

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA  
ESCUELA DE BIOLOGÍA



TRABAJO DE GRADUACIÓN:  
**CARACTERIZACIÓN DE 30 ACCESIONES DE *Theobroma cacao* L.  
SELECCIONADOS EN PEQUEÑOS CULTIVOS DE CACAO EN EL  
SALVADOR MEDIANTE MARCADORES MOLECULARES  
MICROSATÉLITES.**

PRESENTADO POR:  
BLANCA MARGARITA GÓMEZ GUEVARA.

PARA OPTAR AL GRADO DE:  
LICENCIADA EN BIOLOGÍA

CIUDAD UNIVERSITARIA, SAN SALVADOR, FEBRERO DE 2019.

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA  
ESCUELA DE BIOLOGÍA



TRABAJO DE GRADUACIÓN:  
**CARACTERIZACIÓN DE 30 ACCESIONES DE *Theobroma cacao* L.  
SELECCIONADOS EN PEQUEÑOS CULTIVOS DE CACAO EN EL  
SALVADOR MEDIANTE MARCADORES MOLECULARES  
MICROSATÉLITES.**

PRESENTADO POR:  
BLANCA MARGARITA GÓMEZ GUEVARA.

PARA OPTAR AL GRADO DE:  
LICENCIADA EN BIOLOGÍA

DOCENTE ASESORA:  
M.Sc. YANIRA ELIZABETH LÓPEZ VENTURA

ASESORA EXTERNA:  
Dra. VIANNEY CASTAÑEDA DE ABREGO

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA  
ESCUELA DE BIOLOGÍA



TRABAJO DE GRADUACIÓN:  
**CARACTERIZACIÓN DE 30 ACCESIONES DE *Theobroma cacao* L.  
SELECCIONADOS EN PEQUEÑOS CULTIVOS DE CACAO EN EL  
SALVADOR MEDIANTE MARCADORES MOLECULARES  
MICROSATÉLITES.**

PARA OPTAR AL GRADO DE:  
LICENCIADA EN BIOLOGÍA

**TRIBUNAL CALIFICADOR:**

M.Sc. Yanira Elizabeth López Ventura \_\_\_\_\_

Dra. Vianney Castañeda de Abrego \_\_\_\_\_

Lic. M.V.Z. Roberto Guillén Paredes \_\_\_\_\_

Lic. Carlos Alberto Elías Ortiz \_\_\_\_\_

CIUDAD UNIVERSITARIA, SAN SALVADOR, FEBRERO DE 2019.

**AUTORIDADES UNIVERSITARIAS**

**RECTOR**

M.Sc. ROGER ARMANDO ARIAS

**VICERRECTOR ACADÉMICO**

Dr. MANUEL DE JESÚS JOYA

**VICERRECTOR ADMINISTRATIVO**

Ing. NELSON BERBABÉ GRANADOS

**SECRETARIO GENERAL**

M.Sc. CRISTÓBAL HERNÁN RÍOS BENÍTEZ

**FISCAL GENERAL**

Lic. RAFAEL HUMBERTO PEÑA MARÍN

**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA**

**DECANO**

Lic. MAURICIO HERNAN LOVO CÓRDOVA

**VICEDECANO**

Lic. CARLOS ANTONIO QUINTANILLA APARICIO

**DIRECTORA ESCUELA DE BIOLOGÍA**

M.Sc. ANA MARTHA ZETINO CALDERÓN

## **DEDICATORIA**

A Dios Todopoderoso, a Jesús, José y María Santísima, por cuidarme siempre y acompañarme a lo largo de todo el camino de mi vida.

A mis Padres José Rafael Gómez y Esther Enriqueta Guevara de Gómez, por su apoyo incondicional siempre y por guiarme en el camino del bien.

A mis hermanos Rafael Enrique, José Raúl y Carlos Roberto, por su apoyo y compañía a lo largo de mi carrera y durante el proceso de mi Tesis.

A mis sobrinos Carlos José y Adriana Margarita, por apoyarme, motivarme y escucharme cuando más lo necesité. Y a mi pequeño sobrino José Carlos, para ser una inspiración en su vida.

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios Todopoderoso, a Jesús, José y María Santísima, por guiarme y cuidarme siempre.

A mis padres, por su apoyo incondicional, animándome y aconsejándome. Gracias por su arduo esfuerzo y amor para que pudiera salir adelante a lo largo de mi vida.

A mis hermanos y sobrinos, por estar siempre pendientes, por apoyarme, cuidarme, escucharme, aconsejarme y creer en mí.

A la Dra. Vianney Castañeda de Abrego, por su paciencia, por confiar en mí y darme la oportunidad de poder desarrollar esta investigación, siendo mi mentora en el área de Biología Molecular y brindándome sus conocimientos sobre las técnicas de extracción de ADN, PCR y electroforesis.

A la M.Sc. Yanira Elizabeth López Ventura, por aceptar asesorar mi tema, por apoyarme y guiarme en cada paso a lo largo de todo el proceso de elaboración y finalización de mi Trabajo de Graduación, gracias por su paciencia y comprensión en cada obstáculo que se afrontó para sacar adelante esta investigación.

A mis jurados, el Lic. M.V.Z. Roberto Guillén Paredes y el Lic. Carlos Alberto Elías Ortiz, por brindarme su tiempo y conocimiento en la revisión del presente documento.

Al Dr. Saúl Díaz Director del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD), por darme la oportunidad de poder desarrollar esta investigación en las instalaciones de los Laboratorios de extracción de ADN, PCR y electroforesis del Tercer Nivel de CENSALUD.

Al personal que labora en el Tercer Nivel de CENSALUD, por convertirse cada uno en mis maestros y por abrirme las puertas de sus instalaciones brindándome todo el equipo y materiales necesarios para poder realizar esta importante investigación.

A todos y cada uno de los dueños de las fincas que se visitaron, por su amabilidad y confianza, por habernos abierto sus puertas y permitirnos coleccionar el material que sin él no hubiera sido posible la realización de esta importante investigación.

Al Dr. Jorge Ernesto Quezada Díaz, por su apoyo y por darme la oportunidad de trabajar y terminar mi tesis para coronar con éxito mi carrera profesional.

A la Escuela de Biología y a todos mis maestros, por transmitirme un poco de sus conocimientos, por formarme en esta hermosa carrera profesional y por ayudarme a cumplir con esta meta.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS.

ÍNDICE DE TABLAS.....	iii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	v
ABREVIATURAS.....	vii
GLOSARIO.....	viii
RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	3
2. OBJETIVOS.....	5
2.1. OBJETIVO GENERAL.....	5
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	5
3. MARCO TEÓRICO.....	6
3.1. ANTECEDENTES.....	6
3.2. FUNDAMENTO TEÓRICO.....	12
3.2.1. ASPECTOS GENERALES SOBRE <i>Theobroma cacao L.</i> .....	12
3.2.2. ORIGEN, DOMESTICACIÓN Y DISPERSIÓN.....	16
3.2.3. IDENTIFICACIÓN DE ACCESIONES DE CACAO.....	24
3.2.4. MARCADORES MOLECULARES.....	24
3.2.5. ANÁLISIS DE DATOS MOLECULARES.....	26
4. HIPÓTESIS.....	29
5. METODOLOGÍA.....	30
5.1. UBICACIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO.....	30
5.2. FASE DE CAMPO.....	31
5.2.1. Selección de árboles en cultivos de cacao.....	31
5.2.2. Colecta de Muestras.....	32
5.3. FASE DE LABORATORIO.....	32
5.3.1. Secado de hojas de <i>T. cacao L.</i> .....	32
5.3.2. Extracción de ADN.....	32
5.3.3. Marcadores Moleculares Microsatélites y Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	34
5.3.4. Electroforesis para observar Producto de PCR.....	36
5.4. ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	36

5.4.1. Construcción de base de datos de las bandas amplificadas. ....	36
5.4.2. Análisis de Datos Moleculares. ....	36
6. RESULTADOS .....	40
6.1. SELECCIÓN DE ÁRBOLES EN CULTIVOS DE CACAO. ....	40
6.1.1. Descriptores morfológicos de Fruto. ....	40
6.1.2. Descriptores morfológicos de hoja y hoja joven. ....	42
6.1.3. Descriptores morfológicos de Flor. ....	44
6.1.4. Descriptores morfológicos de Semilla. ....	46
6.2. EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ADN. ....	48
6.3. ELECTROFORESIS DE CALIDAD DE ADN. ....	50
6.4. AMPLIFICACIÓN POR PCR DE LOS MICROSATÉLITES UTILIZADOS. ....	50
6.5. VISUALIZACIÓN DE PRODUCTOS AMPLIFICADOS EN GELES DE AGAROSA. ....	51
6.6. IDENTIDAD GENÉTICA. ....	52
6.7. ANÁLISIS DE DATOS MOLECULARES. ....	54
6.7.1. Diversidad genética. ....	54
7. DISCUSIÓN .....	62
8. CONCLUSIONES .....	68
9. RECOMENDACIONES .....	70
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	71
11. ANEXOS .....	76

## ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla No.		Pág. No.
1	Complejos germoplásmicos naturales de cacao (M & O Consulting S.A.C, 2008).....	20
2	Microsatélites previamente reportados y propuestos por Herrera García. 2012.....	35
3	Microsatélites previamente reportados y propuestos por Dadzie et al. 2013.....	35
4	Descriptores morfológicos de fruto, de las 28 accesiones de <i>T. cacao L.</i> detalladas. 2017.....	41
5	Descriptores morfológicos de hoja y hoja joven, en las 30 accesiones de <i>T. cacao L.</i> 2017.....	43
6	Descriptores morfológicos de la Flor en las 28 accesiones de <i>T. cacao L.</i> detalladas. 2017.....	45
7	Descriptores morfológicos de Semilla en las 28 accesiones de <i>T. cacao L.</i> detalladas. 2017.....	47
8	Valores obtenidos en la cuantificación de ADN para cada accesión de <i>T. cacao L.</i> 2017.....	48
9	Componentes de la Master mix para amplificación de PCR. 2017.....	50
10	Condiciones del termociclador para amplificación por PCR. 2017.....	51
11	Porcentajes de homocigosidad y heterocigosidad de las 30 accesiones de <i>T. cacao L.</i> 2017.....	53
12	Frecuencia de los alelos de 12 marcadores analizados con el programa GenAIEx. 2018.....	54

13	Número de alelos (NA); número total de alelos por marcador (NTA) y número promedio de alelos (NPA) para los 12 marcadores moleculares microsatélites (SSR). 2018.....	57
14	Frecuencia de alelos nulos en las accesiones de <i>T. cacao L.</i> analizadas, 1 indican el alelo nulo en cada marcador. 2018.....	58
15	Valores de heterocigosidad observada (Ho) y esperada (He) e Índice de Contenido Polimórfico (PIC) para los 12 marcadores moleculares microsatélites (SSR) utilizados en 30 accesiones de <i>T. cacao L.</i> 2018.....	59

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura No.		Pág. No.
1	Árbol y fruto del cacao (Mccenery, 2013).....	12
2	Centro de origen del cacao (M & O Consulting S.A.C, 2008).....	18
3	Dispersión de grupos germoplásmicos de cacao (M & O Consulting S.A.C, 2008).....	19
4	Grupos germoplásmicos naturales de cacao (M & O Consulting S.A.C, 2008).....	20
5	Cacao Criollo (M & O Consulting S.A.C, 2008).....	21
6	Cacao Forasteros del Alto Amazonas (M & O Consulting S.A.C, 2008).....	22
7	Cacao Forasteros del Bajo Amazonas (M & O Consulting S.A.C, 2008).....	22
8	Cacao Nacional (M & O Consulting S.A.C, 2008).....	23
9	Frutos de cacao del grupo Trinitario (M & O Consulting S.A.C, 2008).....	24
10	Las circunferencias de color rojo muestran la ubicación geográfica de los municipios en donde se encuentran las fincas donde se colectó el material analizado de 30 accesiones de <i>T. cacao L.</i> grupo germoplásmico Criollo (SNET, modificado por: Margarita Gómez, 2018).....	30
11	Protocolo de Extracción de ADN y Caracterización Molecular de <i>T. cacao L.</i> .....	39
12	Valores de Pureza del ADN de las 30 accesiones de <i>T. cacao L.</i> 2017.....	49

13	Bandas de ADN de las 30 Accesiones de <i>T. cacao L.</i> corridas en gel de agarosa al 1% (Fotografías tomadas por: Margarita Gómez, 2017).....	50
14	Bandas en geles de agarosa al 3% para observar producto de PCR (Fotografías tomadas por: Margarita Gómez, 2017).....	52
15	Frecuencia de alelos obtenida con el programa GenAIEx. 2018.....	56
16	Dendograma UPGMA, construido a partir de la matriz de alelos de las 30 accesiones de <i>T. cacao L.</i> analizadas, por medio del software PAST 3.....	61

## ABREVIATURAS

<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>AFLPs</b>	Fragmentos de Amplificación de Longitud Polimórfica (Amplified fragment length polymorphism).
<b>CENSALUD</b>	Centro de Investigación y Desarrollo en Salud.
<b>dNTPs</b>	Desoxirribonucleótidos trifosfato.
<b>He</b>	Heterocigosidad esperada.
<b>Ho</b>	Heterocigosidad observada.
<b>mg</b>	Miligramos
<b>mM</b>	Milimoles
<b>ml</b>	Mililitros
<b>ng</b>	Nanogramos
<b>PCR</b>	Reacción en Cadena de la Polimerasa.
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PIC</b>	Índice de Contenido Polimórfico.
<b>RAPDs</b>	Amplificación aleatoria de ADN polimórfico (Random Amplification of Polymorphic DNA)
<b>RFLPs</b>	Fragmentos de Restricción de Longitud Polimórfica (Restriction Fragment Length Polymorphism)
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto.
<b>SDS</b>	Dodecilsulfato sódico
<b>SSR</b>	Secuencias Simples Repetidas.
<b>TBE</b>	Tris, borato y EDTA
<b>UPGMA</b>	Unweighted Pair Group Method using Arithmetic
<b>μl</b>	Microlitro
<b>μg</b>	Microgramo
<b>μM</b>	Micromoles

## GLOSARIO

- **Accesión:** unidad de conservación que comprende semillas o plantas, que se identifica con un código alfanumérico, y que lo distingue del resto en un banco de germoplasma.
- **ADN genómico:** ácido nucleico constituido por una secuencia particular y estable de nucleótidos, capaz de autorreplicarse y transmitir la información hereditaria de generación en generación.
- **Agarosa:** es un polisacárido formado por galactosas alfa y beta que se extrae de las algas de los géneros *Gellidium* y *Gracillaria*. Es soluble en agua a temperaturas superiores a los 65 °C, dependiendo del grado de sustituciones hidroxietílicas de sus cadenas laterales. Sustituciones las cuales, se pueden modificar para provocar que la temperatura de gelificación varíe entre los 17 y los 40 °C.
- **Alelo:** un alelo es cada una de las dos o más versiones de un gen. Un individuo hereda dos alelos para cada gen, uno del padre y el otro de la madre. Los alelos se encuentran en la misma posición dentro de los cromosomas homólogos. Si los dos alelos son idénticos, el individuo es homocigoto para este gen. En cambio, si los alelos son diferentes, el individuo es heterocigoto para este gen.
- **Alelo nulo:** alelo cuyo efecto molecular es la ausencia del producto génico normal o cuya consecuencia fenotípica es la desaparición de la función normal.
- **Algoritmo:** es una serie de pasos organizados que describe el proceso que se debe seguir, para dar solución a un problema específico.

- **Amplificación de ADN:** producción de réplicas o copias de un fragmento de ADN particular en la célula mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, en inglés).
- **Androceo:** conjunto de órganos masculinos de la flor, que son el conjunto de estambres, también llamados micrófilos.
- **Antocianina:** pigmentos hidrosolubles que se hallan en las vacuolas de las células vegetales y que otorgan el color rojo, púrpura o azul a las hojas, flores y frutos
- **Banco de germoplasma:** instalación dedicada a la conservación y gestión de los recursos fitogenéticos de un cultivo.
- **Banda heterocigota:** banda en la cual se presentan dos alelos con pesos moleculares diferentes.
- **Banda homocigota:** banda en la cual se presenta dos alelos, con pesos moleculares idénticos.
- **Biología Molecular:** parte de la biología que estudia los procesos vitales de los seres vivos en función de las características de su estructura molecular.
- **Buffer:** un tampón, buffer, solución amortiguadora o solución reguladora es una mezcla en concentraciones relativamente elevadas de un ácido y su base conjugada, es decir, sales hidrolíticamente activas. Tienen la propiedad de mantener estable el pH de una disolución frente a la adición de cantidades relativamente pequeñas de ácidos o bases fuertes.

- **Caracterización molecular:** detección de variantes en las secuencias de ADN, que no son afectados por el ambiente, cuando se comparan distintos fenotipos, poblaciones o especies.
- **Caracterización morfológica:** descripción mediante descriptores de los atributos morfológicos cualitativos (de muy alta heredabilidad), de un cultivar o especie.
- **Clustering:** procedimiento de agrupación de una serie de vectores de acuerdo con un criterio. Esos criterios son por lo general distancia o similitud.
- **Codominante:** es cuando ambos alelos contribuyen a formar el fenotipo en forma independiente y ninguno de ellos domina sobre el otro.
- **Cromosoma:** estructuras microscópicas que se encuentran presentes en todas las células del organismo. Contienen los genes que determinan todos los rasgos genéticos, como el color de los ojos y del cabello, y que controlan el crecimiento y el desarrollo de cada componente de nuestro sistema físico y bioquímico.
- **Cotiledón:** hoja primera que, sola o junto a otra u otras, se forma en el embrión de una planta fanerógama, modificada especialmente y que en algunos casos acumula sustancias de reserva.
- **Cultivar:** Conjunto de plantas cultivadas que se distinguen de otras por sus caracteres morfológicos, fisiológicos, genéticos u otros de carácter agronómico o económico y que al reproducirse (sexual o asexualmente), conservan sus caracteres distintivos. (Sinónimo: Variedad)
- **Descriptor morfológico:** características fenotípicas de fácil identificación visual tales como forma, color, tamaño o altura. Muchos de ellos se convierten en importantes, a la hora de inscribir nuevas variedades.

- **Diversidad genética:** es la variación hereditaria dentro y entre poblaciones de determinada especie o grupo de especies. La diversidad genética que tienen las especies les permite responder y adaptarse (o no) a las características ó cambios en su entorno. La diversidad genética se puede medir utilizando la diversidad de genes, la heterocigocidad, o el número de alelos por locus.
- **Electroforesis:** técnica para la separación de moléculas según la movilidad de éstas en un campo eléctrico.
- **Estaminodio:** estambre rudimentario, estéril o abortado. Esto significa que no produce polen.
- **Fenotipo:** conjunto de caracteres percibibles y diferenciables en un individuo como consecuencia de la expresión de sus genes.
- **Filotaxia:** disposición que presentan las hojas en el tallo. La disposición que presentan es característica de cada especie y tiene la función de que las hojas estén expuestas al sol con el mínimo de interferencias posibles por parte de sus compañeras.
- **Gen:** unidad estructural, funcional y de recombinación hereditaria. Secuencia de nucleótidos en el ADN que da lugar a la formación de sustancias proteicas y no proteicas.
- **Genética:** rama de la biología que se encarga de estudiar el mecanismo de la transmisión de los caracteres físicos, bioquímicos o de comportamiento de generación a generación. La genética estudia la manera en que los rasgos de individuos de una misma especie son transmitidos o heredados.

- **Genotipo:** acervo genético completo de un organismo. Comprende los factores hereditarios nucleares y extranucleares de sus células.
- **Heterocigoto:** individuo o población cuyo genotipo está constituido por dos alelos diferentes del mismo gen para un carácter hereditario específico.
- **Homocigoto:** individuo o población cuyo genotipo está constituido por dos alelos iguales del mismo gen (AA, ó aa), respecto a un carácter hereditario específico.
- **Identidad genética:** es el proceso por el cual las características de los individuos se transmiten a su descendencia, ya sean características fisiológicas, morfológicas o bioquímicas de los seres vivos bajo diferentes condiciones ambientales.
- **Lisis:** destrucción de la membrana celular y de la célula. Disolución de la membrana celular, por lo general mediante enzima hidrolítica que provoca la salida del contenido de la célula.
- **Loci:** es el plural de locus.
- **Locus:** posición fija sobre un cromosoma, como la posición de un gen o de un marcador genético. Una variante de la secuencia de ADN en un determinado locus se llama alelo.
- **Marcadores moleculares:** secuencia específica de nucleótidos que permite localizar un gen de interés con mayor exactitud, en ausencia del efecto ambiental en la expresión de esos genes.

- **Microsatélite:** regiones de secuencias cortas, de dos a diez pares de bases repetidas, arregladas en serie, las cuales se asume que son altamente variables y distribuidas aleatoriamente por todo el ADN.
- **Pedicelo:** estructura que une a la flor o al fruto con la rama que la sostiene o con otra estructura más compleja. También se le conoce como pedúnculo.
- **Peso molecular:** masa de una molécula de cualquier sustancia pura, cuyo valor es el de la suma de los átomos que la componen.
- **Polimorfismo:** variantes alélicas de un mismo gen cuyos fenotipos se expresan en forma diferentes.
- **“Primer”:** un cebador, iniciador o “*primer*” es una cadena de ácido nucleico o de una molécula relacionada que sirve como punto de partida para la replicación del ADN.
- **Pulvinos o Pulvínulos:** engrosamiento o ensanchamiento en forma de cojinete de la base de la hoja o del pecíolo de las hojas o folíolos de ciertas especies y que, por variaciones en la turgencia de sus tejidos, puede provocar cambios de posición o movimientos de las hojas.
- **Secuencia:** sucesión de letras representando la estructura primaria de una molécula real o hipotética de ADN o banda, con la capacidad de transportar información.
- **Sépalo:** pieza floral que forma el cáliz de una flor de una planta angiosperma.

- **Textura “cartácea”:** textura en la cual la hoja de una planta es lisa y suave al tacto similar al papel de escribir y que al arrugarla la misma debe volver a su forma original sin deformarse.
- **Verticilo foliar:** conjunto de tres o más hojas que brotan de un tallo en el mismo nudo aparente.

## RESUMEN

*Theobroma cacao L.* es la única especie del género *Theobroma* que se explota comercialmente en grandes extensiones, registrando en la actualidad una amplia distribución mundial. El cacao es un cultivo con un enorme potencial económico, ya que es el principal componente en la fabricación del chocolate. Los colonizadores europeos vieron el potencial financiero del cacao cuando descubrieron el nuevo mundo e inmediatamente iniciaron su expansión comercial.

En el presente estudio se caracterizaron 30 accesiones de *T. cacao L.* grupo germoplásmico criollo seleccionados en pequeños cultivos de cacao en El Salvador mediante marcadores moleculares microsatélites (SSR).

Se muestreó un total de 10 fincas, las cuales están ubicadas en los municipios de: San Julián e Izalco ambos en el Departamento de Sonsonate, Jujutla en el Departamento de Ahuachapán, San Miguel Tepezontes, San Juan Tepezontes y San Pedro Nonualco en el Departamento de La Paz, Tecapán en el Departamento de Usulután, Chinameca en el Departamento de San Miguel y Jocoaitique en el Departamento de Morazán.

En la fase de campo se realizó la selección de árboles en función del fenotipo criollo, se colectaron hojas de cada accesión, las cuales fueron procesadas para realizar la fase de laboratorio, la cual consistió en el secado y almacenamiento de las hojas para su posterior extracción de ADN, seguido de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) utilizando 12 marcadores moleculares microsatélites y observar los productos de PCR con la técnica de electroforesis en geles de agarosa al 3%.

Posteriormente se realizó el análisis de resultados, el cual consistió en la documentación mediante fotografías a cada uno de los geles de agarosa vistos en el Transiluminador de luz ultravioleta y se procedió a determinar la presencia, el número de bandas amplificadas de ADN para cada “*primer*” y los pesos moleculares de cada banda, utilizando un marcador de ADN. Se construyó una matriz de datos en Excel, en la cual se colocó el nombre de cada muestra, los nombres de cada uno de los “*primer*” y los valores obtenidos para cada alelo.

Los datos obtenidos se procesaron mediante el uso de tres programas: GenAlEx para calcular la diversidad genética de la población de cacao. Los parámetros de diversidad genética incluyeron la frecuencia de alelos, número de alelos, heterocigosis observada ( $H_o$ ) y heterocigosis esperada ( $H_e$ ). El Índice de contenido polimórfico (PIC) fue calculado por Info-Gen y se construyó un Dendograma UPGMA por medio del software PAST 3.

Como resultados se obtuvo que el contenido de ADN en la extracción varió desde 293.9  $\mu\text{g/ml}$  a 390.1  $\mu\text{g/ml}$ , adicionalmente se midió la pureza del ADN, la cual varió de 0.99 a 1.03 de pureza. La visualización de los productos amplificados en geles de agarosa se realizó mediante la migración en la electroforesis de 3 geles para cada accesión de *T. cacao L.* Posteriormente, se realizó el análisis de datos moleculares, el cual presentó como resultados que la frecuencia de alelos varió de 0.017 a 0.690 en cada uno de los marcadores. El número de alelos fue de 76 para los 12 locus estudiados, los valores promedios de heterocigosis observada fueron de 0.107 y para la heterocigosis esperada de 0.641 y el promedio del Índice de contenido polimórfico fue de 0.611.

En este estudio los marcadores mTcCIR1, mTcCIR6, mTcCIR9, mTcCIR11, mTcCIR12, mTcCIR15, mTcCIR17, mTcCIR18 y mTcCIR25 fueron los más informativos y polimórficos.

# 1. INTRODUCCIÓN

*Theobroma cacao L.* es el nombre científico del árbol del cacao, la palabra *Theobroma* significa en griego “alimento de los dioses”. Es originario de Suramérica, antes de su expansión y exportación mundial. Su domesticación fue en Centroamérica.

En El Salvador, la caracterización e identificación tradicional de las variedades de los cultivos se ha basado en el empleo de caracteres morfológicos y/o agronómicos, como tamaño y cantidad de semillas, precocidad de germinación, crecimiento, entre otros. Sin embargo, el uso de marcadores morfológicos en las plantas tiene muchas limitantes, pues su expresión genética puede estar sujeta a factores ambientales y con frecuencia sólo es posible evaluarlos a nivel de toda la planta, cuando esta llega a su estado adulto; en el caso del cacao, esto representa de 4 a 5 años.

Además de los marcadores morfológicos existe otro tipo de marcadores, los marcadores moleculares que superan las limitaciones de los marcadores morfológicos, los cuales pueden ser evaluados desde los primeros estados de desarrollo de las plántulas, y son independientes de la época del año en que se realiza el análisis.

En el presente estudio se caracterizaron 30 accesiones de *T. cacao L.* grupo germoplásmico criollo que fueron seleccionados en pequeños cultivos en El Salvador, mediante el uso de Microsatélites (SSR).

Se muestreo un total de 10 fincas, en las cuales se realizó la selección de árboles con fenotipo criollo, se colectaron hojas de cada accesión, para realizar la fase de laboratorio la cual consistió en la extracción de ADN, seguido de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) utilizando 12 marcadores moleculares microsatélites y observar los productos de PCR utilizando la técnica de electroforesis en geles de agarosa al 3%.

El análisis de resultados, se realizó en Excel y con tres programas: GenAlEx para calcular la diversidad genética de la población de cacao a partir de la frecuencia de alelos, número de alelos, heterocigosis observada ( $H_o$ ) y heterocigosis esperada ( $H_e$ ). El Índice de contenido polimórfico (PIC) fue calculado por Info-Gen y se construyó un Dendograma UPGMA con el software PAST 3.

Como resultados en el análisis de datos se obtuvo que la frecuencia de alelos varió de 0.017 a 0.690. El número de alelos fue de 76 para los 12 locus, los valores promedios de heterocigosis observada fueron de 0.107 y de heterocigosis esperada fueron de 0.641. El promedio del Índice de contenido polimórfico fue de 0.611. En el Dendograma UPGMA se determinaron 7 grupos definidos a partir de un valor fijo de 0.90, se mostró al grupo 6 con un valor de 90% de similitud a las características del valor de los alelos en las accesiones.

Los marcadores moleculares microsatélites que resultaron ser altamente informativos y polimórficos fueron: mTcCIR1, mTcCIR6, mTcCIR9, mTcCIR11, mTcCIR12, mTcCIR15, mTcCIR17, mTcCIR18 y mTcCIR25, mientras que los marcadores menos informativos y polimórficos fueron mTcCIR7 y mTcCIR8 debido a que presentaron valores promedio menores a 0.50.

Se espera que con esta investigación se pueda apoyar iniciativas de rescate, conservación y reactivación del cultivo de cacao en El Salvador, debido al interés económico del cacao se podrá conocer la genética de los cacaos que se tienen en fincas y garantizar al productor que la inversión que realiza tendrá rentabilidad.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GENERAL.

- Caracterizar la diversidad genética de 30 accesiones de *Theobroma cacao L.* en pequeños cultivos de cacao en El Salvador; usando marcadores moleculares microsatélites.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Analizar la diversidad genética de 30 accesiones de *T. cacao L.* grupo germoplásmico criollo mediante los siguientes parámetros de diversidad: Frecuencia de alelos, número de alelos, heterocigosis observada ( $H_o$ ), heterocigosis esperada ( $H_e$ ) y el Índice de contenido polimórfico (PIC).
- Identificar la identidad genética de 30 accesiones de *T. cacao L.* grupo germoplásmico criollo utilizando los polimorfismos de 12 pares de marcadores moleculares microsatélites (SSRs).
- Determinar el nivel de polimorfismo de los microsatélites utilizados, mediante amplificación de ADN utilizando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y análisis de fragmentos de electroforesis en geles de agarosa.

### 3. MARCO TEÓRICO

#### 3.1. ANTECEDENTES.

Ante la importancia que representa el cultivo de *Theobroma cacao L.* en Latinoamérica, se han realizado diversos estudios relacionados con la caracterización molecular de esa especie con el fin de mejorar las condiciones del cultivo.

Herrera García, (2012), realizó un trabajo de graduación titulado Caracterización molecular de 105 accesiones de cacao (*T. cacao L.*) utilizando 10 marcadores moleculares tipo SSR en INTA-CNIAB, Nicaragua. Colectó materiales de cacao para caracterizarlos a nivel molecular y establecerlos para su conservación en el banco nacional de Germoplasma de cacao. Seleccionó materiales tipo élite (sanos y altamente productivos, buena adaptabilidad a la zona, árboles robustos). Como Resultados identificaron 183 alelos para todos los locus estudiados, con un promedio de 18.3 alelos por locus en las 105 accesiones evaluadas. El cebador MTcCIR12 detectó 35 alelos, siendo este el más polimórfico y el que logró obtener el mayor número de muestras con ADN amplificado. De acuerdo a los resultados, llegó a la conclusión que se encontraron materiales criollos que están estrechamente relacionados con los utilizados como criollos referencias; pero la mayoría de los materiales en este estudio resultaron ser de los otros grupos genéticos (trinitarios o forasteros).

En El Salvador, Castañeda de Ábrego et al. (2011), realizaron un estudio sobre caracterización genética de los tipos de cacao establecidos en el cultivar “Cooperativa Hacienda La Carrera” Usulután, El Salvador. En este estudio se utilizaron los marcadores de ADN conocidos como Microsatélites o Secuencias Simples Repetidas (SSR). En el diagnóstico se utilizaron diez marcadores SSR. Se recolectaron hojas, pertenecientes a diferentes árboles. Como resultado obtuvieron que la ventaja de los SSRs a diferencia de otros marcadores moleculares como RAPDs y AFLPs, es que son codominantes, debido a que es posible visualizar por separado el aporte de ambos

padres. Los marcadores moleculares SSR, permitieron conocer de forma clara el estado homocigótico o heterocigótico en que se encontraban y regiones específicas dentro de los cromosomas del cacao.

Londoño Murillo et al. (2011), realizaron un estudio sobre Caracterización Molecular de clones de *T. cacao* L., por medio de Marcadores Moleculares Microsatélites. En este estudio evaluaron 12 clones de cacao por medio de marcadores moleculares utilizando 10 secuencias Microsatélites (SSRs), como un estudio piloto antes de un ensayo a mayor escala. Los datos se procesaron mediante el programa Power Marker Versión 3.25. Se estimaron las frecuencias alélicas y luego se generó una matriz de distancias genéticas basada en el coeficiente de Nei & Li's. Utilizando el algoritmo de agrupamiento UPGMA se generó el dendograma correspondiente. El análisis de diversidad mostró un índice de diversidad genética total de 0,6944 considerado intermedio para los materiales evaluados. La estimación de la heterocigosidad promedio fue de 0,58579 y de promedio del contenido de información polimórfica de 0,6523. En este estudio los marcadores mTcCIR6, mTcCIR25, mTcCIR26 y mTcCIR12 fueron los más informativos y polimórficos. También se recomendó relacionar los resultados de diversidad genética con caracteres morfo-agronómicos y de patogenicidad en los distintos clones de cacao a fin de consolidar estrategias eficaces de mejoramiento y control de enfermedades.

Motamayor et al. (2002), realizaron el estudio Cacao Domestication I: the Origin of the cacao Cultivated by the Mayas. En el cual mencionan que el cacao Criollo fue cultivado por los Mayas hace más de 1,500 años, y sugiere que el cacao Criollo se originó en América Central, el cual ha evolucionado de forma independiente a partir de las poblaciones de cacao en la Cuenca del Amazonas. Para obtener una mayor comprensión acerca del origen y la base genética del cacao Criollo en América Central, se realizaron análisis con Microsatélites y RFLP, estos se llevaron a cabo en una muestra, evitando la mezcla de individuos criollos puros con individuos clasificados como Criollos, pero que podrían haber sido introgresión con genes de cacao Forastero. Como resultado se encontraron dos tipos de cacao como Criollo Antiguo y Moderno.

En contraste con estudios anteriores, se encontró que los individuos Criollos antiguos anteriormente clasificados como "salvajes", formaban un grupo estrechamente relacionado con individuos criollos antiguos de América del Sur. También se encontró que los árboles de cacao Criollos Antiguos, eran más cercanos a los cacaos forasteros Colombo-ecuatorianos. Los análisis con Microsatélites y RFLP revelaron un alto nivel de homocigosis y la diversidad genética significativamente baja en el grupo de cacao Criollo Antiguo. Los resultados sugieren que los individuos de cacao Criollo Antiguo representan al grupo criollo original. Los resultados también implican que este grupo no representa una subespecie separada, y que probablemente se originó a partir de unos pocos individuos en América del Sur que se haya extendido por el hombre en América Central.

Vázquez Ovando et al. (2012), realizaron un estudio sobre Potencial de los Marcadores Moleculares para el Rescate de Individuos de *T. cacao L.* de Alta Calidad en México. En el cual explican que originalmente, los programas para obtener variedades "mejoradas" estaban basados en marcadores morfológicos los cuales, poco a poco, se han sustituido cada vez más por marcadores moleculares. También discuten que las principales aplicaciones de las herramientas de la biología molecular en la obtención de mapas de ligamiento de este importante cultivo, *loci* de caracteres cuantitativos están implicados en el mayor rendimiento agronómico y resistencia a enfermedades, así como en la secuenciación del genoma cuya reciente publicación apertura una importante oportunidad de trabajo dirigido. También se hace énfasis en la falta de información y de investigación en el uso de estas herramientas para la búsqueda de marcadores asociados de manera directa con las características de calidad sensorial de las almendras de cacao, siendo ésta una de las razones principales que incentivaron su visionaria domesticación hace unos 4,000 años y su amplia distribución alrededor del mundo hace unos 500 años. Da como resultado que conocer a los individuos que muestran estas características resulta importante, ya que su posible extinción por cuestiones sociales o enfermedades, conllevaría a la pérdida de información científica y tecnológica valiosa que puede ser empleada con fines de conservación y explotación.

Martínez, (2007), en su estudio de Posgrado titulado Caracterización Morfológica y Molecular del Cacao Nacional Boliviano y de selecciones élites del Alto Beni, Bolivia, se analizó la variabilidad morfológica y genética del Cacao Nacional Boliviano, silvestre y cultivado. Se evaluaron 164 genotipos de cacao Nacional Boliviano con diferente nivel de domesticación (57 silvestres, 107 cultivados) y 61 selecciones élites de fincas de productores de la cooperativa El Ceibo en Bolivia. Se midieron in-situ 13 variables de fruto y semilla; se hicieron análisis univariados (ANOVA), y multivariados (componentes principales, conglomerados, discriminante canónico), para identificar las variables que más discriminaban entre grupos y lugares de colecta. También se analizó la calidad de 12 muestras de cacao de genotipos silvestres y cultivados. Se utilizaron 14 “*primers*” para el análisis molecular y se determinó la relación morfológica y molecular con la prueba de consenso. Como resultados se obtuvo que la variabilidad genética del cacao silvestre es baja, las características relevantes son diámetro de la semilla, formas cundeamor y angoleta, ápice obtuso, constricción basal 49% ausente, la rugosidad del mesocarpo 63% intermedia, color de semilla 100% púrpura. El estudio de Microsatélites, ubicó al cacao Nacional Boliviano silvestre en un grupo diferente al Forastero y Trinitario. Todos los “*primers*” resultaron ser polimórficos 100%, los “*primers*” informativos fueron: CIR1, CIR24, CIR7, y CIR18. Se concluyó que el cacao Boliviano silvestre es diferente de los complejos genéticos conocidos.

Quiroz Vera, (2002), en el estudio de Tesis realizado de nombre Caracterización Molecular y Morfológica de Genotipos superiores con Características de Cacao Nacional (*T. cacao L.*) de Ecuador, caracterizó molecularmente 63 genotipos de cacao Nacional y de otros orígenes, además se incluyó dentro de este estudio tres genotipos de referencia de los tipos genéticos Trinitario, Forastero Amazónico y el criollo. Para la caracterización molecular se utilizó la técnica de marcadores moleculares AFLP con siete combinaciones “enzima-*primers*”. Se pudo observar un alto grado de polimorfismo para las siete combinaciones de “*primers*”, reveladas por el método de tinción no radiactivo utilizando nitrato de plata (AgNo<sub>3</sub>). Con la información obtenida del análisis molecular se calculó la matriz de similaridad usando el coeficiente de Nei

& Li's, el cual demostró que la distancia genética presente en los 63 clones de cacao tipo nacional y de otros orígenes es muy amplia cuyo rango es de 0,832 para los clones más similares genéticamente y de 0,225 para los más diferentes. También se elaboró un dendograma UPGMA, para los 63 clones de cacao, el cual demostró la no conformación de grupos genéticos específicos, pero sí separados por su origen y su constitución genética.

Santos et al. (2012), realizaron un estudio llamado New Polymorphic Microsatellite loci for *T. cacao*: Isolation and Characterization of Microsatellites from Enriched Genomic Libraries realizado en Brasil. En el cual explican que diecisiete marcadores de tipo Microsatélites polimórficos fueron aislados de bibliotecas genómicas enriquecidas de *T. cacao L.*, ya que esto proporciona herramientas adicionales para el estudio de la diversidad genética y el mapa de saturación de esta especie. Estos marcadores se caracterizaron en 32 accesiones de la colección de germoplasma de *T. cacao L.* del Centro de Pesquisas do Cacau en Brasil. Como resultado se obtuvo que el número de alelos en cada locus varió de 2 a 8, con un promedio de 4,41 alelos por locus. El contenido de información de polimorfismo varió desde 0,060 hasta 0,695, con un promedio de 0.333. También explica que los marcadores caracterizados en este estudio se emplearán en los estudios de mapa de saturación y evaluaciones de diversidad de genotipos de cacao.

Aranzazu Hernández et al. (2009), realizaron un estudio referente al Mejoramiento Genético para incrementar la Producción y Productividad del Sistema de cacao en Colombia. Hacen un recuento histórico acerca del manejo que Colombia ha dado al recurso genético de *T. cacao*. La modernización del sistema de producción de cacao, junto a las excelentes perspectivas de los mercados mundiales motivó al gobierno y a las instituciones a realizar y financiar proyectos de investigación en alianzas estratégicas. Para el efecto de este estudio se conformó la Unión Temporal Cacao de Colombia, entre Fedecacao y Corpoica, quienes en un primer proyecto seleccionaron y caracterizaron 38 materiales regionales de excelente comportamiento en fincas de agricultores, de una población de 144 árboles evaluados.

También en el mismo estudio se realizó la Caracterización Molecular de Colecciones de *T. cacao L.* en Colombia. El objetivo de esta caracterización molecular de materiales dentro de la Unión Temporal Cacao de Colombia, consistió en ampliar el conocimiento de la colección colombiana, haciendo énfasis en materiales regionales ya seleccionados. Se evaluaron 23 Microsatélites (SSR), en una muestra de 52 genotipos: 42 regionales y 10 introducidos. Se identificaron 88 alelos en total, con un porcentaje de amplificación del 100%, y un número promedio de alelos por locus de 3.8. Posteriormente la población en estudio se agrupó en un dendograma UPGMA con índices de similaridad genética inferiores al 0.1 (10%). En el dendograma se pudieron observar dos grupos genéticos muy distantes.

Sin embargo, hasta el momento se desconocen estudios referentes a la Caracterización Molecular de *T. cacao L.* mediante marcadores moleculares microsatélites en El Salvador, por lo que se consideró de vital importancia la realización de este estudio, con el fin de obtener información en lo referente a la Genética de las poblaciones de cacao presentes en El Salvador.

## 3.2. FUNDAMENTO TEÓRICO

### 3.2.1. ASPECTOS GENERALES SOBRE *Theobroma cacao* L.

#### 3.2.1.1. Clasificación Taxonómica:

Reino: Plantae

Subreino: Tracheobionta

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Dilleniidae

Orden: Malvales

Familia: Sterculiaceae

Subfamilia: Byttnerioideae

Tribu: Theobromeae

Género: *Theobroma*

Especie: *T. cacao*



Figura 1. Árbol y fruto del cacao (Mcenery, 2013).

*T. cacao* L. es el nombre científico que recibe el árbol de cacao, perteneciente a la familia Sterculiaceae, del Orden Malvales. El género *Theobroma* está comprendido por 22 especies, siendo todas originarias de bosques húmedos tropicales (Chanatásig Vaca, 2004) (Martínez, 2007) (Figura 1).

#### 3.2.1.2. Morfología.

*T. cacao* L. es un árbol semicaducifolio que normalmente puede alcanzar una altura entre los 4 y 8 metros de altura según el tipo al que pertenezca (Reyes y Capriles de Reyes, 2000) (Dostert et al, 2011).

Los factores ambientales influyen grandemente en el crecimiento y la altura de este árbol, cuando es cultivado con mucha luminosidad su tamaño es más reducido que cuando es cultivado con exceso de sombra (Batista, 2009).

#### 3.2.1.3. Sistema Radicular.

El cacao posee una raíz principal pivotante; la forma y el desarrollo de las raíces dependerá principalmente de varios factores: textura, estructura, consistencia del suelo y modo de reproducción. Cuando el suelo es profundo y bien aireado la raíz puede llegar a crecer hasta 2 m de profundidad, en suelos pedregosos el crecimiento de la raíz puede llegar a ser tortuoso. En suelos granulosos y de textura arcillosa la raíz puede llegar a crecer de forma derecha (Batista, 2009).

#### 3.2.1.4. Tronco.

Después de que aparecen las primeras hojas, se inicia el crecimiento del tallo y comienzan a desarrollarse las hojas que se distribuyen en una filotaxia de 3/8 a 5/13, durante el primer año de desarrollo. Dependiendo del tipo de cacao, cuando el tallo alcanza un metro de altura, aparece el verticilo foliar, que está compuesto por tres, cuatro o cinco ramas, formando una corona que crece subhorizontalmente durante los primeros 24 meses. A lo largo de todo el crecimiento de la planta se presentan brotaciones foliares sucesivas en las ramas con periodos de reposo, estas brotaciones se disponen en una filotaxia de  $\frac{1}{2}$ , en un número cercano a seis hojas. El tiempo de que se den estas brotaciones dependerá de dos factores: la temperatura del aire y de la disponibilidad de agua en el suelo. En el tronco se observa el desarrollo de brotes ortotrópicos llamados chupones, para que la planta tenga una conformación adecuada y evitar que pueda perder su equilibrio natural y volcarse, el crecimiento de los chupones debe regularse mediante la poda (Reyes y Capriles de Reyes, 2000).

#### 3.2.1.5. Hoja.

La coloración de las hojas puede variar desde muy pigmentadas hasta con poca pigmentación. De acuerdo al grupo de cacao la coloración de las hojas puede variar, los grupos de cacao Criollo y Trinitario tienen pigmentaciones más coloreadas en sus hojas que los del grupo Forastero, en este grupo la coloración de las hojas es muy poca. En todos los grupos de cacao las hojas adultas son completamente verdes, de lámina simple, entera, su forma va desde lanceolada a casi ovalada, poseen margen entero, nervadura pinnada y se observan ambas superficies glabras. El nervio central

de la hoja es prominente y su ápice es agudo. El pecíolo, en las hojas del tronco son más largos que los de las ramas. Dependiendo de las características genéticas y de la posición en el árbol, el tamaño de las hojas puede variar. Las hojas que están expuestas directamente a la luz solar son más pequeñas que las que están ubicadas en el interior del árbol a la sombra. Las hojas adultas del cacao Criollo son más grandes que las del cacao Forastero (Batista, 2009).

#### 3.2.1.6. Flor.

El árbol de cacao produce sus flores sobre la corteza vieja del tronco o de las ramas principales, la floración se inicia a partir de los dos años. La época de floración depende de condiciones climáticas como la temperatura, ya que al presentarse una temperatura media elevada y lluvias abundantes le resultan favorables para las épocas de floración (Reyes y Capriles de Reyes, 2000).

Las inflorescencias se desarrollan sobre los cojinetes, los cuales pueden albergar muchas flores al mismo tiempo. La flor está asentada sobre un pedicelo de 1 a 3 mm, es de talla pequeña y del tipo pentámera. Los cinco sépalos, soldados en su base, son blancos o rosados; los cinco pétalos, alternos con los sépalos, son estrechos en la base, luego se ensanchan y se hacen cóncavos para formar un pequeño capuchón de color blanco llamado “cogulla”. Esta estructura está bordeada interiormente por dos nervios color violeta y su abertura está orientada hacia el eje de la flor; en su parte superior se estrecha y se prolonga en una lígula que la enlaza con el limbo del pétalo, es de color amarillento y completamente orientado hacia el exterior de la flor (Reyes y Capriles de Reyes, 2000).

El ovario es súpero y comprende cinco cavidades que contienen, cada una, de cinco a quince óvulos dispuestos alrededor del eje central del ovario. El estilo es tubular, dividido en cinco estigmas (Reyes y Capriles de Reyes, 2000).

El androceo está compuesto por cinco estambres que alternan con cinco estaminodios estériles. Estambres y estaminodios están soldados por su base para formar un tubo corto, los estaminodios son de color pardo violáceo, erguidos y rodean

el estilo. Los estambres están curvados hacia el exterior, directamente hacia los pétalos a los cuales están opuestos. Las anteras se encuentran alojadas en el interior de las “cogullas” de los pétalos correspondientes, cada una está compuesta por cuatro sacos polínicos. Esta configuración de las piezas florales y la viscosidad del polen hacen muy difícil la polinización por la acción del viento, siendo mayoritariamente entomófila (Reyes y Capriles de Reyes, 2000).

Una vez polinizada la flor por la acción de la fauna insectil, en un máximo de 24 horas, los tubos polínicos germinan a partir de los granos de polen y penetran en el estilo, alargándose hasta alcanzar el saco embrional del óvulo, llegando a los óvulos de la flor y desencadenando el desarrollo de las semillas y del fruto. En algunos casos, las flores polinizadas se caen, debido a una falta de fecundación, causada por un fenómeno conocido como incompatibilidad, el cual parece ser exclusivo del cacao y ocurre en el momento en que los gametos se ponen en contacto con el saco embrionario, impidiendo la fusión de ambos (Reyes y Capriles de Reyes, 2000).

#### 3.2.1.7. Fruto.

El fruto del cacao es una drupa comúnmente conocida como mazorca. El tamaño y la forma de los frutos pueden variar dependiendo de las características genéticas, el medio ambiente en donde crezca y en donde se desarrolle el árbol. El color de los frutos puede variar con muchas tonalidades, pero los colores básicos para los frutos de cacao son el verde y el rojo. El color verde es específico del cacao Forastero, mientras que los de color rojo y verde están presentes en los tipo Criollo y Trinitario. La superficie de los frutos de cacao también puede variar, y van desde las texturas lisas hasta fuertemente rugosas, algunos pueden presentar surcos superficiales o profundos y lomos individuales o pareados (Batista, 2009).

En los frutos jóvenes se pueden observar cinco compartimientos rellenos de granos, repartidos regularmente, que al madurar, las paredes de esos compartimientos desaparecen quedando una cavidad única repleta de granos rodeados de una pulpa mucilaginoso espesa (Reyes y Capriles de Reyes, 2000).

#### 3.2.1.8. Semilla.

Están cubiertas por una pulpa mucilaginosa de color blanco y de sabor agradable, en cuyo interior se encuentran los cotiledones; a la pulpa mucilaginosa le sigue en su interior una envoltura delgada pero resistente, de color rosado, denominada cascarilla, que proviene del desarrollo de los tegumentos del óvulo. Los cotiledones ocupan todo el interior del tegumento, y sus colores oscilan desde el blanco hasta el morado intenso, pasando por todos los matices intermedios. La semilla está cubierta por una pulpa mucilaginosa de color blanco (Reyes y Capriles de Reyes, 2000).

Características de las semillas:

1. La longitud puede variar de 15 a 30 mm, el ancho de 8 a 20 mm y el espesor entre 5 y 15 mm.
2. El peso es quizás el más importante de los caracteres, ya que los cotiledones constituyen la materia prima fundamental para la industria chocolatera y confitera, varía de acuerdo con el tipo y/o clon.
3. El color de los cotiledones frescos va desde el color blanco en los Criollos hasta el morado intenso en los Forasteros amazónicos (Reyes y Capriles de Reyes, 2000).

#### 3.2.2. ORIGEN, DOMESTICACIÓN Y DISPERSIÓN.

*T. cacao* L., es una especie propia de América del Sur, su centro de origen está localizado en la región que comprende entre las cuencas de los ríos Caquetá y Putumayo en Colombia y río Napo que recorre buena parte de los territorios amazónicos de Ecuador y de Perú, que desembocan en el río Amazonas (M & O Consulting S.A.C, 2008) (Figura 2).

El centro primario de diversidad del cacao se encuentra en la región nororiental de Perú, sin embargo, existe una gran diversidad de poblaciones silvestres y nativas que están dispersas en la región central y sur de la Amazonia alta, esto apoyaría la

hipótesis de que el centro de origen estaría confinado a dicha región, pero además incluiría la región centro y suroriental del Perú (M & O Consulting S.A.C, 2008).

Después que México fuera conquistado por los españoles, las variedades de cacao 'Criollo' de América Central, fueron introducidos primero en la región del Caribe y Venezuela y después a las Filipinas, Indonesia, India y Madagascar (M & O Consulting S.A.C, 2008). (Figura 3).

El cultivo de los Forasteros del Bajo Amazonas, particularmente del cacao "amelonado" empezó en Brasil en el siglo XVIII. En 1822, el cacao "amelonado" fue introducido a África, Santo Tomás y después a Ghana, Nigeria y Costa de Marfil. En Ecuador, un tipo local de cacao denominado 'Nacional', se empezó a cultivar a comienzos del siglo XIX. Los híbridos entre 'Criollo' y 'Forastero', denominados 'Trinitarios', aparecieron en Trinidad alrededor del año 1800 (M & O Consulting S.A.C, 2008) (Figura 3).



Figura 2. Centro de origen del cacao (M & O Consulting S.A.C, 2008).

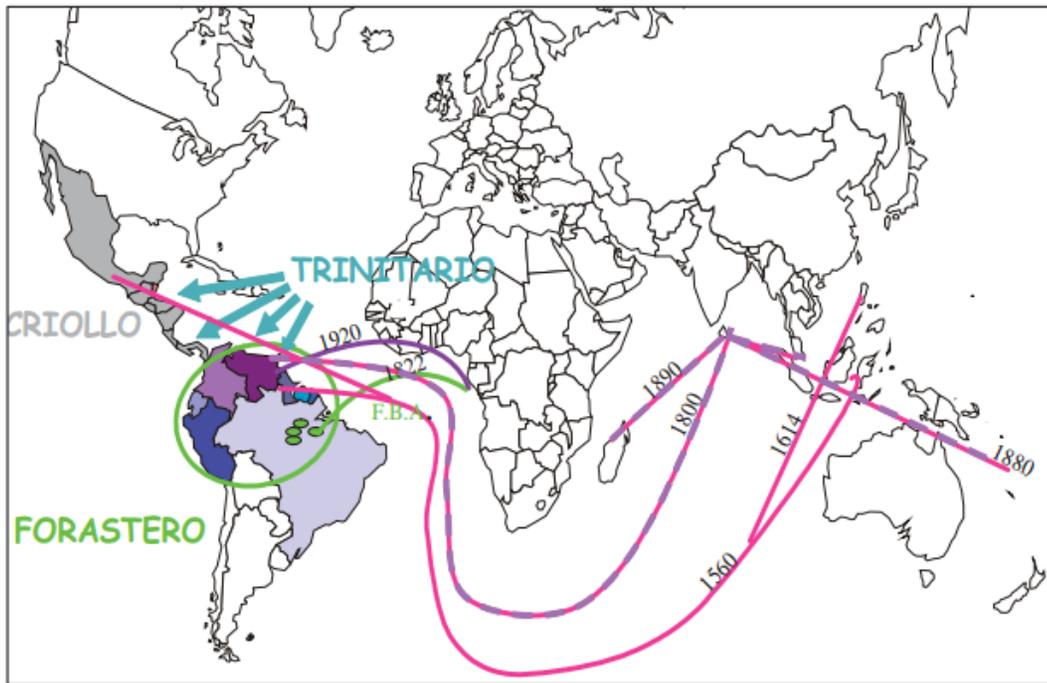


Figura 3. Dispersión de grupos germoplásmicos de cacao (M & O Consulting S.A.C, 2008).

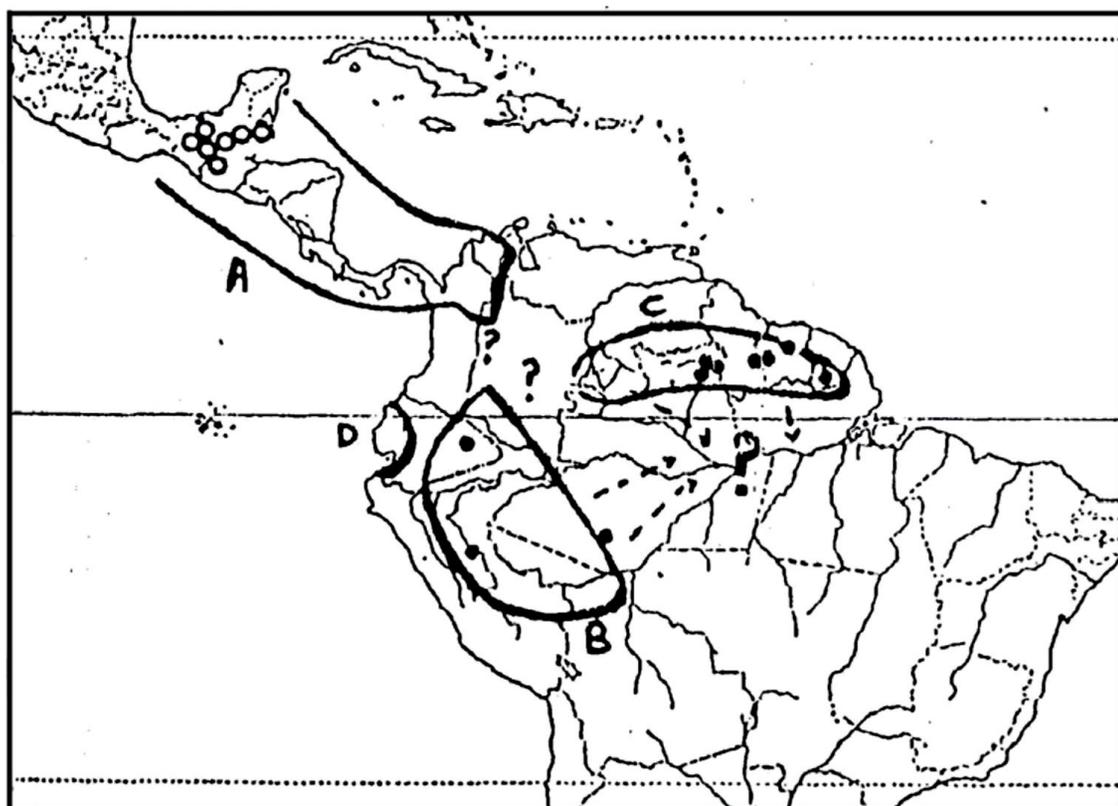
### 3.2.2.1. Complejos o grupos germoplásmicos.

Mediante estudios moleculares y argumentos paleoclimáticos, paleogeográficos y etnobotánicos, se elaboró una propuesta de clasificación de grupos de cacao, estableciendo cuatro grupos o complejos germoplásmicos naturales: 1) Criollo, 2) Amazonas o Forastero del Alto Amazonas, 3) Guyanas o Forastero del Bajo Amazonas y 4) Nacional; así como, su distribución geográfica (Tabla 1 y Figura 4) (M & O Consulting S.A.C, 2008).

Un quinto grupo, el 'Trinitario', resultó ser una población segregante que se originó de una cruce entre una variedad amelonada de la Guyanas ('Forastero del Bajo Amazonas') y una variedad de 'Criollo' de Venezuela. Los Trinitarios fueron diseminados en numerosos países e introducidos alrededor del año 1850 a África occidental donde fueron cruzados con los "amelonados" que años antes habían sido introducidos de Brasil (M & O Consulting S.A.C, 2008).

Tabla 1. Complejos germoplásmicos naturales de cacao (M & O Consulting S.A.C, 2008).

GRUPO DE CACAO	DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA
1. Criollo.	América Central, Colombia y Venezuela.
2. Amazonas o Forastero del Alto Amazonas.	Perú, Ecuador, Colombia, Bolivia y Brasil.
3. Guyanas o Forastero del Bajo Amazonas.	Guyanas, Venezuela, Surinam, Guyana Francesa y Brasil.
4. Nacional.	Ecuador (zona costera).



A) Criollo; B) Amazonas o Forasteros del Alto Amazonas;  
C) Guyanas o Forasteros del Bajo Amazonas; D) Nacional.

Figura 4. Grupos germoplásmicos naturales de cacao (M & O Consulting S.A.C, 2008).

#### Criollos.

Los cacaos criollos se distribuyen desde México hasta Colombia y Venezuela. Son árboles poco vigorosos, de lento crecimiento, más susceptibles a enfermedades

e insectos que los 'Forasteros' y se caracterizan por su alta diversidad morfológica. El fruto, es de forma variable (alargados, amelonados y cundeamor), con ápice acuminado y de superficie lisa o rugosa. Las mazorcas son rojas o verde al estado inmaduro y tienen un pericarpio ligeramente lignificado. Las almendras son generalmente grandes y gruesas, con cotiledones blancos o rosados y tienen mejor calidad de chocolate que los 'Forasteros' (Figura 5) (M & O Consulting S.A.C, 2008).



Figura 5. Cacao Criollo (M & O Consulting S.A.C, 2008).

Forasteros del Alto Amazonas.

Son árboles vigorosos con frutos verdes y de forma variable; pueden existir mazorcas con mayor rugosidad y constricción basal acentuada. Las almendras son generalmente pequeñas y con ciertas excepciones grandes; de sección transversal aplanada y cotiledones morado o violeta. Generalmente, producen un chocolate de calidad corriente o básica (Figura 6) (M & O Consulting S.A.C, 2008).

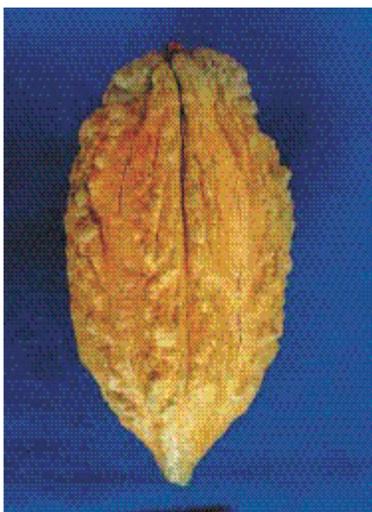


Figura 6. Cacao Forasteros del Alto Amazonas (M & O Consulting S.A.C, 2008).

#### Forasteros del Bajo Amazonas.

Las mazorcas generalmente son de menor tamaño, ligeramente rugosas y de forma amelonada, comparado con los 'Criollos'-tipo "cundeamor", existe la forma calabacillo cuyas mazorcas son pequeñas, redondeadas y de superficie lisa. Las almendras son generalmente pequeñas e intermedias; el color del cotiledón es morado, tiene como característica un sabor afrutado, amargo y astringente (Figura 7) (M & O Consulting S.A.C, 2008).



Figura 7. Cacao Forasteros del Bajo Amazonas (M & O Consulting S.A.C, 2008).

Nacional.

Es el único grupo natural de cacao que se cultiva en el occidente de Ecuador. Se cree que se originó en la región oriental de la amazonía alta del Ecuador. Por su calidad fina de la almendra éste grupo está más relacionado al grupo 'Criollo' que al grupo 'Forastero'. Los árboles son altos, producen mazorcas grandes semejantes a los "amelonados", pero con surcos más profundos; las almendras son grandes y de color morado pálido u oscuro o marrón. Las semillas fermentan en 4-5 días y tienen un intenso aroma floral (Figura 8) (M & O Consulting S.A.C, 2008).



Figura 8. Cacao Nacional (M & O Consulting S.A.C, 2008).

Trinitarios.

Son árboles que nunca se han encontrado en estado silvestre y que generalmente poseen características intermedias entre los 'Criollos' y 'Forasteros'. Los 'Trinitarios' vigorosos fueron diseminados en los países de América Latina y el Caribe e introducidos alrededor de 1850 en África occidental donde fueron cruzados con el "amelonado" que fue introducido más antes. En el comercio es conocido como "cacao fino de aroma" y su sabor puede deberse en parte a su herencia criolla ya que combinan el sabor del cacao criollo con la rusticidad del Forastero, produciendo cacao de mucha demanda por su aplicación en los chocolates de alto grado de sabor afrutado y marcado amargor (Figura 9) (M & O Consulting S.A.C, 2008).



Figura 9. Frutos de cacao del grupo Trinitario (M & O Consulting S.A.C, 2008).

### 3.2.3. IDENTIFICACIÓN DE ACCESIONES DE CACAO.

La identificación de las distintas accesiones de cacao ha sido alcanzada usando distintos tipos de metodologías, especialmente a través de la descripción de características taxonómicas así como de técnicas moleculares. Distintos tipos de marcadores moleculares como los Fragmentos de Restricción de Longitud Polimórfica (RFLP por sus siglas en inglés) o como los Fragmentos de Amplificación de Longitud Polimórfica (AFLP) han sido ampliamente utilizados para caracterizar varias colecciones de germoplasma, ya que permiten determinar accesiones duplicadas o errores en el etiquetado entre las plantas de cacao de una forma rápida y precisa. Sin embargo, desde el desarrollo de los marcadores microsatélites o secuencias simples repetidas (SSRs), el uso de los RFLPs y AFLPs ha disminuido (Romero et al. 2010).

### 3.2.4. MARCADORES MOLECULARES.

Los marcadores moleculares son secuencias identificables de ADN que se encuentran en determinados lugares del genoma y que están relacionadas con la herencia de una característica o de un gen vinculado a ésta. Éstos tienen herencia mendeliana y no son afectados por el ambiente. Son observables sin importar el estado

de desarrollo del individuo ni el tejido analizado, ya que la información genética está presente en todas las células (Romero et al. 2010).

Los microsatélites son secuencias de ADN, cuya unidad de repetición varía de 1 a 7 pares de bases (pb), se distribuyen de forma dispersa a lo largo de todos los cromosomas de los organismos eucariontes y procariontes. Son altamente polimórficos, multi-alélicos, codominantes y fáciles de amplificar por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés). Estas secuencias muestran altos niveles de variación genética según las diferencias que se produzcan en las unidades repetidas en tándem de un locus (Romero et al. 2010).

Estos marcadores permiten visualizar diferencias tangibles entre las secuencias homólogas del ADN de los organismos. Esas diferencias resultan de cambios o rearrreglos entre los pares de bases que conforman este tipo de molécula, tales como: translocaciones, inversiones, recombinación desigual, inserciones o deleciones en regiones homólogas. Tales diferencias pueden ser detectadas en geles de poliacrilamida, donde migran diferentes distancias de acuerdo a su tamaño (Romero et al. 2010).

Los marcadores moleculares han sido ampliamente usados para evaluar accesiones duplicadas o mal etiquetadas en los distintos bancos de germoplasma alrededor del mundo. A diferencia de los métodos de identificación, que usan marcadores moleculares dominantes, como los RAPD, RFLP, o AFLP, los métodos de identificación molecular que se basan en el uso de microsatélites son significativamente más precisos debido a que la identificación de la identidad genética de las accesiones se basa en el análisis del perfil genético de muchos loci que permiten la identificación de heterocigotos y homocigotos (Romero et al. 2010).

### 3.2.5. ANÁLISIS DE DATOS MOLECULARES

#### 3.2.5.1. Análisis de Diversidad Genética.

La diversidad genética es de fundamental importancia en la continuidad de una especie, ya que proporciona la adaptación necesaria ante las condiciones prevalentes en el ambiente, tanto de tipo biótico como abiótico y además, permite el cambio en la composición genética para hacer frente a los cambios que se generen en ese hábitat. El primer estudio necesario para la supervivencia de una especie es el conocimiento del nivel de diversidad genética, esto se refiere a la determinación de la frecuencia de alelos, número de alelos, heterocigosis observada ( $H_o$ ), heterocigosis esperada ( $H_e$ ) y el índice de contenido polimórfico (PIC) (Ruiz, 2014).

Frecuencia de alelos.

Es la proporción de una forma alélica de un gen entre todas las copias de un gen en la población. Se establece dividiendo el número de veces que se presenta una forma alélica de un gen entre el número total de alelos de ese gen en la población (Rosero, 2013).

Número de alelos.

Es el número de alelos generados por locus. Esta medida depende mucho del número de individuos analizados, además de ser parámetro molecular se usa para determinar el número medio de alelos presentados por cada locus en la población y aportar una idea de la heterogeneidad de la muestra (Martínez, 2015).

Heterocigosidad observada ( $H_o$ ).

La heterocigosidad observada para un locus se define como el número de individuos heterocigóticos observados respecto al total analizado, ya que si la frecuencia de un alelo es muy alta, existirá poca heterocigosis (Rosero, 2013).

Se estima mediante:

$$\hat{D}_l = 1 - \sum_{u=1}^k \tilde{P}_{lu}^2$$

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.

Heterocigosidad esperada (He).

Es la probabilidad de que dos alelos seleccionados al azar de la población sean diferentes, se calcula a partir de las frecuencias alélicas conocidas, suponiendo que la población está en equilibrio de Hardy-Weinberg (Rosero, 2013).

Se estima mediante:

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

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.

Índice de contenido polimórfico (PIC).

Medida de diversidad estrechamente relacionada, es la medida de la información de un marcador genético, que depende del número de alelos para ese locus y de sus frecuencias relativas. El Índice de contenido polimórfico (PIC) es similar al valor de heterocigosidad y oscila entre 0 y 1 (Rosero, 2013).

Para calcularlo es posible hacerlo mediante el uso de la siguiente formula:

$$\text{PIC} = 1 - \left( \sum_{i=1}^k x_i^2 \right) - \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i+1}^k 2x_i^2 x_j^2$$

Donde  $k$  es el número de alelos y  $x_i, x_j$  son las frecuencias de los alelos  $i$  y  $j$ .

Los parámetros anteriores se pueden obtener empleando programas estadísticos para análisis genéticos importando los datos obtenidos de la investigación desde una matriz de Excel (Rosero, 2013).

#### Análisis de Agrupamiento.

Los métodos algorítmicos o de agrupamiento (clustering) siguen una serie dada de pasos o reglas computacionales previamente definidas (algoritmo) para reconstruir un árbol. Entre los métodos más utilizados está el UPGMA (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic) que está basado en una matriz de distancia (Rosero, 2013).

## 4. HIPÓTESIS

### **Hipótesis Objetivo específico 1:**

Hi: Los parámetros de diversidad: Frecuencia de alelos, número de alelos, heterocigosis observada ( $H_o$ ), heterocigosis esperada ( $H_e$ ) y el Índice de contenido polimórfico (PIC), pueden determinar la diversidad genética de las 30 accesiones de *T. cacao L.* grupo germoplásmico criollo.

Ho: Los parámetros de diversidad: Frecuencia de alelos, número de alelos, heterocigosis observada ( $H_o$ ), heterocigosis esperada ( $H_e$ ) y el Índice de contenido polimórfico (PIC), no pueden determinar la diversidad genética de las 30 accesiones de *T. cacao L.* grupo germoplásmico criollo.

### **Hipótesis Objetivo específico 2:**

Hi: Los polimorfismos de los 12 pares de marcadores moleculares microsatélites (SSRs), pueden determinar la identidad genética de las 30 accesiones de *T. cacao L.* grupo germoplásmico criollo.

Ho: Los polimorfismos de los 12 pares de marcadores moleculares microsatélites (SSRs), no pueden determinar la identidad genética de las 30 accesiones de *T. cacao L.* grupo germoplásmico criollo.

### **Hipótesis Objetivo específico 3:**

Hi: La técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y el análisis de fragmentos mediante electroforesis en geles de agarosa, pueden determinar el nivel de polimorfismo de los microsatélites utilizados.

Ho: La técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y el análisis de fragmentos mediante electroforesis en geles de agarosa, no pueden determinar el nivel de polimorfismo de los microsatélites utilizados.

## 5. METODOLOGÍA

### 5.1. UBICACIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO.

El estudio se realizó en 10 fincas donde se tienen pequeños cultivos de cacao. Las fincas donde se colectó el material analizado están ubicadas en los municipios de: San Julián e Izalco ambos en el Departamento de Sonsonate, Jujutla en el Departamento de Ahuachapán, San Miguel Tepezontes, San Juan Tepezontes y San Pedro Nonualco en el Departamento de La Paz, Tecapán en el Departamento de Usulután, Chinameca en el Departamento de San Miguel y Jocoaitique en el Departamento de Morazán (Figura 10).

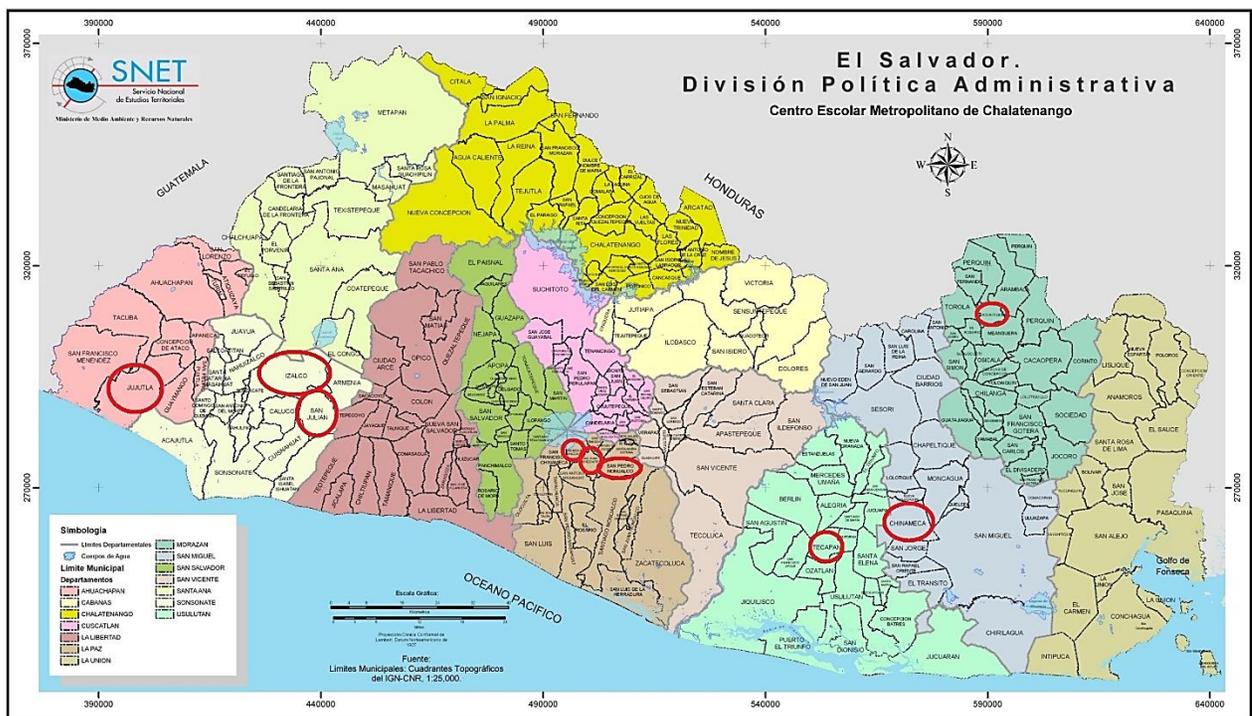


Figura 10. Las circunferencias de color rojo muestran la ubicación geográfica de los municipios en donde se colectó el material analizado de 30 accesiones de *Theobroma cacao* L. grupo germoplásmico Criollo (SNET, modificado por: Margarita Gómez, 2018).

## 5.2. FASE DE CAMPO.

### 5.2.1. Selección de árboles en cultivos de cacao.

La selección de árboles fue en función del fenotipo criollo (Anexo 1), se siguieron los descriptores morfológicos del Manual Práctico para la Caracterización Morfológica de Cacao (*T. cacao L.*) en Venezuela (Engels et al. 1980), los cuales fueron los siguientes:

Hoja: las hojas de los cacaos con fenotipo criollo se presentan pequeñas, de forma ovalada, de color verde claro y gruesas, muy susceptibles a la mayoría de las enfermedades. Las hojas presentan pecíolo con pulvinos o pulvínulos (Engels et al. 1980).

Hoja joven: Las hojas jóvenes son fáciles de reconocer ya que su color difiere del resto de las hojas. Los cacaos con fenotipo criollo presentan una coloración verde muy claro con ausencia de antocianina (Engels et al. 1980).

Coloración de la Flor: El color de la flor depende de la presencia de antocianina en las partes de la flor, ausente en los cacaos fenotipo criollo. Las flores tienen pedicelos cortos, estaminodios y líneas guías de los pétalos de color rosado claro (Engels et al. 1980).

Fruto: Los frutos de cacao son cilíndricos, con diez surcos profundos simples o en cinco pares, cáscara verrugosa, delgada o gruesa, puntas agudas, rectas o recurvadas. El color del fruto puede variar del verde al rojo. Las semillas son blancas o ligeramente pigmentadas, de formas cilíndricas u ovals (Engels et al. 1980).

Corte longitudinal del fruto: Se realizaron cortes longitudinales en frutos de 4 a 5 meses de edad, para observar características importantes como: grosor de la cáscara del fruto, número de granos, color, forma y tamaño de las semillas, además de deficiencias nutricionales y granos vanos. Estas mediciones permitieron obtener información básica

que pudo ser usada para la selección de árboles en las fincas y orientaron en la definición del fenotipo criollo (Anexo 1) (Engels et al. 1980).

#### 5.2.2. Colecta de Muestras.

Se trabajó con 30 accesiones de *T. cacao L.* tipo criollo, se colectaron 10 hojas de cada accesión, las cuales fueron cortadas de la zona media de la rama de los árboles, evitando cortar hojas muy maduras o muy jóvenes, se cuidó que las hojas estuvieran lo más sanas posibles. Una vez colectadas se envolvieron en papel filtro y se llevaron al laboratorio de Biología Molecular en CENSALUD, donde fueron guardadas a una temperatura de 4°C para ser procesadas al día siguiente (Figura 11) (Anexo 1).

### 5.3. FASE DE LABORATORIO.

#### 5.3.1. Secado de hojas de *T. cacao L.*

Las hojas se limpiaron con agua esterilizada para eliminar cualquier tipo de residuo contaminante y se secaron en una estufa a 55°C por 24 horas. Una vez secas se doblaron y envolvieron en servilletas, para ser guardadas en bolsas tipo Ziploc y almacenadas a -20°C (Figura 11) (Anexo 2).

#### 5.3.2. Extracción de ADN.

Para la extracción de ADN se utilizó el kit de extracción de plantas PureLink (Figura 11) (Invitrogen™, 2012).

Lisis del tejido: se utilizaron 50 mg de hoja de cacao para realizar la lisis del tejido según el protocolo siguiente:

1. El tejido de la hoja de cacao fue congelado con Nitrógeno Líquido y macerado con un mortero y pistilo hasta obtener un polvo fino.
2. Al macerado se añadieron 500 µl de Buffer de Resuspensión R2, después se añadieron 15 µl de SDS al 20% y 15 µl de RNasa A (20mg / ml). Se Homogenizó en vortex y se incubó a 55°C por 15 horas, en un bloque de calentamiento seco.

3. Al día siguiente se centrifugó el lisado a 14,000 rpm por 5 minutos y se transfirió el sobrenadante transparente a un tubo de Microcentrífuga de 1.5 ml (sin perturbar el sedimento).
4. Posteriormente, se añadieron 100 µl de Buffer de Precipitación N2. Se homogenizó en vortex y se incubó en hielo durante 5 minutos. Posteriormente se centrifugó a 14,000 rpm por 5 minutos.
5. Se transfirieron 250 µl del lisado transparente a un tubo de Microcentrífuga nuevo y se añadió 375 µl de Buffer de Unión B4.

#### Enlace de ADN (Binding DNA).

1. Se adicionó a un tubo de columna y un tubo colector del Kit la mezcla del paso anterior, posteriormente se centrifugó a 10,000 rpm por 1 minuto y se descartó el fluido del tubo.

#### Lavado de ADN.

1. Se añadieron 500 µl de Buffer de lavado W4. La mezcla se centrifugó a 10,000 rpm por 1 minuto. Posteriormente se desechó el fluido y se colocó la columna de nuevo en el tubo.
2. Se añadieron 500 µl de Buffer de lavado W5 a la columna. Se centrifugó el tubo a 10,000 rpm por 1 minuto. Se desechó el fluido del tubo de Lavado y se colocó el cartucho en el mismo tubo. Posteriormente se repitió este mismo paso colocando nuevamente 500 µl de Buffer de lavado W5 a la columna. Se centrifugó el tubo a 10,000 rpm por 1 minuto. Se descartó el fluido del tubo de lavado y se colocó el cartucho en el mismo tubo.
3. Posteriormente y como último paso del lavado se centrifugó el tubo a 14,000 rpm durante 2 minutos. Descartando el tubo de lavado.

#### Elución de ADN.

1. Se colocó el tubo de columna en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml, se añadió 100 µl de buffer de elución E1. Incubando a temperatura ambiente durante 1

minuto. Posteriormente se centrifugó el tubo a 14,000 rpm por 1 minuto. Como resultado el tubo de la microcentrífuga contenía el ADN purificado.

2. Para recuperar más ADN, se colocó nuevamente 100 µl de buffer de elución E1. Utilizando el mismo tubo. Y se centrifugo la columna a temperatura ambiente por 1 minuto a 14,000 rpm.
3. Como resultado se obtuvieron 200 µl de ADN por cada muestra extraída (Invitrogen™, 2012)

El ADN extraído de las hojas de *T. cacao L.* se guardó a -20°C. Posteriormente, se procedió a realizar la cuantificación del ADN extraído en un Espectrofotómetro modelo Biophotometer Plus marca Eppendorf, en el cual se determinó la cantidad de ADN extraído y la pureza de cada muestra (Anexo 3). Posteriormente, se confirmó la calidad del ADN mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (Figura 11).

### 5.3.3. Marcadores Moleculares Microsatélites y Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

En el presente estudio se utilizaron los marcadores moleculares de ADN conocidos como Microsatélites o Secuencias Simples Repetidas (SSR). Estos marcadores fueron previamente reportados y propuestos por Herrera García (2012) y Dadzie et al. (2013) para la caracterización internacional de *T. cacao L.*

Se utilizaron 12 microsatélites (SSR). El nombre de los marcadores microsatélites, la secuencia de los cebadores, temperatura de alineación y tamaño están referidos en la Tabla 2 y 3. Cada reacción de PCR se llevó a un volumen total de 50 µl, conteniendo 73 ng de ADN genómico. Todas las reacciones de PCR contenían lo siguiente: 1.25 U Amplitaq Gold DNA polimerasa, 0.2mM dNTPs, 0.5µM de cada cebador, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 1X solución amortiguadora Buffer II. Las condiciones del Termociclador fueron: 10 minutos de desnaturalización inicial a 95 °C, seguido por 43 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 30 segundos, 1 minuto a la apropiada temperatura de alineación según cada “*primer*” y 1 minuto de extensión a 72 °C, con una extensión final de 72 °C por 7 minutos. En un Termociclador modelo Mastercycler

nexus flexlid, marca: Eppendorf (Figura 11) (Anexo 4) (Castañeda de Abrego et al. 2011).

Tabla 2. Microsatélites previamente reportados y propuestos por Herrera García. 2012.

<b>Nombre del marcador</b>	<b>Número de acceso EMBL</b>	<b>Secuencia del "Primer" (5'- 3')</b>	<b>Temperatura de alineación (°C)</b>	<b>Tamaño (bp)</b>
mTcCIR1	Y16883	GCAGGGCAGGCTCAGTGAAGCA TGGGCAACCAGAAAACGAT	51	143
mTcCIR6	Y16980	TTCCCTCTAAACTACCCTAAAT TAAAGCAAAGCAATCTAACATA	46	224-253
mTcCIR7	Y16981	ATGCGAATGACAACTGGT GCTTTCAGTCCTTTGCTT	51	150-167
mTcCIR8	Y16982	CTAGTTTCCCATTTACCA TCCTCAGCATTTTCTTTC	46	290-307
mTcCIR11	Y16985	TTTGGTGATTATTAGCAG GATTTCGATTTGATGTGAG	46	286-321
mTcCIR15	Y16988	CAGCCGCCTCTTGTTAG TATTTGGGATTCTTGATG	46	234-263
mTcCIR18	Y16991	GATAGCTAAGGGGATTGAGGA GGTAATTCAATCATTTGAGGATA	51	333-357

Tabla 3. Microsatélites previamente reportados y propuestos por Dadzie et al. 2013.

<b>Nombre del marcador</b>	<b>Número de acceso EMBL</b>	<b>Secuencia del "Primer" (5'- 3')</b>	<b>Temperatura de alineación (°C)</b>	<b>Tamaño (bp)</b>
mTcCIR9	Y16983	ACCATGCTTCCTCCTTCA ACATTTATACCCCAACCA	51	274
mTcCIR12	Y16986	TCTGACCCCAAACCTGTA ATTCCAGTTAAAGCACAT	46	188
mTcCIR17	Y16990	AAGGATGAAGGATGTAAGAGAG CCCATACGAGCTGTGAGT	51	271
mTcCIR24	Y16996	TTTGGGGTGATTTCTTCTGA TCTGTCTCGTCTTTTGGTGA	46	198
mTcCIR25	Y16997	CTTCGTAGTGAATGTAGGAG TTAGGTAGGTAGGGTTATCT	46	153

#### 5.3.4. Electroforesis para observar Producto de PCR.

Los productos amplificados de PCR, fueron separados en gel de agarosa al 3%, la detección de bandas se realizó agregando al gel 1.5 µl de colorante GelRed. La electroforesis se corrió a 70 voltios por 2.5 horas en solución amortiguadora de Buffer TBE a una concentración de 0.5X. El tamaño de las bandas amplificadas fue determinado con la ayuda de un marcador de ADN TrackIt™ 50bp DNA Ladder, marca: Invitrogen. Posteriormente se visualizó en un Transiluminador de luz ultravioleta modelo Ultraviolet Transilluminator, marca Spectroline (Figura 11) (Anexo 5).

### 5.4. ANÁLISIS DE RESULTADOS.

Se realizó una documentación fotográfica de cada gel de agarosa vistos en el transiluminador de luz ultravioleta, utilizando una cámara Digital modelo FinePix JV200, marca Fujifilm. Las fotografías, se descargaron en una computadora y con el Visualizador de fotos de Windows se procedió a determinar la presencia, el número de bandas amplificadas para cada “*primer*” y los pesos moleculares de cada banda con ayuda del marcador de ADN TrackIt™ 50 bp DNA Ladder, marca: Invitrogen, el cual se colocó en el gel junto con los productos amplificados.

#### 5.4.1. Construcción de base de datos de las bandas amplificadas.

Una vez determinados los pesos moleculares de cada banda de todos los geles de agarosa de las muestras de *T. cacao* L., con ayuda del marcador de ADN de 50 pares de bases, se procedió a realizar una matriz de datos en Excel en la cual se colocó el nombre de cada muestra, los nombres de cada uno de los “*primer*” y los valores obtenidos para cada alelo (Anexo 6).

#### 5.4.2. Análisis de Datos Moleculares.

Análisis de diversidad genética.

La información que se obtuvo de las bandas se registró en una matriz de Excel. Se calculó: la frecuencia de alelos, número de alelos, Heterocigosidad observada ( $H_o$ ) y Heterocigosidad esperada ( $H_e$ ) mediante el Software para análisis genéticos en Excel GenAIEx 6.502 (Peakall y Smouse, 2006) y el Índice de contenido polimórfico

(PIC) se calculó mediante el Software para análisis estadístico de datos genéticos Info-Gen (Balzarini y Rienzo, 2004).

Frecuencia de alelos.

Este parámetro se estableció dividiendo el número de veces que se presentó un alelo de un gen por el número total de alelos de ese gen en la muestra (Figura 11) (Rosero, 2013).

Número de alelos.

Este parámetro molecular se utilizó para determinar el número medio de alelos presentes para cada locus en la muestra y ayudó a conocer la heterogeneidad de las muestras en estudio (Figura 11) (Martínez, 2015).

Heterocigosidad observada ( $H_o$ ).

Se utilizó para definir la frecuencia relativa de individuos heterocigotos observados en la muestra para cualquiera de los loci. En cada accesión se calculó como la porción de todos los genotipos heterocigotos en un locus, dado que se expresa en función en cada locus y en promedio de todos los loci (Figura 11) (Martínez, 2015).

Heterocigosidad esperada ( $H_e$ ).

Se utilizó como estadístico molecular para estimar la variabilidad, ya que es usado para reflejar la probabilidad de que dos alelos tomados al azar de la población sean diferentes, pudiéndose aplicar en cualquier especie independientemente de su estructura reproductiva o genética, característica que le permite establecer diferencias entre individuos (Figura 11) (Martínez, 2015).

Índice de contenido polimórfico (PIC).

Se utilizó para determinar la información de los marcadores microsatélites evaluados en los cultivos de cacao según las frecuencias de alelos. Se realizó la estimación mediante la frecuencia relativa entendida como:  $p + q = 1$ , con el fin de encontrar la frecuencia alélica ( $f$ ) (Rosero, 2013).

Dónde:

$p = \text{N}^\circ \text{ de alelos } p / \text{N}^\circ \text{ total de alelos}$

$q = \text{N}^\circ \text{ de alelos } q / \text{N}^\circ \text{ total de alelos}$

Construcción de Dendograma (UPGMA).

Se construyó un Dendograma mediante el software para analizar paquetes de datos PAST3, donde la longitud de las ramas que conectan las entidades en el análisis indica la magnitud de las distancias entre ellas y se van construyendo de forma jerárquica (Figura 11) (Kirdar et al. 2008).

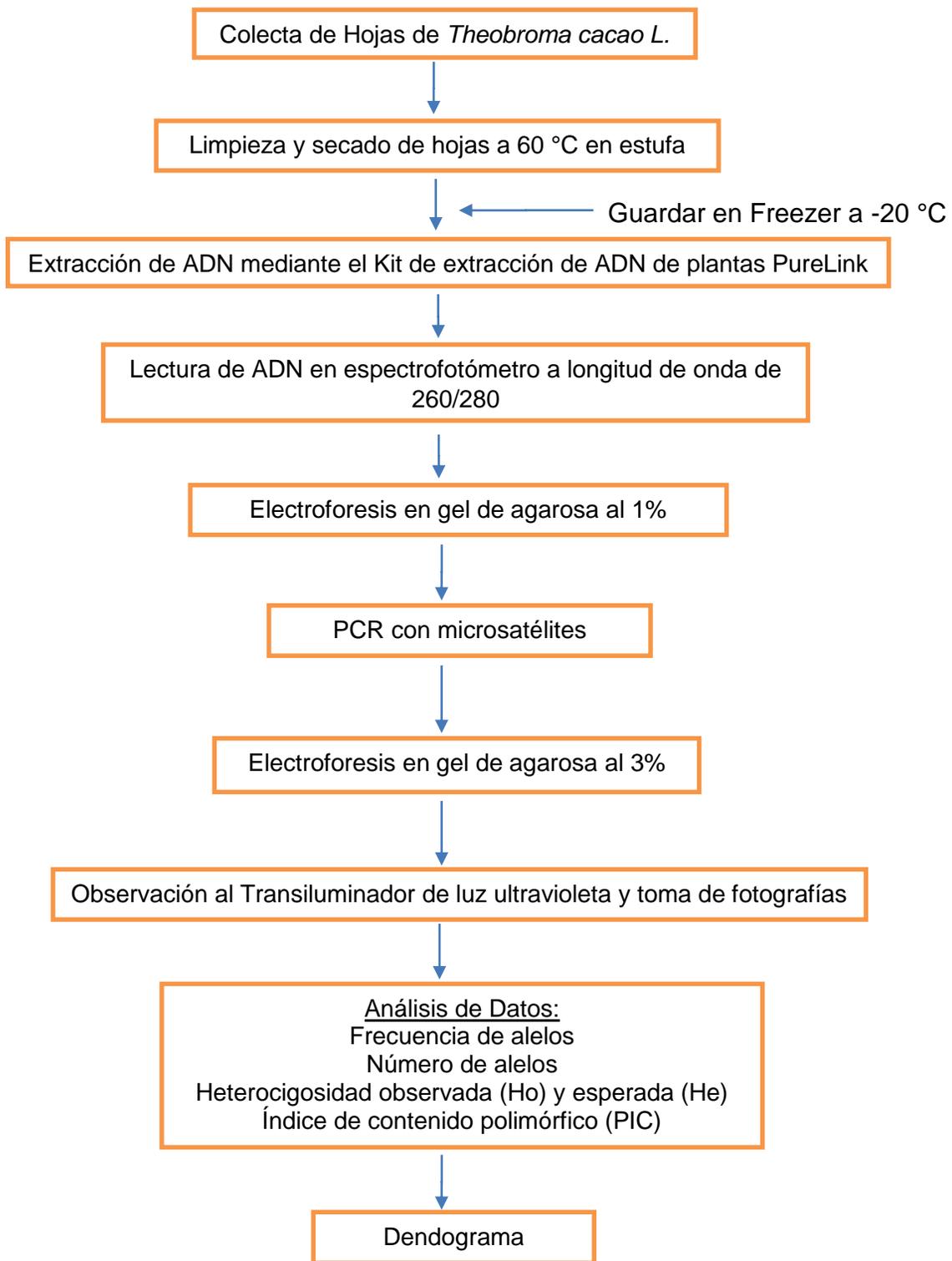


Figura 11. Protocolo de Extracción de ADN y Caracterización Molecular de *T. cacao L.*

## 6. RESULTADOS

### 6.1. SELECCIÓN DE ÁRBOLES EN CULTIVOS DE CACAO.

Para la selección de las 30 accesiones de *T. cacao* L. se hizo uso de descriptores morfológicos de fruto, hoja, flor y semilla, en función del fenotipo Criollo, entre los principales hallazgos están:

#### 6.1.1. Descriptores morfológicos de Fruto.

De las 30 accesiones de *T. cacao* L. se logró detallar 28 muestras para los descriptores morfológicos de fruto, los cuales se explican a continuación:

##### Color del Fruto maduro.

El color predominante fue el verde, el cual lo presentaron 15 accesiones estas fueron las accesiones número: 1, 2, 5, 6, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 26, 27 y 29. Se encontraron 5 accesiones que presentaron fruto de color Amarillo estas accesiones fueron las número: 4, 16, 17, 18 y 28, se encontró 5 accesiones que presentaron fruto de color anaranjado estas fueron las accesiones número: 3, 7, 8, 10 y 21. Y se encontró 3 accesiones con colores combinados, las cuales fueron: accesión número 19 de color rojo-amarillo, la accesión número 22 de color verde-rojo y la accesión número 30 de color verde-amarillo (Tabla 4).

##### Forma del fruto.

La forma del fruto que más predominó fue la forma elíptica, la cual la presentaron 18 accesiones, seguido de la forma oblonga que la presentaron 9 accesiones y la forma redondeada que la presento solamente una accesión (Tabla 4).

##### Forma del ápice del fruto.

En cuanto a la forma del ápice del fruto, la forma que más predominó fue la forma atenuada la cual la presentaron 10 accesiones, seguido de la forma obtusa con 7 accesiones, la forma atenuada en curva con 6 accesiones, la forma aguda con 3 accesiones y la forma redondeada la presentaron solamente 2 accesiones (Tabla 4).

Rugosidad del fruto.

La rugosidad más predominante fue la intermedia con 12 accesiones, seguido de la rugosidad intensa con 11 accesiones y la rugosidad ligera con 5 accesiones (Tabla 4).

Tamaño del fruto.

El tamaño del fruto más predominante fue el intermedio (este tamaño se incluyen frutos de cacao con una medida de 11 cm a 19 cm de largo) este tamaño lo presentaron 19 accesiones, seguido del tamaño grande (mayor a 20 cm) este tamaño lo presentaron 7 accesiones y por último el tamaño pequeño (menor a 10 cm) lo presentaron solamente 2 accesiones (Tabla 4).

Tabla 4. Descriptores morfológicos de fruto, de las 28 accesiones de *T. cacao* L. detalladas. 2017.

Descriptores morfológicos de Fruto								
Accesión No.	Color fruto inmaduro	Color fruto maduro	Forma	Constricción basal	Forma del ápice	Rugosidad	Tamaño	Apariencia de los pares de lomos
1	Verde	Verde	Elíptico	Ausente	Atenuado	Intermedia	Intermedio	Bien separados
2	Verde	Verde	Elíptico	Ligera	Atenuado	Intermedia	Intermedio	Bien separados
3	Rojo	Anaranjado	Elíptico	Ligera	Obtuso	Intermedia	Intermedio	Bien separados
4	Verde	Amarillo	Elíptico	Ausente	Obtuso	Ligera	Intermedio	Bien separados
5	Rojo	Verde	Oblongo	Ausente	Obtuso	Intensa	Grande	Ligeramente separados
6	Rojo	Verde	Oblongo	Ligera	Obtuso	Intensa	Grande	Ligeramente separados
7	Rojo	Anaranjado	Elíptico	Ausente	Obtuso	Ligera	Intermedio	Bien separados
8	Verde	Anaranjado	Elíptico	Ligera	Obtuso	Ligera	Grande	Bien separados
9	Rojo	Verde	Elíptico	Ligera	Atenuado	Intermedia	Grande	Bien separados
10	Verde	Anaranjado	Elíptico	Ligera	Obtuso	Intermedia	Intermedio	Bien separados
11	Verde	Verde	Oblongo	Ausente	Redondeado	Ligera	Intermedio	Equidistantes
12	Verde	Verde	Redondeada	Ausente	Redondeado	Ligera	Intermedio	Bien separados
13	Verde	Verde	Oblongo	Ligera	Atenuado	Intermedia	Grande	Bien separados
14	Verde	Verde	Oblongo	Ligera	Atenuado	Intermedia	Intermedio	Bien separados
15	Verde	Verde	Elíptico	Ligera	Atenuado	Intensa	Intermedio	Ligeramente separados

16	Verde	Amarillo	Elíptico	Ausente	Atenuado	Intensa	Pequeño	Ligeramente separados
17	Verde	Amarillo	Elíptico	Ausente	Agudo	Intensa	Intermedio	Ligeramente separados
18	Verde	Amarillo	Oblongo	Ausente	Atenuado en curva	Intensa	Intermedio	Ligeramente separados
19	Rojo	Rojo y Amarillo	Oblongo	Ausente	Agudo	Intensa	Intermedio	Ligeramente separados
20	Verde	Verde	Elíptico	Ausente	Atenuado	Intensa	Grande	Ligeramente separados
21	Rojo	Anaranjado	Oblongo	Ausente	Atenuado en curva	Intensa	Intermedio	Ligeramente separados
22	Verde	Verde-Rojo	Elíptico	Ausente	Atenuado en curva	Intensa	Pequeño	Ligeramente separados
25	Verde	Verde	Oblongo	Ausente	Atenuado	Intensa	Intermedio	Bien separados
26	Verde	Verde	Elíptico	Ausente	Atenuado en curva	Intermedia	Intermedio	Bien separados
27	Verde	Verde	Elíptico	Ausente	Atenuado en curva	Intermedia	Intermedio	Bien separados
28	Verde	Amarillo	Elíptico	Ausente	Atenuado	Intermedia	Grande	Bien separados
29	Verde	Verde	Elíptico	Ausente	Agudo	Intermedia	Intermedio	Bien separados
30	Verde	Verde-Amarillo	Elíptico	Ausente	Atenuado en curva	Intermedia	Intermedio	Bien separados

### 6.1.2. Descriptores morfológicos de hoja y hoja joven.

Se detalló a las 30 accesiones de *T. cacao* L. para los descriptores morfológicos de hoja, pero solo se logró detallar 28 accesiones para los descriptores morfológicos de hoja joven.

#### Forma de la hoja.

La forma de la hoja predominante en las 30 accesiones fue la forma elíptica, presentándose en todas las accesiones (Tabla 5).

#### Forma del ápice de la hoja.

De las 30 accesiones de *T. cacao* L. 16 accesiones presentaron la forma del ápice acuminado corto, 13 accesiones presentaron forma del ápice acuminado largo y una accesión presentó la forma de su ápice agudo (Tabla 5).

Forma de la base de la hoja.

De las 30 accesiones de *T. cacao* L. 17 accesiones presentaron la forma de la base redondeada, 9 accesiones presentaron forma de la base obtusa y 4 accesiones presentaron forma de la base aguda (Tabla 5).

Presencia de pulvinos y textura de la hoja.

Las 30 accesiones de *T. cacao* L. presentaron pulvinos, ya que se observó un ensanchamiento en forma de cojinete en el pecíolo. La textura predominante en las 30 accesiones fue la textura cartácea ya que al momento de tocarlas, las hojas tenían una textura lisa y suave al tacto similar al papel de escribir y al estrujarlas estas volvían a su forma original (Tabla 5).

Color de la hoja joven y presencia de antocianina.

De las 30 accesiones de *T. cacao* L. se logró detallar 28 accesiones con su hoja joven, de las cuales 21 accesiones presentaron una coloración verde en las hojas jóvenes con ausencia de antocianina, 6 accesiones presentaron una coloración rojiza en las hojas jóvenes con presencia de antocianina y una accesión presentó coloración roja intensa en las hojas jóvenes con presencia de antocianina (Tabla 5).

Tabla 5. Descriptores morfológicos de hoja y hoja joven, en las 30 accesiones de *T. cacao* L. 2017.

<b>Descriptores morfológicos de Hoja y hoja joven</b>							
<b>Accesión No.</b>	<b>Forma</b>	<b>Forma del Ápice</b>	<b>Forma de la base</b>	<b>Pulvinos</b>	<b>Textura</b>	<b>Color hoja joven</b>	<b>Presencia de antocianina en hoja joven</b>
1	Elíptica	Acuminado corto	Obtusa	Presente	Cartácea	Verde	Ausente
2	Elíptica	Acuminado largo	Aguda	Presente	Cartácea	Verde	Ausente
3	Elíptica	Acuminado corto	Redondeada	Presente	Cartácea	Rojizo	Presente
4	Elíptica	Acuminado corto	Redondeada	Presente	Cartácea	Verde	Ausente
5	Elíptica	Acuminado corto	Aguda	Presente	Cartácea	Rojizo	Presente
6	Elíptica	Acuminado corto	Obtusa	Presente	Cartácea	Rojizo	Presente
7	Elíptica	Acuminado largo	Redondeada	Presente	Cartácea	Rojizo	Presente

8	Elíptica	Acuminado corto	Redondeada	Presente	Cartácea	Verde	Ausente
9	Elíptica	Acuminado corto	Redondeada	Presente	Cartácea	Rojo	Presente
10	Elíptica	Acuminado largo	Redondeada	Presente	Cartácea	Rojizo	Presente
11	Elíptica	Acuminado largo	Redondeada	Presente	Cartácea	Verde	Ausente
12	Elíptica	Acuminado corto	Redondeada	Presente	Cartácea	Verde	Ausente
13	Elíptica	Acuminado corto	Redondeada	Presente	Cartácea	Verde	Ausente
14	Elíptica	Acuminado corto	Redondeada	Presente	Cartácea	Verde	Ausente
15	Elíptica	Acuminado corto	Aguda	Presente	Cartácea	Verde	Ausente
16	Elíptica	Acuminado corto	Redondeada	Presente	Cartácea	Verde	Ausente
17	Elíptica	Acuminado corto	Obtusa	Presente	Cartácea	Verde	Ausente
18	Elíptica	Acuminado corto	Obtusa	Presente	Cartácea	Verde	Ausente
19	Elíptica	Acuminado largo	Obtusa	Presente	Cartácea	Verde	Ausente
20	Elíptica	Agudo	Obtusa	Presente	Cartácea	Verde	Ausente
21	Elíptica	Acuminado largo	Obtusa	Presente	Cartácea	Rojizo	Presente
22	Elíptica	Acuminado largo	Obtusa	Presente	Cartácea	Verde	Ausente
23	Elíptica	Acuminado largo	Obtusa	Presente	Cartácea		
24	Elíptica	Acuminado corto	Redondeada	Presente	Cartácea		
25	Elíptica	Acuminado largo	Redondeada	Presente	Cartácea	Verde	Ausente
26	Elíptica	Acuminado corto	Redondeada	Presente	Cartácea	Verde	Ausente
27	Elíptica	Acuminado largo	Redondeada	Presente	Cartácea	Verde	Ausente
28	Elíptica	Acuminado largo	Aguda	Presente	Cartácea	Verde	Ausente
29	Elíptica	Acuminado largo	Redondeada	Presente	Cartácea	Verde	Ausente
30	Elíptica	Acuminado largo	Redondeada	Presente	Cartácea	Verde	Ausente

### 6.1.3. Descriptores morfológicos de Flor.

Estos descriptores morfológicos se basan principalmente en la presencia de antocianina en las partes de la flor, de las 30 accesiones de *T. cacao* L. se logró detallar 28 accesiones, la cuales se describen a continuación:

Presencia de antocianina en pedúnculo.

Se observó 16 accesiones sin antocianina en el pedúnculo y 12 accesiones con presencia de antocianina en el pedúnculo (Tabla 6).

Presencia de antocianina en sépalo.

Se observó 14 accesiones con presencia de antocianina ligera y 14 accesiones sin antocianina (Tabla 6).

Presencia de antocianina en el limbo del pétalo.

Se observó 26 accesiones sin antocianina y 2 accesiones con presencia de antocianina (Tabla 6).

Presencia de antocianina en filamento.

Se observó en las 28 accesiones de *T. cacao* L. detalladas presencia de antocianina en el filamento de la flor (Tabla 6).

Presencia de antocianina en estaminodio.

Se observó 22 accesiones con presencia de antocianina intermedia, 4 accesiones con presencia de antocianina ligera, una accesión con presencia de antocianina intensa y una accesión sin antocianina (Tabla 6).

Tabla 6. Descriptores morfológicos de la Flor en las 28 accesiones de *T. cacao* L. detalladas. 2017.

<b>Descriptores morfológicos de Flor.</b>					
<b>Presencia de Antocianina en partes de la flor.</b>					
<b>Accesión No.</b>	<b>Pedúnculo</b>	<b>Sépalo</b>	<b>Limbo del pétalo</b>	<b>Filamento</b>	<b>Estaminodio</b>
1	Presente	Ligero	Ausente	Ausente	Intermedio
2	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Intensa
3	Presente	Ligero	Ausente	Ausente	Intermedio
4	Presente	Ausente	Ausente	Ausente	Intermedio
5	Presente	Ligero	Ausente	Ausente	Intermedio
6	Presente	Ligero	Presente	Ausente	Intermedio
7	Presente	Ligero	Presente	Ausente	Intermedio
8	Presente	Ligero	Ausente	Ausente	Intermedio

9	Presente	Ligero	Ausente	Ausente	Intermedio
10	Presente	Ligero	Ausente	Ausente	Intermedio
11	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Intermedio
12	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ligero
13	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ligero
14	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
15	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Intermedio
16	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ligero
17	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Intermedio
18	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Intermedio
19	Ausente	Ligero	Ausente	Ausente	Intermedio
20	Presente	Ligero	Ausente	Ausente	Intermedio
21	Presente	Ligero	Ausente	Ausente	Intermedio
22	Presente	Ligero	Ausente	Ausente	Ligero
25	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Intermedio
26	Ausente	Ligero	Ausente	Ausente	Intermedio
27	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Intermedio
28	Ausente	Ligero	Ausente	Ausente	Intermedio
29	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Intermedio
30	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Intermedio

#### 6.1.4. Descriptores morfológicos de Semilla.

De las 30 accesiones de *T. cacao L.* se logró detallar 28 accesiones para los descriptores morfológicos de semilla, los cuales fueron los siguientes:

##### Color de la semilla.

Se observó 17 accesiones con semillas de color blanco, 4 accesiones con semilla de color blanco segregado, el cual es un color blanco con manchas de color rosado, 4 accesiones con semillas de color blanco y rosado, una accesión con semillas de color rosado y violeta claro, una accesión con semillas de color violeta claro y se observó una accesión que presentó tres colores de semilla diferentes: blanco, rosado y violeta oscuro (Tabla 7).

Color del cotiledón.

Se observó 12 accesiones con cotiledón color blanco, 9 accesiones con un color de cotiledón blanco segregado, 4 acciones con color de cotiledón blanco y rosado, una accesión presentó un color de cotiledón rosado y violeta claro, una accesión presentó color violeta claro y una accesión presentó color de cotiledón blanco segregado, rosado y violeta (Tabla 7).

Tabla 7. Descriptores morfológicos de semilla en las 28 accesiones de *T. cacao* L. detalladas. 2017.

<b>Descriptores morfológicos de Semilla</b>		
<b>Accesión No.</b>	<b>Color de la semilla</b>	<b>Color del cotiledón</b>
1	Blanco segregado	Blanco segregado
2	Blanco segregado	Blanco segregado
3	Blanco segregado	Blanco segregado
4	Blanco	Blanco
5	Blanco y rosado	Blanco y rosado
6	Rosado y violeta claro	Rosado y violeta claro
7	Blanco segregado	Blanco segregado
8	Violeta claro	Violeta claro
9	Blanco y rosado	Blanco y rosado
10	Blanco	Blanco
11	Blanco	Blanco
12	Blanco	Blanco
13	Blanco y rosado	Blanco y rosado
14	Blanco	Blanco
15	Blanco	Blanco
16	Blanco	Blanco segregado
17	Blanco	Blanco segregado
18	Blanco	Blanco segregado
19	Blanco	Blanco segregado
20	Blanco	Blanco
21	Blanco, rosado y violeta	Blanco segregado, rosado y violeta
22	Blanco	Blanco
25	Blanco y rosado	Blanco y rosado
26	Blanco	Blanco
27	Blanco	Blanco

28	Blanco	Blanco segregado
29	Blanco	Blanco
30	Blanco	Blanco

La información de los descriptores morfológicos de cada accesión seleccionada fue colocada en una base de datos en la cual se incluyó el número de la accesión, el nombre, el lugar de la finca y las características de cada descriptor (Anexo 7).

## 6.2. EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ADN.

El contenido de ADN obtenido en la cuantificación de las 30 accesiones de *T. cacao L.* varió desde 292.3 µg/ml a 390.1 µg/ml, lo cual fue suficiente para realizar las pruebas de análisis de PCR (Tabla 8).

Tabla 8. Valores obtenidos en la cuantificación de ADN para cada accesión de *T. cacao L.* 2017.

No. de accesión	Contenido de ADN µg/ml	Pureza (260nm/280nm)	Departamento	Municipio
1	308.6	1.02	Ahuachapán	Jujutla
2	323.8	1.03	Ahuachapán	Jujutla
3	347.7	0.99	Sonsonate	San Julián
4	294.4	1.00	Sonsonate	San Julián
5	351.1	0.99	Sonsonate	San Julián
6	333.4	0.99	Sonsonate	San Julián
7	303.0	1.00	Sonsonate	San Julián
8	328.9	0.99	Sonsonate	San Julián
9	345.1	1.00	Sonsonate	San Julián
10	390.1	1.01	Sonsonate	San Julián
11	306.8	1.01	Sonsonate	San Julián
12	292.3	1.01	Sonsonate	Izalco
13	296.5	1.02	Sonsonate	Izalco
14	352.3	1.00	Sonsonate	Izalco
15	341.9	1.00	Sonsonate	Izalco
16	331.8	0.99	La Paz	San Miguel Tepezontes
17	293.9	1.00	La Paz	San Miguel Tepezontes
18	367.6	1.01	La Paz	San Miguel Tepezontes
19	315.5	1.01	La Paz	San Miguel Tepezontes
20	299.7	1.00	La Paz	San Juan Tepezontes
21	346.2	1.00	La Paz	San Pedro Nonualco
22	352.9	1.00	La Paz	San Pedro Nonualco
23	368.8	1.01	Morazán	Jocoaitique
24	345.0	1.01	Morazán	Jocoaitique
25	365.4	1.01	San Miguel	Chinameca
26	297.4	1.01	San Miguel	Chinameca

27	358.7	1.00	San Miguel	Chinameca
28	298.5	1.01	San Miguel	Chinameca
29	330.7	0.99	Usulután	Tecapán
30	294.3	1.00	Usulután	Tecapán

Adicionalmente se midió la pureza del ADN, la mayoría del ADN de las 30 accesiones de *T. cacao L.* se encontró dentro del rango de 0.99 a 1.03 de pureza. Las accesiones que presentaron los valores más altos de rango de pureza fueron: la accesión número 2 con un valor de 1.03 del municipio de Jujutla en el Departamento de Ahuachapán, seguido de las accesiones número 1 también del municipio de Jujutla y de la accesión número 13 del municipio de Izalco en el Departamento de Sonsonate, ambas con un valor de pureza de 1.02 (Figura 12).

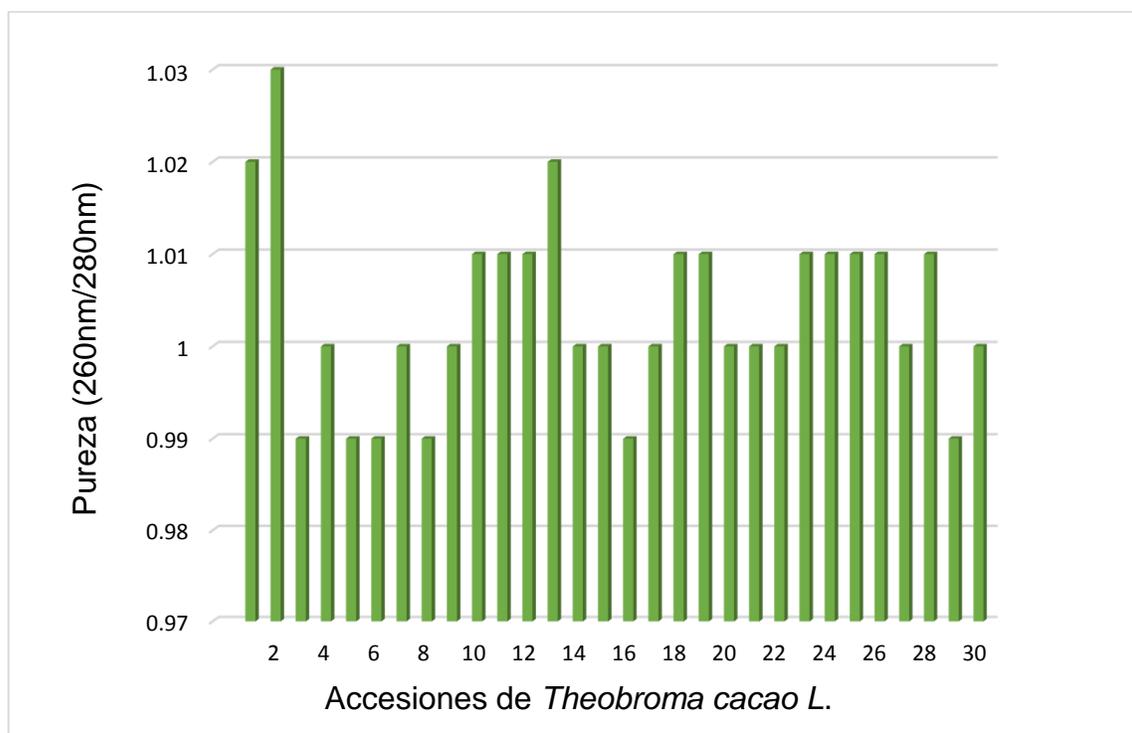


Figura 12. Valores de Pureza del ADN de las 30 accesiones de *T. cacao L.* 2017.

### 6.3. ELECTROFORESIS DE CALIDAD DE ADN.

Posteriormente el ADN extraído fue visualizado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% de concentración para observar la calidad. La intensidad de las bandas varió dependiendo de la cantidad de ADN en cada muestra. Como resultado se observaron bandas bien definidas y no debía observarse un barrido por debajo de cada banda, ya que esto podía interferir en la amplificación de ADN (Figura 13).

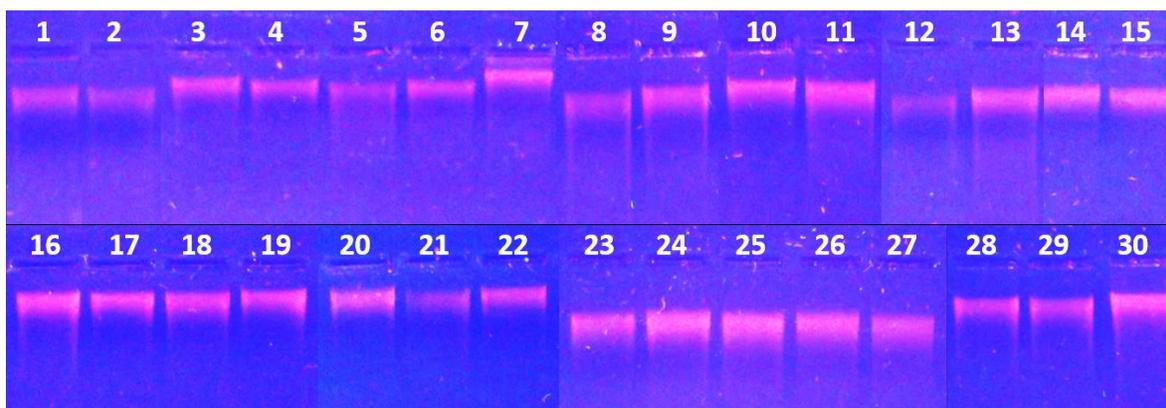


Figura 13. Bandas de ADN de las 30 Accesiones de *T. cacao L.* corridas en gel de agarosa al 1% (Fotografías tomadas por: Margarita Gómez, 2017).

### 6.4. AMPLIFICACIÓN POR PCR DE LOS MICROSATÉLITES UTILIZADOS.

En el procedimiento de estandarización y elaboración de master mix para PCR analizando el ADN de 30 accesiones de *T. cacao L.* grupo germoplásmico criollo se obtuvo como resultado el siguiente protocolo para un volumen final de 50 µl por reacción (Tabla 9).

Tabla 9. Componentes de la Master mix para amplificación de PCR. 2017.

Componentes de la Master Mix	Concentración Stock	Concentración Final	Para 50 µl Rxn
Agua ultrapura	-----	-----	-----
10X PCR Buffer II	10X	1X	5.0 µl
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	1.5mM	3.0 µl
dNTPs	10 mM	0.2mM	1.0 µl
"Primer" 1	10 µM/µl (10,000pmol)	0.5 µM	2.5 µl

"Primer" 2	10 µM/µl (10,000pmol)	0.5 µM	2.5 µl
AmpliTaq Gold DNA Polimerasa	5U/µl	1.25 U/rxn	0.25 µl
ADN diluido Cacao		73 ng.	

Las condiciones de amplificación de PCR se presentan en la tabla 10:

Tabla 10. Condiciones del termociclador para amplificación por PCR. 2017.

1.	10 minutos a 95 °C (Desnaturalización Inicial)
2.	30 segundos a 94 °C (desnaturalización)
3.	1 minuto a la Temperatura según el Primer (Alineación)
4.	1 minuto a 72°C (Extensión)
5.	Go to Step 2, 43 ciclos
6.	7 minutos a 72 °C (Extensión Final)
7.	Hold at 4 °C
8.	End

## 6.5. VISUALIZACIÓN DE PRODUCTOS AMPLIFICADOS EN GELES DE AGAROSA.

En el procedimiento de visualización de productos amplificados en geles de agarosa, se obtuvo como resultado que la técnica mostró suficiente poder de resolución para revelar los diferentes patrones de bandas (alelos) presentes en las muestras analizadas.

Se corrieron 3 geles de electroforesis para cada accesión de *T. cacao L.* en el orden como se muestra en la figura 14, colocando el marcador de ADN de 50pb en el pozo número 1 y colocando los productos de PCR en los pozos número 2, 3, 4, 5 y 6 de cada gel.

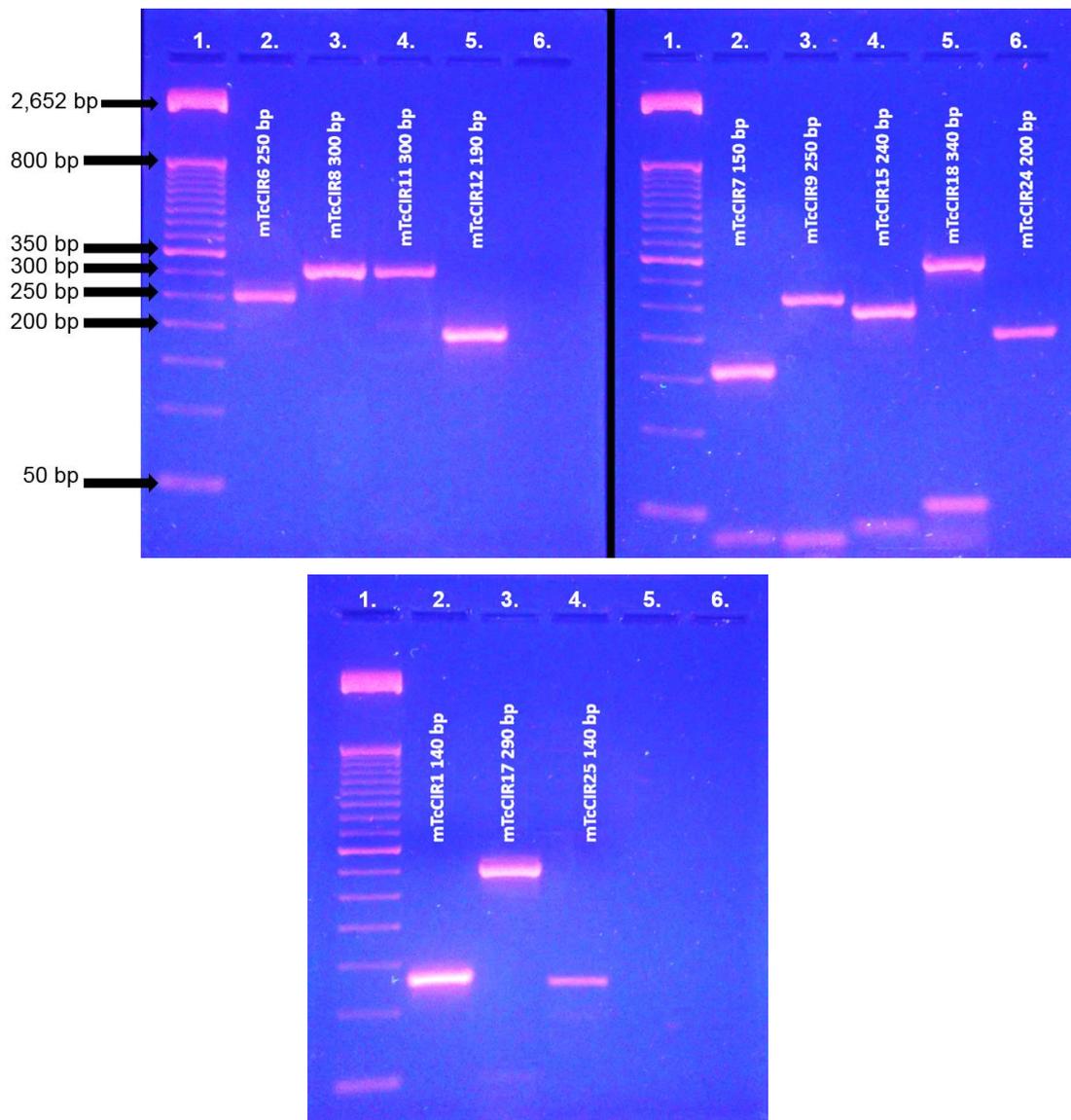


Figura 14. Bandas en gels de agarosa al 3% para observar producto de PCR (Fotografías tomadas por: Margarita Gómez, 2017).

## 6.6. IDENTIDAD GENÉTICA.

El uso de técnicas de biología molecular, particularmente marcadores moleculares microsatélites, permitió definir la identidad genética de las 30 accesiones de *T. cacao L.* grupo germoplásmico criollo. La definición de su identidad se realizó calculando su porcentaje de homocigosis, como resultado las accesiones que presentaron el mayor porcentaje de homocigosis fueron las accesiones: 16, 17, 19,

20, 21, 22, 26, 29 y 30, en las cuales amplificaron los 12 marcadores moleculares microsatélites (SSR) obteniendo el 100% de homocigosidad. Las accesiones que presentaron el 91.66% de homocigosidad amplificando 11 marcadores moleculares microsatélites fueron las accesiones: 11, 18, 23, 24, 25 y 27.

Las accesiones que presentaron un 83.33% de homocigosidad con 10 microsatélites amplificados fueron las accesiones: 2, 3, 4, 5, 13 y 14. Seguido de las accesiones 7, 9, 10 y 15 las cuales presentaron el 75% de homocigosidad. Las accesiones 6, 8 y 12 presentaron el 66.66% de homocigosidad y las accesiones número 1 y 28 presentaron el 50% de homocigosidad (Tabla 11).

Tabla 11. Porcentajes de homocigosidad y heterocigosidad de las 30 accesiones de *T. cacao* L. 2017.

<b>Muestras</b>	<b># bandas homocigotas</b>	<b># bandas heterocigotas</b>	<b>% Homocigosis</b>	<b>% Heterocigosis</b>	<b>Primers Nulos</b>
Accesión 1	6	5	50.00	41.66	1
Accesión 2	10	1	83.33	8.33	1
Accesión 3	10	0	83.33	0.00	2
Accesión 4	10	2	83.33	16.66	0
Accesión 5	10	2	83.33	16.66	0
Accesión 6	8	3	66.66	25.00	1
Accesión 7	9	3	75.00	25.00	0
Accesión 8	8	3	66.66	25.00	1
Accesión 9	9	2	75.00	16.66	1
Accesión 10	9	1	75.00	8.30	2
Accesión 11	11	1	91.66	8.30	0
Accesión 12	8	3	66.66	25.00	1
Accesión 13	10	1	83.33	8.33	1
Accesión 14	10	0	83.33	0.00	2
Accesión 15	9	2	75.00	16.66	1
Accesión 16	12	0	100.0	0.00	0
Accesión 17	12	0	100.0	0.00	0
Accesión 18	11	0	91.66	0.00	1
Accesión 19	12	0	100.0	0.00	0
Accesión 20	12	0	100.0	0.00	0
Accesión 21	12	0	100.0	0.00	0
Accesión 22	12	0	100.0	0.00	0

Accesión 23	11	1	91.66	8.33	0
Accesión 24	11	1	91.66	8.33	0
Accesión 25	11	1	91.66	8.33	0
Accesión 26	12	0	100.0	0.00	0
Accesión 27	11	0	91.66	0.00	1
Accesión 28	6	5	50.00	41.66	1
Accesión 29	12	0	100.0	0.00	0
Accesión 30	12	0	100.0	0.00	0

## 6.7. ANÁLISIS DE DATOS MOLECULARES.

### 6.7.1. Diversidad genética.

Doce marcadores moleculares microsatélites (SSR) fueron utilizados para amplificar 30 accesiones de *T. cacao* L. Se utilizó el programa GenAEx para calcular la diversidad genética de la población de cacao. Los parámetros de diversidad genética incluyeron la frecuencia de alelos, número de alelos, heterocigosidad observada ( $H_o$ ) y heterocigosidad esperada ( $H_e$ ). El Índice de contenido polimórfico (PIC) fue calculado por Info-Gen y el Dendograma UPGMA fue construido con el software PAST 3.

#### 6.7.1.1. Frecuencia de alelos.

Se obtuvo un total de 76 alelos para los 12 marcadores moleculares microsatélites SSR analizados en una población de 30 accesiones de *T. cacao* L. (Figura 15). La frecuencia de alelos varió de 0.017 a 0.690 en cada uno de los locus (Tabla 12).

Tabla 12. Frecuencia de los alelos de 12 marcadores analizados con el programa GenAEx. 2018.

Locus	Alelos	Frecuencia	Locus	Alelos	Frecuencia	Locus	Alelos	Frecuencia
mTcCIR1	135	0.103	mTcCIR9	210	0.034	mTcCIR17	290	0.052
	140	0.362		250	0.466		295	0.069
	143	0.069		255	0.172		300	0.483
	145	0.414		260	0.034		305	0.017
	150	0.034		274	0.034		325	0.034

	155	0.017		275	0.017		340	0.138
mTcCIR6	225	0.034		290	0.052		350	0.207
	230	0.034		300	0.172	mTcCIR18	300	0.037
	240	0.259		310	0.017		305	0.037
	245	0.069	mTcCIR11	300	0.621		310	0.037
	250	0.483		305	0.069		340	0.333
	253	0.034		310	0.138		350	0.556
	260	0.017		325	0.103	mTcCIR24	175	0.033
	265	0.034		350	0.069		180	0.033
	275	0.034	mTcCIR12	180	0.067		190	0.250
mTcCIR7	150	0.690		185	0.033		195	0.067
	155	0.310		190	0.417		200	0.583
mTcCIR8	280	0.033		200	0.367		210	0.033
	290	0.217		205	0.067	mTcCIR25	125	0.045
	295	0.033		210	0.050		130	0.091
	300	0.650	mTcCIR15	210	0.067		140	0.136
	305	0.050		225	0.033		400	0.023
	325	0.017		240	0.433		425	0.114
				245	0.133		450	0.250
				250	0.333		550	0.114
							600	0.045
							625	0.091
							650	0.091

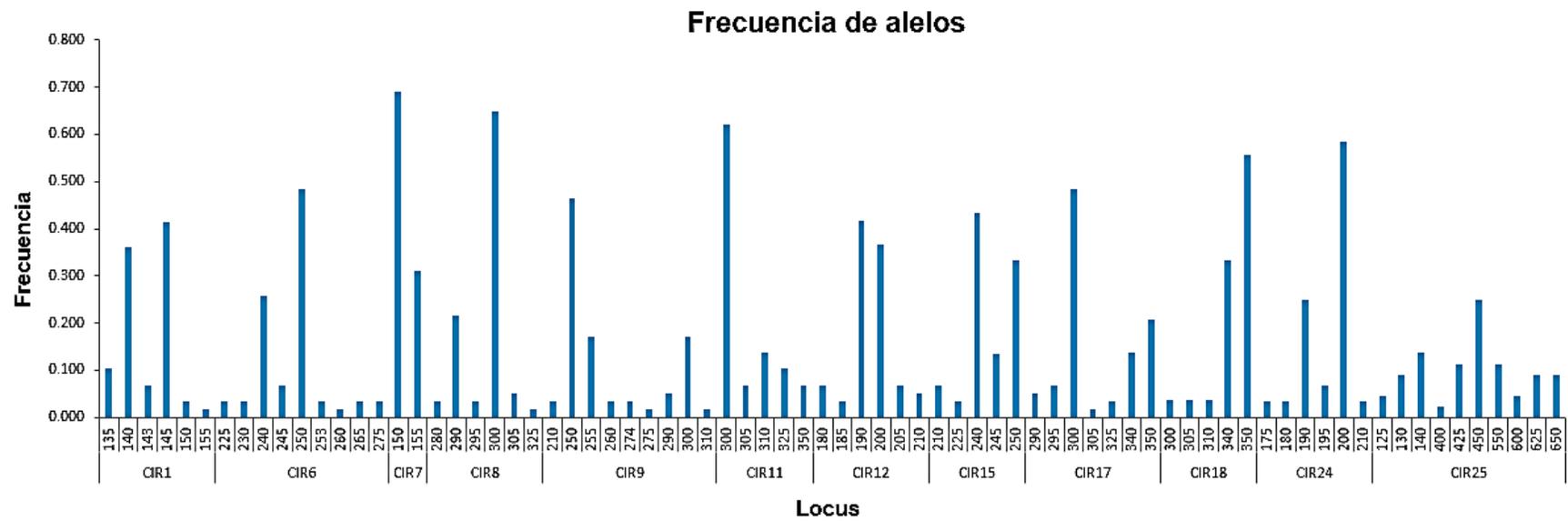


Figura 15. Frecuencia de alelos obtenida con el programa GenAIEx. 2018.

#### 6.7.1.2. Número de alelos.

Se identificaron 76 alelos para los 12 locus estudiados, el número de alelos encontrados osciló entre un mínimo de 2 y un máximo de 10, con un promedio 6.33 alelos por locus en las 30 accesiones de cacao evaluadas. El marcador mTcCIR 25 presentó 10 alelos, mientras que el marcador que presentó el menor número fue mTcCIR7 con 2 alelos (Tabla 13).

Tabla 13. Número de alelos (NA); número total de alelos por marcador (NTA) y número promedio de alelos (NPA) para los 12 marcadores moleculares microsatélites (SSR). 2018.

<b>Marcador</b>	<b>NA</b>
mTcCIR1	6
mTcCIR6	9
mTcCIR7	2
mTcCIR8	6
mTcCIR9	9
mTcCIR11	5
mTcCIR12	6
mTcCIR15	5
mTcCIR17	7
mTcCIR18	5
mTcCIR24	6
mTcCIR25	10
<b>NTA</b>	76
<b>NPA</b>	6.33

#### 6.7.1.3. Alelos Nulos.

En algunas accesiones no se obtuvo la amplificación de los alelos después de varios intentos, aun realizando cambios en los parámetros de la master mix para la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), por tanto se sugiere que existen alelos nulos para esas accesiones en determinados marcadores (Tabla 14). Sin embargo, esas mismas accesiones si amplificaron productos de PCR para el resto de los microsatélites analizados.

Tabla 14. Frecuencia de alelos nulos en las accesiones de *T. cacao* L. analizadas, 1 indican el alelo nulo en cada marcador. 2018.

<b>Muestras</b>	<b>CIR 1</b>	<b>CIR6</b>	<b>CIR7</b>	<b>CIR8</b>	<b>CIR9</b>	<b>CIR11</b>	<b>CIR12</b>	<b>CIR15</b>	<b>CIR17</b>	<b>CIR18</b>	<b>CIR24</b>	<b>CIR25</b>
Accesión 1												<b>1</b>
Accesión 2										<b>1</b>		
Accesión 3	<b>1</b>											<b>1</b>
Accesión 4												
Accesión 5												
Accesión 6												<b>1</b>
Accesión 7												
Accesión 8												<b>1</b>
Accesión 9												<b>1</b>
Accesión 10						<b>1</b>						<b>1</b>
Accesión 11												
Accesión 12										<b>1</b>		
Accesión 13												<b>1</b>
Accesión 14		<b>1</b>	<b>1</b>									
Accesión 15												<b>1</b>
Accesión 16												
Accesión 17												
Accesión 18									<b>1</b>			
Accesión 19												
Accesión 20												
Accesión 21												
Accesión 22												
Accesión 23												
Accesión 24												
Accesión 25												
Accesión 26												
Accesión 27										<b>1</b>		
Accesión 28					<b>1</b>							
Accesión 29												
Accesión 30												
<b>TOTAL</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>0</b>	<b>8</b>

La presencia de alelos nulos podría deberse a mutaciones en las regiones flanqueantes de los microsatélites, donde se diseñan los “*primers*” para la amplificación por PCR, estas mismas impiden el alineamiento de los “*primers*” y en consecuencia la amplificación del fragmento de ADN deseado.

#### 6.7.1.4. Heterocigosidad observada (Ho) y Heterocigosidad esperada (He).

Los valores promedios de Heterocigosidad observada (Ho) para los locus fue de 0.107 y para la Heterocigosidad esperada (He) fue de 0.641. Lo que significa que existe baja diversidad genética, ya que la Heterocigosidad observada fue menor que la Heterocigosidad esperada, poniendo de manifiesto un menor número de heterocigotos. El marcador mTcCIR25 presentó el valor promedio más alto en cuanto a Heterocigosidad esperada con 0.864; la Heterocigosidad observada promedio para este marcador fue de 0.136. El marcador mTcCIR7 presentó el rango más bajo en cuanto a Heterocigosidad esperada con un valor de 0.428 (Tabla 15).

#### 6.7.1.5. Índice de contenido polimórfico (PIC).

El promedio del Índice de contenido polimórfico (PIC) para todos los locus analizados fue de 0.611. El marcador mTcCIR25 presentó el valor más alto con 0.837 y el marcador mTcCIR7 el más bajo con un valor 0.367, considerándose medianamente informativo (Tabla 15).

Tabla 15. Valores de heterocigosidad observada (Ho) y esperada (He) e Índice de Contenido Polimórfico (PIC) para los 12 marcadores moleculares microsatélites (SSR) utilizados en 30 accesiones de *T. cacao* L. 2018.

<b>Marcador</b>	<b>Ho</b>	<b>He</b>	<b>PIC</b>
mTcCIR1	0.034	0.681	0.652
mTcCIR6	0.172	0.689	0.675
mTcCIR7	0.000	0.428	0.367
mTcCIR8	0.200	0.526	0.481
mTcCIR9	0.069	0.717	0.706
mTcCIR11	0.138	0.576	0.556
mTcCIR12	0.100	0.679	0.625
mTcCIR15	0.200	0.678	0.622
mTcCIR17	0.069	0.696	0.666
mTcCIR18	0.000	0.576	0.593
mTcCIR24	0.167	0.589	0.548
mTcCIR25	0.136	0.864	0.837
<b>Promedio</b>	<b>0.107</b>	<b>0.641</b>	<b>0.611</b>

#### 6.7.1.6. Análisis de agrupamiento.

Con la matriz de pesos moleculares (Anexo 7) se construyó un Dendograma UPGMA, el cual se realizó con ayuda del software PAST 3. Los datos fueron analizados con el índice de similitud de correlación. El coeficiente de correlación cofenética tuvo un valor de 0.9217, es decir muy representativo para la distribución de los datos. La correlación cofenética se basa en el cálculo del grado de relación a través del coeficiente “r” de la correlación, su valor va de 0 a 1, entre más se acerque a 1, la información es más fidedigna.

En el Dendograma (Figura 16) se determinaron 7 grupos definidos a partir de un valor fijo de 0.90, donde se muestra al grupo 6 con un valor del 90% de similitud a las características del valor de alelos en las accesiones número 6, 13, 8, 9, 15, 1, 3, 16, 17, 20, 21 y 22; el grupo 3 a las características del valor de alelos en las accesiones número 25, 26, 30, 29, 5, 7, 4, 19, 23, 11 y 24; el grupo 1 a las características del valor de alelos compartidos en las accesiones número 12, 2 y 27, como las más similares entre las accesiones de *T. cacao L.*, seguido de los grupos 2 con la accesión número 14, el grupo 4 con la accesión número 18, el grupo 5 con la accesión número 10 y el grupo 7 con la accesión número 28 estos grupos presentaron características de menor similitud entre el resto de las accesiones.

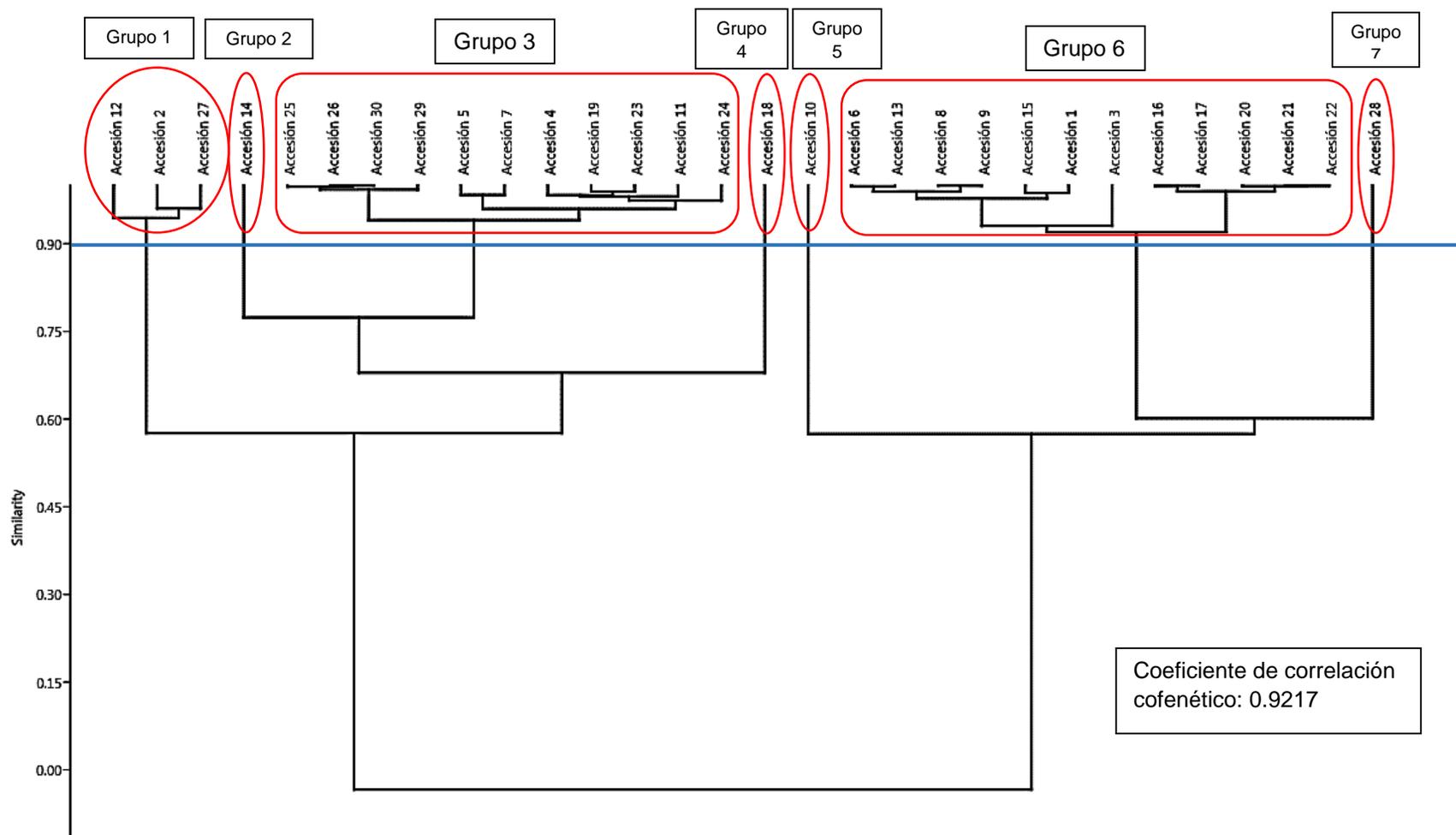


Figura 16. Dendrograma UPGMA, construido a partir de la matriz de alelos de las 30 accesiones de *T. cacao* L. analizadas, por medio del software PAST 3.

## 7. DISCUSIÓN

Extracción y cuantificación de ADN.

Según Rosero Galarraga (2013), es importante que al momento de realizar la extracción de ADN en cacao se utilice el método de pulverizado de tejido foliar con nitrógeno líquido, ya que permite la ruptura de la pared celular para liberar los constituyentes celulares. También explica que la extracción de ADN de las muestras de cacao fue realizada sin mayor dificultad y como resultado se observaron bandas de ADN con poca degradación, pero resalta que para obtener mejores resultados al momento de realizar la extracción de ADN es importante realizar la purificación con columnas de membrana de silicato.

Al realizar el análisis de cuantificación de ADN a las 30 accesiones de *T. cacao L.* por medio de espectrofotometría, se pudo confirmar que se contaba con la cantidad suficiente de ADN de calidad adecuado antes de llevar a cabo ensayos de PCR. El contenido de ADN varió desde 293.9 µg/ml a 390.1 µg/ml, lo cual fue suficiente para realizar las pruebas de análisis de PCR.

Martínez Botello (2015), tuvo como resultado un contenido de ADN por espectrofotometría para 31 muestras de *T. cacao L.* entre 250 µg/ml a 400 µg/ml. Mientras que Chia Wong (2009), obtuvo una cantidad de 111 µg/ml hasta 1,802 µg/ml en su investigación con 50 individuos de cacao. La cantidad obtenida en la presente investigación fue relativamente baja comparada con la investigación de Chia Wong (2009).

Finalmente, al comparar los dos métodos de cuantificación de ADN: el método de visualización en geles de agarosa al 1% y el método por espectrofotometría, se puede afirmar que el más preciso es el método por espectrofotometría, ya que es necesario conocer la cantidad de ADN extraído para realizar la dilución del ADN para los ensayos de PCR.

Amplificación por la técnica de PCR.

Las pruebas de amplificación por la técnica de PCR mostraron que las 30 accesiones de *T. cacao L.* amplificaron, lo cual permitió verificar que las características de cantidad y calidad de ADN extraídos fueron las necesarias para llevar a cabo la PCR, pero para lograr resultados fue necesario realizar diluciones ya que la cantidad de ADN debe ser la adecuada debido a que el exceso de ADN puede provocar que no haya amplificación de productos, esto concuerda con Williams et al. (1990), que sugieren que el ADN debe tener una mínima cantidad de compuestos contaminantes para obtener una amplificación de productos. Además, la cantidad de ADN debe ser la adecuada, ya que un exceso de ADN genómico puede inhibir la amplificación.

Análisis de datos moleculares.

Frecuencia de alelos.

En el presente estudio se tuvo como resultado que la frecuencia de alelos para los 12 marcadores moleculares microsatélites SSR utilizados en 30 accesiones de *T. cacao L.* varió de 0.017 a 0.690 en cada uno de los locus. Coincidiendo con los valores obtenidos por Ordoñez Trejo (2017) que obtuvo valores de frecuencia de alelos entre 0.017 a 0.879 en 29 muestras de *T. cacao L.* con 17 marcadores moleculares. Mientras que Rosero Galarraga (2013), obtuvo valores de frecuencia entre 0.016 a 0.61 en 31 muestras de *T. cacao L.* utilizando 20 marcadores moleculares microsatélites (SSR).

Número de alelos.

En cuanto al número de alelos en el presente estudio, se identificaron 76 alelos para los 12 marcadores estudiados, el número de alelos encontrados osciló entre un mínimo de 2 y un máximo de 10, con un promedio de 6.33 alelos por locus en las 30 accesiones de cacao evaluadas. El marcador mTcCIR25 presentó 10 alelos, mientras que el marcador que presentó el menor número fue mTcCIR7 con 2 alelos.

Ordoñez Trejo (2017), obtuvo un total de 54 alelos en los 17 marcadores SSR utilizados en un conjunto de 29 muestras, el número de alelos por marcador osciló entre 2 y 6, siendo el marcador mTcCIR33 el que presentó el mayor número de alelos

con 6, con un promedio de alelos por marcador de 3.18 y el marcador que presentó el menor número de alelos fue mTcCIR1 con 2 alelos.

Mientras que Ruiz Erazo (2014), obtuvo 85 alelos para los 12 marcadores SSR estudiados, el número de alelos encontrados varió entre un mínimo de 5 y un máximo de 9, teniendo un promedio de 6.8 alelos por marcador en las 165 muestras de cacao evaluadas. El marcador mTcCIR37 presentó un máximo 9 alelos, mientras que los marcadores que presentaron el menor número fueron mTcCIR25 y mTcCIR30 con 5 alelos cada uno.

Lanaud et al. (1999), obtuvo 130 alelos para 23 marcadores SSR analizados, el número de alelos varió de un mínimo de 2 a un máximo de 13, teniendo un promedio de 5.65 alelos por marcador en las 50 muestras de *T. cacao L.* analizadas. El marcador mTcCIR25 presentó un máximo de 13 alelos, mientras que el marcador mTcCIR28 presentó el menor número con 2 alelos. Coincidiendo en esta investigación que el marcador mTcCIR25 fue el más polimórfico. Mientras que Herrera García (2012), reportó en su investigación que el marcador mTcCIR7 fue el que presentó menor número de alelos, con 12. Coincidiendo en esta investigación que el marcador mTcCIR7 fue el que presentó el menor número de alelos con 2.

Heterocigosis observada ( $H_o$ ) y Heterocigosis esperada ( $H_e$ ).

En el presente estudio se obtuvieron valores promedios de heterocigosis observada para los locus de 0.107 y para la heterocigosis esperada de 0.641. Lo que significó que existe baja diversidad genética, poniendo de manifiesto un menor número de alelos heterocigotos. El marcador mTcCIR25 presentó el valor promedio más alto en cuanto a heterocigosis esperada con 0.864; la heterocigosis observada promedio para este marcador fue de 0.136, el marcador mTcCIR7 presentó el rango más bajo en cuanto a heterocigosis esperada con un valor de 0.428.

Ruiz Erazo (2014), reportó valores bajos de heterocigosis esperada para los marcadores mTcCIR3 y mTcCIR7 de 0.554 y 0.573 respectivamente. Coincidiendo

con el marcador mTcCIR7 que presentó valores bajo en la heterocigosidad esperada comparado con la presente investigación. Mientras que Ordoñez Trejo (2017), reportó en su investigación valores promedio de heterocigosidad observada de 0.095 y la heterocigosidad esperada fue 0.312, para los 17 marcadores moleculares analizados en 29 muestras de *T. cacao* L. tipo criollos, obteniendo baja diversidad genética, poniendo de manifiesto un menor número de alelos heterocigotos. El marcador mTcCIR33 presentó el valor más alto de heterocigosidad esperada con 0.628, la heterocigosidad observada para este mismo marcador fue de 0.639 siendo el valor promedio más alto.

Rosero Galarraga (2013), reportó el marcador mTcCIR58 con la mayor heterocigosidad esperada de 0.79, sin embargo, la mayor heterocigosidad observada la mostraron los marcadores mTcCIR6 y mTcCIR26 con un valor de 0.97, obteniendo un promedio general de 0.78, para los 17 marcadores analizados.

Lanaud et al. (1999), reportaron en su investigación con 23 marcadores moleculares un valor promedio de heterocigosidad observada de 0.46 y la heterocigosidad esperada obtuvo un valor promedio de 0.60, obteniendo baja diversidad genética, debido a que la heterocigosidad observada fue menor que la heterocigosidad esperada, observándose un menor número de alelos heterocigotos. Los marcadores mTcCIR15 y mTcCIR25 obtuvieron el valor más alto de heterocigosidad esperada con 0.84, la heterocigosidad observada para estos mismos marcadores fue de 0.62 y 0.42 respectivamente.

Herrera García (2012), reportó que los marcadores mTcCIR1 y mTcCIR12 presentaron los valores promedios más altos de heterocigosidad observada de 0.43 y para la heterocigosidad esperada un promedio para esos mismos marcadores de 0.69 y 0.81 respectivamente, presentando una alta diversidad genética para todos los marcadores utilizados en ese estudio. Mientras que en la presente investigación los marcadores mTcCIR1 y mTcCIR12 presentaron valores de heterocigosidad observada

de 0.034 y de 0.100 respectivamente. La heterocigosidad esperada para esos mismos marcadores fue de 0.681 y 0.679, presentando una alta diversidad genética.

Índice de contenido polimórfico (PIC).

En el presente estudio, el promedio del Índice de contenido polimórfico para todos los marcadores analizados fue de 0.611. El marcador mTcCIR25 presentó el valor más alto con 0.837 y el marcador mTcCIR7 el más bajo con un valor 0.367, considerándose medianamente informativo. Mientras que Ruiz Erazo (2014), reportó un Índice de contenido polimórfico de 0.71 para todos los marcadores estudiados. El marcador mTcCIR33 presentó el valor más alto con 0.84, mientras que el marcador mTcCIR3 presentó el valor más bajo con 0.48, considerándose medianamente informativo. Coincidiendo con los valores obtenidos de PIC mas alto y más bajo en esta investigación pero en diferentes marcadores.

Rosero Galarraga (2013), presentó un PIC promedio de 0.57 para todos los marcadores analizados. El marcador mTcCIR58 presentó el valor más alto con 0.76 y el marcador mTcCIR1 con el valor más bajo siendo de 0.36. Coincidiendo con el valor de PIC más bajo para el marcador mTcCIR7 en esta investigación el cual fue de 0.36.

Mientras que Martínez Botello (2015), reportó un valor promedio de PIC para 19 marcadores evaluados de 0.90, los marcadores mTcCIR37, mTcCIR8, mTcCIR12, mTcCIR60 y mTcCIR33 superaron el promedio con valores entre 0.93 y 0.95, resultados que evidenciaron la utilidad de los microsatélites para detectar variabilidad genética en *T. cacao L.*

Herrera García (2012), reportó un valor promedio de PIC de 0.87 para todos los locus analizados. El marcador mTcCIR12 presentó el valor más alto de 0.96 y el marcador mTcCIR6 el más bajo con un valor de 0.78. Mientras que Romero et al. (2010), reportó un valor de PIC bajo para este mismo marcador que fue de 0.71 y el valor más alto lo proporcionó el marcador mTcCIR15 con 1.00. En comparación con los valores obtenidos en el presente estudio el valor de PIC fue menor con 0.611 y los

valores para los marcadores mTcCIR15, mTcCIR12 y mTcCIR6 fueron de 0.622, 0.625 y 0.675 siendo también menores a los obtenidos por los autores antes mencionados.

Análisis de agrupamiento.

En el presente estudio se elaboró un Dendograma UPGMA, en el cual los datos fueron analizados con el índice de similitud de correlación. El coeficiente de correlación cofenética tuvo un valor de 0.9217 y se determinaron 7 grupos definidos a partir de un valor fijo de 0.90, donde el grupo 6 mostró un valor del 90% de similitud para los alelos de las accesiones número 6, 13, 8, 9, 15, 1, 3, 16, 17, 20, 21 y 22. Mientras que Chia Wong (2009), determinó 13 grupos definidos a partir de un valor fijo de 0.79, donde mostró al grupo 1 con un valor del 79% de similitud a las características del valor de los alelos y obteniendo un coeficiente de correlación cofenética de 0.91383. En ambas investigaciones la correlación cofenética fue muy representativa para la distribución de datos.

## 8. CONCLUSIONES

El protocolo de extracción de ADN que proporcionó el Kit para extracción de ADN en plantas PureLink resultó ser favorable, ya que se obtuvieron valores de cantidad y pureza de ADN aceptables para realizar la caracterización molecular por medio de la técnica de PCR con marcadores moleculares.

La técnica de visualización de los productos de amplificación en geles de agarosa a una concentración de 3% mostró suficiente poder de resolución para revelar los diferentes patrones de bandas (alelos) presentes en las 30 accesiones de *T. cacao* L. grupo germoplásmico criollo analizadas.

Mediante el uso de los parámetros de diversidad: Frecuencia de alelos, número de alelos, heterocigosidad observada ( $H_o$ ), heterocigosidad esperada ( $H_e$ ) y el Índice de contenido polimórfico (PIC), se logró analizar la diversidad genética de las 30 accesiones de *T. cacao* L. grupo germoplásmico criollo.

Los resultados mostraron que existe una baja diversidad genética para los 12 marcadores moleculares microsatélites (SSR) utilizados en la población de 30 accesiones de *T. cacao* L. grupo germoplásmico criollo, debido a que la heterocigosidad observada fue menor que la heterocigosidad esperada.

Los marcadores moleculares microsatélites que resultaron ser altamente informativos y polimórficos fueron mTcCIR1, mTcCIR6, mTcCIR9, mTcCIR11, mTcCIR12, mTcCIR15, mTcCIR17, mTcCIR18 y mTcCIR25 ya que mostraron valores promedio superiores a 0.60, mientras que los marcadores menos informativos y polimórficos fueron mTcCIR7 y mTcCIR8 debido a que presentaron valores promedio menores a 0.50. Se logró determinar el nivel de polimorfismo de los microsatélites utilizados, mediante la amplificación de ADN utilizando la técnica de reacción en

cadena de la polimerasa (PCR) y el análisis de fragmentos de electroforesis en geles de agarosa.

A partir del Dendograma UPGMA se identificaron 7 grupos definidos con un valor fijo de 0.90, siendo el grupo 6 el más similar a las características de los alelos, mientras que los grupos restantes mostraron menor similitud en cuanto a las características de los alelos.

## 9. RECOMENDACIONES

- Se recomienda continuar con las investigaciones de caracterización molecular de *T. cacao* L. grupo germoplásmico criollo en otros sitios de cultivo que puedan existir en El Salvador, mediante el uso de marcadores moleculares microsatélites.
- Las técnicas moleculares deben ser consideradas para futuros programas de caracterización, mejoramiento y conservación de cacao en El Salvador.
- Es recomendable para próximas investigaciones de caracterización molecular con marcadores moleculares microsatélites SSR, se incluyan un mayor número de marcadores moleculares esto con el fin de que se puedan detectar más regiones en el genoma del cacao y tener mayor información de resultados.
- Es de suma importancia realizar más estudios genéticos con marcadores moleculares microsatélites que permitan identificar materiales que posean alelos de interés, tales como resistencia a enfermedades, plagas y características organolépticas.
- Crear alianzas con cooperativas, instituciones nacionales y ONGs interesadas en investigaciones como esta para que puedan financiar proyectos de rescate de materiales germoplásmicos criollos para caracterizar tanto morfológica como molecular.

## 10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aránzazu Hernández, F. et al. 2009. CACAO, Manejo del recurso Genético para incrementar la producción y productividad del Sistema de Cacao en Colombia. Federación Nacional de Cacaoteros, FEDECACAO. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, Corpoica. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. República de Colombia. 128pp.
- Balzarini M, Di Rienzo J. 2004. Info-Gen: Software para análisis estadístico de datos genéticos. Facultad de Ciencia Agropecuarias. Universidad Nacional de Córdoba. Argentina.
- Batista, L. 2009. Guía Técnica: El Cultivo de Cacao. Primera Edición. Centro para el Desarrollo Agropecuario y Forestal, Inc. (CEDAF). Santo Domingo, República Dominicana. 232pp.
- Castañeda de Abrego, V., Pérez Gómez, J. M. y G. Bonilla. 2011. Caracterización Genética de los Tipos de Cacao establecidos en el Cultivar “Cooperativa Hacienda La Carrera” Usulután, El Salvador. Ciencia & Tecnología, Vol. 16, No.21, agosto de 2011. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACYT. Investigadores de la Facultad de Agricultura e Investigación Agrícola, Universidad Dr. José Matías Delgado, El Salvador. Pag. 12-18.
- Chanatásig Vaca, C. I. 2004. Inducción de la Embriogénesis somática en Clones superiores de cacao (*Theobroma cacao L.*), con resistencia a Enfermedades Fungosas. Tesis para optar al grado de *Magister Scientiae*. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, CATIE. Programa de Educación para el Desarrollo y la Conservación. Escuela de Posgrado. Turrialba, Costa Rica. 97pp.

- Chia Wong, J. A. 2009. Caracterización molecular mediante marcadores ISSR de una colección de 50 árboles clonales e híbridos de cacao (*Theobroma cacao L.*) de la UNAS-Tingo María. Tesis para optar al grado académico de Magíster en Biología Molecular. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas Unidad de Postgrado. 136pp.
- Dadzie, A. M. et al. (en Línea). 2013. Conversion of Microsatellite Markers to Single Nucleotide Polymorphism (SNP) Markers for Genetic Fingerprinting of *Theobroma cacao L.* Journal of Crop Improvement. Artículo Científico. Documento de pdf, disponible en: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/15427528.2012.752773#preview>
- Dostert, N., Roque. J., Cano. A., La Torre. M. I. y M. Weigend. 2011. Hoja Botánica: Cacao (*Theobroma cacao L.*). Primera Edición. Proyecto Perubiodiverso. Programa Desarrollo Rural Sostenible – GIZ. Lima, Perú. 20pp.
- Engels et al. 1980. Manual Práctico para la Caracterización Morfológica de cacao (*Theobroma cacao L.*) en Venezuela. 50pp.
- Herrera García, K. M. 2012. Caracterización Molecular de 105 accesiones de Cacao (*Theobroma cacao L.*) utilizando 10 marcadores moleculares tipo SSR en INTA-CNIAB, Nicaragua, 2011. Tesis para optar al grado de Ingeniero Agrónomo. Universidad Nacional Agraria, Facultad de Agronomía, Departamento de Producción Vegetal. 58pp.
- Invitrogen™. 2012. PureLink® Plant Total DNA Purification Kit, for purification of DNA from plant. User Guide. Document Part Number 25-0757. Life Technologies. Estados Unidos. 24pp.
- Kirdar AO, Green KD, Rathore AS. 2008. Application of multivariate data analysis for identification and successful resolution of a root cause for a bioprocessing application. Biotechnol. Prog. 720–726pp.

Lanaud, C., Risterucci, A. M., Pieretti, I., Falque, M., Bouet, A. and P. J. L. Lagoda. 1999. Isolation and Characterization of Microsatellites in *Theobroma cacao* L. Molecular Ecology. Primer Notes. 12pp.

Londoño Murillo, J. et al. (en Línea). 2011. Caracterización Molecular de Clones de *Theobroma cacao* L., por medio de Marcadores Moleculares Microsatélites. Artículo Científico. Revista Luna Azul. Universidad de Caldas. Colombia. Documento de pdf, disponible en:  
<http://lunazul.ucaldas.edu.co/index.php?option=content&task=view&id=609>

M & O Consulting S.A.C. 2008. Estudio de Caracterización del Potencial Genético del Cacao en el Perú. Proyecto de Cooperación UE-Perú en materia de asistencia técnica relativa al Comercio – Apoyo al Programa Estratégico Nacional Exportaciones (PENX 2003-2013). Lima, Perú. 142pp.

Martínez Botello, D. H. 2015. Caracterización de cultivares de cacao (*Theobroma cacao* L.) por su respuesta de defensa a *Moniliophthora roreri* y su polimorfismo de SSRs. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias Agrarias. Maestría en Ciencias Agrarias con énfasis en Fitopatología. Sede Bogotá, Colombia. 165pp.

Martínez, W. J. 2007. Caracterización Morfológica y Molecular del Cacao Nacional Boliviano y de Selecciones Elites del Alto Beni, Bolivia. Tesis para optar al grado de *Magister Scientiae*. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, CATIE. Programa de Educación para el Desarrollo y la Conservación. Escuela de Posgrado. Turrialba, Costa Rica. 101pp.

Mcenery, J. 2013. *Theobroma cacao* watercolour pencil on Archers paper. Imagen disponible en: <http://www.juliemcenery.com.au/svmanager/g15/>

- Motamayor, J. C. et al. (en Línea). 2002. Cacao Domestication I: the Origin of the Cacao Cultivated by the Mayas. *Heredity*. Nature Publishing Group. Artículo Científico. Documento de pdf, disponible en:  
<http://www.nature.com/hdy/journal/v89/n5/full/6800156a.html>
- Ordoñez Trejo, E. F. 2017. Genetic diversity evaluation of Criollo Cacao (*Theobroma cacao* L.) in Honduras with SSR Molecular Markers. Master of Science degree (MSc) “Natural Resources Management for Tropical Rural Development” (LM 69 – Classe delle lauree magistrali in Scienze e Tecnologie Agrarie). Dissertation subject: Tropical Tree Crops. Università Degli Studi Firenze, Scuola di Agraria. 73pp.
- Peakall, R. and Smouse P.E. (2006) GENALEX 6: Genetic Analysis in Excel. Population Genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*. 6, 288-295.
- Quiroz Vera, J. G. 2002. Caracterización Molecular y Morfológica de Genotipos superiores de Cacao Nacional (*Theobroma cacao* L.) de Ecuador. Tesis para optar el grado de Magister Scientiae. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. Programa de Educación para El Desarrollo y la Conservación. Escuela de Posgrado. 132pp.
- Reyes, H. y L. Capriles de Reyes. 2000. El Cacao en Venezuela, Moderna Tecnología para su Cultivo. Editado por Chocolates El Rey, C. A. Caracas, Venezuela. 270pp.
- Romero, C. A. et al. (en Línea). 2010. Identificación Varietal de 41 Plantas Seleccionadas de Cacao (*Theobroma cacao* L.) Provenientes de Cuatro Cultivares Distintos de la Región Amazónica Ecuatoriana, Mediante el Uso de Marcadores Microsatélites. Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador, Escuela Superior Politécnica del Litoral, Campus Gustavo Galindo. Guayaquil, Ecuador. Artículo Científico. Documento de pdf, disponible en:  
<http://www.rte.espol.edu.ec/index.php/tecnologica/article/viewFile/44/16>

- Rosero Galarraga, C. G. 2013. Selección estable de marcadores moleculares microsatélites (SSRs) para la identificación de clones comerciales de cacao nacional (*Theobroma cacao L.*), recomendados por el INIAP. Previa a la obtención de Grado Académico o Título de: Ingeniera en Biotecnología. Escuela Politécnica del Ejército. Departamento de Ciencias de la vida. Ingeniería en Biotecnología. Sangolqui, Ecuador. 125pp.
- Ruiz Erazo, X. A. 2014. Diversidad Genética de cacao *Theobroma cacao L.* con marcadores moleculares microsatélites. Trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de Magister en Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias Agrarias, Escuela de Posgrados, Palmira, Colombia. 80pp.
- Santos, E. S. L. et al. (en Línea). 2012. New polymorphic microsatellite loci for *Theobroma cacao*: isolation and characterization of microsatellites from enriched genomic libraries. *Biología Plantarum*. Brief Communication. Artículo Científico. Documento de pdf, disponible en:  
<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10535-012-0134-y>
- SNET. 2018. Mapa de la división política administrativa de El Salvador. Servicio Nacional de Estudios Territoriales (SNET). Ministerio de Medio Ambiente y Recursos Naturales-MARN. Disponible en:  
<https://elsalvadoreshermoso.com/mapa-division-politico-administrativa-el-salvador/>
- Vázquez Ovando, A. et al. 2012. Potencial de los Marcadores Moleculares para el Rescate de Individuos de *Theobroma cacao L.* de Alta Calidad. Artículo Científico. *Revista Biotecnología*, Año 2012, Vol.16 No1. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad Universitaria, México D.F. Pag. 36-56.
- Williams, J., Kubelik, A., Rafalski, K. and Tingey, S. 1990. DNA Polimorphisms amplified by Arbitrary Primers are Useful as Genetic Markers. *Nucleic Acids Research* (18). 6,531-6,535pp.

## 11. ANEXOS



1. Selección de árboles de *Theobroma cacao* L.



2. Selección del fruto



3. Corte longitudinal del fruto



6. Colecta de hojas de *Theobroma cacao* L. para realizar análisis.



5. Selección de hojas de las accesiones de *Theobroma cacao* L.



4. Fruto cortado longitudinalmente para observar color de las semillas

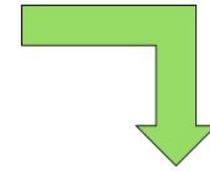
1. Selección de árboles y colecta de muestras en cultivos de cacao (*Theobroma cacao* L.) Lugar: finca San Julián, Departamento de Sonsonate. Año: 2017. Fotografías tomadas por: Margarita Gómez



1. Limpieza de hojas de *Theobroma cacao* L.



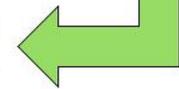
2. Hojas de *Theobroma cacao* L. limpias listas para ser secadas en la estufa



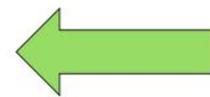
3. Colocar las hojas dentro de la estufa y secar a 55°C



4. Guardar las hojas secas en bolsas Ziploc



5. Almacenar hojas en freezer a -20°C



2. Limpieza y secado de hojas de *Theobroma cacao* L. Lugar: Laboratorio de Biología molecular de CENSALUD, tercer nivel. Año: 2017. Fotografías tomadas por: Margarita Gómez.



1. Macerado de hojas de *Theobroma cacao L.* con Nitrógeno Líquido



2. Pesaje del macerado de hojas de *Theobroma cacao L.*



3. Kit para extracción de ADN en plantas PureLink



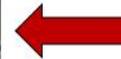
4. Colocando los componentes del kit en la muestra



5. Incubación de muestras a 55°C toda la noche



6. Centrifugación de las muestras



7. Elución de ADN



8. Cuantificación de ADN en Espectrofotómetro

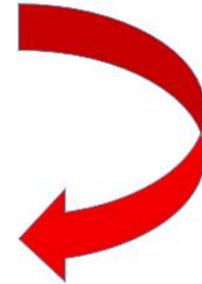
3. Proceso de Extracción de ADN en hojas de *Theobroma cacao L.* Lugar: Laboratorio de Extracción de ADN de CENSALUD, tercer nivel. Año: 2017. Fotografías tomadas por: Margarita Gómez.



1. Elaboración de la Master mix para PCR



2. Colocando los tubos de PCR en el Termociclador



4. Amplificación de ADN de accesiones de *Theobroma cacao L.*



3. Programación del Termociclador

4. Proceso de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y amplificación de ADN de accesiones de *Theobroma cacao L.* Lugar: Laboratorio de Biología Molecular de CENSALUD, tercer nivel. Año: 2017. Fotografías tomadas por: Margarita Gómez.



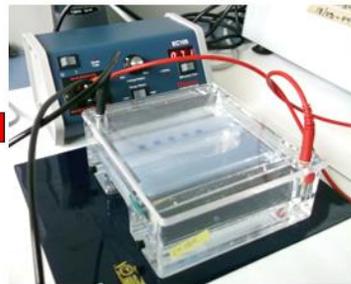
1. Preparación del gel de agarosa para visualizar producto de PCR



2. Colocando el colorante GelRed en la agarosa



6. Visualización de las bandas de los productos de PCR amplificados en el Transiluminador de luz ultravioleta.



5. Corrida de productos de PCR en el gel de agarosa al 3% a 70 voltios



4. Colocando producto de PCR en el gel de agarosa al 3%



3. Colocando la agarosa en cámara de electroforesis

5. Proceso de la técnica de Electroforesis: elaboración geles de agarosa al 3% y visualización de productos de PCR en el Transiluminador de luz ultravioleta. Lugar: Laboratorio de Biología Molecular de CENSALUD, tercer nivel. Año: 2017. Fotografías tomadas por: Margarita Gómez.

6. Matriz de pesos moleculares de 30 accesiones de *Theobroma cacao* L. grupo germoplásmico Criollo. Lugar: Laboratorio de Biología Molecular de CENSALUD, tercer nivel. Año: 2018. Matriz elaborada por: Margarita Gómez.

Sample Name	CIR 1		CIR6		CIR7		CIR8		CIR9		CIR11		CIR12		CIR15		CIR17		CIR18		CIR24		CIR25	
	Allele 1	Allele 2																						
Accesión 1	145	145	240	240	150	150	280	280	250	275	300	325	180	200	240	240	290	300	350	350	190	200	0	0
Accesión 2	145	145	240	240	150	150	290	290	210	210	300	300	190	190	240	240	295	295	0	0	190	200	450	450
Accesión 3	0	0	240	240	150	150	300	300	300	300	300	300	200	200	250	250	350	350	350	350	200	200	0	0
Accesión 4	145	145	240	275	150	150	295	305	255	255	310	310	210	210	250	250	340	340	350	350	210	210	425	425
Accesión 5	145	145	245	245	150	150	290	300	250	250	300	300	190	190	210	210	340	340	300	300	175	175	450	550
Accesión 6	145	145	250	250	155	155	290	290	290	290	300	305	200	200	240	250	350	350	350	350	190	200	0	0
Accesión 7	145	145	240	260	150	150	300	300	255	255	310	310	200	200	240	250	340	340	350	350	200	200	425	550
Accesión 8	145	145	240	265	150	150	290	300	250	250	310	310	200	200	240	250	350	350	350	350	200	200	0	0
Accesión 9	145	145	240	265	150	150	290	290	250	250	310	310	200	200	250	250	350	350	350	350	200	200	0	0
Accesión 10	150	150	250	250	150	150	290	290	255	255	0	0	200	200	240	250	350	350	350	350	200	200	0	0
Accesión 11	145	145	230	230	150	150	290	300	250	250	305	305	200	200	210	210	340	340	340	340	180	180	450	450
Accesión 12	145	145	225	225	150	150	300	300	300	300	300	300	190	210	225	250	325	325	0	0	190	190	400	550
Accesión 13	140	140	250	250	155	155	300	300	300	300	300	325	205	205	245	245	350	350	350	350	190	190	0	0
Accesión 14	145	145	0	0	0	0	300	300	300	300	325	325	205	205	250	250	300	300	350	350	190	190	450	450
Accesión 15	140	140	250	250	150	150	300	325	300	300	350	350	180	180	250	250	300	300	350	350	190	200	0	0
Accesión 16	140	140	250	250	150	150	300	300	250	250	300	300	190	190	240	240	295	295	310	310	200	200	140	140
Accesión 17	140	140	250	250	150	150	300	300	250	250	300	300	185	185	240	240	300	300	305	305	195	195	140	140
Accesión 18	140	140	250	250	155	155	300	300	255	255	300	300	190	190	245	245	0	0	340	340	200	200	550	550
Accesión 19	140	140	250	250	155	155	300	300	250	250	300	300	190	190	240	240	300	300	340	340	200	200	450	450
Accesión 20	140	140	250	250	150	150	300	300	250	250	300	300	190	190	240	240	290	290	340	340	200	200	140	140
Accesión 21	135	135	250	250	155	155	300	300	250	250	300	300	190	190	240	240	300	300	340	340	200	200	130	130
Accesión 22	135	135	245	245	150	150	300	300	250	250	300	300	190	190	240	240	300	300	350	350	200	200	130	130
Accesión 23	140	140	240	240	155	155	300	300	260	260	325	325	200	200	245	245	300	305	350	350	190	190	425	425
Accesión 24	145	145	240	240	155	155	290	290	290	310	300	300	200	200	250	250	300	300	340	340	190	190	450	450
Accesión 25	140	140	250	250	150	150	300	300	250	250	300	300	190	190	225	250	300	300	350	350	200	200	600	600
Accesión 26	140	140	250	250	150	150	305	305	255	255	300	300	190	190	245	245	300	300	340	340	200	200	650	650
Accesión 27	135	135	250	250	150	150	300	300	250	250	300	300	190	190	240	240	300	300	0	0	200	200	650	650
Accesión 28	140	155	240	275	155	155	295	300	0	0	300	305	180	200	240	240	300	300	340	340	190	200	125	125
Accesión 29	143	143	253	253	150	150	300	300	274	274	350	350	200	200	250	250	300	300	350	350	200	200	625	625
Accesión 30	143	143	250	250	155	155	300	300	250	250	300	300	190	190	240	240	300	300	340	340	195	195	625	625

## FICHA DE DESCRIPTORES MORFOLÓGICOS ACCESIÓN No.29

Finca: Tecapán, Departamento de Usulután.

FRUTO										
	<table border="1"> <tr><td>Color Fruto inmaduro: Verde</td></tr> <tr><td>Color Fruto maduro: Verde</td></tr> <tr><td>Forma del fruto: Elíptico</td></tr> <tr><td>Constricción basal: Ausente</td></tr> <tr><td>Ápice del fruto: Agudo</td></tr> <tr><td>Rugosidad del fruto: Intermedia</td></tr> <tr><td>Tamaño del fruto: Intermedio</td></tr> <tr><td>Apariencia de los pares de lomos: Bien separados</td></tr> <tr><td> </td></tr> </table>	Color Fruto inmaduro: Verde	Color Fruto maduro: Verde	Forma del fruto: Elíptico	Constricción basal: Ausente	Ápice del fruto: Agudo	Rugosidad del fruto: Intermedia	Tamaño del fruto: Intermedio	Apariencia de los pares de lomos: Bien separados	
	Color Fruto inmaduro: Verde									
Color Fruto maduro: Verde										
Forma del fruto: Elíptico										
Constricción basal: Ausente										
Ápice del fruto: Agudo										
Rugosidad del fruto: Intermedia										
Tamaño del fruto: Intermedio										
Apariencia de los pares de lomos: Bien separados										
HOJA Y BROTE TIERNO										
	<table border="1"> <tr><td>Forma de la hoja: Elíptica</td></tr> <tr><td>Forma del ápice: Acuminado largo</td></tr> <tr><td>Forma de la base: Redondeada</td></tr> <tr><td>Presencia de Pulvinos: Presente</td></tr> <tr><td>Textura de la hoja: Cartácea</td></tr> <tr><td>Color de la hoja joven: Verde</td></tr> <tr><td>Presencia de antocianina en brote: Ausente</td></tr> </table>	Forma de la hoja: Elíptica	Forma del ápice: Acuminado largo	Forma de la base: Redondeada	Presencia de Pulvinos: Presente	Textura de la hoja: Cartácea	Color de la hoja joven: Verde	Presencia de antocianina en brote: Ausente		
Forma de la hoja: Elíptica										
Forma del ápice: Acuminado largo										
Forma de la base: Redondeada										
Presencia de Pulvinos: Presente										
Textura de la hoja: Cartácea										
Color de la hoja joven: Verde										
Presencia de antocianina en brote: Ausente										
FLOR										
	<table border="1"> <tr><td><b>Presencia de Antocianina en partes de la Flor.</b></td></tr> <tr><td>Pedúnculo: Ausente</td></tr> <tr><td>Sépalo: Ausente</td></tr> <tr><td>Limbo del pétalo: Ausente</td></tr> <tr><td>Filamento: Ausente</td></tr> <tr><td>Estaminodio: Intermedio</td></tr> <tr><td> </td></tr> </table>	<b>Presencia de Antocianina en partes de la Flor.</b>	Pedúnculo: Ausente	Sépalo: Ausente	Limbo del pétalo: Ausente	Filamento: Ausente	Estaminodio: Intermedio			
<b>Presencia de Antocianina en partes de la Flor.</b>										
Pedúnculo: Ausente										
Sépalo: Ausente										
Limbo del pétalo: Ausente										
Filamento: Ausente										
Estaminodio: Intermedio										
SEMILLA										
	<table border="1"> <tr><td>Color de la semilla: Blanco</td></tr> <tr><td>Color del cotiledón: Blanco</td></tr> <tr><td>Forma Longitudinal: Oblonga</td></tr> <tr><td>Forma Transversal: Intermedia</td></tr> <tr><td>Tamaño de la semilla: intermedio</td></tr> </table>	Color de la semilla: Blanco	Color del cotiledón: Blanco	Forma Longitudinal: Oblonga	Forma Transversal: Intermedia	Tamaño de la semilla: intermedio				
Color de la semilla: Blanco										
Color del cotiledón: Blanco										
Forma Longitudinal: Oblonga										
Forma Transversal: Intermedia										
Tamaño de la semilla: intermedio										

7. Ficha de descriptores morfológicos accesiones de *Theobroma cacao* L. grupo germoplásmico Criollo. Año: 2017. Fotografías tomadas por: Margarita Gómez. Ficha elaborada por: Margarita Gómez.

