caulinares y cimosas, las flores son pentámeras, hermafroditas, actinomorfas, y de 5 a 20 mm de diámetro; el pedúnculo floral es de 1 a 3 cm de largo. Los sépalos son (verdosos) blancos o rosa claros, 5 a 8 mm de largo, 1.5 a 2 mm de ancho, angostamente lanceoladas, persistentes y fusionados en la base. Los pétalos son un poco más largos que los sépalos, 6 a 9 mm de largo, libres, amarillentos, con dos y hasta tres nervios violetas adentro, glabros, con la parte inferior redondeada o abruptamente atenuada, recurvos y apiculados. Los estambres son 10 y lineares; cinco estambres fértiles se alternan con cinco estaminodios; todos los estambres están fusionados en la base formando un tubo; los estambres fértiles son de 2,5 a 3 mm de largo y están dispuestos frente a los pétalos; los estaminodios son violeta y 6.5 a 7.5 mm de largo. El ovario es de 2 a 3 mm de largo, anguloso-ovado, ligeramente pentagonal y pentámero. Los óvulos se disponen en dos filas con 6 a 16 óvulos por fila. El fruto es una baya grande llamada también mazorca, es polimorfa, esférico a fusiforme, púrpura o amarillo en la madurez, glabro, de 10 hasta 35 cm de largo y de 6 hasta 10 cm ancho, tiene un peso de entre 200 1000 gr, posee de 5 a 10 surcos longitudinales. El endocarpo es de 4 a 8 mm de grosor, duro y caroso, y leñoso estado seco. Las semillas son café-rojizas, ovadas, ligeramente comprimidas, cada una de entre 20 y 50 mm de largo, 12 a 16 mm de ancho y 7 a 12 mm de grosor; la conformación del sistema radical del cacao depende de la clase de propagación utilizada en su siembra. En una planta proveniente de semilla hay una raíz principal o pivotante, que alcanza hasta dos metros de longitud. En el caso de las plantas provenientes de propagación clonal no hay una sola raíz principal sino varias y su diámetro es mayor a 5 mm. Igualmente hay raíces laterales o raíces que se ramifican superficialmente y miden hasta cinco metros de largo, de las cuales el 78% se ubican entre los 0-20 cm de profundidad y tienen un diámetro entre 1 – 5 mm. Las raicillas alimentadoras proliferan cerca de la superficie en los primeros 5 cm de profundidad, en una masa compacta y su diámetro es menor a 1 mm, con una

extensión de 1.200 metros por metro cuadrado en árboles de 11 años de edad.(Kummerow J. et al., 1981; Gama R. y Cadima Z., 1991; León J., 2000).



Figura N° 4: Árbol de cacao en la estación experimental “el Choclino “. (Fuente: Registro grafico propio)

El efecto del sistema de propagación también se observa en el tallo. Cuando la planta se origina a partir de una semilla sexual presenta un tronco vertical que puede desarrollarse en forma muy variada dependiendo de las condiciones ambientales, pudiendo alcanzar los 20 m de altura. En general, cuando la planta alcanza 1,50 a 2 m de altura se abre dando origen a 3, 4 o 5 ramas distribuidas al mismo nivel formando la mesa, molinillo o verticilo. Las plantas de origen clonal obtenidas mediante injerto o estacas presentan una

conformación diferente sin el predominio de un eje principal. En este caso el tallo usualmente se asemeja a una rama primaria porque normalmente los injertos se hacen a partir de yemas plagiotrópicas, consecuentemente la planta no crece verticalmente y no emite horqueta. Las hojas son de superficie lisa y brillante por ambas caras, con colores variables que van desde morado hasta verde pálido, la longitud del peciolo varía en tamaño dependiendo si son ramas ortotrópicas (crecimiento vertical) o plagiotrópicas (crecimiento horizontal) siendo este más largo en las primeras (Enriquez G., 1968, León J., 2000).

1.3 Principales grupos cultivados de cacao en el mundo; *Theobroma cacao* fue diferenciarla en “cultivares”, proponiéndose dos grandes grupos: Criollo y Forastero (Morris D., 1882). Años después se sugirió una nueva clasificación en grupos básicos: Criollos, Forasteros amazónicos y Trinitarios (Cheesman E., 1944). Sin embargo en la actualidad se ha mencionado que la especie *Theobroma cacao* comprende una gran variedad de formas y poblaciones muy diferentes y que las antiguas clasificaciones no describen suficientemente la variabilidad de la especie (Hall H. et al., 2010), (Zhang D. et al., 2009). Sin embargo las antiguas clasificaciones siguen siendo usadas como referencia en muchos trabajos de investigación (fig. 5).

Particularmente, el grupo Forastero abarca una alta variabilidad genética, mientras que las formas Criollo son genéticamente más estrechamente definidas. El grupo Trinitario comprende híbridos entre los dos primeros grupos. La mayoría de las formas de cacao cultivadas mundialmente hoy en día son híbridos de orígenes mixtos que no pueden ser completamente incluidos dentro de esta división clásica. Un estudio reciente basado en datos moleculares clasifica las formas conocidas en 10 conglomerados principales o grupos (Motamayor J. et al, 2003). La delimitación clásica de grupos, ya sin base científica, puede resumirse de la siguiente manera:

1.3.1 Cacao Criollo; Se cree que el cacao criollo era la única variedad de cacao cultivado en Mesoamérica antes de la llegada de los europeos (Bartley B., 2005;

Motamayor J. et al., 2002). Los Criollos (palabra que significa nativo pero de ascendencia extranjera), se originaron también en Sudamérica, pero fueron domesticados en México y Centro América y son conocidos también como híbridos de cacao dulce; el cacao Criollo comprende árboles delgados, son plantas de poco vigor y bajo rendimiento, destacándose la alta calidad de sus semillas. Este tipo de cacao posee un cotiledón de color entre marfil pardusco y castaño muy claro, con un olor de cacao dulce unido a un aroma delicado característico; los frutos tienen típicamente una cubierta delgada, y una pigmentación rojiza. Las formas Criollo muestran signos de depresión endogámica y frecuentemente mayor susceptibilidad a plagas. Se cultiva en México, Venezuela, Colombia, Nicaragua, Guatemala, Trinidad, Jamaica y Granada, en la zona del océano Índico y en Indonesia. Representa, como mucho, el 10% de la producción mundial (Wood G., 1975; Adriazola J, 2003).

1.3.2 Cacao Forastero; El cacao Forastero abarca una amplia gama de poblaciones de América del Sur (Bartley B., 2005), pero no se utilizó en la producción hasta mediados del siglo 18. El cacao Forastero fue llevado a las regiones tradicionales productoras de cacao, incluyendo América Central y el Caribe, se sabe algunas de las plantaciones de cacao fueron devastadas por las enfermedades desconocidas. Su centro de origen es la parte alta de la cuenca del Amazonas en el área comprendida entre los ríos Napo, Putumayo y Caquetá, se caracteriza por ser de mayor tolerancia a las enfermedades que el cacao Criollo, sus frutos de cáscara dura y leñosa, de superficie relativamente tersa y de granos aplanados, pequeños de color morado y sabor amargo; dentro de esta raza se destacan distintas variedades como Cundeamor, Amelonado, Zambito, Calabacillo y Angoleta. La variedad Nacional originaria de Ecuador se caracteriza por ser un cacao fino y de gran aroma y también pertenece a este grupo. La variedad Forastero y derivados de este tipo de cacao representan aproximadamente un 85% de la producción mundial, proveniente de los países de África Occidental y Brasil. (Hunter R., 1990).

1.3.3 Cacao Trinitario; Se cree que la población de cacao Trinitario debió haber surgido naturalmente en Trinidad, por hibridación entre remanentes Criollos y germoplasma Forastero que se introdujo de Venezuela en la mitad del siglo XVIII

(Cheesman E., 1944; Bartley B., 2005). Por esta razón, estos materiales presentan características morfológicas y genéticas de ambas razas. Es más resistente y productivo que el cacao “Criollo” pero de inferior calidad. Es producido en Granada, Jamaica, Trinidad y Tobago, Colombia, Venezuela y América Central.

Presentan granos de tamaño mediano a grande y cotiledones de color castaño (Enriquez G. y Soria J., 1968; Arciniegas A. 2005, Bartley B. 2005). Ocupan del 10 al 15% de la producción mundial.

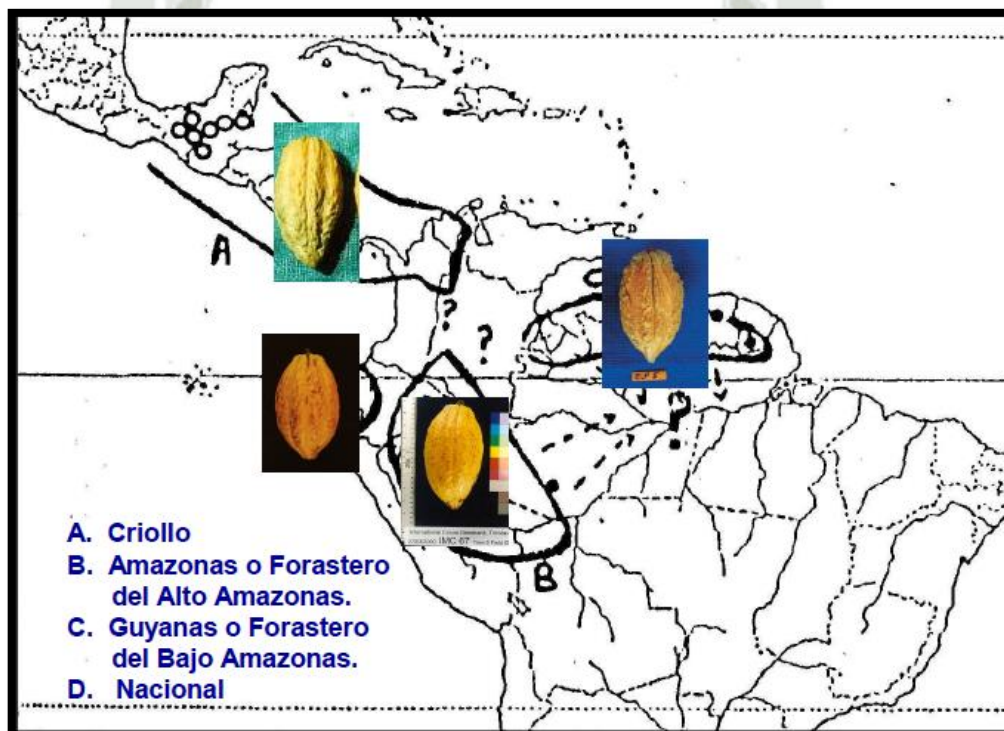


Figura N° 5: Grupos germoplasmicos Naturales de cacao y su localización en un mapa de centro y sur América. (Fuente: Lachenaud P. 1997).

En la literatura botánica sistemática se reconocen paralelamente dos subespecies dentro de *Theobroma cacao*: *Theobroma cacao* L. subsp. *Cacao* y *Theobroma cacao* L. subsp. *sphaerocarpum*. las razas y cultivares de la subespecie *cacao* forman el grupo Criollo, mientras que la subespecie *sphaerocarpum* corresponde al grupo Forastero. (Dostert N. et al., 2011).

Durante miles de años, el cacao ha sido cultivado en América y todos los tipos o razas que se encuentran hoy no son más que variedades o cultivares de los que apenas es posible conocer su origen y su historia. Se han producido mutaciones, se han hecho selecciones y han ocurrido numerosos cruzamientos naturales (Braudeau J., 1975).

1.4 Centro de Origen; Por “centro de origen” se entiende una zona geográfica donde adquirió por primera vez sus propiedades distintivas una especie vegetal, domesticada o silvestre, (FAO, 2009). Para poder dilucidar cuál sería el centro de origen más exacto para *Theobroma cacao* es necesario tener en cuenta la importancia de las variedades domesticadas en Centroamérica, además de la labor dispersante de la especie por el hombre y la naturaleza por miles de años y las evidencias actuales que colocan a la cuenca alta del Amazonas (involucra a Brasil, Perú, Bolivia, Ecuador, Venezuela y Colombia) como el poseedor de la mayor diversidad genética de la especie.

Se han realizado trabajos importantes que discuten el centro de origen de esta especie (Motomayor J. et al., 2003; Cuatrecasas J., 1964; 2001; Smith N., 1999) que señalan que el origen del árbol de cacao se habría producido aproximadamente hace unos 4,000 años, en la región de las cuencas de los ríos Amazonas y Orinoco. Los primeros árboles del cacao crecían de forma natural a la sombra de las selvas tropicales de las cuencas del Amazonas y del Orinoco. Por otro lado Cheesman E. (1944); Dias L. (2001); Gómez A. (1999), Hunter R. (1990). Afirman que Cacao (*Theobroma cacao* L.) es originario de la selva tropical de América del Sur, aunque se cree que ha sido domesticadas en el sur de México y América Central Esta especie comprende un gran número de poblaciones morfológicamente muy variables, los cuales pueden ser cruzados entre sí (Cheesman E. 1944; Bartley B. 2005).

Se cree que el centro de la diversidad genética se encuentra en las regiones amazónicas altas, que tiene una serie de importantes sistemas fluviales que desembocan en el Marañón y el Amazonas. Incluyendo la selva tropical en el Perú, se ha propuesto como centro de origen de esta especie, basado en la hipótesis de que la superior variabilidad

genética se encuentra en la región amazónica a juzgar por la gran diversidad morfológica observada en esta región (Bartley B., 2005; Dias L., 2001; Cheesman E., 1944; Cuatrecasas J., 1964; Pound F., 1945). Zhang D. (2011) reporta que en el Perú existe una a diversidad alélica importante, basada en marcadores moleculares. Producto de los estudios mencionados se desdoblaron tres hipótesis (Dias L., 2001; Motamayor J. et al., 2002), que describen el centro de origen y la dispersión de esta especie.

La hipótesis de dispersión Sur a Norte: supone que el cacao, cuyo centro de origen sería la cuenca alta del Amazonas, habría sido llevado por humanos a través de los Andes hacia Centroamérica, siendo aquí donde se domesticó. En contraparte la Hipótesis de dispersión Norte a Sur respalda un origen Centroamericano y dispersión del cacao en dirección opuesta a la anterior hipótesis; el centro de origen habría sido Centroamérica y a partir de aquí los cacaos habrían sido transportados por Amerindios hacia Sudamérica. Finalmente el “Desarrollo simultáneo” indica que existieron dos poblaciones de cacao, separados por el Istmo de Panamá y que derivaron posteriormente en cacao Criollo en Centroamérica y Forastero en Sudamérica. (Chia J. 2009)

Como cultivo, el cacao se llevó de Brasil a la colonia portuguesa de Príncipe en 1822 y de ahí a la isla Sao Tomé en 1830, ambas en el Golfo de Guinea. Posteriormente, gracias a la corona británica, Ghana obtiene el cacao en 1869 y por el año de 1951 se extiende al oeste de África, donde actualmente la producción mundial alcanza un 60 %. (Chia J., 2009)

Esta discusión sobre el origen y domesticación del cacao amplía el entendimiento del proceso evolutivo de la especie, con significativos impactos en la conservación y el mejoramiento genético.

1.5 Fuentes de variabilidad; Existen numerosos tratados en los que se discute cómo se ha producido y aún se produce la variabilidad de las especies vegetales. Las fuentes de variabilidad para las especies de plantas cultivadas se pueden resumir en las categorías siguientes.

1.5.1 Evolutiva; Se refiere a la variabilidad producida durante los procesos evolutivos de especiación por los que haya pasado una especie, principalmente durante las etapas de aislamiento reproductivo, así como a la dinámica que la especie ha tenido y sigue teniendo en condiciones naturales. En este aspecto Ford B. y Jackson M. (1986) consideran que los patrones de diversidad genética de las plantas cultivadas resultan de la interacción de los factores principales siguientes: mutación, migración, recombinación, selección (natural y artificial) y deriva genética. Los tres primeros estimulan la producción de nueva variabilidad, mientras que los dos restantes pueden reducirla. En esta interacción entra a jugar un papel relevante la biología reproductiva, autógena o alogama, con sus variantes que desarrolle la especie esperando, por lo general, una mayor variabilidad en las alogamas que en las autógenas.

1.5.2 Geográfica; Esta fuente de variabilidad es importante para un buen número de especies cultivadas que tienen un amplio rango de distribución geográfica, porque además de su dispersión natural, han sufrido una extensa dispersión artificial por acción del hombre. En ambos casos, al llegar a un nuevo nicho ecológico empiezan un nuevo proceso evolutivo en el cual crean variantes genéticas de adaptación como respuesta a variaciones en los componentes ambientales. Una vez más entran a jugar los factores principales mencionados en la variabilidad evolutiva. En términos generales, se espera que a mayor rango de dispersión geográfica de una especie vegetal, ocurra una mayor variabilidad.

1.5.3 Domesticación; Durante el proceso de domesticación de las especies cultivadas el hombre ha ejercido una fuerte presión de selección que ha permitido la preservación de muchas variantes las cuales, posiblemente, hubieran desaparecido en condiciones naturales. De la misma manera, el hombre también indujo la producción de nuevas variantes, tanto para facilitar el manejo agronómico como para incrementar la producción. En el proceso de domesticación se pueden identificar dos etapas distintas de presión de selección del hombre con el objeto de preservar o producir variabilidad. La domesticación que abarca todo el proceso de selección empírica mediante el cual el hombre fue adaptando las especies para suplir sus necesidades básicas en alimentación,

vestido, salud e industria. Esto fue posible mediante la selección y conservación de variantes útiles que aparecían en las poblaciones en un proceso que para la mayoría de las especies cultivadas tuvo una duración superior a 10,000 años.

El descubrimiento de la genética que proporcionó una vía alterna a la naturaleza permitiéndole ampliar su variabilidad en el corto tiempo. Por otra parte, desde el comienzo del siglo XX, es decir hace aproximadamente 100 años, genetistas y mejoradores han estado produciendo nuevas variantes genéticas mediante infinidad de cruzamientos en la búsqueda de solucionar problemas de producción y aquellos ocasionados por plagas y enfermedades en las especies cultivadas.

1.6 Recursos fitogenéticos; Desde la aparición de la vida en la Tierra hace unos 3.000 millones de años, el proceso evolutivo ha originado una enorme diversidad de especies e individuos que mediante los procesos de selección permanente se han adaptado a las diferentes condiciones del globo. Esta variabilidad genética acumulada resulta esencial para el equilibrio del sistema y constituye lo que se denomina germoplasma del planeta. Dentro de este conjunto, los “recursos fitogenéticos” comprenden la diversidad genética correspondiente al mundo vegetal que se considera poseedora de un valor para el presente o el futuro. Bajo esta definición se incluyen normalmente las categorías siguientes: variedades de especies cultivadas, tanto tradicionales como comerciales; especies silvestres o asilvestradas afines a las cultivadas o con un valor actual o potencial, y materiales obtenidos en trabajos de mejora genética (Esquinas J., 1993).

Los recursos fitogenéticos constituyen un patrimonio de la humanidad de valor incalculable y su pérdida es un proceso irreversible que supone una grave amenaza para la estabilidad de los ecosistemas Tropicales, el desarrollo agrícola y la seguridad alimentaria del mundo. Los recursos genéticos vegetales, según el Instituto Internacional para los Recursos Fitogenéticos IPGRI (1995), “representan la materia viviente que puede propagarse sexual o asexualmente; tienen un valor actual o potencial para la alimentación, agricultura o forestería y pueden ser cultivares primitivos (razas locales), cultivares obsoletos, cultivares modernos; poblaciones en proceso de mejora genética,

poblaciones silvestres y especies relacionadas” por tanto, los recursos genéticos son una fracción de esta diversidad biológica, que tienen un importante valor potencial para el establecimiento de la agricultura y su relación con la alimentación, es por eso que el hombre debe conocerlos, manejarlos, mantenerlos y utilizarlos racionalmente (Jaramillo S. y Baena M., 2000). La pérdida de variabilidad genética supone una limitación de la capacidad de responder a nuevas necesidades y un incremento de la vulnerabilidad de nuestros cultivos frente a cambios ambientales o aparición de nuevas plagas o enfermedades. (Martín I., 2001).

El valor de las colecciones de recursos fitogenéticos reside en la utilización que de ellas se haga para producir nuevos cultivares, domesticar nuevas especies y desarrollar nuevos productos, para el beneficio de las actividades productivas. Las colecciones deben proveer a los mejoradores de variantes genéticas, genes o genotipos, que les permitan responder a los nuevos desafíos planteados por los sistemas productivos, siendo para ello imprescindible conocer las características del germoplasma conservado. (Abadie T. y Berreta A., 2001)

1.7 Mantenimiento de recursos genéticos del cacao; En el caso del cacao, estos recursos genéticos se conservan en bancos de germoplasma, Los bancos de germoplasma son centros (instalaciones) para la conservación de germoplasma. Pueden ser de varios tipos dependiendo de la parte de la planta que se pretende conservar: bancos de semillas, bancos de polen, bancos de clones (colecciones en campo) y bancos de conservación in vitro de órganos y tejidos vegetativos y/o reproductivos, conservados para fines de aprovechamiento, mejoramiento genético y mantenimiento de diversidad.

Los bancos de germoplasma pueden ser colecciones base (CATIE-Costa Rica y CRU-Trinidad), cuyas instalaciones poseen un elevado número y diversidad de accesiones o colecciones activas (Banco de germoplasma de cacao-UNAS-TM, u otro), con menor número y diversidad de accesiones. Los bancos de germoplasma que son producto de numerosas expediciones de recolección a zonas donde se conoce que estas plantas

subsisten de una forma natural o ya sea zonas productoras de importancia. La finalidad extender un pool genético definido para futuros trabajos encaminados al mejoramiento.

La Amazonía peruana (región alta del río Amazonas), alberga un gran número de poblaciones diversas de cacao (Pound F., 1945; Schultes R., 1984; Bartley B., 2005), y que en la actualidad esta variabilidad está bajo amenaza debido a la rápida pérdida de su hábitat natural. El territorio de la cuenca amazónica peruana comprende 956,751 km², que corresponden al 74.4 % del territorio nacional y el 15 % de la cuenca amazónica total. Una característica importante en la Amazonía es la heterogeneidad de las formaciones vegetales desde el punto de vista fisionómico estructural y de diversidad florística. La diferente composición florística de la Amazonía peruana responde al tipo de substrato gradiente de humedad y tipo de aguas relacionada a los diferentes biotopos: suelos lateríticos; suelos aluviales, relativamente ricos; suelos muy pobres de arena blanca; suelos estacionalmente inundados y suelos permanentemente inundados. Las áreas de colecta de cacao con mayor potencial de recursos silvestres son las regiones de Loreto, Amazonas y San Martín siendo el principal foco geográfico los afluentes de los ríos Morona, Huallaga, Marañón y Nanay, además de los valles del río Ucayali (Evans H. et al., 1998).

Durante las últimas décadas, varias expediciones se han hecho y una gran cantidad de germoplasma, tanto de poblaciones nativas y cultivadas, se han obtenido de la región del alto Amazonas (Bartley B., 2005). A partir de 1930, cuarenta expediciones de colecta de germoplasma se han realizado en los países centro de origen del cacao., el Dr. F.J. Pound realizó 2 expediciones (1938 y 1943) a la Amazonía peruano-ecuatoriana, los sitios que recogían estaban todos en la región alta del Amazonas, incluyendo Río Nanay, Río Morona, Río Marañón y sus afluentes. Colectó mazorcas y varas yemeras de árboles de cacao aparentemente inmunes a la "escoba de bruja" producida por el hongo *Crinipellis perniciosa*; este germoplasma fue llevado a Trinidad y una parte se estableció como Jardín clonal en Iquitos a los que se les denominó "Clones Pound", este material genético perteneciente al grupo Forastero, sirvió para hacer selección clonal,

cruzamientos y obtención de clones Trinitarios, ICS (Selección del Colegio Imperial), Muchos clones comerciales, llamados ahora “Clones Internacionales” tienen su origen en esta colección. (Arévalo E., 2011).

Posteriormente, se realizaron expediciones de colección a la Amazonía colombiana por Chalmers A. En 1967, a la Amazonía brasileña por Barriga en 1984, a la Amazonía ecuatoriana por J. Alleny R. Lassen 1983, a la Amazonía peruana por B. Coral entre 1987 y 1989, otras colecciones en Venezuela y México. En la década de 1950, los nuevos clones extranjeros fueron introducidos en Perú. Entre ellos se encontraban las selecciones de Compañía de alimentos Costa Rica (UF clones), las selecciones Colegio Imperial de Trinidad (ICS clones), y las selecciones de Ecuador (EET clones). Un programa de cría se puso en marcha en 1953 por instituciones nacionales peruanas para desarrollar híbridos de cacao de alto rendimiento y resistencia a enfermedades (Arévalo E. et al., 1999). Se realizaron cruces controladas entre clones extranjeros introducidos y germoplasma Forastero peruano.

Los genotipos de cacao cultivados actualmente en Perú consisten en variedades tradicionales y los híbridos derivados del germoplasma introducido. Se ha sugerido que el fondo genético de estos genotipos puede ser parcialmente remonta a la "colección de Pound," que se estableció en la década de 1930 (Arévalo E. et al., 1999; Pound F., 1945). Esta colección se compone de cinco poblaciones naturales de la Amazonía peruana, incluidos los grupos de germoplasma de Iquitos Mezclado Calabacillo (IMC), Morona (MO), Nanay (NA), Parinari (PA) y Scavina (SCA) (Pound F., 1938- 1945; Zhang et al. 2009). Un gran número de plantas híbridos fueron distribuidas en las regiones productoras de cacao, este fue un esfuerzo especialmente importante en los distintos programas de rehabilitación con el apoyo de los programas de las Naciones Unidas de Control de Drogas (PNUFID) en los años 1980-1990 (Evans H. et al., 1998).

La Universidad Nacional Agraria de la Selva (UNAS) de Tingo María (Huánuco), tiene a su cargo un Banco de Germoplasma que es una colección activa de cacao. Éste le fue

transferido desde el año 1990 por Programa de Naciones Unidas para el Desarrollo (PNUD) con la finalidad de conocer, evaluar y generar semilla élite. El pool genético ahí está conformado por aproximadamente 160 accesiones: colección Internacional o Introducida, colección Huallaga y colección Ucayali - Urubamba (García H., 2000; IICA, 2006).

El Instituto de Cultivos Tropicales (ICT) en convenio con USDA-ARS desde el año 2002, desarrolla el programa de investigación “Elaboración de un sistema gestión eficiente de los cultivos de árboles tropicales, evaluación de germoplasma y agentes de control biológico para mejorar la sostenibilidad del cacao en la Estación experimental el Choclino”, siendo el objetivo del proyecto el estudio de cultivos tropicales, manejo y sistemas que conlleven a la sostenibilidad. Además que ha realizado trabajos de selección recurrente en campos de productores en los últimos años, en la búsqueda de materiales productivos, existentes a enfermedades. Además ICT con el apoyo de INCAGRO en el año 2007realizo también un trabajo en el que se llegó a seleccionar 44 clones de más de 600 plantas híbridas como madres promisorias en la Región San Martín (Tocache y Juanjuí) la ubicación se aprecia en la figura 6, estos clones se conservan en la estación experimental “El Choclino” Se espera que de este material surjan genotipos de cacao promisorios para el incremento de la productividad y control de enfermedades con material resistente al corto y largo plazo, además de ampliar la base genética del cacao en la zona, a fin de encaminar investigaciones futuras en esta línea.

con la finalidad de tener un nuevo enfoque en el conocimiento, existencia y propagación de plantas de cacao silvestre, este trabajo de prospección permitió construir un mapa de la dispersión de plantas silvestres de cacao. El ecosistema de estos ríos mostro alta probabilidad de encontrar nuevo germoplasma, los clones obtenidos actualmente se conservan en un área denominada “colección de cacao silvestre de la amazonia peruana” (fig. 8) en la estación experimental “ElChoclino” (Arévalo E., 2011).

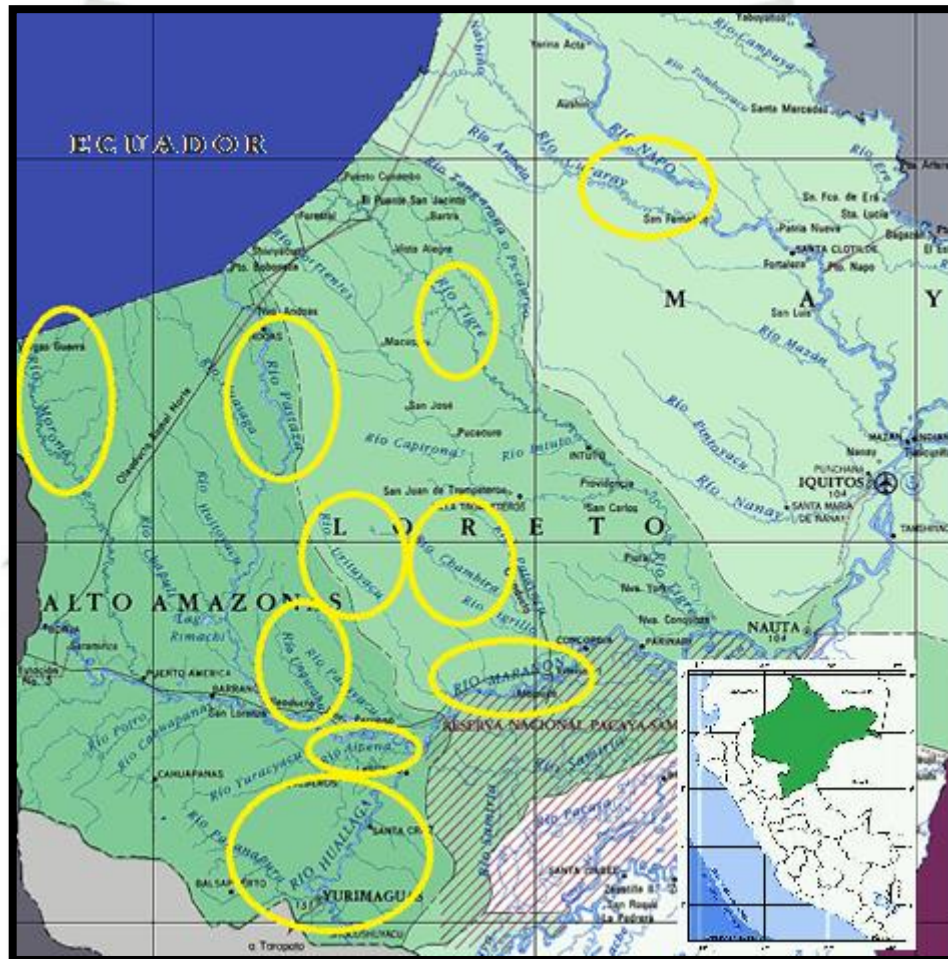


Figura N° 7: Ubicación del muestreo de accesiones de cacao realizado en los ríos tributarios Amazónicos en las expediciones realizadas por el Instituto de Cultivos Tropicales del Perú (ICT) entre julio del 2008 y octubre del 2009. (Fuente: Adaptación de www.mapasperu.com)

Solamente una fracción pequeña de las accesiones recogidas anteriores se mantiene como colecciones ex-situ, debido al constante estudio que se realizan en ellas, logrando eliminar redundancias y ampliando el pool genético que sirven como la fundación para la mejora genética del cacao global.

Debe entenderse que los Bancos de Germoplasma son entidades muy dinámicas, en las cuales el número de accesiones se incrementa como resultado de nuevas colectas, pero también existen reducciones en número como consecuencia de la identificación de duplicados, reordenamientos, condiciones ambientales o manejo de las mismas.



Figura N° 8: Entrada del banco de germoplasma de genotipos silvestres colectados en la Amazonia peruana, de propiedad del Instituto de Cultivos Tropicales (ICT). (Fuente: Archivo gráfico propio)

1.8 Mejoramiento Genético; Los recursos fitogenéticos para la alimentación y la agricultura son los elementos básicos para el mejoramiento de los cultivos a través de la selección y Mejoramiento genético convencional y mediante técnicas modernas de biotecnología. El mejoramiento de los cultivos permite adaptarlos a los cambios bióticos y ambientales y desarrollar nuevos usos y alimentos. Actualmente, todos los países dependen en gran parte de los recursos fitogenéticos de otros para la alimentación y el desarrollo agrícola sostenible (Debouck D., 2009).

El cacao, como ya se mencionó antes, es una planta alógama, favorecida por la estructura misma de la flor y por sistemas de incompatibilidad presentes en las diferentes poblaciones. Por tanto es de esperar una gran variabilidad de caracteres en una población de árboles provenientes de semillas. Esta alta variabilidad de caracteres en una población confiere una ventaja para los trabajos de selección por cuanto el diferencial de selección es mayor, permitiendo aislar genotipos superiores y cambiar la frecuencia de ciertos genes mediante trabajos de selección e hibridación. La mayoría de países productores de cacao en el mundo tienen una amplia diversidad genética que imposibilita conservar la pureza genética de un tipo de cacao con características deseables, de allí que son pocos los que producen cacaos finos. (Arévalo E., 2011)

En cacao es posible propagar vegetativamente una planta deseable y conservar así los genotipos superiores a los que se le denomina “clones”. También es posible utilizar los genes de estos para usarlos en cruzamientos para transmitir los caracteres buscados. Los métodos de mejoramiento utilizados en cacao consiste en seleccionar plantas superiores con cualquier carácter de importancia, como resistencia a enfermedades o insectos, rendimiento, calidad, etc., y luego propagación vegetativa, y utilizar material superior en programas de hibridación con fines de combinar los caracteres deseables.

El mejoramiento genético demanda una mayor diversidad genética en las colecciones, siendo la caracterización y evaluación de éstas, una de las mayores prioridades. En forma similar que otros cultivos perennes, el cacao depende de la disponibilidad de

material genético de origen silvestre para la obtención de variedades importantes (especialmente para aspectos de resistencia a enfermedades) (Chia J., 2009).

Es importante señalar además que para alcanzar la manifestación de una nueva característica deseable se hace necesario la selección de aquellas plantas recombinantes que logran adquirirla. Este proceso puede necesitar hasta 10 generaciones de selección de las plantas mejoradas y el descarte de aquellas en donde la característica no se logra expresar completamente. Con los avances de la biología molecular se ha logrado ubicar e incorporar solamente el gen o los genes que tienen esta característica novedosa y se ahorra mucho tiempo en la obtención de variedades mejoradas. Igualmente, se asegura que el mejoramiento inducido sea más puntual y directo, ya que existen técnicas que permiten corroborar la presencia o ausencia del gen en plántulas jóvenes, lo cual a su vez agiliza notablemente los procesos de selección de los individuos agrónomicamente interesantes. La filosofía que se adopta en cuanto al mejoramiento genético de cacao es la de lograr generar variedades superiores “plantas élite”, que reemplacen a las variedades “tradicionales”. Para lograr esto es necesario partir por la selección de árboles de cacao con mayor productividad, Resistencia a plagas y Superior calidad organoléptica.

Los programas de mejoramiento del cacao enfocaron su atención en características fenológicas de interés agrónomico las cuales, están fuertemente influenciados por el ambiente. A partir de la década de los ochenta del siglo pasado se empezaron a incorporar marcadores moleculares como herramientas auxiliares en los estudios y programas relacionados con esta planta. Se han empleado isoenzimas (Lanaud C., 1986), AFLP (Perry M. et al., 1998; Queiroz V. et al., 2003), RAPD (Lerceteau E. et al., 1997; Moreno Y. et al., 2004; Whitkus R. et al., 1998), y SSR ó microsatélites (Zhang D. et al., 2006) con el objetivo de asociarlas a características de interés comercial (detallado más adelante) como el rendimiento agrónomico y resistencia a enfermedades; dichos marcadores también se han empleado para reducir la redundancia y etiquetado erróneo,

conocer la estructura de las poblaciones tanto en bancos de germoplasma como ex situ, así como para analizar la genealogía de las accesiones.

Por otro lado en la actualidad los agricultores están involucrados de manera sistemática en la selección de líneas que son más adaptables a las condiciones locales (Witcombe J. et al., 1996); se ha mostrado como un enfoque eficaz para promover la conservación de los recursos genéticos en fincas, ya que los agricultores son los más aptos para seleccionar las variedades con las que seguirán trabajando en el mismo ecosistema (Bellon M. et al., 2006).

La Selección participativa puede ser más útil para los cultivos perennes tropicales en sistemas de producción a pequeña escala y de bajos insumos, donde la experiencia de los agricultores en las observaciones de campo de varios años puede beneficiar a la selección de árboles superiores, debido a la adaptación específica recibiría pesos adecuados como criterios de selección (Dias L., 2001; Eskes A., 2006). Para utilizar este método de obtención, se parte de la existencia de altos niveles de diversidad genética y la variabilidad de las características agronómicas de los campos de los agricultores, que pueden ser exploradas para la identificación de cultivares promisorios (Bellon M. 2006; Dias L., 2001). Una mejor comprensión de la estructura genética así como de la diversidad en la selección hecha por los agricultores es fundamental para la aplicación de la selección participativa, y para asegurar que el componente indígena de la diversidad genética está bien representado en los materiales de "élite" que se seleccionan.

La hibridación es también una herramienta de la mejora genética en cacao y es posible tanto entre diferentes formas dentro de la especie como también entre especies diferentes del género *Theobroma*. La hibridación interespecífica e injertos son considerados como estrategias potenciales para el desarrollo de nuevas cultivares "resistentes" de cacao. (Rusconi M. et al., 2010). Una hibridación es posible entre especies estrechamente relacionadas, como también entre especies de diferentes secciones del género

Theobroma. Hibridación intraespecífica, especialmente sobre la base de clasificaciones moleculares de la diversidad del cacao, se ha utilizado para el desarrollo de nuevas variedades (Motamayor J. et al., 2003). Híbridos naturales son extremadamente escasos, lo que probablemente se debe a un eficiente sistema de aislamiento reproductivo y a una reducida distribución simpátrica de las especies (De la CruzM. et al., 1995).

La diversidad genética del cacao comprende el conjunto de poblaciones silvestres y domesticadas, con distinto origen genético y grado evolutivo, que ocupan un nicho ecológico específico y, que teniendo características semejantes y distintivas, se muestran variables o diferentes. La diversidad genética del cacao juega un rol muy importante para:

- a) La conservación del germoplasma nativo y mejorado.
- b) La utilización del germoplasma promisorio con fines de propagación clonal.
- c) Como fuente de genes para los programas de mejora genética.
- d) Una mejor comprensión de relaciones de similitud o disimilitud taxonómica.
- e) La elaboración de mapas genéticos.
- f) El aislamiento, clonación, secuenciación de genes, etc.

1.9 Caracterización de los Recursos Genéticos; Una de las tareas asociadas a los bancos de germoplasma y que facilita en gran medida la utilización de los materiales es la adecuada descripción de los mismos. En la descripción de colecciones se distinguen normalmente dos aspectos: la caracterización y la evaluación; la caracterización tiene sobre todo un objetivo de identificación de las entradas y se refiere principalmente a atributos cualitativos que pueden considerarse invariables (color de la flor, forma de la semilla, composición isoenzimática, perfil genético etc.). La evaluación persigue fundamentalmente determinar caracteres de interés agronómico que normalmente se ven influidos por las condiciones ambientales (precocidad, contenido en proteína, resistencia a plagas y enfermedades, etc.). En la práctica, los bancos de germoplasma suelen realizar

una tarea mixta de caracterización y evaluación, la evaluación de grandes colecciones de germoplasma para los caracteres más requeridos, como pueden ser factores de calidad o resistencia a estreses bióticos y abióticos, es un proceso muy costoso en tiempo y recursos, por ello, actualmente se plantea la idea de concentrar el trabajo de evaluación en las llamadas “colecciones nucleares”, constituidas un por un grupo de muestras representativas de la variabilidad genética de la colección total (Brown A., 1995).

Una evaluación integral de la identidad genética del origen de cada una de las accesiones, y las relaciones genealógicas entre ellos, es esencial para reducir la redundancia en las colecciones de germoplasma. Esta información puede dar lugar a una mayor comprensión de la representación ecogeográfica de las colecciones existentes y mejorar la precisión y la eficacia de la utilización de germoplasma. (Zhang D. et al. 2009)

En general la caracterización de los recursos fitogenéticos en un banco de germoplasma permite proporcionar un mejor conocimiento del germoplasma, identificar duplicados, identificar genotipos faltantes en las colecciones, facilitar la planificación de nuevas colectas e introducciones, permitir el establecimiento de colecciones núcleos. En la identificación de especies, familias y géneros de plantas los caracteres morfológicos han sido muy usados, constituyéndose éstos en una herramienta útil e indispensable para realizar numerosos estudios en genética de poblaciones y agricultura (Arciniegas A., 2005). La utilización eficiente de los recursos fitogenéticos depende de su adecuada caracterización. Tradicionalmente, estas caracterizaciones se han realizado utilizando largas listas de descriptores fenotípicos, principalmente de tipo morfológico o agronómico. Esto ha permitido diferenciar algunos materiales, pero a veces en forma imprecisa, debido a la interacción de estas variables con las condiciones ambientales (Wilches A., 2004).

Los marcadores moleculares presentan muchas ventajas en comparación con los marcadores genéticos de tipo morfológico, especialmente por su alto número y su

independencia de los efectos del medio ambiente. Los marcadores permiten revelar las diferencias que existen entre los genomas como producto del proceso evolutivo. Como aplicaciones de estas técnicas se puede mencionar la definición de grupos genéticos a nivel intra-específico (entre la misma especie) y la organización filogenética de las especies, o sea, las relaciones evolutivas entre distintas especies (Anthony H., et al., 1997). La caracterización bioquímica y molecular ofrece una serie de oportunidades, entre ellas la de ser una alternativa para estimar la diversidad genética de las colecciones (Westman A. y Kresovich S., 1997), y por tanto ayudar a establecer criterios para mejorar la representatividad de las mismas.

Se han realizado trabajos importantes en cuanto a la caracterización de recursos genéticos de cacao (*Theobroma cacao L.*) de diferentes colecciones en las que se puede mencionar:

Motamayor J. et al. (2008), Sugiere una nueva clasificación de germoplasma de cacao en 10 grupos principales: Marañon, Curaray, Criollo, Iquitos, Nanay, Contamana, Amelonado, Purus, Nacional y la Guayana. Basado en estudios con microsatelites (SSR) en un grupo de accesiones de *Theobroma cacao* colectados de centro y sur América.

Chia J. (2009) estudio una colección de cacao de Tingo María. Ésta consistió en 50 individuos o accesiones, de diversas procedencias genéticas y geográficas usando ISSR. Las muestras fueron colectadas en la provincia de Leoncio Prado (región de Huánuco) y se mantienen en el banco de germoplasma de la Universidad Nacional Agraria de la Selva y de la Estación Experimental Agrícola Tulumayo. Resultando que el cacao de Cusco y Huánuco poseen mayor diversidad genética que el resto de muestras, así mismo encontró una baja diferenciación genética entre poblaciones. Además observo que el nivel de variación genética fue mayor a nivel intra-subpoblacional en comparación con la variación inter-poblacional.

Perry M. et al., (1998) y Saunders J. et al., (2000) trabajaron el método de AFLP en cacao, con la finalidad de compararlos con otro tipo de marcadores como RAPD y SSR. Reportaron una buenos resultados en cuanto a la obtención de bandas marcadoras polimórficas por parte de AFLP y recomendaron su utilización en estudios de variabilidad genética.

Romero C. et al. (2010). Analizan 41 plantas de cacao pertenecientes a cuatro cultivares diferentes y conservadas como colecciones ex situ en un invernadero privado de la Región Amazónica del Ecuador fueron evaluadas mediante el análisis de nueve microsatélites (SSR) con el objetivo de verificar la relación genética de estas plantas con el grupo de cacao Nacional. El promedio de diversidad genética detectado entre los individuos que conforman cada una de las cuatro poblaciones fue $He = 0.80$, además resalta los bajos niveles de diferenciación genética entre las poblaciones.

Zhang D. investigador de USDA ha realizado varios trabajos de variabilidad genética y poblacional en cacao perteneciente a la Amazonia peruana así como otras zonas productoras de cacao en el Perú, resaltando los siguientes trabajos:

“Caracterización molecular de una colección de cacao (*Theobroma cacao L.*) del Alto Amazonas utilizando marcadores microsatélites de ADN ”(Zhang D. et al., 2009), el cual analizó 612 accesiones de cacao obtenidos de los sistemas de los ríos Ucayali, Marañón , Nanay, detecto un total de 180 casos de etiquetado incorrecto, además describió una pronunciada diversidad genética, estratificada según los sistemas fluviales de la Amazonía peruana. Así también señaló un alto nivel de la diversidad alélica en esta colección. Concluye afirmando que la gran mayoría de la Amazonía peruana, especialmente las afluentes superiores del rio Marañón no se han estudiado adecuadamente por falta de recopilación de muestras por expediciones.

“Diversidad genética y estructura de poblaciones manipuladas y semi-naturales de cacao (*Theobroma cacao*) en los valles de Perú Huallaga y Ucayali ”(Zhang D. et al., 2006),

donde trabajo con 105 accesiones de los clones Huallaga y Ucayali de la colección de germoplasma de cacao mantenidas en la Universidad Nacional Agraria de la Selva, en Tingo María. En consecuencia detecto que el grupo Huallaga mostro menor diversidad genética, tanto en términos de riqueza alélica y de la diversidad genética que el grupo de Ucayali. Estos resultados corroborar la hipótesis de que la Amazonía peruana alberga un alto nivel de diversidad genética del cacao, finalmente señala que la introducción de poblaciones de semillas exóticas en la Amazonía peruana está cambiando el espectro de germoplasma de cacao en esta región, por lo que recomienda recolecciones adicional y medidas de conservación para las poblaciones de cacao naturales y semi-naturales.

“Estudio de la estructura genética de *Theobroma cacao* seleccionado por agricultores en la Amazonía peruana: Implicaciones para la Conservación y Rehabilitación por sistema de Granja” (Zhang D. et al., 2011). Donde estudio la el parentesco y estructura poblacional de 220 plantas de cacao seleccionadas por agricultores detectando un alto nivel de riqueza de alelos y heterocigosidad en estas elecciones. Demostró que estas selecciones se componen principalmente de híbridos derivados de Trinitario y germoplasma Forastero del Alto Amazonas. Además se mostró que las progenies híbridas están estrechamente relacionadas en las granjas vecinas y aldeas así también se vio que a pesar de la introducción de germoplasma exótico en el pasado, las accesiones pertenecientes al grupo Forastero del alto Amazonas sigue siendo el elemento dominante en el valle del Huallaga.

1.10 Generalidades acerca del ADN; El ADN o Ácido desoxirribonucleico es una doble cadena enrollada alrededor de proteínas conocidas como histonas. En esta doble hélice se encuentra la información genética de todo organismo viviente. El ADN se enrolla nuevamente hasta constituirse en un cromosoma. El número de cromosomas varía entre los distintos organismos, pero no existe una clara relación entre la complejidad del organismo y el número de cromosomas que el mismo posee, los genes están localizados en los cromosomas, cada uno de los cuales codifica para una característica específica, por ejemplo, el gen que regulan los colores de las flores, la

altura, el color de las hojas, tamaño de la planta, longitud entre ramas, ángulo de las hojas, productividad y resistencia, entre otros; y los alelos son las distintas formas que puede tener este gen: azules, negros, verdes, altos, bajos, lacio, crespo, resistentes, susceptibles, entre otros.

Existe una ruta para que la información genética que está contenida en el ADN se exprese, y en ella se ven involucrados algunos pasos y varias enzimas que hacen el trabajo. El conocimiento de la estructura y los mecanismos de replicación del ADN rompen, sin dudas, las barreras naturales que existen entre las especies. De este modo, no debe hacerse referencia a especies, sino a ADN, que se comporta de manera similar y por lo tanto, puede estudiarse en iguales condiciones, modificarse y mejorarse. El estudio del ADN ha permitido señalar aquellas características que resultan útiles o ventajosas para ciertas especies, como son la resistencia natural a ciertos patógenos y plagas, un alto grado de productividad, altura ideal de las plantas, color y otras características de interés agronómico. Algunas de estas características están conferidas por un gen, pero otras, son el resultado de la expresión de varios genes, con lo que su transferencia a otros organismos o su localización dentro del genoma se hace un poco más compleja. (Wilches A., 2004)

1.11 Caracterización Molecular; La biología molecular es considerada como una herramienta indispensable en los programas de mejoramiento genético. En este sentido, y en apego al espíritu de las entidades académicas, es fundamental procurar su máxima utilización en apoyo a los programas de investigación, docencia y proyección social. (Wilches A., 2004). En el caso de *Theobroma cacao*, su empleo ha resultado de gran utilidad en estudios relacionados con diversos aspectos de la biología y genealogía de esta planta tropical. Así, han sido auxiliares en estudios de etiquetado de accesiones en los bancos de germoplasma más importantes del mundo, donde la clasificación y muchas veces el etiquetado erróneo (Motamayor J. et al., 2008; Motilal L. et al., 2011; Takrama J. et al., 2005; Zhang D. et al., 2009-2008).

Los marcadores moleculares se basan en tres diferentes estrategias de detección del polimorfismo: hibridación del ADN, reacción en cadena de la polimerasa y secuenciación de ADN. Sin embargo, cada una de las mencionadas técnicas tiene ventajas y desventajas que deben evaluarse según la aplicación y condición (Karp A. et al., 1997; Spooner D., 2005). En muchos casos, debido a la escasez de especialización técnica, recursos financieros e infraestructura adecuada el acceso a las técnicas en biología molecular de última generación es muy limitado y para esto se deben evaluar las alternativas disponibles. Antes de las primeras aplicaciones de los marcadores moleculares en estudios de genética y mejoramiento de organismos, los marcadores por elección, eran aquellos regulados por genes asociados a caracteres morfológicos y de rendimiento, en general fenotipos de fácil cuantificación e identificación visual. Sin embargo, el limitado número de estos marcadores y la interferencia epistática o ambiental acotaron su expansión (Azofeita A., 2006).

Los marcadores del ADN se basan fundamentalmente en el análisis de las diferencias en pequeñas secuencias del ADN entre individuos. Las técnicas empleadas para ello son muy diversas y dan el nombre a los distintos tipos de marcadores, los cuales pueden ser de carácter dominante o codominante (Karp A. y Edwards, 1998). Los marcadores moleculares presentan muchas ventajas en comparación con los marcadores genéticos de tipo morfológico, especialmente por su alto número y su independencia de los efectos del medio ambiente. Los marcadores permiten revelar las diferencias que existen entre los genomas como producto del proceso evolutivo (Wilches A., 2004). Como aplicaciones de estas técnicas se puede mencionar la definición de grupos genéticos a nivel intra-específico (entre la misma especie) y la organización filogenética de las especies, o sea, las relaciones evolutivas entre distintas especies (Anthony H. et al, 1997). Existen varias técnicas para definir marcadores moleculares y detectar polimorfismos, pero ninguna de ellas es ideal. Por ello, se debe tomar en cuenta la finalidad y la resolución genética deseada, así como los costos, antes de elegir una técnica (Müeller U. et al., 1999).

1.12 Polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados (AFLP); Los AFLP son considerados marcadores de alta eficacia, permiten el análisis de un elevado número de loci por experimento sin requerir información previa sobre su secuencia, son en su mayoría dominantes y altamente reproducibles. Sin embargo, la técnica es más complicada de ejecutar que la de los RAPD y el SSR, además requieren una mayor cantidad de ADN (Karp A. et al., 1997). Se ha convertido en la herramienta molecular más adecuada para establecer la huella génica de cualquier origen o complejidad, analizando simultáneamente muchos loci y detectando un mayor número de marcadores de ADN polimórfico que cualquier otro medio basado en la PCR.

Por su alto grado de resolución, versatilidad y reproducibilidad, así como su costo relativamente bajo, los marcadores moleculares generados por AFLP están siendo empleados con mayor frecuencia en diversas áreas, incluyendo estudios sistemáticos, tipificación, genética de poblaciones, huella genética y mapeo de rasgos cuantitativos o fenotípicos (QTL). Por ello, la AFLP ha encontrado mucha aplicación en el monitoreo de heredabilidad de características deseables tanto en plantas como animales, diagnóstico de enfermedades hereditarias, análisis de pedigríes, tipificación forense, análisis de paternidad, monitoreo de poblaciones silvestres, identificación de familias, medición de variabilidad genética, construcción de mapas genéticos (localización genes en los cromosomas), búsqueda de marcadores de ADN ligados a rasgos genéticos y tipificación microbiana, en la construcción del armazón de los mapas genéticos en el que se localizan los marcadores codominantes, para discriminar entre individuos cercanamente relacionados y para localizar genes específicos en genomas complejos (Valadez E. y Kahl G., 2000).

El análisis AFLP combina la digestión con enzimas de restricción con el PCR. El primer paso involucra la digestión del ADN con dos enzimas específicas de restricción, comúnmente se usan EcoRI, AseI, HindIII, ApaI y PstI, las cuales requieren 6-8 bases en secuencia específica para poder hidrolizar, lo que genera fragmentos muy grandes debido a la baja frecuencia de estos sitios de corte. Para aumentar el número de cortes,

por otro lado, la digestión se lleva a cabo en combinación con otra enzima (MseI ó TaqI) que solamente necesita 4 bases y que, por lo tanto, genera mayor número de fragmentos. En ambos casos, las enzimas tienen alta especificidad, garantizando la reproducibilidad del patrón de fragmentos de ADN. Es necesario agregar adaptadores (oligonucleótidos sintéticos) de doble cadena, de 10-30pb en los extremos, para que éstos se peguen en los bordes de los fragmentos recién formados, utilizando la enzima T4 ADN ligasa, y de esta manera proveer una secuencia conocida para poder amplificar mediante PCR. En este paso, también se requiere el uso de ligasas para facilitar la unión entre los bordes de los fragmentos y las secuencias cortas conocidas. El uso de adaptadores es necesario porque las secuencias que permanezcan en los bordes de los fragmentos, luego de ser cortados, no son adecuadas para actuar como iniciadores (Karp A. et al., 1997). Si el primer paso se realizó adecuadamente, todos los fragmentos de restricción se amplificarían mediante PCR. Para poder discriminar entre todos los fragmentos de restricción que se forman, se diseñan los iniciadores de tal manera que incorporen el adaptador de secuencia conocida más uno, dos o tres pares de bases (dejando por fuera alguna de las cuatro posibles: A, G, C o T). La amplificación mediante PCR solo ocurrirá en aquellos fragmentos en donde los iniciadores encuentren las secuencias complementarias tanto para el adaptador como para los pares de base adicionales. En este caso, los pares de bases adicionales actúan como nucleótidos selectivos. Si solamente se utiliza uno de estos nucleótidos se amplificarán más fragmentos de los que se podrían amplificar si se utilizaran dos nucleótidos. Del mismo modo, si se utilizan tres nucleótidos se obtendrían menos fragmentos amplificados. Por alguna razón técnica, la adición de más de tres nucleótidos selectivos al iniciador resulta en una amplificación PCR no específica (Karp A. et al., 1997).

Durante el PCR normalmente se realizan dos ciclos térmicos selectivos. En el primero se utiliza un único nucleótido selectivo, en el segundo ciclo térmico, se utiliza el anterior nucleótido más uno o dos nucleótidos selectivos adicionales. Los fragmentos amplificados de esta forma pueden ser luego separados en un gel de poliacrilamida mediante electroforesis y los productos de la amplificación pueden ser visualizados

mediante fluorescencia (Karp A. et al., 1997; Valadez E. y Kahl G., 2000) mencionan que los AFLP's surgen a partir de Polimorfismos en los sitios de restricción, en donde una secuencia específica para el reconocimiento de una endonucleasa de restricción, está presente o ausente, o polimorfismos en la longitud de la secuencia, donde el número de las secuencias repetidas arregladas en serie ("tandem") tienen sitios variables. Y por último cambios en los pares de bases de ADN no asociados con sitios de restricción.

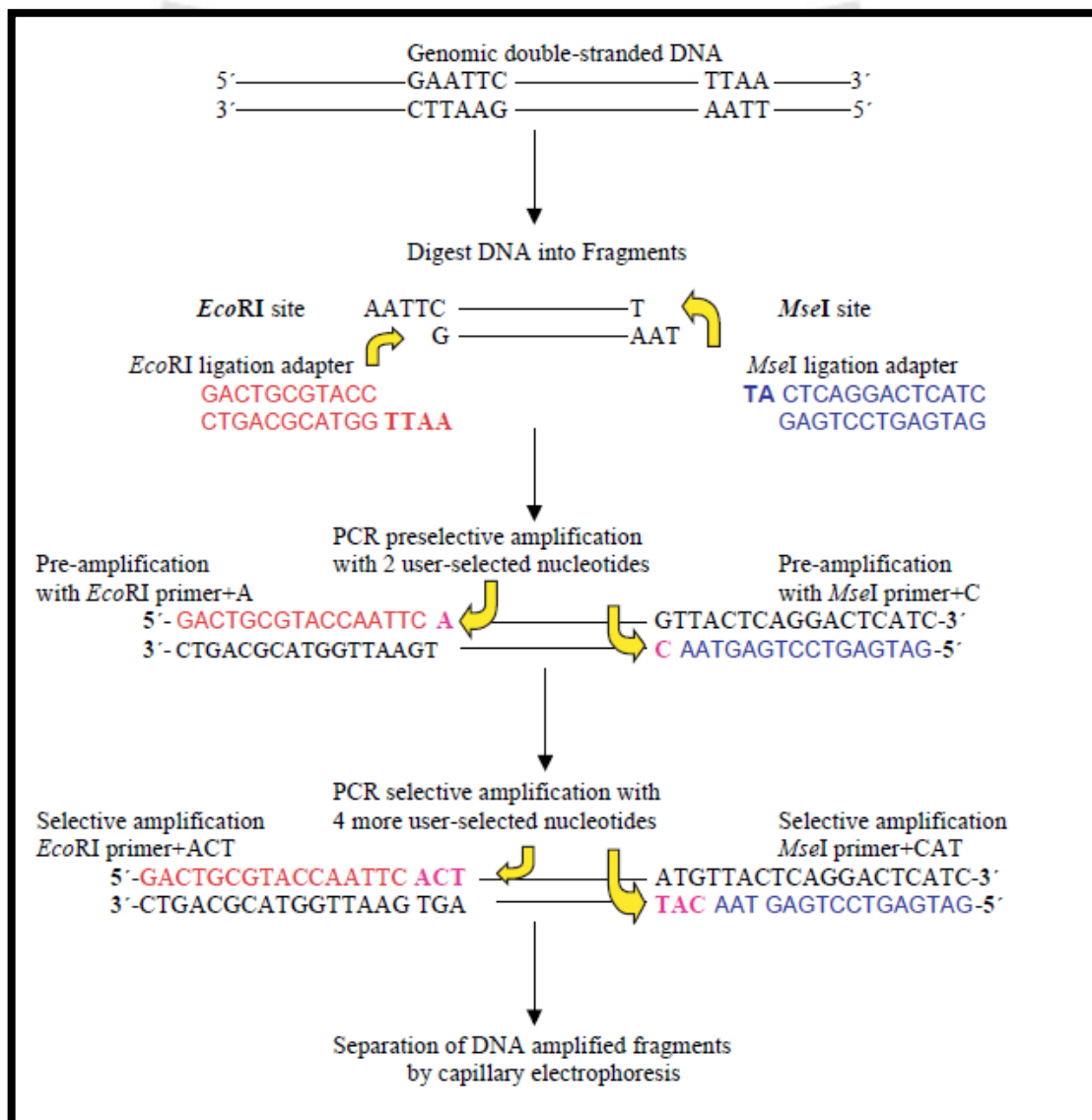


Figura N° 9: Método AFLP detallado por etapas. (Fuente: Saunders J. et al., 2000)

Entre sus ventajas está el hecho de que no se requiere de información previa del genoma del organismo a estudiarse, existe un número ilimitado de marcadores, presentan alto polimorfismo, analizan todo el genoma, son altamente reproducibles y son versátiles en cuanto al uso de distintas enzimas e iniciadores.

Algunas de sus desventajas radican en herencia dominante lo que genera un bajo contenido de información genética por locus, tienen un procedimiento medianamente laborioso y tienen un costo medio en cuanto a su implementación y uso. Valadez E. y Kahl G. (2000) mencionan que los AFLP surgen a partir de: A) Polimorfismos en los sitios de restricción, en donde una secuencia específica para el reconocimiento de una endonucleasa de restricción, está presente o ausente. B) Polimorfismos en la longitud de la secuencia, donde el número de las secuencias repetidas arregladas en serie (“tandem”) tienen sitios variables. C) Cambios en los pares de bases de ADN no asociados con sitios de restricción.

Tabla N° 5: Comparación de RFLP, RAPD y AFLP.

ANALISIS	NUMERO DE PRIMERS EXAMINADOS	PRIMERS POLIMORFICOS	%	NUMERO DE BANDAS POLIMORFICAS POR PRIMER
RFLP	209	104	50	0.5
RAPD	245	85	35	0.7
AFLP	64	60	94	5.6

(Fuente: Lin et al., 1996)

1.13 Electroforesis en geles de poliacrilamida; La electroforesis en geles con una matriz de poliacrilamida, comúnmente denominada electroforesis en poliacrilamida (PAGE, 'polyacrilamide gel electrophoresis'), La electroforesis es un método analítico – semi preparativo, es sin duda alguna una de las técnicas más ampliamente usada para caracterizar mezclas complejas de moléculas biológicas en dependencia fundamentalmente de su carga bajo la influencia de un campo eléctrico. La electroforesis

en poliacrilamida es un método conveniente, rápido y económico a nivel de muestra pues se requieren sólo cantidades del orden de microgramos de proteína.

Fue empleado por primera vez por Tiselius en el año 1937. Raymond y Weintraub en 1959 emplearon como soporte para la electroforesis un gel de poliacrilamida (PAGE), La popularidad de este creció rápidamente y se logró un aumento de la resolución. La electroforesis es la migración de solutos iónicos bajo la influencia de un campo eléctrico; Estas partículas migran hacia el cátodo o ánodo (electrodos - y +), en dependencia de una combinación de su carga, peso molecular y estructura tridimensional. Los geles de poliacrilamida se forman por la polimerización vinílica del monómero acrilamida $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$ y del monómero entrecruzador N, N'-metilen-bis-acrilamida $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$. La polimerización se inicia con la formación de radicales libres del monómero, que se producen por radicales libres de oxígeno, por causa de la acción de iones persulfato. Las aminas terciarias como el N, N, N, N'-tetrametilen-diamina (TEMED) se emplean como catalizadores de esta reacción, porque causan la formación de radicales libres del persulfato. Una ventaja importante de los geles de poliacrilamida es que son químicamente inertes, transparentes y estables en un rango amplio de pH, temperatura y fuerza iónica.

En función del estado de las biomoléculas (nativo o desnaturalizado) a lo largo del proceso electroforético éstas se clasifican en electroforesis nativas o desnaturalizantes:

- una electroforesis desnaturalizante, la más común, es la que somete a las proteínas a migración asegurando la completa desnaturalización (pérdida de la estructura tridimensional). En esta situación la migración es proporcional a la carga y al tamaño de la molécula pero no a su forma. El agente desnaturalizante más empleado es el sodiododecilsulfato o SDS, un detergente.
- una electroforesis nativa es la que somete a las proteínas a migración sin desnaturalización. En esta situación las proteínas migran en función de su carga, de su tamaño y de su forma. Además se mantienen en ciertos casos las interacciones entre subunidades y entre proteínas, separándose los complejos. Los sistemas

tampón (buffer) empleados en estos caso son: tris-glicina (rango de pH 8.3 a 9.5), tris-borato (rango de pH 7.0 a 8.5) y tris-acetato (rango de pH 7.2 a 8.5).

Una rápida tinción, distinción y fijación son esenciales en el caso de las proteínas pequeñas para evitar su elusión; la omisión del metanol de la solución de tinción es beneficiosa ya que se reduce el tiempo de tinción y disminuye el hinchamiento de los geles. Existen diferentes tipos de tinción, entre ellos la plata que es muy sensible y tiene la característica de producir generalmente coloraciones carmelita o negro.

1.14 Análisis estadístico; La identificación del individuo queda descrita por el conjunto total de alelos obtenido para cada uno de ellos, llamado patrón alélico. La comparación de patrones alélicos, mediante coeficientes de similaridad, permite establecer grupos de individuos con características génicas similares (Pejic et al., 1998). Dichos grupos, asociables a pedigree o a grupos heteróticos, suelen ser representados mediante un dendrograma. (dendron: árbol y gr. diágramma: diseño). Un dendrograma es una descripción en forma dendrítica del grado de similaridad génica entre individuos pertenecientes a una misma especie o a distintas especies, donde cada punto de ramificación representa el valor de similaridad o distancia génica entre los grupos representados por las ramas que se abren.

Estructura de diversidad se puede representar adecuadamente en un modelo jerárquico, y si la información sobre los individuos es suficiente, será posible representarla usando técnicas de agrupamiento y/o clasificación (Van Hintum T., 1995). Para la caracterización usando marcadores moleculares tanto dominantes como codominantes, las técnicas de clasificación mayormente utilizadas son el árbol generado por el algoritmo UPGMA “Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean” y el método jerárquico de Neighbour joining. Ambos son calculados sobre matrices de similaridad empleando los coeficientes de distancia genética.

Sokal R. y Rohlf H. introdujeron en 1962 el coeficiente de correlación cofenética como una medida del grado de buena clasificación. Consiste en calcular el coeficiente de

correlación entre todos los pares de distancias (d_{ij} , u_{ij}). Si el valor resultante es próximo a cero, existe una distorsión importante entre las distancias iniciales i las que expresa la jerarquía resultante. Si el valor del coeficiente está cercano a la unidad, indica que hay una buena estructura jerárquica entre los elementos analizados. El análisis de varias variables, o análisis multidimensional, o análisis multivariado no es más que el conjunto de métodos estadísticos que tienen por objeto el estudio de las relaciones existentes entre varias variables dependientes o interdependientes, que han sido medidas sobre los mismos individuos (Dagnielie P. 1975).

1.15 Análisis poblacional; Con los marcadores genéticos moleculares se pueden examinar un grupo de individuos o poblaciones para estimar medidas de diversidad y distancias genéticas, para inferir estructuras poblacionales y patrones de agrupamiento, comprobar equilibrios de Hardy Weinberg y de multiloci y buscar en loci polimorficos la evidencia de neutralidad de selección Sokal R. y Sneath H. (1963). Los índices de distancia genética se calculan entre pares de poblaciones y pretende describir el grado de diferencia genética entre estas dos poblaciones. La medida de distancia genética más usada es la distancia de Nei M. (1973, 1977). Este índice pretende estimar el número de mutaciones que a nivel nucleotídico se han acumulado en las secuencias de dos linajes a partir del tiempo que ha transcurrido desde su divergencia original.

Como síntesis de los conceptos sobre los índices o coeficientes de similitud o de distancias, Bramardi S. et al. (2005) explica que la semejanza entre pares de unidades ha recibido diferentes denominaciones tales como similitud, proximidad, disimilitud y distancia o asociación, por tanto, se sugiere que todas estas acepciones sean consideradas como un grupo de índices de distancia. La elección de cuál índice tomar depende de los datos y de los tipos de análisis que se planeen realizar posteriormente, como es el caso del análisis de cluster que trabaja con índices de similitud, no obstante, estos se pueden transformar en índices de distancia y viceversa.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Localización de muestreo; Se trabajó con 80 accesiones de cacao provenientes del banco de germoplasma del Instituto de Cultivos Tropicales del Perú (ICT), de las cuales 43 de estas accesiones son originarias de las localidades de Juanjui en la provincia de mariscal Cáceres y Tocache en la provincia de Tocache (ver tabla 6). El segundo grupo contiene 28 accesiones originarias de cultivos silvestres de las orillas de los ríos tributarios del río Amazonas entre las regiones Amazonas y Loreto (ver tabla 7). Además de 9 clones híbridos cuyo origen es Trinidad y Tobago, Costa Rica, Ecuador y Perú (ver tabla 8).

Tabla N° 6: Codificación, grupo genético y origen de las 43 muestras de cacao pertenecientes al grupo Tocache y Mariscal Cáceres

	CODIGO DE ACCECION	ORIGEN
ICT_1	ICT-1026	Mariscal Cáceres
ICT_2	ICT-1043	Mariscal Cáceres
ICT_3	ICT-1087	Mariscal Cáceres
ICT_4	ICT-1092	Mariscal Cáceres
ICT_5	ICT-1104	Mariscal Cáceres
ICT_6	ICT-1112	Mariscal Cáceres
ICT_7	ICT-1176	Mariscal Cáceres

CODIGO DE MUESTRA	CODIGO DE ACCECION	ORIGEN
ICT_8	ICT-1182	Mariscal Cáceres
ICT_9	ICT-1187	Mariscal Cáceres
ICT_10	ICT-1189	Mariscal Cáceres
ICT_11	ICT-1251	Mariscal Cáceres
ICT_12	ICT-1281	Mariscal Cáceres
ICT_13	ICT-1292	Mariscal Cáceres
ICT_14	ICT-1382	Mariscal Cáceres
ICT_15	ICT-1414	Mariscal Cáceres
ICT_16	ICT-1506	Mariscal Cáceres
ICT_17	ICT-1561	Mariscal Cáceres
ICT_18	ICT-1594	Mariscal Cáceres
ICT_19	ICT-2142	Tocache
ICT_20	ICT-2151	Tocache
ICT_21	ICT-2152	Tocache
ICT_22	ICT-2161	Tocache
ICT_23	ICT-2162	Tocache
ICT_24	ICT-2163	Tocache
ICT_25	ICT-2165	Tocache
ICT_26	ICT-2171	Tocache
ICT_27	ICT-2172	Tocache
ICT_28	ICT-2173	Tocache
ICT_29	ICT-2174	Tocache
ICT_30	ICT-2175	Tocache
ICT_31	ICT-2315	Tocache
ICT_32	ICT-2492	Tocache
ICT_33	ICT-2501	Tocache
ICT_34	ICT-2504	Tocache
ICT_35	ICT-2652	Tocache
ICT_36	ICT-2653	Tocache
ICT_37	ICT-2694	Tocache
ICT_38	ICT-2702	Tocache
ICT_39	ICT-2703	Tocache
ICT_40	ICT-2705	Tocache
ICT_41	ICT-2821	Tocache
ICT_43	ICT-2824	Tocache
ICT_44	ICT-2825	Tocache

Tabla N° 7: Codificación y origen de las muestras de cacao pertenecientes a la colección de genotipos silvestres colectados en la amazonia peruana.

CODIGO DE MUESTRA	ORIGEN
NUC_141	Cuenca rio Nucuray
MAR_26	Cuenca rio Marañón
MAR_29	Cuenca rio Marañón
MARA_33	Cuenca rio Marañón
MAR_40	Cuenca rio Marañón
PAST_85	Cuenca rio Pastaza
PAST_94	Cuenca rio Pastaza
PAST_88	Cuenca rio Pastaza
MOR_212	Cuenca rio Morona
MOR_214	Cuenca rio Morona
MOR_268	Cuenca rio Morona
SAN_219	Cuenca rio Santiago
SAN_221	Cuenca rio Santiago
SAN_225	Cuenca rio Santiago
SAN_227	Cuenca rio Santiago
SAN_229	Cuenca rio Santiago
CH_277	Cuenca rio Chambira
CH_281	Cuenca rio Chambira
CH_293	Cuenca rio Chambira
CH_296	Cuenca rio Chambira
NAP_330	Cuenca rio Napo
NAP_332	Cuenca rio Napo
NAP_333	Cuenca rio Napo
NAP_336	Cuenca rio Napo
TIG_305	Cuenca rio Tigre
TIG_310	Cuenca rio Tigre
TIG_311	Cuenca rio Tigre
TIG_312	Cuenca rio Tigre

Tabla N° 8: Codificación, grupo genético y origen de las muestras de cacao pertenecientes al grupo de híbridos internacionales.

CODIGO	GRUPO GENETICO	ORIGEN
ICS_1	Trinitario	Trinidad Y Tobago
ICS_95	Trinitario	Trinidad Y Tobago
SCA_6	Forastero Alto Amazonas	Perú
CCN_51	(IMC-67 x ICS-95) x Forastero	Ecuador
IMC_67	Forastero desconocido	Perú
EET_400	Silecial	Ecuador
UF613	Trinitario	Costa Rica
UF_667	Trinitario	Costa Rica

2.2Material vegetal; El fundamento que se siguió para la recolección de las muestras de cacao fue el de obtener una muestra completamente representativa de la población, que tenga una confiabilidad susceptible de medición y que la recolección sea simple y directa.

Las muestras fueron recolectadas de la estación experimental “El Chocliño” a 10 km de la ciudad de Tarapoto, esta estación alberga al banco de germoplasma del ICT; todas las accesiones se propagan vegetativamente, por lo tanto se eligió uno o dos árboles y se colectaron hojas jóvenes sin lesiones por insectos, ni infectadas gravemente con patógenos, las muestras fueron debidamente rotuladas y almacenadas en sobres de papel, luego fueron transportadas hasta la estación experimental “Juan Bernito” a 5 km de la ciudad de Tarapoto, en el distrito de la Banda del Shilcayo. Una vez ingresadas las muestras en el laboratorio, se procedió a realizar su limpieza con paños de papel toalla y se les agregó aproximadamente 100 mg de silica gel por cada 3 hojas colocadas en sobres de papel, se tuvo cuidado de rotulara las muestras apenas se cogía material en el campo.

2.3 Aislamiento del ADN; Las células vegetales pueden lisarse con el detergente iónico bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), que forma un complejo insoluble con los ácidos nucleicos en medio hiposalino. De ese modo, los polisacáridos, los compuestos fenólicos y los demás contaminantes permanecen en el sobrenadante y pueden eliminarse por lavado. El complejo de ADN se solubiliza aumentando la concentración salina y se precipita con etanol o isopropanol. En esta sección se describirán los pasos de las etapas de lisis de la membrana celular, la extracción del ADN genómico y su precipitación.

Para el aislamiento del ADN de las hojas de cacao previamente desecadas se utilizó el método de Doyle J. y Doyle J. (1990). Modificado por el departamento de biología molecular del Instituto de Cultivos Tropicales (ICT). La primera etapa de la extracción del ADN fue la rotura de la membrana celular y nuclear, para ello se pesó 0.15 gr. de muestra picada y se colocó en un tubo de 1.5 ml completamente estéril, que además contenía una perla acrílica y 0.1266 gr. de arena estéril, luego se agregó 700 μ l de tampón CTAB 2X a 65 °C y 2 μ l. de β -mercaptoetanol, se llevó a agitación en un Fast-prep (Bio 101 Savant FP-120), por 40 segundos, para lisar la muestra, inmediatamente después se retiraron los tubos y se colocaron en baño maría por 30 minutos a 65 °C (este paso ayudó a desactivar las DNAsas que digieren el ADN), se agitó el tubo cada 10 minutos, transcurrido el tiempo en baño maría, las muestras se dejaron enfriar por dos minutos y se centrifugó a 10 000 r.p.m. por 10 minutos en una microcentrífuga Hettich (modelo Mikro 22 R).

2.4 Purificación del DNA; Se separan los ácidos nucleicos de los complejos formados por CTAB con los polisacáridos, fenoles, proteínas y demás lisados celulares disueltos en esta solución acuosa, agregando 800 μ l de cloroformo-alcohol isoamílico en una proporción de 24:1. Cada muestra se mezcló por inversión hasta tener una solución lechosa y luego se centrifugó a 14 000 r.p.m. por 10 minutos; el sobrenadante se transfirió cuidadosamente a un nuevo microtubo (1.5 ml). Seguidamente se agregó 300 μ l de octanol: alcohol isoamílico en una proporción de 24:1, se mezclaron las fases de

una manera suave durante 5 minutos seguidamente se centrifugó 10 minutos a 14000 rpm, el nuevo sobrenadante se recogió cuidadosamente en un micro tubo de 1.5 ml. y se rotuló. Para precipitar y lavar el ADN extraído se agregó 800 μ l de isopropanol al 96% y se mezcló cuidadosamente por inversión, obteniendo como una masa flotante o “medusa”; la muestra se centrifugó por un minuto a 10 000 r.p.m. para obtener el ADN como un pellet, finalmente se eliminó el alcohol por decantación. Se realizó un último lavado del pellet con etanol al 70%, por 5 minutos, centrifugándolo a 10 000 r.p.m. por 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y los microtubos se dejaron con la tapa abierta e invertidos dentro de una incubadora a temperatura ambiente durante toda la noche. Posteriormente, se re-suspendió el precipitado de ADN en 50 μ l de agua ultra pura y además se le adicionó 2 μ l de RNAsa y se dejó incubar a 37 °C por 2 horas. El ADN extraído se conservó en un refrigerador a una temperatura de -10 °C.

2.5 Calidad del ADN; La evaluación de la integridad del ADN extraído se realizó a través de electroforesis en gel de agarosa al 1 % con 2 μ l de bromuro de etidio, se cargó 8.3 μ l de muestra de DNA con 1.6 μ l de tampón de carga. Se deja migrar 1 hora a 90 voltios con buffer de corrida TBE 1X. El resultado de la electroforesis se visualizó con la ayuda de una transiluminador UV Vilber Lourmat (Modelo ECX-F26.MX) y un fotodocumetador equipado con cámara digital (Fotodyme). Se evaluó la calidad del DNA en la corrida verificando la integridad de la banda.

2.6 Determinación de la pureza y concentración del ADN; Se realizó en un espectrofotómetro Thermo Scientific (Genesys 10S UV Vis), para lo que se preparó una dilución de ADN genómico y agua destilada estéril a una relación 1/100. El equipo fue previamente calibrado, y posteriormente se realizó lecturas de absorbancia a 260 nm. y 280 nm. Para el cálculo de la pureza se usó la relación entre A260/A280, se determinó la concentración de la muestra de ADN con la formula (1)

$$\text{Concentración ADN (ng/\mu l)} = 50 \times A_{260} \times \text{Factor de dilución} \dots \dots \dots (1)$$

2.7 Aplicación del método de AFLP; La técnica de AFLP se realizó según el método de (Vos et al., 1995) y se describe a continuación.

2.7.1 Digestión del ADN; En ADN previamente aislado fue digerido con dos enzimas de restricción, una de corte raro (EcoR I) y otra de corte frecuente (Mse I). La enzima EcoR I reconoce 6 pb, mientras que la enzima Mse I tiene lugar de reconocimiento cada 4 pb; la mezcla de reacción de la digestión del ADN se puede apreciar en la Tabla 9, las reacciones en esta etapa se realizan en microtubos de 0.5 ml; la reacción de digestión se mantuvo durante dos horas a 37°C en una incubadora, al término de esta etapa los tubos que contienen la muestra fueron colocados en un refrigerador a una temperatura de -10°C.

Tabla N° 9: Componentes de la reacción para digestión del ADN. El buffer de digestión y endonucleasas (EcoRI, MseI) proporcionadas por el kit Fermentas.

COMPONENTE	VOLUMEN
ADN (50ng/μl)	10 μl.
Buffer	2 μl.
EcoR I	1 μl.
Mse I	0.5 μl.
Agua Ultrapura.	6.5 μl.

2.7.2 Ligación de adaptadores; Se efectuó en los tubos que contienen el ADN digerido de cada una de las muestras, se agregó los adaptadores complementarios a los cortes, de cada una de las enzimas de restricción, cuyas secuencias se detallan en la tabla 10. Los volúmenes de los componentes de esta reacción se detallan en la Tabla 11.

Tabla N° 10: Secuencias forward (F') y Reverse (R') de cada tipo de adaptador

ADAPTADOR		SECUENCIA
<i>Adaptador EcoRI</i>	<i>F'</i>	5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3'
	<i>R'</i>	5'-AATTGGTACGCAGTCTAC-3'
<i>Adaptador MseI</i>	<i>F'</i>	5'-GACGATGAGTCCTGAG-3'
	<i>R'</i>	5'-TACTCAGGACTCAT-3'

Tabla N° 11: Componentes de reacción de ligación. Proporcionadas por el kit Fermentas.

COMPONENTE	VOLUMEN
DNA digerido	20 μ l.
Adaptador EcoR I	1 μ l.
Adaptador Mse I	1.25 μ l.
Ligasa de ADN (1U)	0.4 μ l
Buffer de ligación.	2.5 μ l.

La reacción de ligación fue incubada a 16°C por 4 horas. Finalizada la incubación se realizó una dilución 1:5 del producto de la ligación con agua ultra pura, tomando 5 y 20 μ l respectivamente; la dilución se realizó en tubos de reacción de 0.5 ml.

2.7.3 Amplificación pre selectiva (+1/+1); Para la amplificación pre selectiva (+1/+1) se utilizaron tubos para PCR de 0.2 ml. Se usaron cebadores preselectivos para EcoRI y MseI cuya secuencia se muestra en la tabla 12, la reacción de amplificación se dio con los componentes detallados en la tabla 13.

Tabla N° 12: Secuencia de los cebadores de pre corrida de EcoRI y MseI.

CEBADORES	SECUENCIA
Pre-EcoRI	5'-GACTGCGTACCAATTCA-3'
Pre-MseI	5'-GATGAGTCCTGAGTAAC-3'

Tabla N° 13: Componentes de reacción para la amplificación pre selectiva (+1/+1) por PCR de los productos de digestión/ligación. Proporcionados por el kit fermentas.

COMPONENTE	VOLUMEN / MUESTRA
Muestra ADN (digestión/ligación) diluida 1:5	5 μ l.
Agua ultra pura	13.4 μ l.
Tampón PCR 10X	2.5 μ l.
MgCl ₂ (50 mM)	0.6 μ l.
DNTPs	1.25 μ l.
Pre EcoR I (10 uM)	1 μ l.
Pre Mse I (10 uM)	1 μ l.
Taq DNA polimerasa	0.2 μ l.

Tabla N° 14: Programa realizado por el termociclador Amplitronyx 6 (nyxtechnik inc.), para la amplificación pre específica de las muestras de ADN de cacao.

CICLOS	TEMPERATURA °C	TIEMPO
1	72	2 min.
2	94	4 min.
3	94	30 seg.
4	56	1 min.
5	72	1 min.
6	Repetir desde el paso 3 al 5 (22 ciclos)	
7	72	5 min.
8	4	Hold

La amplificación se llevó a cabo en un termociclador nyxtechnik inc (Modelo Amplitronyx 6.), Los ciclos térmicos utilizados para el PCR +1/+1 se detalla en el Tabla 14. Finalizada la amplificación se realizó una dilución 1:3 del PCR +1/+1 con agua ultra pura, tomando 5 μ l y 20 μ l respectivamente, en nuevos tubos de reacción.

2.7.4. Amplificación selectiva (+3/+3); Para la amplificación selectiva (+3/+3) se usaron cebadores selectivos para EcoRI y MseI cuya secuencia se detalla en la tabla 15,

se realizaron 13 combinaciones; Estos cebadores se muestran en la tabla 11, alternado un iniciador EcoRI con un iniciador MseI. La reacción de amplificación se dio con los componentes de PCR detallados en la tabla 16.

Tabla N° 15: Secuencia de los cebadores utilizados para la selección específica, proporcionados por el kit fermentas.

PRIMERS	SECUENCIA
<i>EcoRI</i> -AAC	5'-GACTGCGTACCAATTCAAC-3'
<i>EcoRI</i> -AAG	5'-GACTGCGTACCAATTCAAG-3'
<i>EcoRI</i> -ACA	5'-GACTGCGTACCAATTCACA-3'
<i>EcoRI</i> -ACC	5'-GACTGCGTACCAATTCACC-3'
<i>EcoRI</i> -ACT	5'-GACTGCGTACCAATTCACT-3'
<i>EcoRI</i> -AGC	5'-GACTGCGTACCAATTCAGC-3'
<i>MseI</i> -CAA	5'-GATGAGTCCTGAGTAACAA-3'
<i>MseI</i> -CAC	5'-GATGAGTCCTGAGTAACAC-3'
<i>MseI</i> -CAT	5'-GATGAGTCCTGAGTAACAT-3'
<i>MseI</i> -CTA	5'-GATGAGTCCTGAGTAACTA-3'
<i>MseI</i> -CTC	5'-GATGAGTCCTGAGTAACTC-3'
<i>MseI</i> -CAG	5'-GATGAGTCCTGAGTAACAG-3'

Tabla N° 16: Combinaciones primer selectivos de EcoRI (E) y MseI (M), se efectuaron las combinaciones marcadas con "x".

	M- CAA	M- CAC	M- CAG	M- CAT	M- CTA	M- CTC	M- CTG	M- CTT
E-AAC		X				X		
E-AAG					X			
E-ACA	X			X				
E-ACC					X			
E-ACG		X						
E-ACT		X		X				
E-AGC		X	X	X	X			
E-AGG								

Tabla N° 17: Componentes de reacción para la amplificación selectiva (+3/+3) por PCR. Proporcionados por el kit fermentas.

Componente.	Volumen
Muestra diluida (1:3)	2 μ l.
Agua ultra pura	3.25 μ l.
Tampón PCR 10X	1.1 μ l.
MgCl ₂ (50 mM)	0.6 μ l.
DNTPs	0.6 μ l.
Cebador EcoR I	2 μ l.
Cebador Mse I	0.3 μ l.
Taq DNA polymerasa	0.15 μ l.

La reacción de PCR final contiene 2 μ l del PCR +1/+1 diluido 1:3, y 8 μ l de la mezcla de componentes de PCR. El programa utilizado para las amplificaciones esta detallado en la tabla 18, cada una de las pares de cebadores estuvo incluida en un mix de reacción diferente, los productos de la amplificación se separaron por electroforesis en gel denaturante de poliacrilamida. (PAGE). La PCR fue llevada a cabo mediante un programa “touchdown” (Don R. *et al.*, 1991). Un programa “touchdown” es un programa de termociclación aplicado a la PCR, que incluye una subrutina inicial (protocolo “touchdown”) en la cual la temperatura de hibridación decrece en cada ciclo, mientras que el resto del programa utiliza una única temperatura de hibridación.

Tabla N° 18: Programa realizado por el termociclador Amplitronyx 6 (nyxtechnik inc.), para la amplificación específica de las muestras de ADN de cacao.

Ciclos	Temperatura °C	Tiempo
1	94	4 min.
2	94	20 s.
3	65	30 s.
4	72	2 min.
5	94	20 s.
6	65	30 s. bajando 1°C por ciclo
7	72	2 min
8	Repetir desde el paso 5 al 7 (10 ciclos)	
9	94	20 s.
10	56	30 s.
11	72	2 min.
12	Repetir desde el paso 9 al 11 (20 ciclos)	
13	60	30 min.
14	4	Hold

2.8 Electroforesis en gel denaturante de poliacrilamida (PAGE); Para realizar la separación de los productos de la PCR, se utilizó una cámara de electroforesis vertical, esta cámara contiene 2 vidrios que fueron cuidadosamente limpiados y en los cuales se agrega en la superficie de uno de ellos una solución de adhesión que con 1.5 ml de etanol al 95 %, 7.5 μ l de bind silano y 7.5 μ l de ácido acético glacial. En la superficie del segundo vidrio se agrega una solución de repulsión, se usó un repelente de agua comercial “lluviex” de la marca Simoniz. Se dejó secar las soluciones por 30 minutos, Transcurrido el tiempo se ensambló la cámara para contener a la poliacrilamida. Se tomó una solución de acrilamida/bisacrilamida en una proporción de 19:1 y 7 M de úrea, de esta solución se midió 60 ml y se le agregó 380 ml de polivinil pirrolidona 10 % (APS) y 38 μ l de TEMED, esta solución fue cargada en la matiz y se dejó polimerizar por 3 horas, el buffer de corrida contiene 800 ml de tampón Tris - borato EDTA (TBE) 1X. Antes de cargar las muestras, se realizó una pre-corrida a 200 V por 20 minutos y posteriormente se hace la corrida con las muestras a 400 V por 15 horas. A cada muestra se añadió 10 μ l de tampón de carga. Se denaturó cada muestra a 90 °C por 5 minutos y se cargó en sus respectivos pocillos. Se corrió a ambos lados del gel el marcador de peso

molecular O'GeneRuler 50 bp DNA Ladder Plus (Fermentas). La tinción y el revelado de los geles de poliacrilamida se hizo basándose en los protocolos de Bassam B. et al., (1991). El gel fue fijado con un 1 litro de solución de ácido acético que contenía 5 ml de ácido acético por 100 de alcohol puro; durante 30 minutos, luego para el proceso de tinción se colocó el gel en una solución que contiene nitrato de plata (AgNO_3) (2 g/l), por 30 minutos, seguidamente se lavó el gel con agua destilada, y finalmente se reveló con una solución que contiene 0.8 litros de solución de revelado (24 gr. de hidróxido de sodio y 5 ml. de formaldehído), hasta la visualización de las bandas; para detener la reacción de la solución reveladora, el gel se colocó en una solución de ácido acético al 10% durante 10 minutos y se dejó secar por unos 5 minutos. Los geles resultantes se documentaron con la ayuda de una cámara digital.

2.9 Colecta de los datos moleculares y determinación de valores descriptivos; Se usó el programa Cross Checker (versión 2.91) para la asignación de los valores binarios de presencia (1), ausencia (0) para cada banda analizada. Visualizando las fotografías digitales de los PAGE, se trazaron líneas verticales para los carriles de las accesiones y líneas horizontales para las bandas marcadoras, en la intersección de ambos se asigna el valor correspondiente si hubiera presencia o ausencia de banda de ADN. A los fragmentos con una tenue amplificación, se les asignó un valor de (2), consignándolos como datos perdidos; esta información de bandas se ingresó en hojas de cálculo de Microsoft Excel 2000. En esta misma hoja de cálculo se determinó el porcentaje de datos perdidos por cada locus ingresado, de la siguiente forma: la cantidad de datos perdidos por locus se dividió entre el número total de accesiones y se multiplicó por cien. Los locus con un porcentaje de datos perdidos mayor al 10 % fueron descartados para análisis posteriores (Warburton y Crossa, 2002).

2.10 Análisis estadístico; La matriz binaria (0,1) obtenida de la colecta de datos de los geles de poliacrilamida fueron analizada usando el paquete estadístico PAST versión 2.1b (Hammer O. et al, 2001). Se construyó una matriz de similaridad entre cada una de las accesiones de cacao con el índice de Jaccard (1908). Se generó además un dendograma con el método jerarquizado de Neighborur Joining (Saitou N. y Nei M.,

1987). El cálculo del índice de contenido polimórfico (PIC) para cada uno de las combinaciones de cebadores selectivos se realizó en una hoja de cálculo del programa Microsoft Excel 2010. Asimismo, para explicar la variabilidad molecular a nivel de poblacionales o grupos de accesiones de cacao del banco de germoplasma del Instituto de Cultivos Tropicales (ICT) se utilizó el programa POPGENE v1.32 (Yeh F. et al., 1999) con el cual se calculó el número de alelos (n_a), número de alelos efectivos (n_e), porcentaje de loci polimórfico, diversidad genética de Nei (h), diversidad de genes en poblaciones subdivididas y la distancia genética a nivel de poblaciones.



III RESULTADOS Y DISCUSION

3.1 Accesiones de cacao; el estudio de variabilidad se inició recolectando hojas de 80 accesiones de cacao (*Theobroma cacao L.*) en su mayoría pertenecientes al grupo genético Forastero (Cheesman E., 1944). Involucrando accesiones de plantas procedentes de las provincias Mariscal Cáceres y Tocache. Además se añadieron accesiones de grupos de cacao silvestre procedentes de las márgenes de ríos amazónicos como son: Nucurai, Marañon, Pastaza, Chambira, Napo, Tigre, Morona y Santiago. (Grupo Amazónicos), también se añadieron clones híbridos de procedencia nacional e internacional (Trinidad y Tobago, Costa Rica, Ecuador y Perú) esto se realizó con la finalidad de estudiar la variabilidad con respecto a estos clones distantes geográficamente. La cantidad de accesiones de cacao tomadas (80 accesiones) está por encima de los reportes recientes (Moreno Y. et al., 2004; Chia J. 2009; Aragón E. 2009; Carranza M. et al., 2007; Perry M., 1998) sin embargo hay reportes con más de 100 accesiones que abarcan distintas zonas cacaoteras en todo el mundo (Saunders J. et al., 2000; Zhang D. et al., 2005; Zhang D., et al., 2008; Motamayor J. et al., 2008.); sin embargo no se incluyó este grupo de muestras del banco de germoplasma del Instituto de Cultivos Tropicales (ICT). Finalmente el número de muestra estudiadas resultan en

un aporte adicional al ya existe sobre todo desde el punto de vista de los análisis genético-molecular.

3.2 Aislamiento, purificación y calidad del ADN; La obtención de ADN de las muestras de cacao a partir de hojas desecadas, se realizó mediante el método de Doyle J. y Doyle J. (1990) con modificaciones realizadas por el departamento de biotecnología del Instituto de Cultivos Tropicales (ICT), dichas modificaciones se dan en la formulación del tampón de extracción CTAB 2X (CTAB 2%, NaCl 5 M, EDTA 0.5 mM, Tris-HCl 1 mM (pH 8), PVP 1% y 2-mercaptoetanol 2%), siendo los aspectos más resaltante de las modificaciones las altas concentraciones (5 M) de NaCl que se emplean para prevenir la contaminación de la muestra con polisacáridos que afectan la pureza del ADN, La adición de PVP ayuda a prevenir que el ADN extraído presente coloración gris o parda, la cual se debe a la actividad de polifenoloxidasas presentes en gran cantidad en tejidos provenientes de cacao, finalmente 2-mercaptoetanol es un fuerte agente reductor que puede eliminar taninos y otros polifenoles presentes en las hojas de cacao; otra modificación importante fue la repetición de los lavados del ADN extraído. Los resultados de las concentraciones y pureza de ADN para cada una de las 80 accesiones se detallan en el anexo 1, y la evaluación de la calidad se muestra en la figura 10.

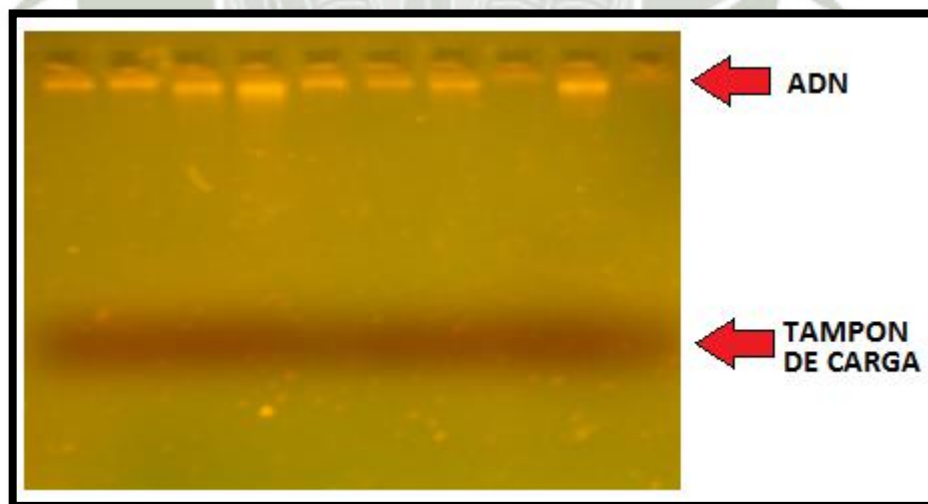


Figura N° 10: Imagen de un gel de agarosa preparado para verificar la calidad del ADN de *Theobroma cacao L.* extraído.

La integridad del ADN extraído se evaluó en agarosa al 1 %. (Fig. 10) y se observó que en las 10 accesiones que se utilizaron para esta prueba mostraron una banda definida al inicio de cada pocillo sin la presencia de “smir” (ADN degradado), lo que indica que la calidad del material genético es buena, no se apreció presencia de ARN, cuya manifestación es usualmente una banda al final del carril, esto indica que la adición de los 2 μ l de enzima ARNasa fue suficiente y efectiva para digerir el ARN de cada muestra tratada. La medición de las concentraciones de ADN de las 80 accesiones, variaron desde 45 ng/ μ l hasta 260 ng/ μ l con un promedio de 112 ng/ μ l y el promedio de cocientes de pureza obtenidos para el ADN extraído es de 1.27, lo que se catalogaría como una baja pureza, sin embargo ya se ha reportado con anterioridad este inconveniente, Saunders J. et al.,(2000) quienes señalaron que la extracción de ADN de cacao se caracteriza por los bajos valores de pureza, Chía J. (2009) y Carranza M. et al. (2007) obtuvieron similares resultados con el mismo método de aislamiento y purificación. Esto hecho podría deberse a que cacao es una planta de tipo leñoso y por lo general este tipo de plantas tiene ciertos metabolitos como compuestos polifenólicos, polisacáridos, taninos y ARN, interfieren con el aislamiento del ADN (Rout G. et al. 2002; Capriles L. y Reyes H., 1968), por lo que se hizo las modificaciones apuntando a estos contaminantes.

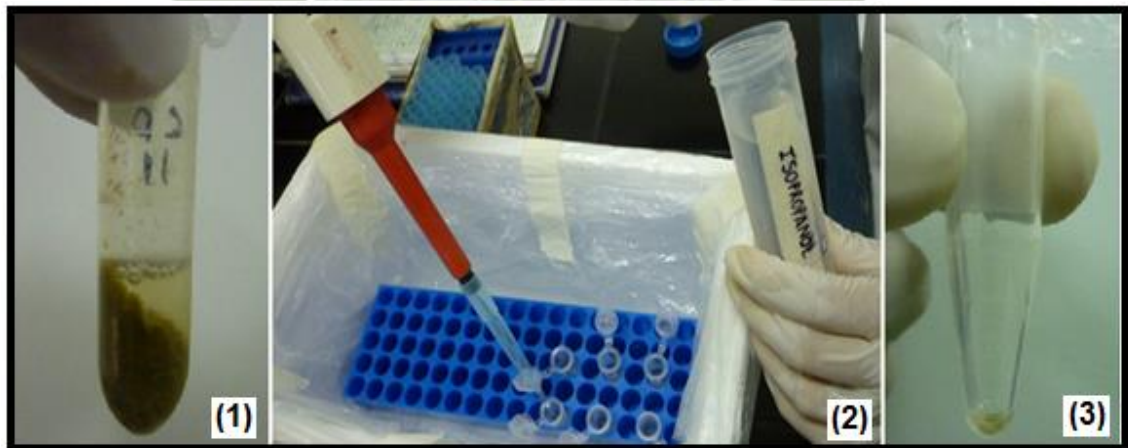


Figura N° 11: Imagen de las etapas de lisis y precipitación de ADN de cacao con isopropanol (1) precipitación de proteínas, (2) precipitación de ADN con Isopropanol, (3) formación de Pellet de ADN

Para poder mejorar las condiciones de pureza del ADN extraído se procedió a realizar una nueva etapa de purificación (Fig. 11), adicionado 800 μ l de cloroformo-alcohol isoamílico en una proporción de 24:1, se mezcló por inversión y se separó las fases con la ayuda de una microcentrifuga a 14 000 r.p.m. por 10 minutos se recogió el sobrenadante en un tubo de 1.5 ml nuevo y se precipito con 800 ml de isopropanol al 96% y se resuspendió con agua ultra pura, de esta manera se eliminó una carga de contaminantes y el ADN quedo listo para la amplificación, todo este procedimiento fue parte de las modificaciones que se sugirieron por el laboratorio de Biotecnología del Instituto de Cultivos Tropicales (ICT) ya que de esta manera se han tratado anteriormente muestras de cacao para mejorar los niveles de pureza y garantizar la amplificación del Material genético de cacao por PCR.



Figura N° 12: hojas de cacao (*Theobroma cacao L.*), desecadas para la extracción de ADN.

Por otra parte el uso de un material desecado (Fig. 12) obedeció a que el recojo del material fresco sería imposible por la lejanía del banco de germoplasma con respecto al

laboratorio, y las hojas de cacao presentan una rápida finalización, lo que imposibilitaría manejo en laboratorio en cuanto a cantidad de muestras procesadas por día; aunque en muchos protocolos se plantea el hecho de que la extracción de ADN, se realiza preferiblemente a partir de tejidos jóvenes debido al menor contenido de polisacáridos, polifenoles y otros metabolitos secundarios (Zhang J. y McStewart J. 2000); esto es poco frecuente, ya que en la mayoría de los casos sólo se dispuso de tejidos viejos. Sin embargo se han reportado trabajos como López A., 2011, que recomienda el uso de material desecado para el manejo con fines de extracción de ADN de plantas leñosas con altos niveles de polisacáridos de alta viscosidad, y polifenoles, los cuales actúan como inhibidores durante la extracción del ADN, sin embargo este método no se ha registrado para cacao, lo que sería un aporte más en cuanto se refiere a extracción de ADN.

Para finalizar se puede indicar que los niveles de compuestos fenólicos confieren a cacao una característica valiosa ya que tal como describen Arbeláez J. et al. (2011), los compuestos polifenólicos como metabolitos secundarios son muy estudiados en la actualidad a nivel farmacológico, estos metabolitos son usados como compuestos activos para combatir muchas patologías.

3.3 Amplificación de muestras por AFLP; La amplificación del ADN de las 80 accesiones de cacao se realizó con el método AFLP (Vos P. et al., 1995), teniéndose resultados positivos en cuanto a la aparición de bandas marcadoras en los geles de poliacrilamida, como se aprecia en la figura 13, donde se observa el gel obtenido por la amplificación de las accesiones de cacao con el par de cebadores selectivos E-AAG/M-CTA, el gel de poliacrilamida presenta bandas bien definidas y presencia de polimorfismo, este mismo hecho se evidencio en el resto de ensayos.

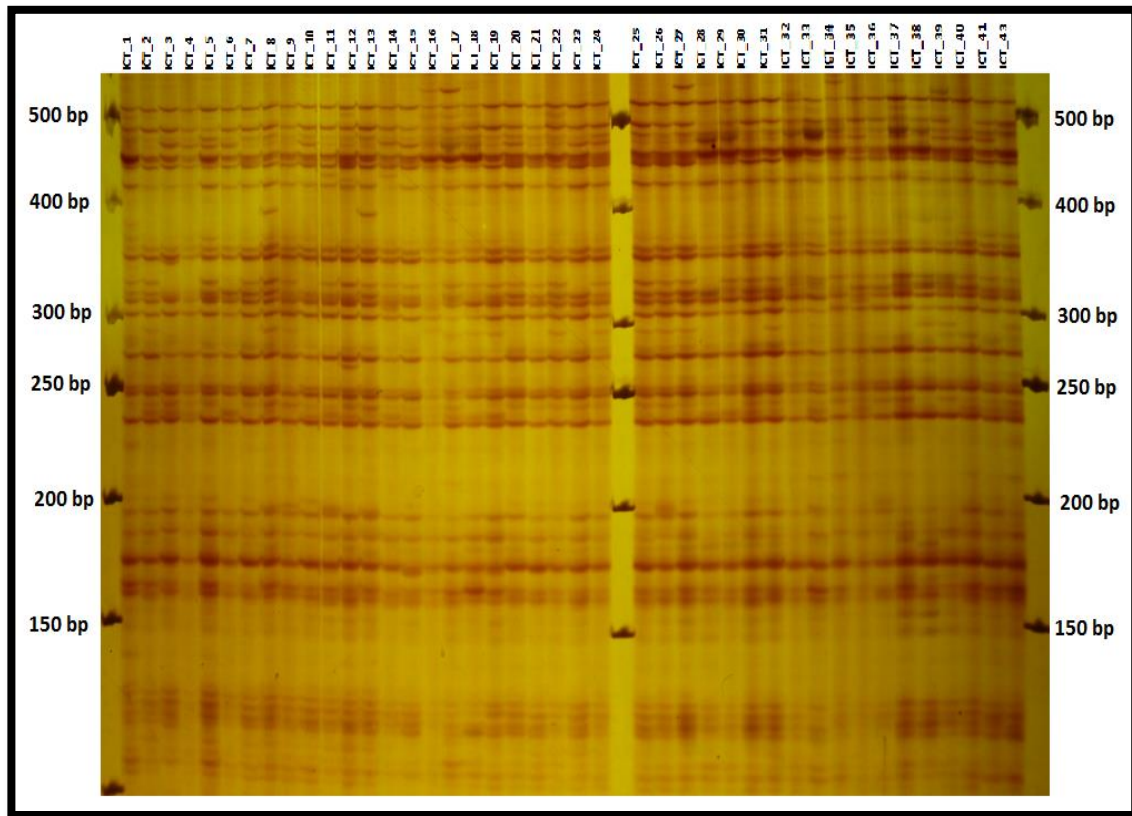


Figura N° 13: Electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% mostrando los patrones de amplificación del par de cebadores E-AAG/M-CTA con los genotipos cuyos códigos se muestran en la parte superior del carril el marcador de peso molecular O'GeneRuler 50 bp DNA se aprecia en ambos extremos y en la parte central.

De las 13 pares de combinaciones de cebadores específicos, se tomaron 9 que generaron bandas polimórficas necesarias para el análisis de variabilidad, las 4 combinaciones restantes mostraron defectos en la etapa de separación de los vidrios, después de la corrida electroforética, lo que generó algunas rupturas en el gel que afectó su adecuado revelado y distorsionó su análisis. Saunders J. Et al. (2001) reportó que en muestras de cacao, por lo general se puede detectar diferencias en los patrones de AFLP en fragmentos de ADN (polimorfismo) cuando se utilizan al menos 7 pares de cebadores.

En relación a las condiciones del PCR, se utilizó el mismo programa de amplificación para todas las combinaciones de cebadores específicos, y la reacción de amplificación

sucedió en un termociclador Amplitronyx 6 (nyxtechnik inc.), tanto en la pre selección (+1/+1) como en la selección específica (+3/+3). La efectividad de esta etapa fue confirmada ya que se pudo separar exitosamente los productos de la PCR por electroforesis en una cámara vertical nyxtechnik inc (modelo Electronyx LFV I 20 x 50cm), El uso de este tipo de cámara electroforética certificadas no generó distorsiones significativas como suele ser frecuente cuando se usa cámaras artesanales tal como reporta Chia J. (2009) quien señalo la presencia de distorsiones o "sonrisas" a ambos lados del gel, por lo que repitió algunos ensayos.

Las condiciones de amplificación del ADN realizadas en este trabajo fueron propuestas por Saunders J. et al., (2000) y Perry M. et al. (1998) quienes reportaron ciclos de PCR para AFLP en cacao muy similares. Adicionalmente estas condiciones fueron confirmadas por el instituto de biotecnología (IBT, 2010) de la Universidad Nacional Agraria la Molina (UNALM).

La preparación de las matrices que contuvieron a la acrilamida demandaron mucha precisión y tiempo, además hay que resaltar que la acrilamida es un compuesto toxico por lo que se tuvieron todas precauciones del caso, el tiempo de polimerización de la acrilamida a poliacrilamida fue de 3 horas y una temperatura ambiental de 18 °C, la cual se logró con el uso de un equipo de aire acondicionado debido a que las condiciones ambientales son propias de clima tropical (mayor a 25 °C), la configuración final de las cámaras se muestra en la figura 14. La electroforesis en poliacrilamida fue realizada a 400 voltios, durante 15 horas, y los geles posteriormente fueron revelados con una solución de nitrato de plata (AgNO_3) a una concentración de 2 g/l en condiciones de oscuridad, debido a que el nitrato de plata es fotosensible y se degrada con rapidez (Bassam B. et al., 1991). Las imágenes de cada uno de los geles fueron capturadas con la ayuda de una cámara fotográfica digital, la detección en geles de poliacrilamida teñidos con nitrato de plata fue laboriosa pero ofreció buenos resultados, esta metodología se caracteriza por ofrecer una alta resolución y requiere de equipos “poco” sofisticados. (Beidler J. et al. 1982, Bassam et al. 1991, Sanguinetti C. et. al. 1994,).

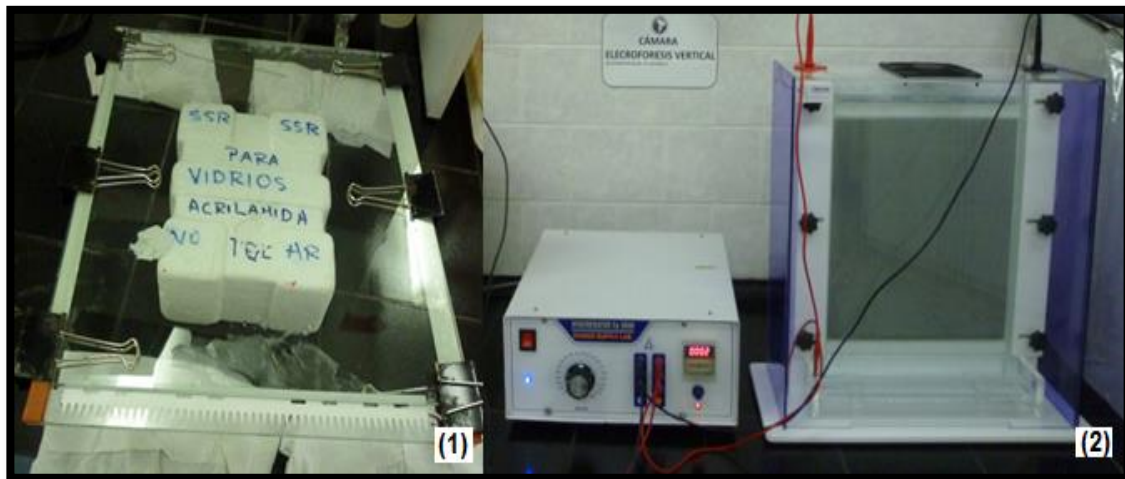


Figura N° 14: Imágenes de la preparación de un gel de poliacrilamida en una cámara de electroforesis vertical (1), cámara de electroforesis en funcionamiento conectada a una fuente de poder (2).

Los cebadores usados en el método de AFLP dieron buenos resultados por la cantidad de bandas producidas por ensayo, Fory A. (2005) reporta que la técnica de los AFLP es altamente polimórfica y reproducible, confiriendo un alto grado de confiabilidad, resultados similares han sido observados por otros investigadores empleando esta técnica con otras especies de la familia *Solanaceae* (Acquadro A. et al. 2002, Lanteri S. et al. 2003 y Toquica S. et al. 2003).

La posición de las bandas individuales que son detectados para cada muestra representa la huella dactilar de su ADN que es único para ese tipo de planta. Es importante señalar que los polimorfismos detectado por AFLP generalmente indican la herencia mendeliana y puede ser utilizado para estudiar el parentesco y variabilidad genética dentro y entre poblaciones. Tal como indica Vos P. et al., (1995), las bandas marcadoras generadas por AFLP son una herramienta robusta para detección de la variabilidad.

3.4 Recolección de datos; se generaron matrices binarias (presencia “0”, ausencia “1”) adicionalmente se marcaron con “2” los datos perdidos; en la tabla 19 se muestra una parte de los datos recogidos a partir de los gels de poliacrilamida revelados. La matriz completa se detalla en el anexo 3.

Tabla N° 19: fragmento de la matriz obtenida con la asignación de datos binarios a las bandas amplificadas en los geles de poliacrilamida.

PAR DE CEBADORES	LOCI	ICT-1026	ICT-1043	ICT-1087	ICT-2142	ICT-2151	ICT-2152	ICS-1	SCA-6	CCN-51	UF-667	NUC-141	MARA-40	PAST-85	MOR-212	SAN-229	CH-277	NAP-330	TIG-305
EcoRI-ACT + Msel-CAT	A1X1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1
	A1X2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	A1X12	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0
	A1X13	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
EcoRI-ACA + Msel-CAA	A1X14	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	A2X1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	A2X2	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	A2X3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0
EcoRI-AAG + Msel-CTA	A2X4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	A2X5	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	A7X1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	A7X2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
EcoRI-AGC + Msel-CTA	A7X6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	A7X7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1
	A9X1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	A9X2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
EcoRI-AGC + Msel-CAC	A9X3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	A9X4	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0
	A13X3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	A13X4	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	A13X5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	A13X6	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
	A13X7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Para la confección de esta matriz se tomaron los fragmentos de ADN de tamaños comprendidos entre 150 pb y 500 pb de acuerdo al marcador de peso molecular O'GeneRuler 50 bp DNA Ladder Plus, (Fermentas), este criterio se planteó debido la actividad de Taq Polimerasa que amplifica los fragmentos pequeños de ADN con facilidad, pero conforme aumenta su tamaño se hace más difícil obtener una amplificación eficiente por la estabilidad de la enzima. En el trabajo de Saunders J. et al., (2000) mencionan que los tamaños de los fragmentos de ADN entre 50 y 400 pb fueron los únicos que se analizaron, sin embargo el criterio de toma de datos es decisión del investigador en base a las características de los materiales usados, separación de los productos de PCR y la calidad del revelado entre otros. El número de datos obtenidos se detalla en la tabla 20.

Tabla N° 20: Número de bandas revisadas y escogidas para las 9 combinaciones de cebadores específicos de AFLP, en el estudio de las 80 accesiones de *Theobroma cacao L.*

COMBINACION DE CEBADORES	BANDAS REVISADAS	BANDAS ESCOGIDAS	BANDAS OMITIDAS
EcoRI-ACT + MseI-CAT	14	12	2
EcoRI-ACA + MseI-CAA	19	19	0
EcoRI-ACA + MseI-CAT	14	12	2
EcoRI-ACC + MseI-CTA	13	13	0
EcoRI-AAC + MseI-CAC	8	7	1
EcoRI-AAC + MseI-CTC	18	17	1
EcoRI-AAG + MseI-CTA	22	19	3
EcoRI-AGC + MseI-CTA	22	22	0
EcoRI-AGC + MseI-CAC	14	14	0
TOTAL	144	135	9

El número total de bandas marcadoras fue de 144 para las 9 combinaciones de cebadores, de esta se seleccionaron aquellas que tuvieron hasta un máximo de 5% de datos perdidos para garantizar la confiabilidad de los mismos en un estudio de diversidad genética, finalmente se obtuvieron un total de 135 bandas. Warburton M. y Crossa J., (2002), afirman que la cantidad de datos perdidos no debe sobrepasar el 15%, pero finalmente esta decisión también depende del criterio del investigador (Chia J., 2009). Los datos perdidos corresponden a bandas cuya claridad no está definida, pudiéndose tratar de productos mal amplificados, mal revelados y en muchos caso ni siquiera son bandas de ADN este fenómeno es comúnmente llamado bandas “artefacto”, por este motivo se les consideraron como bandas ambiguas y se les dio un valor de “2” como ya se mencionó antes.

Otros autores indican la utilización de un número menor de combinaciones de cebadores específicos, por ejemplo Perry M. et al., (1998) comparó los marcadores AFLP y RAPD, utilizó dos combinaciones (E-ACT/M-CAC y E-ACT/ M-CAT) de esta manera obtuvieron un promedio de 40 bandas por par de cebadores, número mayor que el promedio obtenido en este trabajo, esto pudo deberse a que utilizaron un método de AFLP con detección radioactiva, sumado al hecho de que no se analizaron los mismos genotipos. Saunders et al., (2000) trabajo con 7 combinaciones de cebadores específicos,

las cuales fueron probados en este trabajo, obteniendo similares promedios de aparición de bandas por par de cebadores. Las combinaciones E-AGC / M-CAC y E-AGC / M-CTA no fueron reportadas en trabajos anteriores en cacao, lo cual significa un aporte en futuros estudios, ya que brindaron una importante cantidad de bandas (14 y 22 bandas respectivamente).

La técnica de AFLP entre sus características tiene la ventaja que genera un alto número de información por par de cebadores, lo que fue comprobado en este trabajo, además existen otros ejemplos reportados por Bertoni M. et al., (2009) quienes estudiaron *Jacaranda decurrens* (Bignoniaceae) utilizando cuatro combinaciones de marcadores de AFLP, logrando reproducir 205 bandas, Fory A.(2005) reportó para *Solanum quitoense* un total de 206 y 170 bandas para dos cebadores (E-ACG/M-CAT y E-ACG/M-CTC). Sin embargo el número relativamente bajo de productos generados por AFLP en cacao es explicado por Perry Et al., (1998), quienes atribuyen este fenómeno al pequeño tamaño del genoma de cacao (430 Mb), con número cromosómico $2n= 20$, el cual es considerado por (Couch J. et al., 1993, Bennett M. y Leitch I., 1995) como “pequeño” en comparación con individuos de las mismas características fenotípicas. A pesar de esto una de las ventajas notables de este método es que AFLP permite inspecciona múltiples loci del genoma por la acción de las enzimas de restricción (EcoRI y MseI) y por tanto es una herramienta adecuada para el estudio de los polimorfismos en la población (Hill M. et al., 1996); esto se corroboró por los resultados obtenidos en cuanto al porcentaje de bandas polimórficas por par de cebadores específicos de AFLP.

3.5 Polimorfismo de los Marcadores AFLP; Se construyó una tabla con los resultados obtenidos, que detallan la información de las combinaciones de cebadores específicos de AFLP, el que se presenta a continuación:

Tabla N° 21: resultados del contenido de información de polimorfismo obtenido de los 9 pares de cebadores específicos de AFLP, en la caracterización molecular de 80 accesiones de *Theobroma cacao L.*

COMBINACION DE CEBADORES	N° LOCI	LOCI MONOMORFICO	LOCI POLIMORFICO	% LOCI POLIMORFICAS	PIC PROMEDIO
EcoRI-ACT + MseI-CAT	12	5	7	58.3	0.1
EcoRI-ACA + MseI-CAA	19	3	16	84.2	0.22
EcoRI-ACA + MseI-CAT	12	2	10	83.3	0.28
EcoRI-ACC + MseI-CTA	13	3	10	76.9	0.17
EcoRI-AAC + MseI-CAC	7	3	4	57.1	0.17
EcoRI-AAC + MseI-CTC	17	5	12	70.6	0.13
EcoRI-AAG + MseI-CTA	19	4	15	78.9	0.12
EcoRI-AGC + MseI-CTA	22	9	13	59.1	0.1
EcoRI-AGC + MseI- CAC	14	4	10	71.4	0.12
TOTAL	135	38	97	71.9	

Se evaluó los valores de índice de contenido polimórfico (PIC) de cada una de las combinaciones de cebadores específicos, los valores más altos fueron documentados para la combinación de cebadores EcoRI-ACA / MseI-CAT con PIC igual a 0.28 y un porcentaje de polimorfismo de 83.3% y para EcoRI-ACA / MseI-CAA con un PIC 0.22 y un porcentaje de polimorfismo de 84.2%. Otros 2 cebadores mostraron PIC altos como son EcoRI-ACC / MseI-CTA (0.17) y EcoRI-AAC + MseI-CAC (0.17). Los iniciadores con mayor PIC se presentan como los más informativos para detectar la variabilidad presente en el conjunto de accesiones analizadas, estas combinaciones pueden ser considerados como combinaciones de cebadores óptimos de acuerdo con Saunders et al., (2000) quienes afirma que los cebadores óptimos producen fragmentos de ADN fácilmente puntuables que muestran la reproducibilidad entre las muestras y un alto número de loci polimórfico para elucidar la diversidad y discriminar entre muestras; sin embargo el porcentaje de loci polimórfico no tuvo una relación directa con el PIC como se aprecia en la tabla 21. Es allí donde radica la importancia del índice de contenido polimórfico (PIC) que da un panorama más preciso de la importancia de cada par de cebadores AFLP, ya que para el cálculo del mismo se basa en las frecuencias de presencias (p) para cada loci; para esto se dividió la cantidad de fragmentos amplificados

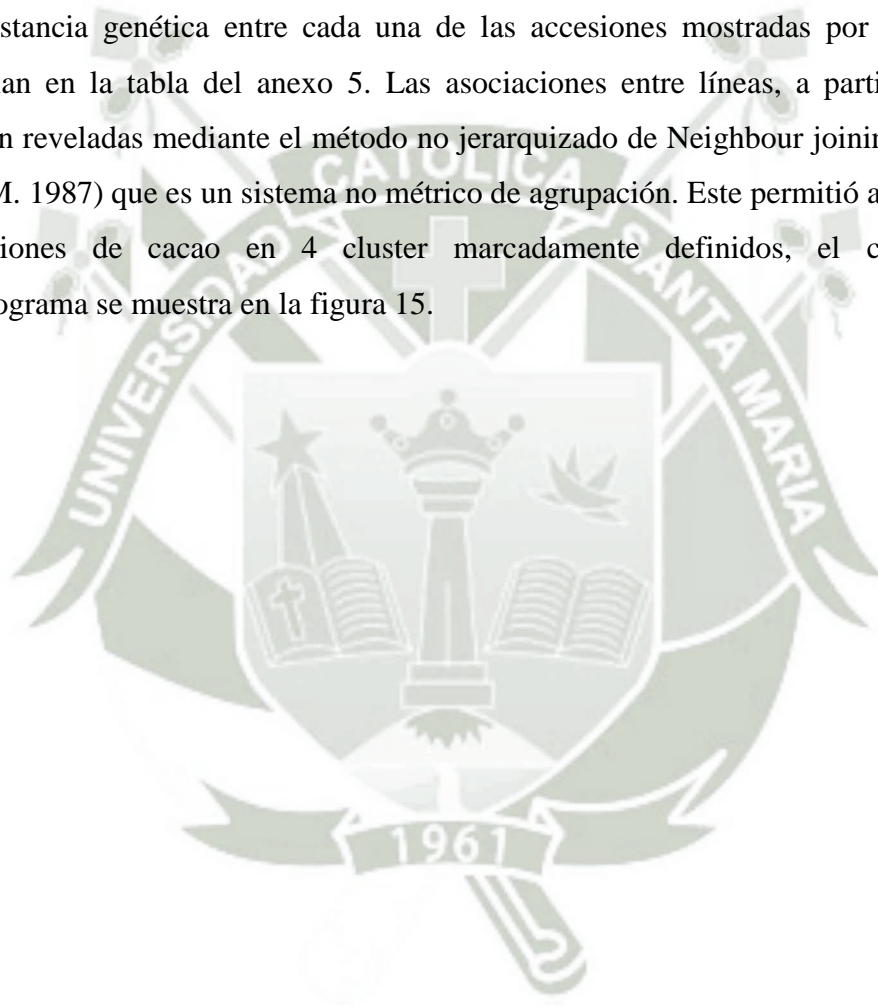
(1) entre el total de individuos sin considerar los datos perdidos. La frecuencia de ausencias (q) según Chia J., 2009 se obtuvo restando 1 menos el valor de “p”. Los loci con una frecuencia de presencia de banda (p) menores a 0.05 se consideraron alelos raros y con una frecuencia de presencia de banda (p) igual a 1.0 son considerados monomórficos. Con estos datos se calculó finalmente un promedio para cada par de cebadores específicos. Las combinaciones EcoRI-ACT/MseI-CAT y AGC + MseI-CTA tuvieron los índices de contenido polimórfico más bajos del estudio (PIC= 0.1) y el mayor número de bandas monomórficas lo que podría ser indicador de que estos cebadores analizaron partes donde la especie comparte el genoma y donde según (Brown A., (2002) y Whitkus R. et al., (1994) resaltarían el hecho de que la especie se derivan de un ancestro común.

Martinez W., (2007) obtuvo valores similares usando microsatelites (SSR) en muestras de cacao boliviano, reportando valores PIC máximo de 0.23. De la misma manera Chia J. (2009) en un estudio a la colección de cacao de Tingo María reportó la suma de todos los valores PIC para cada iniciador ISSR usado generando índices informativos ISSR (basado en Ghislain M. *et al.*, 1999) de esta manera indicó el valor de 4.56 para el mejor de sus cebadores que amplificó 15 loci (promedio PIC de 0.30) de esta manera se podría indicar que los valores de PIC obtenidos son indicadores de la efectividad de los cebadores AFLP para estudios de variabilidad. Esto corrobora el uso de este método en la estimación de la diversidad genética entre cada accesión. Este resultado tiene similitud con estudios en otras especies vegetales usando marcadores AFLP Fory A., (2005) en *Solanum Quitoense* y Bertoni M. et al., (2009) en *Jacaranda Decurrens cham.*

En conclusión el contenido de información polimórfica (PIC) se utilizó para medir la capacidad de los marcador para detectar polimorfismo de modo que indica su calidad en estudios de variabilidad génica (Botstein D. et al. 1980) además revelaron la existencia de variabilidad genética entre las accesiones de cacao del banco de germoplasma del Instituto de Cultivos Tropicales (ICT) partiendo de la premisa que un locus es considerado polimórfico cuando se puede detectar más de un alelo en una población.

Generalmente el criterio más utilizado es el de 1%, entonces, como menciona Aranguren J. *et al.*, (2005) un locus es polimórfico si el alelo más común presenta una frecuencia menor al 99 % en la población bajo estudio.

3.6 Análisis de similitud y Agrupamiento; Usando el programa PAST versión 2.1b (hammer O. et al, 2001) se generó la matriz de distancia genética entre las 80 accesiones estudiadas, utilizando el coeficiente de correlación Jaccard (Sneath, 1908) los resultados de distancia genética entre cada una de las accesiones mostradas por esta matriz se detallan en la tabla del anexo 5. Las asociaciones entre líneas, a partir de los datos fueron reveladas mediante el método no jerarquizado de Neighbour joining (Saitou N. y Nei M. 1987) que es un sistema no métrico de agrupación. Este permitió agrupar a las 80 accesiones de cacao en 4 cluster marcadamente definidos, el correspondiente dendograma se muestra en la figura 15.



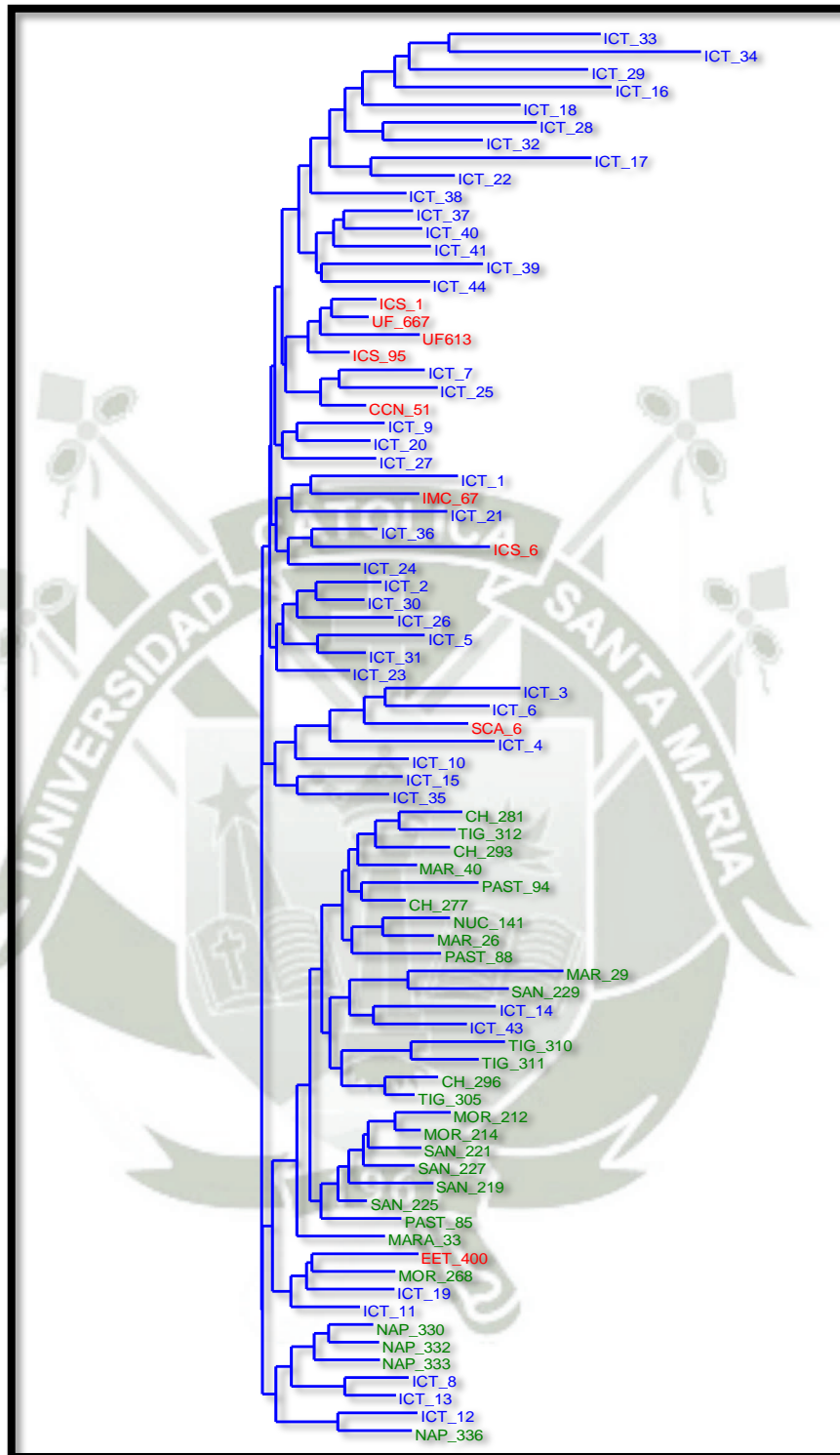


Figura N° 15: Dendrograma propuesto para las 80 accesiones de *Theobroma cacao L.* del banco de germoplasma del Instituto de Cultivos Tropicales (ICT), con el método no jerarquizado de Neighborur Joining.

La descripción del dendograma de la figura 15 se realiza de la siguiente manera:

Clúster 1; Conformado por las accesiones NAP-330, NAP-332, NAP-333, NAP-336, ICT-8, ICT-12 e ICT-13, este clúster agrupa perfectamente a los 4 muestras provenientes de las accesiones recogidas del río Napo en el departamento de Loreto, este río es uno de los más lejanos en cuanto a distancia de procedencia con el resto de las accesiones y podría ser esta la razón de su agrupamiento, sin embargo es interesante ver el grupo de muestras ICT agrupadas en este clúster, siendo la procedencia de estas últimas la provincia de Mariscal Cáceres, no obstante hay que tener en cuenta que la constitución genética del grupo ICT se debe a la selección y mezcla por agricultores, con parentales foráneos introducidos a lo largo de muchos años en estas zonas cacaoteras, esto podría significar la presencia de genes transmitidos desde estas zonas tan remotas por acción del hombre.

Clúster 2; Este clúster agrupa de una manera interesante a la mayoría de accesiones Amazónicas, lo que indica la estrecha relación genética que existe entre ellas y que las diferencia del resto de accesiones estudiadas, este clúster está dividido en 2 sub clúster

Sub clúster 2.1; Conformado por la accesión internacional EET-400, el Amazónico MOR-268 y las accesiones ICT-19 e ICT-11, este grupo refleja la cercanía geográfica que existe entre el río Morona y la muestra EET-400 proveniente de Estación Experimental Tropical de Pichilingue (Ecuador) lo que podría señalar una relación entre estas muestras, a su vez es interesante ver en este grupo las muestras pertenecientes al grupo ICT-19 proveniente de Tocache e ICT-11 proveniente de Mariscal Cáceres lo que volvería a indicar el rol de clones foráneos en la constitución genética de estas muestras.

Sub clúster 2.2; Este sub clúster agrupa al resto de las accesiones amazónicas en tres pequeños grupos, el primero está conformado por CH-277, CH-281, CH-293, TIG-312, MAR-40 Y PAST-94. El segundo grupo está conformado por los MAR-29, SAN-229, TIG-310, TIG-311, TIG-305, CH-296, ICT-14 e ICT-43 y el tercer grupo alberga a MOR-212, MOR-214, SAN-221, SAN-227, SAN-219,

SAN-225 PAST-85 y MARA 33. Estas accesiones son pertenecientes a los ríos Chambira, Tigre, Marañón, Pastasa, Santiago, y dos al grupo ICT.

Clúster 3; Conformado por las accesiones ICT-3, ICT-6, SCA-6, ICT-4, ICT-10, ICT-15, ICT-35. Este clúster agrupa principalmente a individuos del grupo ICT colectados de las zonas productoras de Juanjui y apenas 1 individuo de la colecta en Tocache, esto podría justificarse por la proximidad geográfica relativa que existe entre ambas zonas. El caso de la presencia de SCA-6 en este clúster podría explicarse ya que este es un genotipo muy utilizado en los programas de mejoramiento genético, debido a su aporte a la resistencia a “escoba de bruja”, y como ya se indicó antes, la constitución genética del grupo ICT se debe a la selección y mezcla por agricultores con parentales foráneos, por tanto se podría pensar además que el resto del clúster podría contener esta característica de resistencia.

Clúster 4; Este clúster es el más amplio y agrupa en su mayoría a las accesiones pertenecientes al grupo ICT tanto de las zonas productoras de Juanjui y Tocache así como al resto de los clones internacionales, además este clúster se divide en 2 sub clúster:

Sub clúster 4.1; Aquí se agrupan las accesiones ICT-2, ICT-30, ICT-26, ICT-5, ICT-31 e ICT-23. Todos estas accesiones son pertenecientes a las zonas productoras de Juanjui y Tocache, lo que indicaría una homogeneidad de las accesiones, tanto por distancia geográfica como por constitución genética, sin embargo el hecho que estos individuos agrupen separados del resto de muestras pertenecientes a esta zona indicaría que poseen algunas características diferenciadas, convirtiéndolas en un interesante grupo de estudio en posteriores trabajos.

Sub clúster 4.2; Este sub clúster agrupa 31 accesiones en su mayoría del grupo ICT tanto de Juanjui y Tocache y complementadas por el resto de accesiones Internacionales. Presenta a su vez distintos grupos marcadamente separados, el primero de esos grupos lo conforman ICT-1, IMC-67, ICT-21, ICT-36, ICS-6 e

ICT-24, siendo la mayoría del grupo ICT y complementado por dos híbridos de origen peruano (IMC-67 e ICS-6) que poseen moderada resistencia a escoba de bruja y susceptibilidad a monilia, lo que podría indicar que el resto de accesiones ICT podrían compartir esta característica. El segundo grupo lo conforman ICT-9, originario de Juanjui, ICT-20 e ICT-27 originarios de Tocache, este grupo es congruente desde el punto de vista geográfico. El tercer grupo contiene a las accesiones internacionales ICS-1, UF-667, UF-613 e ICS-95. Estos híbridos pertenecen al grupo genético trinitario, sus abreviaturas indican el lugar donde fueron desarrollados, ICS (Selección del Colegio Imperial, Trinidad y Tobago) y UF (compañía de frutos unidos, Costa Rica), los híbridos ICS presentan rendimientos por encima de los 1300 kg/ha y una moderada resistencia a escoba de bruja, los híbridos UF son susceptibles a escoba de bruja, pero mantienen rendimientos por encima de los 1000 kg/ha. Las accesiones ICT-7, ICT-25 y el híbrido internacional CCN-51 completan este tercer grupo, es importante señalar que CCN-51 es un híbrido muy cultivado en las zonas cacaoteras Peruanas por su alto rendimiento (2500 kg/ha) y su resistencia a escoba de bruja, su origen genético se da relacionado a un cruce entre IMC-67 x ICS-95 y un forastero desconocido (MINAG, 2009), razón por la cual integra este clúster acompañado de sus parentales. En cuanto a las accesiones ICT podrían mostrar un excelente potencial ya que están relacionados a los híbridos ya mencionados.

La razón por la cual no se observan medidas de las distancias genéticas en el dendograma presentado responde al hecho de que el método de agrupación de Neighbor-Joining ("reunión por vecindad") emplea técnicas generales de aglomeración de datos para el análisis de secuencias y se sirven de la distancia genética como un medidor de aglomeración. El método Neighbor-Joining simple produce árboles no enraizados, pero no asume una tasa constante de evolución entre los linajes.

La selección de este método de agrupación (Neighbor joining) se asoció al tipo de caracteres evaluados, así como a la respuesta del método de reflejar una asociación basada en la concordancia de las clasificaciones generadas respecto al conocimiento del

patrón natural o filogenético de los individuos o poblaciones en estudio (Boontong S. et al., 2008) citado por (Demey J., 2008). Esto es corroborado por otros trabajos que han empleado este método de agrupamiento en diversidad genética en cacao (Gillaspie J. et al., 2005; Barkley N. et al., 2006; Barry R. et al., 2007)

Es necesario comentar que no existe un criterio universal de cuando usar uno u otro coeficiente de similitud o distancia genética, los diferentes autores que han abordado el tema coinciden que la elección de un determinado coeficiente dependerá del peso que se desea dar a las frecuencias de ausencia (0) y presencia (1) entre cada par de accesiones, el tipo de datos que se quieran representar y la situación experimental (Legèndre P. y Legèndre L., 1979; Gower y Legèndre L., 1986) citado por Demey J., (2008) La identificación del individuo queda descrita por el conjunto total de alelos obtenido para cada uno de ellos, llamado patrón alélico. La comparación de patrones alélicos, mediante coeficientes de similaridad, permite establecer grupos de individuos con características génicas similares (Pejic L. et al., 1998).

La formación de clúster obtenidos para las 80 accesiones de cacao del banco de germoplasma del Instituto de Cultivos Tropicales guarda en muchos casos asociatividad con respecto al lugar de donde se reportó su procedencia, las accesiones del grupo amazónico permanecieron agrupadas en un mismo clado, esto resalta naturaleza silvestre de estas accesiones, evidenciando que en ciertos casos las accesiones dentro de este grupo permanecieron juntas obedeciendo al río de donde fueron colectadas, Zhang D. et al., (2009) reporta menciona que existe una clara diferenciación de la población, que se estratifica por los sistemas fluviales de la Amazonía peruana, siendo esto evidenciado con marcadores SSR. De igual manera las muestras procedentes de las zonas productoras de Mariscal Cáceres y Tocache en su mayoría mostraron tendencia la agrupación regionalizada, pero dentro del grupo no se observó este mismo hecho, quizá por tratarse de accesiones influenciadas por la actividad comercial humana. Debido a estos resultados no se concuerda con Faleiro F. et al. (2004) quien afirma que no existe ninguna tendencia a la regionalización en el análisis de agrupamiento de la variabilidad genética de materiales de diferentes orígenes amazónicos. De la misma forma Parra P. et

al. (2002) evidenciaron la variabilidad existente entre estos tipos de cacao como consecuencia de la hibridación natural que ha ocurrido en la zona. Pero encontró poca asociatividad entre agrupamientos y localización geográfica.

Motamayor J. et al. (2008) citado por Chia J., (2009) proponen que el patrón de diferenciación de las poblaciones estudiadas de cacao podría estar ligado a potenciales barreras de dispersión creadas por cordilleras "primitivas" también llamadas "paleoarcos". Los individuos de varios clúster se pueden ubicar en una misma localidad sin ser divididos por alguna potencial barrera (río o cordillera). Es el caso de Iquitos, donde varios ríos principales usados para transporte convergen, la presencia de poblaciones distintas de cacao podría deberse a una antigua o actual intervención humana. Esto explicaría la similitud molecular entre algunos individuos de cacao cuyo origen geográfico no es el mismo.

Lachenaud P. (1997) citado por Chia J., (2009), afirma que muchos de los trabajos realizados para categorizar o clasificar el cacao tienen "debilidades" debido a que el investigador supone que ciertos clones (individuos o accesiones) pertenecen a particularmente uno de los llamados grupos genéticos (Forastero, Criollo o Trinitario, propuestos por Cheesman E., (1944). Asimismo, el número diferente de muestras genera un sesgo en el análisis estadístico jerárquico.

3.7 Análisis de la variabilidad molecular entre poblaciones; Considerando que una población, es una colección de individuos de la misma especie que viven en un espacio y momento determinado se realizó un agrupamiento según su origen geográfico, por tanto se constituyeron 5 poblaciones las que agruparon a las accesiones de Mariscal Cáceres, Tocache, Amazónicas, Perú – Ecuador y Trinidad y Tobago – Costa Rica, para realizar los análisis entre las poblacionales y dentro de las poblaciones. Adicionalmente se realizó la suposición previa de que las poblaciones de cacao están en Equilibrio Hardy Weinberg, por requerimiento del programa POPGENE; esta suposición estaría apoyada en que el cacao es una especie principalmente alógama y gracias a esto son poblaciones muy heterocigotas.

3.7.1 Porcentaje de loci polimórfico (%PPL); Con los resultados del análisis se confeccionó la tabla 22, que muestra el porcentaje de loci polimórfico que existe entre las 5 poblaciones y dentro de cada una de estas.

Tabla N° 22: Número de loci polimórfico y porcentaje de loci polimórfico de las 5 poblaciones de *Theobroma cacao L.* analizadas

POBLACION	NUMERO DE LOCI POLIMÓRFICO	% PPL
Mariscal Cáceres	75	55.56
Tocache	73	54.07
Amazónicos	66	48.89
Internacional (Trinidad y Tobago- Costa Rica	24	17.78
Internacional (Perú-ecuador)	32	23.7
INTERPOBLACIONAL	97	71.85

El resultado de porcentaje de loci polimórfico entre poblaciones fue de 71.85%; lo que revelaría que como grupo perteneciente al banco de germoplasma del Instituto de Cultivos Tropicales presenta un alto potencial de polimorfismo y por tanto podría ser fuente de riqueza alélica para trabajos de mejoramiento genético futuros. En cuanto a las poblaciones independientes se observa que las poblaciones de Mariscal Cáceres y Tocache tienen los valores más altos de porcentaje de loci polimórfico 55.56% y 54.07% respectivamente, esto muestra de una manera superficial que en términos de polimorfismo la mayor riqueza se encuentra en estas regiones, quizá influenciada al manejo de los agricultores sobre estas accesiones. Zhang D. et al, (2006) indica que estas localidades corroboran la hipótesis de que la Amazonía peruana alberga un alto nivel de diversidad genética del cacao, finalmente señala que la introducción de poblaciones de semillas como parte de planes de mejora del cultivo en zonas cacaoteras peruana está cambiando el espectro de germoplasma de cacao en estas regiones. Por tal motivo la población amazónica mostró un valor de 44.89% lo que guarda lógica con dichas aseveraciones. Las poblaciones Internacionales Trinidad y Tobago - Costa Rica (17.78%) y Perú - Ecuador (23.7%). Tuvieron valores relativamente bajos, estas diferencias pueden deberse a que son genotipos diferentes, con orígenes diferentes, de esta manera se encontró que la estructura genética describe la variación en la frecuencia

del gen y genotipo entre los individuos. (Hasting K. 1997). Por otro lado, debido a que el porcentaje de loci polimórficos se calculó mediante la fórmula (2)

$$\text{Porcentaje de loci polimórficos} = \frac{\text{Número de loci polimórficos}}{\text{número total de loci}} \times 100 \dots \dots \dots (2)$$

Se puede resaltar el hecho que las poblaciones con menos accesiones relativamente presentaron menor porcentaje de loci polimórfico.

3.7.2 Diversidad genética (h), número de alelos observados (na) y número de alelos efectivos (ne); los resultados de estos parámetros poblacionales se muestran en la tabla 23.

Tabla N° 23: Reporte de número de alelos observados, número de alelos efectivos y Diversidad genética de Nei. Dentro de cada una de las poblaciones y en conjunto.

Entre accesiones dentro de una población.

POBLACION	na	desv. Est.	ne	desv. Est.	H	desv. Est.
MARISCAL CÁCERES	1.56	0.50	1.34	0.38	0.20	0.20
TOCACHE	1.54	0.50	1.31	0.37	0.18	0.20
AMAZONICOS	1.49	0.50	1.28	0.36	0.16	0.20
TRINIDAD-COSTA	1.18	0.38	1.13	0.31	0.07	0.16
PERU-ECUADOR	1.24	0.43	1.14	0.29	0.09	0.16

Entre poblaciones

GRUPO	na	ne	h
ENTRE POBLACIONES	1.72	1.31	0.20
desv. Est.	0.45	0.33	0.18

na: número de alelos observados.
ne: número de alelos efectivos. (Kimura y Crow, 1964)
h: diversidad genética de Nei. (1973)

Los mayores valores del coeficiente de diversidad de Nei M. (heterocigosidad esperada) para este estudio se revelaron para las poblaciones de Mariscal Cáceres (0.20), seguida de la población de Tocache (0.18) y la población Amazónica (0.16), esto vuelve a resaltar la importancia del contenido genético que albergan estas poblaciones, los valores más bajos están registrados para las poblaciones Trinidad -Costa Rica y Perú-Ecuador (0.07 y 0.09 respectivamente).

Por otra parte, el coeficiente de diversidad para todo el conjunto de accesiones estudiadas, como parte del banco de germoplasma del Instituto de Cultivos Tropicales (ICT) y que contiene a las cinco poblaciones de cacao fue de 0.20, este valor es tan alto como la presentada por la población de Mariscal Cáceres, por tal motivo resalta el valor en conjunto de todas las accesiones estudiadas. En lo referente al número de alelos observados (n_a) y el número efectivo de alelos (n_e), la población de Mariscal Cáceres superó a las poblaciones restantes con valores de 1.56 y 1.34, respectivamente, estos valores son directamente proporcionales a los de diversidad genética.

Cabe señalar que la diversidad genética es una mejor valoración de la variación genética de la población medida como la frecuencia media de individuos heterocigotos por locus (Lacadena J., 1981). Así también Crow M. y Kimura J., (1970); citados por Arangure J. et al., 2005 indican que el término de diversidad genética de un locus (Nei M., 1973) se usa para referirse a la heterocigosidad esperada (H_E) y es la probabilidad de que dos alelos tomados al azar de la población sean diferentes

Los valores obtenidos muestran que las poblaciones estudiadas poseen diversidad genética sin embargo los mayores valores corresponden a las poblaciones de Mariscal Cáceres (Tabla 23), Esto sugiere centrar la atención en este material para trabajos de mejoramiento, por esta razón se concuerda con Zhang D. et al., (2006 y 2011), quien resalta el potencial de diversidad de cacao en esta región y lo atribuye a la selección hecha por los agricultores y que derivó en el establecimiento de familias de plantas híbridas. Además se ha reportado que en la Amazonía el cacao fue distribuidos tradicionalmente por vainas como material de siembra de cacao (Dias L., 2001;

BartleyB., 2005). La propagación por clones ha sido un aporte reciente. Los híbridos segregan familias con diversos antecedentes ofreciendo un alto nivel de diversidad genética y nuevos genotipos en las plantaciones de cacao.

El número de alelos efectivos (n_e) para cada población fue proporcional a la heterocigosidad, ya esta medida indica el número de alelos esperados en cada locus de una determinada población, y es la inversa de la homocigosidad de un locus, lo que fue corroborado en la tabla 23, de la misma manera los alelos efectivos presentaron valores altos en comparación con las poblaciones cultivadas en las regiones del Ecuador (aunque las poblaciones contaron con pocos individuos). Aranguren J. et al., (2005), comenta que esta medida depende del número de individuos analizados, cuando el número es grande, mayor es la probabilidad de detectar alelos suplementarios. Además, el número de alelos por locus es utilizado para estudiar la existencia de la variabilidad.

Un aporte más a la presencia de diversidad genética entre las poblaciones y dentro de estas, es el hecho de que los valores de desviación estándar son relativamente altos. Sounigo O. et al., 2005 citado por Chia J., (2009), indica que este hecho posee una correlación altamente significativa con la aparición de variabilidad en las muestras analizadas.

3.7.3 Proporción de la diversidad genética (G_{st}); La comparación de los G_{st} entre par de poblaciones se muestra a continuación.

Tabla N° 24: Proporción de la diversidad genética (G_{st}) entre poblaciones comparadas.

POBLACION	MARISCAL CACERES	TOCACHE	AMAZONICOS	TRINIDAD - COSTA
TOCACHE	0.04	----	----	----
AMAZONICOS	0.09	0.11	----	----
TRINIDAD- COSTA	0.22	0.21	0.21	----
PERU-ECUADOR	0.16	0.17	0.13	0.31

Tabla N° 25: Promedio de la heterocigosis esperada en la población total para todos los loci (Ht) y promedio de la heterocigosis esperada dentro de subpoblaciones para todos los loci (Hs).

GRUPO	Ht	Hs	Gst
ENTRE POBLACIONES	0.18	0.14	0.23
desv. Est.	0.03	0.02	

Se analizó la proporción de diversidad genética (Gst) que existe entre cada una de las poblaciones establecidas, resultando los valores que se muestran en la tabla 24, de tal manera se aprecia que las poblaciones de Mariscal Cáceres y Tocache tienen un valor bajo de proporción de variación genética (0.04) lo que en términos porcentuales indica que un 4 % de la variación se debe a diferencias entre estas poblaciones, la población amazónica también presenta valores Gst de 0.11 y 0.09 con las poblaciones de Tocache y Mariscal Cáceres respectivamente, denotando así que las accesiones dentro de estas regiones no están muy diferenciadas entre ellas. Por otro lado estas tres poblaciones presentan mayores valores de diferenciación con respecto a la población Trinidad-Costa que con la población Ecuador-Perú, alcanzando valores máximos de 0.22 y 0.16 con respecto a la población de Mariscal Cáceres. Finalmente estas dos poblaciones (Trinidad-Costa y Ecuador-Perú) presentan el mayor valor de Gst (0.31), lo que es congruente a su naturaleza y origen.

En la tabla 25 se da también un valor de diferenciación genética de la población total (Gst = 0.23), lo que indica que las poblaciones están poco diferenciadas, y que aproximadamente 23 % de la variación detectada se debe a diferencias entre las poblaciones; es importante señalar además que el porcentaje complementario al valor de Gst representa diversidad genética dentro de las poblaciones, y que para este caso, el estudio de la población total es de 77 %. El promedio de la heterocigosis esperada en la población total (Ht) es 0.18 al igual que el promedio de la heterocigosis esperada dentro de subpoblaciones para todos los loci (Hs) es 0.14. Piñero D., et al. (2008) indica que la interpretación de estos dos últimos resultados con respecto a Gst es sencilla: si es de 0,

indica que las frecuencias alélicas son iguales en todas la poblaciones, no ha habido diferenciación ($H_t = H_s$). El máximo posible es de 1, cuando cada población está fija en alelos diferentes ($H_s = 0$)

De acuerdo con Sounigo O. et al., (2005) cita por Chia J., (2009). Los valores de G_{st} indican la proporción de la diversidad genética entre las poblaciones comparadas y permitiría ser la guía para definir la cantidad de individuos que una muestra debe contener. A una mayor diversidad genética, mayor número de individuos. Esto también permitiría dirigir las estrategias de exploración para coleccionar y enriquecer la diversidad genética en un Banco de Germoplasma.

Chia J. (2009) afirma que la utilización de subpoblaciones con pocas muestras y en algunos casos con un solo individuo varían los resultados de G_{st} .

3.7.4 Distancias genéticas (Nei 1973); Los índices de distancia genética se calculan entre pares de poblaciones y pretende describir el grado de diferencia genética entre estas dos poblaciones.

Tabla N° 26: Matriz de Identidades Genéticas y Distancias Genéticas normalizadas (unbiased) de Nei.

POBLACION	MARISCAL CACERES	TOCACHE	AMAZONICOS	TRINIDAD-COSTA	PERU-ECUADOR
MARISCAL CACERES	----	0.98	0.96	0.92	0.94
TOCACHE	0.02	----	0.95	0.93	0.94
AMAZONICOS	0.04	0.05	----	0.93	0.96
TRINIDAD-COSTA	0.09	0.08	0.07	----	0.93
PERU-ECUADOR	0.06	0.06	0.04	0.08	----

Con esta matriz generada con el POPGENE v1.32, se graficó un dendograma sin raíz con todas las subpoblaciones analizadas, el cual se muestra a continuación en la figura 16.

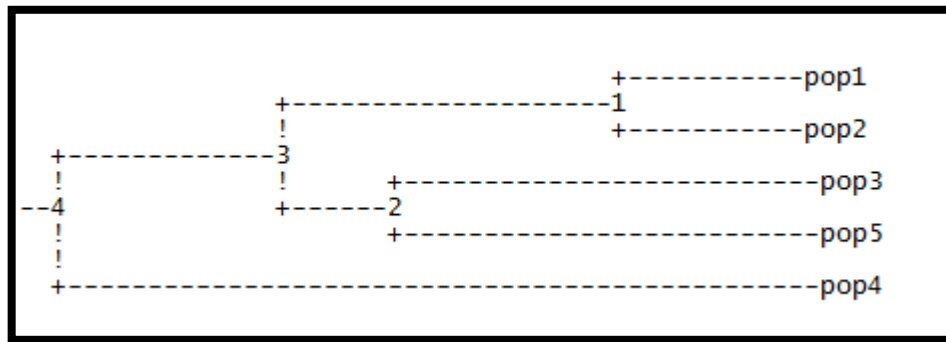


Figura N° 16: Dendrograma UPGMA de las subpoblaciones analizadas. Mariscal Cáceres (pop1), Tocache (pop2), Amazónicos (pop3), Trinidad-Costa (pop4) y Perú-Ecuador (pop5).

La matriz de las Identidades Genéticas y Distancias Genéticas normalizadas (*unbiased*) de Nei M. (1973) muestra dos partes la parte superior a la diagonal corresponde a las identidades, mientras que las Distancias Genéticas están debajo de la diagonal, las población Trinidad - Costa presentan mayor distancia con respecto a la población de Mariscal Cáceres (0.09), presentando a sus vez la identidad más baja (0.92). Por otro lado poblaciones de Mariscal Cáceres presenta menor distancia genética con respecto a la población de Tocache (0.02) y por tanto presentan una alta identidad (0.98). La población amazónica muestra valores promedios con respecto a las otras poblaciones. Las distancias genéticas fueron utilizadas por el programa POPGEN para construir un dendrograma con el método UPGMA, el cual se muestra en la figura 16. Así se refleja de una manera precisa la agrupación que existe entre las poblaciones de Mariscal Cáceres y Tocache, la población amazónica esta agrupada con la población Perú-Ecuador y finalmente la población de Trinidad-Costa presenta una mayor distancia genética con el resto. El número de la medida directa de las diferencias genéticas entre dos poblaciones.

Ya que estos parámetros de estructura poblacional fueron obtenidos gracias al uso de los marcadores AFLP se concuerda con Aranguren J. et al., (2005); quienes mencionan que los marcadores permitieron la identificación de cada alelo, la obtención de datos poblacionales y cálculo de las frecuencias alélicas, así, se puede estimar las distancias genéticas entre poblaciones o entre individuos además de realizar estudios sobre análisis filogenéticos y estudios de estructura poblacional.

CONCLUSIONES

1. Se puede afirmar que existe una significativa variabilidad entre las 80 accesiones de *Theobroma cacao L.* (cacao) pertenecientes al banco de germoplasma del Instituto de Cultivos Tropicales (ICT).
2. El método AFLP permitió obtener bandas correspondientes a la longitud de los fragmentos amplificados, formando así un perfil de cada una de las accesiones, las 9 combinaciones de cebadores específicos AFLP se comportaron como variable en el análisis de cada muestra, proporcionando 135 bandas marcadoras de las cuales 97 fueron polimórficas, adicionalmente las combinaciones E-AGC / M-CAC y E-AGC / M-CTA son un aporte a la lista de cebadores que detectan polimorfismo en la especie *Theobroma cacao L.* ya que no han sido reportados con anterioridad. Los patrones de bandas permitieron discriminar la variabilidad existente entre accesiones y entre poblaciones de las 80 accesiones de cacao procedentes del banco de germoplasma del Instituto de Cultivos Tropicales (ICT)
3. Se pudo determinar la variabilidad de las 80 accesiones de *Theobroma cacao L.* del banco de germoplasma del Instituto de Cultivos Tropicales (ICT) estas se agruparon en 4 clúster con tendencia a la separación de acuerdo a su origen geográfico, manteniéndose una marcada separación entre las accesiones de Amazónicas y las del accesiones del grupo ICT (Mariscal Cáceres y Tocache), las accesiones híbridas internacionales se repartieron dentro de estos clúster, mostrando congruencia con los antecedentes históricos.
4. El estudio de la variabilidad poblacional señaló al grupo Mariscal Cáceres como poseedor de mayor diversidad genética en comparación con las demás poblaciones estudiadas, la población amazónica también mostro valores considerables de variabilidad, finalmente los valores de G_{st} evidenciaron que la variabilidad es mayor dentro de cada población que entre las poblaciones.

RECOMENDACIONES

1. Es necesario para futuros estudios de estas accesiones de cacao pertenecientes al banco de germoplasma del Instituto de Cultivos Tropicales (ICT) en el empleo de marcadores moleculares de tipo codominante (por ejemplo microsatélites), que permitirían ampliar el conocimiento del banco de germoplasma del Instituto de Cultivos Tropicales (ICT).
2. Asociar los resultados de marcadores moleculares a las características agronómicas de las accesiones de *Theobroma Cacao L.* estudiadas, para iniciar la elaboración de mapas genéticos.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- **Abadie T., Berreta A.** Caracterización y evaluación de recursos filogenéticos. 2001, Montevideo, Uruguay. PROCISUR.s.p.86: 1474– 486.
- **Acquadro, A., Portis, E., and Lanteri, S.** Development of microsatellite markers in pepper (*Capsicum annum* L.) using microsatellite-amplified fragment length polymorphism (MAFLP).2002, *Capsicum Eggplant Newsl.* 21: 25–28.
- **Adriazola J.** Producción del Alimento de los Dioses *Theobroma cacao* L. Monografía. Universidad Nacional Agraria de la Selva. 2003. Tingo María. Perú.81 pp.
- **Allen J., Lass R.,** London cocoa trade Amazon Project. Final reort. Phase 1 Cocoa Growes bulletin.19 83. N° 34 : 45
- **Almeida, A. y VALLE R.** Ecophysiology of the cocoa tree. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 2007, 19(4): 425-448.
- **Alverson W., Whitlock B., Nyffeler R., Bayer C., and Baum D.,** Phylogeny of the core Malvales: evidence from *ndhF* sequence data. 1999. *American Journal of Botany* 86: 1474– 486.
- **Anthony H., Birtwistle S., Eaton K., et al.** (1997) Environmental medicine in clinical practice.(BSAENM Publications, Southampton).
- **Aragon E.,** Genetic characterization of *Theobroma Cacao* L Nicaraguan. [TESIS DE MAESTRÍA]. Faculty Of Agriculture And Forestry, University Of Helsinki; 2005
- **Aranguren J., Román-Bravo R., Isea W., Villasmil Y., Jordana J.** Los microsatelites (STR's), marcadores moleculares de ADN por excelencia para programas de conservación: 2005. *Arch. Latinoa. Prod. Anim.* 13(1): 30-42.
- **Arbeláez J., Acevedo, J. y Jaramillo, R.** Metabolitos secundarios en el guayacán amarillo y en el guayacán rosado. 2011, *Scientia et Technica* 47:297-301.

- **Arca M.** Capítulo I: La producción del cacao en el Perú. En: Arca B., M. (Ed.) El Cultivo del Cacao en la Amazonía Peruana. 2000, Presidencia de la República. Ministerio de Agricultura, Lima - Perú.
- **Arciniegas A.** Caracterización de árboles superiores de Cacao (*Theobroma cacao L.*) seleccionados por el Programa de Mejoramiento Genético del CATIE. Tesis para optar al grado de Magíster Scientiae. Programa de enseñanza para el Desarrollo y la Conservación. Escuela de Postgrado. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE). Turrialba, Costa Rica. 2005
- **Arciniegas A., Phillips M.** Caracterización de genotipos superiores de cacao seleccionados por el programa de mejoramiento genético del CATIE por su rendimiento y/o resistencia a moniliasis. 2006, In 15 International Cocoa Research
- **Arévalo E.** Identificación del cacao criollo como producto nativo de la biodiversidad de San Martín y evaluación de su potencialidad regional. 2011, Perúbiodiverso. Lima, Perú.
- **Arévalo E., García L., Krauss U., et al.** (1999) Mejoramiento genético para el control de enfermedades del cacao en el Perú. In: Proceeding of the International Workshop on the Contribution of Disease Resistance to Cocoa Variety Improvement, 24th–26th, November, 1996. Bahía, Brazil: INGENIC, 127–133
- **Arévalo E., Ortiz B., Zuñiga C., Gonzales V.** Selección de plantas de cacao resistentes a la moniliasis usando savia del floema y fluidos embriónicos de frutos jóvenes. 2005, Manejo Integrado de Plagas y Agroecología 76: 86-88.
- **Arguello O., Mejia L., Palencia C.** Origen y descripción botánica. In Tecnología para el mejoramiento de sistemas de producción de cacao. 2000, Corpoica, Bucaramanga, Colombia. p 10 – 12.
- **Azofeifa A.** Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del trópico. CIGRAS.2006; vol. 17: 221-242.
- **Bertoni, M. et al.** Genetic diversity in natural populations of *Jacaranda decurrens* Cham. Determined using RAPD and AFLP markers. Genetics and Molecular Biology. 2010; vol. (33):532-538.

- **Barkley N., Roose M., Krueger R., Federici C.** Assessing genetic diversity and population structure in a citrus germplasm collection utilizing simple sequence repeat markers (SSRs). 2006, *Theoretical and Applied Genetics*, 112(8):1519-1531.
- **Barry, R., et al.** 2007. Chapter 15, Polar regions (Arctic and Antarctic). In *Climate Change 2007: Impacts, Adaptation and Vulnerability, Contribution of Working Group II to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*, ed. M. L. Parry et al., 653–686. Cambridge: Cambridge University Press.
- **Bartley B.** The genetic diversity of cacao and its utilization. CABI International, Wallingford. 2005, Oxford shire, OX10, 8DE, UK: CABI Publishing Tropical Plant Biol.
- **Bassman B., Caetano G., Gresshoff P.** Anal. Biochem. 196: 80-83. Bellon, M.R., J. Berthaud, M. Smale, J.A. Aguirre, S. Taba et al. 2003. Participatory landrace selection for on farm conservation: An example from the Central Valleys of Oaxaca. 1991, Mexico. *Genetic Resources and Crop Evolution* 50:401-416.
- **Beidler J., Hilliard P., Rill R.** Ultrasensitive Staining of Nucleic Acids with Silver. 1982, *Anal Biochem.* 126: 374-380.
- **Bellon M., Adato J., Becerril A., Mindek D.** Poor farmers' perceived benefits from different types of maize germplasm: The case of creolization in lowland tropical Mexico. 2006, *World Development* 34:113-129.
- **Bennett M., Leitch I.** Nuclear DNA amounts in angiosperms. 1995, *Annals of Botany* 76: 113–176.
- **Bernoulli G.** Über der bis jetzt bekannten Arten von Theobroma. Neue Denkschriften der allgemeinen Schweizerischen Gesellschaft für die gesammten Naturwissenschaftler. 1869, 243: 1-15. Zurich.
- **Bertoni B. et al.** Genetic diversity in natural populations of *Jacaranda decurrens* Cham. Determined using RAPD and AFLP markers. *Genetics and Molecular Biology*. 2010; vol. (33):532-538.

- **Boontong C., Pandey M., Changtragoon S.** Isolation and characterization of microsatellite markers in Indian neem (*Azadirachta indica* var. *indica* A. Juss) and cross-amplification in Thai neem (*A. indica* var. *siamensis* Valenton). *Conservation Genetics*.(2008, DOI 10.1007/s10592-008-9610-5.
- **Botstein D., White R., Skolmick H., Davis R.** Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. 1980 *American Journal of Human Genetics*, 32, 314-331.
- **Bowcock A., Ruíz A., Tomfohrde J., Minch E., Kidd J., Cavalli L.** High resolution human evolutionary trees with polymorphic microsatellites. 1994, *Nature*, 368:455-457.
- **Brako L., Zarucchi J.** Catalogue of the Flowering Plants and Gymnosperms of Peru.1993, *Monogr.Syst. Bot. Missouri Bot. Gard.* 45: i–xl, 1–1286.
- **Bramardi S., Bernet, G., Asíns M., Carbonell E.** Simultaneous Agronomic and Molecular Characterization of Genotypes via the Generalised Procrustes Analysis. An Application to Cucumber.2005, *Crop Science*, 45:1603-1609.
- **Braudeau J.** El cacao.Trad. A.M Hernández. Técnicas agrícolas y producciones tropicales. Primera reimpresión.Editorial Blume. Barcelona. 1975. ES. 283 p.
- **Brown A.** 1995. The core collection at the crossroads. In: Core collections of plant genetic resources. Hodking, T., A.H.D. Brown, T.J.L van Hintum and E.A.V. Morales, (eds.). Pp. 3-19. John Wiley and sons, New York
- **Brown A.***Genomes 2.* Oxford: Bios Scientific Publishers. 2002
- **Brown W.**The mitochondrial genome of animals. En: *Molecular Evolutionary Genetics*. 1995 MacIntyre RJ (ed), New York, Olenum. P. 95-130.
- **Capriles L., Reyes H.** Contenido de polifenoles en dos variedades de *Theobroma cacao L.*, y su relación con la resistencia a *Ceratocystis fimbriata*. 1968, *Agronomía Tropical* 18 (3): 339-355.
- **Carranza M., Motte E., Cedeño V., Cevallos O., Saucedo E., Canchignia H.** Estudio de la Diversidad Genética de 20 Accesiones de Cacao (*Theobroma cacao L.*) Mediante AP-PCR de la Colección del Centro del Cacao de Aroma

Tenguel en la Finca Experimental La Buseta. 2007; Ciencia y Tecnología. Nov; 1: 1-5

- **Checa M.** Polimorfismos genéticos: Importancia y aplicaciones, REV INST NAL ENF RESP. 2007; VOL. 20 ; 213-221
- **Cheesman E.** Notes on the nomenclature, classification and possible relationships of cocoa populations.1944, Trop. Agric. 21: 144-159.
- **Cherfas J.** Cacao: from the farms of Nicaragua to the mouths of gourmet connoisseurs everywhere. In Raimond, R. D. (ed) Geneflow: a publication about agricultural biodiversity. 2007, Roma, Italy.Bioversity International.p. 2.
- **Chevalier, A.** Revisión du genre *Theobroma* d'après l'Herbier du Muséum National d'Histoire Naturelle de Paris. 1946, *Rev. Int. Bot. Appl. Agr. Trop.* 26: 265-285.
- **Chia Wong J,** Caracterización molecular mediante marcadores ISSR de una colección de 50 árboles clonales e híbridos de cacao (*Theobroma cacao* L.) de la UNAS. [tesis de Maestría]. Tingo María: Universidad Nacional Mayor De San Marcos; 2009
- **Christensen M, Sunde L, Bolund L, Orntoft TF.** Comparison of three methods of microsatellite detection. Scandinavian Journal Clinical and Laboratory Investigation 1999. 59:167-178.
- **Couch J., Zintel H., Fritz P.**The genome of the tropical tree *Theobroma cacao* L. 1993, Mol. Gen. Genet.237, 123– 128.
- **Crow J., Kimura M.**An Introduction to Population Genetics Theory.1970, Harper and Row Publishers. New York. 591 p.
- **Cuatrecasas J.** Cacao and its allies.A taxonomic revision of thegenus *Theobroma*.Contributions from the United States NationalHerbarium.1964, vol 35. Smithsonian Institution Press, Washington,DC, pp 375–614
- **Cuéllar O., Guerrero G.** Actividad antibacteriana de la cáscara de cacao, *Theobroma cacao* L. 2012, Rev.MVZ Córdoba 17(3):3176-3183

- **Dagnielie P.** L'analyse statistique á plusier variables. 1975, Les Presses agronomiques de Gembloux(Belgique).362 pp.
- **De la Cruz M., Whitkus R., Gomez-Pompa A., Mota-Bravo L.** Origins of cacao cultivation. 1995. Nature 375: 542-543.
- **Debouck D., Smartt J.** Evolution of crop plants. Longman, Harlow, 1995. UK, pp. 287-294.
- **Dellaporta S., Word J.** A plant DNA minipreparation: version II. Plant Molecular Biology Reports. N°1, 1983, pp. 19 – 21.
- **Demey J.** diversidad genética en bancos de germoplasma: un enfoque biplot, [tesis de Maestría]. universidad de salamanca; 2008
- **Demey J., et al.** Classifying genotypes using Molecular Markers: A Biplot Methodology Apoach. In XXIIIrd International Biometric Conference, Montreal, Québec, Canada. 16–21 June 2006, THP3.326.
- **Dias L.** Genetic Improvement of Cacao.Traducción del libro ‘Melhoramento Genético do Cacaueiro’. 2001,Food and Agriculture Organization (FAO).
- **DIRECCIÓN GENERAL DE PROMOCIÓN AGRARIA (DGPA),** 2007. Cacao- Chocolate. Ministerio de Agricultura. Año 1 - Boletín 1.Diciembre.
- **Don R., Cox P., Wainwright B., Baker K., Mattick J.** “Touchdown” PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. 1991, Nucleic Acids Res. 19:4008
- **Dostert N., Roque J., Cano A., La Torre M., Weigend M.** Hoja botánica: Cacao. 2011, Comisión de Promoción del Perú para la Exportación y el Turismo – PROMPERU Ministerio del Ambiente – MINAM.
- **Doyle J., Doyle J.** Isolation of plant DNA from fresh tissue.1990, Focus 12: 13-15.
- **Duke J.** *Theobroma cacao L.* Handbook of Energy Crops. 1983
- **Efombagn M., Sounigo O., Eskes A., Motamayor J., Manzanares-Dauleux M., Schnell R., Nyassé S.** Parentage analysis and outcrossing patterns in cacao (*Theobroma cacao L.*) farms in Cameroon. 2009. Heredity 103: 46-53.

- **Enriquez G., Soria, J.** The variability of certain bean characteristics of cacao (*Theobroma cacao* L). 1968. *Euphytica*, 17: 114-120.
- **Eskes A.** (2006) Collaborative and participatory approaches to cocoa germplasm evaluation and selection. In : Denamany G, LaminKH, Albert L, Maisin N, Ahmad AC, Saripah B, Yazik NM (ed) Sustainable cocoa economy through increase in productivity, efficiency and quality: Proceedings of 4th Malaysian International Cocoa Conference (MICC) 2005. Kuala Lumpur, Malaysia, 18th–19th July 2005. Kota Kinabalu: MCB, pp. 77–88
- **Esquinas J.** La diversidad genética como material básico para el desarrollo agrícola. En: La Agricultura del Siglo XXI. J.I. Cubero y M.T. Moreno (coord.). 1993, Mundi-Prensa, Madrid, pp. 79-102.
- **Evans H., Krauss U, Rutz R, Acosta T, Arevalo E.** Cocoa in Peru. 1998, *Cocoa Growers Bulletin* 51: 7-22.
- **Faleiro F, Yamada M., Lopes U., Faleiro A., Siqueira R., Costa L., Santos R., dos Santos R.** Genetic similarity of *Theobroma cacao* L. accessions maintained in duplicates in the Cacao Research Center germplasm collection, based on RAPD markers. *Crop*. 2002
- **Faleiro F.** Proyecto BIOMOL/CEPEC/CEPLAC El uso de Técnicas Moleculares para la búsqueda de variedades resistentes a enfermedades de escoba de bruja en cacao. Ilhéus, Brasil, CEPLAC. 2001
- **Faleiro F., Pires J., Monteiro W. et al.** Variability in cacao accessions from the Brazilian, Ecuadorian, and Peruvian Amazons based on molecular markers. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*. 2004, Volumen 4, pp.227-233. Brazilian Society of Plant Breeding.
- **FAO 1996** Plan de Acción Mundial para la Conservación y la utilización sostenible de los recursos fitogenéticos para la alimentación y la agricultura. Leipzig, Alemania.
- **FAO, 1997.** Conservación y utilización sostenible de los recursos fitogenéticos para la alimentación y la agricultura. Plan de Acción Mundial. Roma, Italia. 10 p.

- **Ferreira, M., Grattapaglia D.** Introducción al Uso de Marcadores Moleculares en el Análisis Genético. 1998, 1ra Edición. EMBRAPA – CENARGEN Documento 20. Brasilia D.F. – Brasil.
- **Figueira A., Levy M., Goldsbrough P.** Reexamining the classification of *Theobroma cacao L.* using molecular markers. 1994, J Amer Soc Hort Sci 119(5):1073-1082.
- **Ford B., Jackson M.** Plant genetic resources. An introduction to their conservation and use. 1986, Arnold,Public Baltimore,. 152
- **Fory Sanchez A.,** Caracterización y análisis molecular de la diversidad genética de la colección colombiana de lulo (*Solanum quitoense lam*) y seis especies relacionadas de la sección Lasiocarpa. [tesis de Maestría]. Universidad Nacional De Colombia, Sede Palmira; 2005.
- **Gama R., Cadima Z.**Efectos de fertilización sobre sistema radicular de cacao en suelos de "tabuleiros" del sur de Bahía, Brasil. 1991, Turrialba (IICA) 41(2): 135-141.
- **García H.** Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia. UNIV DIAG. 2000; VOL. 1: 31-41
- **García L.** Recopilación y análisis de información científica para la elaboración de la hoja botánica del cacao (*Theobroma cacao L.*), cv. “porcelana” de Piura. Informe de consultoría. 2011, Tingo María, Perú.
- **Gawel N., Jarret R.** A CTAB procedimiento de extracción de ADN modificado de Musa y .Ipomoea Planta Periodista Biología Molecular , v.9, p.262-266, 1991.
- **Ghislain M., Zhang D., Fajardo D., Huaman Z., HijmanS R.** Marker assisted sampling of the cultivated Andean potato *Solanum phureja* collection using RAPD markers. 1999, Genetic Resources and Crop Evolution 46: 547-555.
- **Ghislain M., Zhang D., Fajardo D., Huaman Z., HijmanS R.** Marker assisted sampling of the cultivated Andean potato *Solanum phureja* collection using RAPD markers. 1999, Genetic Resources and Crop Evolution 46: 547-555.

- **Gillaspie A., Hopkins M., Dean R.** Determining genetic diversity between lines of *Vigna unguiculata* subspecies by AFLP and SSR markers. 2005, *Genetic Resources and Crop Evolution*, 52:245-247.
- **Gómez A.** La conservación de la biodiversidad en México: mitos y realidades: mitos y realidades. 1999, *Bol. Soc. Bot. México*. 63:33-41.
- **Hall H., Yuncong L., Comerford N., Arévalo Gardini E., Zuniga Cernades L., Baligar V., Popenoe H.** Cover crops alter phosphorus soil fractions and organic matter accumulation in a Peruvian cacao agroforestry system. 2010, *Agroforestry Systems* 80(3):447-455
- **Hammer O., Harper D., Ryan P.** PAST: Palaeontological Statistics software package for education and data analysis. *Palaeontología Electronica* 2001, 4 (1): 9.
- **Hill M., Witsenboer H., Zabeau M., Vos P.** PCR-based fingerprinting using AFLPs as a tool for studying genetic relationships in *Lactuca* spp. 1996, *Theor Appl Genet* 93:1202- 1210.
- **Hunter R.** The status of Cacao (*Theobroma cacao*, Sterculiaceae) in the western hemisphere. 1990, *Econ. Bot.* 44:425-439.
- **IIAP 2006**, Filomeno Encarnación C. Estudios Temáticos para la Zonificación Ecológica y Económica de la Provincia de Tocache, Vegetación
- **IIAP 2007**, Francisco Reategui R; Percy Martinez D. Estudios Temáticos para la Zonificación Ecológica y Económica del Departamento de San Martín, Forestal
- **Instituto Nacional De Investigacion Y Extension Agraria (INIA)** D. Velarde, L. Ríos, F. Carrillo, R. Estrada. CATALOGO DE LAS COLECCIONES NACIONALES .Volumen 1. Lima – Perú: GRAVAR - Impresiones Generales 2007.
- **IPGRI 1995** A brief history of plant germplasm collecting. En: *Collecting Plant Genetic Diversity*. L. Guarino, V. Ramanatha Rao, R. Reid (eds.). CABI, Wallingford, UK, pp. 1-22.

- **Jaccard, P.** Nouvelles recherches sur la distribution florale. 1908, Bulletin Society
- **Jaramillo S., Baena M.** Material de apoyo a la capacitación en conservación ex situ de recursos fitogenéticos. Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI). 2000, Cali, Colombia. 122 p.
- **Ji K., Zhang D., Motilal L., Boccara M., Lachenaud P., Meinhardt L.** Genetic diversity and parentage in farmer varieties of cacao (*Theobroma cacao L.*) from Honduras and Nicaragua as revealed by single nucleotide polymorphism (SNP) markers. Genet Resour Crop Evol. 2012; Jun
- **July, W.** Comportamiento de estacas de tres variedades de cacao (*Theobroma cacao L.*) a tres tratamientos de fitohormonas en la región de Alto Beni. Tesis Ingeniero Agrónomo. UMSA, La Paz BO 98 p, 2002.
- **Karp A., Edwards K.** DNA markers: a global overview. In: G. Caetano-Anollés, P.M. eds. DNA markers: protocols, applications and overviews. Gresshoff. 1998, New York. p. 1-13.
- **Karp A., Kresovich S., Bhat K., Ayad W., Hodgkin T.** Molecular tools in plant genetic resources conservation: a guide to the technologies. IPGRI Technical Bulletin no.2. International Plant Genetic Resources Institute, Rome Italy. 1997.
- **Kobayashi N., Horikoshi T., Katsuyama H., Handa T., Takayanagi K.** A simple and efficient DNA extraction method for plants, especially woody plants. 1998. Plant Tissue Cult Biotechnol 4 (2):76–80
- **Kummerow J., Kummerow A., Alvim P.** Root biomass in a mature cacao (*Theobroma cacao L.*) plantation. 1981, Theobroma 11(1): 77-85.
- **Lacadena J.** Genética. 3ª Edición. A.G.E.S.A. Madrid .1981
- **Lachenaud P, Paulin D, Ducamp M, Thevenin J.** Twenty years of agronomic evaluation of wild cocoa trees (*Theobroma cacao L.*) from French Guiana. 2007, Sci Hortic 113:313-321

- **Lachenaud P, Paulin D, Ducamp M, Thevenin J.** Twenty years of agronomic evaluation of wild cocoa trees (*Theobroma cacao L.*) from French Guiana. 2007, Sci Hortic 113:313-321
- **Lachenaud, P.** Genetic/Taxonomic Structuring of the *Theobroma cacao L.*, Species Fresh Hypotheses.1997, Ingenic Newsletter, N° 3. pp:10-11
- **Lanaud C.** (1986) Genetic studies of *Theobroma cacao L.* with the help of enzymatic markers. I: Genetic control and linkage of nine enzymatic markers. Cafe Cacao The 30: 259-270.
- **Lanteri S., Acquadro A., Quagliotti L., Portis E.** RAPD and AFLP assessment of genetic variation in a landrace of pepper (*Capsicum annum L.*), grown in North-West Italy. 2003, Genet. Resour. Crop.Evol. 50: 723-735
- **Legèndre L., Legèndre P.,** Ecologie Numérique. Vol. 1 and 2. Masson Editeur. In: Masson et Les Presses de l'université du Québec. 1979, Paris. pp 197-284.
- **León J.** Botánica de los Cultivos Tropicales. 2000, 3 ed. Costa Rica, San José, IICA. 678 p.
- **Lerceteau E., Robert T., Pétiard V., Crouzillat D.** Evaluation of the extent of genetic variability among *Theobroma cacao* accesions using RAPD and RFLP markers. 1997, Theor. Appl. Genet. 95(1-2): 10-19.
- **Linné C., Willdenow K., Friedrich H., Schwägrichen C.** Caroli a Linné Species plantarum : exhibentes plantas rite cognitatas, ad genera relatas, cum differentiis specificis, nominibus trivialibus, synonymis selectis, locis natalibus, secundum systema sexuale digestas. Berolini : Impensis G.C. Nauk, 1797-1830.
- **Loor R., et al.** Tracing the native ancestors of the modern *Theobroma cacao L.* population in Ecuador. 2009. Tree Genetics and Genomes Vol.5. Pp. 421-433. Springer-Verlag 2009.
- **López A., Ferreira H., Llamosas A., Romeu A.** Present status of cacao
- **Martín I.** Centro de Recursos Fitogenéticos (CRF) Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), 2001.

- **Martínez W.** Análisis estadístico en biología molecular: Uso y aplicación en poblaciones vegetales. En: Memorias Simposio Internacional de Estadística en Agricultura y Medio Ambiente. 1995, CIAT, Cali, Colombia. p. 152-170.
- **Martínez W.** Caracterización morfológica y molecular del Cacao Nacional Boliviano y de selecciones élites del Alto Beni, Bolivia. [tesis de Maestría]. CATIE Turrialba. Costa Rica. 2007
- **MINAG. 2000.** Boletines Estadísticos de la Oficina de Información Agraria en base a información de las Direcciones Regionales y Sub Regionales de Agricultura. Ministerio de Agricultura. PERÚ: Primer Informe Nacional sobre la Situación de los Recursos Zoogenéticos
- **MINAG. 2001.** Boletines Estadísticos de la Oficina de Información Agraria en base a información Direcciones Regionales y Sub Regionales de Agricultura.
- Ministerio de Agricultura.
- **Moreno Y., Melgarejo L., Hernández M., Quintero L., Vargas G.** Caracterización molecular de un banco de germoplasma del género *Theobroma* mediante la técnica RAPD. Revista Colombiana de Biotecnología. 2004; dic; 4(2): 15-24
- **Morris D.** Cocoa: how to grow and how to cure it. 1682, Jamaica pp 1-45.
- **Motamayor J., Lachneaud P., da Silva J., Looor R., Kuhn D., Brown J., Schnell R.** Geographic and genetic population differentiation of the Amazonian chocolate tree (*Theobroma cacao L.*). 2008; PLoS ONE 3: e3311.
- **Motamayor J., Risterucci A., Heath M., Lanaud C.** Cacao domestication II: progenitor germplasm of the Trinitario cacao cultivar. Nature. 2003; Feb; 91: 322–330
- **Motamayor J., Risterucci A., Heath M., Lanaud C.** Cacao domestication II: progenitor germplasm of the Trinitario cacao cultivar. 2003, Heredity 91:322–330

- **Motamayor J., Risterucci A., Lopez P., Ortiz C., Moreno A., Lanaud C.** Cacao domestication I: the origin of the cacao cultivated by the Mayas. *Nature*. 2002; May; 89: 380–386
- **Motilal L., Zhang D., Pathmanathan U., Mischke S., Pinney S., Meinhardt L.** Microsatellite fingerprinting in the International Cocoa Genebank, Trinidad: accession and plot homogeneity information for germplasm management. 2011, *Plant Genet. Resour.* 9: 430-438.
- **Mueller U., LaReesa W.** AFLP genotyping and fingerprinting. 1999, *REVIEWS - TREE*; vol. 14; no. 10; pp. 389-394.
- **Nei M.** 1973. Analysis of gene diversity in subdivided groups. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 70: 3321–3323.
- **Nei M.** Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. 1978 *Genetics* 89:583-590.
- **Nei M., Chesser R.** Estimation of fixation indices and gene diversities.1983, *Annals of Human Genetics* 47: 253–259.
- **Nei, M., Wen L.** Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, October 1979, vol. 76, no. 10, p. 5269-5273.
- **Ochse J., Soule M., Dijkman M., Wehlburg.C.** Cultivo y mejoramiento de plantas tropicales y subtropicales. 1974, Editorial Limusa. Primera ed. MX. 2 v. p. 912 – 956.
- **Ogata N. 2008.** Boletín bimestral de la Comisión Nacional para el Conocimiento y
- **Ogata N. Gomez-Pompa, Tabue K.** 2006. Chapter 3: The domestication and distribution of *Theobroma cacao L.* in the Neotropics. In: *Chocolate in Mesoamerica: A cultural history of cacao.* (Ed. by McNeil, C).University of press of Florida.
- **Padrón G., Manuel E., Romero J., Benavides A., Zamora J.,Peregrina S.** Efecto de la cáscara de cacao en la obtención de espumas de poliuretano para uso

hortícola. Propiedades físicas y de biodegradabilidad. Rev. Soc. Quím. Méx. 2004, 48, 156-164

- **Parra P, González M, Ortiz de Bertorelli L, Graziani de Fariñas L, Figueroa R.** Caracterización de los tipos de cacao criollo, trinitario y forastero de Cumboto, Aragua, mediante patrones electroforéticos de isoenzimas. 2002, Agron. Trop. 52(3):277-297.
- **Parra P., Ortiz B., L.; Graziani F., Figueroa R.** 2001. Relaciones de similitud establecidas mediante el análisis de isoenzimas de los grupos de cacao criollo, trinitario y forastero de la zona de Cumboto, región centro norte costera del estado Aragua, Venezuela. Agronomía Tropical Volumen 51(4). pp. 575-592.
- **Pejic L., Ajmone P., Morgante M., Kovumplik V., Castiglioni P., Taramino G., Motto M.** Comparative analysis of genetic similarity among maize inbred lines detected by RFLPs, RPADs, SSRs, and AFLPs. 1998, Theoretical and Applied Genetic 97, 1248-1255.
- **Pérez J.** Evaluación y caracterización de selecciones clonales de cacao (*Theobroma cacao L.*) del Programa de Mejoramiento del CATIE. [tesis de Maestría]. Turrialba, Costa Rica: CATIE; 2009
- **Perry M., Davey M., Power J., Lowe K., Bligh H., Roach P., Jones C.** DNA isolation and AFLP genetic fingerprinting of *Theobroma cacao (L.)*. (1998). Plant Mol. Biol. Rep. 16: 49-59
- **Pickersgill B.** Domestication of Plants in the Americas: Insights from Mendelian and Molecular Genetics. Oxford journals. 2007; VOL. 100: 925–940,
- **Population Genetic Analysis.POPGENE Version 1.32.**A Joint Project of Ag/For Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta and Center for International Forestry Research.
- **Posada J., M.; Pineda S., V.; Agudelo O.** El chocolate-un placer saludable. 2006, 2ed. Marquillas. Medellín, Colombia. 89 p.
- **Pound F.** The genetic constitution of cacao crops 1. Pp 9 -29 In Annual report of cacao Research 1931 – 1945. Imperial College of Tropical Agriculture Trinidad, TT.

- **Pound F.** Cacao and Witches broom disease (*Marasmius perniciosus*) of South America with notes on other species of *Theobroma*. Yuilles Printery. Port-of-Spain, Trinidad and Tobago. Reprinted 1982 In Arch. Cocoa Res. 1:20-27.
- **Queiroz V., Guimarães C., Anherth D., Schuster I., Daher T., Pereira M., Miranda V., Loguercio L., Barros E., Moreira M.** Identification of a major QTL in cocoa (*Theobroma cacao L.*) associated with resistance to witches' broom disease. 2003, Plant Breeding 122: 268-272.
- **Rice S., Browning C., Burke J., Nguyen L.** inventors Genetic Biosystems Inc, assignee. 1999, Membrane loader for gel electrophoresis. US patent 5 972 188. Oct 26.
- **Rohlf F.** NTSYS-pc. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System: Version 2.1. Applied Biostatistics, New York, 2000.
- **Romero C., Bonilla J., Santos E., Peralta E.** Identificación Varietal de 41 Plantas Seleccionadas de Cacao (*Theobroma cacao L.*) Provenientes de Cuatro Cultivares. Revista Tecnológica ESPOL – RTE. Diciembre, 2010, Vol. (23), 121-128.
- **Rout G., Sama L S., Nayak S., Rashmi M., Lenka P.** An alternative method of plant DNA extraction of cashew (*Anacardium occidentale L.*) for randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. 2002, Gartenbauwissenschaft 67(3):114-118.
- **Rusconi M., Conti A.** *Theobroma cacao L.*, the Food of the Gods: A scientific approach beyond myths and claims. 2010, Pharmacological Research 61(1):5-13.
- **Saitou N., Nei M.** The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. 1987, Mol. Biol. Evol., 4, 406–425.
- **Sanguinetti, C. et al.** (1994). Biotechniques.17:915-919.
- **Saunders J., Hemeida A., Mischke S.** USDA DNA fingerprinting programme for identification of *Theobroma Cacao* accessions. INGENIC, 2000; Oct; 108-114.

- **Saunders J., Pedroni M., Penrose L., Fist A.** AFLP DNA analysis of opium Poppy. 2001, Crop Science 41: number 5
- **Saunders, J., Mischke, S., Leamy, E.A. & Hemeida, A.A.** 2004. Selection of international molecular standards for DNA fingerprinting of *Theobroma cacao*. . Theoretical and Applied Genetics 110: 41-47.
- **Schnell R., Kuhn D., Brown J., Olano C., Phillips-Mora W., Amores F., Motamayor J.** Development of a marker assisted selection program for Cacao. The American Phytopathological Society. 2007; Dic; 97(12): 1664 – 1669
- **Schnell R., Olano C., Brown J., Meerow A., Cervantes-Martínez C.** Retrospective determination of the parental population of superior cacao (*Theobroma cacao L.*) seedlings and association of microsatellite alleles with productivity. (2005). J. Am. Soc. Hortic. Sci. 130(2): 181-190.
- **Schultes R.** Amazonian cultigens and their northward and westward migrations in pre-Columbian times. In: Stone D (ed) Pre-Columbian plant migration. 1984, Papers of the Peabody Museum of Archaeology and Ethnology. Vol 76: Mass.: Harvard University Press: Cambridge. pp 69–83.
- **Schumann K.** Sterculiaceae. In: Martius *Flora brasiliensis*. 1886, 12(3): 2-114.
- **Smith N.** The Amazon River Forest: a natural history of plants, animals, and people. Oxford University Press, New York. 1999
- **Sokal R., Sneath H.** Numerical taxonomy. The principles and practice of numerical classification. 1963. Freeman and company. San Francisco, E.U. 358 p.
- **Soria V.** Principals Variedades de cacao cultivadas en America Tropical. 1996, Turrialba Costa Rica 16(3): 261-166.
- **Sounigo O., Umaharan R., Christopher Y., Sankar A., Ramdahin S.** Assessing the genetic diversity in the International Cocoa Genebank, Trinidad (ICG,T) using isozyme electrophoresis and RAPD. 2005. Genetic Resources and Crop Evolution. Volumen 52. pp: 1111–1120.

- **Spooner D., Van Treuren R., De Vicente M.** Molecular markers for Genebank management. IPGRI Technical Bulletin No. 10. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy. 136 pp. 2005.
- **Takrama J., Cervantes-Martínez C., Philips-Mora W., Brown J., Motamayor J., Schnell R.** Determination of off-types in a cacao breeding program using microsatellites. 2005 INGENIC Newsl. 10: 2-7.
- **Toquica S., Rodríguez F., Martínez., Duke M., Tohme J.** Molecular Characterization by AFLP of Capsicum Germplasm from the Amazon Department in Colombia, Characterization by AFLP of Capsicum. 2003, Genetic Resources and Crop Evolution 50: 639-647.
- **USAID. 2007.** Informe de evaluación de plaguicidas y plan de acción para su uso más seguro (PERSUAP) Bogotá Colombia. 686 p.
- **Valadez E., Kahl G.** Huellas de ADN en genomas de plantas. 2000, Universidad Autónoma Chapingo. México.
- **Van Hintum Th.** Hierarchical approaches to the analysis of genetic diversity in crop plants. In: Core Collections of Plant Genetic Resources. 1995, IPGRI p 23-34.
- **Vázquez A., Molina F., Nuñez J., Salvador M.,** Potencial de los Marcadores Moleculares para el Rescate de Individuos de *Theobroma cacao L.* de Alta Calidad. 2012, BioTecnología, Vol. 16 No. 1
- **Vos P., Hogers R., et al.** AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. 1995, Nucleic Acids Res. 23(21):4407-4414.
- **Warburton M., Crossa J.** Data Analysis in the CIMMYT Applied Biotechnology Center. For Fingerprinting and Genetic Diversity Studies. 2002
- **Westman A., Kresovich S.** Use of molecular marker techniques for description of plant genetic variation. In: Callow, J.A., Ford-Lloyd, J.A. and Newbury, H.J (eds), Biotechnology and Plant Genetic Resources: Conservation and Use. 1997, pp. 9-48. CAB International, Oxford, UK.

- **Whitkus R., De la Cruz M., Mota-Bravo L.** Genetic diversity and relationships of cocoa (*Theobroma cacao L.*) in southern Mexico. 1998, Theor Appl Genet 96: 621–627
- **Whitkus R., De La Cruz M., Mota-Bravo I., Gómez-Pompa A.** Genetic diversity and relationships of cacao (*Theobroma cacao L.*) in southern Mexico. 1994, Theor. Appl. Genet. 96(1-2): 621-627.
- **Wilches A.** Descripción de algunas herramientas moleculares y sus aplicaciones. 2004. Universidad Rafael Landívar. Instituto De Agricultura, Recursos Naturales Y Ambiente. Serie técnica No. 15.
- **Witcombe J., Joshi A., Joshi K., Sthapit B.** (Farmer participatory crop improvement. In: Varietal selection and breeding methods and their impact on biodiversity. 1996, Exp Agric 32:445–460.
- **Wood G.,** Cocoa. 3ra edición. 1975. Longman Group Limited. Londres. 292 pp.
- **Yeh F., Yang R., Boyle T.** PopGen 1.0, 1999.
- **Zhang D, Arevalo E., Mischke S., Zuniga L., Barreto A., adriazola del águila J.** Genetic diversity and structure of managed and semi-natural populations of cocoa (*theobroma cacao*) in the Huallaga and Ucayali valleys of Peru. 2006 Annals of Botany.
- **Zhang D., Arevalo E., Motilal L., Baligar V., Bailey B., Zuniga; Cernades L., et al.** Dissecting genetic structure in farmer selections of *theobroma cacao* in the Peruvian amazon: implications for on farm conservation and rehabilitation. 2011. Tropical plant boil.
- **Zhang D., Boccara M., Motilal L., Mischke S., Johnson E., Butler D.** Molecular characterization of an earliest cacao (*Theobroma cacao L.*) collection from Upper Amazon using microsatellite DNA markers. Tree Genet.& Genomes. 2009; vol. 5: 595–607.
- **Zhang D., Boccara M., Motilal L., Butler D., Umaharan P., Mischke S., Meinhardt L.** Microsatellite variation and population structure in the ‘Refractario’ cacao of Ecuador. 2008, Conserv. Genet. 9: 327-337.

- **Zhang D., Mischke S., Goenaga R., Hemeida A. & Saunders J.** Accuracy and reliability of high-throughput microsatellite genotyping for cacao clone identification. 2006, Crop Sci. 46: 2084-2092.
- **Zhang J., McStewart J.** Economical and rapid method for extracting cotton genomic DNA. 2000, Journal of Cotton Science 4: 193-201.



ANEXOS.

Anexo N° 1: Datos de Pureza (A260/A280) y concentraciones de ADN (ng/μl) para las 50 accesiones de cacao; lecturas obtenidas del espectrofotómetro Thermo UV.

CODIGO MUESTRA	260 nm.	280 nm.	260 nm./280 nm.	ng/ul
ICT_1	0.018	0.014	1.3	90
ICT_2	0.018	0.019	0.9	90
ICT_3	0.013	0.012	1.1	65
ICT_4	0.01	0.008	1.3	50
ICT_5	0.023	0.019	1.2	115
ICT_6	0.01	0.009	1.1	50
ICT_7	0.018	0.016	1.1	90
ICT_8	0.009	0.09	0.1	45
ICT_9	0.017	0.015	1.1	85
ICT_10	0.012	0.012	1	60
ICT_11	0.01	0.009	1.1	50
ICT_12	0.013	0.012	1.1	65
ICT_13	0.018	0.016	1.1	90
ICT_14	0.018	0.016	1.1	90
ICT_15	0.012	0.009	1.3	60
ICT_16	0.024	0.014	1.7	120
ICT_17	0.018	0.014	1.3	90
ICT_18	0.017	0.013	1.3	85
ICT_19	0.013	0.012	1.1	65
ICT_20	0.011	0.01	1.1	55
ICT_21	0.037	0.024	1.5	185
ICT_22	0.051	0.04	1.3	255
ICT_23	0.012	0.011	1.1	60
ICT_24	0.01	0.009	1.1	50
ICT_25	0.011	0.009	1.2	55
ICT_26	0.023	0.021	1.1	115
ICT_27	0.01	0.008	1.3	50
ICT_28	0.038	0.029	1.3	190
ICT_29	0.022	0.016	1.4	110
ICT_30	0.01	0.007	1.4	50
ICT_31	0.01	0.01	1	50
ICT_32	0.048	0.039	1.2	240

(2^{da} parte)

CODIGO MUESTRA	260 nm.	280 nm.	260 nm./280 nm.	ng/ul
ICT_33	0.032	0.024	1.3	160
ICT_34	0.03	0.021	1.4	150
ICT_35	0.01	0.008	1.3	50
ICT_36	0.026	0.024	1.1	130
ICT_37	0.036	0.03	1.2	180
ICT_38	0.03	0.023	1.3	150
ICT_39	0.047	0.033	1.4	235
ICT_40	0.011	0.009	1.2	55
ICT_41	0.009	0.01	0.9	45
ICT_43	0.01	0.009	1.1	50
ICT_44	0.024	0.018	1.3	120
ICS_1	0.018	0.016	1.1	90
ICS_95	0.01	0.006	1.7	50
SCA_6	0.011	0.01	1.1	55
CCN_51	0.015	0.014	1.1	75
IMC_67	0.012	0.011	1.1	60
EET_400	0.02	0.018	1.1	100
UF613	0.013	0.011	1.2	65
UF_667	0.012	0.011	1.1	60
ICS_6	0.01	0.009	1.1	50
NUC_141	0.032	0.025	1.3	160
MAR_26	0.021	0.013	1.6	105
MAR_29	0.028	0.021	1.3	140
MARA_33	0.038	0.031	1.2	190
MAR_40	0.025	0.018	1.4	125
PAST_85	0.015	0.013	1.2	75
PAST_94	0.013	0.01	1.3	65
PAST_88	0.018	0.014	1.3	90
MOR_212	0.036	0.03	1.2	180
MOR_214	0.045	0.031	1.5	225
MOR_268	0.043	0.035	1.2	215
SAN_219	0.037	0.028	1.3	185
SAN_221	0.023	0.016	1.4	115
SAN_225	0.02	0.014	1.4	100
SAN_227	0.052	0.042	1.2	260
SAN_229	0.023	0.015	1.5	115
CH_277	0.052	0.034	1.5	260
CH_281	0.009	0.005	1.8	45

(3^a parte)

CODIGO MUESTRA	260 nm.	280 nm.	260 nm./280 nm.	ng/ul
CH_293	0.018	0.012	1.5	90
CH_296	0.025	0.018	1.4	125
NAP_330	0.017	0.013	1.3	85
NAP_332	0.029	0.021	1.4	145
NAP_333	0.022	0.018	1.2	110
NAP_336	0.035	0.024	1.5	175
TIG_305	0.03	0.018	1.7	150
TIG_310	0.029	0.018	1.6	145
TIG_311	0.027	0.018	1.5	135
TIG_312	0.029	0.019	1.5	145

Anexo N° 2: Contenido de reactivos utilizados en la aplicación de la técnica de AFLP (que no incluyo el kit). Buffer PCR 10X

Stock	Final	100 ml
Tris HCl 1M, Ph 8.3	100 mM	10 ml
KCl 1M	500 mM	50 ml
MgCl ₂ 1M	15m M	1.5 ml
H ₂ O agua molecular estéril		Completar 100 ml

Cloruro de magnesio

Stock	10 ml
MgCl ₂ · 6H ₂ O	0.10 gr
H ₂ O destilada	10 ml

Didexosinucleótido (dNTP)

Stock	1000 µl
dATP 100 Mm, 25µmol	50 µl
dTTP 100 Mm, 25µmol	50 µl
dCTP 100 Mm, 25µmol	50 µl
dGTP 100 Mm, 25µmol	50 µl
Agua molecular estéril	800 µl

Agarosa al 1,5%

Stock	Final	100 ml
Agarosa		1.5 gr
TBE 10X	1 X	90 ml

Acrilamida al 10%

Stock	Final	1 L
Urea	7 M	420 gr
Acrilamida - Bisacrilamida	10 %	100 gr
TBE 10X	1 X	50 ml
H ₂ O destilada		Completar 1000 ml

Buffer TBE 10X

Stock	1 L
Tris - base	108 gr
Ácido bórico	55 gr
EDTA 0.5M, pH 8.0	40 ml
H ₂ O destilada	Completar 1000 ml

Buffer de carga

Stock	100 ml
Azul de bromofenol 0.25%	0.25 gr
Sucrosa 40% w/v	40 gr
H ₂ O destilada	Completar a 100ml

Anexo N° 3: Datos Binarios (presencia: 1 ó ausencia: 0) de 135 loci (caracteres) para 80 accesiones de cacao del banco de germoplasma del Instituto de Cultivos Tropicales ICT. El código 2 es el asignado a los datos perdidos o “missing data”.



Anexo N° 4: Valores descriptivos calculados para cada locus con un porcentaje de datos

	ALELO	PRESENCIA	AUSENCIA	PERDIDOS	N° LOCI VERDADEROS	TOTAL	% PERDIDAS	Freq. genotípica P	Freq. genotípica Q	PIC= 1-F12-F02	PIC= 2fi(1-fi)	PIC PROMEDIO		
EcoRI-ACT + Msel-CAT	A1X1	28	52	0	80	80	0.0	0.35	0.65	0.46	0.46	0.10		
	A1X2	80	0	0	80	80	0.0	1.00	0.00	0.00	0.00			
	A1X3	17	63	0	80	80	0.0	0.21	0.79	0.33	0.33			
	A1X5	6	74	0	80	80	0.0	0.08	0.93	0.14	0.14			
	A1X6	75	4	1	79	80	1.3	0.95	0.05	0.10	0.10			
	A1X7	80	0	0	80	80	0.0	1.00	0.00	0.00	0.00			
	A1X8	78	2	0	80	80	0.0	0.98	0.03	0.05	0.05			
	A1X9	80	0	0	80	80	0.0	1.00	0.00	0.00	0.00			
	A1X11	79	0	1	79	80	1.3	1.00	0.00	0.00	0.00			
	A1X12	73	7	0	80	80	0.0	0.91	0.09	0.16	0.16			
	A1X13	79	1	0	80	80	0.0	0.99	0.01	0.02	0.02			
	A1X14	80	0	0	80	80	0.0	1.00	0.00	0.00	0.00			
	EcoRI-ACA + Msel-CAA	A2X1	80	0	0	80	80	0.0	1.00	0.00	0.00		0.00	0.22
		A2X2	73	7	0	80	80	0.0	0.91	0.09	0.16		0.16	
A2X3		11	69	0	80	80	0.0	0.14	0.86	0.24	0.24			
A2X4		80	0	0	80	80	0.0	1.00	0.00	0.00	0.00			
A2X5		76	4	0	80	80	0.0	0.95	0.05	0.10	0.10			
A2X6		80	0	0	80	80	0.0	1.00	0.00	0.00	0.00			
A2X7		38	41	1	79	80	1.3	0.48	0.52	0.50	0.50			
A2X8		5	74	1	79	80	1.3	0.06	0.94	0.12	0.12			
A2X9		76	4	0	80	80	0.0	0.95	0.05	0.10	0.10			
A2X10		73	7	0	80	80	0.0	0.91	0.09	0.16	0.16			
A2X11		78	2	0	80	80	0.0	0.98	0.03	0.05	0.05			
A2X12		39	41	0	80	80	0.0	0.49	0.51	0.50	0.50			
A2X13		17	63	0	80	80	0.0	0.21	0.79	0.33	0.33			
A2X14		76	4	0	80	80	0.0	0.95	0.05	0.10	0.10			
A2X15		33	47	0	80	80	0.0	0.41	0.59	0.48	0.48			
A2X16		45	35	0	80	80	0.0	0.56	0.44	0.49	0.49			
A2X17		68	12	0	80	80	0.0	0.85	0.15	0.26	0.26			
A2X18		68	12	0	80	80	0.0	0.85	0.15	0.26	0.26			
A2X19		60	20	0	80	80	0.0	0.75	0.25	0.38	0.38			

(2^{da} parte)

PRIMERS	ALELO	PRESENCIA	AUSENCIA	PERDIDOS	N° LOCI VERDADEROS	TOTAL	% PERDIDAS	Freq. genotípica P	Freq. genotípica Q	PIC= 1-F12-F02	PIC= 2fi(1-f1)	
EcoRI-ACA + Msel-CAT	A3X1	77	3	0	80	80	0.0	0.96	0.04	0.07	0.07	0.28
	A3X2	53	27	0	80	80	0.0	0.66	0.34	0.45	0.45	
	A3X3	40	40	0	80	80	0.0	0.50	0.50	0.50	0.50	
	A3X4	41	39	0	80	80	0.0	0.51	0.49	0.50	0.50	
	A3X5	79	1	0	80	80	0.0	0.99	0.01	0.02	0.02	
	A3X6	18	62	0	80	80	0.0	0.23	0.78	0.35	0.35	
	A3X7	79	0	1	79	80	1.3	1.00	0.00	0.00	0.00	
	A3X9	23	57	0	80	80	0.0	0.29	0.71	0.41	0.41	
	A3X10	32	47	1	79	80	1.3	0.41	0.59	0.48	0.48	
	A3X11	34	46	0	80	80	0.0	0.43	0.58	0.49	0.49	
	A3X12	80	0	0	80	80	0.0	1.00	0.00	0.00	0.00	
	A3X13	73	5	2	78	80	2.5	0.94	0.06	0.12	0.12	
	EcoRI-ACC + Msel-CTA	A4X1	41	39	0	80	80	0.0	0.51	0.49	0.50	
A4X2		62	17	1	79	80	1.3	0.78	0.22	0.34	0.34	
A4X3		80	0	0	80	80	0.0	1.00	0.00	0.00	0.00	
A4X4		71	9	0	80	80	0.0	0.89	0.11	0.20	0.20	
A4X5		1	79	0	80	80	0.0	0.01	0.99	0.02	0.02	
A4X6		71	9	0	80	80	0.0	0.89	0.11	0.20	0.20	
A4X7		3	77	0	80	80	0.0	0.04	0.96	0.07	0.07	
A4X8		79	1	0	80	80	0.0	0.99	0.01	0.02	0.02	
A4X9		80	0	0	80	80	0.0	1.00	0.00	0.00	0.00	
A4X10		78	2	0	80	80	0.0	0.98	0.03	0.05	0.05	
A4X11		80	0	0	80	80	0.0	1.00	0.00	0.00	0.00	
A4X12		65	15	0	80	80	0.0	0.81	0.19	0.30	0.30	
A4X13		44	36	0	80	80	0.0	0.55	0.45	0.50	0.50	
EcoRI-AAC + Msel-CAC	A5X1	45	32	3	77	80	3.8	0.58	0.42	0.49	0.49	0.17
	A5X2	64	16	0	80	80	0.0	0.80	0.20	0.32	0.32	
	A5X4	64	16	0	80	80	0.0	0.80	0.20	0.32	0.32	
	A5X5	80	0	0	80	80	0.0	1.00	0.00	0.00	0.00	
	A5X6	4	76	0	80	80	0.0	0.05	0.95	0.10	0.10	
	A5X7	80	0	0	80	80	0.0	1.00	0.00	0.00	0.00	
	A5X8	80	0	0	80	80	0.0	1.00	0.00	0.00	0.00	

(3^a parte)

PRIMERS	ALELO	PRESENCIA	AUSENCIA	PERDIDOS	N° LOCI VERDADERO S	TOTAL	% PERDIDAS	Freq. genotípica P	Freq. genotípica Q	PIC= 1-F12- F02	PIC= 2f1(1-f1)	
EcoRI-AAC + Msel-CTC	A6X1	4	76	0	80	80	0.0	0.05	0.95	0.10	0.10	0.13
	A6X2	80	0	0	80	80	0.0	1.00	0.00	0.00	0.00	
	A6X3	80	0	0	80	80	0.0	1.00	0.00	0.00	0.00	
	A6X4	77	2	1	79	80	1.3	0.97	0.03	0.05	0.05	
	A6X5	40	40	0	80	80	0.0	0.50	0.50	0.50	0.50	
	A6X6	80	0	0	80	80	0.0	1.00	0.00	0.00	0.00	
	A6X7	14	65	1	79	80	1.3	0.18	0.82	0.29	0.29	
	A6X8	79	1	0	80	80	0.0	0.99	0.01	0.02	0.02	
	A6X9	78	2	0	80	80	0.0	0.98	0.03	0.05	0.05	
	A6X10	79	1	0	80	80	0.0	0.99	0.01	0.02	0.02	
	A6X11	9	71	0	80	80	0.0	0.11	0.89	0.20	0.20	
	A6X12	33	47	0	80	80	0.0	0.41	0.59	0.48	0.48	
	A6X13	80	0	0	80	80	0.0	1.00	0.00	0.00	0.00	
	A6X14	8	70	2	78	80	2.5	0.10	0.90	0.18	0.18	
	A6X15	5	71	4	76	80	5.0	0.07	0.93	0.12	0.12	
	A6X17	71	7	2	78	80	2.5	0.91	0.09	0.16	0.16	
	A6X18	80	0	0	80	80	0.0	1.00	0.00	0.00	0.00	
	EcoRI-AAG + Msel-CTA	A7X1	80	0	0	80	80	0.0	1.00	0.00	0.00	
A7X2		77	3	0	80	80	0.0	0.96	0.04	0.07	0.07	
A7X6		77	0	3	77	80	3.8	1.00	0.00	0.00	0.00	
A7X7		76	2	2	78	80	2.5	0.97	0.03	0.05	0.05	
A7X8		8	72	0	80	80	0.0	0.10	0.90	0.18	0.18	
A7X9		79	1	0	80	80	0.0	0.99	0.01	0.02	0.02	
A7X10		80	0	0	80	80	0.0	1.00	0.00	0.00	0.00	
A7X11		67	13	0	80	80	0.0	0.84	0.16	0.27	0.27	
A7X12		67	13	0	80	80	0.0	0.84	0.16	0.27	0.27	
A7X13		75	5	0	80	80	0.0	0.94	0.06	0.12	0.12	
A7X14		76	4	0	80	80	0.0	0.95	0.05	0.10	0.10	
A7X15		18	62	0	80	80	0.0	0.23	0.78	0.35	0.35	
A7X16		79	1	0	80	80	0.0	0.99	0.01	0.02	0.02	
A7X17		1	79	0	80	80	0.0	0.01	0.99	0.02	0.02	
A7X18		72	7	1	79	80	1.3	0.91	0.09	0.16	0.16	
A7X19		76	4	0	80	80	0.0	0.95	0.05	0.10	0.10	
A7X20		46	33	1	79	80	1.3	0.58	0.42	0.49	0.49	
A7X21		78	2	0	80	80	0.0	0.98	0.03	0.05	0.05	
A7X22	80	0	0	80	80	0.0	1.00	0.00	0.00	0.00		

(4^a parte)

PRIMERS	ALELO	PRESENCIA	AUSENCIA	PERDIDOS	N° LOCI VERDADERO S	TOTAL	% PERDIDAS	Freq. genotípica P	Freq. genotípica Q	PIC= 1-F12- F02	PIC= 2f(1-f1)	
EcoRI-AGC + Msel-CTA	A9X1	80	0	0	80	80	0.0	1.00	0.00	0.00	0.00	0.10
	A9X2	80	0	0	80	80	0.0	1.00	0.00	0.00	0.00	
	A9X3	80	0	0	80	80	0.0	1.00	0.00	0.00	0.00	
	A9X4	33	47	0	80	80	0.0	0.41	0.59	0.48	0.48	
	A9X5	80	0	0	80	80	0.0	1.00	0.00	0.00	0.00	
	A9X6	80	0	0	80	80	0.0	1.00	0.00	0.00	0.00	
	A9X7	1	79	0	80	80	0.0	0.01	0.99	0.02	0.02	
	A9X8	80	0	0	80	80	0.0	1.00	0.00	0.00	0.00	
	A9X9	75	5	0	80	80	0.0	0.94	0.06	0.12	0.12	
	A9X10	72	7	1	79	80	1.3	0.91	0.09	0.16	0.16	
	A9X11	79	0	1	79	80	1.3	1.00	0.00	0.00	0.00	
	A9X12	15	64	1	79	80	1.3	0.19	0.81	0.31	0.31	
	A9X13	74	6	0	80	80	0.0	0.93	0.08	0.14	0.14	
	A9X14	1	79	0	80	80	0.0	0.01	0.99	0.02	0.02	
	A9X15	79	1	0	80	80	0.0	0.99	0.01	0.02	0.02	
	A9X16	74	6	0	80	80	0.0	0.93	0.08	0.14	0.14	
	A9X17	79	1	0	80	80	0.0	0.99	0.01	0.02	0.02	
	A9X18	73	7	0	80	80	0.0	0.91	0.09	0.16	0.16	
	A9X19	56	24	0	80	80	0.0	0.70	0.30	0.42	0.42	
	A9X20	71	9	0	80	80	0.0	0.89	0.11	0.20	0.20	
	A9X21	80	0	0	80	80	0.0	1.00	0.00	0.00	0.00	
	A9X22	80	0	0	80	80	0.0	1.00	0.00	0.00	0.00	
EcoRI-AGC + Msel-CAC	A14X1	18	62	0	80	80	0.0	0.23	0.78	0.35	0.35	0.12
	A14X2	80	0	0	80	80	0.0	1.00	0.00	0.00	0.00	
	A14X3	80	0	0	80	80	0.0	1.00	0.00	0.00	0.00	
	A14X4	6	74	0	80	80	0.0	0.08	0.93	0.14	0.14	
	A14X5	78	1	1	79	80	1.3	0.99	0.01	0.02	0.02	
	A14X6	69	10	1	79	80	1.3	0.87	0.13	0.22	0.22	
	A14X7	77	2	1	79	80	1.3	0.97	0.03	0.05	0.05	
	A14X8	1	79	0	80	80	0.0	0.01	0.99	0.02	0.02	
	A14X9	79	1	0	80	80	0.0	0.99	0.01	0.02	0.02	
	A14X10	62	18	0	80	80	0.0	0.78	0.23	0.35	0.35	
	A14X11	80	0	0	80	80	0.0	1.00	0.00	0.00	0.00	
	A14X12	73	6	1	79	80	1.3	0.92	0.08	0.14	0.14	
	A14X13	61	16	3	77	80	3.8	0.79	0.21	0.33	0.33	
	A14X14	80	0	0	80	80	0.0	1.00	0.00	0.00	0.00	

Anexo N° 5: Matriz de similitud construida usando el coeficiente de Jaccard, comparación entre las 80 accesiones de *Theobroma cacao L.*

