



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS TABASCO

PROGRAMA PRODUCCIÓN AGROALIMENTARIA EN EL TRÓPICO

**CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE
GENOTIPOS DE CACAO (*Theobroma cacao* L.) EN PLANTACIONES
DE TABASCO, MÉXICO**

MIGUEL ÁNGEL RAMÍREZ GUILLERMO

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

H. CÁRDENAS, TABASCO, MÉXICO

2014

La presente tesis, titulada: **Caracterización morfológica y molecular de genotipos de cacao (*Theobroma cacao* L.) en plantaciones de Tabasco, México**, realizada por el alumno: **Miguel Angel Ramírez Guillermo**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS

EN PRODUCCIÓN AGROALIMENTARIA EN EL TRÓPICO

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO:



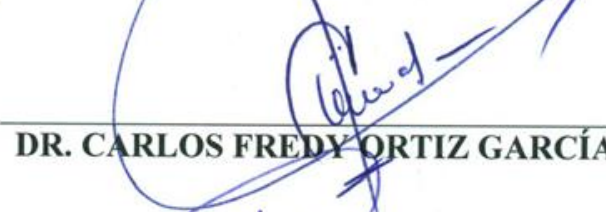
DRA. LUZ DEL CARMEN LAGUNES ESPINOZA

ASESOR:



Ph. D. OSMAN A. GUTIERREZ

ASESOR:



DR. CARLOS FREDY ORTIZ GARCÍA

ASESOR:



DR. ROBERTO DE LA ROSA SANTAMARÍA

H. CÁRDENAS, TABASCO A 8 DE DICIEMBRE DE 2014

DEDICATORIA

A mis padres Félix (q.e.p.d.) y María Gloria.

A mis hermanos.

A mis sobrinos.

AGRADECIMIENTOS

Al pueblo contribuyente de México, quienes a través de sus aportaciones hacen posible que instituciones como el CONACYT brinden la oportunidad de financiamiento para estudios de posgrado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca nacional para realizar mis estudios en el Colegio de Postgraduados *Campus* Tabasco y la beca mixta para la estancia de investigación en el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos-Servicio de Investigación Agrícola (USDA-ARS) de Miami, Florida.

Al Colegio de Postgraduados *Campus* Tabasco, por haberme brindado la oportunidad y permitirme la realización de mis estudios de maestría.

Al Instituto Nacional de Investigación Forestales, Agrícolas y Pecuarias, por brindarme la oportunidad de ser becario e incursionar en su programa de capacitación del personal investigador.

Al USDA-ARS de los Estados Unidos de Norteamérica, por las facilidades otorgadas en la realización de la estancia, en el Laboratorio de Biología Molecular para realizar parte de mi investigación de posgrado.

A la Dra. Luz del Carmen Lagunes Espinoza, Consejero Principal por su valioso entusiasmo, apoyo, tiempo, orientación, colaboración y revisión crítica del manuscrito del presente trabajo de investigación.

Al Ph. D. Osman A. Gutierrez, Asesor Externo (USDA-ARS), por su entusiasmo, tiempo y apoyo brindado a esta investigación; por conducir las actividades de la estancia y sus valiosas aportaciones críticas al manuscrito.

Al Dr. Carlos Fredy Ortiz García y Dr. Roberto de la Rosa Santamaría, Asesores Internos, por sus valiosas sugerencias y aportaciones en la revisión crítica del manuscrito.

A los técnicos e investigadores del USDA/ARS de Miami Fl.: Cecile T. Olano, Kathleen Cariaga Wilber Quintanilla, Michael Wintersten, Ph. D. Tomas Ayala Silva, Ph. D. Donald S. Livingstone, por sus apoyos y sugerencias en las actividades de la etapa de laboratorio.

A la Dra. Dayana Salas, por su valioso apoyo en el análisis genético de los datos.

Al Ph. D. Isidro E. Suárez Padrón, de la Universidad de Córdoba, Colombia, por la revisión y aportaciones al manuscrito.

Al MC. Procopio Alejandro López Andrade, del programa cacao en el INIFAP-Tabasco por su sugerencias tan valiosas y compartir sus conocimientos en la realización del presente trabajo.

Al Sr. Román García Ricardez, por su valioso apoyo y la confianza que me brindó.

A los productores de cacao del estado de Tabasco, a los encargados de los Banco de Germoplasma de cacao del INIFAP-Tabasco, del Colegio de Postgraduados Campus Tabasco, de la Ex Finca el Danubio/UJAT-DAMC y a la Finca Los Pinos-SEDAFOP, que de una u otra forma colaboraron en el presente trabajo, brindándome la oportunidad de ingresar a sus plantaciones y coleccionar las muestras requeridas para el estudio.

A Stephanie Diaz, del Miami DADE College, North Campus, por su apoyo en la extracción del ADN de cacao en el Laboratorio del USDA.

A Pedro Jesús Ruiz, por su valiosa colaboración en la extracción de ADN de cacao en el Laboratorio del CP Campus Tabasco.

A Luz del Carmen Calderón, Antonio López, Joel Ramírez, Jesús Francisco Ramírez, Celedonio Hernández y Jesús Zapata, por su colaboración en las actividades de campo.

A mis amigos y compañeros, personal del INIFAP y CP Campus Tabasco, Gracias.

“El medio el verdadero conocimiento de lo que existe, quien me hizo conocer la estructura del mundo y las propiedades de los elementos, el principio, el fin y la mitad de los tiempos, la sucesión de los días y las estaciones; el avance del año y las posiciones de los astros; la naturaleza de las fieras, el poder de los espíritus y los pensamientos de los hombres, las variedades de las plantas y las propiedades de las raíces”. Sabiduría 7, 17-20.

El hombre de cacao y maíz

Yo también bebo cacao,

me refresca,

y corre por mis venas purificando mi sangre,

me revitaliza y me da placer.

Hágase la mezcla del cacao con el maíz, ¡tengo sed y hambre!,

la piedra molera el maíz que renovara mi carne,

del comal y el cacao saldrá el perfume sagrado que embriagará de placer a mi alma.

El cacao será la esencia misma de mi vida; mi sangre.

La cal recubrirá mis huesos que me hará perpetuo como una piedra,

tal vez no venceré al tiempo,

pero lo miraré pasar por un largo rato.

Gracias al cacao y el maíz:

porque estoy hecho de ellos.

Mazateupa, Nacajuca a 11 de junio 2014.

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE GENOTIPOS DE CACAO (*Theobroma cacao* L.) EN PLANTACIONES DE TABASCO, MÉXICO

MIGUEL ÁNGEL RAMÍREZ GUILLERMO, M. C.

COLEGIO DE POSTGRADUADOS, 2014

RESUMEN

El estado de Tabasco, México concentra la mayor superficie cultivada de *Theobroma cacao* L. Entre los factores que limitan su producción están principalmente las enfermedades como *Moniliophthora roreri* y el escaso conocimiento de la diversidad genética existente para programas de mejoramiento. El conocimiento de esta diversidad contribuirá a la conservación de cacao y utilización en programas de mejoramiento. El objetivo fue determinar la diversidad morfológica y genética de cacao existente en plantaciones (PL) y bancos de germoplasma (BGC) de Tabasco. En 33 PL se identificaron 170 morfotipos los que se describieron morfológicamente con 10 características cualitativas y 18 cuantitativas del fruto y la semilla. Para estimar la diversidad genética se utilizaron 19 microsatélites (SSR) en 338 muestras foliares de PL y 110 de BGC. Los resultados demuestran que la variación morfológica en PL y BGC es amplia. Los rangos de variación para peso y longitud de mazorca fueron mayores en PL que en BGC. En PL la forma dominante del fruto fue cundeamor (26.8%); en los BGC angoleta (clones 44.4%, híbridos 67.7 % y criollo 36.3%). Rendimiento por planta, superiores a 1 kg de grano seco fueron observados en PL. Mayor polimorfismo fue revelado en BGC (132 alelos con 6.95 alelos/locus) que en PL (76 alelos con un promedio de 4 alelos/locus) con los 19 SSR. Tres nuevos alelos a con los mTcCIR6, 33 y 37 fueron identificados en PL. El nivel de heterocigosidad en PL ($H_o=0.473$) es menor que en BGC ($H_o=0.729$), y también el nivel de diversidad genética (PL $H_e=0.386$ y BGC $H_e=0.661$). El ACP separó al cacao de PL de los 10 grupos genéticos de cacao. La población de cacao de Tabasco es morfológica y genéticamente diversa y diferente, por lo que requiere ser conservada para su uso en la mejora genética del cacao de Tabasco.

Palabras clave: *Theobroma cacao*, diversidad, morfológica, genética, plantaciones, banco de germoplasma, Tabasco.

**MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF CACAO
(*Theobroma cacao* L.) GENOTYPES OF LOCAL FARMERS FROM TABASCO,
MEXICO**

MIGUEL ÁNGEL RAMÍREZ GUILLERMO, M. C.

COLEGIO DE POSTGRADUADOS, 2014

ABSTRACT

The state of Tabasco concentrates the major cultivated area of cacao (*Theobroma cacao* L.) in México. Among the factors limiting production are primarily diseases like *Moniliophthora roreri* and limited knowledge of the genetic diversity for breeding programs. Knowledge of this diversity will contribute to the conservation of cacao and use in breeding programs. The objective was to determine the morphological and genetic diversity of existing cocoa local farmers (PL) and genebanks (BGC) of Tabasco. 170 samples were assessed in 33 PL to describe 10 qualitative and 18 quantitative morphological traits of cacao pods and beans. 19 microsatellite markers were employed to fingerprint 338 local farmer trees and 110 germplasm accessions. The results show that the morphological variation in PL and BGC is wide. The ranges of variation for weight and pod length were higher in PL than BCG. In PL the dominant form of fruit was cundeamor (26.8%); in BGC angoleta (clones 44.4%, 67.7% and Creole hybrids 36.3%). Yield per plant, more than 1 kg of dry beans were observed in PL. 76 alleles were revealed in PL (average of 4 alleles per locus) and 132 alleles in BCG (average of 6.95 alleles per locus) with 19 SSR. Three new alleles with mTcCIR6, 33 and 37 were identified in PL. The level of heterozygosity in PL ($H_o = 0.473$) is lower than in BGC ($H_o = 0.729$), and the level of genetic diversity ($H_e = 0.386$ and PL BGC $H_e = 0.661$). The ACP separated cocoa PL from the 10 genetic groups of cacao. The cacao from local farmers of Tabasco is morphologically and genetically diverse and different, so it needs to be preserved for use in genetic improvement of cacao Tabasco.

Key words: *Theobroma cacao*, diversity, morphology, genetic, local farmer trees, germplasm collection, Tabasco.

CONTENIDO

DEDICATORIA	III
AGRADECIMIENTOS	IV
RESUMEN	VII
ABSTRACT.....	VIII
CONTENIDO	IX
INDICE DE CUADROS.....	XI
INDICE DE FIGURAS.....	XII
INDICE DE ANEXOS	XIII
INTRODUCCION GENERAL	1
Objetivo general.....	7
Objetivos específicos	7
Hipótesis	7
Estructura de la tesis	8
LITERATURA CITADA	9
1. CAPÍTULO I	15
1.1. RESUMEN.....	15
1.2. ABSTRACT.....	16
1.3. INTRODUCCIÓN	17
1.4. MATERIALES Y METODOS	21
1.4.1. Sitio de estudio.....	21
1.4.2. Selección y colecta de material vegetal	23
1.4.3. Análisis estadístico.....	25
1.5. RESULTADOS	26
1.5.1. Características cualitativas de la mazorca.....	26
1.5.2. Características cuantitativas.....	29
1.5.3. Análisis de componentes principales	32
1.6. DISCUSION.....	36
1.7. LITERATURA CITADA.....	43
2. CAPÍTULO II.....	50
2.1. RESUMEN.....	50
2.2. ABSTRACT.....	51

2.3.	INTRODUCCIÓN	52
2.3.1.	Diversidad genética de <i>T. cacao</i>	53
2.3.2.	Caracterización molecular	57
2.4.	MATERIALES Y METODOS	60
2.4.1.	Material vegetal	60
2.4.2.	Análisis molecular	62
2.4.3.	Extracción de ADN genómico	63
2.4.4.	Cuantificación del ADN	64
2.4.5.	Microsatélites utilizados	65
2.4.6.	Reacción de amplificación por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)	67
2.4.7.	Electroforesis capilar	67
2.4.8.	Análisis de la diversidad genética y estructura de la población.....	68
2.5.	RESULTADOS	70
2.5.1.	Diversidad genética.....	70
2.5.2.	Análisis de coordenadas principales (PCA).....	73
2.5.3.	Análisis de Varianza Molecular (AMOVA).....	76
2.6.	DISCUSION.....	78
2.7.	LITERATURA CITADA.....	83
	CONCLUSIONES GENERALES	96
	RECOMENDACIONES	98
	ANEXOS	99
1.	Anexo Capitulo I.....	99
2.	Anexo Capitulo II	115

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1.1. Accesiones colectadas en plantaciones de Tabasco, Hacienda Las Conchas, Chiapas y de los bancos de germoplasma de Tabasco, México, usadas en el estudio.....	24
Cuadro 1.2. Descriptores morfológicos cuantitativos y cualitativos utilizados en la caracterización de mazorcas y semillas de las accesiones colectadas.	25
Cuadro 1.3. Frecuencia (%) de 10 características cualitativas de mazorca y semilla en 170 muestras de cacao provenientes de plantaciones y bancos de germoplasma de Tabasco, México.	27
Cuadro 1.4. Rangos de variación de características cuantitativas de la mazorca y la semilla de 170 muestras evaluadas en Tabasco, México	29
Cuadro 1.5. Rango de variación de indicadores de producción de los morfotipos colectados en plantaciones y bancos de germoplasma de Tabasco, México.	31
Cuadro 1.6. Variación explicada por cuatro componentes principales para características del fruto y semilla en todas las muestras incluidas en el estudio.	32
Cuadro 2.1. Localidades y accesiones muestreadas para el estudio.	63
Cuadro 2.2. Características de los SSR, iniciadores utilizados en el estudio.	66
Cuadro 2.3. Descripción de 19 SSR utilizados en muestras de <i>Theobroma cacao</i> L de plantaciones y bancos de germoplasmas en Tabasco, México.	70
Cuadro 2.4. Parámetros de diversidad dentro de cada población en estudio.	73
Cuadro 2.5. AMOVA en las poblaciones de estudio.	76
Cuadro 2.6. Coeficiente endogámico entre población y subpoblaciones.	76
Cuadro 2.7. AMOVA correspondientes a las plantaciones de Tabasco.	77
Cuadro 2.8. Coeficiente endogámico en las plantaciones de Tabasco.	77

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Localización de sitios muestreados en plantaciones de Tabasco y Chiapas, México.	22
Figura 1.2. Diversidad de formas dominantes de mazorca observadas en las plantaciones de Tabasco y bancos de germoplasma, utilizadas en este estudio. a: angoleta; b: amelonado; c: cundeamor; d: calabacillo, e: elíptico; f: criollo; g: pentágona; h: oblongo, i: abovado; j: ovado. Fotos: M.A. Ramírez G. y (f) P.A. López A.....	26
Figura 1.3. Diversidad morfológica revelada por el análisis de componentes principales de 170 accesiones de plantaciones y bancos de germoplasma de Tabasco, México.	34
Figura 1.4. Distribución espacial de las accesiones Clones, Criollos e Híbridos de los bancos de germoplasma y plantaciones, revelada por el análisis de componentes principales, basada en características morfológica del fruto y semilla de cacao.....	35
Figura 2.1. Localización de los sitios de muestreo foliar en plantaciones de cacao de Tabasco, México	61
Figura 2.2. Diversidad genética de <i>Theobroma cacao</i> L. de las plantaciones y bancos de germoplasmas de Tabasco y Chiapas.....	75

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1.1. Localidades del estado de Tabasco, Chiapas y ubicación de Bancos de germoplasma en el estudio.	99
Anexo 1.2. Caracterización morfológica de mazorcas y semilla de 170 muestras: variables cualitativas	100
Anexo 1.3. Caracterización morfológica de mazorcas y semillas de 170 muestras: variables cuantitativas	105
Anexo 1.4. Parámetros productivos de las muestras identificadas en plantaciones y BGC	111
Anexo 2.1. Acciones colectadas en Tabasco, México con código del LGFT del USDA-ARS de Miami, FL., USA.	115
Anexo 2.2. Guía para coleccionar, empacar y enviar hojas de cacao <i>Theobroma cacao</i> L. al laboratorio del USDA-ARS de Miami, Florida.	118
Anexo 2.3. Protocolo de liofilización de hojas de <i>T. cacao</i> de acuerdo al USAD-ARS, Miami, Fl.	120
Anexo 2.4. Protocolo de extracción de ADN en con el kit FastDNA [®] Spin, modificado por el Laboratorio de Genética de Frutas Tropicales del USDA-ARS Miami, Fl., en septiembre del 2011.	121
Anexo 2.5. Protocolo de extracción de ADN en con el kit PlantDNAazol [®] (Invitrogen) en el Laboratorio de Fisiología Vegetal del Colegio de Postgraduados Campus Tabasco, Cárdenas, Tabasco. (Lagunes-Espinoza, L. C., Ramírez-Guillermo, M. A. y Ruiz-Gil, P. J).....	123

INTRODUCCION GENERAL

Cacao (*Theobroma cacao* L.) es un árbol neotropical perenne originario de los bosques húmedos del Amazonas. Pertenece a la familia Malvaceae *sensu lato* (Alverson *et al.*, 1999). Se desarrolla desde los 20° N y 20° S, en altitudes de 0 hasta 1250 msnm con temperaturas de 20°C a 30°C y lluvias de 2000 hasta 8000 mm anuales.

La mayor diversidad genética de la especie *Theobroma* se encuentra en el alto Amazonas (Motamayor *et al.*, 2008) desde donde se ha distribuido a Centroamérica y México (Thomas *et al.*, 2012). Actualmente se conocen 22 especies del género *Theobroma*, tres grupos morfológicos: criollo, forastero y trinitario (híbridos de criollo x forastero) (Cuatrecasas, 1964) y 10 grupos genéticos (Motamayor *et al.*, 2008). *T. cacao* es la única especie de importancia comercial, es diploide ($2n=2x=20$) con un genoma de 411-494 Mb (Argout *et al.*, 2011; Motamayor *et al.*, 2013). Presenta un modo de reproducción alógama, con polinización cruzada superior al 95%.

Mesoamérica ha sido identificada como el centro de domesticación y cultivo del cacao (Coe y Coe, 2013). Evidencias arqueológicas en México indican que el uso del cacao por las culturas Mokayas y Olmecas se remonta a 3,800 años (1800-1000 a C.). Estas culturas son consideradas como las que domesticaron al cacao (Powis *et al.*, 2011). Las primeras plantaciones fueron establecidas por los Mayas Yucatecos bajo un sofisticado agroecosistema, mientras que los *putunes* chontales de la Chontalpa, Tabasco, extendieron su distribución (Gómez-Pompa *et al.*, 1990; Díaz, 2006).

Las características botánicas del árbol de cacao comprenden una raíz principal pivotante, alcanzando los 2 m de longitud y raíces secundarias hasta 25 cm. El tronco crece verticalmente (ortotrópico), hasta formar el primer verticilo entre los 80 cm de altura, originando de 3 a 5 ramas que forman la horqueta, las cuales crecen de manera lateral (plagiotrópicas). El árbol adulto puede llegar hasta los 20 m de altura.

En las hojas del tronco, el pecíolo es largo con pulvínulo bien marcado, y en las ramas es pequeño con pulvínulo menos pronunciado. El tamaño de las hojas es variable, el ambiente influye en su desarrollo, a menos luz la hoja es más grande; y estas pueden ser pigmentadas o no.

La floración es cauliflora, se observa principalmente en la base de las hojas y el tronco. Las flores están agrupadas formando los cojinetes. Estas son pequeñas de 1 a 2 cm de diámetro, es hermafrodita, actinomorfa, pentámera, de ovario súpero, androceo formado por 10 filamentos, 5 estambres fértiles y 5 estaminoides infértiles que se encuentran alrededor del pistilo. Los pétalos están compuestos por tres partes: la concha, el ribete y la lígula. El pistilo por un ovario súpero constituido por la fusión de cinco lóculos que contienen hasta 15 óvulos fecundados: su fórmula es $S5, P5, E5 + 5, \underline{G} (5)$.

El fruto es una baya protegida por el pericarpio, indehiscente. Su desarrollo requiere de un periodo de 150-210 días, dependiendo del origen genético y del clima. En su interior se encuentran las semillas ordenadas en hileras alrededor de un eje central llamado placenta, y estas se encuentran cubiertas por una pulpa mucilaginoso. El tamaño y forma de la semilla es variable, ya que es influenciado por el ambiente. El color del cotiledón es asociado al tipo genético, variando de blanco (tipo criollo) hasta el bien pigmentado (tipo forastero). La germinación de la semilla es de forma epigea ocurriendo en tres a siete días después de su siembra (Enríquez, 1985; Braudeau, 1970).

La clasificación taxonómica de acuerdo al USDA-ARS (2014) es la siguiente:

Reino: Plantae

Subreino: Tracheobionta

Super división: Spermatophyta

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Dilleniidae

Orden: Malvales

Suborden: Malvina

Familia: Sterculiaceae

Género: *Theobroma*

Especie: *Theobroma cacao* L.

Con dos subespecies

Cacao Criollo: *Theobroma cacao* L. ssp. *cacao*

Cacao Forastero, *Theobroma cacao* L. ssp. *sphaerocarpum* (Chevalier) Cuatr.

A nivel mundial, el continente africano aporta el 72% de la producción de cacao, el americano el 15%, el asiático y Oceanía el 13% (ICCO, 2013). México ocupó el 13° lugar en producción a nivel mundial, con un volumen de producción de 27, 844.12 t cosechadas en 61,319.10 ha durante el ciclo 2012-2013 (SIAP, 2014a).

En México, Tabasco es el estado que cuenta con la mayor superficie cultivada de cacao y el que aporta la mayor producción. Actualmente la superficie cultivada es de 40,782.70 ha donde se produjeron 18, 550.64 t valoradas en \$ 708, 477.07 pesos en el ciclo 2012-2013. El rendimiento promedio por unidad de producción es de 0.45 t ha⁻¹ y cerca de 31, 139 familias dependen del cultivo (SIAP, 2014b). Esta superficie cultivada y rendimiento ha variado. En 1984 la superficie cultivada de cacao en Tabasco ascendía a 41,113 ha, en donde se producían 30,409 t, lo que da un rendimiento promedio de 0.73 t ha⁻¹ (Alonso, 1984). En ese año los tipos de cacao presentes eran amelonado (70%), calabacillo (26%) y criollo (4%) y el 98% de las plantaciones fueron propagadas por semilla

Entre las causas que han reducido los rendimientos de cacao, se encuentra la presencia de enfermedades del fruto. Entre las principales en Latinoamérica están la mazorca negra (*Phytophthora palmivora*), la moniliasis (*Moniliophthora roreri* (Cif. & Par.) Evans *et al.*) y la escoba de bruja (*Moniliophthora perniciosa* (Stahel) Aime & Phillips-Mora) ya que causan pérdidas superiores al 80% en la producción (Phillips-Mora y Galindo, 1989; Griffith *et al.*, 2003, Phillips *et al.*, 2006).

En Tabasco, *Moniliophthora roreri* y *Phytophthora capsici* son los patógenos que más han afectado la producción de cacao (López, 1993; Ortiz, 1996; Phillips-Mora *et al.*, 2006).

Parte de la diversidad genética de cacao presente en Tabasco, se conserva en bancos de germoplasma de instituciones gubernamentales. El principal es el del Campo Experimental Huimanguillo del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Este se encuentra enriquecido con materiales nacionales e internacionales de diferentes morfotipos donados del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE) de Costa Rica (López *et al.*, 1996), y algunas accesiones locales. Esta colección ha sido parcialmente caracterizada para conocer su potencial de uso en programas de mejoramiento.

Sin embargo para la mejora genética del cacao en Tabasco, se requiere caracterizar de manera sistemática el fenotipo y el genotipo, y evaluar el valor agronómico de cada colecta. La caracterización del fenotipo y del genotipo consiste en determinar la variación existente usando características morfológicas y a través de marcadores moleculares. El interés en estos últimos es que no son afectados por el ambiente.

La evaluación del valor agronómico consiste en la descripción de la variación en términos de atributos de importancia agronómica, los cuales tienen influencia ambiental (Phillips-Mora *et al.*, 2012).

A nivel morfológico se han logrado diferenciar clones de cacao, compararlos con otros materiales de interés y corroborar su identidad morfológica; esta caracterización es fácil de realizar y no costosa (Johnson *et al.*, 2007; Phillips-Mora *et al.*, 2012). Con ella se ha logrado identificar variaciones entre características morfológicas, las cuales incluyen el rendimiento a nivel de poblaciones de *Theobroma* (Marcano *et al.*, 2009). Se ha observado que el número y peso de semillas por fruto son caracteres de importancia agronómica (Cilas *et al.*, 2010) e indicadores para seleccionar árboles de alta productividad (Kuppers, 1953).

Asimismo, utilizando características morfológicas se ha logrado diferenciar al cacao criollo de los forasteros y trinitarios (Bekele *et al.*, 2006). Específicamente, las características de la flor han permitido distinguir genotipos nativos de cacao de Guyana de los trinitarios, y de los forasteros amelonados del Amazonas (Lachenaud *et al.*, 1999). El color del cotiledón también presenta la

característica discriminante, ya ha permitido diferenciar los genotipos criollos de los genotipos forasteros (Ciferri y Ciferri, 1957).

La caracterización molecular ha sido empleada para complementar la información morfológica, debido a que permite corroborar y determinar el grupo genético al cual pertenece el morfotipo (Phillips-Mora *et al.*, 2012). Los marcadores moleculares son importantes para la detección y exploración de polimorfismo del ADN. Entre ellos los microsatélites o SSR (Simple Sequence Repeat) son secciones de ADN, en repeticiones de tándem de mono, di, tri, tetra o penta unidades de nucleótidos, que permiten distinguir entre genotipos estrechamente relacionados. Presentan naturaleza codominante. Debido a que estas secuencias detectadas por los microsatélites presentan un alto grado de variabilidad son útiles para estudios de diversidad genética, identificación de variedades e ideales para el mapeo de genes (Semagn *et al.*, 2006; Johnson *et al.*, 2009; Azofeifa, 2006; Kumar *et al.*, 2009).

En *T. cacao* los microsatélites revelan polimorfismos entre especies del mismo género (Lanaud *et al.*, 1999). Para estudios genéticos a gran escala y para la integración en programas de mejoramiento de cacao más de 400 SSR han sido desarrollados (Saunders *et al.*, 2004; Motamayor *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2009; Argoud *et al.*, 2011; Allegre *et al.*, 2011). Quince de ellos se utilizan de manera rutinaria en cacao para determinar la composición alélica y diversidad genética de cultivares en y dentro de poblaciones (Zhang *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2012; Boza *et al.*, 2013; Trognitz *et al.*, 2011).

Microsatélites propuestos por Lanaud *et al.* (1999) han sido utilizados para la caracterización molecular de seis clones resistentes a *M. royeri* (Phillips-Mora *et al.* 2012), para determinar la diversidad genética de plantaciones de cacao en Camerún (Efombagn *et al.*, 2008), para estimar diferencias entre plantaciones de híbridos de grupos genéticos de forasteros alto y bajo amazónicos y trinitarios (Pokou *et al.*, 2009), para investigar acerca de los ancestros del cacao de Java que es de importancia para el mejoramiento genético (Susilo *et al.*, 2011), sobre el origen del cacao de Ecuador (Loor *et al.*, 2009), la diversidad genética del cacao en África occidental (Aikpokpodion *et al.*, 2009), y el nivel de heterocigosidad de una población segregante de clones del CEPLAC-Brasil (Yamada *et al.*, 2008).

Con la creación de poblaciones segregantes y el desarrollo de mapas genéticos de cacao (Argoud *et al.*, 2011; Allegre *et al.*, 2011) se han identificado QTLs asociados con el rendimiento (Crouzillat *et al.*, 2000), el peso de la semilla y del fruto (Yin *et al.*, 2004; Marcano *et al.*, 2007). Debido al impacto de las enfermedades en el cultivo, se han desarrollado programas de selección asistida por marcadores moleculares para identificar regiones del genoma asociadas con características de resistencia a enfermedades (Schnell *et al.*, 2007).

En México, el INIFAP en Tabasco y Chiapas han implementado el Programa Nacional de Mejoramiento Genético de cacao para obtener clones de alta productividad, excelente calidad del grano y resistente a enfermedades de importancia económica (mazorca negra y moniliasis). De las accesiones de los bancos de germoplasma solo algunas de ellas se han caracterizado morfológicamente (López, 1995; López *et al.*, 1996; López *et al.*, 2013b). El mismo caso es para los estudios de caracterización morfológica en plantaciones comerciales de productores de ambos estados (Avendaño-Arrazate *et al.*, 2013; López *et al.*, 2013a). A nivel molecular, no se han realizado caracterizaciones extensas a nivel de plantaciones o de bancos de germoplasma para conocer la diversidad genética del cacao de Tabasco.

Hasta hoy, lo estudiado en México es el cacao criollo. De la Cruz *et al.* (1995) afirmaron que las poblaciones de cacao criollo de Yucatán y de La Selva Lacandona presentaban baja similaridad a los criollos de Sudamérica. Whitkus *et al.* (1998) mostraron que el cacao criollo de Yucatán y de Chiapas eran genéticamente diferente entre ellos, pero convergentes con los criollos de Sudamérica. Más tarde Motamayor *et al.* (2000) sugieren que de una reducida población de antiguos criollos se originaron las poblaciones actuales, ya que al estudiar las poblaciones de criollos antiguos de la Selva Lacandona en Chiapas, México, observaron que estas eran altamente homocigotas, presentaban bajo nivel de diversidad. Confirmaron que estos antiguos criollos estaban estrechamente relacionadas con los criollos de Sudamérica y que los criollos modernos en México son híbridos entre los antiguos criollos y los forasteros (Motamayor *et al.*, 2002).

Por la importancia del cacao en el estado de Tabasco, es necesario conocer la diversidad morfológica y genética en la especie presente en el estado, para proponer esquemas de

mejoramiento que conduzcan a incrementar el rendimiento, mejorar la calidad del grano y la tolerancia a factores bióticos y abióticos. En el presente trabajo se plantearon los siguientes objetivos:

Objetivo general

Conocer la diversidad de los tipos de cacao (*Theobroma cacao* L.) existente en Tabasco y su potencial de aprovechamiento mediante un estudio morfológico y molecular.

Objetivos específicos

- a) Determinar la variación morfológica en las plantaciones de cacao y bancos de germoplasma del estado de Tabasco, utilizando características cualitativas y cuantitativas del fruto y la semilla.
- b) Determinar la diversidad genética entre plantaciones y en los bancos de germoplasma utilizando marcadores moleculares microsatélites.
- c) Determinar el nivel de polimorfismo, estimado por los marcadores moleculares usados para diferenciar los tipos de cacao en estudio.

Hipótesis

Los tipos de cacao cultivados en Tabasco y los resguardados en los bancos de germoplasma muestran diferencias a nivel morfológico para fruto y semilla. La diversidad morfológica es mayor que la diversidad observada a nivel molecular. A nivel molecular, la diversidad es mayor dentro que entre las plantaciones.

Estructura de la tesis

La presente investigación está estructurada en dos capítulos. Primeramente se tiene una introducción general, los objetivos, hipótesis y breve descripción del contenido de esta tesis. En el CAPITULO I se muestran y discuten los resultados de la caracterización morfológica de las colectas de frutos y de semillas de cacao realizadas en plantaciones del estado de Tabasco, y en los bancos de germoplasma del CEHUI-INIFAP y la Ex Finca el Danubio. En el CAPITULO II se muestran los resultados de la caracterización molecular de las colectas foliares realizadas en las plantaciones de cacao del estado de Tabasco, y los bancos de germoplasma. Para esta caracterización se adicionaron colectas foliares de la Finca Los Pinos y del banco d germoplasma del Colegio de Postgraduados, Campus Tabasco. Los resultados fueron obtenidos después del análisis informático de datos moleculares con los softwares GenMapper® y GenAIEx. Finalmente, se puntualizan las conclusiones generales de la investigación realizada y se esbozan las recomendaciones para futuros trabajos de investigación.

LITERATURA CITADA

- Alonso, V. R. 1984. Marco de referencia para la planeación y evaluación de la investigación agrícola en el cultivo del cacao en el estado de Tabasco. SARH, INIA, CIAGOC, CAEHUI. Huimanguillo, Tabasco, México. 106 p.
- Alverson, W. S., B. A. Whitlock, R. Nyfeller, C. Bayer and D. A. Baum. 1999. Phylogeny of the core Malvales: Evidence from ndhF sequence data. *Amer. J. Bot.* 86: 1474-1486.
- Azofeifa, D. A. 2006. Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del trópico. *Agronomía mesoamericana* 17(2): 221-242.
- Aikpokpodion, P. O., J. C. Motamayor., V. O. Adetimirin., Y. Adu-Ampomah., I. Ingelbrecht., A. B. Eskes., R. J. Schnell, and M. Kolesnikova-Allen. 2009. Genetic diversity assessment of sub-samples of cacao, *Theobroma cacao* L. collections in West Africa using simple sequence repeats marker. *Tree Genetics & Genomes* 5: 699-711.
- Allegre, M., X. Argout, M. Boccara, O. Fouet, Y. Roguet, A. Berard, J. M. Thèvenin, A. Chauveau, R. Rivallan, D. Clement, B. Courtois, K. Gramacho, A. Boland-Auge, M. Tahí, P. Umaharan, D. Brunel, and C. Lanaud. 2012. Discovery and mapping of a new expressed sequence tag-single nucleotide polymorphism and simple sequence repeat panel for large-scale genetic studies and breeding of *Theobroma cacao* L. *DNA Res.* 19: 23-35.
- Argout, X., J. Salse, J. M. Aury, M. J. Gaultier, G. Droc, J. Gouzy, M. Allegre, C. Chaparro, T. Legavre, S. Maximova N., M. Abrouk, F. Murat, O. Fouet, J. Poulain, M. Ruiz, Y. Roguet, M. Rodier-Goud, J. F. Barbosa-Neto, F. Sabot, D. Kudrna, J. S. S. Ammiraju, C. Schuster S., J. E. Carlson, E. Sallet, T. Schiex, A. Dievart, M. Kramer, L. Gelley, Z. Shi, A. Berard, C. Viot, M. Boccara, A. M. Risterucci, V. Guignon, X. Sabau, M. J. Axtell, Z. Ma, Y. Zhang, S. Brown, M. Bourge, W. Golser, X. Song, D. Clement, R. Rivallan, M. Tahí, J. M. Akaza, B. Pitollat, K. Gramacho, A. D'Hont, D. Brunel, D. Infante, I. Kebe, P. Costet, R. Wing, W. R. McCombie, E. Guiderdoni, F. Quetier, O. Panaud, P. Wincker, S. Bocs, and C. Lanaud. 2011. The genome of *Theobroma cacao*. *Nat. Genet.* 43: 101-108.
- Avendaño-Arrazate, C. H., A. Mendoza-López, E. Hernández-Gómez, G. López-Guillen, M. Martínez-Bolanos, J. F. Caballero-Pérez, S. Guillen-Díaz y S. Espinosa-Zaragoza. 2013.

- Mejoramiento genético participativo en cacao (*Theobroma cacao* L.). Agroproductividad 6(5): 71-80.
- Bekele, F. B., I. Bekele, D. R. Butler, and G. G. Bidaisee. 2006. Patterns of morphological variation in a sample of cacao (*Theobroma cacao* L.) germplasm from the International Cocoa Genebank, Trinidad. Genet. Resour. Crop. Evol. 53: 933-948.
- Boza, E. J., B. Irish, A. Meerow, C. Tondo, O. A. Rodríguez, L. M. Ventura, J. Gómez, M. Moore, D. Zhang, J. C. Motamayor, and R. Schnell. 2013. Genetic diversity, conservation, and utilization of *Theobroma cacao* L.: genetic resources in the Dominican Republic. Genet. Resour. Crop. Evol. 60: 605-619.
- Braudeau, J. 1970. El cacao. Trad. A M. Hernández Cardona. Ed. Blume, Barcelona. 297 p.
- Ciferri, R. and F. Ciferri. 1957. The Evolution of Cultivated Cacao. Evol. 11(4): 381-397.
- Cuatrecasas, J. 1964. Cacao and its allies: A taxonomic revision of the genus *Theobroma*. Contributions to the U.S. Natural Herbarium 35(6): 379-614.
- Crouzillat, D., B. Ménard¹, A. Mora, W. Phillips, and V. Pétiard. 2000. Quantitative trait analysis in *Theobroma cacao* using molecular markers, yield QTL detection and stability over 15 years. Euphytica 114: 13-23.
- Cilas, C., R. Machado and J. C. Motamayor. 2010. Relations between several traits linked to sexual plant reproduction in *Theobroma cacao* L.: number of ovules per ovary, number of seeds per pod, and seed weight. Tree Genetics & Genomes 6: 219-226.
- Coe, M y S. Coe. 2013. La verdadera historia del chocolate. Trad. Marco Antonio Pulido Rull. Fondo de Cultura Económica, México. 396 p.
- De la Cruz, M., R. Whitkus, A. Gómez-Pompa and L. Mota-Bravo L. 1995. Origins of cacao cultivation. Nat. 375:542-543.
- Díaz, del C. B. 2006. Historia verdadera de la conquista de la Nueva España. Colección literaria Universal, Editores Mexicanos Unidos, S. A., México. 773 p.
- Enríquez, G. A. 1985. Curso sobre el cultivo de cacao. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 239 p.
- Efombagn, I. B. M., J. C. Motamayor, O. Sounigo, A. B. Eskes, S. Nyassé, C. Cilas, R. Schnell, M. J. Manzanares-Dauleux, and M. Kolesnikova-Allen. 2008. Genetic diversity and structure of farm and GenBank accessions of cacao (*Theobroma cacao* L.) in Cameroon revealed by microsatellite markers. Tree Genetics & Genomes 4: 821-831.

- Gómez-Pompa, A., J. Salvador F., and M. Aliphath F. 1990. The sacred cacao groves of the maya. *Lat. Amer. Antiquity* 1(3): 247-257.
- Griffith, G. W., J. Nicholson, A. Nenninger, R. H. Birch, and J. N. Hedger. 2003. Witches' brooms and frosty pods: two major pathogens of cacao. *New Zealand J. of Bot.* 41: 423-35.
- ICCO. 2013. Production of cocoa beans. *Quarterly Bulletin of Cocoa Statistic.* London, U. K. 39:3.
- Johnson, E. S., A. Mora, and R. J. Schnell. 2007. Field Guide efficacy in the identification of reallocated clonally propagated accessions of cacao (*Theobroma cacao* L.). *Genet. Resour. Crop Evol.* 54: 1301-1313.
- Johnson, E. S., F. L. Bekele, S. J. Brown, Q. Song, D. Zhang, L. W. Meinhardt, and R. J. Schnell. 2009. Population Structure and Genetic Diversity of the Trinitario Cacao (*Theobroma cacao* L.) from Trinidad and Tobago. *Crop Sc.* 49: 564-572.
- Kuppers, J. R. 1953. Some biometric observations on cacao fruit. *Science, New Series* 117(3040): 354-355.
- Kumar, P., V. K. Gupta, A. K. Misra, D. R. Modi, and B. K. Pandey. 2009. Potential of molecular markers in plant biotechnology. *Plant Omics J.* 2(4): 141-162.
- Lanaud, C., M. A. Risterucci, I. Pieretti, M. Falque, A. Bouet, and P. J. L. Lagoda. 1999. Isolation and characterization of microsatellites in *Theobroma cacao* L. *Mol. Ecol.* 8: 2141-2143.
- Lachenaud, P., F. Bonnot, and G. Oliver. 1999. Use of floral descriptors to study variability in wild cocoa trees (*Theobroma cacao* L.) in French Guiana. *Gen. Resour. Crop Evol.* 46: 491-500.
- López, A. P. A. 1993. Descripción y control de las enfermedades del cacao en Tabasco. SARH-INIFAP, folleto técnico. 7. 23 p.
- López, A. P. A., V. H. Delgado N., y A. Azpeitia M. 1996. El cacao *Theobroma cacao* L. en Tabasco. Libro técnico 1, INIFAP. 270 p.
- López, A. P. A., C. H. Avendaño A, M. A. Ramírez G, C. Hernández H, M. C. López N, y A. Mendoza L. 2013a. Catálogo de clones de cacao resistentes a la monilia y de alta productividad. *Publicación Especial 9, SAGARPA, INIFAP.* 37 p.

- López, A. P. A., C. Hernández H. y M. A. Ramírez G. 2013b. Caracterización de las variedades de cacao en Tabasco. SAGARPA, INIFAP. Folleto técnico 74. 25 p.
- López, B. O. 1995. Características del fruto del germoplasma de cacao, *Theobroma cacao* L. seleccionado en Rosario Izapa, Chiapas. *Agric. Téc. Méx.* 21(2): 127-137.
- Loor, R. G., A. M. Risterucci, B. Courtois, O. Fouet, M. Jeanneau, E. Rosenquist, F. Amores, A. Vasco, M. Medina, and C. Lanaud. 2009. Tracing the native ancestors of the modern *Theobroma cacao* L. population in Ecuador. *Tree Genetics & Genomes* 5: 421-433.
- Marcano, M., T. Pugh, E. Cros, S. Morales, E. A. Portillo P., B. Courtois, J. C. Glaszmann, J. M. M. Engels, W. Phillips, C. Astorga, A. M. Risterucci, O. Fouet, V. González, K. Rosenberg, I. Vallat, M. Dagert, and C. Lanaud. 2007. Adding value to cocoa (*Theobroma cacao* L.) germplasm information with domestication history and admixture mapping. *Theor. Appl. Genet.* DOI 10.1007/s00122-006-0486-9.
- Marcano, M., S. Morales, M. T. Hoyer, B. Courtois, A. M. Risterucci, O. Fouet, T. Pugh, E. Cros, V. González, M. Dagert, and C. Lanaud. 2009. A genome wide admixture mapping study for yield factors and morphological traits in a cultivated cocoa (*Theobroma cacao* L.) population. *Tree Genetics & Genomes* 5: 329-337.
- Motamayor, J. C., K. Mockaitis, J. Schmutz, N. Haiminen, D. Livingstone, O. Cornejo, S. D. Findley, P. Zheng, F. Utro, S. Royaert, C. Saski, J. Jenkins, R. Podicheti, M. Zhao, B. E. Scheffler, J. C. Stack, F. A. Feltus, G. M. Mustiga, F. Amores, W. Phillips, J. P. Marelli, G. D. May, H. Shapiro, J. Ma, C. D. Bustamante, R. J. Schnell, D. Main, D. Gilbert, L. Parida, and D. N. Kuhn. 2013. The genome sequence of the most widely cultivated cacao type and its use to identify candidate genes regulating pod color. *Genome Biol.* 14: r53.
- Motamayor, J.C., P. Lachenaud, J. Wallace, G. Loor, D. N. Kuhn, J. S. Brown, and R. J. Schnell. 2008. Geographic and genetic population differentiation of the Amazonian chocolate tree. *PLoS One* 3: e3311.doi:10.1007/s12042-008-9011-4.
- Motamayor, J. C., A. M. Risterucci, P. A. López, C. F. Ortiz, A. Moreno, and C. Lanaud. 2002. Cacao domestication I: the origin of de cacao cultivated by the Mayas. *Heredity* 89: 380-386.
- Motamayor, J. C., A. M. Risterucci, V. Laurent, A. Moreno, and C. Lanaud. 2000. The genetic diversity of criollo cacao and its consequence in quality breeding. In: *Memoria del primer congreso venezolano del cacao y su industria*. Maracay, Venezuela. pp 33-56.

- Ortiz, G. C. F. 1996. Étude de la diversité génétique de populations de *Phytophthora* pathogènes du cacaoyer (*Theobroma cacao* L.) et du cocotier (*Cocos nucifera* L.). Thèse Doctoral. Université Paul Sabatier Toulouse, Francia. 85 p.
- Pokou, N. D., J. A. K. N'Goran, P. H. Lachenaud, A. B. Eskes, J. C. Montamayar, R. Schnell, M. Kolesnikova-Allen, D. Clément, and A. Sangaré. 2009. Recurrent selection of cocoa populations in Côte d'Ivoire: comparative genetic diversity between the first and second cycles. *Plant Breeding* 128: 514-520.
- Phillips-Mora, W. y J. J. Galindo. 1989. Método de inoculación y evaluación de la resistencia a *Phytophthora palmivora* en frutos de cacao (*Theobroma cacao* L.). *Turrialba* 39(4): 488-496.
- Phillips, M. W., A. Coutiño, F. Ortiz G., P. López A., J. Hernández, and M. C. Aime. 2006. First report of *Moniliophthora roreri* causing frosty pod rot (moniliasis disease) of cocoa in México. *Plant Pathology* 55: 584.
- Phillips-Mora, W., A. Arciniegas L., A. Mata Q. and J. C. Motamayor A. 2012. Catálogo de clones de cacao seleccionados por el CATIE para siembras comerciales. Manual técnico 105 CATIE. Turrialba, Costa Rica. 68 p.
- Powis, T. G., A. Cypher, N. W. Gaikwad, L. Grivetti, and K. Cheong. 2011. Cacao use and the San Lorenzo Olmec. *PNAS* 108(21): 8595-8600.
- Saunders, J. A., S. Mischke, E. A. Leamy, and A. A. Hemeida. 2004. Selection of international molecular standards for DNA fingerprinting of *Theobroma cacao*. *Theor. Appl. Genet.* 110: 41-47.
- Semagn, K., Å. Bjørnstad, and M. N. Ndjioudjop. 2006. An overview of molecular marker methods for plants. *African J. Biotech.* 5(25): 2540-2568.
- SIAP. 2014a. www.siap.gob.mx/cierre-de-la-producción-agrícola-por-cultivo/ Consultado el 14/08/2014
- SIAP. 2014b. www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-estado/. Consultado el 14/08/2014.
- Susilo, A. W., D. Zhang, L. A. Motilal, S. Mischke, and L. D. Meinhardt. 2011. Assessing genetic diversity in Java fine-flavor cacao (*Theobroma cacao* L.) germoplasm by using simple sequence repeat (SSR) markers. *Trop. Agr. Develop.* 55(2): 84-92.

- Schnell., R. J., D. N. Kuhn, J. S. Brown, C. T. Olano, W. Phillips-Mora, F. A. Amores, and J. C. Motamayor. 2007. Development of a marker assisted selection program for cacao. *Phytopathology* 97(12): 1664-1669.
- Trognitz, B., X. Scheldeman, K. Hansel-Hohl, A. Kuant, H. Grebe, and M. Hermann. 2011. Genetic population structure of cacao plantings within a young production area in Nicaragua. *PLoS ONE* 6(1):e16056. doi:10.1371/journal.pone.0016056.
- Thomas E., M. van Zonneveld, J. Loo, T. Hodgkin, G. Galluzzi, and J. van Etten. 2012. Present spatial diversity patterns of *Theobroma cacao* L. in the Neotropics reflect genetic differentiation in pleistocene refugia followed by human-influenced dispersal. *PLoS ONE* 7(10): e47676. doi:10.1371/journal.pone.0047676.
- United States Department of Agriculture – Agricultural Research Service (USDA-ARS). 2014. <http://plants.usda.gov/core/profile?symbol=THCA>. Consultado el 23/07/2014.
- Whitkus, R., M. de la Cruz, B. L. Mota, and P. A. Gómez, P. A. 1998. Genetic diversity and relationships of cocoa (*Theobroma cacao* L.) in southern México. *Theor. Appl. Genetic.* 96: 621-627.
- Yamada, M. M., F. G. Faleiro, A. B. Flores, U. V. Lopes, J. L. Pires, R. X. Corrêa, and R. F. Santos. 2009. Microsatellite diversity and heterozygosity of parents of cocoa breeding population. *Crop Breeding Appl. Biotechnol.* 9: 17-22.
- Yin, X., P. C. Struik, and M. J. Kropff. 2004. Role of crop physiology in predicting gene-to-phenotype relationships. *Trends in Plant Sci.* 9(9): 426-432.
- Zhang, D., E. Arevalo G., S. Mischke, L. Zuñiga C., A. Barreto Ch. and J. Adiazola del Aguila. 2006. Genetic diversity and structure of managed and semi-natural populations of cacao (*Theobroma cacao*) in the Huallaga and Ucayali valleys of Peru. *Ann. Bot.* 98: 647-655.
- Zhang, D., S. Mischke, E. S. Johnson, W. Phillips-Mora, and L. Meinhardt. 2009. Molecular characterization of an international cacao collection using microsatellite markers. *Tree Genetics & Genomes* 5: 1-10.
- Zhang, D., W. July M., E. Johnson, E. Somarriba, W. Phillips M., C. Astorga, S. Mischke, and L. W. Meinhardt. 2012. Genetic diversity and spatial structure in a new distinct *Theobroma cacao* L. population in Bolivia. *Genet. Resour. Crop Evol.* 59: 239-252.

CAPÍTULO I

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE CACAO *Theobroma cacao* L. EN PLANTACIONES Y BANCOS DE GERMOPLASMA DE TABASCO, MÉXICO

1.1. RESUMEN

En México el cacao forma parte de la herencia cultural y en Tabasco se concentra la mayor superficie cultivada, por lo que conocer la variación fenotípica y genética disponible en esta especie ayudará a su conservación y utilización en programas de mejoramiento. El objetivo del estudio fue determinar la variación morfológica del fruto de cacao existente en plantaciones (PL) en relación con la de los bancos de germoplasma (BG) e identificar accesiones con características sobresalientes asociadas al rendimiento. La colecta de frutos se realizó en 33 PL de los municipios de Cárdenas, Comalcalco, Huimanguillo, Jalpa de Méndez, Nacajuca, Paraíso, Tacotalpa y Teapa. En total 101 accesiones fueron colectadas en PL y 69 en BG del CEHUI-INIFAP y Ex-Finca el Danubio, de octubre 2013 a marzo 2014. La caracterización se realizó con 10 características cualitativas y 18 cuantitativas del fruto y de la semilla. Para las características cualitativas una amplia variación morfológica en PL y BG fue observada. En PL la forma dominante del fruto fue cundeamor (26.8 %), y no se observaron las formas criollo. En los BG la dominante fue angoleta (44.4 % en clones, 67.7 % en híbridos, 36.3 % en clones criollo). Características relacionadas con la forma del fruto (peso, longitud y diámetro) presentaron rangos de variación más amplios en PL que en BG. Los dos primeros componentes principales explicaron el 65 % de la variación morfológica total. La estructura morfológica (ACP de características cuantitativas) mostró diferenciación espacial entre las accesiones de PL y BG y algunas accesiones de PL mostraron una estrecha relación con las de los BG. Accesiones sobresalientes fueron identificadas en las PL por número y peso total de semillas por mazorca e índice de mazorca. La diversidad observada en plantaciones puede enriquecer la de bancos de germoplasma y utilizarse en la mejora genética del cultivo.

Palabras clave: *Theobroma cacao*, diversidad morfológica, mazorca, semilla, plantaciones, banco de germoplasma

1.2. ABSTRACT

In Mexico the major cocoa producing area is grown in the state of Tabasco, so knowing the available phenotypic and genetic variation in this species will help their conservation and utilization in breeding programs. The aim of the study was to determine the morphological variation of the fruit existing in cocoa farmers' fields (FF) in relation to variation in genebank (GB) accessions and identify accessions with outstanding performance. The collection of fruits was performed in 33 FF of the municipalities of Cárdenas, Comalcalco, Huimanguillo, Jalpa de Méndez, Nacajuca, Paraiso, Teapa and Tacotalpa. 101 accessions were collected in FF and 69 in BG of CEHUI- INIFAP and Ex-Finca el Danubio in October 2013 to March 2014. For characterization, 10 quantitative and 18 qualitative characteristics of the fruit and seed were used. Qualitative characteristics showed a wide morphological variation in PL and BG. In PL, the dominant form of the fruit was cundeamour (26.8%), and no fruits of criollo form were observed. In the BG was angoleta the form dominant (44.4% clones, 67.7% in hybrids, 36.3% in clones criollos). Characteristics related to the shape of the fruit (weight, length and diameter) had wider ranges of variation in PL than BG. The two first principal components accounted for 65% of the total morphological variation. The morphological structure (ACP quantitative trait) showed spatial differentiation between PL and BG accessions. Some PL accessions showed a close relationship with those of BG. Outstanding accessions were identified in PL by total number and weight of seeds per pod and pod index. The diversity observed in farmers' fields could enrich the genebanks and use in genetic improvement of the crop.

Index words: *Theobroma cacao*, morphological diversity, fruit, seed, farmers' field, genebank

1.3. INTRODUCCIÓN

El cacao (*Theobroma cacao* L.) es una planta perenne cuyo cultivo sustenta a la industria chocolatera lo que la ubica entre las plantas de mayor importancia económica, social y ecológica. *Theobroma cacao* es una especie que crece bajo sombra, clasificada recientemente dentro de la familia Malvaceae (Alverson *et al.*, 1999).

Tradicionalmente se reconocen tres morfotipos principales: criollo, forastero y trinitario (cruza entre criollo x forastero) y es en el Alto Amazonas donde se concentra la mayor diversidad genética de la especie, de donde migró hacia Centroamérica y el sur de México, actualmente se conocen 10 grupos genéticos (Motamayor *et al.*, 2008; Thomas *et al.*, 2012).

En ésta última región, los Mokayas y Olmecas fueron los primeros en domesticar y consumir el cacao hace más de 3,800 años (1800-1000 a C.) (Engels *et al.*, 2006; Powis *et al.*, 2011; Coe y Coe, 2013). Las primeras plantaciones fueron establecidas por los Mayas yucatecos en el sur de México, bajo un sofisticado agroecosistema en donde existía una diversidad de plantas asociadas al cacao (Barrera *et al.*, 1977; Gómez-Pompa, 1987; Gómez-Pompa *et al.*, 1990; Caso, 2009), pero fue en la región de la Chontalpa, Tabasco donde el grupo indígena de los *putunes* chontales cultivaron extensas áreas de cacao criollo bajo el esquema artificial de un bosque tropical (Díaz, 2006; Bergmann, 1969).

En este periodo, el cultivo de cacao se distribuía en la zona del Golfo de México desde Tuxpan y Papantla, Veracruz cerca del sitio arqueológico de El Tajín, la zona de Huatusco hasta Cuetlaxtlán, Tochtepec en Oaxaca. En el Pacífico desde el Soconusco hasta la zona del valle del río Ameca entre Jalisco-Nayarit, Michoacán y el valle de Colima (Bergmann, 1969).

Enríquez (1985) señala que en Tabasco y Chiapas se cultivaba un cacao con forma de fruto calabacillo llamado “*Patastillo*” y otro tipo forastero de forma amelonado conocido como “*Ceylan*”, que posiblemente fue introducido en 1900. Alonso (1984) indicaba que el 98% de las plantaciones de Tabasco proceden de semillas y que el tipo predominante es el amelonado en un 70%, el calabacillo en un 26% y solo el 4% son del tipo criollo.

Los tipos introducidos al cruzarse con las poblaciones criollas establecidas desde tiempos antiguos, debieron recombinarse y generar una significativa diversidad genética en las nuevas plantaciones, y que actualmente puede ser aprovechada para mejorar el rendimiento y la sostenibilidad del sistema. Las plantaciones de cacao cultivadas actualmente en Tabasco, corresponden principalmente al grupo genético trinitario (López *et al.*, 2013a).

Con la finalidad de rescatar y conservar la diversidad genética del cacao en el estado de Tabasco, distintas instituciones han conformado bancos de germoplasma. El principal por el número de accesiones (389) es el del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuaria (INIFAP). Este banco de germoplasma cuenta con accesiones provenientes de colectas de los estados de Chiapas, Tabasco, Oaxaca, Veracruz, Yucatán y Michoacán, y de accesiones de ocho países donadas por el Banco Internacional de Germoplasma del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), Costa Rica.

En el Campo Experimental Rosario Izapa (CERI) en Chiapas conserva 176 accesiones, destacando los clones RIM predominando en el fruto las forma angoleta, cundeamor y pentágona (López, 1995).

En el Campo Experimental Huimanguillo (CEHUI) en Tabasco, conserva 116 accesiones que incluyen, una réplica de los clones introducidos del CATIE por el CERI, además los clones UF 273, ICS 95 y PA 169 del CATIE seleccionados por su resistencia a enfermedades, y accesiones de Tabasco (López *et al.*, 1989; López, 1994a; López *et al.*, 1996; Avendaño *et al.*, 2011).

El INIFAP ha liberado los clones INIFAP 1, 4, 8, 9 y 10 que superan en rendimiento a los clones cultivados en el estado. Estos se encuentran establecidos en la región de la Chontalpa en fincas del gobierno del estado de Tabasco: la Finca los Pinos, El Morralero y la ex Finca el Danubio para incrementar el número de plantas por injerto y posteriormente su reproducción masiva (López, 1994b; López *et al.*, 1995; López, 2011; López *et al.*, 2011; López *et al.*, 2013b).

Asimismo, los productores han realizado selecciones locales excelentes, por ejemplo en el rancho la Joya, en Cunduacán, Tabasco se conserva un tipo de cacao criollo de cotiledones

blancos (ECH o Carmelo C1), el cual ha sido el resultado de la selección realizada por el propietario de la finca (Avendaño *et al.*, 2011; Motamayor *et al.*, 2000).

Gran parte de esta diversidad conservada en estos bancos de germoplasma y en las plantaciones no ha sido caracterizada a nivel morfológico ni molecular.

La caracterización es una descripción de la variación que existe entre las plantas de una plantación, población o colección de germoplasma a través de la cual se pueden diferenciar los diferentes individuos de una especie, por su fenotipo. Esta se realiza con la ayuda de descriptores morfológicos de la planta que pueden incluir características relacionadas con el rendimiento.

En cacao como en otras especies, el rendimiento es un carácter complejo de herencia multigénica, por lo que el conocer la variación de los caracteres asociados al rendimiento puede ayudar a mejorarlo (Pinzón y Rojas, 2008; Phillips *et al.*, 2012). En este sentido el número y peso de granos secos por fruto, se emplean como indicadores para seleccionar árboles de alta productividad (Kuppers, 1953; Cilas *et al.*, 2010) y la relación largo/diámetro de la mazorca puede tomarse como característica para diferenciar clones (Enríquez, 1966).

Para la caracterización de clones de cacao se han utilizado además características de la flor y semilla (Pound, 1932), para diferenciar tipos criollos y forasteros el color del cotiledón (Ciferri y Ciferri, 1957) y para discriminar entre accesiones o clones de los programas de mejoramiento genético y para el establecimiento de bancos de germoplasmas características de la hoja, mazorca y semillas que son poco afectadas por el ambiente (Enríquez, 1966; Engels *et al.*, 1980; Engels, 1983a; Engels 1983b).

Estos descriptores se encuentran publicados en los catálogos de cultivares de cacao, en los que se describen e identifican genotipos de alto valor agronómico (Soria y Enríquez, 1981; Engels, 1981; García, 2010; Phillips-Mora *et al.*, 2012; López *et al.*, 2013b), y permiten comparar morfológicamente materiales de interés y corroborar su identidad (Johnson *et al.*, 2007; Phillips-Mora *et al.*, 2012).

El número de descriptores morfológicos utilizados es variable, el IBPGR propuso 65 (IBPGR, 1980), el CATIE emplea 26 (Phillips y Enríquez, 1988), el CIRAD 24 y el CRU 23 descriptores (Bekele y Buttler, 2000). Con el uso de estos descriptores se ha observado una amplia variabilidad morfológica y en caracteres asociados al rendimiento de cacao de diferentes regiones del mundo.

También se ha logrado diferenciar entre los tipos criollos, forasteros y trinitarios (Lachenaud *et al.* 1999; Lachenaud y Oliver, 2005; Bekele *et al.* 2006; Marcano *et al.* 2009; Santos *et al.* 2012; ten Hoppen *et al.* 2012).

En México, hasta nuestro entender no existen estudios de la diversidad presente en las plantaciones, a nivel morfológico y molecular, que permitan conocer su estructura y variación. En Tabasco, donde se concentra el 66% de la producción de cacao de México (SIAP, 2014a), solo se han descrito algunas accesiones dentro de los bancos de germoplasma.

Debido a la importancia del cultivo en este estado y a la necesidad de conocer la variación morfológica existente en las plantaciones para su mejor aprovechamiento, los objetivos de ésta investigación fueron: a) determinar la variación morfológica de mazorcas y semillas de los tipos de cacao de los bancos de germoplasma y en las plantaciones de cacao del Estado; b) comparar la diversidad existente entre las accesiones del banco de germoplasma e identificar tipos con características sobresalientes asociadas al rendimiento.

1.4. MATERIALES Y METODOS

1.4.1. Sitio de estudio

El estudio se realizó en la zona cacaotera del estado de Tabasco, México (Figura 1.1) localizada en el sureste del país, entre 17° 15' y 18° 39' de latitud norte y 90° 59' y 94° 08' de longitud oeste. El cacao se cultiva en 10 de los 17 municipios del estado, que se distribuyen en tres subregiones climáticas: áreas montañosas de la sierra (AMS), la planicie costera (PC) y la región noroeste (RN) del estado.

En las AMS que incluye a los municipios de Tacotalpa y Teapa, el cacao se cultiva en un clima tropical cálido húmedo con lluvias de 3,000 a 4,500 mm todo el año (Af (m)). En este mismo ambiente se localiza la plantación de la Hacienda Las Conchas, ubicada en Jana 2da. Sección, del municipio de Ixtacomitan, Chiapas.

En la PC de la llanura del Golfo de México que integra a los municipios de Paraíso, Cárdenas, Comalcalco, Cunduacán, Jalpa de Méndez y Nacajuca, el clima es tropical cálido húmedo con lluvias abundantes en verano (Am (f)). En esta planicie se presentan marcados periodos con lluvias de 2,000 a 2,600 mm (junio-enero) y de sequías (febrero-mayo).

En la RN que incluye al municipio de Huimanguillo, las plantaciones se localizan bajo un clima tropical cálido subhúmedo con lluvias en verano de hasta 1,500 mm (Aw2 (x1)).

Bajo las condiciones climáticas descritas, el cacao se produce bajo una temperatura media anual que varía de 24° a 28°C y en plantaciones bajo la sombra de moté (*Erythrina fusca*), Chipilcoite (*Diphysa robinoides*) y diversos árboles frutales o maderables. El rendimiento promedio es de 0.45 t ha⁻¹ (SIAP, 2014b).

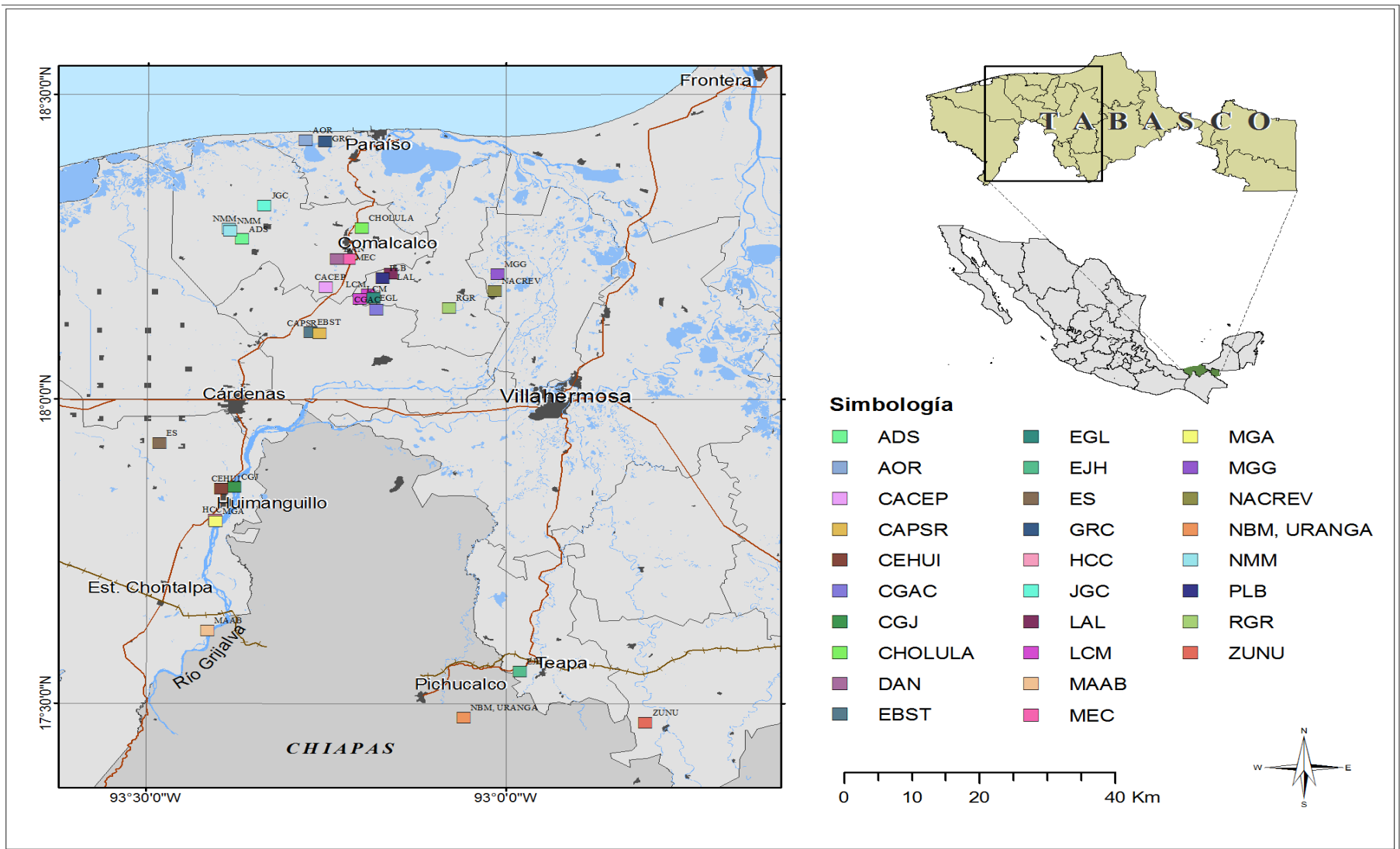


Figura 1.1. Localización de sitios muestreados en plantaciones de Tabasco y Chiapas, México.

1.4.2. Selección y colecta de material vegetal

El material de estudio se colectó en plantaciones de productores y en bancos de germoplasma (BGC). En plantaciones se incluyó un total de 101 muestras, provenientes de treinta y tres plantaciones de cacao distribuidas en 26 localidades de los municipios de Cárdenas, Comalcalco, Cunduacán, Huimanguillo, Jalpa de Méndez, Nacajuca, Paraíso, Tacotalpa y Teapa, se colectaron 95 muestras. En la Hacienda Las Conchas, del municipio de Ixtacomitan, Chiapas se colectaron seis muestras, consideradas como material criollo típico de la zona (Cuadro 1.1, Anexo 1.1).

Las plantaciones fueron seleccionadas de manera aleatoria, considerando que fueran plantaciones provenientes de semilla, y presentaran diversidad de formas del fruto. En cada plantación se identificaron los árboles diferentes en cuanto a formas de mazorca presentes con la ayuda del productor. La colecta se realizó de octubre 2013 a abril 2014. En total se colectaron 372 mazorcas.

De los bancos de germoplasma se incluyeron 69 accesiones de cacao (Cuadro 1.1) que comprenden 51 accesiones del banco de germoplasma del CEHUI-INIFAP y 18 accesiones de la ex finca El Danubio. Las colectas de mazorcas se realizaron de noviembre a diciembre del 2012 para la Ex finca El Danubio y de diciembre 2013 a marzo 2014 para las del CEHUI-INIFAP.

Para la caracterización morfológica y obtención de datos cualitativos y cuantitativos de los frutos se utilizó el mayor número de mazorcas maduras y sanas disponibles. Frecuentemente se encontraron frutos afectados por enfermedades y plagas que no fueron considerados para el estudio.

Para la caracterización de las semillas, estas se tomaron al azar del grupo de mazorcas de cada muestra. La caracterización de los frutos y de las semillas se realizó en base a los descriptores de Engels *et al.* (1980) y Phillips-Mora *et al.* (2012) (Cuadro 1.2). Para ello se utilizaron 10 características cualitativas y 17 cuantitativas. El peso seco de las semillas se determinó después del secado a 60°C por 48 h con una humedad de 7 %.

Cuadro 1.1. Accesiones colectadas en plantaciones de Tabasco, Hacienda Las Conchas, Chiapas y de los bancos de germoplasma de Tabasco, México, usadas en el estudio.

Accesiones colectadas en plantaciones de Tabasco		
Región	Municipio	
Chontalpa	Comalcalco	29445, 29447, 29448, 29449, 29451, 29453, 29456, 29459, 29503, 29505, 29508, 29532, 29541, 29543, 29544, 29545, 29546, 29547, 29548, 29552, 29553, 29554, 29556, 29558, 29560, 29561, 29562, 29563, 29576
	Cunduacán	29694, 29707, 29709, 29715, 29716, 29721
	Huimanguillo	29348, 29349, 20350, 29351, 29352, 29353, 29360, 29365, 29367, 29368, 29369, 29370, 29371, 29483, 29484, 29487, 29607, 29608, 29609, 29611, 29612, 29614, 29615, 29616, 29617, 29618, 29620
	Jalpa de Méndez	29625, 29733, 29735, 29736, 29737, 29738, 29739, 29741, 29742, 29743, 29744, 29745, 29746, 29747, 29748, 29749, 29757, 29758, 29759, 29750, 29751, 29752, 29760, 29761, 29762, 29763
	Nacajuca Paraíso	29637, 29770 29469, 29470, 29476
Sierra	Tacotalpa	29392
	Teapa	29376
Accesiones colectadas en Hacienda Las Conchas, Chis.		
Norte	Ixtacomitan	29772, 29773, 29774, 29775, 29776, 29777
	Tipo	Accesiones del banco de germoplasma CEHUI-INIFAP
Chontalpa	Clones	UF11, UF12, UF29, UF273, UF296, UF613, UF667, UF668, UF700, ICS6, ICS95, SCA6, SCA12, PORC3, PORC3T1, POUND7, EET48, EET95, EET96, EET400, CATONGO, SPA9, IMC67, H20, CC225, OC77, PA169
	Híbridos	F7, F9, F14, F20, F21, F28, F30, F33, F42, F44, HRMO15, HRMO16, HRMO17
	Clones Criollos	CARMEC1, RIM68, T3C, TF20, TF45, TF59, TF61, CRF6, CR22, CR38, CR126
Accesiones de la Ex Finca El Danubio		
	Híbridos	DAN4, DAN13, DAN15, DAN34, DAN43, DAN134, DAN187, DAN188, DAN198, DAN228, DAN242, DAN340, DAN367, DAN386, DAN401, DAN460, DAN480, DAN511

Cuadro 1.2. Descriptores morfológicos cuantitativos y cualitativos utilizados en la caracterización de mazorcas y semillas de las accesiones colectadas.

Descriptor Fruto	
Cuantitativo	Largo (cm), Diámetro (cm), Relación largo/diámetro (cm), Espesor del caballete (mm), Profundidad del surco (mm), Peso de la mazorca (g), Número de semillas por mazorca, Peso total de las semillas (g), Proporción del mesocarpo, Número de semillas vanas
Cualitativo	
Forma	1= angoleta, 2= amelonado, 3= cundeamor, 4= calabacillo, 5= criollo, 6=pentágona, 7=oblongo, 8=abovado, 9=ovado, 10= elíptico, 11=orbicular
Color	1= amarillo, 2=rojo, 3=amarillo/verde, 4=naranjado, 5= rojo medio, 6=rojo oscuro, 7=purpura, 8=verde/amarillo, 9= verde, 10=amarillo/rojo, 11=rojo/amarillo, 12= amarillo/naranjado
Constricción basal	0 = ausente, 1 = escaso, 2 = intermedio, 3 = bien marcado, 4 = muy ancho
Forma del ápice	1 = puntiagudo, 2 = agudo, 3 = obtuso, 4 = redondeado, 5 = pezón, 6 = dentado, 7 = atenuado, 8 = caudado
Rugosidad	0 = liso, 1 = leve, 3 = intermedia, 5 = levemente áspera, 7 = áspera
Dureza del mesocarpo	3 = suave, 5 = intermedio, 7 = duro
Color del chilillo	1 = verde, 2 = verde-rojo, 3 = rojo-verde, 4 = rojo intenso
Color de fruto verde	1 = verde, 2 = verde-rojo, 3 = rojo-verde, 4 = rojo intenso
Color del mucílago	1 = blanco, 2 = crema
Descriptor semilla	
Cuantitativo	Peso húmedo (g), Largo (mm), Diámetro (mm), Espesor (mm), Peso seco (g), Relación Largo/Diámetro, Relación Peso húmedo/Peso seco
Cualitativo	
Forma	1 = oblonga, 2 = elíptica, 3 = ovada, 4 = irregular
Color del cotiledón	1 = blanco, 2 = crema, 3 rosa, 4 = violeta, 5 violeta claro, 6 = rojo oscuro, 7 = purpura, 8 = café, 9 = moteado
Forma en sección transversal	1 = aplanada, 2 = intermedia, 3 = redonda

1.4.3. Análisis estadístico

Estadísticas descriptivas básicas y análisis multivariado fueron realizadas para todas las características morfológicas registradas. Con el conjunto de 17 características cuantitativas se hizo un análisis de componentes principales (ACP), a partir de la matriz de correlaciones para determinar la importancia relativa de cada característica en la variación de las accesiones en las plantaciones y en los bancos de germoplasma. Los análisis se hicieron con el paquete estadístico SAS (SAS, 2010).

1.5. RESULTADOS

1.5.1. Características cualitativas de la mazorca

La caracterización cualitativa permitió observar la diversidad morfológica en las diez características de la mazorca existente en las plantaciones estudiadas (Cuadro 1.3, Anexo 1.2). De las ocho formas de mazorca observadas, la dominante fue el cundeamor (26.8%), y no se observaron las formas criollo (Figura 1.2). El 34.7% tiene una constricción basal escaso y el 36.9% son de rugosidad escaso. En el 33.5% de las mazorcas, el ápice fue obtuso y el 36.9% presentaron una dureza intermedia del mesocarpo. De acuerdo a la etapa de desarrollo de la mazorca, se observa que el 74.9% presenta coloración verde en la etapa de chilillo.

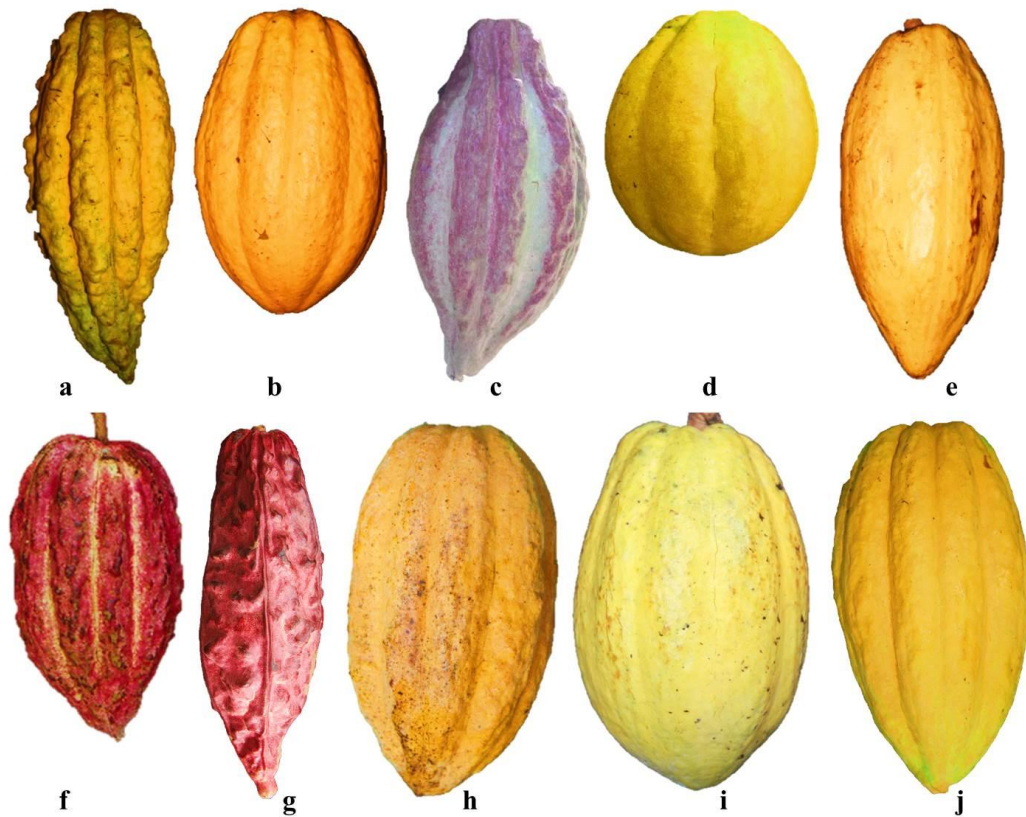


Figura 1.2. Diversidad de formas dominantes de mazorca observadas en las plantaciones de Tabasco y bancos de germoplasma, utilizadas en este estudio. a: angoleta; b: amelonado; c: cundeamor; d: calabacillo, e: elíptico; f: criollo; g: pentágona; h: oblongo, i: abovado; j: ovado. Fotos: M.A. Ramírez G. y (f) P.A. López A.

Cuadro 1.3. Frecuencia (%) de 10 características cualitativas de mazorca y semilla en 170 muestras de cacao provenientes de plantaciones y bancos de germoplasma de Tabasco, México.

Característica	Categoría	Plantaciones	Bancos de germoplasma			
		101 ^{1/}	Clones	Híbridos	Clones criollos	
FM	Angoleta	20.14	44.44	67.74	36.36	
	Amelonado	22.11	7.41	12.90	9.09	
	Cundeamor	26.85	14.81	-	-	
	Calabacillo	3.16	3.70	-	-	
	Elíptico	20.14	29.63	16.13	-	
	Criollo	-	-	3.23	27.27	
	Pentágona	1.05	-	-	18.18	
	Oblongo	8.42	-	-	9.09	
	Abovado	2.11	-	-	-	
	FAM	Puntiagudo	1.05	-	-	-
Agudo		14.74	7.41	19.35	-	
Obtuso		33.57	18.52	16.13	18.18	
Redondeado		2.11	-	-	-	
Pezón		2.11	3.70	3.23	9.09	
Dentado		11.58	3.70	6.45	-	
Atenuado		2.12	14.81	12.90	36.36	
Caudado		17.90	51.85	41.94	36.36	
CBM		Ausente	35.80	7.41	12.90	45.45
		Escaso	34.74	29.63	22.58	9.09
	Intermedio	15.67	37.04	16.13	9.09	
	Bien marcado	17.90	25.93	45.16	36.26	
RM	Muy ancho	-	-	3.27	-	
	Liso	3.16	3.70	12.90	-	
	Leve	36.93	81.48	48.39	45.45	
	Intermedia	38.05	-	20.03	9.09	
	Levemente áspera	13.68	11.11	9.68	27.27	
DMM	Áspera	13.42	3.70	-	18.18	
	Suave	34.74	7.41	22.58	9.09	
	Intermedio	36.93	59.26	35.48	45.45	
CCH	Duro	32.50	33.33	41.94	45.45	
	Verde	74.98	70.37	67.74	72.73	
	Verde-rojo	17.90	11.11	25.81	18.18	
	Rojo-verde	6.32	11.11	6.45	9.09	
CFV	Rojo intenso	6.71	7.41	-	-	
	Verde	77.32	70.37	67.74	72.73	
	Verde-rojo	16.78	11.11	25.81	18.18	
	Rojo-verde	5.26	11.11	6.45	-	
	Rojo intenso	6.71	7.41	-	4.09	

Cuadro 1.3. Continuación

Característica	Categoría	Plantaciones	Bancos de germoplasma		
			Clones	Híbridos	Clones criollos
		101 ^{1/}	27	31	11
CM	Amarillo	83.93	70.37	83.87	18.18
	Rojo	2.29	3.70	-	-
	Amarillo/verde	2.11	-	3.27	-
	Naranjado	1.05	11.11	6.45	-
	Rojo oscuro	-	-	-	9.09
	Verde/amarillo	-	11.11	-	36.36
	Verde	1.05	-	-	36.36
	Amarillo/rojo	10.06	-	3.23	-
	Rojo/amarillo	4.21	3.70	-	-
	Amarillo/naranjado	-	-	3.23	-
CMUS	Blanco	96.24	29.63	51.61	27.27
	Crema	10.06	70.37	48.39	72.73
CCS	Blanco	4.21	-	-	-
	Crema	1.96	-	-	81.82
	Rosa	1.05	-	-	-
	Violeta	47.00	11.11	54.84	-
	Violeta claro	1.05	-	3.23	-
	Purpura	50.36	85.19	35.48	-
	Moteado	2.24	3.70	6.45	18.18

^{1/} Número de accesiones por grupo; FM=forma de la mazorca, FAM=forma del ápice de la mazorca, CBM=constricción basal de la mazorca, RM=rugosidad de la mazorca, DMM=dureza del mesocarpo de la mazorca, CCH=color del chilillo, CFV=color del fruto verde, CM=color de la mazorca, CMUS=color del mucilago, CCS= color del cotiledón de la semilla.

En la etapa de fruto verde, la coloración no cambia, el 77.3% continúa siendo verde, pero a medida que la mazorca llega a la madurez fisiológica el 83.9% de ellas cambia a amarillo. En el interior de la mazorca el mucilago que cubre a las semillas es de color blanco en el 96.2% de ellas. El cotiledón es de color violeta en el 47.0% y sólo el 6.1% de las accesiones producen semillas con cotiledones color blanco y crema. Estas muestras son importantes debido a la preferencia del chocolate obtenido de cotiledones de éste color (Cuadro 1.3).

En las accesiones de los bancos de germoplasma muestreados se observó variación para las características cualitativas como es de esperarse en este tipo de colecciones, aunque la forma predominante de la mazorca es la angoleta (44.4% en clones, 67.7% en híbridos y 36.3% en los

clones criollo). Cuando las mazorcas alcanzan la madurez fisiológica, más del 70% son de color amarillo. En las semillas, se observa variación en el color del cotiledón. En los clones, el 85.19% de éstas son de color púrpura, en los híbridos el 54.84% presentan un cotiledón de color violeta y en los clones criollos el 81.82% es de color crema (Cuadro 1.3).

1.5.2. Características cuantitativas

Entre plantaciones, los rangos de variación son amplios especialmente para peso de la mazorca, y peso total de semillas por mazorca. La proporción de mesocarpo y el diámetro de la mazorca fueron los que mostraron menor variación entre las accesiones. El peso de la mazorca varió de 243.4 g (29476) a 1194.3 g (29752) con un promedio general de 528.4 g. El peso total de las semillas por mazorca fluctuó de 27.3 g (29736) a 178.3 g (29487). En relación al número de semillas por mazorcas se observaron desde 17 semillas (29545 y 29484) hasta 46 (29360 y 29561). El peso seco por semilla fue de 0.38 g a 1.46 g (Cuadro 1.4, Anexo 1.3).

Cuadro 1.4. Rangos de variación de características cuantitativas de la mazorca y la semilla de 170 muestras evaluadas en Tabasco, México

Caracter	Plantaciones (101*)			Bancos de germoplasma				
	Intervalo	Media	DE	Clones (27)	Híbridos (31)	Clones criollos (11)	Media	DE
PM	243.4-1194.3	718.8	672.3	170.9-691.8	310.4-746.8	259.3-528.2	451.2	69.5
LM	8.8-23.7	16.2	10.5	10.8-22.9	13.3-20.6	12.7-21.7	17.0	0.1
DM	6.8-11.4	9.1	3.5	5.7-9.1	6.8-9.6	6.6-8.5	7.7	0.4
ECM	8.3-28.1	18.2	14.0	8.5-18.3	8.1-20.2	9.9-15.1	13.3	0.8
PSM	5.3-18.1	11.7	9.0	4.4-13.1	4.5-15.9	5.7-10.7	9.0	1.0
RLDM	1.1-2.7	1.9	1.1	1.5-3.0	1.5-2.7	1.6-3.0	2.2	0.1
NSM	17.0-46.0	31.5	20.5	24.0-46.5	21.0-51.8	29.8-38.8	35.3	1.0

Cuadro 1.4. Continuación

Caracter	Plantaciones (101*)			Bancos de germoplasma				
	Intervalo	Media	DE	Clones (27)	Híbridos (31)	Clones criollos (11)	Media	DE
PTSM	27.3-178.3	102.8	106.7	37.7-186.3	69.9-196.0	52.9-140.7	113.9	18.1
PMM	0.6-0.9	0.7	0.2	0.6-0.8	0.5-0.8	0.7-0.8	0.7	0.1
SEMVAN	0.0-5.6	2.8	3.9	0.0-5.5	0.0-7.6	0.0-9.0	3.6	0.8
PHS	0.9-3.6	2.2	1.9	0.8-3.8	1.1-3.4	1.1-2.2	2.0	0.3
PSS	0.3-1.4	0.8	0.7	0.4-1.6	0.5-1.5	0.5-1.2	0.9	0.1
RPHPSS	1.3-4.5	2.9	2.2	1.4-3.8	1.5-2.9	1.6-2.1	2.2	0.3
DS	10.5-15.5	13.0	3.5	9.4-15.0	9.7-14.2	9.6-14.1	12.0	0.2
LS	18.8-26.9	22.8	5.7	19.0-27.6	21.8-26.6	18.6-25.4	23.1	1.1
ES	5.8-11.3	8.5	3.8	5.6-9.2	6.6-10.6	5.9-9.8	7.9	0.6
RLDS	1.5-2.1	1.9	0.6	1.7-2.3	1.7-2.3	1.6-2.0	1.9	0.1
IM	17.0-98.0	57.5	57.2		19.0-40.0	23.7-50.7	33.3	5.4

*Número de accesiones, DE=desviación estándar, PTSM=peso total de las semillas por mazorca, PMM=proporción del mesocarpo de la mazorca, SEMVAN=semillas vanas, PHS=peso húmedo de la semilla, PSS=peso seco de la semilla, RPHPSS=relación peso húmedo/peso seco de la semilla, DS=diámetro de la semilla, LS=largo de la semilla, ES=espesor de la semilla, RLDS=relación largo diámetro de la semilla, IM=Índice de mazorca.

Entre las accesiones de los bancos de germoplasma del CEHUI-INIFAP y la ex Finca El Danubio los rangos de variación fueron menos amplios. El peso de las mazorcas en los clones varió de 170.9 g (UF29) a 691.8 g (IMC67), el peso total de las semillas de 37.7 g (PORC3) a 186.3 g (OC77). El rango para el peso seco por semilla fue más amplio que el observado en plantaciones, de 0.48 g (clon IMC67) a 1.64 g (clon OC77).

En los híbridos el peso de la mazorca varió de 310.4 g (F30) a 746.8 g (DAN511), mientras que el peso total de las semillas de 69.9 g (DAN43) a 196.0 g (F20). En cuanto al peso seco por semilla fue de 0.54 g (DAN460) a 1.53 g (DAN386) (Cuadro 1.4). El peso de la mazorca en las

accesiones de criollos varió de 259.3 g (T3C) a 528.2 g (TF59), con un número de semillas por mazorcas de 29.8 g (RIM68) a 38.8 g (CRF6) y un peso total de las semillas de 52.9 g (TF45) a 140.7 g (TF59). Respecto al peso seco de las semillas éste va de 0.55 g (T3C) a 1.24 g (RIM68).

Los datos de productividad son fundamentales para la selección de accesiones productivas, para ello se registraron datos de número de mazorcas por árbol en aquellas donde fue posible realizar éste registro. Los resultados se resumen en el Cuadro 1.5 y muestran la diversidad que existe en estas características entre las accesiones evaluadas. El rendimiento potencial de cada accesión está en función del índice de mazorcas (IM) que indica el número de mazorcas requeridas para obtener un kilogramo de grano seco y la cantidad de semillas (IS) que integran el kilogramo. En el Anexo 1.4 se detallan los datos de cada accesión.

En el Cuadro 1.5 se observa que las 101 accesiones identificadas en las plantaciones en estudio, el 24.2% de ellas tienen un bajo potencial productivo por planta que va de 87.4 g a 477.7 g de semilla seca. El 31.5% pueden producir de 504.0 g hasta 990.9 g de semilla seca, pero el 44.2% de las accesiones tienen un alto potencial productivo ya que alcanzan a producir de 1025.2 g hasta 4055.8 g de grano seco por planta. Entre estas accesiones colectadas se encuentran la accesión 29487 que sobresale por el IM, donde con 17 mazorcas se puede obtener un kilogramo de grano seco, compuesto de 687 semillas.

Cuadro 1.5. Rango de variación de indicadores de producción de los morfotipos colectados en plantaciones y bancos de germoplasma de Tabasco, México.

Indicador	Plantaciones	Bancos de germoplasma	
		Clones criollos	Híbridos
PSS (g)	0.38-1.46	0.55-1.24	0.73-1.30
M/ARB	6.00-105.00	21.00-47.00	18.00-60.00
PSS/ARB (g)	87.49-4055.86	512.80-1741.80	462.59-2266.63
IS	687.00-2655.00	805.80-1834.90	771.35-1371.00
IM	17.00-98.00	23.70-50.70	19.00-40.00

PSS=Peso seco de semillas, M/ARB= Mazorcas por árbol, PSS/ARB=Peso seco de semillas por árbol, IS=Índice de semillas (cantidad de semillas que integran un kilogramo), IM=Índice de mazorca.

Entre las de alto potencial de producción está la 29745, con un peso seco de semillas por árbol (PSS/ARB) de 4055.8 g, que contrasta con la 29476 que produce sólo 87.4 g de semilla seca.

1.5.3. Análisis de componentes principales

El análisis de componentes principales (ACP) para las características del fruto evaluadas en las accesiones de los bancos de germoplasma estudiados mostró que los cuatro primeros componentes explican el 86 % de la variación morfológica observada entre las accesiones de cacao (Cuadro 1.6).

El primer componente contó para el 42 % de la variación total, y muestra a las características del fruto como peso, diámetro, espesor del caballete, profundidad del surco, proporción del pericarpio y grosor de la semilla como las de mayor peso en la variación total. El componente 2 explicó el 23 % de la variación entre las accesiones de cacao y representó principalmente a las características número y peso total de semillas por mazorca, y color del mucílago de la semilla.

El tercer componente (11% de la variación total) estuvo relacionado principalmente con características cualitativas como largo y profundidad del surco del fruto, grosor de la semilla y relación peso húmedo/peso seco de la semilla.

Cuadro 1.6. Variación explicada por cuatro componentes principales para características del fruto y semilla en todas las muestras incluidas en el estudio.

Característica	CP1	CP2	CP3	CP4
Valor propio	4.61	2.58	1.26	0.95
Proporción de varianza (%)	42	23	11	0.09
Varianza acumulada (%)	42	65	77	86
Peso mazorca (g)	0.41	0.25	-0.01	-0.02
Largo mazorca (g)	0.29	0.19	-0.40	0.38
Diámetro mazorca (g)	0.40	0.18	0.18	-0.15
Espesor del caballete (mm)	0.43	0.0047	0.17	-0.04
Profundidad del surco (mm)	0.36	0.14	0.43	-0.10
Número de semillas por fruto	-0.06	0.47	-0.24	-0.47
Peso total de semillas de mazorca (g)	0.02	0.56	-0.22	0.03
Proporción de mesocarpo en mazorca	0.34	-0.33	0.19	-0.02
Color del mucílago	-0.18	0.32	0.34	0.42
Relación peso húmedo/peso seco semilla	0.18	-0.27	-0.40	-0.44
Grosor de la semilla	0.29	-0.17	-0.41	0.49

La Figura 1.3 muestra el agrupamiento relativo de las accesiones de los bancos de germoplasma y plantaciones en función de las características que definieron cada componente principal, se observa una separación espacial entre ambos grupos de accesiones.

Las muestras de las plantaciones tienden a presentar características que definen al CP 1 como mayor peso de mazorca, espesor del caballete, peso de una semilla y proporción de mesocarpo, en cambio las accesiones del banco de germoplasma tienden a agruparse en el cuadrante superior izquierdo. La separación espacial de estas accesiones fue definida principalmente por las características número y peso total de semillas por mazorca y pigmentación del mucílago.

En la Figura 1.4 se desglosa el agrupamiento por tipo de accesión en los bancos de germoplasma. En este se puede apreciar que en los bancos de germoplasma sobresalen las accesiones DAN228, DAN134 y SCA6 por su mayor número de semillas por mazorca y un mucílago crema.

En contraste el híbrido F33 presenta mayor peso y diámetro de mazorca, espesor del caballete, profundidad del surco, peso total de semillas por mazorca y proporción de pericarpio. Las accesiones que se encuentran en los cuadrantes inferiores como POR3, UF700, HRMO17, DAN196, TF45, UF196 presentan menor número de semillas por mazorca y mucílago blanco.

Cuando se observa la distribución espacial de las accesiones de las plantaciones, algunas se ubican en el cuadrante superior izquierdo y derecho como 29561, 29487, 29392, 29745, 29376, 29775, 29758, 29749. Estas accesiones presentan alto número y peso total de semillas por mazorca y baja proporción de mesocarpo, lo que muestra que existen árboles en las plantaciones del estado que han logrado conjuntar características favorables del fruto y deberían ser conservados para estudios futuros de mejoramiento.

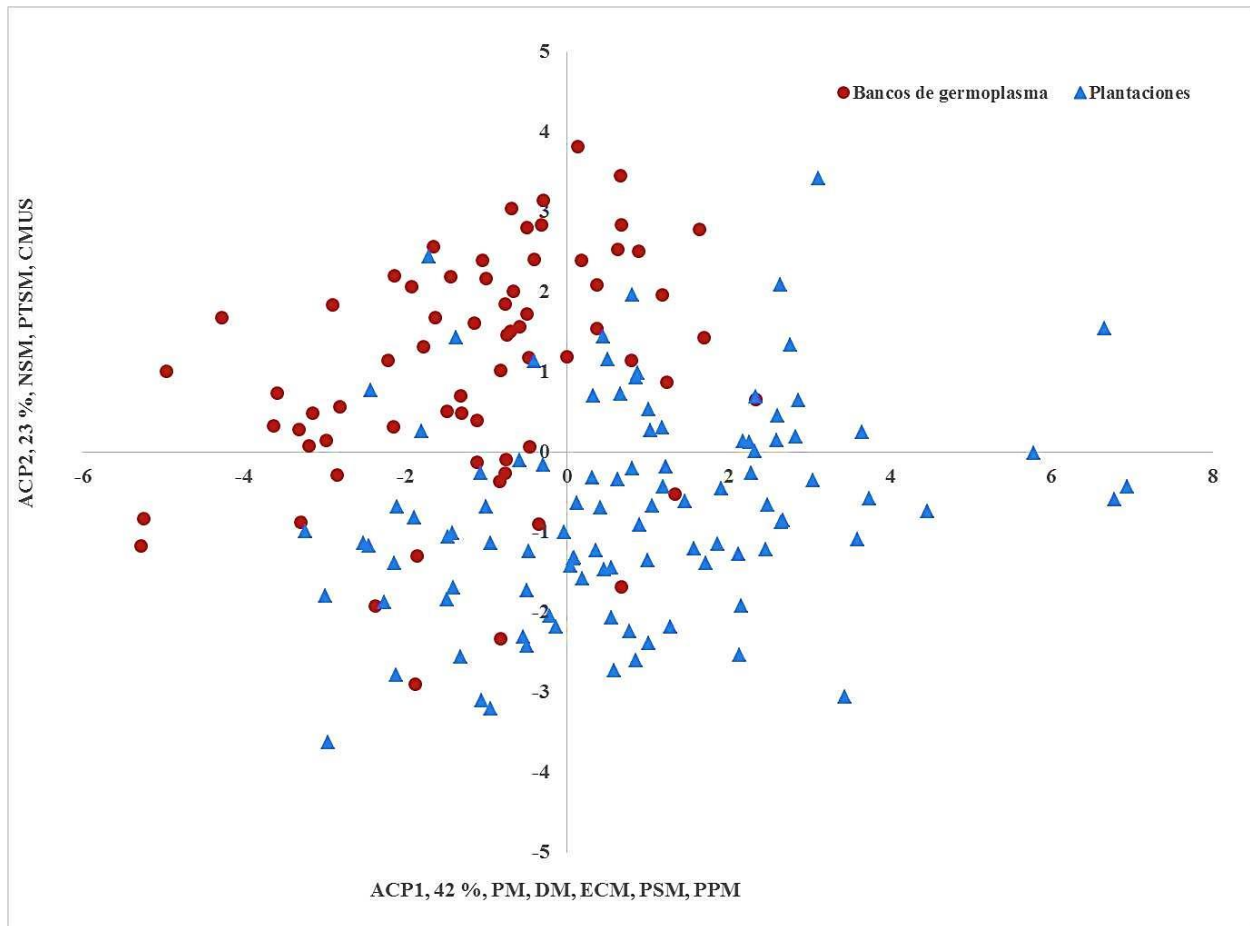


Figura 1.3. Diversidad morfológica revelada por el análisis de componentes principales de 170 accesiones de plantaciones y bancos de germoplasma de Tabasco, México.

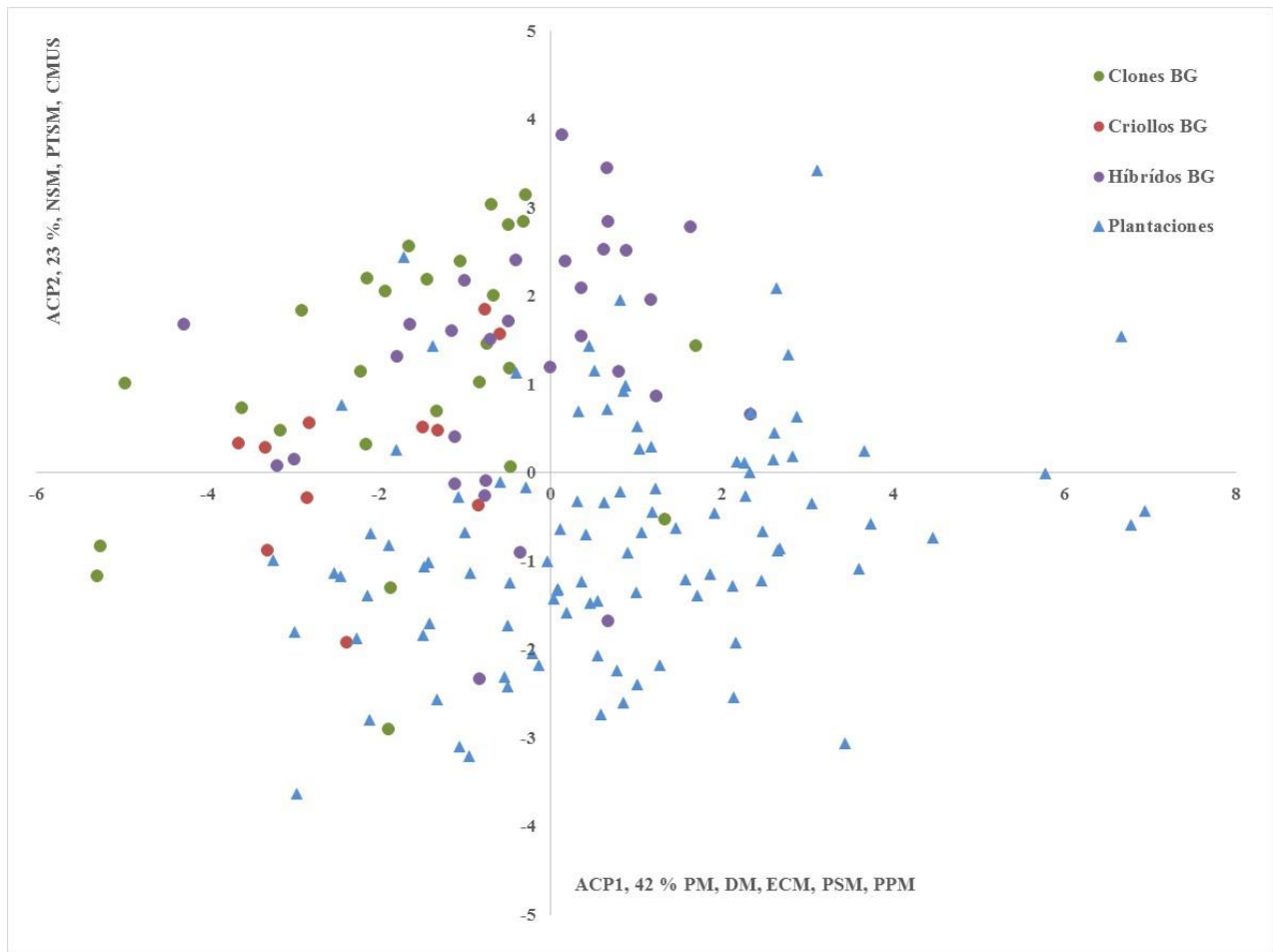


Figura 1.4. Distribución espacial de las accesiones Clones, Criollos e Híbridos de los bancos de germoplasma y plantaciones, revelada por el análisis de componentes principales, basada en características morfológica del fruto y semilla de cacao.

1.6. DISCUSION

El presente estudio reveló variación morfológica en las plantaciones y en los bancos de germoplasma caracterizados. Características relacionadas con la forma del fruto como peso, longitud y diámetro de mazorca presentaron rangos de variación más amplios en las plantaciones que los bancos de germoplasma.

De las ocho formas del fruto observadas en las plantaciones, la dominante fue cundeamor (>26 %) y amelonado (>20%) y en los bancos de germoplasma el angoleta (>30 %). Esta forma dominante del fruto observada en las plantaciones en estudio difiere de la mostrada en estudios previos. Hernández (1959) indicaba que en las plantaciones de cacao de Tabasco los frutos presentaban forma oblonga, rugosa y de color rojo. En nuestro estudio esta forma fue la menos frecuente.

En 1945, en Tabasco la formas predominante de fruto eran las de tipo criollo (Limón, 1945). En 1984m Alonso (1984) identificó que el tipo amelonado se encontraba presente en el 70% de las plantaciones, el calabacillo en un 24% y el criollo en un 6%, en tanto que, Yanes (1994) encontró que la forma amelonado o “guayaquil” era la dominante entre las plantaciones del estado, mientras que el calabacillo, ceylán, angoleta, cundeamor y los criollos eran de menor frecuencia. En esa época en la región de la Sierra se observaba la presencia de forma de mazorca criolla cuyas características eran alargadas con o sin constricción, ápice curvado, cáscara delgada, rugosa y con pigmentación, con 30 a 97% de semillas abultadas de cotiledones blancos (López *et al.*, 1989 y 1994a). En nuestro estudio la forma de mazorca criolla no fue observada entre las plantaciones, sin embargo la forma cundeamor tiende hacia la forma criolla. Avendaño-Arrazate *et al.* (2013) encontraron que en el estado de Chiapas la forma más frecuente del fruto de cacao es el elíptico, seguidos del abovado y oblongo; observaron plantas con potencial de alto rendimiento y tolerancia *M. royeri*. Estos autores observaron la presencia de tipos criollos de cotiledones color crema con forma de la mazorca oblonga en el estado de Oaxaca.

Una causa posible de no haber observado la forma criollo del fruto en las plantaciones en estudio es la erosión genética en esta especie en el estado, donde predominan actualmente las

plantaciones clonales. De hecho, en el año 2001, el 75% del área cacaotera del Plan Chontalpa en el municipio de Cárdenas, Tabasco, era ya principalmente cultivada con el tipo de cacao “guayaquil” o de frutos amelonados, y las formas de fruto calabacillo, ceylán, patastillo y cundeamor eran los de menor frecuencia (Córdova *et al.* 2001). Otra causa de la posible variación en las formas dominante del fruto es que para éste estudio se seleccionaron solo plantaciones provenientes de semilla, con edades entre 15 a 60 años, evitando las plantaciones clonales.

La diversidad en forma de fruto observada entre las plantaciones puede ser aprovechada en selección para mejora de la calidad. López *et al.* (2013a) mencionan que las características fisicoquímicas y sensoriales difieren entre las formas del fruto. El contenido de grasa va de 44.5% (angoleta), 44.2 % (amelonado) a 43.1 % (cundeamor y calabacillo). El perfil de aroma y sabor del cundeamor es poco sabor a chocolate, menor acidez y nula astringencia, en contraste el amelonado presenta un fuerte sabor a chocolate, menos ácido y ligero amargor.

La caracterización de las semillas permitió identificar tipos criollo, forastero y trinitario en las accesiones de las plantaciones y en los bancos de germoplasma de acuerdo a la clasificación del color del cotiledón de Ciferri y Ciferri (1957). Esta clasificación indica que el color púrpura de los cotiledones corresponde a los forasteros y el blanco a los criollos. El color blanco de cotiledón se observó en las accesiones 29761, 29552, 29553 y 29554.

Entre los tipos con tendencia a criollo por presentar cotiledones moteados (color crema con violeta) destacan las accesiones 29445 y 29352. Este color puede deberse a la hibridación presente en estas plantaciones por el modo de reproducción alógama del cacao (Cheesman, 1944), ya que la mosca polinizadora visita varias flores de diferentes plantas, intercambiando polen entre flores y plantas, incrementando la recombinación. Los polinizadores son atraídos en mayor cantidad por las flores del cacao criollo debido a la fragancia de los aceites esenciales que produce la flor (Young y Severson, 1994). Esto se notó en el RIM100 un cacao criollo.

En las plantaciones no se encontraron accesiones con forma de mazorca tipos criollo. Este tipo de cacao es susceptible a enfermedades y su rendimiento es notablemente bajo pero sus granos

son aromáticos (López *et al.*, 1996). Posiblemente por las características relacionadas con enfermedades y rendimiento de los tipos criollo, y a la necesidad de ser más competitivos en producción de cacao, en el estado de Tabasco, se inició una etapa de renovación de las plantaciones con materiales introducidos del tipo genético forastero y trinitario (Soria, 1961). Estos materiales introducidos se recombinaron con los materiales genéticos (los criollos) que antiguamente se domesticaron en la región, generando con el paso del tiempo la gran diversidad de morfotipos en las plantaciones, donde destacaron algunos árboles por su productividad.

Posteriormente esta renovación de plantaciones se incrementó. Durante los años de 1973 a 1989 la Comisión Nacional del Cacao (CONADECA) reguló los precios del cacao e impulsó la rehabilitación y el establecimiento de nuevas plantaciones a través de injertos, con materiales regionales seleccionados por su productividad (FPT, 2003; González, 2005). Esta actividad causó una disminución importante de las poblaciones nativas de cacao.

En 2009 se inició el Programa para el Desarrollo Rural Sustentable del Sur-Sureste: Trópico Húmedo (PTH), el cual impulsó el desarrollo de diversos cultivos tropicales, entre ellos, el cacao (Del Castillo, 2011). El programa hizo énfasis en el control de la moniliasis e impulsó la rehabilitación y renovación de plantaciones a través de injertos, con clones recomendados por productividad y adaptación a la región, estableciéndose 1,011 ha de cacao en el periodo 2009-2010. Durante 2012-2013 en Tabasco y Chiapas se establecieron 900 ha de nuevas plantaciones y se produjeron 1.3 millones de plantas para establecer 2,790 ha en 2014 (SAGARPA, 2013).

Actualmente los materiales recomendados para su cultivo en Tabasco son los híbridos: INIFAP1 (RIM76A X EET400), INIFAP4 (RIM75 X POUND7), INIFAP8 (RIM 76A X EE48) e INIFAP9 (RIM75 X SPA9) con rendimientos superiores a una tonelada por hectárea, y los clones criollos Carmelo C1 y Blanco Marfil. Para el patrón se recomiendan los clones IMC67 y SPA9, además, la variedad regional amelonado (López, 2011; López *et al.*, 2013c). Aun cuando esta actividad de renovación de plantaciones con clones se ha incrementado, también ha causado la pérdida de variación genética de esta especie en el estado. Sin embargo este estudio demuestra que aún existe diversidad a nivel morfológico para características del fruto y de la semilla que

puede ser conservada y aprovechada para la mejora de éste cultivo, previo estudios de seguimiento para conocer el efecto ambiental y el genético.

En cuanto al rendimiento de cacao, diversos estudios muestran que este no ha variado. En 1996, el promedio de producción por planta en el estado de Tabasco era de 1.1 kg de grano seco (López *et al.*, 1996). En 2001 el rendimiento en plantaciones jóvenes (17.4 años era de 400 a 600 kg ha⁻¹ de grano seco y en plantaciones viejas de 200 a 400 kg ha⁻¹ (Córdova *et al.*, 2001). Ramírez *et al.* (2010) indica que la capacidad máxima de producción de un árbol de cacao es de 197 frutos, de ellos, solo 70 llegan a la madurez, obteniéndose con ello hasta 1.6 kg de grano seco por planta. Esto concuerda con la variación observada para el peso total de semillas secas por planta entre las accesiones de las plantaciones evaluadas.

El 55.7% de las accesiones mostraron un rendimiento bajo con un rango de 87.4 g a 990.9 g de semilla seca por planta. Pero el 44.2% de las accesiones cuentan con un buen potencial productivo ya que se observaron rendimientos de 1025.2 g hasta 4055.8 g de grano seco por planta. Estos pueden considerarse materiales para selección e incorporarse a los programas de mejoramiento genético para incrementar rendimiento (Arciniegas, 2005), previa evaluación en años subsecuentes para confirmar su potencial productivo.

Los clones e híbridos establecidos en los bancos de germoplasmas de cacao, son importantes debido a que son accesiones utilizadas en los programas de mejoramiento genético del cacao. Cuando se realizan cruzamientos, la información de los caracteres de cada padre es fundamental, ya que la F1 que se desea obtener, debe contar con caracteres heredables sobresalientes en las características deseadas. Los híbridos de los bancos de germoplasma en estudio mostraron amplios rangos de variación en peso de mazorca y sobre todo en peso total de semillas por mazorca, reflejando la selección realizada. Esto los separa espacialmente de las accesiones de las plantaciones como se reveló por el análisis de componentes principales.

Algunas cruzas realizadas en el INIFAP utilizando los clones criollos e híbridos han sido estudiadas respecto a rendimiento y resistencia a enfermedades de importancia en Tabasco, entre ellas *Phytophthora* sp y *Moniliophthora roreri*. Entre los clones considerados criollos están los

clones RIM (López, 1995). Estos presentan un fruto de forma angoleta, cundeamor y pentágona, semirrugosa a rugosa, en estado inmaduro varía del rojo al verde, al madurar el color es amarillo. López *et al.* (2013b) indica que el fruto del clon ICS95 es un fruto elíptico, de color rojo al madurar y el cotiledón es de color púrpura, los del clon PA169 son elípticos, amarillos al madurar y el cotiledón de color púrpura intenso y los del clon UF273 son de forma abovado, al madurar el color es un rojo intenso y los cotiledones son de color púrpura intenso.

En nuestro estudio se observó que el fruto del clon ICS95 es de forma angoleta, de color rojo/amarillo al madurar y el cotiledón es de color púrpura; el del PA169 es de forma angoleta, al madurar es amarillo y el cotiledón de color púrpura, el del UF273 es elíptico, al madurar es de color anaranjado y el cotiledón es de color púrpura, el del POUND7 es de forma elíptico, al madurar tiene una coloración amarillo y el cotiledón es de color púrpura. En ambos trabajos se notan diferencias respecto a las formas de las mazorcas, es evidente que los frutos de la misma planta pueden ser variables en su forma morfológica, la cual puede estar afectada por las condiciones del medio, pero no para el color de los cotiledones. Phillips-Mora *et al.* (2012) describe la mazorca del clon ICS95 T1 de forma criollo, de color anaranjado con amarillo al madurar con cotiledones de color púrpura claro.

Los clones presentes en el banco de germoplasma del CEHUI-INIFAP han sido también evaluados en su respuesta a enfermedades. Bajo las condiciones ambientales de Tabasco, Ramírez y López (2012a) y Ramírez (2013) encontraron que el clon UF273 es resistente a *M. royeri* al igual que el híbrido F33. El clon ICS95 y PA169 son moderadamente resistente y el POUND7 moderadamente susceptible. La susceptibilidad del POUND7 a *M. royeri* había sido ya reportada por Arciniegas (2005). UF273, UF712, EET75 y PA169 presentaron menor incidencia de la enfermedad. Phillips-Mora *et al.* (2005) observó que el ICS95 fue significativamente resistente a siete variantes de *M. royeri*.

Al igual se han evaluado clones de este banco de germoplasma en busca de resistencia a *Phytophthora* spp. En Tabasco y norte de Chiapas *Phytophthora capsici* es la especie causante de la mazorca negra (Ortiz, 1996). López (1999) a través de inoculaciones de hojas encontró que los clones EE400, Catongo, CC225 y SCA12 fueron resistentes, mientras que Ramírez y López

(2012b) inoculando mazorcas, encontraron que el clon POUND7 fue resistente. Así dentro del banco de germoplasma, los clones ICS95, PA169 y UF273 son importante por su resistencia a *M. royeri* y el POUND7 resistente a *P. palmivora* y *P. capsici*. Phillips-Mora *et al.* (2012) destaca la importancia de los clones UF273 T1 y PA169 ya que indica que el cruce de estos produce descendientes precoces, productivos y resistentes a moniliasis.

El híbrido F33 es un material creado en México y destaca por su característica de resistencia a moniliasis (Ramírez, 2013), morfológicamente la mazorca es de forma amelonado, de color amarillo al madurar y los cotiledones son de color púrpura. En este caso, los padres producen mazorcas de forma elíptica, amarillos al madurar y el cotiledón es color púrpura en ambos. El número de semillas por mazorcas en los tres genotipos es similar: 37, 36.7 y 37.5 respectivamente, así como el peso seco por semillas (0.82, 0.71 y 0.72 respectivamente), notándose que el 29405 presenta semillas ligeramente más pesadas que ambos padres (Anexo 1.2 y 1.3).

La variación morfológica observada en las plantaciones y bancos de germoplasma para características de la mazorca puede ser afectada por el ambiente, como es el caso de la coloración de la mazorca. Bartley (2005) indica que el color rojo de la mazorca es expresado por un gen dominante en algunas poblaciones de criollos, debido a la presencia de antocianinas. Esta coloración que es influenciada por la cantidad de luz que recibe la mazorca durante su desarrollo.

En las accesiones estudiadas el color rojo se observó durante las primeras dos etapas de desarrollo de la mazorca en el clon Pentágono o “cacao lagarto” RIM68 del grupo de los criollos, lo que coincide con López, (1995) y Avendaño *et al.* (2011). En contraparte el clon TF45 del mismo tipo, durante su desarrollo es de coloración verde y al madurar toma una coloración verde/amarillo (Cuadro 1.3), por lo que entre los tipos pentágonas se pueden observar frutos rojos y verdes durante las primeras fases de desarrollo.

Estos resultados ponen de manifiesto la importancia de la información morfológica de las accesiones para uso adecuado del material conservado en los bancos de germoplasma. Así el

presente trabajo contribuye con información de cada accesión de los bancos de germoplasma del estado, los cuales pueden ser tomados en cuenta para decisiones futuras (Anexo 1.2 y 1.3).

Es evidente que las etapas de renovación de plantaciones han revolucionado y beneficiado al cultivo de cacao en Tabasco, homogenizando las plantaciones con genotipos productivos, pero en contraparte, desde el punto de vista genético, esta acción ha provocado la pérdida de morfotipos importantes. Debido a que estos programas no incluyen una evaluación agronómica o caracterización de los tipos de cacao de las plantaciones que permitan identificar y rescatar genotipos de importancia genética, la erosión genética de la especie en el estado es evidente.

Esto aunado a las plantaciones derribadas ex profeso por el productor debido a los daños tan severos causados por la moniliasis (*M. rozeri*), que hace económicamente no viable al cultivo. Por este motivo cerca de 1,000 ha de cacao han sido derribadas (Barrón *et al.*, 2014). En resumen el cultivo de cacao presenta actualmente plantaciones más homogéneas, mientras que su preservación y conservación genética no ha avanzado al mismo ritmo.

Finalmente, la caracterización de los frutos y semillas de los tipos de cacao que fueron reproducidos por semilla y que aún están presentes en las plantaciones del estado es un gran avance en el conocimiento de la diversidad morfológica de esta especie en Tabasco. De éste conocimiento se pueden generar materiales para futuros estudios para conservación y mejoramiento, al igual como se ha realizado entre accesiones de cacao Criollo Porcelana de Venezuela (Chacón de Ramírez *et al.*, 2011), plantaciones de Camerún (Efombagn *et al.*, 2009) y de Nigeria (Aikpokpodion, 2010), donde también se observa que características de interés agronómico como peso de semillas e índice de mazorca, son las que diferencian a las accesiones de bancos de germoplasma de las de plantaciones.

1.7. LITERATURA CITADA

- Aikpokpodion, P. O. 2010. Variation in agro-morphological characteristics of cacao, *Theobroma cacao* L. in farmers' fields in Nigeria. *New Zealand J. Crop Hort. Sc.* 38(2): 157-170.
- Alonso, V. R. 1984. Marco de referencia para la planeación y evaluación de la investigación agrícola en el cultivo del cacao en el estado de Tabasco. SARH, INIA, CIAGOC, CAEHUI. Huimanguillo, Tabasco, México. 106 p.
- Alverson W, S., B. Whitlock A., R. Nyfeller, C. Bayer and D. A. Baum. 1999. Phylogeny of the core Malvales: Evidence from *ndhF* sequence data. *Amer. J. Bot.* 86: 1474-1486.
- Arciniegas L., A. M. 2005. Caracterización de árboles superiores de cacao (*Theobroma cacao* L.) seleccionados por el programa de mejoramiento genético del CATIE. Tesis Msc., CATIE, Turrialba, Costa Rica. 126 p.
- Avendaño-Arrazate, C. H., A. Mendoza-López, E. Hernández-Gómez, G. López-Guillen, M. Martínez-Bolaños, J. F. Caballero-Pérez, S. Guillen-Díaz, y S. Espinoza-Zaragoza, 2013. Mejoramiento genético participativo en cacao (*Theobroma cacao* L.). *Agroproductividad* 6(5): 71-80.
- Avendaño, A. C. H., J. M. Villareal F., E. Campos R., R. A. Gallardo M., A. Mendoza L., J. F. Aguirre M., A. Sandoval E. y S. Espinoza Z. 2011. Diagnóstico del cacao en México. UACH. 78 p.
- Barrera, A., A. Gómez-Pompa y C. Vázquez-Yanez. 1977. El manejo de las selvas por los mayas: sus implicaciones agrícolas y silvícolas. *Bioética* 2(2) 47-61.
- Bartley, B. G. D. 2005. The genetic diversity of cacao and its utilization. CABI, London UK. 342 p.
- Barrón, G., Y. P., A. Azpeitia M., P. A. López A. y F. Mirafuentes-Hernández. 2014. Metodología adaptada para la formación de híbridos F1 de cacao (*Theobroma cacao* L.) en Tabasco. *Rev. Mex. de Cien. Agrí.* 5(5): 765-777.
- Bergmann, J. F. 1969. The distribution of cacao cultivation in Pre-Columbian America. *Ann. of the assoc. of amer. geographers* 59(1): 85-96.
- Bekele, F. and R. Buttler D. 2000. Proposed short list cocoa descriptors for characterization. *In:* Eskes, A. B. Engels, J. M. M.; Lass, R. A. eds. Working procedures for cocoa germplasm

- evaluation and selection (Proceedings of the CFC/ICCO/IPGRI project Workshop 1-6 February 1988-Montpellier, France). Rome, Italy. IPGRI. pp 41-48.
- Bekele, F. B., I. Bekele, D. R. Butler, and G. G. Bidaisee. 2006. Patterns of morphological variation in a sample of cacao (*Theobroma cacao* L.) germplasm from the International Cocoa Genebank, Trinidad. *Gen. Resour. Crop Evol.* 53: 933-948.
- Caso B, L. 2009. Huertos Q'eqchi': Comprobación actual de un agroecosistema prehispánico. *In: XXII Simposio de Investigaciones Arqueológicas en Guatemala, 2008* (editado por J.P. Laporte, B. Arroyo y H. Mejía), pp. 276-284. Museo Nacional de Arqueología y Etnología, Guatemala.
- Ciferri, R. and F. Ciferri. 1957. The Evolution of Cultivated Cacao. *Evol.* 11(4): 381-397.
- Cilas, C., R. Machado and J. C. Motamayor. 2010. Relations between several traits linked to sexual plant reproduction in *Theobroma cacao* L.: number of ovules per ovary, number of seeds per pod, and seed weight. *Tree Gen. Genomes* 6: 219-226.
- Córdova, A., V., M. Sánchez H., N. G. Estrella C., A. Macías L., E Sandoval C., T. Martínez S. and C. F. Ortiz G. 2001. Factores que afectan la producción de cacao (*Theobroma cacao* L.) en el ejido Francisco I Madero del Plan Chontalpa, Tabasco, México. *Univ. y Cien.* 17(34): 93-100.
- Coe, M. y S. Coe. 2013. La verdadera historia del chocolate. Trad. Marco Antonio Pulido Rull. Fondo de Cultura Económica, México. 396 p.
- Chacón de Ramírez, I., C. Ramis y C. Gómez. 2011. Descripción morfológica de frutos y semillas del cacao criollo Porcelana (*Theobroma cacao* L.) en el Sur del Lago Maracaibo. *Rev. Fac. Agron. (LUZ) Sup.* 28, 1: 1-13.
- Cheesman, E. 1944. Notes on the nomenclature, classification and possible relationships of cocoa populations. *Trop. Agric. (Trinidad)* 21(8): 114-159.
- Díaz, del C. B. 2006. Historia verdadera de la conquista de la Nueva España. Colección Literaria Universal, Editores Mexicanos Unidos, S. A. 773 p.
- Del Castillo C., P. E. 2011. El trópico mexicano: una potencia productiva. *AAPAUNAM* 2: 117-118.
- Efombagn, M. I. B., O. Sounigo, A. B. Eskes, J. C. Motamayor, M. J. Manzanares-Dauleux, R. Schnell, and S. Nyassé. 2009. Parentage analysis and outcrossing patterns in cacao (*Theobroma cacao* L.) farms in Cameroon. *Heredity* 103: 46-53.

- Engels, J. M. M., B. G. D. Bartley, and G. A. Enríquez. 1980. Cacao descriptor, their states and modus operandi. *Turrialba* 30(2): 209-218.
- Engels, J. M. M. 1981. Genetic resources of cacao: a catalogue of the CATIE collection. Turrialba, C. R., CATIE Plant Gen. Resources Unit. 169 p.
- Engels, J. M. M. 1983a. A systematic description of cacao clones. I. The discriminative value of quantitative characteristics. *Euphytica* 32: 377-385.
- Engels, J. M. M. 1983b. A systematic description of cacao clones. II. The discriminative value of qualitative characteristics and the practical compatibility of the discriminative value of quantitative and qualitative descriptors. *Euphytica* 32: 387-396.
- Engels, J. M. M., A. W. Ebert., I. Thormann, and M. C. de Vicente. 2006. Centres of crop diversity and/or origin, genetically modified crops and implications for plant genetic resources conservation. *Gen. Resour. Crop Evol.* 53: 1675-1688.
- Enríquez, C, G. A. 1966. Selección y estudio de los caracteres de la flor, la hoja y la mazorca, útiles para la identificación y descripción de cultivares de cacao. Tesis Mag. Sc. Turrialba, Costa Rica. IICA de la OEA. 97 p.
- Enríquez, G. A. 1985. Curso sobre el cultivo de cacao. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 239 p.
- Fundación Produce Tabasco (FPT, A. C.), 2003. Programa estratégico de necesidades de investigación y transferencia de tecnología para la cadena agroindustrial cacao en México. Foro nacional cacaotero, 25 y 26 de febrero del 2003, Villahermosa, Tabasco. 122 p.
- García C, L. F. 2010. Catálogo de cultivares de cacao del Perú. Ministerio de agricultura, DEVIDA. Lima, Perú. 108 p.
- Gómez-Pompa, A. 1987. On maya silviculture. *Estudios mexicanos* 3(1): 1-17.
- Gómez-Pompa, A., J. Salvador F., and M. Aliphath F. 1990. The sacred cacao groves of the maya. *Lat. Amer. Ant.* 1(3): 247-257.
- González L., V. W. 2005. Cacao en México: competitividad y medio ambiente con alianzas (diagnóstico rápido de producción y mercadeo). USAID. 80 p.
- Hernández, F. 1959. Obras completas, historia natural de nueva España. vol. 1. UNAM, México. 980 p.
- International Board for Plant Genetic Resources, IT (IBPGR). 1980. Working group on genetic resources of cocoa: report. IBPGR, Rome, Italy. 30 p. (AGP/IBPGR/80/56).

- Johnson, E. S., A. Mora, and R. J. Schnell. 2007. Field Guide efficacy in the identification of reallocated clonally propagated accessions of cacao (*Theobroma cacao* L.). Genet. Resour. Crop Evol. 54: 1301-1313.
- Kuppers, J. R. 1953. Some biometric observations on cacao fruit. Science, New Series 117(3040): 354-355.
- Lachenaud, P., F. Bonnot, and G. Oliver. 1999. Use of floral descriptors to study variability in wild cocoa trees (*Theobroma cacao* L.) in French Guiana. Genet. Resour. Crop Evol. 46: 491-500.
- Lachenaud, P. and G. Oliver. 2005. Variability and selection for morphological bean traits in wild cocoa trees (*Theobroma cacao* L.) from French Guiana. Genet. Resour. Crop Evol. 52: 225-231.
- Limón B. B. 1945. Algunas enfermedades fungosas del cacaotero en Tabasco. Tesis de licenciatura. Escuela Nacional de Agricultura. México, D. F. 59 p. y anexos.
- López, A., P. 1994a. Colecta y descripción de germoplasma de cacao criollo *Theobroma cacao* L. en Tabasco, México. En: Memoria de la Séptima Reunión Científica, Forestal y Agropecuaria. CIFAP-Tabasco. Villahermosa, Tabasco, México. pp. 1-3.
- López, A., P. 1994b. Selección de dos clones de cacao *Theobroma cacao* L. de alta producción en Tabasco, México. En: Memoria de la Séptima Reunión Científica, Forestal y Agropecuaria. CIFAP-Tabasco. Villahermosa, Tabasco, México. pp. 4-5.
- López, A., P., R. Olgún, and A. Azpeitia M. 1995. Calidad física y química de 20 clones de cacao en Comalcalco, Tabasco. En: Octava Reunión Científica 1995. Villahermosa, Tabasco. pp. 1-2.
- López, A., P. A., V. H. Delgado N. y A. Azpeitia M. 1996. El cacao *Theobroma cacao* L. en Tabasco. Libro técnico 1, INIFAP. 270 p.
- López, A., P. A. 1999. Selección de cultivares de cacao con resistencia a *Phytophthora capsici* Leonian emend. Alizadeh & Tsao. Tesis de Mc. Colegio de Postgraduados, H. Cárdenas, Tabasco, México. 62 p.
- López, A., P. A. 2011. Paquete tecnológico cacao (*Theobroma cacao* L.). Producción de planta. Programa estratégico para el desarrollo rural sustentable de la región sur-sureste de México: Trópico húmedo 2011. SAGARPA, INIFAP. México. 10 p.

- López, A., P. A., M. A. Ramírez G. y C. Hernández H. 2011. Conservación de recursos genéticos de cacao en Tabasco. *In: Memoria de la XXIII Reunión Científica-Tecnológica Forestal y Agropecuaria*. Villahermosa, Tabasco. pp. 250-256.
- López, A., P. A., C. Hernández H. y M. A. Ramírez G. 2013a. Caracterización de las variedades de cacao en Tabasco. SAGARPA, INIFAP. Folleto técnico 74. 25 p.
- López, A., P. A., C. H. Avendaño A., M. A. Ramírez G., C. Hernández H., M. C. López N, y A. Mendoza L. 2013b. Catálogo de clones de cacao resistente a la monilia y de alta productividad. Publicación Especial 9, SAGARPA, INIFAP. 37 p.
- López, A. P. A., M. A. Ramírez G., y C. Hernández H. 2013c. Propagación y manejo de plantaciones de clones de cacao en Tabasco. SAGARPA, INIFAP. Folleto técnico 73. 25 p.
- López, O., J. Mulato y J. I. López. 1989. Recolección de germoplasma de cacao (*Theobroma cacao* L.) en México. *Plant Genetic Resou. Newsletter* 80: 23-24.
- López, B. O. 1995. Características del fruto del germoplasma de cacao, *Theobroma cacao* L. seleccionado en Rosario Izapa, Chiapas. *Agric. Téc. Méx.* 21(2): 127-137.
- Marcano, M., S. Morales, M. T. Hoyer, B. Courtois, A. M. Risterucci, O. Fouet, T. Pugh, E. Cros, V. González, M. Dagert, and C. Lanaud. 2009. A genome wide and mixture mapping study for yield factors and morphological traits in a cultivated cocoa (*Theobroma cacao* L.) population. *Tree Genetics & Genomes* 5: 329-337.
- Motamayor, J.C., P. Lachenaud, J. Wallace, G. Loor, D. N. Kuhn, J. S. Brown, and R. J. Schnell. 2008. Geographic and genetic population differentiation of the Amazonian chocolate tree. *PLoS One* 3: e3311. doi:10.1007/s12042-008-9011-4.
- Motamayor, J. C., A. M. Risterucci, V. Laurent, A. Moreno, and C. Lanaud. 2000. The genetic diversity of criollo cacao and its consequence in quality breeding. *In: Memoria del primer congreso venezolano del cacao y su industria*. Maracay, Venezuela. pp 33-56.
- Ortiz, G. C. F. 1996. Étude de la diversité génétique de populations de *Phytophthora* pathogènes du cacaoyer (*Theobroma cacao* L.) et du cocotier (*Cocos nucifera* L.). Thèse Doctoral. Université Paul Sabatier Toulouse, Francia. 85 p.
- Pinzón, U., J. O. y J. Rojas A. 2008. Guía técnica para el cultivo del cacao. 3ed. Bogotá, Colombia. FEDECACAO. 189 p.

- Pound, F. J. 1932. The genetic constitution of cacao crops 1. Pp 9-26 *In*: Annual Report of Cacao Research 1931-1945. Imperial College of Tropical. Agriculture, Trinidad, TT.
- Powis, T. G., A. Cypher, N. W. Gaikwad, L. Grivetti, and K. Cheong. 2011. Cacao use and the San Lorenzo Olmec. PNAS 108(21): 8595-8600.
- Phillips, W. y G. A. Enríquez. 1988. Catalogo cultivares de cacao. Turrialba, Costa Rica. CATIE. CR. 12 p.
- Phillips-Mora, W., J. Castillo, U. Krauss, E. Rodríguez, and M. J. Wilkinson. 2005. Evaluation of cacao (*Theobroma cacao*) clones against seven Colombian isolates of *Moniliophthora roreri* from four pathogen genetic groups. Plant Pathol. 54: 483-490.
- Phillips-Mora, W., A. Arciniegas L, A. Mata Q. y J. C. Motamayor A. 2012. Catálogo de clones de cacao seleccionados por el CATIE para siembras comerciales. Manual técnico 105 CATIE. Turrialba, Costa Rica. 68 p.
- Ramírez, G., M. A., P. A. López A. y C. G. Rodríguez Q. 2010. Selección de germoplasma nativo de *Theobroma cacao* L. con tolerancia promisorio a *Moniliophthora roreri*. *In*: Memoria de la XXII Reunión Científica-Tecnológica Forestal y Agropecuaria, pp 390-399.
- Ramírez-Guillermo, M. A. y P. A. López-Andrade. 2012a. Reacción de dos clones “Conadeca” de cacao (*Theobroma cacao* L.) inoculados artificialmente con *Moniliophthora roreri* causal de la moniliasis del cacao. *In*: Memoria del I Simposium Internacional en Producción Agroalimentaria Tropical y XXIV Reunión Científica-Tecnológica Forestal y Agropecuaria. pp 610-618.
- Ramírez-Guillermo, M. A. y P. A. López A. 2012b. Reacción de dos clones “Conadeca” de cacao (*Theobroma cacao* L.) inoculados artificialmente con *Phytophthora* sp causal de la mazorca negra. *In*: Memoria del I Simposium Internacional en Producción Agroalimentaria Tropical y XXIV Reunión Científica-Tecnológica Forestal y Agropecuaria. pp 468-477.
- Ramírez, G., M. A. 2013. Selección y evaluación de germoplasma nativo tolerantes a la moniliasis del cacao en las regiones cacaoteras de Tabasco. Informe final de proyecto, Fundación Produce Tabasco-INIFAP. 23p.

- Santos, R. C., J. L. Pires, and R. X. Correa. 2012. Morphological characterization of leaf, flower, fruit and seed traits among Brazilian *Theobroma* L. species. *Genet. Resour. Crop Evol.* 59: 327-345.
- SIAP. 2014a. www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-estado/. Consultado el 14/08/2014.
- SIAP. 2014b. www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-cultivo/ Consultado el 14/08/2014
- SAS, Institute. (2010). User's Guide: Statistics, version 9.3. SAS Inst. Inc. Cary, N.C. USA.
- Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), 2013. 1er Informe de labores 2012-2013. México, D. F. 149 p.
- Soria, V., J. 1961. Anotaciones sobre un viaje a las zonas productoras de cacao en México. Turrialba (mimeografiado) pp 1-18.
- Soria, V., J. y G. A. Enríquez. 1981. International cacao cultivar catalogue. ACRI, CATIE. Turrialba, C. R. 156 p.
- Thomas, E., M. van Zonneveld, J. Loo, T. Hodgkin, G. Galluzzi, and J. van Etten. 2012. Present spatial diversity patterns of *Theobroma cacao* L. in the Neotropics reflect genetic differentiation in pleistocene refugia followed by human-influenced dispersal. *PLoS ONE* 7(10): e47676. doi:10.1371/journal.pone.0047676.
- ten Hoppen, G. M., P. Deberdt, M. Mbenoun, and C. Cilas. 2012. Modelling cacao pod growth: implications for disease control. *Ann. Appl. Biol.* 160: 260-272.
- Yanes, G., M. 1994. El cacao: origen, cultivo e industrialización en Tabasco. DACA-UJAT. 87 p.
- Young, A. M. and D. W. Severson. 1994. Comparative analysis of steam distilled floral oils of cacao cultivars (*Theobroma cacao* L., sterculiaceae) and attraction of flying insects: implications for a *Theobroma* pollination syndrome. *J. Chem. Ecol.* 20(10): 2687-2703.

CAPÍTULO II

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE GENOTIPOS DE CACAO *Theobroma cacao* L. EN PLANTACIONES Y BANCOS DE GERMOPLASMA DE TABASCO, MÉXICO

2.1. RESUMEN

En México, el cultivo de cacao presenta una herencia ancestral y Tabasco es el principal productor de cacao (*Theobroma cacao* L.), por lo que el conocimiento de la diversidad genética de esta población contribuirá en el rescate, conservación y utilización de los mejores materiales en los programas de mejoramiento. El objetivo fue estimar el nivel de diversidad genética en la población estudiada, entre plantaciones (PL) y los bancos de germoplasma (BGC) de Tabasco. Se emplearon 19 microsatélites para la huella genética de 338 plantas y 110 accesiones de BGC partir del ADN foliar. En PL se observó un total de 76 alelos, en promedio 4 alelos/locus, a diferencia en BGC fue de 132 alelos con 6.95 alelos/locus. Los mTcCIR6, 8 y 33 fueron polimórficos en PL y los mTcCIR37, 33, 15 y 11 en BGC. Tres nuevos alelos se identificaron haciendo que la población de Tabasco difiera de las otras en estudio. El nivel de heterocigosidad en PL ($H_o=0.473$) es menor que en BGC ($H_o=0.729$), y también el nivel de diversidad genética (PL $H_e=0.386$ y BGC $H_e=0.661$). El ACP separó al cacao de PL de los 10 grupos genéticos de cacao. La población de cacao de Tabasco es morfológica y genéticamente diversa y diferente, por lo que requiere ser conservada para su uso en la mejora genética del cacao de Tabasco.

Palabras clave: *Theobroma cacao*, diversidad genética, plantaciones, banco de germoplasma, Tabasco, alelo nuevo

2.2. ABSTRACT

In Mexico, the State of Tabasco has the major cultivated area of cacao (*Theobroma cacao* L.). Knowledge of the diversity genetic of cacao in farmers' fields of Tabasco will contribute to the rescue, conservation, and use of the better materials in breeding improvement programs. The main objective was estimate the genetic diversity level in farmers' fields (FF) and germplasm collection (GC) from Tabasco. 19 microsatellite markers were employed to fingerprint 338 FF selections and 110 GC accessions from foliar DNA. 76 alleles with an average of four alleles per locus were observed within FF in contrast with 132 alleles with an average of 6.95 alleles per locus observed within GC. The mTcCIR6, 8, and 33 in FF and mTcCIR37, 33, 15, and 11 in GC were polymorphic. The identification of three new alleles, determinate the difference of population from Tabasco. The heterozygosis level in FF ($H_o=0.473$) is smaller than GC ($H_o=0.729$). Also, the genetic diversity level in FF ($H_e=386$) is smaller than BGC ($H_e=661$). The cacao from local farmers of Tabasco is genetically diverse and different, so it needs to be preserved for use in genetic improvement of cacao Tabasco.

Key words: *Theobroma cacao*, genetic diversity, farmers' fields, germplasm collection, Tabasco, new allele.

2.3. INTRODUCCIÓN

Cacao (*Theobroma cacao* L.) es un importante cultivo tropical nativo de Sudamérica (Cuatrecasas, 1964). La especie es subdividida en tres grupos genéticos: Forasteros [*Theobroma cacao* L. subespecie *sphaerocarpum* (Chevalier) Cuatr.], Criollos [*Theobroma cacao* L. subespecie *cacao*] y los Trinitarios o criollos modernos, originados por el cruzamiento entre el Forastero y el Criollo (Cheesman, 1944; Cuatrecasas, 1964).

T. cacao es la única especie de importancia comercial de este género, e indispensable en la industria del chocolate. A nivel mundial se ha observado un aumento de 13 % en la producción mundial de cacao siendo el continente africano el que produce el 68% (WCF, 2014). Los consumidores han incrementado su demanda de chocolate de alta calidad, especialmente el chocolate negro que contiene una alta proporción de cacao. El mercado considera al cacao Forastero como un cacao ordinario o corriente; al Criollo como cacao fino de alta calidad por sus sabores frutales y aromáticos y al Trinitario como cacao de sabor fino. Una excepción es el cacao Nacional de Ecuador que es un tipo Forastero pero sus atributos lo clasifican dentro de los cacaos finos. Sin embargo la producción de cacao fino es menos del 5 % de la producción mundial, debido a la baja productividad y susceptibilidad a enfermedades en estas plantas (Argout *et al.*, 2011).

El reto actual del cultivo de cacao es incrementar los rendimientos buscando genotipos con tolerancia a factores bióticos y abióticos y mejorando la calidad hacia la búsqueda de cacaos finos (criollos), conservando la sustentabilidad del sistema. Por ello los programas de mejoramiento del cacao están orientados a la búsqueda e identificación de genotipos criollos superiores quienes aportarían el cacao fino. La caracterización a través de descriptores morfológicos para identificar atributos agronómicos y conocer la diversidad genética de las poblaciones es una etapa crucial (Engels *et al.*, 1980; Arciniegas, 2005; Bekele *et al.*, 2006; López *et al.*, 2013). Los avances científicos han permitido incorporar técnicas moleculares para precisar el mejoramiento y reducir el tiempo de selección de genotipos superiores.

El uso de SSR o secuencias simples repetidas ha permitido diferenciar los diferentes grupos genéticos y conocer su variación alélica (Lanaud *et al.*, 1999; Saunders *et al.*, 2004). Por ello, el análisis de la diversidad genética de cacao en plantaciones y bancos de germoplasma utilizando 15 SSR se ha incrementado, debido al alto grado de polimorfismo que revelan (Motamayor *et al.*, 2002; Motamayor *et al.*, 2003; Motamayor *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2009; Trognitz *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2012; Boza *et al.*, 2014).

En Tabasco, México la cultura del cacao procede desde antes de la época Pre-Colombina (Powis *et al.*, 2011). La región de la Chontalpa fue la zona de mayor producción de cacao e importancia, donde predominaron genotipos Criollos. Actualmente se observa una variabilidad morfológica de las mazorcas (ver capítulo I), debido probablemente a la recombinación de tipos Forasteros introducidos y Criollos nativos.

El cultivo de *T. cacao* en el Estado es importante, de él dependen 31, 139 familias (SIAP, 2014b), es afectado por enfermedades que limitan la producción (López, 1993; Ortiz, 1996; Phillips-Mora *et al.*, 2006), por lo que es necesario generar estrategias de mejoramiento para reducir los efectos de los factores bióticos y abióticos limitante de su producción.

Se desconoce diversidad genética existente actualmente en las plantaciones del Estado, y solo se ha definido por su fenotipo (ver Capítulo I), sin embargo, este es afectado por factores ambientales. Por ello se planteó la presente investigación, con la finalidad de generar información genética de la diversidad de los tipos de cacao presentes en el estado de Tabasco utilizando para ello marcadores moleculares tipo microsatélites.

2.3.1. Diversidad genética de *T. cacao*

Theobroma cacao es una especie alógama, de polinización entomófila y su número cromosómico es de $2n=20$ (Muñoz, 1948; Martinson, 1975; Dantas y Guerra, 2010). Su genoma es pequeño con una cantidad de ADN por núcleo haploide de 0.43 pg equivalente a 415,000 kbp (Figueira *et al.*, 1992).

A través de estudios moleculares, se ha determinado que en la región del Alto Amazonas (Brasil, Perú, Ecuador y Colombia) y Bajo Amazonas (Guyana, Venezuela y Brasil) se encuentra la mayor diversidad de la especie de *Theobroma* (Cheesman, 1944; Bartley, 2005). Diez grupos genéticos se han identificado: Marañón, Curaray, Criollo, Iquitos, Nanay, Contamana, Amelonado, Purús, Nacional y Guiana (Motamayor *et al.*, 2008).

Estos grupos fueron distribuidos desde su sitio de diversidad hasta los sitios de refugio en Mesoamérica a través de las actividades humanas (Motamayor *et al.*, 2002; Motamayor *et al.*, 2008; Thomas *et al.*, 2012). Se presume que solo hay un sitio de origen de la especie de *T. cacao* L. subespecie *cacao* (criollo: México y Centroamérica) ya que la forma *Theobroma cacao* subespecie *cacao* forma *lacandonense* Cuatr., identificado en México es similar genéticamente a los de Sudamérica (Lanaud, 1987; Figueira *et al.*, 1994; Whitkus *et al.*, 1998; Laurent *et al.*, 1994; Motamayor y Lanaud, 2002; Motamayor *et al.*, 2002, 2003; Clement *et al.*, 2003; Bekele, 2004; Sereno *et al.*, 2006).

Fue domesticado por los antiguos Mokayas, Olmecas y Mayas quienes habitaron en la región sur del trópico húmedo de México (Engels *et al.*, 2006; Powis *et al.*, 2011).

En poblaciones silvestres y cultivadas, los tipos Forasteros del Alto Amazonas son heterogéneos predominando las formas de fruto angoleta, cundeamor y calabacillo, y en el Bajo Amazonas únicamente el tipo amelonado. El cacao tipo Criollo fue el más cultivado en Centroamérica y México, el cual se cruzó con el tipo Forastero originando los Trinitarios en Trinidad y Tobago desde 1752. A partir de 1950, los Forastero del Alto Amazonas fueron empleados en los programas de mejoramiento y se han distribuidos a todas las zonas productoras de cacao a nivel mundial, originando nuevas cruces con las poblaciones existentes en las zonas.

En Brasil, los tipos Forasteros del Alto Amazonas son muy diversos a diferencia de los del Bajo Amazonas predominando el tipo amelonado. En este país las plantaciones conocidas como *cacao comum* de la región de Bahia, tuvieron su origen en el Sureste del Bajo Amazonas. Estudios recientes han propuesto al área del Alto Amazonas de Brasil como el centro de la diversidad de la especie de *Theobroma* (Sereno *et al.*, 2006; Lopes *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2011).

Las poblaciones silvestres y semidomesticadas del Valle del Huallaga y Ucayali de Perú, genéticamente son las poblaciones más diversas, hasta ahora encontradas (Zhang *et al.*, 2006a).

El tipo de cacao conocido como Refractario, un híbrido de la cruce del tipo Nacional de Ecuador con otra variedad desconocida, es similar a los nativos del Amazonas de Ecuador los cuales son diversos y difieren de los tipos Forasteros, Criollos y Trinitarios (Quiroz, 2002; Zhang *et al.*, 2007, 2011; Loor *et al.*, 2009, 2012).

En Bolivia, el Cacao Nacional Boliviano es similar genéticamente a los tipos silvestres de la margen del río Beni; poblaciones que aún permanecen puros y diferentes a los Forasteros y Trinitarios del Amazonas (Zhang *et al.*, 2011; Chumacero *et al.*, 2013).

En Mesoamérica en donde se establecieron las primeras plantaciones de cacao, también se ha determinado la diversidad genética existente. En Nicaragua existe un bajo a moderado nivel de diversidad predominando mayormente poblaciones del tipo Trinitario, en menor grado el tipo Forastero y los tipos Criollos son relativamente muy bajos (Ruiz *et al.*, 2011; Trognitz *et al.*, 2011).

En Honduras, las poblaciones dominantes corresponden a los tipos Trinitarios, pero diferentes a los Trinitarios cultivados en Nicaragua. Ambos países cultivan la variedad regional conocida como “*Indio*” que genéticamente corresponde al tipo Amelonado Forastero del Bajo Amazonas. Esta variedad “*Indio*” se ha cruzado con los Trinitarios formando nuevos híbridos (Ji *et al.*, 2012).

En Belice, la diversidad de los tipos Criollo asciende a once genotipos genéticamente diferente (Motilal *et al.*, 2010).

En México, la población de cacao Criollo corresponde a dos grupos diferentes, genéticamente es similar a los del Amazonas (Cuatrecasas, 1964; Gómez-Pompa *et al.*, 1990; De la Cruz *et al.*, 1995; Whitkus *et al.*, 1998; Motamayor *et al.*, 2002). La hipótesis de un tercer grupo se puede fundamentar con las descripciones de Miranda (1962).

Las variedades cultivadas actualmente en Trinidad y Tobago corresponden al tipo Trinitario, destacando los clones ICS y TRD híbridos descendientes de los tipos Criollos y Forasteros del Alto Amazonas (Cheesman, 1944; Johnson *et al.*, 2009; Maharaj *et al.*, 2011). En República Dominicana, los tipos Amelonados predominan en las plantaciones, los Trinitarios y Criollos son menos frecuentes (Boza *et al.*, 2013). En Guyana Francesa se ha observado la diversidad intrapoblacional en los cacaos nativos existentes en la zona (Lachenaud y Zhang, 2008).

Las plantaciones del Oeste de África son de baja diversidad, provienen genéticamente de poblaciones del Bajo Amazonas. Un cambio se observa particularmente en las plantaciones de Nigeria, donde se reportan genotipos emparentados con las del Alto Amazonas y de los tipos Trinitarios (Aikpokpodion *et al.*, 2009). En Camerún, las poblaciones corresponden a los Forasteros del Bajo Amazonas y la presencia de los Trinitarios es bajo (Efombagn *et al.*, 2008). A diferencia, en Costa de Marfil se encuentran plantaciones de Forasteros del Alto y Bajo Amazonas, así como tipos Trinitarios (Pokou *et al.*, 2009).

Los criollos de Java son genotípicamente heterocigóticos, indicando que se originaron a través de cruces (Susilo *et al.*, 2011). En Indonesia, la diversidad genética del cacao corresponde a los tipos Forasteros, Criollos y Trinitarios (Susilo *et al.*, (2013).

Los bancos de germoplasma resguardan parte de esta diversidad de cacao del mundo. Su función es clave para la conservación *in situ* y *ex situ* de los recursos genéticos de cacao y su uso adecuado en los programas de mejoramiento.

El estudio de las accesiones en los bancos de germoplasmas ha contribuido con la documentación y corroboración de los materiales que estas resguardan, entre ellas el CATIE en Costa Rica y el Banco-Genético Internacional de Cacao de Trinidad (ICGT), la colección TARS del USDA-ARS de Mayaguez, Puerto Rico, el banco de germoplasma del Centro de Investigación Agrícola de Hawaii, USA y la colección del CRIG de Ghana.

Esto ha generado información de importancia para dichos sitios, permitiendo el monitoreo de la integridad y riqueza genética que en estas existen; se ha monitoreado la integridad genética de plantas reproducidas en cultivos *in vitro* para identificar plantas mutantes o quimeras (Engels 1986; Laurent *et al.*, 1994; Lerceteau *et al.*, 1997; Lanaud *et al.*, 1999; N'Goran *et al.*, 2000; Sounigo *et al.*, 2005; Motilal y Butler, 2003; Rodríguez *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2006b; Boccara y Zhang, 2006; Cryer *et al.*, 2006; Johnson *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2009a; Nagai *et al.*, 2009; Irish *et al.*, 2010; Laliberté *et al.*, 2012; Takrama *et al.*, 2014).

Actualmente existen sitios en donde se pueden consultar los resultados, entre ellos el International Cocoa Germplasm Database (ICGD) y en CocoaGenDB (Guiltinan *et al.*, 2008); o en su caso los catálogos, que muestran y describen los clones, sus atributos y huella genética (Johnson *et al.*, 2004, 2007; Phillips-Mora *et al.*, 2012).

2.3.2. Caracterización molecular

Un marcador molecular se define como un segmento de ADN considerado como punto de referencia al analizar sitios específicos del genoma, una región de un cromosoma, donde su comportamiento es regido por las leyes de la herencia mendeliana; demostrando la variación, mayor segregación o polimorfismo, en la misma región del genoma entre organismos de la misma especie; considerándose libres de efectos epistáticos (Phillips-Mora *et al.*, 1995).

Los primeros marcadores utilizados en estudios de diversidad genética y construcción de mapas de ligamiento del cacao fueron las isoenzimas (Lanaud, 1986; Ronning y Schnell, 1994; Lachenaud y Zhang, 2008). Posteriormente se incorporaron a los estudios técnicas moleculares con los RFLPs (Figueira *et al.*, 1992; Laurent *et al.*, 1994; N'Goran., *et al.*, 2000) y los RAPDs (Figueira *et al.*, 1994; Russell *et al.*, 1993; Wilde *et al.*, 1992; Ronning *et al.*, 1995).

Los SSR conocidos como microsatélites son regiones de secuencias pequeñas (dos a 10 pares de bases) repetidas, arregladas en serie y distribuidas al azar en el ADN. La detección del polimorfismo se realiza a través de la PCR y su separación de los productos mediante la electroforesis en geles de agarosa, poliacrilamidas o geles de secuenciación los cuales separan a

los fragmentos según su longitud, en donde las variaciones son el número de unidades repetidas (Azofeifa, 2006).

El análisis de los microsatélites puede realizarse con un secuenciador automático a través de tinción con fluorescencia de la muestra para detectar los alelo con mayor precisión (Saunders *et al.*, 2004; Schenell *et al.*, 2005b; Motamayor *et al.*, 2008). Los SSR son codominates y multialelicos que permiten la discriminación individual de los clones basados en los multilocus de su huella genética (Lanaud *et al.*, 1999).

Saunders *et al.* (2004) evaluó los iniciadores SSR propuestos por Lanaud *et al.* (1999) para identificar poblaciones de Forasteros del Alto y Bajo Amazonas y un tipo no identificado, Criollo, Trinitarios, híbridos y mezclas de origen desconocidos. Para ello tomó en cuenta en estos marcadores su potencial de eficiencia, confianza, su distribución a través del genoma, número de alelos identificados y su habilidad discriminante entre accesiones de cacao.

Como resultado un juego de 15 SSR altamente reproducibles y polimorfos con capacidad de separar la divergencia de los genotipos. Diversos estudios se han realizado tomando como base los primer propuestos por Lanaud *et al.* (1999), los seleccionados por Saunders *et al.*, (2004) y los propuestos por Pugh *et al.*, (2004) con la finalidad de esclarecer la diversidad genética con que cuentan los países productores de cacao, al igual se han aplicado a los bancos internaciones de cacao para conocer su riqueza genética.

En 1999 el USDA-ARS estableció el programa de mejoramiento genético del cacao asistido por marcadores moleculares (MAS) incorporando y desarrollando nuevos marcadores para estudios de huella genética, análisis de diversidad, creación de mapas de ligamiento y mapeo de locus o regiones del genoma que muestran variación para un carácter a efecto cuantitativo (QTL).

Para estos estudios se han creado 320 microsatélites entre diversas instituciones como el CIRAD en Francia y el USDA-ARS SHRS de Miami, USA (Borrone y Kuhn, 2004; Schnell *et al.*, 2005a, 2007; Marín-Argüello y Negaresh, 2009). Igualmente se han incorporado técnicas de biotecnología para la reproducción masivamente de las mejores accesiones a través de cultivos *in*

vitro, embriogénesis somática y criopreservación en sitios cuarentenarios (Maximova *et al.*, 2002; Florin *et al.*, 2000; Fang *et al.*, 2004).

El primer mapa genético del cacao se construyó utilizando la progenie del UPA402 x UF676 (Lanaud *et al.*, 1995) empleando 193 loci que cubren 759 cM del genoma. Risterucci *et al.* (2000) desarrollo un nuevo mapa con 424 loci. Posteriormente Pugh *et al.* (2004) incorporaron 465 marcadores codominantes a este mapa, cubriendo un total de 782.8 cM del genoma. Mapas de alta densidad son esenciales para estudios genéticos.

Recientemente Allegre *et al.* (2012) crearon el mapa más denso, examinando 149,650 ESTs, detectaron 5246 SNP *in silico*, de los cuales 1536 corresponden a genes con funciones putativas. Mientras que 851 muestran polimorfismo de la cruce de los padres; 681 son nuevos EST-SNPs y 163 nuevos SSRs. Adicionando 418 marcadores codominantes y 409 marcadores SSRs nuevos se detectaron en el genoma de un cacao Criollo.

Actualmente se conocen dos genoma del cacao que han sido secuenciados, el primero obtenido de la accesión Criollo de Belice B97-61/B2 el cual tiene un tamaño de 409 Mbp (Argout *et al.*, 2011), el segundo obtenido del clon Matina 1-6 es de 445 Mbp (Motamayor *et al.*, 2013).

El desconocimiento de la diversidad genética del cacao cultivado en Tabasco y la importancia del cultivo, permitió plantear los siguientes objetivos: a) efectuar una caracterización molecular de accesiones de cacao provenientes de las plantaciones del estado de Tabasco, b) determinar el grado de polimorfismo de marcadores moleculares microsatélites y la variabilidad genética existente.

2.4. MATERIALES Y METODOS

2.4.1. Material vegetal

La colecta de muestras foliares de árboles de cacao se realizó en las plantaciones de la zona cacaotera del estado de Tabasco, México (Figura 2.1). El estado se encuentra en el sureste del país entre los 17° 15' y 18° 39' de latitud norte y entre los 90° 59' y 94° 08' de longitud oeste.

La actividad cacaotera se realiza en tres regiones que comprenden 10 municipios: la Región de la Chontalpa, la más importante, comprende municipios de Cárdenas, Comalcalco, Cunduacán, Huimanguillo, Jalpa de Méndez, Nacajuca y Paraíso. La Región del Centro, al municipio del Centro, y la Región de la Sierra, a los municipios de Tacotalpa y Teapa (Cuadro 2.1). En estos municipios las plantaciones fueron seleccionadas de manera aleatoria, tomando como criterio la diversidad morfológica del fruto dentro de cada unidad seleccionada.

En este grupo de muestras foliares de plantaciones se incluyeron accesiones seleccionadas en la hacienda Las Conchas, ubicada en la localidad de Jana 2da. Secc., del municipio de Ixtacomitan, Chiapas, debido a que se consideran como un tipo criollo nativo de la zona.

Se colectaron también muestras foliares de accesiones del Banco de Germoplasma de Cacao del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias ubicado en el Campo Experimental Huimanguillo (INIFAP-CEHUI), de la Ex Finca El Danubio perteneciente a la División Académica Multidisciplinaria de Comalcalco-Universidad Juárez Autónoma de Tabasco (DAMC-UJAT). Esta plantación es producto de un ensayo de híbridos creados por el INIFAP-Campo Experimental Rosario Izapa, Chiapas, plantados en 1989 de manera aleatoria y consta de 660 árboles de cacao (López *et al.*, 1991).

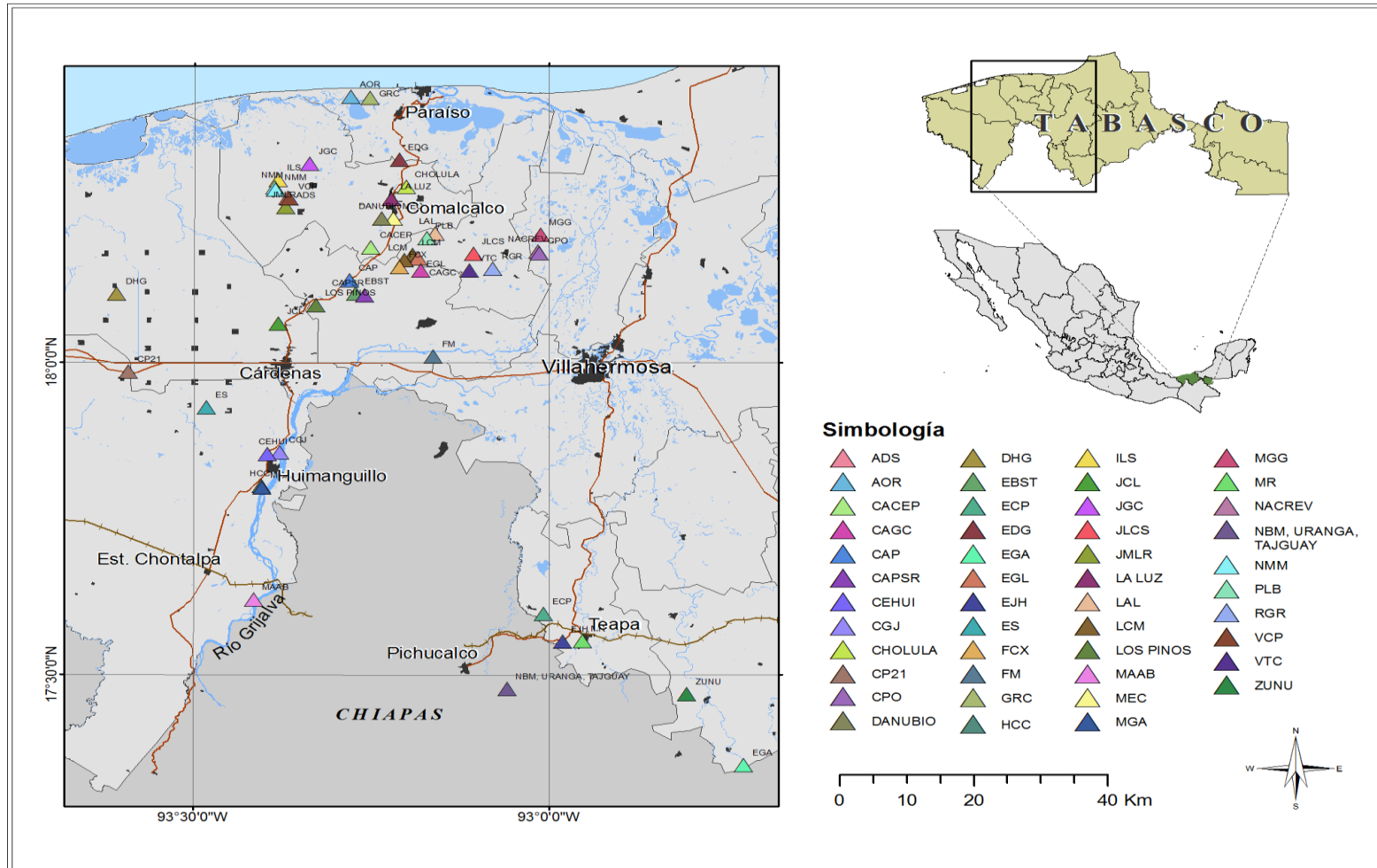


Figura 2.1. Localización de los sitios de muestreo foliar en plantaciones de cacao de Tabasco, México

Al igual, se incorporaron accesiones de la Finca Los Pinos en donde se encuentran establecidos híbridos creados por el INIFAP-CERI y una accesión de cacao criollo. Se incluyeron accesiones del banco de germoplasma del Colegio de Postgraduados Campus Tabasco en donde se encuentran colectas de varios estados del país. En total se colectaron 448 muestras foliares. A cada muestra colectada se le asignó un código para su identificación dentro del estudio (Cuadro 2.1, Anexo 2.1).

2.4.2. Análisis molecular

Para la extracción del ADN genómico, se colectaron hojas de cacao de acuerdo a la guía del Laboratorio de Genética de Frutas Tropicales (LGFT) del USDA-ARS en Miami, FL. Fueron de 3 a 4 hojas jóvenes sin presencia de lesiones por plagas o enfermedades por accesión, las cuales se depositaron en bolsas de papel, colocando en el pedúnculo de la hoja una cinta con la identificación de cada accesión (Cuadro 2.1, Anexo 2.1 y 2.2), al igual que en la bolsa. En total 448 muestras se enviaron al LGFT del USDA-ARS.

Para su ingreso, las muestras se identificaron con un código numérico normativo de la institución y se depositaron en un nuevo sobre de papel (Anexo 2.1). Enseguida se realizó su liofilización de acuerdo al protocolo del laboratorio (Anexo 2.3).

Cuadro 2.1. Localidades y accesiones muestreadas para el estudio.

Municipio	Código Accesoión
Plantaciones de Tabasco	
Cárdenas	29488 al 29501
Centro	29647 al 29650
Comalcalco	29445 al 29467, 29502 al 29606
Cunduacán	29692 al 29728
Huimanguillo	29348 al 29372, 29479 al 29487, 29607 al 29622
Jalpa de Méndez	29623 al 29636, 29729 al 29764
Nacajuca	29637, 29765 al 29771
Paraíso	29468 al 29478, 29638 al 29646
Tacotalpa	29387 al 29392
Teapa	29373 al 29386
Plantación de Chiapas	
Ixtacomitan	29772 al 29778
Bancos de Germoplasmas de Cacao en Tabasco	
Cárdenas, CP km 21	29686 al 29691
Comalcalco, Ex Finca El Danubio	29651 al 29685
Cunduacán, Pob. 11 de febrero	29779 al 29795
Huimanguillo CEHUI/INIFAP	29393 al 29444

Las muestras liofilizadas se agruparon en paquetes de cinco muestras, depositándose en bolsas re-sellables (reclosable bag) de polietileno que se guardaron en cajas hasta el momento de realizar la extracción del ADN.

Los materiales control en este estudio fueron proporcionados por el laboratorio del USDA-ARS: Criollo Tc-28967 de Puerto Rico, Banco de Germoplasma del USDA-ARS; Criollo de Costa Rica (Tc-23070-2), Matina 1-6 (Tc-23069) de Costa Rica, clon Pound 7 (Tc-23068) y el clon UF 273 T1-A5 (Tc-30941).

2.4.3. Extracción de ADN genómico

Para la extracción del ADN genómico se utilizó el kit FastDNA[®] Spin (MP Biomedicals, Solon, OH). Se pesaron 40 mg de hojas secas obtenidos del corte de 16 discos de 8 mm de diámetro de cada hoja seca. Estos fueron pulverizados con el equipo FastPrep[™] FP 120 Cell Disrupter (Savant Instruments, Inc.; Holbrook, N.Y.) siguiendo el protocolo del kit descrito previamente por Schnell *et al.* (2005b) y modificado por el LGFT del USDA (Anexo 2.4).

Las muestras foliares fueron colocadas en el tubo Lysing Matrix A, añadiendo dos esferas de cerámica de 0.64 cm (1/4" Ceramic Sphere) (los discos foliares deben quedar entre las dos esferas).

El tubo se colocó en el disruptor a una velocidad de 5 por 30 s. Este proceso se repitió tres veces y en cada intervalo los tubos se incubaron en hielo por 5 min. El ADN extraído y suspendido en 100 μL de DES (FastDNA[®] Spin) se consideró como puro.

2.4.4. Cuantificación del ADN

Este se cuantificó en un espectrofotómetro NANODROP 2000 (Thermo Fisher Scientific, Delaware, USA), el cual realiza el cálculo de la concentración de ADN a partir de la adición de 1 μL de la extracción original.

Una vez que se obtuvo el resultado de la concentración de cada muestra, se realizó la dilución de 1:10 para obtener una concentración aproximada de $10 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$. La dilución fue realizada con el robot MultiPROBE II Plus HT EX (Perkim Elmer, Waltham, MA).

La concentración promedio de ADN obtenida de las muestras foliares de cacao fue 1.77 ng mg^{-1} ; siendo el 29370 con el rendimiento más bajo (0.83 ng mg^{-1}) y el 29380 el más alto (4.35 ng mg^{-1}). Cinco controles proporcionados por el Laboratorio de del USDA-ARS en Miami fueron incluidos.

En el laboratorio de Fisiología Vegetal del Colegio de Postgraduados Campus Tabasco, se realizaron pruebas para estandarizar el método de extracción de ADN, utilizando las muestras 29432 y 29433, obteniéndose rendimientos de 0.87 ng mg^{-1} y 0.92 ng mg^{-1} de ADN respectivamente (promedio de cinco repeticiones en cada muestra) (Anexo 2.5).

2.4.5. Microsatélites utilizados

Se empleó un juego de 19 marcadores moleculares SSRs o microsatélites (Sigma Genosys, Woodlands, Tx.) (Cuadro 2.2) construidos por Lanaud *et al.* (1999) y confirmados por Saunders *et al.* (2004), además de los propuestos Pugh *et al.* (2004). El sentido forward de los iniciadores SSR contenía un marcador fluorescente HEX (4,7,2',4',5',7'-hexachloro-6-carboxyfluorescein; color virtual verde), 6-FAM (6-carboxyfluorescein; color virtual azul) y NED (7',8'-benzo-5'-fluoro-2',4,7-trichloro-5-carboxyfluoresein; color virtual amarillo/negro), el color virtual facilitar la visualización de los picos en el programa de análisis GenMapper (Applied Biosystems, Hitachi, Foster City, CA.) y la tinción fluorescente facilita la visualización de los picos en el equipo de electroforesis capilar ABI 3730.

Estos 19 iniciadores SSR se han utilizado en diversos trabajos en cacao: los primers mTcCIR222, mTcCIR168, mTcCIR115 y mTcCIR158 están relacionados con la auto-compatibilidad (Royaert *et al.*, 2011).

Los mTcCIR12, mTcCIR18, mTcCIR35, mTcCIR37 y mTcCIR60 asociados a QTLs de productividad (Schnell *et al.*, 2005b). El mTcCIR26 implicado con QTL para resistencia a *M. royeri*. Los mTcCIR37 y mTcCIR168 para *Phytophthora* y los mTcCIR24, mTcCIR33 y mTcCIR35 ligados a la resistencia a *M. perniciosa* (Queiroz *et al.*, 2003; Brown *et al.*, 2005; Faleiro *et al.*, 2006; Santos *et al.*, 2007; Santos *et al.*, 2014).

Los mTcCIR6, mTcCIR7, mTcCIR8, mTcCIR11, mTcCIR12, mTcCIR35 y mTcCIR37 involucrados en la tolerancia a suelos inundados (Bertolde *et al.*, 2009). El mTcCIR33 es altamente polimórfico (Thondaiman *et al.*, 2013). Los mTcCIR8, 11, 33 y 37 son discriminantes para identificar tipos criollos (Motilal *et al.*, 2010).

Cuadro 2.2. Características de los SSR, iniciadores utilizados en el estudio.

Nombre del marcador	EMBL accesión número	5'-3' Forward iniciador	5'-3' Reverse iniciador	Repetición de la estructura
mTcCIR6	Y16980	TTCCCTCTAAACTACCCTAAAT	TAAAGCAAAGCAATCTAACATA	(TG) ₇ (GA) ₁₃
mTcCIR7	Y16981	ATGCGAATGACAACCTGGT	GCTTTCAGTCCTTTGCTT	(GA) ₁₁
mTcCIR8	Y16982	CTAGTTTCCCATTTACCA	TCCTCAGCATTTTCTTTC	(TC) ₅ TT(TC) ₁₇ TTT(CT) ₄
mTcCIR11	Y16985	TTTGGTGATTATTAGCAG	GATTCGATTTGATGTGAG	(TC) ₁₃
mTcCIR12	Y16986	TCTGACCCCAAACCTGTA	ATTCCAGTTAAAGCACAT	(CATA) ₄ N ₁₈ (TG) ₆
mTcCIR15	Y16988	CAGCCGCCTCTTGTTAG	TATTTGGGATTCTTGATG	(TC) ₁₉
mTcCIR18	Y16991	GATAGCTAAGGGGATTGAGGA	GGTAATTCAATCATTTGAGGATA	(GA) ₁₂
mTcCIR22	Y16995	ATTCTCGCAAAAACCTTAG	GATGGAAGGAGTGTAATAG	(TC) ₁₂ N ₁₄₆ (CT) ₁₀
mTcCIR24	Y16996	TTTGGGGTGATTTCTTCTGA	TCTGTCTCGTCTTTTGGTGA	(AG) ₁₃
mTcCIR26	Y16998	GCATTCATCAATACATTC	GCACTCAAAGTTCATACTAC	(TC) ₉ C(CT) ₄ TT(CT) ₁₁
mTcCIR33	AJ271826	TGGGTTGAAGATTTGGT	CAACAATGAAAATAGGCA	(TG) ₁₁
mTcCIR35		TTTCCTTGATTGACCTA	ATATAAACACACTTCAGAGAT	(GT) ₁₁
mTcCIR37	AJ271942	CTGGGTGCTGATAGATAA	AATACCCTCCACACAAAT	(GT) ₁₅
mTcCIR40	AJ271943	AATCCGACAGTCTTTAATC	CCTAGGCCAGAGAATTGA	(AC) ₁₅
mTcCIR60	AJ271958	CGCTACTAACAAACATCAAA	AGAGCAACCATCACTAATCA	(CT) ₇ (CA) ₂₀
mTcCIR115	AJ566457	GTGATTCAAATTCAAATATG	AATAGCAAGAGAGTGATGAG	(TC) ₁₁
mTcCIR158	AJ566489	TGTAGGTTATGCAGCGTGTC	GATGAGGGGTGTAGCTGTTTG	(CT) ₈
mTcCIR168	AJ566497	GGTAGTATTGAGGTGCGTAT	GTGAATGAATGGATGTGAAA	(TC) ₉
mTcCIR222	AJ566543	CTACAGAAAATAGGCAATA	TCATTGTATTATCAGGTAGA	(GA) ₉

2.4.6. Reacción de amplificación por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

La amplificación del ADN se realizó a través de la PCR. Para ello se cargó en los pozos del plato PCR (GeneMate, Cat. No. T-3152-1) un volumen total de 10 μL , el cual contenía los siguiente: 1 μL de ADN genómico (de la dilución 1:10). Todas las reacciones PCR contenían 0.05 $\text{U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ Taq DNA Polymerase (New England Biolabs, Inc.), 0.02 mM dNTPs (Promega, Madison, WI), 0.5 μM de forward y reverse de cada cebador, 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de BSA (Fisher Biotech, Fair Lawn, N. J.), 1 μL de 10X ThermoPol Reaction Buffer (20 mM Tris-HCl, 10 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 10 mM KCl, 2 mM MgSO_4 , 0.1% Triton® X-100, pH 8.8) (New England Biolabs, Inc.) y 7.75 μL H_2O (Molecular Grade, GBiosciences®, St. Louis, MO.).

El ciclo térmico fue el siguiente: desnaturalización del ADN genómico a 94°C por 4 minutos, seguido por 32 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 segundos, 1 minuto para la alineación del primer de acuerdo a su temperatura adecuada (Cuadro 2.3), 1 minuto para la extensión a 72°C y 5 minutos a 72°C para finalizar la extensión. Al finalizar el proceso, la máquina conserva las muestras a 4°C. Enseguida los platos PCR con las muestras se cargaron en la máquina DNA Engine tetrad thermal cycler (M J Research, Inc.; Watertown, Mass.).

2.4.7. Electroforesis capilar

La electroforesis capilar se realizó de acuerdo a lo descrito por Schnell *et al.* (2005b) y Boza *et al.* (2014) con modificaciones, utilizando el equipo ABI 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA.). En cada pozo del plato para electroforesis capilar se colocó un volumen total de 21 μL , el cual contuvo 1 μL de la muestra PCR y 20 μL de la mezcla siguiente: 20 μL de H_2O (Molecular Grade, GBiosciences®, St. Louis, MO.) y 0.1 μL de GeneScan® 400HD [ROX] Size Standard (Applied Biosystems). Seguido de una desnaturalización a 95°C por 3 minutos y al finalizar una incubación en hielo por 5 minutos.

Las muestras se cargaron en la máquina de electroforesis capilar, utilizando la corrida de análisis default con capilares de 50 cm de longitud, temperatura de 63°C, tiempo de inyección de 15 s, voltaje de inyección 1.6 kV, voltaje de corrida 15 kV por un tiempo de corrida de 1600

segundos. El resultado generado por el equipo AB 3730 DNA Analyzer se pasó al programa del software GenMapper™ versión 4.0 (Applied Biosystems) para analizar y determinar el tamaño estándar del fragmento interno y la designación del alelo para cada muestra.

2.4.8. Análisis de la diversidad genética y estructura de la población

Los datos del genotipo se procesaron con el software GenAlEx versión 6.5 (Peakall y Smouse, 2012) para estimar los parámetros genéticos. La diversidad genética se evaluó a partir de tres estimaciones: el número de alelos por locus, la heterocigosidad observada (H_o) el índice de diversidad genética (heterocigosidad esperada, H_e). La estimación de la heterocigosidad para un locus dado es simplemente la proporción de individuos heterocigóticos en dicho locus:

$$\tilde{H}_l = 1 - \sum_{u=1}^k \tilde{P}_{luu}$$

Donde \tilde{P}_{luu} es la frecuencia genotípica observada de individuos homocigóticos uu en el locus l y la sumatoria se hace a lo largo de todos los alelos del mismo locus.

La diversidad genética, también referida como heterocigosidad esperada, se define como la probabilidad de que dos alelos de un mismo locus escogidos al azar sean diferentes:

$$\tilde{D}_l = (1 - \sum_{u=1}^k \tilde{p}_{lu}^2)$$

Donde \tilde{p}_{lu}^2 es la frecuencia alélica observada del alelo u en el locus l y la sumatoria se hace a lo largo de todos los alelos del mismo locus.

El análisis de coordenadas principales (PCA) permitió observar la estructura de las poblaciones, a partir del análisis de distancia genética.

Para el análisis comparativo y de similitudes con otros grupos genéticos, los resultados se contrastaron con 112 muestras que integran los 10 nuevos grupos genéticos de cacao propuesto por Motamayor *et al.* (2008).

El resultado se contrastó con la información de las muestras: Matina 1-6 (Tc-23069-3), Criollo I 3 (Tc-23070-2), [MN-1] C PR (Tc-28967) generados por el LGFT y los datos de los clones POUND 7 (Tc-23068) y UF273 T1-A5 reportados por Takrama *et al.* (2005) y Brown *et al.* (2007); al igual con algunos genotipos de los 10 nuevos grupos genéticos reportados por Motamayor *et al.* (2008): Amelonado (9 accesiones), Contamana (11), Criollo (5), Curaray (12), Guiana (12), Iquitos (14), Marañón (12), Nacional (13), Nanay (12) y Purús (13).

El genotipo conocido como Matina 1-6 es una variedad cultivada en Costa Rica, clasificado genéticamente como el típico Amelonado homocigótico, su genoma es de 445 Mbp. Este tipo de cacao como germoplasma Trinitario es ampliamente cultivado a nivel mundial por su alto rendimiento y resistencia a enfermedades (Motamayor *et al.*, 2003; Bartley, 2005; Motamayor *et al.*, 2008; Aikpokpodion *et al.*, 2009; Motamayor *et al.*, 2013). El clon UF 273 fue identificado genéticamente a través de los SSR, observándose la presencia de los genotipos T1 y T2. El T1 muestra resistencia a *M. royeri*, el Pound 7 es un clon Forastero del Alto Amazonas con resistencia a *P. palmivora* (presentes en Centroamérica y Sudamérica) y *P. capsici* (presente en Tabasco y Chiapas, México) (Ortiz, 1996; Takrama *et al.*, 2005; Brown *et al.*, 2007; Phillips-Mora *et al.*, 2012; Ramírez-Guillermo y López-Andrade, 2012).

Para conocer la estructura jerárquica de la variación molecular se realizó una AMOVA con el software GenAlEx versión 6.5 (Peakall y Smouse, 2012).

2.5. RESULTADOS

2.5.1. Diversidad genética

Un total de 208 alelos fueron identificados entre los 19 loci, con una media de 10.9 por locus. En las plantaciones el número total de alelos fue 76, con un promedio de 4.00 alelos por locus. En los bancos de germoplasma se revelaron un total de 132 alelos, con un promedio de 6.95 alelos por locus (Cuadro 2.3).

Cuadro 2.3. Descripción de 19 SSR utilizados en muestras de *Theobroma cacao* L de plantaciones y bancos de germoplasmas en Tabasco, México.

Iniciador	T _m	Tamaño (bp)	Plantaciones			Bancos de germoplasma		
			No de alelos	H _o	H _e	No de alelos	H _o	H _e
mTcCir6	46	224-248	6	0.449	0.369	7	0.837	0.687
mTcCir8	46	286-304	6	0.388	0.308	6	0.765	0.696
mTcCir33	51	289-344	6	0.544	0.426	11	0.891	0.768
mTcCir11	46	289-316	5	0.469	0.380	9	0.696	0.637
mTcCir15	46	232-252	5	0.521	0.421	9	0.829	0.734
mTcCir37	46	133-184	5	0.417	0.350	12	0.791	0.747
mTcCir22	46	272-289	4	0.447	0.371	6	0.692	0.615
mTcCir24	46	184-201	4	0.424	0.328	7	0.602	0.514
mTcCir26	46	282-307	4	0.365	0.272	6	0.733	0.628
mTcCir18	51	331-346	4	0.517	0.418	6	0.745	0.724
mTcCir40	51	260-285	4	0.595	0.603	6	0.910	0.760
mTcCir35	46	223-237	3	0.388	0.311	6	0.735	0.591
mTcCir115	46	187-195	3	0.534	0.410	4	0.600	0.621
mTcCir222	46	216-232	3	0.530	0.410	7	0.679	0.621
mTcCir7	51	147-161	3	0.398	0.340	6	0.857	0.694
mTcCir60	51	186-211	3	0.497	0.362	8	0.818	0.685
mTcCir168	48	166-186	3	0.524	0.417	6	0.494	0.618
mTcCir12	59	187-219	3	0.535	0.409	7	0.817	0.685
mTcCir158	51	211-217	2	0.442	0.437	3	0.369	0.535
Total			76			132		
Media			4.00	0.473	0.386	6.95	0.729	0.661

T_m = Temperatura de alineación, H_o = Heterocigosidad observada, H_e = Heterocigosidad esperada.

El número de alelos por locus varió de 2 asociados a mTcCir158 a 6 asociados con mTcCir6, mTcCir8 y mTcCir33 en las plantaciones. En los bancos de germoplasma este varió de 3 asociados al mTcCir158 a 12 asociado a mTcCir37. Estos datos sugieren que existe un nivel de polimorfismo importante en estos marcadores genéticos, expresado como número de alelos por locus. El nivel de poliformismo revelado por los marcadores fue mayor en los bancos de germoplasma que en las plantaciones.

Se identificó una segregación con alelos que van desde los 133 bp (mTcCIR37) hasta 346 bp (mTcCIR18). En las plantaciones los mTcCIR6, mTcCIR8 y mTcCIR33 mostraron el mayor número de alelos (6 alelos). Para las accesiones de los bancos de germoplasmas se observó que los mTcCIR37, mTcCIR33, mTcCIR11 y mTcCIR15 presentaron el mayor número de alelos. Esto indica que estos marcadores son los que tuvieron mayor poder discriminante entre los genotipos. El mTcCIR158 mostró la menor presencia de alelos en ambos grupos (bajo nivel de polimorfismo revelado por este marcador).

En una población, las frecuencias alélicas son un reflejo de la diversidad genética. Cambios en las frecuencias alélicas en el tiempo pueden indicar que un cambio genético está ocurriendo o que nuevas mutaciones han sido introducidas en la población.

En el estudio genético de *T. cacao* en Tabasco se encontró la presencia de tres nuevos alelos, a través de los loci en estudio. La presencia de estos nuevos alelos es importante dentro de la riqueza genética de *T. cacao* cultivado en Tabasco, el cual evidencia la presencia de genotipos distintos a los conocidos actualmente y difiere de los grupos genéticos del centro de origen propuesto, el Amazonas.

La mayor parte de las muestras con presencia de alelos nuevos se encuentra en la Región de la Chontalpa, una en la Región de la Sierra, una se encuentra ubicada en la Colección de Clones Criollos del Banco de Germoplasma de Cacao del INIFAP-CEHUI, en Huimanguillo, Tabasco.

La heterocigosidad observada (H_o) en los genotipos de las plantaciones varió de 0.36 para el mTcCIR26 a 0.59 para el mTcCIR40, con un promedio de 0.47 en 19 loci. Para los genotipos de

los bancos de germoplasmas H_o fue de 0.36 en el mTcCIR158 a 0.91 en el mTcCIR40, con un promedio de 0.72 (Cuadro 2.3).

La diversidad genética, también referida como heterocigosidad esperada, se define como la probabilidad de que dos alelos de un mismo locus escogidos al azar de una población sean diferentes. La heterocigosidad esperada (H_e) en los bancos de germoplasma varió de 0.51 para mTcCir24 a 0.76 para mTcCir33 y presentó un promedio sobre los 19 loci de 0.66. En las plantaciones fue de 0.27 para mTcCir26 a 0.60 para mTcCir40 y el promedio sobre los 19 loci fue de 0.38.

Los alelos privados son alelos encontrados sólo en una sola población entre una colección más amplia de poblaciones. En las plantaciones de Tabasco y de Chiapas se lograron identificar 27 alelos privados que son únicos para cada población, de ellos cuatro se identificaron con el mTcCIR8, tres con el mTcCIR11, tres con el mTcCIR6 y los demás loci mostraron de dos a un alelo privado, la población CML presento el mayor número de alelos privados (Cuadro 2.4). A nivel de población, la heterocigosis más baja se observa en CNT ($H_o=0.24$) y la más alta en CDN ($H_e=0.67$), en tanto que el nivel de diversidad más alto se observó en la población de CDN ($H_e=0.49$) (Cuadro 2.4), así mismo se observa que el valor de F es negativo, indicando un exceso heterocigótico, causado por recombinaciones aleatorias entre la población.

El conocimiento de esta diversidad genética en plantaciones como en las colecciones de los bancos de germoplasma es una valiosa herramienta para la selección y programas de mejoramiento de cacao en el estado.

Cuadro 2.4. Parámetros de diversidad dentro de cada población en estudio.

Pop	Nm.	Na.	H _o	H _e	Ap	F
Huimanguillo	50	2.32	0.46	0.39	0	-0.180
Teapa	14	2.26	0.44	0.38	1	-0.167
Tacotalpa	6	2.53	0.52	0.42	6	-0.225
Comalcalco	128	2.95	0.55	0.44	9	-0.235
Paraíso	20	2.42	0.48	0.38	2	-0.244
Cárdenas	14	2.21	0.67	0.49	0	-0.370
Cunduacán	37	2.26	0.50	0.39	0	-0.270
Jalpa de Méndez	50	2.21	0.46	0.38	0	-0.219
Nacajuca	8	2.00	0.35	0.30	0	-0.166
Centro	4	1.68	0.24	0.19	1	-0.200
Ixtacomitan	7	2.74	0.55	0.49	8	-0.143
Total	338	25.58			27	
Media		2.33	0.47	0.39		-0.221

Nm = Número de muestras por población, Na = Numero de alelos por locus, H_o = Heterocigosidad observada, H_e = Heterocigosidad esperada, Ap = Alelos privados, F= Coeficiente de consanguinidad.

2.5.2. Análisis de coordenadas principales (PCA)

En la Figura 2.2 se muestra una separación entre los grupos criollos, los grupos genéticos propuestos por Motamayor *et al.* (2008) y las plantaciones del estado de Tabasco. Las 338 muestras de cacao colectadas en las zonas productores del estado de Tabasco y una localidad del estado de Chiapas forman un grupo genético muy grande relacionado entre sí. En estas plantaciones existen al parecer genotipos cercanos a los criollos. Las 110 muestras correspondientes a los Bancos de Germoplasmas de Tabasco se separan del grupos de las plantaciones y se mezclan con las de los 10 grupos genéticos de Motamayor *et al.* (2008).

Al incluir las 120 muestras de los diez grupos genéticos de Motamayor *et al.* (2008), se observa que las muestras de las plantaciones de Tabasco son cercanas al grupo genético Amelonado (Forastero del Bajo Amazonas). Una de las muestras de este grupo conocido como Matina 1-6 (Tc-23069) se encuentra entre el grupo de las plantaciones de Tabasco. Ocho de los diez nuevos grupos que son Forasteros del Alto Amazonas, forman un grupo totalmente separado de las muestras de las plantaciones de Tabasco, pero relacionado con las muestras de los bancos de germoplasmas.

Los genotipos Criollos forma un grupo muy separado, se observa que una muestra de criollo de México está muy relacionada con este grupo, y muestras de las plantaciones como de los bancos de germoplasmas tienden a asociarse a este grupo genético de los criollos (Figura 2.2).

En el cuadrante I del ACP se observa al grupo de Criollos Antiguos o Silvestres, y dentro de este grupo se encuentra la muestra 29431, colectada en Yucatán, México, lo que indica que posiblemente es un cacao criollo antiguo de México o criollo Mesoamericano. Dentro de éste grupo se encuentra también la muestra 29441. Este genotipo se encuentra en el Banco de Germoplasma del INIFAP-CEHUI y está clasificado como criollo, de cotiledones color crema, de forma pentágona o “lagarto”. Este genotipo se encuentra relacionado con muestras del cuadrante II y III.

En el cuadrante II, se agrupan genotipos provenientes de las plantaciones de Tabasco que son híbridos naturales entre los Criollos o Criollos Modernos con el Forastero del Bajo Amazonas (Amelonado). En el cuadrante III, se observan genotipos provenientes de las plantaciones de Tabasco y al grupo de los Forasteros del Bajo Amazonas. Una muestra de este grupo genético se encuentra relacionada con los genotipos 29502, 29523, 29524, 29534, 29625, 29668, 29725, los cuales se ubican en la Región de la Chontalpa, en Tabasco.

Esto sugiere que hubo en alguna época introducciones del genotipo Amelonado en la región productora de cacao en Tabasco, posiblemente desde el lugar de origen de este grupo. Probablemente aún permanecen plantas originales en las plantaciones de Tabasco. En el cuadrante IV, se observan únicamente muestras de los nuevos grupos genético, el cual se relaciona con una muestra de los híbridos creados en México.

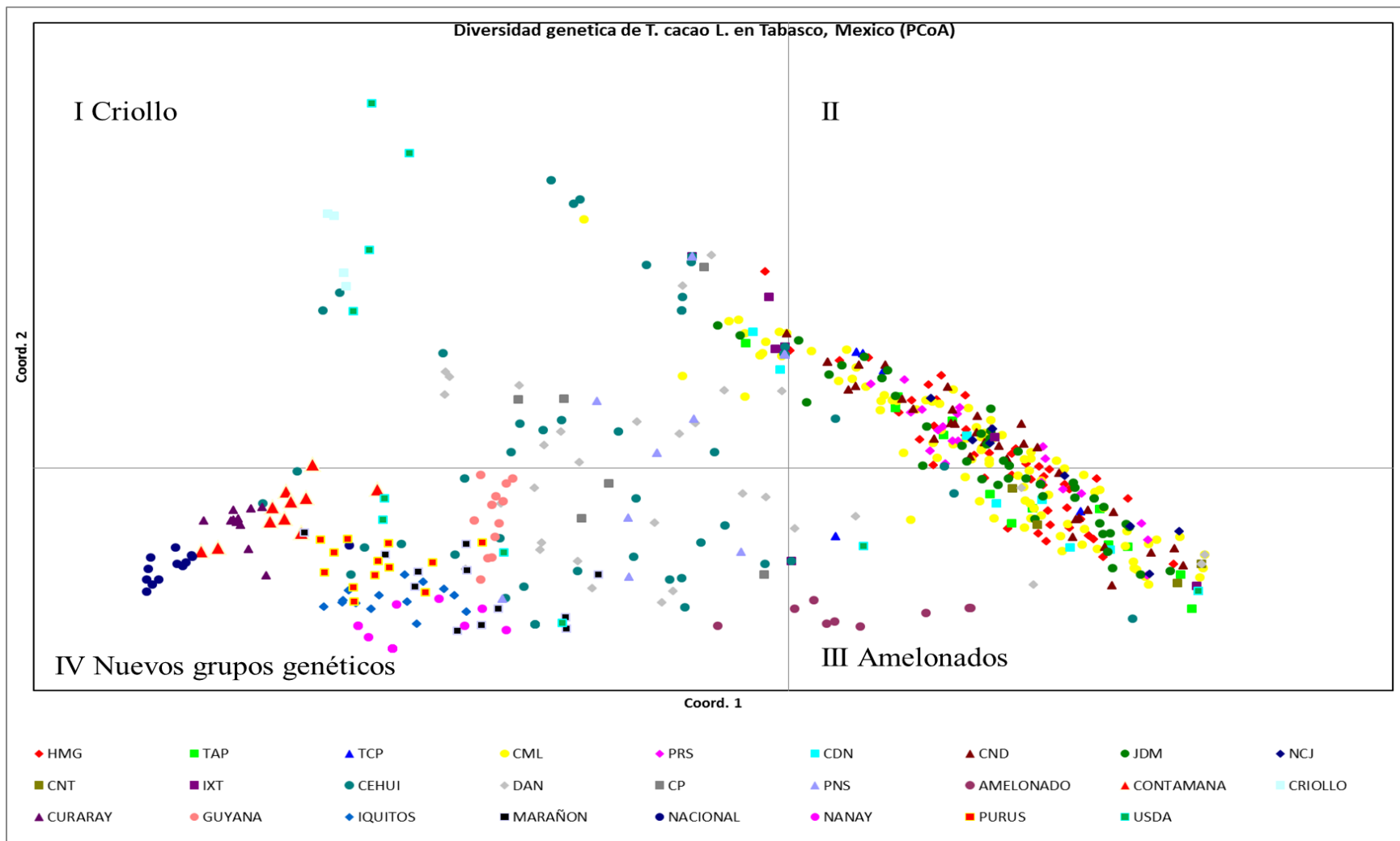


Figura 2.2. Diversidad genética de *Theobroma cacao* L. de las plantaciones y bancos de germoplasmas de Tabasco y Chiapas.

2.5.3. Análisis de Varianza Molecular (AMOVA)

Para este análisis los datos se dividieron en tres grupos: a) grupos correspondientes a las plantaciones de Tabasco, b) correspondientes a las accesiones de Bancos de Germoplasmas presentes en Tabasco y c) correspondientes al grupo de los diez grupos genéticos propuestos por Motamayor *et al.* (2008).

El AMOVA indica que existe una alta variación significativa dentro de los individuos de cada población (74%) que entre las poblaciones (19%) (Cuadro 2.5).

Cuadro 2.5. AMOVA en las poblaciones de estudio.

Fuente de variación	Gl	SCD	SCMD	Var Est	VM %	P value ¹
Entre poblaciones (grupos)	2	769.402	384.701	1.211	19%	>0.001
Entre individuos	558	3161.485	5.666	0.437	7%	
Individuos dentro de la población	561	2688.500	4.792	4.792	74%	
Total	1121	6619.387		6.440	100%	

¹Probabilidad obtenida con un estimado de 999 permutaciones. SCD= suma de cuadrados, SCMD= suma de cuadrado medio de la desviación, Var Est= variación estándar, VM= variación molecular.

Los tres grupos (plantaciones, bancos de germoplasma y grupos genéticos) y subpoblaciones (municipios) en estudio se encuentran relacionadas hacia la homocigosis, tal como lo indica el coeficiente de consanguinidad; ya que entre las subpoblaciones de la población en estudio (Plantaciones) se notó que este coeficiente es altamente significativo ($F_{st}=0.188>0$), al igual que entre individuos ($F_{is}=0.084>0$) notándose una reducción en su nivel de heterocigosis (Cuadro 2.6).

Cuadro 2.6. Coeficiente endogámico entre población y subpoblaciones.

F-Statistics	Valor	P(rand >= data)
F_{st}	0.188	0.001
F_{is}	0.084	0.001
F_{it}	0.256	0.001

A nivel de plantaciones el AMOVA indica que existe una variación significativa de los individuos dentro de la población (99%) que entre las poblaciones (1%) (Cuadro 2.7).

Cuadro 2.7. AMOVA correspondientes a las plantaciones de Tabasco.

Fuente de variación	gl	SC	SCM	Var Est	VM %	P value¹
Entre poblaciones	10	67.246	6.725	0.067	1%	>0.001
Individuos dentro de la plantación	338	1611.500	4.768	4.768	99%	

¹Probabilidad obtenida con un estimado de 999 permutaciones. SCD= suma de cuadrados, SCMD= suma de cuadrado medio de la desviación, Var Est= variación estándar, VM= variación molecular.

El coeficiente endogámico calculado, indica que las plantaciones y subpoblaciones (municipios) de *T. cacao* en Tabasco se encuentran emparentadas. Entre las subpoblaciones de la población en estudio (Plantaciones) se notó que este coeficiente es significativo ($F_{st}=0.017>0$), al igual que entre individuos ($F_{is}=-0.206>0$) notándose una aumento en su nivel de heterocigosis (Cuadro 2.8).

Cuadro 2.8. Coeficiente endogámico en las plantaciones de Tabasco.

F-Statistics	Valor	P(rand >= data)
F_{st}	0.017	0.002
F_{is}	-0.206	1.000
F_{it}	-0.186	1.000

2.6. DISCUSION

El conocimiento de la diversidad genética en plantaciones y bancos de germoplasma, en especial en especies que son parte de la herencia cultural de un país como es el caso del cacao en México, es crucial para el manejo y uso de los recursos genéticos disponibles.

En el presente estudio con 19 loci y 110 accesiones de los bancos de germoplasmas se revelaron en promedio 6.9 alelos por locus. La riqueza alélica de los bancos de germoplasma de Tabasco es mayor que la observada por Aikpokpodion *et al.* (2009) en el banco de germoplasma en Nigeria con un promedio de 4.39 alelos por locus, y a la revelada por Schnell *et al.* (2005) en las accesiones de los bancos de germoplasma de Hawai con 19 microsatélites (1.92 alelos por locus). En contraste Zhang *et al.* (2006b) estudiando 141 accesiones TARS del banco de germoplasma del USDA en Mayaguez, Puerto Rico, con 15 iniciadores, encontró un promedio de 10.8 alelos por locus.

Entre las accesiones TARS del banco de germoplasma del USDA en Mayaguez, Puerto Rico, la heterocigosidad ($H_o = 0.701$) y diversidad genética ($H_e = 0.651$) son altas (Zhang *et al.*, 2006b). Resultados que son similares a lo observado en los bancos de germoplasma de Tabasco evaluados. En cuanto a la segregación alélica observó que fue de 187 bp (mTcCIR6) hasta 290 bp (mTcCIR22). En nuestro estudio esta fue de 133 bp (mTcCIR37) hasta 346 bp (mTcCIR18).

Los valores de los parámetros genéticos y poder discriminante de un iniciador SSR varía según la población estudiada (Bhattacharjee *et al.* 2004; Sánchez *et al.* 2007; Zhang *et al.*, 2009b; Motilal *et al.*, 2009; Boza *et al.*, 2014). En el presente estudio se observó que el iniciador más polimórfico respecto a las accesiones de los bancos de germoplasmas fue el mTcCIR37 con un total de 12 alelos. Para las plantaciones se observó hasta seis alelos en los mTcCIR6, 8 y 33. Zhang *et al.* (2009b) encontró de 5 hasta 18 alelos por iniciador SSR, con un promedio de 12 alelos por locus en 612 accesiones de la colección de cacao de Perú.

En esta colección fue el iniciador mTcCIR33 el que reveló mayor heterocigosidad y diversidad genética ($H_o=0.642$ y $H_e=0.805$). En las accesiones del Corpoica, Colombia con 25 SSR observó

que el mTcCIR15 fue el más polimórfico al revelar 14 alelos (Sánchez *et al.* 2007). Y Motilal *et al.* (2009) identificó a los mTcCIR12, 15, 26, 33, 37, 42, 57, 243 y 244 son altamente discriminantes para identificar individuos en colecciones de germoplasmas. Entre las accesiones de los bancos de germoplasma y de plantaciones de Tabasco, México los mTcCIR37 y 33 fueron los de más poder discriminante.

En el presente estudio la H_o (0.473) de las plantaciones fue baja y el mTcCIR33 fue polimórfico en ambos grupos estudiados (plantaciones y bancos de germoplasma). En los bancos de germoplasma la H_o fue mayor (0.729). Crouzillat *et al.* (2001a) observó también un bajo nivel de heterocigosidad (5%) y diversidad genética en el grupo del cacao Nacional de Ecuador. En contraste entre los híbridos de cacao Nacional con genotipos de Venezuela y Trinidad el nivel fue alto (32%). Boza *et al.* (2013) en 955 accesiones de República Dominicana analizadas con 14 SSR, identificó 117 alelos con un promedio de 8.36 alelos por locus. En las plantaciones locales identificó 113 alelos con un promedio de 8.07 alelos por locus. La heterocigosidad observada en el banco y las plantaciones locales fue alta: 0.67 y 0.60 respectivamente.

El resultado de la AMOVA muestra que la variación genética es significativa dentro de los individuos (99%) de la población que entre poblaciones (1%), similar a lo reportado por Zhang *et al.* (2009a) ya que identificaron que la variación es mayor dentro de las poblaciones.

En nuestro estudio el coeficiente de consanguinidad dentro de la población (F_{is}) fue de -0.206 y menor en las subpoblaciones (F_{st}) 0.017; en ambos son significativamente mayor de cero por una permutación de prueba a 999 (Peakall y Smouse, 2012). Indicando un desequilibrio de acuerdo a la ley de Hardy-Weinberg; es posible que los individuos de la población proceden de un apareamiento no aleatorio, causado por la introducción de un nuevo individuo dentro de la población, alterando la frecuencia alélica (Hardy, 1908).

Es importante una revisión de las accesiones de los bancos de germoplasma ya que a través de estos estudios moleculares se han encontrado genotipos duplicados en los bancos de germoplasma, Boza *et al.* (2014) identificó que los clones mexicanos RIM 117, 75, 52, 15 y 2 establecidos en el banco de germoplasma de República Dominicana son genéticamente clones

sinónimos. Irish *et al.* (2010) al igual identificó que 16 clones RIM de México son genéticamente sinónimos. El genotipo CC 225 originalmente proviene de la cruce entre el Scavina 6 y el ICS 1. El clon CC 225 también se encuentra en el banco de germoplasma del INIFAP, México. En un estudio realizado en CATIE utilizando RFLPs se encontró que genéticamente este clon CC 225 diferente al genotipo con el mismo nombre que se encuentra en el banco internacional del CATIE, Costa Rica (Crouzillat *et al.*, 2001a). Evidencia clara de la importancia de los estudios moleculares en la identificación correcta de los clones para evitar errores genéticos en los programas de mejoramiento al emplear clones incorrectamente nombrados.

El consumo de cacao en México data desde tiempos antiguos, 3,800 años (1800-1000 a.C.) en las culturas Olmecas y Mokayas (Powis *et al.*, 2011; Coe y Coe, 2013). Vestigios de las antiguas plantaciones es lo que se ha identificado y catalogado como plantas de cacao silvestre en la selva Lacandona de Chiapas y en rejollas de Yucatán (Miranda, 1962; Gómez-Pompa *et al.*, 1990). Esto llevó a Cuatrecasas (1964) a plantear la hipótesis que Centroamérica es el sitio de origen del cacao tipo Criollo.

Los primeros estudios genéticos de las poblaciones de cacao criollo en México indicaban que estas son diferentes entre sí pero similares a los del Alto Amazonas (De la Cruz *et al.*, 1995; Whitkus *et al.*, 1998). Actualmente Motamayor *et al.* (2008) indican que el cacao criollo es originario del Alto Amazonas en Sudamérica.

En el presente estudio se identificaron tres alelos nuevos en plantaciones de Tabasco. Dos de ellos se encuentran en el grupo de los criollos propuesto por Motamayor *et al.* (2008). Esto parece indicar que genéticamente aún hay genotipos criollos en Tabasco. Así mismo la muestra proveniente de Yucatán, México se encuentra muy cercana al grupo de los criollos de Motamayor *et al.* (2008) y es muy probable que sea el cacao descrito por Miranda (1962) y clasificado como criollo por Cuatrecasas (1964).

En el mismo cuadrante del ACP se encuentran muestras de las plantaciones de cacao de Tabasco, indicando que probablemente el cacao cultivado en Tabasco por semilla es la cruce de Criollo (Nativo Mexicano) con el material introducido tipo forastero de Sudamérica. Esto es de

importancia debido a la calidad del grano de cacao asociado a este tipo de cacao. Probablemente también hay variación genética no solo para características relacionadas con el rendimiento sino también de calidad de cacao en las plantaciones del estado de Tabasco.

En los 80s los productores de la zona cacaotera de Tabasco y Chiapas tenían preferencia por cultivar el cacao “*guayaquil*”, un tipo amelonado, por su rendimiento y tolerancia a enfermedades, (principalmente *P. capsici*). También se cultivaba el tipo forastero amelonado “*Ceylán*”, posiblemente introducido en 1900. Además se cultivaba una variedad tipo calabacillo que se nombra “*Patastillo*” (Enríquez, 1985).

En el presente estudio genético se encontró que el Forastero del Bajo Amazonas conocido como Amelonado se encuentra presente en plantaciones de Tabasco, México, ya que las muestras Tc-29502, Tc-29523, Tc-29524, Tc-29534, Tc-29625, Tc-29668 y Tc-29725 de las plantaciones en Tabasco son genéticamente cercanas al Matina 1-6 (Tc-23069). En este caso este tipo de cacao del Bajo Amazonas al cruzarse con los Criollos Nativos originaron al complejo de híbridos (Trinitarios) que actualmente se cultivan en Tabasco (Limón, 1945; Alonso, 1984) y que contienen genes aun de criollos puros nativos de Tabasco (Miranda, 1962; Cuatrecasas, 1964; Motamayor *et al.*, 2002). Esto a lo mencionado anteriormente donde las muestras que revelan alelos nuevos se encuentran en el grupo de los criollos pero a su vez están relacionadas con el grupo cercano a los amelonados.

Probablemente al realizar el análisis de la estructura de la población, será posible la formación de tres grupos genéticos en las poblaciones de cacao de Tabasco: los Criollos, los híbridos cruzas con los amelonados y los híbridos cruzas con híbridos de criollos. Posiblemente los híbridos entre criollos estén dando origen a lo que se ha llamado criollos modernos (Motamayor *et al.*, 2000, 2002, 2003).

Motamayor *et al.* (1998) indican que las plantaciones de cacao del estado de Tabasco corresponden al grupo genético Trinitario y que morfológicamente los frutos corresponden al tipo angoleta. Nuestro resultado indica que solo una porción de la población de cacao de Tabasco pueda corresponder a lo que este autor indica, ya que se observa que dentro del grupo de los

amelonados hay cruzas con criollos (Trinitario) y que éstos revelan genes nuevos producto posiblemente de la recombinación.

Whitkus *et al.* (1998) indicaba que las poblaciones de tipo criollos de Tabasco son las más polimórficas (73.4%), en comparación con las de Chiapas (12.3) y Yucatán (8.8) y que genéticamente las poblaciones silvestres existentes en Chiapas están relacionados con los cultivares de tipo criollos de Tabasco, pero distintos a las poblaciones silvestres de Yucatán. El criollo identificado en Comalcalco es similar (96%) a los tipos criollos y al grupo de Sudamérica (Criollos, Forasteros y Trinitarios). Motamayor *et al.* (2002) encontró una diversidad de 0.04 para los Criollos antiguos y 0.78 para los Forasteros.

En Tabasco, la nueva visión del productor y de las entidades estatales y federales relacionadas con el sector agrícola, para continuar la actividad cacaotera, es plantar genotipos resistentes a *M. royeri*, que sean productivos y produzcan un cacao de calidad. *M. royeri* es una enfermedad que está causando grandes pérdidas en la producción de cacao en el estado. Si esto no se realiza, la opción del productor es cambiar a otros cultivos más rentables.

Esto es una pauta para realizar investigación básica y aplicada en el cultivo de cacao para que la transferencia de tecnología sea basada en conocimiento científico generado en la región. Para ello es necesario y urgente la identificación de genotipos con alto rendimiento productivo, diseñar estrategias del manejo sustentable del cultivo y el control de las enfermedades y plagas, identificar genotipos locales con tolerancia a *M. royeri* y a futuro, crear genotipos (cruzas, híbridos) encaminados a la resistencia de enfermedades e incremento de la productividad y calidad.

Todo basado en información morfológica (atributos) y molecular (genético) para aplicar la selección asistida por marcadores moleculares. Esta selección apoyada en el conocimiento de regiones del genoma implicadas en la variación de un carácter a efecto cuantitativo (QTL), disminuye el tiempo obtención de un híbrido, en comparación con el mejoramiento genético tradicional.

2.7. LITERATURA CITADA

- Aikpokpodion, P. O., J. C. Motamayor, V. O. Adetimirin, Y. Adu-Ampomah, I. Ingelbrecht, A. B. Eskes, R. J. Schnell, and M. Kolesnikova-Allen. 2009. Genetic diversity assessment of sub-samples of cacao, *Theobroma cacao* L. collections in West Africa using simple sequence repeats marker. *Tree Genet. Genomes* 5: 699-711.
- Allegre, M., X. Argout, M. Boccara, O. Fouet, Y. Roguet, A. Berard, J. M. Thèvenin, A. Chauveau, R. Rivallan, D. Clement, B. Courtois, K. Gramacho, A. Boland-Auge, M. Tahí, P. Umaharan, D. Brunel, and C. Lanaud. 2012. Discovery and mapping of a new expressed sequence tag-single nucleotide polymorphism and simple sequence repeat panel for large-scale genetic studies and breeding of *Theobroma cacao* L. *DNA Res.* 19: 23-35.
- Arciniegas L., A. M. 2005. Caracterización de árboles superiores de cacao (*Theobroma cacao* L.) seleccionados por el programa de mejoramiento genético del CATIE. Tesis Msc., CATIE, Turrialba, Costa Rica. 126p.
- Argout X., J. Salse, J. M. Aury, M. J. Gaultinan, G. Droc, J. Gouzy, M. Allegre, C. Chaparro, T. Legavre, S. Maximova N., M. Abrouk, F. Murat, O. Fouet, J. Poulain, M. Ruiz, Y. Roguet, M. Rodier-Goud, J. F. Barbosa-Neto, F. Sabot, D. Kudrna, J. S. S. Ammiraju, C. Schuster S., J. E. Carlson, E. Sallet, T. Schiex, A. Dievart, M. Kramer, L. Gelley, Z. Shi, A. Berard, C. Viot, M. Boccara, A. M. Risterucci, V. Guignon, X. Sabau, M. J. Axtell, Z. Ma, Y. Zhang, S. Brown, M. Bourge, W. Golser, X. Song, D. Clement, R. Rivallan, M. Tahí, J. M. Akaza, B. Pitollat, K. Gramacho, A. D'Hont, D. Brunel, D. Infante, I. Kebe, P. Costet, R. Wing, W. R. McCombie, E. Guiderdoni, F. Quetier, O. Panaud, P. Wincker, S. Bocs, and C. Lanaud. 2011. The genome of *Theobroma cacao*. *Nat Genet* 43: 101-108.
- Azofeifa D., A., 2006. Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del trópico. *Agronomía mesoamericana* 17(2): 221-241.
- Bartley, B. G. D. 2005. The genetic diversity of cacao and its utilization. Wallingford, U. K. CABI, Publishing. 342 p.

- Bhattacharjee, R., P. Aikpokpdion, M. Kolesnikova-Allen, K. Badaru, and R. Schnell. 2004. West African cocoa: a pilot study on DNA fingerprinting of de germplasm from cross River State of Nigeria. *INGENIC, Newsletter* 9: 15-20.
- Bekele, F. B., I. Bekele, D. R. Butler, and G. G. Bidaisee. 2006. Patterns of morphological variation in a sample of cacao (*Theobroma cacao* L.) germplasm from the International Cocoa Genebank, Trinidad. *Genetic Resources and Crop Evolution* 53:933-948.
- Bekele, F. L. 2004. The history of cacao production in Trinidad and Tobago. In: Re-vitalisation of the Trinidad & Tobago cacao industry: proceeding of the APASTT seminar-exhibition, 20 september 2003, St. Augustine, Trinidad. (edi.) L. A. Wilson, 4-12. Trinidad & Tobago. APASTT.
- Bertolde, F. Z., A-A. F. de Almeida, R. X. Corrêa, F. P. Gomes, F. A. Gaiotto, V. C. Baligar, and L. L. Loguercio. 2009. Molecular, physiological and morphological analysis of waterlogging tolerance in clonal genotypes of *Theobroma cacao* L. *Tree Physiol.* 30: 56-67.
- Boccaro, M. and D. Zhang. 2006. Progress in resolving identity issues among the Parinari accessions held in Trinidad: the contribution of the collaborative USDA/CRU project. *CRU Ann Rpt 2005*, Cacao Research Unit, The University of the West Indies, St. Augustine, Trinidad and Tobago.
- Borrone, J. W, D. N. Kuhn, and R. J. Schnell. 2004. Isolation, characterization, and development of WRKY genes as useful genetic markers in *Theobroma cacao*. *Theor. Appl. Genet.* 109: 495-507.
- Boza, E. J., B. M. Irish, A. W. Meerow, C. L. Tondo, O. A. Rodríguez, M. Ventura-López, J. A. Gómez, J. M. Moore, D. Zhang, J. C. Motamayor, and R. J. Schnell. 2014. Genetic diversity, conservation, and utilization of *Theobroma cacao* L.: genetic resources in the Dominican Republic. *Genet. Resour. Crop Evol.* DOI 10.1007/s10722-012-9860-4.
- Brown, J. S., W. Phillips-Mora, E. J. Power, C. Krol, C. Cervantes-Martinez, J. C. Motamayor, and R. J. Schnell. 2007. Mapping QTLs for resistance to frosty pod and black pod diseases and horticultural traits in *Theobroma cacao* L. *Crop Sci.* 47: 1851- 1858.

- Brown, J. S., D. N. Kuhn., U. Lopez, and R. J. Schnell. 2005. Resistance gene mapping for witches' broom disease in *Theobroma cacao* L. in an F2 population using SSR markers and candidate genes. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 130: 366-373.
- Coe, M y S. Coe. 2013. La verdadera historia del chocolate. Trad. Marco Antonio Pulido Rull. Fondo de Cultura Económica, México. 396 p.
- Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira, (CEPLAC). 2007. The use of molecular biology techniques in a search for varieties resistant to Witches' Broom disease of cocoa. CFC/ICCO/CEPLAC. Kuala. Lumpur. 14 p.
- Cuatrecasas, J. 1964. Cacao and its allies: A taxonomic revision of the genus *Theobroma*. *Contributions to the U.S. Natural Herbarium* 35(6): 379–614.
- Cheesman, E. 1944. Notes on the nomenclature, classification and possible relationships of cocoa populations. *Tropical Agriculture (Trinidad)* 21(8): 114-159.
- Chumacero S, C., W. Durka, T. Tschardtkey, I. Hensen, and M. Kessler. 2013. Gene flow and genetic diversity in cultivated and wild cacao (*Theobroma cacao*) in Bolivia. *Am. J. Bot.* 100(11): 2271-2279.
- Clement, D., A. M. Risterucci., J. C. Motamayor., J. N'Goran, and C. Lanaud. 2003. Mapping quantitative trait loci for bean traits and ovule number in *Theobroma cacao* L. *Genome* 46:103-111.
- Crouzillat, D., L. Bellanger, M. Rigoreau, P. Bucheli, and V. Pétiard. 2001. Genetic structure, characterization and selection of Nacional cocoa compared to other genetic groups. *Proc Intl Workshop New Technol Cocoa Breeding (INGENIC)*. pp. 48-66.
- Dantas, L. G. and M. Guerra. 2010. Chromatin differentiation between *Theobroma cacao* L. and *T. grandiflorum* Schum. *Gen. Mol. Biol.* 33(1): 94-98.
- De la Cruz, M., R. Whitkus., A. Gómez-Pompa, and L. Mota-Bravo. 1995. Origins of cacao cultivation. *Nature* 375: 542-543.

- Efombagn, B. M. I., J. C. Motamayor, O. Sounigo, A. B. Eskes, S. Nyassé, C. Cilas, R. Schnell, M. J. Manzanares-Dauleux, and M. Kolesnikova-Allen. 2008. Genetic diversity and structure of farm and GenBank accessions of cacao (*Theobroma cacao* L.) in Cameroon revealed by microsatellite markers. *Tree Gen. Genomes* 4: 821-831.
- Engels, J. M. M., B. G. D. Bartley, and G. A. Enríquez. 1980. Cacao descriptor, their states and modus operandi. *Turrialba* 30(2): 209-218.
- Faleiro, F. G., V. T. Queiroz., U. V. Lopes., C. T. Guimarães., J. L. Pires., M. M. Yamada., I. S. Araújo., M. G. Pereira., R. Schnell., G. A. S. Filho., C. F. Ferreira., E. G. Barros, and M. A. Moreira. 2006. Mapping QTLs for Witches' Broom (*Crinipellis pernicioso*) Resistance in cacao (*Theobroma cacao* L.). *Euphytica* 149: 227-235.
- Fang, J. Y., A. Wetten, and P. Hadley. 2004. Cryopreservation of cocoa (*Theobroma cacao* L.) somatic embryos for long-term germplasm storage. *Plant Sci.* 166: 669-675.
- Figueira, A., J. Janick, and P. Goldsbrough. 1992. Genome size and DNA polymorphism in *Theobroma cacao*. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 117(4): 673-677.
- Figueira, A., J. Janick, M. Levy, and P. Goldsbrough. 1994. Reexamining the classification of *Theobroma cacao* L. using molecular markers. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 119(5): 1073-1082.
- Florin, B., E. Brulard, and V. Pétiard. 2000. In vitro cryopreservation of cacao genetic resources. *In: Engelman F; Tagaki H (eds) Cryopreservation of tropical plant germplasm.* Japanese International Research Centre for Agricultural Sciences and IPGRI, Rome, Italy, pp 344-347.
- Gómez-Pompa, A., J. Salvador F. and M. Aliphath F. 1990. The sacred cacao groves of the maya. *Latin American Antiquity* 1(3): 247-257.
- Guiltinan, M. J., J. Verica., D. Zhang, and A. Figueira. 2008. Genomic of *Theobroma cacao*, “the food of the gods”. *In: Genomic of Tropical Crop Plants.*, Moore, R. Ming (eds.). pp. 145-170.
- Hardy, G. H. 1908. Mendelian proportions in a mixed population. *Science*, N. S. 28: 49-50.

- Irish, B., R. Goenaga, D. Zhang, R. Schnell, J. S. Brown, and J. C. Motamayor. 2010. Microsatellite fingerprinting of the USDA-ARS Tropical Agriculture Research Station Cacao (*Theobroma cacao* L.) germplasm collection. *Crop Sci.* 50: 656-667.
- Ji, K., D. Zhang, L. A. Motilal, M. Boccara, P. Lachenaud, and L. W. Meinhardt. 2012. 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.* DOI 10.1007/s10722-012-9847-1.
- Johnson, E. S., F. L. Bekele, S. J. Brown, Q. Song, D. Zhang, L. W. Meinhardt, and R. J. Schnell. 2009. Population structure and genetic diversity of the Trinitario Cacao (*Theobroma cacao* L.) from Trinidad and Tobago. *Crop Sci.* 49: 564-572.
- Johnson, E. S., A. Mora, and R. J. Schnell. 2007. Field Guide efficacy in the identification of reallocated clonally propagated accessions of cacao (*Theobroma cacao* L.). *Genet. Resour. Crop Evol.* 54: 1301-1313.
- Johnson, E. S., F. L. Bekele, and R. J. Schnell. 2004. Field guide to the ICS clones of Trinidad. CATIE, Turrialba, Costa Rica. Manual técnico No. 54. 32 pp.
- Lachenaud, P. and D. Zhang. 2008. Genetic diversity and population structure in wild stands of cacao trees (*Theobroma cacao* L.) in French Guiana. *Ann. For. Sci.* 65:310. DOI: 10.1051/forest:2008011.
- Laliberté, B., N. C. Cryer, A. J. Daymond, M. J. End, J. Engels, B. Eskes, M. Gilmour, P. Lachenaud, W. Phillips-Mora, C. J. Turnbull, P. Umaharan, D. Zhang, and S. Weise. 2012. A Global strategy for the conservation and use of cacao genetic resources, as the foundation for a sustainable cocoa economy. *In: 17th International cocoa research conference, Yaoundé, Cameroon.* 15p.
- Lanaud, C., M. A. Risterucci, I. Pieretti, M. Falque, A. Bouet, and P. J. L. Lagoda. 1999. Isolation and characterization of microsatellites in *Theobroma cacao* L. *Mol. Ecol.* 8: 2141-2143.

- Lanaud, C., A. M. Risterucci, J. A. K. N'Goran, D. Clement, M. H. Flament, V. Laurent, and M. Falque. 1995. A genetic linkage map of *Theobroma cacao* L. *Theor. Appl. Genet.* 91: 987-993.
- Lanaud, C. 1987. Nouvelles données sur la biologie du cacaoyer (*Theobroma cacao* L.): diversité des populations, système d'incompatibilité, haploïdes spontanés. Leurs conséquences pour l'amélioration génétique de cette espèce. These PhD. Université de Paris Sud, Centre d'Orsay, France.
- Lanaud, C. 1986. Genetic studies of *Theobroma cacao* L. with the help of enzymatic markers. I. Genetic control and linkage of nine enzymatic markers. *Café Cacao Thé* 30: 259-270.
- Laurent, V., A. M. Risterucci, and C. Lanaud. 1994. Genetic diversity in cocoa revealed by cDNA probes. *Theor. Appl. Genet.* 68: 193-195.
- Lerceteau, E., T. Robert, V. Pétiard, and D. Crouzillat. 1997. Evaluation of the extent of genetic variability among *Theobroma cacao* accessions using RAPD and RFLP markers. *Theor. Appl. Genet.* 95: 10-19.
- Loor, R. G., A. M. Risterucci, B. Courtois, O. Fouet, M. Jeanneau, E. Rosenquist, F. Amores, A. Vasco, M. Medina, and C. Lanaud. 2009. Tracing the native ancestors of the modern *Theobroma cacao* L. population in Ecuador. *Tree Gen. Genomes* 5: 421-433.
- Lopes, V. L., W. R. Monteiro, J. L. Pires, D. Clement, M. M. Yamada, and K. P. Gramacho. 2011. Cocoa breeding in Bahia, Brazil - strategies and results. *Crop Breeding Appl. Biotech.* S1: 73-81.
- López A., P. A., C. H. Avendaño A., M. A. Ramírez G., C. Hernández H., M. C. López N, y A. Mendoza L. 2013. Catálogo de clones de cacao resistentes a la monilia y de alta productividad. Publicación Especial 9, SAGARPA, INIFAP. 37 p.
- López A, P. A. 1993. Descripción y control de las enfermedades del cacao en Tabasco. SARH-INIFAP, folleto técnico. 7. 23 p.

- López A, P.A., J. I. López A. y V. H. Delgado N. 1991. Desarrollo vegetativo de híbridos interclonales de cacao en Tabasco. *In: Cuarta reunión científica forestal y agropecuaria del CIFAP-Tabasco*. Villahermosa, Tabasco. 69 p.
- Maharaj, K., P. Maharaj, F. L. Bekele, D. Ramnath, G. G. Bidaisee, I. Bekele, C. Persad, K. Jennings, and R. Sankar. 2011. Trinidad selected hybrids: An investigation of the phenotypic and agro-economic traits of 20 selected cacao cultivars. *Trop Agric. (Trinidad)* 88(4): 175-185.
- Marín-Argüello, I. y S. Negaresh. 2009. Presencia de genes (WRKY) asociados a la respuesta al estrés biótico en cacao de Nicaragua. *Agronomía mesoamericana* 20(1): 41-46.
- Martinson, V. A. 1975. Cytological studies of diploid and tetraploid *Theobroma cacao*. *Genetics* 45: 341-348.
- Maximova, S., L. Alemanno., A. Young., N. Ferriere., A. Traore, and M. Guiltinan. 2002. Efficiency, genotypic variability, and cellular origin of primary and secondary somatic embryogenesis of *Theobroma cacao* L. *In vitro Cell Dev. Biol-Plant*. 38: 252-259.
- Miranda, F. 1962. Wild cacao in the Lacandona forest, Chiapas, Mexico. *Cacao (Turrialba)* 7:7. CATIE, Costa Rica.
- Motamayor, J. C., K. Mockaitis, J. Schmutz, N. Haiminen, D. Livingstone III, O. Cornejo, S. D. Findley, P. Zheng, F. Utro, S. Royaert, C. Saski, J. Jenkins, R. Podicheti, M. Zhao, B. E. Scheffler, J. C. Stack, F. A. Feltus, G. M. Mustiga, F. Amores, W. Phillips, J. P. Marelli, G. D. May, H. Shapiro, J. Ma, C. D. Bustamante, R. J. Schnell, D. Main, D. Gilbert, L. Parida, and D. N. Kuhn. 2013. The genome sequence of the most widely cultivated cacao type and its use to identify candidate genes regulating pod color. *Genome Biol.* 14:r53.
- Motamayor, J. C., P. Lachenaud, J. Wallace, G. Loor, D. N. Kuhn, J. S. Brown, and R. J. Schnell. 2008. Geographic and genetic population differentiation of the Amazonian chocolate tree. *PLoS One* 3: e3311. doi:10.1007/s12042-008-9011-4.
- Motamayor, J. C., A. M. Risterucci, M. Heath, and C. Lanaud. 2003. Cacao domestication II: progenitor germplasm of the Trinitario cacao cultivar. *Heredity* 91: 322-330.

- Motamayor, J. C., P. A. Lopez, C. F. Ortiz, A. Moreno, and C. Lanaud. 2002. Cacao domestication. I. The origin of the cacao cultivated by the Mayas. *Heredity* 89:380-386.
- Motamayor, J. C. and C. Lanaud. 2002. Molecular analysis of the origin and domestication of *Theobroma cacao* L. In: *Managing plant genetic diversity* (eds) J.M.M. Engels, V. Ramanatha Rao, A.H.D. Brown y M.T. Jackson. IPGRI. Rome, Italy. pp 77-87.
- Motamayor, J. C., A. M. Risterucci, V. Laurent, A. Moreno, and C. Lanaud. 2000. The genetic diversity of criollo cacao and its consequence in quality breeding. In: *Memorias del primer congreso venezolano del cacao y su industria*. 378 p.
- Motamayor, J. C., P. A. López., C. Ortiz., A. Moreno, J. Zamora., M. Pinto, and C. Lanaud. 1998. Sampling genetic diversity of criollo cacao in Central and South America. *INGENIC, Newsletter* 4: 14-15.
- Motilal, L. A., D. Zhang, P. Umaharan, S. Mischke, V. Mooleedhar, and L. W. Meinhard. 2010. The relic criollo cacao in Belize - genetic diversity and relationship with Trinitario and other cacao clones held in the International Cocoa Genebank, Trinidad. *Plant Gen. Resour.: Characterization and Utilization* 8(2): 106-115.
- Motilal, L. A., D. Zhang, P. Umaharan, S. Mischke, M. Boccara, and S. Pinney. 2009. Increasing accuracy and throughput in large-scale microsatellite fingerprinting of cacao field germplasm collections. *Tropical Plant Biol.* 2: 23-37.
- Motilal, L. and D. Butler. 2003. Verification of identities in global cacao germplasm collections. *Genetic Res. Crop Evol.* 50: 799-807.
- Muñoz, J. M. O. 1948. Estudios cromosomicos en el género *Theobroma* L. Tesis de M. Ag. IICA, Turrialba, Costa Rica.
- Nagai, C., R. Heinig, C. T. Olano, J. C. Motamayor, and R. J. Schnell. 2009. Fingerprinting of cacao germplasm in Hawaii. Hawaii Agriculture Research Center. Cacao report 1, 14p.
- N'Goran, J. A. K., V. Laurent, A. M. Risterucci, and C. Lanaud. 2000. The genetic structure of cocoa populations (*Theobroma cacao* L.) revealed by RFLP analysis. *Euphytica* 115: 83-90.

- Ortiz G., C. F. 1996. Étude de la diversité génétique de populations de *Phytophthora* pathogènes du cacaoyer (*Theobroma cacao* L.) et du cocotier (*Cocos nucifera* L.). Thèse Doctoral. Université Paul Sabatier Toulouse, Francia. 85 p.
- Peakall R, and P. E. Smouse, 2012. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics* 28: 2537-2539.
- Pokou, N. D., J. A. K. N’Goran, P. Lachenaud, A. B. Eskes, J. C. Montamayor, R. Schnell, M. Kolesnikova-Allen, D. Clément, and A. Sangaré. 2009. Recurrent selection of cocoa populations in Côte d’Ivoire: comparative genetic diversity between the first and second cycles. *Plant Breeding* 128: 514-520.
- Powis, T. G., A. Cypher, N. W. Gaikwad, L. Grivetti, and K. Cheong. 2011. Cacao use and the San Lorenzo Olmec. *PNAS* 108(21): 8595-8600.
- Pugh, T., O. Fouet, A. M. Risterucci, P. Brottier, M. Abouladze, C. Deletrez, B. Courtois, D. Clement, P. Larmande, J. A. K. N’Goran, and C. Lanaud. 2004. A new cacao linkage map based on codominant markers: development and integration of 201 new microsatellite markers. *Theor. Appl. Genet.* 108: 1151-1161.
- Phillips-Mora W, A. Arciniegas-Leal, A. Mata-Quirós y J. C. Motamayor-Arias. 2012. Catálogo de clones de cacao seleccionados por el CATIE para siembras comerciales. Manual técnico 105; CATIE. Turrialba, Costa Rica. 68 p.
- Phillips, W., C. F. Ortiz, and M. C. Aime. 2006. Fifty years of frosty pod rot in central america: Chronology of its spread and impact from Panamá to México. *In: International Cocoa Research Conference. Actas: Procceding Nigeria. COPAL Vol. I, p. 1039-1047.*
- Phillips-Mora, W., H. Rodríguez R. y P. J. Fritz. 1995. Marcadores de ADN: Teorías, aplicaciones y protocolos de trabajo, con ejemplos de investigaciones en cacao (*Theobroma cacao*). Serie técnica. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 184p.
- Queiroz, V. T., C. T. Guimarães, D. Anhert, I. Schuster, R. T. Daher, M. G. Pereira, V. R. M. Miranda, L. L. Loguercio, E. G. Barros, and M. A. Moreira. 2003. Identification of a

- major QTL in cocoa (*Theobroma cacao* L.) associated with resistance to witches' broom disease. *Plant Breeding* 122: 268-272.
- Quiroz, J. G. V. 2002. Caracterización molecular y morfológica de genotipos superiores con características de Cacao Nacional (*Theobroma cacao* L.) de Ecuador. Tesis de Msc. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 111p.
- Ramírez-Guillermo, M. A. y López-Andrade, P. A. 2012. Reacción de dos clones "CONADECA" de cacao (*Theobroma cacao* L.) inoculados artificialmente con *Moniliophthora roreri* causal de la moniliasis del cacao. *In: I Simposium Internacional en Producción Agroalimentaria y XXIV Reunión Científica-Tecnológica Forestal y Agropecuaria Tabasco*. Cárdenas, Tabasco. pp 610-618.
- Risterucci, A. M., L. Grivet, J. A. Ngoran, I. Pieretti, M. H. Flamen, and C. Lanaud. 2000. A high-density linkage map of *Theobroma cacao* L. *Theor Appl Genet* 101:948-955.
- Ronning, C. M. and R. J. Schnell. 1994. Allozyme diversity in a germplasm collection of *Theobroma cacao* L. *J. Heredity* 85: 291-295.
- Ronning, C. M., R. J. Schnell, and D. N. Kuhn. 1995. Inheritance of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in *Theobroma cacao* L. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 120(4): 681-686.
- Royaert, S., W. Phillips-Mora, A. M. Arciniegas L., K. Cariaga, J. S. Brown, D. N. Kuhn, R. J. Schnell, and J. C. Motamayor. 2011. Identification of marker-trait associations for self-compatibility in a segregating mapping population of *Theobroma cacao* L. *Tree Gen. Genomes* DOI 10.1007/s11295-011-0403-5.
- Russell, J. R., F. Hosein, E. Johnson, R. Waugh, and W. Powell. 1993. Genetic differentiation of cocoa (*Theobroma cacao* L.) populations revealed by RAPD analysis. *Mol. Ecol.* 2: 89-97.
- Sánchez, I., L. A. Zárate, G. Gallego, and J. Tohme. 2007. Análisis de la diversidad genética de accesiones de *Theobroma cacao* L. del banco de conservación a cargo de Corpoica. *Revista Corpoica-Ciencia y Tecnología Agropecuaria* 8(2): 26-31.

- Santos, F. F. J., U. V. Lopes, J. L. Pires, G. R. P. Melo, K. P. Gramacho, and D. Clément. 2014. QTLs detection under natural infection of *Moniliophthora perniciosa* in a cacao F2 progeny with Scavina-6 descendants. *Agrotropica* 26(1): 65-72.
- Santos, R. M. F., U. V. Lopes, R. C. Bahia, R. C. R. Machado, D. Ahnert, and R. X. Corrêa. 2007. Marcadores microssatélites relacionados com a resistência à vassoura-de-bruxa do cacauero. *Pesq. Agropec. Bras., Brasília* 42(8): 1137-1142.
- Saunders, J. A., S. Mischke, E. A. Leamy, and A. A. Hemeida. 2004. Selection of international molecular standards for DNA fingerprinting of *Theobroma cacao*. *Theor. Appl. Genet.* 110: 41-47.
- Sereno, M. L., P. S. B. Albuquerque, R. Vencovsky, and A. Figueira. 2006. Genetic diversity and natural population structure of cacao (*Theobroma cacao* L.) from the Brazilian Amazon evaluated by microsatellite markers. *Conservation Genetics* 7: 13-24.
- Silva, C. R. S., P. S. B. Albuquerque, F. R. Ervedosa, J. W. S. Mota, A. Figueira, and A. M. Sebbenn. 2011. Understanding the genetic diversity, spatial genetic structure and mating system at the hierarchical levels of fruits and individuals of a continuous *Theobroma cacao* population from the Brazilian Amazon. *Heredity* 106: 973-985.
- Sounigo, O., R. Umaharan, Y. Christopher, A. Sankar, and S. Ramdahin. 2005. Assessing the genetic diversity in the International Cocoa Genebank, Trinidad (ICG,T) using isozyme electrophoresis and RAPD. *Gen. Resour. Crop Evol.* 52: 1111-1120.
- Susilo, A. W., D. Zhang, and L. Motilal. 2013. Assessing genetic diversity cocoa (*Theobroma cacao* L.) collection resistant to cocoa pod borer using simple sequence repeat markers. *Pelita Perkebunan* 29(1): 1-9.
- Susilo, A. W., D. Zhang, L. A. Motilal, S. Mischke, and L. W. Meinhardt. 2011. Assessing genetic diversity in Java fine-flavor cocoa (*Theobroma cacao* L.) germplasm by using simple sequence repeat (SSR) markers. *Trop. Agr. Develop.* 55(2): 84-92.

- Schnell, R. J., D. N. Kuhn, J. S. Brown, C. T. Olano, W. Phillips-Mora, F. A. Amores, and J. C. Motamayor. 2007. Development of a marker assisted selection program for cacao. *Phytopathology* 97(12): 1664-1669.
- Schnell, R. J., J. S. Brown, D. Kuhn, C. Cervantes-Martinez, C. T. Olano, and J. C. Motamayor. 2005a. Why would we breed cacao in Florida?. *Pro. Fla. State Hort. Soc.* 118: 189-191.
- Schnell, R. J., C. T. Olano, J. S. Brown, A. W. Meerow, C. Cervantes-Martinez, C. Nagai, and J. C. Motamayor. 2005b. Retrospective determination of the parental population of superior cacao (*Theobroma cacao* L.) seedlings and association of microsatellite alleles with productivity. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 130: 181-190.
- Takrama, J., J. Kun, L. Meinhardt, S. Mischke, S. Y. Opoku, F. K. Padi, and D. Zhang. 2014. Verification of genetic identity of introduced cacao germplasm in Ghana using single nucleotide polymorphism (SNP) marker. *African J. Biotech.* 13(21): 2127-2136.
- Takrama, J. F., C. Cervantes-Martínez, W. Phillips-Mora, J. S. Brown, J. C. Motamayor, and R. J. Schnell. 2005. Determination of Off-Types in a cocoa breeding programme using microsatellites. *INGENIC Newsletter* 10:2-8.
- Thomas E., M. van Zonneveld, J. Loo, T. Hodgkin, G. Galluzzi, and J. van Etten. 2012. Present spatial diversity patterns of *Theobroma cacao* L. in the Neotropics reflect genetic differentiation in pleistocene refugia followed by human-influenced dispersal. *PLoS ONE* 7(10): e47676. doi:10.1371/journal.pone.0047676.
- Thondaiman, V., K. Rajamani, N. Senthil, N. Shoba, and A. J. Joel. 2013. Genetic diversity in cocoa (*Theobroma cacao* L.) plus trees in Tamil Nadu by simple sequence repeat (SSR) markers. *African J. Biotech.* 12(30): 4747-4753.
- Trognitz, B., X. Scheldeman, K. Hansel-Hohl, A. Kuant, H. Grebe, and M. Hermann. 2011. Genetic population structure of cacao plantings within a young production area in Nicaragua. *PLoS ONE* 6(1): e16056. doi:10.1371/journal.pone.0016056.
- Wilde J., R. Waugh, and W. Powell. 1992. Genetic fingerprinting of *Theobroma* clones using randomly amplified polymorphic DNA markers. *Theor. Appl. Genet.* 83: 871-877.

- World Cocoa Foundation (WCF). 2014. Cocoa marked update. <http://worldcocoafoundation.org/wp-content/uploads/Cocoa-Marked-update-as-of-4-1-2014.pdf>. consultado 23 de agosto 2014.
- Whitkus, R., M. de la Cruz, L. Mota-Bravo, and A. Gómez-Pompa. 1998. Genetic diversity and relationships of cocoa (*Theobroma cacao* L.) in southern México. *Theor. Appl. Genetic.* 96: 621-627.
- Zhang, D., W. J. Martínez, E. S. Johnson, E. Somarriba, W. Phillips-Mora, C. Astorga, S. Mischke, and L. W. Meinhardt. 2011. Genetic diversity and spatial structure in a new distinct *Theobroma cacao* L. population in Bolivia. *Genet. Resour. Crop Evol.* DOI 10.1007/s10722-011-9680-y.
- Zhang, D., S. Mischke, E. S. Johnson, W. Phillips-Mora, and L. Meinhardt. 2009a. Molecular characterization of an international cacao collection using microsatellite markers. *Tree Gen. Genomes* 5: 1-10.
- Zhang, D., M. Boccara, L. Motilal, S. Mischke, E. S. Johnson, D. R. Butler, B. Bailey, and L. Meinhardt. 2009b. Molecular characterization of an earliest cacao (*Theobroma cacao* L.) collection from Upper Amazon using microsatellite DNA markers. *Tree Gen. Genomes* 5: 595-607.
- Zhang, D., M. Boccara, L. Motilal, D. R. Butler, P. Umaharan, S. Mischke, and L. Meinhardt. 2007. Microsatellite variation and population structure in the “Refractario” cacao of Ecuador. *Conserv. Genet.* DOI 10.1007/s10592-007-9345-8.
- Zhang, D., E. Arevalo-Gardini, S. Mischke, L. Zuñiga-Cernades, A. Barreto-Chavez, and J. Adriaola del Aguila. 2006a. Genetic diversity and structure of managed and semi-natural populations of cacao (*Theobroma cacao*) in the Huallaga and Ucayali Valleys of Peru. *Ann. Bot.* 98: 647–655.
- Zhang, D., S. Mischke, R. Goenaga, A. A. Hemeida, and J. A. Saunders. 2006b. Accuracy and reliability of high-throughput microsatellite genotyping for cacao clone identification. *Crop Sci.* 46: 2084-2092.

CONCLUSIONES GENERALES

Con base en los objetivos planteados en el presente estudio se concluye:

La diversidad morfológica para el fruto y la semilla es amplia en las poblaciones de *Theobroma cacao* L. cultivadas en Tabasco, así como en los bancos de germoplasma evaluados; tanto para el fruto como para semilla. Siendo mayor en las plantaciones que en los bancos de germoplasma para características relacionados con la forma de la mazorca: peso y longitud de mazorca que en las plantaciones.

En plantaciones como en bancos de germoplasma se observaron rangos de variación amplios para el peso total de semillas por mazorca.

En las plantaciones la forma dominante de la mazorca fue el cundeamor, la cual está presente en el 26.8% de las plantaciones, esta forma de mazorca conserva características de la forma criollo (rugosidad y ápice con terminación curva). Se observaron mazorcas con semillas de cotiledones blancos en las plantaciones (4.2 %), lo que sugiere la presencia aun de plantas criollas.

En los bancos de germoplasma la forma dominante fue el angoleta con (44.4% en clones, 67.7% en híbridos y 36.3% en clones criollo).

La estructura morfológica (Análisis de Componentes Principales de características cuantitativas) mostró diferenciación espacial entre las muestras de las plantaciones y las accesiones de los banco de germoplasma. Algunas muestras provenientes de plantaciones mostraron una estrecha relación con las de los bancos de germoplasma.

Se identificaron arboles sobresalientes en las plantaciones, destacando por número y peso total de semillas por mazorca e índice de mazorca.

El análisis de la diversidad genética permitió identificar iniciadores que revelaron un alto polimorfismo en las plantaciones de cacao de Tabasco: mTcCIR 6, 8 y 33.

En las plantaciones, los 19 microsatélites (SSR) utilizados revelaron un total de 76 alelos y en promedio 4 alelos/locus.

En los bancos de germoplasma los 19 SSR que revelaron mayor polimorfismo fueron mTcCIR37, 33, 15 y 11. En estas accesiones se revelaron un total de 132 alelos con un promedio de 6.95 alelos/locus.

Se notó la presencia de alelos nuevos, indicando que el cacao de Tabasco es diferente a los grupos genéticos ya conocidos, y distantes a los de su lugar de origen, debido posiblemente a la recombinación generada entre los criollos nativos y las introducciones de forastero.

El nivel de heterocigosidad en las plantaciones de cacao de Tabasco es menor ($H_o=0.473$) al observado en los BGC ($H_o=0.729$) y la diversidad genética en plantaciones es bajo ($H_e=0.386$) en contraste con el de los BGC ($H_e=0.661$).

RECOMENDACIONES

Rescatar y conservar las plantas sobresalientes e identificadas en el presente estudio morfológico y molecular e iniciar el mejoramiento participativo.

Continuar con la caracterización morfológica y molecular incluyendo nuevas plantas y zonas productoras de cacao en Tabasco y el país.

Confirmar la presencia de alelos nuevos, conservar y estudiar las plantas con los nuevos alelos para identificar su potencial genético.

Rescatar y conservar las plantas de cacao criollos o criollos modernos presentes en Tabasco. Iniciar el mejoramiento participativo.

Realizar estudios físico-químicos y sensoriales de las poblaciones de cacao presentes en Tabasco para determinar su perfil de calidad.

Ampliar las investigaciones morfológicas y genéticas de los nuevos alelos y proponerlos para su denominación de origen del cacao de Tabasco.

ANEXOS

1. Anexo Capítulo I.

Anexo 1.1. Localidades del estado de Tabasco, Chiapas y ubicación de Bancos de germoplasma en el estudio.

Plantaciones de Tabasco	
Municipio	Genotipos (Código)
Comalcalco	29445 al 29462, 29502 al 29579
Cunduacán	29348 al 29372 29692 al 29694 29704 al 29723
Huimanguillo	29479 al 29487 29607 al 29622
Jalpa de Méndez	29623 al 29625 29729 al 29764
Nacajuca	29637, 29770 y 29771
Paraíso	29468 al 29478
Tacotalpa	29391 y 29392
Teapa	29375 al 29380
Plantaciones de Chiapas	
Ixtacomitan	29772 al 2977
Bancos de Germoplasmas de Cacao en Tabasco	
Huimanguillo, CEHUI/INIFAP	29393 al 29444*
Comalcalco, Ex Finca El Danubio DAMC-UJAT	29651 al 29685

*CL=clones, HB=híbridos y CR=clones criollos

Anexo 1.2. Caracterización morfológica de mazorcas y semilla de 170 muestras: variables cualitativas

SELEC	TIPO	ACCESION	FM	CM	FAM	CBM	RMM	DMM	CCH	CFV	CMUS	CCS	FS	FSTS
BGC	CL	29425	2.00	1.00	3.00	1.00	1.00	5.00	1.00	1.00	2.00	7.00	2.00	1.00
BGC	CL	29412	1.00	4.00	3.00	3.00	1.00	7.00	1.00	1.00	2.00	7.00	2.00	3.00
BGC	CL	29418	1.00	1.00	8.00	2.00	5.00	5.00	1.00	1.00	1.00	7.00	2.00	3.00
BGC	CL	29424	1.00	1.00	8.00	2.00	1.00	5.00	1.00	1.00	2.00	7.00	1.00	1.00
BGC	CL	29426	2.00	1.00	2.00	0.00	1.00	5.00	1.00	1.00	2.00	4.00	1.00	1.00
BGC	CL	29421	1.00	1.00	8.00	2.00	1.00	7.00	1.00	1.00	2.00	7.00	4.00	1.00
BGC	CL	29417	1.00	1.00	7.00	3.00	7.00	5.00	3.00	3.00	1.00	7.00	1.00	1.00
BGC	CL	29408	3.00	1.00	8.00	1.00	1.00	7.00	1.00	1.00	2.00	7.00	3.00	1.00
BGC	CL	29394	1.00	11.00	7.00	2.00	1.00	7.00	2.00	2.00	2.00	7.00	4.00	1.00
BGC	CL	29429	10.00	1.00	3.00	2.00	1.00	7.00	1.00	1.00	1.00	7.00	4.00	1.00
BGC	CL	29413	1.00	1.00	8.00	1.00	1.00	5.00	3.00	3.00	2.00	7.00	3.00	1.00
BGC	CL	29395	1.00	1.00	8.00	3.00	1.00	5.00	1.00	1.00	2.00	7.00	3.00	1.00
BGC	CL	29396	3.00	1.00	3.00	2.00	1.00	3.00	1.00	1.00	1.00	9.00	4.00	1.00
BGC	CL	29397	3.00	1.00	7.00	1.00	5.00	5.00	1.00	1.00	1.00	4.00	1.00	3.00
BGC	CL	29416	10.00	1.00	8.00	3.00	1.00	5.00	1.00	1.00	2.00	7.00	3.00	1.00
BGC	CL	29423	10.00	1.00	8.00	1.00	1.00	3.00	1.00	1.00	2.00	7.00	4.00	1.00
BGC	CL	29415	10.00	1.00	5.00	3.00	1.00	5.00	1.00	1.00	2.00	7.00	1.00	1.00
BGC	CL	29428	10.00	1.00	8.00	1.00	1.00	7.00	1.00	1.00	2.00	7.00	3.00	2.00
BGC	CL	29414	3.00	8.00	7.00	2.00	5.00	7.00	1.00	1.00	2.00	7.00	3.00	1.00
BGC	CL	29419	1.00	1.00	8.00	1.00	1.00	5.00	1.00	1.00	2.00	7.00	3.00	1.00
BGC	CL	29393	10.00	4.00	8.00	3.00	1.00	5.00	4.00	4.00	2.00	7.00	3.00	1.00
BGC	CL	29422	10.00	1.00	6.00	3.00	1.00	7.00	1.00	1.00	1.00	7.00	4.00	1.00
BGC	CL	29420	1.00	4.00	3.00	2.00	1.00	5.00	2.00	2.00	2.00	7.00	3.00	1.00
BGC	CL	29427	10.00	1.00	8.00	2.00	1.00	5.00	3.00	3.00	1.00	4.00	2.00	3.00
BGC	CL	29411	1.00	8.00	8.00	1.00	1.00	5.00	2.00	2.00	2.00	7.00	3.00	1.00
BGC	CL	29410	1.00	8.00	8.00	0.00	1.00	5.00	1.00	1.00	2.00	7.00	3.00	2.00
BGC	CL	29409	4.00	2.00	2.00	2.00	0.00	7.00	4.00	4.00	1.00	7.00	2.00	1.00
BGC	CR	29432	1.00	1.00	8.00	0.00	1.00	7.00	1.00	1.00	2.00	2.00	4.00	1.00
BGC	CR	29438	5.00	9.00	3.00	0.00	5.00	5.00	1.00	1.00	2.00	9.00	4.00	1.00
BGC	CR	29439	1.00	9.00	3.00	0.00	1.00	7.00	1.00	1.00	2.00	9.00	4.00	1.00
BGC	CR	29437	7.00	9.00	5.00	0.00	1.00	5.00	2.00	2.00	2.00	2.00	1.00	1.00
BGC	CR	29436	2.00	9.00	8.00	0.00	1.00	5.00	1.00	1.00	2.00	2.00	4.00	1.00
BGC	CR	29433	6.00	6.00	7.00	3.00	7.00	5.00	3.00	4.00	1.00	2.00	1.00	3.00
BGC	CR	29430	5.00	1.00	7.00	3.00	1.00	3.00	1.00	1.00	1.00	2.00	3.00	1.00
BGC	CR	29435	1.00	8.00	8.00	3.00	3.00	7.00	2.00	2.00	2.00	2.00	1.00	1.00
BGC	CR	29441	6.00	8.00	7.00	3.00	7.00	5.00	1.00	1.00	1.00	2.00	4.00	1.00
BGC	CR	29440	1.00	8.00	8.00	1.00	5.00	7.00	1.00	1.00	2.00	2.00	3.00	1.00

BGC	CR	29434	5.00	8.00	7.00	2.00	5.00	7.00	1.00	1.00	2.00	2.00	4.00	1.00
BGC	HB	29651	1.00	10.00	8.00	3.00	1.00	7.00	2.00	2.00	1.00	4.00	2.00	3.00
BGC	HB	29653	1.00	1.00	2.00	3.00	3.00	5.00	1.00	1.00	1.00	4.00	1.00	3.00
BGC	HB	29654	1.00	1.00	3.00	2.00	0.00	5.00	1.00	1.00	1.00	4.00	2.00	3.00
BGC	HB	29656	1.00	1.00	8.00	1.00	1.00	3.00	1.00	1.00	1.00	4.00	3.00	3.00
BGC	HB	29657	1.00	1.00	7.00	4.00	3.00	3.00	1.00	1.00	1.00	4.00	1.00	3.00
BGC	HB	29663	1.00	1.00	8.00	3.00	3.00	3.00	1.00	1.00	1.00	4.00	1.00	3.00
BGC	HB	29665	1.00	1.00	6.00	2.00	5.00	3.00	2.00	2.00	2.00	4.00	1.00	3.00
BGC	HB	29666	2.00	1.00	3.00	1.00	1.00	5.00	1.00	1.00	1.00	4.00	1.00	3.00
BGC	HB	29667	1.00	12.00	2.00	3.00	1.00	5.00	2.00	2.00	1.00	4.00	1.00	3.00
BGC	HB	29670	1.00	1.00	8.00	3.00	0.00	3.00	1.00	1.00	2.00	4.00	4.00	3.00
BGC	HB	29671	1.00	1.00	8.00	3.00	1.00	7.00	1.00	1.00	1.00	4.00	2.00	3.00
BGC	HB	29675	1.00	1.00	2.00	1.00	3.00	5.00	1.00	1.00	1.00	4.00	2.00	3.00
BGC	HB	29676	1.00	1.00	2.00	1.00	5.00	3.00	1.00	1.00	2.00	5.00	2.00	3.00
BGC	HB	29677	2.00	1.00	3.00	0.00	0.00	5.00	1.00	1.00	1.00	4.00	2.00	3.00
BGC	HB	29678	1.00	1.00	8.00	1.00	0.00	3.00	1.00	1.00	1.00	4.00	1.00	3.00
BGC	HB	29679	1.00	1.00	7.00	2.00	3.00	5.00	1.00	1.00	1.00	4.00	2.00	1.00
BGC	HB	29680	1.00	1.00	2.00	3.00	3.00	5.00	1.00	1.00	1.00	4.00	3.00	3.00
BGC	HB	29681	1.00	3.00	2.00	3.00	3.00	7.00	1.00	1.00	2.00	4.00	2.00	3.00
BGC	HB	29398	1.00	1.00	8.00	3.00	1.00	5.00	2.00	2.00	2.00	7.00	4.00	1.00
BGC	HB	29399	1.00	1.00	8.00	1.00	1.00	7.00	2.00	2.00	2.00	7.00	3.00	1.00
BGC	HB	29400	1.00	1.00	8.00	3.00	1.00	7.00	1.00	1.00	2.00	7.00	3.00	1.00
BGC	HB	29401	10.00	1.00	8.00	3.00	1.00	7.00	2.00	2.00	2.00	7.00	3.00	2.00
BGC	HB	29402	10.00	1.00	3.00	0.00	1.00	7.00	3.00	3.00	2.00	7.00	4.00	1.00
BGC	HB	29403	10.00	1.00	8.00	2.00	5.00	7.00	1.00	1.00	2.00	7.00	4.00	1.00
BGC	HB	29404	5.00	1.00	6.00	3.00	3.00	7.00	1.00	1.00	1.00	9.00	4.00	1.00
BGC	HB	29405	2.00	1.00	3.00	0.00	1.00	7.00	1.00	1.00	1.00	7.00	2.00	3.00
BGC	HB	29406	10.00	1.00	8.00	2.00	1.00	7.00	1.00	1.00	2.00	7.00	3.00	1.00
BGC	HB	29407	10.00	1.00	8.00	3.00	3.00	5.00	1.00	1.00	2.00	9.00	2.00	1.00
BGC	HB	29442	1.00	4.00	7.00	1.00	1.00	7.00	2.00	2.00	2.00	7.00	2.00	1.00
BGC	HB	29443	1.00	4.00	7.00	3.00	1.00	5.00	2.00	2.00	2.00	7.00	3.00	1.00
BGC	HB	29444	2.00	1.00	5.00	0.00	1.00	7.00	3.00	3.00	2.00	7.00	2.00	3.00
SCMP	PLT	29503	3.00	1.00	3.00	0.00	1.00	7.00	1.00	1.00	1.00	4.00	2.00	1.00
SCMP	PLT	29505	10.00	10.00	8.00	0.00	1.00	5.00	1.00	1.00	2.00	7.00	1.00	3.00
SCMP	PLT	29508	3.00	1.00	6.00	0.00	3.00	7.00	1.00	1.00	1.00	7.00	1.00	3.00
SCMP	PLT	29476	4.00	1.00	4.00	0.00	3.00	5.00	1.00	1.00	1.00	7.00	4.00	1.00
SCMP	PLT	29445	3.00	10.00	6.00	0.00	3.00	3.00	2.00	2.00	1.00	9.00	2.00	1.00
SCMP	PLT	29456	1.00	1.00	7.00	3.00	3.00	7.00	3.00	3.00	1.00	4.00	1.00	1.00
SCMP	PLT	29459	3.00	11.00	7.00	1.00	3.00	5.00	2.00	2.00	1.00	7.00	1.00	1.00
SCMP	PLT	29447	3.00	1.00	2.00	0.00	3.00	3.00	1.00	1.00	1.00	4.00	1.00	1.00
SCMP	PLT	29448	7.00	3.00	2.00	1.00	3.00	3.00	1.00	1.00	1.00	7.00	1.00	1.00

SCMP	PLT	29449	3.00	1.00	8.00	2.00	3.00	3.00	1.00	1.00	1.00	7.00	3.00	1.00
SCMP	PLT	29451	3.00	11.00	8.00	0.00	3.00	3.00	3.00	3.00	1.00	4.00	1.00	1.00
SCMP	PLT	29453	2.00	1.00	3.00	0.00	1.00	3.00	1.00	1.00	1.00	7.00	2.00	1.00
SCMP	PLT	29694	10.00	1.00	6.00	1.00	1.00	7.00	1.00	1.00	1.00	7.00	1.00	1.00
SCMP	PLT	29705	2.00	1.00	3.00	0.00	1.00	5.00	1.00	1.00	1.00	4.00	1.00	1.00
SCMP	PLT	29707	1.00	1.00	7.00	3.00	3.00	5.00	3.00	1.00	1.00	7.00	1.00	1.00
SCMP	PLT	29352	3.00	1.00	3.00	3.00	1.00	7.00	1.00	1.00	2.00	9.00	3.00	3.00
SCMP	PLT	29353	2.00	1.00	3.00	1.00	1.00	7.00	1.00	1.00	1.00	7.00	3.00	2.00
SCMP	PLT	29360	2.00	1.00	3.00	3.00	1.00	7.00	2.00	2.00	1.00	7.00	3.00	2.00
SCMP	PLT	29532	1.00	1.00	8.00	2.00	3.00	3.00	1.00	1.00	2.00	4.00	2.00	1.00
SCMP	PLT	29715	3.00	1.00	2.00	2.00	7.00	5.00	1.00	1.00	1.00	7.00	1.00	1.00
SCMP	PLT	29716	10.00	2.00	2.00	1.00	3.00	3.00	4.00	4.00	1.00	7.00	2.00	1.00
SCMP	PLT	29721	10.00	1.00	8.00	0.00	3.00	5.00	1.00	1.00	1.00	4.00	1.00	1.00
SCMP	PLT	29733	7.00	1.00	8.00	0.00	5.00	3.00	2.00	2.00	1.00	4.00	1.00	3.00
SCMP	PLT	29735	10.00	1.00	2.00	1.00	1.00	7.00	1.00	1.00	1.00	7.00	1.00	1.00
SCMP	PLT	29736	4.00	1.00	3.00	1.00	1.00	3.00	1.00	1.00	1.00	4.00	3.00	1.00
SCMP	PLT	29376	7.00	1.00	3.00	3.00	1.00	5.00	1.00	1.00	1.00	7.00	3.00	1.00
SCMP	PLT	29612	7.00	1.00	8.00	1.00	7.00	3.00	1.00	1.00	1.00	7.00	1.00	1.00
SCMP	PLT	29607	3.00	1.00	3.00	0.00	3.00	7.00	1.00	1.00	1.00	7.00	1.00	1.00
SCMP	PLT	29614	7.00	2.00	6.00	0.00	3.00	5.00	4.00	4.00	1.00	4.00	2.00	1.00
SCMP	PLT	29608	1.00	1.00	8.00	2.00	3.00	3.00	1.00	1.00	1.00	4.00	1.00	1.00
SCMP	PLT	29615	7.00	1.00	5.00	1.00	3.00	3.00	1.00	1.00	1.00	7.00	1.00	1.00
SCMP	PLT	29609	3.00	1.00	6.00	0.00	5.00	5.00	1.00	1.00	1.00	7.00	1.00	1.00
SCMP	PLT	29616	1.00	10.00	8.00	3.00	7.00	3.00	2.00	2.00	1.00	7.00	3.00	1.00
SCMP	PLT	29617	2.00	1.00	8.00	1.00	1.00	3.00	1.00	1.00	2.00	4.00	1.00	1.00
SCMP	PLT	29618	10.00	1.00	2.00	3.00	3.00	3.00	1.00	1.00	1.00	7.00	1.00	1.00
SCMP	PLT	29620	1.00	1.00	7.00	0.00	5.00	5.00	2.00	1.00	1.00	4.00	2.00	1.00
SCMP	PLT	29611	3.00	2.00	6.00	0.00	1.00	3.00	4.00	4.00	1.00	7.00	3.00	1.00
SCMP	PLT	29469	10.00	1.00	3.00	0.00	1.00	5.00	1.00	1.00	1.00	7.00	1.00	3.00
SCMP	PLT	29470	3.00	10.00	8.00	2.00	1.00	5.00	3.00	3.00	1.00	4.00	1.00	1.00
SCMP	PLT	29365	3.00	1.00	7.00	3.00	7.00	7.00	1.00	1.00	1.00	7.00	1.00	1.00
SCMP	PLT	29367	2.00	1.00	3.00	0.00	1.00	7.00	1.00	1.00	1.00	4.00	2.00	1.00
SCMP	PLT	29368	2.00	1.00	3.00	0.00	1.00	5.00	1.00	1.00	1.00	7.00	2.00	1.00
SCMP	PLT	29369	3.00	1.00	6.00	1.00	1.00	3.00	1.00	1.00	1.00	7.00	2.00	1.00
SCMP	PLT	29370	10.00	1.00	6.00	1.00	3.00	3.00	1.00	1.00	1.00	7.00	2.00	1.00
SCMP	PLT	29371	10.00	1.00	6.00	1.00	3.00	3.00	1.00	1.00	1.00	7.00	1.00	1.00
SCMP	PLT	29541	10.00	1.00	3.00	0.00	1.00	7.00	2.00	2.00	1.00	7.00	4.00	3.00
SCMP	PLT	29737	3.00	1.00	8.00	0.00	3.00	3.00	1.00	1.00	1.00	4.00	3.00	3.00
SCMP	PLT	29738	1.00	1.00	2.00	1.00	5.00	5.00	1.00	1.00	1.00	4.00	3.00	3.00
SCMP	PLT	29739	3.00	10.00	7.00	1.00	3.00	5.00	1.00	1.00	1.00	4.00	1.00	3.00
SCMP	PLT	29741	2.00	1.00	3.00	1.00	1.00	5.00	1.00	1.00	1.00	4.00	1.00	3.00

SCMP	PLT	29742	3.00	10.00	1.00	3.00	3.00	5.00	2.00	2.00	1.00	4.00	3.00	1.00
SCMP	PLT	29743	2.00	1.00	3.00	1.00	1.00	3.00	1.00	1.00	1.00	4.00	1.00	1.00
SCMP	PLT	29744	10.00	1.00	2.00	2.00	1.00	7.00	1.00	1.00	1.00	4.00	3.00	1.00
SCMP	PLT	29750	3.00	1.00	7.00	1.00	5.00	7.00	1.00	1.00	1.00	4.00	2.00	3.00
SCMP	PLT	29751	1.00	11.00	7.00	1.00	3.00	7.00	2.00	2.00	1.00	7.00	2.00	1.00
SCMP	PLT	29752	1.00	1.00	7.00	0.00	5.00	7.00	2.00	2.00	1.00	3.00	2.00	3.00
SCMP	PLT	29745	2.00	1.00	3.00	1.00	0.00	3.00	1.00	1.00	1.00	4.00	3.00	3.00
SCMP	PLT	29746	10.00	1.00	7.00	1.00	0.00	3.00	1.00	1.00	1.00	4.00	2.00	1.00
SCMP	PLT	29747	10.00	1.00	3.00	1.00	1.00	3.00	1.00	1.00	1.00	4.00	3.00	1.00
SCMP	PLT	29748	10.00	1.00	8.00	1.00	1.00	3.00	1.00	1.00	1.00	7.00	3.00	1.00
SCMP	PLT	29749	1.00	1.00	6.00	0.00	5.00	3.00	1.00	1.00	1.00	4.00	3.00	1.00
SCMP	PLT	29757	2.00	1.00	3.00	1.00	3.00	5.00	2.00	2.00	1.00	4.00	1.00	1.00
SCMP	PLT	29758	1.00	1.00	7.00	3.00	5.00	3.00	1.00	1.00	1.00	4.00	1.00	3.00
SCMP	PLT	29759	1.00	1.00	2.00	3.00	3.00	3.00	1.00	1.00	1.00	4.00	2.00	3.00
SCMP	PLT	29348	10.00	10.00	2.00	1.00	3.00	5.00	2.00	2.00	1.00	4.00	3.00	1.00
SCMP	PLT	29349	10.00	3.00	2.00	2.00	1.00	5.00	1.00	1.00	1.00	4.00	1.00	1.00
SCMP	PLT	29450	2.00	1.00	3.00	1.00	1.00	5.00	1.00	1.00	1.00	7.00	3.00	1.00
SCMP	PLT	29351	10.00	1.00	5.00	2.00	3.00	5.00	1.00	1.00	1.00	7.00	3.00	1.00
SCMP	PLT	29543	3.00	11.00	7.00	0.00	7.00	7.00	3.00	3.00	1.00	4.00	1.00	1.00
SCMP	PLT	29552	7.00	1.00	2.00	0.00	5.00	7.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
SCMP	PLT	29553	8.00	1.00	2.00	0.00	5.00	7.00	2.00	2.00	1.00	1.00	1.00	1.00
SCMP	PLT	29554	7.00	1.00	2.00	0.00	3.00	5.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
SCMP	PLT	29544	8.00	1.00	8.00	1.00	5.00	3.00	4.00	4.00	1.00	7.00	1.00	1.00
SCMP	PLT	29545	1.00	1.00	7.00	0.00	5.00	5.00	2.00	2.00	1.00	4.00	1.00	3.00
SCMP	PLT	29546	2.00	1.00	3.00	0.00	3.00	7.00	1.00	1.00	1.00	4.00	3.00	1.00
SCMP	PLT	29547	3.00	10.00	7.00	1.00	7.00	5.00	2.00	2.00	1.00	4.00	1.00	3.00
SCMP	PLT	29548	2.00	1.00	6.00	0.00	7.00	7.00	3.00	3.00	1.00	4.00	2.00	1.00
SCMP	PLT	29483	6.00	4.00	8.00	3.00	7.00	7.00	2.00	2.00	1.00	7.00	2.00	1.00
SCMP	PLT	29484	3.00	1.00	7.00	3.00	7.00	7.00	1.00	1.00	2.00	7.00	1.00	3.00
SCMP	PLT	29487	2.00	9.00	3.00	2.00	7.00	7.00	1.00	1.00	1.00	7.00	3.00	1.00
SCMP	PLT	29637	2.00	1.00	4.00	1.00	0.00	5.00	1.00	1.00	1.00	5.00	1.00	3.00
SCMP	PLT	29770	2.00	1.00	3.00	2.00	1.00	5.00	1.00	1.00	1.00	4.00	1.00	3.00
SCMP	PLT	29556	3.00	10.00	3.00	1.00	3.00	3.00	4.00	4.00	1.00	4.00	1.00	1.00
SCMP	PLT	29576	3.00	1.00	3.00	2.00	7.00	3.00	1.00	1.00	1.00	7.00	1.00	1.00
SCMP	PLT	29558	10.00	1.00	3.00	3.00	1.00	7.00	1.00	1.00	1.00	7.00	4.00	3.00
SCMP	PLT	29560	1.00	1.00	7.00	3.00	5.00	7.00	1.00	1.00	2.00	7.00	1.00	3.00
SCMP	PLT	29561	2.00	1.00	3.00	0.00	1.00	7.00	1.00	1.00	1.00	7.00	4.00	1.00
SCMP	PLT	29562	1.00	1.00	7.00	3.00	1.00	5.00	1.00	1.00	2.00	7.00	4.00	1.00
SCMP	PLT	29563	2.00	1.00	3.00	0.00	7.00	5.00	4.00	4.00	2.00	7.00	4.00	1.00
SCMP	PLT	29760	1.00	1.00	8.00	2.00	3.00	5.00	1.00	1.00	1.00	4.00	1.00	3.00
SCMP	PLT	29761	1.00	1.00	7.00	2.00	3.00	7.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	3.00

SCMP	PLT	29762	1.00	1.00	7.00	2.00	3.00	7.00	1.00	1.00	1.00	4.00	3.00	1.00
SCMP	PLT	29763	2.00	1.00	3.00	1.00	1.00	5.00	1.00	1.00	1.00	7.00	2.00	1.00
SCMP	PLT	29625	2.00	1.00	3.00	1.00	1.00	3.00	1.00	1.00	1.00	4.00	3.00	3.00
SCMP	PLT	29392	4.00	1.00	3.00	1.00	1.00	5.00	1.00	1.00	2.00	7.00	3.00	1.00
SCMP	PLCH	29772	3.00	1.00	3.00	0.00	3.00	5.00	1.00	1.00	1.00	2.00	4.00	1.00
SCMP	PLCH	29773	10.00	1.00	8.00	0.00	3.00	7.00	1.00	1.00	1.00	2.00	3.00	3.00
SCMP	PLCH	29774	1.00	1.00	7.00	0.00	1.00	7.00	1.00	1.00	2.00	9.00	1.00	3.00
SCMP	PLCH	29775	1.00	1.00	7.00	3.00	7.00	7.00	2.00	2.00	2.00	7.00	3.00	3.00
SCMP	PLCH	29776	3.00	10.00	8.00	0.00	3.00	5.00	2.00	2.00	1.00	4.00	1.00	1.00
SCMP	PLCH	29777	10.00	2.00	3.00	2.00	3.00	5.00	4.00	4.00	1.00	7.00	4.00	1.00

Anexo 1.3. Caracterización morfológica de mazorcas y semillas de 170 muestras: variables cuantitativas

SELEC	TIPO	ACCESION	PM	LM	DM	ECM	PSM	RLDM	NSM	PTSM	PMM	SEMVAN	PHS	PSS	RPHSPSS	DS	LS	ES	RLDS
BGC	CL	29425	333.97	11.97	7.67	11.03	8.13	1.57	38.33	82.87	0.73	0.67	1.18	0.80	1.50	10.37	22.00	6.57	2.12
BGC	CL	29412	519.77	16.81	8.18	14.93	10.45	2.05	37.46	118.74	0.77	1.00	1.27	0.79	1.63	9.57	22.69	7.35	2.38
BGC	CL	29418	458.45	16.10	7.90	10.50	4.40	2.10	34.50	126.80	0.72	1.00	1.60	1.02	1.58	11.22	22.42	8.09	2.01
BGC	CL	29424	438.20	15.97	8.25	12.78	8.81	1.94	43.92	123.02	0.72	0.46	1.82	1.16	1.60	13.04	23.29	6.83	1.80
BGC	CL	29426	530.56	14.44	8.92	14.86	9.82	1.64	38.40	124.10	0.76	2.40	2.40	0.99	2.45	12.98	23.42	7.72	1.81
BGC	CL	29421	511.35	17.15	8.37	14.45	10.63	2.07	42.83	131.83	0.75	0.17	1.57	1.09	1.45	12.83	23.65	6.58	1.85
BGC	CL	29417	526.35	22.92	7.45	13.18	8.35	3.08	44.42	142.92	0.72	0.25	1.46	0.97	1.53	11.31	21.84	8.17	1.93
BGC	CL	29408	590.32	17.05	8.83	14.97	9.85	1.93	39.00	174.95	0.70	0.56	1.91	1.27	1.51	14.26	24.59	7.50	1.73
BGC	CL	29394	461.83	18.00	8.03	14.33	10.20	2.20	36.33	104.97	0.77	0.00	1.49	0.92	1.70	11.55	21.95	7.75	1.91
BGC	CL	29429	691.80	19.10	9.10	16.85	13.10	2.10	45.00	128.65	0.82	0.00	1.08	0.48	3.00	10.31	23.12	6.49	2.24
BGC	CL	29413	608.96	17.67	8.95	14.52	10.27	1.97	37.87	186.35	0.69	0.27	2.45	1.64	1.51	14.83	26.43	8.65	1.80
BGC	CL	29395	296.67	15.53	7.40	8.89	6.59	2.11	37.47	90.06	0.70	0.07	1.27	0.85	1.50	11.59	21.01	6.55	1.82
BGC	CL	29396	289.55	15.10	7.05	12.00	6.45	2.15	24.00	37.75	0.88	5.50	1.49	0.90	1.66	12.50	22.54	7.27	1.81
BGC	CL	29397	440.78	18.00	7.84	13.61	7.26	2.30	40.75	133.38	0.69	0.13	3.86	1.00	3.87	13.53	24.30	9.25	1.79
BGC	CL	29416	501.33	16.07	8.43	13.54	9.53	1.84	40.92	134.41	0.73	0.25	1.39	0.94	1.50	12.05	22.00	6.82	1.83
BGC	CL	29423	173.78	11.34	6.02	8.66	5.02	1.88	34.17	56.26	0.67	1.58	1.00	0.54	1.88	9.49	19.09	6.22	2.03
BGC	CL	29415	231.20	13.85	6.25	8.50	6.10	2.25	46.50	79.00	0.66	1.50	0.82	0.50	1.63	9.79	19.18	5.66	1.96
BGC	CL	29428	429.10	14.52	7.72	12.62	9.73	1.88	37.50	104.87	0.75	0.50	1.10	0.72	1.56	11.59	21.19	5.95	1.83
BGC	CL	29414	580.60	18.14	8.89	13.55	9.75	2.05	37.29	174.26	0.70	0.29	2.45	1.58	1.59	15.08	27.69	8.47	1.84
BGC	CL	29419	448.48	15.49	8.28	12.26	8.43	1.89	39.42	142.03	0.68	0.17	1.92	1.31	1.48	14.21	25.20	7.20	1.78
BGC	CL	29393	430.11	15.18	8.40	14.75	9.13	1.83	34.33	97.00	0.77	0.39	1.60	1.09	1.50	12.72	22.98	7.15	1.81
BGC	CL	29422	170.98	10.88	5.73	9.43	4.65	1.93	36.75	56.78	0.66	1.00	1.11	0.71	1.61	10.10	19.31	5.62	1.93
BGC	CL	29420	397.50	14.54	7.92	10.18	7.32	1.84	46.40	115.68	0.70	0.80	1.75	1.02	1.74	13.08	23.73	6.86	1.81
BGC	CL	29427	545.34	16.44	8.80	18.36	11.36	1.88	34.20	102.82	0.81	1.20	3.10	1.00	3.10	12.82	24.13	8.25	1.89
BGC	CL	29411	585.98	17.54	8.75	14.38	10.36	2.01	37.69	178.47	0.69	0.19	2.46	1.61	1.55	14.63	26.28	9.22	1.81
BGC	CL	29410	507.71	15.86	8.49	12.64	8.42	1.86	37.86	167.07	0.67	0.21	2.20	1.47	1.51	14.80	26.53	8.05	1.80

BGC	CL	29409	323.55	12.23	8.13	13.40	8.80	1.53	27.00	74.95	0.76	0.25	1.46	0.85	1.79	12.86	24.63	6.56	1.92
BGC	CR	29432	517.10	16.42	8.44	14.81	10.75	1.95	33.71	137.28	0.73	0.43	1.98	1.23	1.64	14.15	24.10	8.31	1.71
BGC	CR	29438	301.44	14.31	7.16	10.79	7.06	1.99	36.00	86.10	0.71	0.43	1.21	0.72	1.72	11.18	20.92	6.85	1.87
BGC	CR	29439	317.70	13.50	7.30	10.30	7.80	1.90	30.00	89.40	0.72	9.00	1.50	0.90	1.70	11.70	23.10	8.26	1.97
BGC	CR	29437	281.17	12.89	7.11	9.96	7.87	1.82	36.33	86.27	0.70	0.44	1.25	0.80	1.61	11.12	21.00	6.73	1.90
BGC	CR	29436	355.10	12.76	7.58	11.91	8.08	1.69	38.88	91.34	0.74	0.38	1.28	0.78	1.71	11.45	21.15	6.68	1.85
BGC	CR	29433	435.84	21.70	7.11	11.67	7.07	3.05	29.86	109.45	0.74	0.09	2.22	1.24	1.79	12.55	23.57	9.88	1.89
BGC	CR	29430	259.36	15.27	6.82	10.76	5.77	2.25	36.19	69.40	0.73	0.67	1.12	0.55	1.98	9.64	18.67	5.97	1.95
BGC	CR	29435	435.26	17.36	7.68	12.42	8.61	2.26	34.18	107.70	0.75	0.88	2.21	1.08	2.10	12.82	25.49	8.57	2.00
BGC	CR	29441	261.71	15.85	6.66	11.01	7.79	2.39	29.87	52.91	0.80	0.87	1.33	0.71	1.90	11.46	19.17	7.03	1.68
BGC	CR	29440	528.29	15.92	8.52	15.18	9.72	1.88	37.92	140.78	0.73	0.15	1.84	1.11	1.82	13.47	24.00	7.87	1.79
BGC	CR	29434	401.68	17.12	7.73	14.38	8.54	2.22	33.14	99.24	0.75	0.50	1.34	0.81	1.67	11.47	20.42	7.80	1.78
BGC	HB	29651	712.30	19.80	9.02	15.70	9.40	2.18	48.00	158.58	0.77	0.20	2.76	1.43	1.94	12.82	26.66	8.04	2.08
BGC	HB	29653	617.70	17.59	9.01	16.54	9.02	1.94	38.11	150.72	0.75	0.33	3.33	1.43	2.37	14.20	25.15	8.94	1.78
BGC	HB	29654	613.38	18.38	8.52	13.62	9.92	2.14	51.80	157.58	0.74	0.60	3.06	1.07	2.90	11.36	23.39	8.58	2.06
BGC	HB	29656	464.07	16.73	7.50	13.10	7.93	2.27	34.33	128.07	0.73	0.33	2.85	1.28	2.23	13.39	23.35	9.92	1.74
BGC	HB	29657	367.33	16.83	7.33	13.73	7.93	2.30	22.67	69.90	0.80	5.67	3.00	1.13	2.68	12.67	22.19	8.18	1.75
BGC	HB	29663	425.60	18.97	6.97	12.10	6.13	2.70	45.67	152.47	0.64	0.00	3.15	1.14	2.77	13.18	24.00	9.00	1.82
BGC	HB	29665	597.35	18.15	8.55	15.05	6.55	2.15	38.00	141.45	0.76	0.00	2.51	0.97	2.60	11.85	24.46	9.78	2.07
BGC	HB	29666	420.59	13.35	8.31	15.05	8.86	1.61	38.25	108.75	0.74	0.55	2.74	0.99	2.81	12.77	22.27	8.01	1.74
BGC	HB	29667	472.10	16.90	8.00	16.50	9.90	2.10	21.00	90.40	0.81	0.00	2.55	1.46	1.77	12.96	25.37	10.60	1.97
BGC	HB	29670	310.89	14.84	6.84	8.13	4.58	2.18	45.00	139.06	0.55	1.50	3.02	1.01	2.99	12.77	23.02	7.77	1.81
BGC	HB	29671	682.73	18.50	8.93	16.90	9.87	2.07	41.33	123.53	0.81	0.33	2.77	1.06	2.62	12.62	21.85	7.80	1.74
BGC	HB	29675	446.22	17.34	7.52	12.62	7.52	2.30	38.00	131.46	0.71	1.00	3.03	1.33	2.28	13.18	22.54	9.21	1.72
BGC	HB	29676	546.93	18.82	8.48	12.95	6.23	2.20	35.83	156.10	0.72	7.67	2.97	1.21	2.51	13.43	22.79	9.24	1.71
BGC	HB	29677	666.43	15.70	9.53	15.67	9.78	1.68	47.83	176.12	0.73	1.33	3.41	1.53	2.25	13.36	25.75	8.47	1.93
BGC	HB	29678	446.80	15.70	7.80	11.40	9.05	2.00	37.00	111.70	0.75	3.50	3.00	1.14	2.63	11.89	23.76	7.77	2.00
BGC	HB	29679	547.50	17.63	8.28	15.83	9.13	2.12	43.00	146.47	0.73	0.50	1.11	0.54	2.11	9.79	22.43	6.62	2.32
BGC	HB	29680	505.15	16.33	8.30	14.55	8.58	1.95	46.25	162.98	0.68	0.75	2.65	1.29	2.06	12.70	24.30	7.61	1.92
BGC	HB	29681	746.87	19.57	9.40	19.43	10.17	2.10	49.33	146.77	0.80	0.33	2.73	1.06	2.59	11.52	24.89	8.25	2.17

BGC	HB	29398	593.03	18.07	8.87	13.98	9.30	2.04	39.67	149.96	0.75	0.27	1.83	1.19	1.55	12.61	25.32	8.02	2.02
BGC	HB	29399	735.65	17.15	9.66	16.04	11.43	1.79	40.71	181.76	0.75	1.21	1.98	1.30	1.54	14.24	26.39	7.69	1.85
BGC	HB	29400	685.49	20.63	8.76	15.56	11.49	2.36	44.00	143.49	0.79	0.43	1.58	1.03	1.55	12.33	23.73	7.96	1.93
BGC	HB	29401	682.12	18.06	9.34	15.20	11.17	1.93	41.33	196.02	0.71	0.44	1.94	1.27	1.59	13.83	25.88	7.50	1.88
BGC	HB	29402	598.39	14.83	9.57	16.22	12.59	1.56	36.64	111.59	0.81	0.36	1.51	1.00	1.52	11.29	25.52	7.02	2.26
BGC	HB	29403	625.12	17.73	8.72	16.47	11.56	2.05	41.88	136.39	0.78	0.76	1.58	0.97	1.64	12.51	23.75	7.27	1.91
BGC	HB	29404	310.42	13.90	6.97	10.65	7.97	2.00	34.67	104.65	0.66	0.17	1.22	0.74	1.69	11.74	21.86	6.65	1.87
BGC	HB	29405	692.91	16.43	9.42	20.25	15.90	1.70	37.04	92.55	0.87	0.39	1.29	0.82	1.60	10.23	22.03	7.00	2.16
BGC	HB	29406	680.55	17.57	9.20	18.34	13.09	1.91	36.53	128.56	0.81	0.33	1.74	1.13	1.61	12.73	24.35	7.54	1.92
BGC	HB	29407	315.99	15.99	7.41	10.70	5.92	2.16	34.42	86.26	0.72	0.00	1.27	0.73	1.76	10.55	22.11	7.40	2.10
BGC	HB	29442	447.54	18.53	7.66	12.91	8.50	2.42	41.57	117.47	0.74	0.00	1.53	0.97	1.58	11.50	23.47	7.56	2.05
BGC	HB	29443	474.17	17.86	8.26	13.39	8.94	2.16	37.00	128.81	0.73	0.14	1.91	1.15	1.68	12.97	26.15	7.93	2.03
BGC	HB	29444	415.02	13.52	8.44	15.26	11.19	1.61	25.71	74.19	0.83	2.14	1.79	1.09	1.68	12.42	23.35	8.86	1.89
SCMP	PLT	29503	927.80	18.00	11.00	27.30	18.10	1.60	34.00	62.30	0.93	0.00	2.16	0.94	2.31	14.59	25.09	8.71	1.72
SCMP	PLT	29505	604.15	17.55	9.40	21.00	12.90	1.90	28.00	73.65	0.88	0.00	2.83	0.95	3.02	14.19	26.06	9.60	1.84
SCMP	PLT	29508	1092.00	19.30	11.10	28.15	18.15	1.75	26.50	52.55	0.95	0.00	2.13	0.86	2.48	12.27	23.25	9.18	1.90
SCMP	PLT	29476	243.40	8.83	7.90	16.33	11.25	1.13	24.75	35.73	0.86	0.00	1.42	0.59	2.45	12.46	18.86	7.24	1.52
SCMP	PLT	29445	474.60	19.10	8.40	16.10	7.50	2.30	35.00	87.80	0.82	0.00	2.80	0.83	3.37	14.57	25.29	10.16	1.74
SCMP	PLT	29456	725.30	23.53	9.03	16.83	8.40	2.60	40.33	115.27	0.84	0.00	2.89	1.32	2.19	13.00	25.05	10.61	1.94
SCMP	PLT	29459	429.15	18.75	7.80	14.70	8.65	2.40	29.00	65.35	0.85	0.00	2.43	0.93	2.64	12.06	23.89	10.07	1.98
SCMP	PLT	29447	487.25	15.45	8.25	11.80	7.70	1.85	35.50	72.70	0.85	0.00	2.20	0.94	2.33	13.01	24.81	8.43	1.91
SCMP	PLT	29448	410.20	16.90	7.00	12.05	6.20	2.40	39.00	80.55	0.80	0.00	2.08	0.86	2.42	13.41	23.19	8.57	1.73
SCMP	PLT	29449	271.70	13.30	7.12	9.28	5.30	1.88	35.33	55.12	0.78	0.00	1.67	0.75	2.30	13.27	21.87	7.10	1.65
SCMP	PLT	29451	398.60	15.50	7.85	11.00	5.85	2.00	36.50	82.00	0.79	0.00	2.44	1.04	2.36	13.84	25.16	8.54	1.82
SCMP	PLT	29453	296.30	11.10	7.00	13.00	6.10	1.60	32.00	39.90	0.87	0.00	1.24	0.60	2.08	12.26	19.47	7.78	1.59
SCMP	PLT	29694	736.59	18.81	9.81	20.36	11.60	1.94	42.71	107.51	0.85	0.00	2.15	0.77	2.93	13.14	21.67	8.57	1.65
SCMP	PLT	29705	581.58	14.84	9.66	17.28	10.52	1.54	42.60	98.10	0.83	0.00	2.10	0.88	2.70	13.18	24.80	7.30	1.89
SCMP	PLT	29707	471.85	21.70	7.90	15.05	8.55	2.75	23.50	69.25	0.85	0.00	2.96	1.24	2.38	13.90	26.43	11.34	1.91
SCMP	PLT	29352	752.05	16.85	9.80	19.40	16.15	1.70	33.00	124.60	0.84	0.00	1.95	0.86	2.32	13.09	24.04	8.76	1.84
SCMP	PLT	29353	427.60	13.50	8.40	14.40	10.30	1.60	34.00	88.50	0.79	0.00	1.39	0.84	1.76	12.42	22.61	6.02	1.82

SCMP	PLT	29360	604.80	15.30	9.90	16.80	12.10	1.60	46.00	128.60	0.79	0.00	1.81	1.22	1.48	12.95	25.49	7.21	1.97
SCMP	PLT	29532	379.10	17.70	7.70	12.50	7.30	2.30	34.00	75.60	0.80	0.00	2.36	1.03	2.29	12.10	25.15	9.89	2.08
SCMP	PLT	29715	659.05	22.20	9.10	20.10	8.65	2.45	40.00	81.70	0.87	0.00	2.18	1.02	2.17	12.86	23.52	9.35	1.84
SCMP	PLT	29716	291.18	13.48	7.65	10.65	6.78	1.75	29.50	82.20	0.71	0.00	2.20	1.16	1.91	13.61	24.76	9.65	1.82
SCMP	PLT	29721	468.17	17.17	8.97	16.07	8.30	1.93	39.33	78.70	0.83	0.00	2.13	1.22	1.82	12.71	22.63	8.69	1.78
SCMP	PLT	29733	491.50	18.10	8.30	11.90	8.60	2.20	31.00	82.20	0.83	0.00	2.68	1.36	1.97	14.03	26.19	10.84	1.87
SCMP	PLT	29735	795.83	20.60	9.57	19.60	13.17	2.13	34.33	70.77	0.91	0.00	2.53	0.99	2.56	13.69	24.60	9.77	1.80
SCMP	PLT	29736	256.55	9.30	6.95	10.45	5.60	1.35	26.00	27.30	0.90	0.00	0.90	0.39	2.28	11.53	20.01	5.89	1.76
SCMP	PLT	29376	578.60	15.40	9.10	14.20	6.60	1.70	36.00	158.20	0.73	0.00	2.05	1.08	1.91	14.13	24.66	8.64	1.75
SCMP	PLT	29612	300.30	14.85	7.05	10.35	5.70	2.13	36.25	83.50	0.73	0.00	2.08	0.85	2.51	12.44	23.40	8.52	1.88
SCMP	PLT	29607	675.20	19.87	9.01	19.54	10.56	2.21	39.29	90.83	0.86	0.00	2.47	1.10	2.24	12.76	23.86	8.88	1.87
SCMP	PLT	29614	479.60	17.20	7.70	16.30	9.60	2.20	26.00	54.30	0.89	0.00	2.25	1.37	1.64	13.64	22.69	10.42	1.66
SCMP	PLT	29608	369.55	17.03	7.75	13.53	7.70	2.20	34.75	69.23	0.81	0.00	2.04	1.03	2.03	13.58	22.23	8.17	1.64
SCMP	PLT	29615	333.03	14.97	7.87	12.37	5.78	1.92	31.67	75.00	0.77	0.00	2.53	1.00	2.53	13.71	25.88	9.05	1.89
SCMP	PLT	29609	567.53	17.60	8.97	20.17	9.33	1.97	29.67	68.80	0.88	0.00	2.46	1.09	2.27	13.30	24.87	8.77	1.87
SCMP	PLT	29616	327.97	15.31	7.58	12.39	6.84	2.03	32.62	61.53	0.81	0.00	1.42	0.56	2.55	11.31	19.64	7.66	1.74
SCMP	PLT	29617	272.70	12.64	7.78	11.54	7.16	1.62	32.20	60.42	0.77	1.80	1.70	0.73	2.39	11.80	23.14	7.58	1.97
SCMP	PLT	29618	301.75	15.25	7.80	11.25	5.80	1.95	43.00	71.05	0.76	3.00	1.79	0.77	2.34	13.04	21.90	7.86	1.68
SCMP	PLT	29620	498.30	20.70	8.75	18.10	9.15	2.35	29.00	75.40	0.85	3.50	2.46	1.18	2.13	14.16	22.22	9.86	1.57
SCMP	PLT	29611	354.66	14.56	7.96	15.36	9.02	1.82	33.60	59.90	0.83	0.00	1.88	0.80	2.42	13.70	23.17	8.22	1.70
SCMP	PLT	29469	470.60	14.30	8.40	15.60	11.60	1.70	38.00	78.00	0.83	0.00	2.11	1.05	2.02	13.72	21.79	9.27	1.59
SCMP	PLT	29470	356.70	15.00	8.20	15.90	11.70	1.80	24.00	46.70	0.87	0.00	2.27	0.95	2.44	13.55	23.23	9.15	1.71
SCMP	PLT	29365	470.52	19.78	8.03	14.50	7.80	2.48	28.17	68.22	0.83	0.00	2.11	1.10	1.86	12.19	23.14	8.79	1.93
SCMP	PLT	29367	439.55	13.58	8.62	16.73	12.40	1.57	22.33	56.88	0.86	0.00	2.82	1.40	2.02	15.22	25.58	9.79	1.68
SCMP	PLT	29368	400.72	12.52	8.60	17.48	11.38	1.48	33.20	58.54	0.86	0.00	1.96	0.87	2.28	13.28	22.51	7.46	1.70
SCMP	PLT	29369	346.45	15.60	8.10	12.55	8.45	1.95	22.50	63.55	0.82	0.00	2.56	1.38	1.86	14.40	26.23	9.74	1.82
SCMP	PLT	29370	442.15	16.65	8.40	16.05	7.80	2.00	42.50	84.35	0.81	0.00	2.07	0.96	2.16	13.33	24.61	7.95	1.85
SCMP	PLT	29371	482.45	16.20	8.68	15.20	8.15	1.88	33.25	95.85	0.80	0.00	2.88	1.36	2.13	13.84	26.85	9.10	1.94
SCMP	PLT	29541	827.90	22.60	9.20	17.50	13.30	2.50	40.00	141.30	0.83	0.00	1.8	1.1	1.6	12.0	22.7	8.4	1.9
SCMP	PLT	29737	387.45	15.29	7.96	15.68	7.53	1.92	29.50	75.97	0.80	0.00	2.47	0.82	3.13	13.10	22.41	9.05	1.71

SCMP	PLT	29738	424.17	15.68	8.40	15.70	8.35	1.86	37.80	82.29	0.81	0.00	2.20	0.78	2.90	13.12	22.06	8.39	1.69
SCMP	PLT	29739	583.43	20.08	8.85	17.48	9.13	2.28	34.50	79.75	0.86	0.00	2.87	0.94	3.30	13.79	25.46	10.14	1.86
SCMP	PLT	29741	491.40	14.52	9.05	18.05	10.00	1.62	34.67	89.45	0.82	0.00	2.62	0.94	2.80	13.28	21.87	8.59	1.65
SCMP	PLT	29742	595.19	19.57	9.26	17.06	8.49	2.10	28.86	92.41	0.84	0.00	3.29	1.14	3.00	15.55	26.57	9.60	1.71
SCMP	PLT	29743	369.63	13.25	8.58	14.50	7.55	1.55	28.50	55.63	0.85	0.00	1.98	0.73	2.82	12.44	21.66	7.74	1.74
SCMP	PLT	29744	417.60	15.00	8.40	13.10	9.70	1.80	21.00	76.00	0.82	0.00	2.21	0.88	2.53	13.54	26.80	8.46	1.98
SCMP	PLT	29750	1123.92	21.50	11.42	26.36	13.74	1.88	29.40	94.34	0.91	0.00	3.68	0.93	4.10	12.88	24.31	10.32	1.90
SCMP	PLT	29751	806.65	19.55	10.45	23.15	11.85	1.85	30.00	81.55	0.90	3.00	3.07	1.24	2.47	14.82	25.30	10.84	1.71
SCMP	PLT	29752	1194.39	23.70	11.20	24.27	15.00	2.12	36.00	116.59	0.90	4.00	2.91	1.37	2.12	14.90	24.53	11.15	1.65
SCMP	PLT	29745	399.00	13.16	8.21	11.24	7.40	1.62	38.18	131.53	0.67	0.00	2.77	1.01	2.76	14.16	25.75	8.34	1.83
SCMP	PLT	29746	312.40	13.46	7.51	12.40	8.16	1.80	23.40	55.19	0.83	0.00	2.24	0.75	3.00	12.09	24.12	8.41	2.00
SCMP	PLT	29747	433.60	14.67	8.60	15.37	7.80	3.30	38.33	104.93	0.75	0.00	2.38	1.01	2.37	12.99	21.72	8.39	1.68
SCMP	PLT	29748	396.80	16.00	8.50	14.93	8.39	1.88	32.00	76.76	0.81	0.00	2.39	0.99	2.43	13.39	24.36	9.44	1.82
SCMP	PLT	29749	545.33	18.20	8.80	16.45	9.00	2.07	38.00	133.05	0.76	0.00	2.31	1.05	2.21	12.66	23.51	9.34	1.86
SCMP	PLT	29757	585.19	18.63	8.78	16.77	9.38	2.12	34.08	105.16	0.83	0.00	2.47	0.81	3.06	12.21	23.39	7.90	1.92
SCMP	PLT	29758	614.72	20.92	8.50	16.20	8.04	2.46	36.40	123.58	0.81	4.20	2.47	1.09	2.29	12.68	24.28	9.71	1.92
SCMP	PLT	29759	590.38	18.32	8.94	17.70	10.68	2.04	35.00	108.80	0.82	5.60	2.54	0.87	3.15	12.52	24.72	9.70	1.98
SCMP	PLT	29348	520.60	16.10	9.00	17.30	13.00	1.80	34.00	86.50	0.83	0.00	2.33	0.93	2.50	14.01	24.62	8.75	1.76
SCMP	PLT	29349	560.90	17.45	8.98	17.35	9.70	1.95	42.00	115.83	0.80	0.00	2.03	0.83	2.49	12.72	22.78	8.75	1.79
SCMP	PLT	29450	646.63	15.85	9.85	19.65	12.93	1.63	32.25	92.45	0.85	0.00	2.29	1.00	2.28	13.73	25.92	8.22	1.89
SCMP	PLT	29351	513.65	17.95	9.05	13.45	9.60	2.00	37.00	130.85	0.75	0.00	2.69	1.27	2.15	14.28	26.35	9.30	1.85
SCMP	PLT	29543	585.57	19.13	8.50	16.37	7.68	2.23	34.00	93.72	0.84	0.00	2.64	1.19	2.24	13.23	24.01	9.85	1.82
SCMP	PLT	29552	625.75	17.95	9.30	18.90	9.85	1.95	32.00	87.45	0.86	0.00	3.05	1.00	3.11	14.27	25.14	10.28	1.77
SCMP	PLT	29553	637.25	18.25	9.05	20.85	11.15	2.00	19.50	54.90	0.91	0.00	3.12	0.94	3.40	13.90	24.88	11.09	1.80
SCMP	PLT	29554	534.40	16.80	8.73	17.27	7.70	1.90	36.00	120.40	0.78	0.00	2.69	1.06	2.56	14.04	24.27	10.30	1.73
SCMP	PLT	29544	514.90	19.90	8.50	14.90	7.10	2.30	41.00	98.30	0.81	0.00	2.54	0.85	3.05	13.45	22.10	9.31	1.64
SCMP	PLT	29545	563.00	21.10	8.30	17.30	9.10	2.50	17.00	72.30	0.87	0.00	2.58	1.05	2.47	13.32	24.36	11.34	1.83
SCMP	PLT	29546	546.85	14.28	9.93	20.10	11.93	1.43	26.50	56.78	0.90	0.00	2.34	0.90	2.63	14.94	22.90	8.06	1.54
SCMP	PLT	29547	713.00	22.55	9.35	19.95	9.40	2.45	28.00	106.20	0.86	0.00	2.88	1.46	1.99	13.12	25.10	10.85	1.91
SCMP	PLT	29548	700.28	16.20	10.21	24.10	13.21	1.60	28.56	67.98	0.90	0.00	2.17	0.94	2.36	13.83	22.43	8.90	1.62

SCMP	PLT	29483	541.10	19.70	8.50	19.30	11.30	2.30	38.00	116.40	0.78	0.00	1.75	1.02	1.75	13.04	22.80	7.48	1.75
SCMP	PLT	29484	270.40	14.65	7.40	13.75	9.30	2.00	17.00	40.05	0.84	0.00	1.57	1.00	1.61	12.40	20.54	9.16	1.67
SCMP	PLT	29487	881.30	19.00	10.50	18.20	16.10	1.80	43.00	178.30	0.80	0.00	1.84	1.34	1.37	13.07	25.10	8.02	1.93
SCMP	PLT	29637	459.23	13.48	8.77	16.66	10.33	1.56	31.50	78.97	0.83	1.28	2.62	0.92	2.89	12.81	21.48	8.06	1.68
SCMP	PLT	29770	478.00	14.50	8.40	13.80	9.80	1.70	36.00	60.70	0.87	0.00	1.72	0.38	4.96	10.79	22.49	8.16	2.09
SCMP	PLT	29556	493.90	15.55	9.35	11.25	7.55	1.65	36.50	66.15	0.87	0.00	2.84	1.05	2.72	13.01	25.11	8.25	1.93
SCMP	PLT	29576	370.10	18.40	6.80	9.65	5.65	2.70	43.00	68.05	0.82	0.50	1.56	0.83	1.90	11.93	19.94	8.70	1.67
SCMP	PLT	29558	490.40	17.70	9.70	16.10	11.10	1.80	43.00	99.10	0.80	0.00	1.44	1.02	1.41	10.72	21.95	7.22	2.05
SCMP	PLT	29560	594.65	22.45	8.35	16.15	9.75	2.70	36.00	98.40	0.84	0.00	1.66	0.98	1.73	11.25	22.58	8.86	2.01
SCMP	PLT	29561	727.80	18.50	9.90	8.30	10.00	1.87	46.00	105.20	0.86	0.00	1.36	0.78	1.78	10.56	23.03	6.75	2.18
SCMP	PLT	29562	345.70	18.75	7.60	9.90	7.95	2.50	38.00	82.50	0.76	0.00	1.44	1.03	1.41	12.24	20.52	6.79	1.69
SCMP	PLT	29563	260.80	12.80	7.80	10.60	6.00	1.60	26.00	70.80	0.73	0.00	1.55	0.80	1.95	11.65	24.29	6.83	2.08
SCMP	PLT	29760	707.61	23.27	8.83	17.99	10.89	2.61	34.29	114.70	0.83	0.00	2.59	1.06	2.48	13.12	23.05	10.79	1.76
SCMP	PLT	29761	668.53	21.03	8.77	19.40	9.50	2.40	35.00	115.03	0.83	0.00	2.39	1.06	2.27	12.74	20.53	10.31	1.62
SCMP	PLT	29762	627.92	18.90	9.08	20.70	11.10	2.08	30.60	95.68	0.85	0.00	2.55	0.93	2.78	13.97	23.21	10.04	1.66
SCMP	PLT	29763	551.82	15.54	9.18	17.82	11.24	1.70	36.17	99.68	0.81	0.00	2.26	0.96	2.38	13.32	22.02	8.85	1.66
SCMP	PLT	29625	272.65	11.35	7.45	12.95	7.00	1.55	33.00	59.00	0.79	0.00	2.00	1.00	2.05	12.91	20.60	7.62	1.60
SCMP	PLT	29392	444.80	11.90	9.40	16.20	8.90	1.30	33.00	173.20	0.61	0.00	1.81	1.05	1.73	13.06	23.23	7.19	1.78
SCMP	PLCH	29772	622.30	17.57	9.30	19.10	12.03	1.90	34.67	88.23	0.86	0.00	2.61	0.99	2.65	14.41	25.27	9.83	1.76
SCMP	PLCH	29773	754.83	18.67	10.20	19.47	10.93	1.83	35.67	96.83	0.80	0.00	2.56	1.09	2.36	14.25	25.62	9.08	1.80
SCMP	PLCH	29774	432.40	16.30	8.80	17.30	9.10	1.90	21.00	67.80	0.84	0.00	2.17	1.35	1.62	12.69	24.37	10.72	1.92
SCMP	PLCH	29775	432.00	19.10	8.00	12.20	8.70	2.40	39.00	110.80	0.74	0.00	1.88	1.29	1.46	12.44	23.01	8.31	1.85
SCMP	PLCH	29776	761.08	21.58	9.65	19.13	12.40	2.23	37.50	111.00	0.85	0.00	3.18	1.07	2.99	14.58	26.91	10.62	1.85
SCMP	PLCH	29777	676.80	18.30	9.90	18.30	13.20	1.80	39.00	87.90	0.87	0.00	2.30	0.87	2.66	12.88	25.33	7.95	1.97

Anexo 1.4. Parámetros productivos de las muestras identificadas en plantaciones y BGC

SELEC	TIPO	ACCESION	PM	NSM	PTSM	PHS	PSS	M/ARB	PSS/ARB (g)	IS	IM
BGC	CR	29432	517.10	33.71	137.28	1.98	1.23	31	1283.58	814	24
BGC	CR	29438	301.44	36.00	86.10	1.21	0.72	23	599.95	1380	38
BGC	CR	29439	317.70	30.00	89.40	1.50	0.90	26	705.12	1106	37
BGC	CR	29437	281.17	36.33	86.27	1.25	0.80	31	900.10	1251	34
BGC	CR	29436	355.10	38.88	91.34	1.28	0.78	29	875.54	1288	33
BGC	CR	29433	435.84	29.86	109.45	2.22	1.24	47	1741.76	806	27
BGC	CR	29430	259.36	36.19	69.40	1.12	0.55	26	512.82	1835	51
BGC	CR	29435	435.26	34.18	107.70	2.21	1.08	25	925.80	923	27
BGC	CR	29441	261.71	29.87	52.91	1.33	0.71	27	570.37	1414	47
BGC	CR	29440	528.29	37.92	140.78	1.84	1.11	28	1182.47	898	24
BGC	CR	29434	401.68	33.14	99.24	1.34	0.81	21	566.64	1228	37
BGC	HB	29398	593.03	39.67	149.96	1.83	1.19	30	1419.43	838	21
BGC	HB	29399	735.65	40.71	181.76	1.98	1.30	25	1319.58	771	19
BGC	HB	29400	685.49	44.00	143.49	1.58	1.03	50	2266.63	971	22
BGC	HB	29401	682.12	41.33	196.02	1.94	1.27	25	1314.40	786	19
BGC	HB	29402	598.39	36.64	111.59	1.51	1.00	40	1470.95	996	27
BGC	HB	29403	625.12	41.88	136.39	1.58	0.97	50	2031.84	1031	25
BGC	HB	29404	310.42	34.67	104.65	1.22	0.74	18	462.59	1349	39
BGC	HB	29405	692.91	37.04	92.55	1.29	0.82	60	1830.14	1214	33
BGC	HB	29406	680.55	36.53	128.56	1.74	1.13	36	1486.70	885	24
BGC	HB	29407	315.99	34.42	86.26	1.27	0.73	22	552.34	1371	40
SCMP	PLT	29503	927.80	34.00	62.30	2.16	0.94	23	737.69	1060	31
SCMP	PLT	29505	604.15	28.00	73.65	2.83	0.95	7	185.22	1058	38
SCMP	PLT	29508	1092.00	26.50	52.55	2.13	0.86	14	319.06	1163	44
SCMP	PLT	29476	243.40	24.75	35.73	1.42	0.59	6	87.49	1697	69
SCMP	PLT	29445	474.60	35.00	87.80	2.80	0.83	19	554.17	1200	34
SCMP	PLT	29446	725.30	40.33	115.27	2.89	1.32	28	1493.23	756	19
SCMP	PLT	29459	429.15	29.00	65.35	2.43	0.93	24	647.28	1075	37
SCMP	PLT	29447	487.25	35.50	72.70	2.20	0.94	25	837.21	1060	30
SCMP	PLT	29448	410.20	39.00	80.55	2.08	0.86	15	504.08	1161	30
SCMP	PLT	29449	271.70	35.33	55.12	1.67	0.75	12	315.88	1342	38
SCMP	PLT	29451	398.60	36.50	82.00	2.44	1.04	14	533.14	958	26
SCMP	PLT	29453	296.30	32.00	39.90	1.24	0.60	19	364.80	1667	52
SCMP	PLT	29694	736.59	42.71	107.51	2.15	0.77	56	1831.21	1306	31
SCMP	PLT	29705	581.58	42.60	98.10	2.10	0.88	26	975.61	1135	27
SCMP	PLT	29709	471.85	23.50	69.25	2.96	1.24	47	1373.26	804	34
SCMP	PLT	29352	752.05	33.00	124.60	1.95	0.86	16	455.66	1159	35

SCMP	PLT	29353	427.60	34.00	88.50	1.39	0.84	10	284.24	1196	35
SCMP	PLT	29360	604.80	46.00	128.60	1.81	1.22	16	899.39	818	18
SCMP	PLT	29532	379.10	34.00	75.60	2.36	1.03	18	630.36	971	29
SCMP	PLT	29705	659.05	40.00	81.70	2.18	1.02	16	653.87	979	24
SCMP	PLT	29716	291.18	29.50	82.20	2.20	1.16	14	477.70	865	29
SCMP	PLT	29721	468.17	39.33	78.70	2.13	1.22	44	2102.76	823	21
SCMP	PLT	29733	491.50	31.00	82.20	2.68	1.36	35	1479.22	733	24
SCMP	PLT	29735	795.83	34.33	70.77	2.53	0.99	16	543.84	1010	29
SCMP	PLT	29736	256.55	26.00	27.30	0.90	0.39	10	102.27	2542	98
SCMP	PLT	29376	578.60	36.00	158.20	2.05	1.08	14	546.34	923	26
SCMP	PLT	29612	300.30	36.25	83.50	2.08	0.85	10	306.61	1182	33
SCMP	PLT	29607	675.20	39.29	90.83	2.47	1.10	60	2602.96	906	23
SCMP	PLT	29614	479.60	26.00	54.30	2.25	1.37	20	714.13	728	28
SCMP	PLT	29608	369.55	34.75	69.23	2.04	1.03	63	2250.06	973	28
SCMP	PLT	29615	333.03	31.67	75.00	2.53	1.00	20	634.04	999	32
SCMP	PLT	29509	567.53	29.67	68.80	2.46	1.09	36	1168.87	914	31
SCMP	PLT	29616	327.97	32.62	61.53	1.42	0.56	16	294.41	1773	54
SCMP	PLT	29617	272.70	32.20	60.42	1.70	0.73	17	399.97	1369	43
SCMP	PLT	29618	301.75	43.00	71.05	1.79	0.77	11	365.79	1293	30
SCMP	PLT	29620	498.30	29.00	75.40	2.46	1.18	29	990.98	849	29
SCMP	PLT	29611	354.66	33.60	59.90	1.88	0.80	26	700.04	1248	37
SCMP	PLT	29469	470.60	38.00	78.00	2.11	1.05	8	318.19	955	25
SCMP	PLT	29470	356.70	24.00	46.70	2.27	0.95	7	159.04	1056	44
SCMP	PLT	29365	470.52	28.17	68.22	2.11	1.10	56	1741.64	906	32
SCMP	PLT	29367	439.55	22.33	56.88	2.82	1.40	39	1223.27	712	32
SCMP	PLT	29368	400.72	33.20	58.54	1.96	0.87	30	864.53	1152	35
SCMP	PLT	29369	346.45	22.50	63.55	2.56	1.38	39	1213.88	723	32
SCMP	PLT	29370	442.15	42.50	84.35	2.07	0.96	18	734.40	1042	25
SCMP	PLT	29371	482.45	33.25	95.85	2.88	1.36	39	1759.26	737	22
SCMP	PLT	29541	827.90	40.00	141.30	1.8	1.1	27	1220.40	885	22
SCMP	PLT	29737	387.45	29.50	75.97	2.47	0.82	52	1252.77	1224	42
SCMP	PLT	29738	424.17	37.80	82.29	2.20	0.78	79	2329.24	1282	34
SCMP	PLT	29739	583.43	34.50	79.75	2.87	0.94	57	1848.51	1064	31
SCMP	PLT	29741	491.40	34.67	89.45	2.62	0.94	48	1566.93	1062	31
SCMP	PLT	29742	595.19	28.86	92.41	3.29	1.14	82	2690.80	879	30
SCMP	PLT	29743	369.63	28.50	55.63	1.98	0.73	69	1425.71	1379	48
SCMP	PLT	29744	417.60	21.00	76.00	2.21	0.88	66	1224.30	1132	54
SCMP	PLT	29750	1123.92	29.40	94.34	3.68	0.93	12	328.69	1073	37
SCMP	PLT	29751	806.65	30.00	81.55	3.07	1.24	78	2909.40	804	27
SCMP	PLT	29752	1194.39	36.00	116.59	2.91	1.37	54	2663.28	730	20

SCMP	PLT	29745	399.00	38.18	131.53	2.77	1.01	105	4055.86	988	26
SCMP	PLT	29746	312.40	23.40	55.19	2.24	0.75	52	916.01	1328	57
SCMP	PLT	29747	433.60	38.33	104.93	2.38	1.01	24	928.18	991	26
SCMP	PLT	29748	396.80	32.00	76.76	2.39	0.99	17	539.47	1008	32
SCMP	PLT	29749	545.33	38.00	133.05	2.31	1.05	12	477.28	955	25
SCMP	PLT	29757	585.19	34.08	105.16	2.47	0.81	32	885.70	1231	36
SCMP	PLT	29758	614.72	36.40	123.58	2.47	1.09	69	2730.95	920	25
SCMP	PLT	29759	590.38	35.00	108.80	2.54	0.87	97	2964.97	1145	33
SCMP	PLT	29348	520.60	34.00	86.50	2.33	0.93	46	1459.73	1071	32
SCMP	PLT	29349	560.90	42.00	115.83	2.03	0.83	46	1612.15	1198	29
SCMP	PLT	29350	646.63	32.25	92.45	2.29	1.00	37	1196.23	998	31
SCMP	PLT	29351	513.65	37.00	130.85	2.69	1.27	26	1223.34	786	21
SCMP	PLT	29543	585.57	34.00	93.72	2.64	1.19	76	3082.14	838	25
SCMP	PLT	29552	625.75	32.00	87.45	3.05	1.00	28	891.52	1005	31
SCMP	PLT	29553	637.25	19.50	54.90	3.12	0.94	16	293.28	1064	55
SCMP	PLT	29554	534.40	36.00	120.40	2.69	1.06	10	380.00	947	26
SCMP	PLT	29544	514.90	41.00	98.30	2.54	0.85	20	697.00	1176	29
SCMP	PLT	29545	563.00	17.00	72.30	2.58	1.05	15	266.90	955	56
SCMP	PLT	29546	546.85	26.50	56.78	2.34	0.90	45	1072.26	1112	42
SCMP	PLT	29547	713.00	28.00	106.20	2.88	1.46	15	611.10	687	25
SCMP	PLT	29548	700.28	28.56	67.98	2.17	0.94	19	507.29	1070	37
SCMP	PLT	29483	541.10	38.00	116.40	1.75	1.02	17	660.21	978	26
SCMP	PLT	29484	270.40	17.00	40.05	1.57	1.00	14	237.76	1001	59
SCMP	PLT	29489	881.30	43.00	178.30	1.84	1.34	35	2022.72	744	17
SCMP	PLT	29637	459.23	31.50	78.97	2.62	0.92	31	895.45	1091	35
SCMP	PLT	29770	478.00	36.00	60.70	1.72	0.38	18	244.08	2655	74
SCMP	PLT	29556	493.90	36.50	66.15	2.84	1.05	37	1413.52	955	26
SCMP	PLT	29576	370.10	43.00	68.05	1.56	0.83	26	932.78	1199	28
SCMP	PLT	29558	490.40	43.00	99.10	1.44	1.02	40	1754.40	980	23
SCMP	PLT	29560	594.65	36.00	98.40	1.66	0.98	36	1271.38	1019	28
SCMP	PLT	29561	727.80	46.00	105.20	1.36	0.78	41	1467.31	1285	28
SCMP	PLT	29562	345.70	38.00	82.50	1.44	1.03	51	1986.45	976	26
SCMP	PLT	29563	260.80	26.00	70.80	1.55	0.80	18	374.40	1250	48
SCMP	PLT	29760	707.61	34.29	114.70	2.59	1.06	57	2068.75	945	28
SCMP	PLT	29761	668.53	35.00	115.03	2.39	1.06	48	1782.67	942	27
SCMP	PLT	29762	627.92	30.60	95.68	2.55	0.93	36	1025.22	1074	35
SCMP	PLT	29763	551.82	36.17	99.68	2.26	0.96	48	1674.08	1037	29
SCMP	PLT	29625	272.65	33.00	59.00	2.00	1.00	37	1216.93	1003	30
SCMP	PLT	29392	444.80	33.00	173.20	1.81	1.05	26	899.18	954	29
SCMP	PLCH	29772	622.30	34.67	88.23	2.61	0.99	25	857.42	1011	29

SCMP	PLCH	29773	754.83	35.67	96.83	2.56	1.09	30	1168.25	916	26
SCMP	PLCH	29774	432.40	21.00	67.80	2.17	1.35	15	425.25	741	35
SCMP	PLCH	29775	432.00	39.00	110.80	1.88	1.29	25	1257.75	775	20
SCMP	PLCH	29776	761.08	37.50	111.00	3.18	1.07	27	1078.31	939	25
SCMP	PLCH	29777	676.80	39.00	87.90	2.30	0.87	10	338.13	1153	30

2. Anexo Capítulo II

Anexo 2.1. Acciones colectadas en Tabasco, México con código del LGFT del USDA-ARS de Miami, FL., USA.

Cód. USDA	Cód. USDA	Cód. USDA	Cód. USDA
Tc-29348	Tc-29460	Tc-29572	Tc-29684
Tc-29349	Tc-29461	Tc-29573	Tc-29685
Tc-29350	Tc-29462	Tc-29574	Tc-29686
Tc-29351	Tc-29463	Tc-29575	Tc-29687
Tc-29352	Tc-29464	Tc-29576	Tc-29688
Tc-29353	Tc-29465	Tc-29577	Tc-29689
Tc-29354	Tc-29466	Tc-29578	Tc-29690
Tc-29355	Tc-29467	Tc-29579	Tc-29691
Tc-29356	Tc-29468	Tc-29580	Tc-29692
Tc-29357	Tc-29469	Tc-29581	Tc-29693
Tc-29358	Tc-29470	Tc-29582	Tc-29694
Tc-29359	Tc-29471	Tc-29583	Tc-29695
Tc-29360	Tc-29472	Tc-29584	Tc-29696
Tc-29361	Tc-29473	Tc-29585	Tc-29697
Tc-29362	Tc-29474	Tc-29586	Tc-29698
Tc-29363	Tc-29475	Tc-29587	Tc-29699
Tc-29364	Tc-29476	Tc-29588	Tc-29700
Tc-29365	Tc-29477	Tc-29589	Tc-29701
Tc-29366	Tc-29478	Tc-29590	Tc-29702
Tc-29367	Tc-29479	Tc-29591	Tc-29703
Tc-29368	Tc-29480	Tc-29592	Tc-29704
Tc-29369	Tc-29481	Tc-29593	Tc-29705
Tc-29370	Tc-29482	Tc-29594	Tc-29706
Tc-29371	Tc-29483	Tc-29595	Tc-29707
Tc-29372	Tc-29484	Tc-29596	Tc-29708
Tc-29373	Tc-29485	Tc-29597	Tc-29709
Tc-29374	Tc-29486	Tc-29598	Tc-29710
Tc-29375	Tc-29487	Tc-29599	Tc-29711
Tc-29376	Tc-29488	Tc-29600	Tc-29712
Tc-29377	Tc-29489	Tc-29601	Tc-29713
Tc-29378	Tc-29490	Tc-29602	Tc-29714
Tc-29379	Tc-29491	Tc-29603	Tc-29715
Tc-29380	Tc-29492	Tc-29604	Tc-29716
Tc-29381	Tc-29493	Tc-29605	Tc-29717
Tc-29382	Tc-29494	Tc-29606	Tc-29718
Tc-29383	Tc-29495	Tc-29607	Tc-29719

Tc-29384	Tc-29496	Tc-29608	Tc-29720
Tc-29385	Tc-29497	Tc-29609	Tc-29721
Tc-29386	Tc-29498	Tc-29610	Tc-29722
Tc-29387	Tc-29499	Tc-29611	Tc-29723
Tc-29388	Tc-29500	Tc-29612	Tc-29724
Tc-29389	Tc-29501	Tc-29613	Tc-29725
Tc-29390	Tc-29502	Tc-29614	Tc-29726
Tc-29391	Tc-29503	Tc-29615	Tc-29727
Tc-29392	Tc-29504	Tc-29616	Tc-29728
Tc-29393	Tc-29505	Tc-29617	Tc-29729
Tc-29394	Tc-29506	Tc-29618	Tc-29730
Tc-29395	Tc-29507	Tc-29619	Tc-29731
Tc-29396	Tc-29508	Tc-29620	Tc-29732
Tc-29397	Tc-29509	Tc-29621	Tc-29733
Tc-29398	Tc-29510	Tc-29622	Tc-29734
Tc-29399	Tc-29511	Tc-29623	Tc-29735
Tc-29400	Tc-29512	Tc-29624	Tc-29736
Tc-29401	Tc-29513	Tc-29625	Tc-29737
Tc-29402	Tc-29514	Tc-29626	Tc-29738
Tc-29403	Tc-29515	Tc-29627	Tc-29739
Tc-29404	Tc-29516	Tc-29628	Tc-29740
Tc-29405	Tc-29517	Tc-29629	Tc-29741
Tc-29406	Tc-29518	Tc-29630	Tc-29742
Tc-29407	Tc-29519	Tc-29631	Tc-29743
Tc-29408	Tc-29520	Tc-29632	Tc-29744
Tc-29409	Tc-29521	Tc-29633	Tc-29745
Tc-29410	Tc-29522	Tc-29634	Tc-29746
Tc-29411	Tc-29523	Tc-29635	Tc-29747
Tc-29412	Tc-29524	Tc-29636	Tc-29748
Tc-29413	Tc-29525	Tc-29637	Tc-29749
Tc-29414	Tc-29526	Tc-29638	Tc-29750
Tc-29415	Tc-29527	Tc-29639	Tc-29751
Tc-29416	Tc-29528	Tc-29640	Tc-29752
Tc-29417	Tc-29529	Tc-29641	Tc-29753
Tc-29418	Tc-29530	Tc-29642	Tc-29754
Tc-29419	Tc-29531	Tc-29643	Tc-29755
Tc-29420	Tc-29532	Tc-29644	Tc-29756
Tc-29421	Tc-29533	Tc-29645	Tc-29757
Tc-29422	Tc-29534	Tc-29646	Tc-29758
Tc-29423	Tc-29535	Tc-29647	Tc-29759
Tc-29424	Tc-29536	Tc-29648	Tc-29760

Tc-29425	Tc-29537	Tc-29649	Tc-29761
Tc-29426	Tc-29538	Tc-29650	Tc-29762
Tc-29427	Tc-29539	Tc-29651	Tc-29763
Tc-29428	Tc-29540	Tc-29652	Tc-29764
Tc-29429	Tc-29541	Tc-29653	Tc-29765
Tc-29430	Tc-29542	Tc-29654	Tc-29766
Tc-29431	Tc-29543	Tc-29655	Tc-29767
Tc-29432	Tc-29544	Tc-29656	Tc-29768
Tc-29433	Tc-29545	Tc-29657	Tc-29769
Tc-29434	Tc-29546	Tc-29658	Tc-29770
Tc-29435	Tc-29547	Tc-29659	Tc-29771
Tc-29436	Tc-29548	Tc-29660	Tc-29772
Tc-29437	Tc-29549	Tc-29661	Tc-29773
Tc-29438	Tc-29550	Tc-29662	Tc-29774
Tc-29439	Tc-29551	Tc-29663	Tc-29775
Tc-29440	Tc-29552	Tc-29664	Tc-29776
Tc-29441	Tc-29553	Tc-29665	Tc-29777
Tc-29442	Tc-29554	Tc-29666	Tc-29778
Tc-29443	Tc-29555	Tc-29667	Tc-29779
Tc-29444	Tc-29556	Tc-29668	Tc-29780
Tc-29445	Tc-29557	Tc-29669	Tc-29781
Tc-29446	Tc-29558	Tc-29670	Tc-29782
Tc-29447	Tc-29559	Tc-29671	Tc-29783
Tc-29448	Tc-29560	Tc-29672	Tc-29784
Tc-29449	Tc-29561	Tc-29673	Tc-29785
Tc-29450	Tc-29562	Tc-29674	Tc-29786
Tc-29451	Tc-29563	Tc-29675	Tc-29787
Tc-29452	Tc-29564	Tc-29676	Tc-29788
Tc-29453	Tc-29565	Tc-29677	Tc-29789
Tc-29454	Tc-29566	Tc-29678	Tc-29790
Tc-29455	Tc-29567	Tc-29679	Tc-29791
Tc-29456	Tc-29568	Tc-29680	Tc-29792
Tc-29457	Tc-29569	Tc-29681	Tc-29793
Tc-29458	Tc-29570	Tc-29682	Tc-29794
Tc-29459	Tc-29571	Tc-29683	Tc-29795

Anexo 2.2. Guía para coleccionar, empacar y enviar hojas de cacao *Theobroma cacao* L. al laboratorio del USDA-ARS de Miami, Florida.

Recolección y etiquetado

- 1.- Colectar hojas sanas, en etapa joven a semi-adultas (no, hojas de color rojo), sin daños de microorganismos, insectos, etc.
- 2.- Rotular las muestras con una etiqueta o cinta adhesiva, el cual debe colocarse en el pedúnculo de la hoja.
- 3.- Rotular el sobre o envoltura (papel periódico, sobres de papel o manila): nombre del cultivar, número del árbol, localización del árbol, el país y fecha de recolección.

Empacado

- 1.- Asegurarse que los paquetes con las hojas estén bien cerrados para que no se mezclen o confundan cuando sean empacadas o durante la manipulación del envío.
- 2.- Colocar los paquetes en cajas de cartón, donde la deshidratación no es acelerada. No colocar hielo, causa congelación y deterioro de las hojas.
- 3.- No enviar hojas en neveras o cajas con aislamiento plástico o espuma, ya que causan el deterioro de la hoja por acumulación de humedad.
- 4.- No llenar demasiado la caja con las muestras para evitar comprimirlas.

Envío

- 1.- Enviar el material colectado lo más pronto posible. Si es un número grande de muestras lo ideal es hacer varios envíos con pequeños números de muestras. Evitar almacenar las hojas por un periodo muy largo, causa su deterioro.
- 2.- Al enviar los paquetes, es preferible que estos estén en tránsito el menor tiempo posible (preferentemente 24 horas).
- 3.- Incluir un listado de los materiales colectados y empacados, que permita verificar las muestras a su llegada.

4.- Avisar con anticipación al SHRS del envío del material. Para estar al pendiente y preparados para su llegada.

5.- Para mayor información comunicarse con: USDA-ARS, SHRS., 13601 Old Cutler Road, Miami Florida 33158. Teléfono: (786) 573-7097, Fax: (786) 573-7100. En internet: http://www.ars.usda.gov/main/site_main.htm?modecode=60-38-05-00

Anexo 2.3. Protocolo de liofilización de hojas de *T. cacao* de acuerdo al USAD-ARS, Miami, Fl.

Preparación de las muestras:

- 1.- Etiquetar los sobres (PrintMaster, de 4 3/8" x 5 3/4") con el código correspondiente a la muestra.
- 2.- Doblar las hojas y colocarlas dentro del sobre, no cerrar el sobre.
- 3.- Colocar los sobres con la muestra en la bandeja metálica del liofilizador.
- 4.- Poner la bandeja en el ultracongelador a -80°C por un tiempo de 2 horas. La bandeja debe colocarse sobre un plástico.

Preparación de la máquina de liofilización (VirTis™ SP Scientific, Genesis).

- 1.- Limpiar el condensador y retirar residuos de agua.
- 2.- Seleccionar el programa 4 de la máquina de liofilización

Ciclos de secado	Temperatura	Tiempo	Vacío
Paso 1	-40° C	Mantener a 30 min	100
Paso 2	20° C	Aumentar a 180 min	200
Paso 3	20° C	Mantener a 940 min	200
Paso 4-10	0	0	0
2do. ciclo	+ 60°C		
Incremento de calor	+ 25°C	60 min	100 mT

Temperatura de congelación: -40°C

Temperatura adicional de congelación: 0 min

Temperatura del Condensador: -40°C

Atmosfera de vacío: 400 mTorr

Anexo 2.4. Protocolo de extracción de ADN en con el kit FastDNA[®] Spin, modificado por el Laboratorio de Genética de Frutas Tropicales del USDA-ARS Miami, Fl., en septiembre del 2011.

Preparación de las muestras:

Hojas frescas, 200 mg, equivalentes a 20 discos de 8 mm de diámetro.

Hojas secas, 40 mg o 16 discos de 8 mm de diámetro.

- 1.- Adicionar las muestras (discos de hojas) al tubo Lising Matrix A.
- 2.- colocar una segunda esfera de 1/4" (Ceramic Sphere) al tubo.
- 3.- Agregar al tubo con la muestra, 800µl de CLS-VF* y 200 µl de PPS.

*Al frasco de CLS-VF (90 ml) antes de usarse, se deberá agregar 2.8 g de PVPP (Polivinilpolipirrolidona) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO.) y mezclarlo en agitación.

Homogenización

4.- Colocar los tubos en el disrruptor (FastPrep[™] FP 120 Cell Disrupter (Savant Instruments, Inc.; Holbrook, N.Y.) a una velocidad de 5 por 30 segundos, retirar los tubos y colocarlos en hielo por 5min. Realizar este pasó tres veces.

5. posteriormente pasar al siguiente paso:

Si se utiliza hojas secas, las muestras deben permanecer en hielo durante 2 horas.

Si es hoja fresca continuar al siguiente paso.

Centrifugación

6.- Colocar los tubos en la centrifuga (ependorf Centrifuge 5424, Westbury, N. Y.) a 14,000xg por un tiempo de 10 min.

7.- Recuperar el sobrenadante (parte liquida) y transferirlo al siguiente tubo (Recovery tube), el mayor volumen posible de líquido.

8.- Centrifugar, tal como en el paso 6. Para separa la parte solida de la parte liquida.

9.- Tomar 400 μ l de la parte líquida y transferirlo a un nuevo tubo (Recovery tube) y adicionar un volumen igual de Binding Matrix, mezclarlo por inversión e incubar por 5 min a la temperatura del laboratorio.

10.- Colocar el tubo en la centrifuga (Eppendorf Centrifuge 5424, Westbury, N. Y.) a 14,000xg por un tiempo de 30 min.

11.- Eliminar el sobrenadante del tubo, dejando solamente la parte sólida que se ha formado.

12.- Agregar al tubo 500 μ L de la solución SEWS-M y con ello disolver la parte sólida que se formó. La solución disuelta se coloca en un nuevo tubo SPIN Modules.

Al frasco de 12 mL de la concentración SEWS-M se le agregan 100 mL de etanol para biología molecular (Decon Labs, Inc.). Este debe prepararse con anticipación.

SPIN Filter

13.- Centrifugar el tubo a 14,000xg por 1 minuto 30 segundos, posteriormente retirar el filtro para eliminar el desecho líquido, seguidamente se regresa el filtro al tubo.

14.- Para secar la parte sólida que ha quedado en el filtro, volver a centrifugar el tubo a 14,000xg por 30 segundos.

15.- Transferir el filtro del tubo SPIN Modules un nuevo tubo tipo Delfín.

16.- En el nuevo tubo, al filtro agregar 100 μ L de DES, dar golpes leves al tubo con el dedo para disolver la parte sólida.

17.- Incubar durante 5 minutos el tubo en una placa caliente a 55°C (Digital dry bath, Labnet International, Inc.)

18.- Centrifugar el tubo a 14,000xg por 1 minuto 30 segundos

19.- Retirar el filtro del tubo, el ADN contenido en este es considerado como puro.

20.- Cuantificar la pureza del ADN extraído de la muestra.

Anexo 2.5. Protocolo de extracción de ADN en con el kit PlantDNAazol® (Invitrogen) en el Laboratorio de Fisiología Vegetal del Colegio de Postgraduados Campus Tabasco, Cárdenas, Tabasco. (Lagunes-Espinoza, L. C., Ramírez-Guillermo, M. A. y Ruiz-Gil, P. J).

Preparación de las muestras

Hojas jóvenes de *Theobroma cacao* L., realizar trozos pequeños de la lámina foliar y eliminar las nervaduras.

- 1.- Colocar en un mortero los trozos de la lámina foliar, añadir suficiente nitrógeno líquido y con ayuda de un pistilo molerlo hasta reducirlo a un polvo fino (mortero y pistilo esterilizados y previamente enfriados).
- 2.- Transferir 0.1 g (100 mg) del polvo fino a un tubo eppendorf y adicionar 0.3 mL de la solución Plant DNAazol. (El Plant DNAazol previamente mezclado con RNAasa A con 100 µg /mL de Plant DNAazol. (al Plant DNAazol de 100mL adicionar 10 mg de RNAasa A).
- 3.- Mezclar la solución por inversión suave del tubo, incubar a 25°C por 5 minutos con agitación horizontal.
- 4.- Agregar nuevamente 0.3 ml de la solución Plant DNAazol.
- 5.- repetir el paso 3.
- 6.- Adicionar 0.3 mL de cloroformo, mezclar vigorosamente e incubar a 25°C por 5 minutos con agitación horizontal.
- 7.- Centrifugar el extracto a 12000 xg por 5 min y transferir el sobrenadante a un nuevo tubo.
- 8.- repetir paso 6, 7 y 6.
- 9.- Centrifugar el extracto a 12000 xg por 10 min y transfiera el sobrenadante a un nuevo tubo.
- 10.- Para precipitar el ADN, añadir 0.225 mL de etanol al 100%, homogenizarlo por inversión (6-8 movimientos) e incubar a temperatura ambiente por 5min.
- 11.- Para sedimentar el ADN precipitado, repetir el paso 9 y remover el sobrenadante con una pipeta (el precipitado de ADN no es visible antes de la centrifugación).

Lavado del ADN

- 12.- Agregar 0.3 mL de la solución de lavado (la solución de lavado es Plant DNAazol-etanol: volumen/volumen), mezclar en vortex e incubar en hielo durante 5 minutos.
- 13.- Centrifugar a 12000 xg por 10 minutos.
- 14.- Remover la solución de lavado por decantación.

15.- Para lavar el pellet de ADN, adicionar 0.3 mL de etanol al 75 % y agitar vigorosamente.

16.- Centrifugar a 12000 xg por 5 minutos.

Solubilización del ADN

17.- Remover el etanol por decantación vertical (1-2 minutos) y remover el etanol remanente con una micropipeta.

18.- Disolver el pellet de ADN en 70 μ L de TE buffer (pH 8.0).

19.- Guarde las muestras de ADN aislado a -20°C.

Con el presente protocolo se extrajeron ADN de las muestras Tc-29432 y Tc-29433 (cinco repeticiones de cada una). La cuantificación se realizó tomando las lecturas a 260 y 280 nm en un espectrofotómetro (Genesys 10uv, Thermo electron corporation) con el resultado se realizó una dilución de 1:10. Para determinar la calidad y pureza del ADN extraído, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1%. El gel se visualizó en el transilunador (Bio-Imaging Systems,Mini Bis) (Figura 1). La PCR se realizó en el equipo Techne-Techgene con el primer mTcCIR1 (BioLab); posteriormente se realizó una electroforesis en gel de agarosa el cual se visualizó en el transilunador (Bio-Imaging Systems,Mini Bis) para determinar el peso molecular (Figura 2).

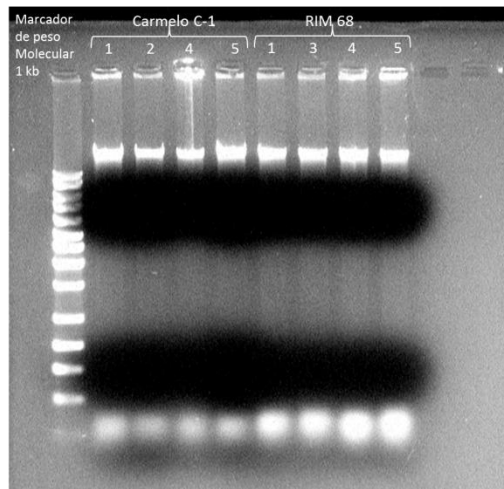


Figura 1. Calidad del ADN extraído



Figura 2. PCR del primer mTcCIR1