

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



Universidad de El Salvador

Hacia la libertad por la cultura

**CARACTERIZACIÓN DE UNA COLECCIÓN DE *Theobroma cacao*,
MEDIANTE DESCRIPTORES MORFOLÓGICOS Y MARCADORES
MOLECULARES MICROSATÉLITES (SSRs), EN LA FINCA EL
CARMEN, MUNICIPIO DE NAHUILINGO, SONSONATE.**

TRABAJO DE GRADUACIÓN PRESENTADO POR:

WENDY GUADALUPE AYALA MARTÍNEZ

JORGE ALBERTO BENÍTEZ

PARA OPTAR AL GRADO DE:

LICENCIADO(A) EN BIOLOGÍA

CIUDAD UNIVERSITARIA, ABRIL 2021

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



Universidad de El Salvador

Hacia la libertad por la cultura

**CARACTERIZACIÓN DE UNA COLECCIÓN DE *Theobroma cacao*,
MEDIANTE DESCRIPTORES MORFOLÓGICOS Y MARCADORES
MOLECULARES MICROSATÉLITES (SSRs), EN LA FINCA EL
CARMEN, MUNICIPIO DE NAHUILINGO, SONSONATE.**

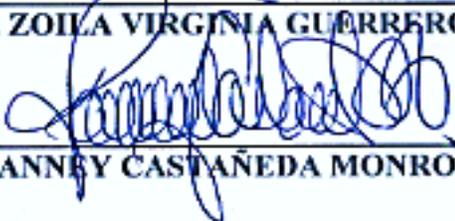
TRABAJO DE GRADUACIÓN PRESENTADO POR:

**WENDY GUADALUPE AYALA MARTÍNEZ
JORGE ALBERTO BENÍTEZ**

**PARA OPTAR AL GRADO DE:
LICENCIADO(A) EN BIOLOGÍA**

ASESORES:

F. 
MSc. ZOILA VIRGINIA GUERRERO MENDOZA

F. 
Dra. VIANNEY CASTAÑEDA MONROY DE ABREGO

CIUDAD UNIVERSITARIA, ABRIL 2021

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



Universidad de El Salvador

Apunta la libertad por la cultura

**CARACTERIZACIÓN DE UNA COLECCIÓN DE *Theobroma cacao*,
MEDIANTE DESCRIPTORES MORFOLÓGICOS Y MARCADORES
MOLECULARES MICROSATÉLITES (SSRs), EN LA FINCA EL
CARMEN, MUNICIPIO DE NAHUILINGO, SONSONATE.**

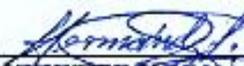
TRABAJO DE GRADUACIÓN PRESENTADO POR:

**WENDY GUADALUPE AYALA MARTÍNEZ
JORGE ALBERTO BENÍTEZ**

**PARA OPTAR AL GRADO DE:
LICENCIADO(A) EN BIOLOGÍA**

TRIBUNAL CALIFICADOR:

F. 
Lic. ROBERTO GUILLÉN PAREDES

F. 
Ing. LIZZETTE HERNÁNDEZ LOVATO

CIUDAD UNIVERSITARIA, ABRIL 2021

AUTORIDADES UNIVERSITARIAS

RRECTOR

MSc. ROGER ARMANDO ARIAS ALVARADO

SECRETARIO GENERAL

MSc. FRANCISCO ANTONIO ALARCÓN SANDOVAL

FISCAL GENERAL

Lic. RAFAEL HUMBERTO PEÑA MARÍN

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMATICA

DECANO

Lic. MAURICIO HERNAN LOVO CÓRDOVA

VICEDECANA

MSc. ZOILA VIRGINIA GUERRERO MENDOZA

SECRETARIO

Lic. JAIME HUMBERTO SALINAS ESPINOZA

DIRECTORA EN FUNCIONES DE LA ESCUELA DE BIOLOGÍA

MSc. ZOILA VIRGINIA GUERRERO MENDOZA

DEDICATORIA

A Dios todo poderoso por guiarme y mantenerme en pie aun en los momentos de dificultad.

A mis padres Mirna Edith Martínez de Ayala y Juan Carlos Ayala Chávez por su apoyo, su amor incondicional, por creer en mí y brindarme la oportunidad de estudiar una carrera académica.

A mis Angelitos Casto Raúl Ayala Chávez, Ángela Menéndez Chávez y Lucas Casto Ayala, que siempre en vida me brindaron su amor, su fortaleza, su fe y motivación para culminar mis estudios académicos.

A mi hermano David Ernesto por su apoyo y motivación en todo momento.

A mi tía Marta Guadalupe Ayala de Santillana, por todo su amor, motivación y guía durante todos mis estudios.

A mi novio, mejor amigo y compañero de tesis Jorge Benítez por trabajar de manera equitativa y laboriosa en este proyecto que emprendimos un día con un mismo fin culminar nuestras carreras Universitaria y formarnos al fin como profesionales.

A toda mi familia, amigos y compañeros por su apoyo y motivación en momentos difíciles.

A todos los maestros que formaron parte de mi educación y me guiaron en este arduo camino.

Wendy Guadalupe Ayala Martínez.

DEDICATORIA

A Dios todo poderoso y a la virgencita de Guadalupe por permitirme culminar una etapa importante de mi vida y por iluminarme siempre cuando más lo necesite.

A mis abuelos María Inés Benitez y Francisco Campos quienes fueron un pilar muy importante en el desarrollo de mi educación y de mi vida, quienes siempre creyeron en mí siempre y lucharon a la par mía siempre dándome la fuerza que necesitaba para poder llegar a triunfar en la vida.

A mi madre Yanira Inés Benítez y a mi padrastro José Zelaya quienes son un pilar fundamental en mi vida y siempre me han apoyaron y me han dado la fuerza para seguir adelante.

A mis hermanos Marisol Zelaya Benítez, a José Miguel Zelaya Benítez y a Walter Alexander Zelaya Benítez por ayudarme cuando lo necesite y darme ánimos a seguir adelante.

A mis tíos y primos por confiar en mí y darme ánimos.

A mi novia, amiga y compañera de tesis Wendy Guadalupe Ayala Martínez, por ser un pilar fundamental en mi vida, por darme los ánimos cuando ya los estaba perdiendo por luchar a mi lado durante la realización de esta tesis, por tantos desvelos y porque gracias a Dios y a su ayuda al fin terminamos esta tesis juntos y así cerrar una etapa de nuestra vida.

A la familia de mi novia por apoyarnos en los momentos que más lo necesitamos y por siempre darnos ánimos a seguir adelante.

Jorge Alberto Benitez.

AGRADECIMIENTOS

A Dios todo poderoso por permitirnos seguir adelante en nuestros estudios, guiarnos en todo nuestro camino y brindarnos la oportunidad de llevar a cabo este trabajo.

De forma especial a la Maestra Yanira Elisabeth López Ventura, a quien debemos en gran medida la culminación de este proyecto, en vida fue nuestra asesora, maestra y amiga, entregada siempre a su trabajo ejerció siempre su vocación muy profesional, empeñada siempre en dar lo mejor de sí, comprometida en transmitir sus conocimientos y consejos con el fin de formar estudiantes apasionados en esta bella carrera.

A nuestras asesoras y jurados MSc. Yanira López, MSc. Zoila Virginia Guerrero y Dra. Vianney Castañeda de Abrego, Ing. Lizzette Hernández Lovato y Lic. Roberto Guillen Paredes, quienes nos instruyeron mediante su conocimiento, apoyo y sus correcciones en este trabajo.

Al Ing. Milán Klimo, Ing. Elvis, Don Sami y todas las personas que amablemente acompañaron en los recorridos y muestreos en la Finca El Carmen.

A Blanca Margarita Gómez Guevara quien nos instruyó y nos brindó su experiencia en el área de la Biología molecular.

Al Doctor Saúl Díaz Peña, Ana Margarita Pérez, Lic. Gladis Quintanilla, Ing. Lizzette Hernández Lovato, Lic. Amy Morán, Don Carlitos y todas personas en CENSALUD que mostraron su cariño y apoyo durante el desarrollo de nuestro proyecto de graduación.

A nuestros maestros en la Escuela de Biología quienes compartieron sus conocimientos y contribuyeron en nuestra formación académica.

	Pag.
ÍNDICE DE CONTENIDO	
ÍNDICE DE TABLAS.....	IV
ÍNDICE DE FIGURAS.....	V
ÍNDICE DE GRÁFICAS.....	Viii
ÍNDICE DE ANEXOS.....	IX
RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	2
2. OBJETIVOS.....	3
2.1. OBJETIVO GENERAL.....	3
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	3
3. MARCO TEÓRICO.....	4
3.1. ORIGEN Y DISTRIBUCIÓN DE <i>Theobroma cacao</i>	4
3.2. TAXONOMÍA DE <i>Theobroma cacao</i>	5
3.2.1. MORFOLOGÍA DE <i>T. cacao</i>	6
3.2.1.1. SISTEMA RADICAL.....	6
3.2.1.2. TALLO DE <i>T. cacao</i>	7
3.2.1.3. HOJA DE <i>T. cacao</i>	7
3.2.1.4. FLOR DE <i>T. cacao</i>	8
3.2.1.5. FRUTO DE <i>T. cacao</i>	9
3.2.1.6. SEMILLA DE <i>T. cacao</i>	10
3.3. GRUPOS GENÉTICOS DE <i>T. cacao</i>	10
3.4. TIPOS GENÉTICOS DE CACAO PRESENTES EN EL SALVADOR.....	12
3.4.1. CRIOLLOS.....	12
3.4.2. FORASTEROS.....	13
3.4.3. TRINITARIOS.....	13
3.5. CARACTERIZACIÓN DE GERMOPLASMA.....	14
3.6. BANCOS DE GERMOPLASMA.....	15
3.7. MARCADORES MOLECULARES.....	15
3.8. ISOENZIMAS.....	17
3.9. MARCADORES DE ADN.....	17
3.9.1. Polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados (LOS RFLP).....	18
3.9.2. MICROSATÉLITES O SECUENCIAS CORTAS DE ADN (SSRs).....	18
3.10. APLICACIONES DE MARCADORES MOLECULARES EN EL MEJORAMIENTO DE <i>T. cacao</i>	19
3.11. MICROSATÉLITES EN LA IDENTIFICACIÓN DE GERMOPLASMA DE <i>Theobroma cacao</i>	19
3.12. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA.....	21
3.12.1. DESCRIPTORES.....	21
3.12.2. TIPOS DE DESCRIPTORES.....	21
3.12.2.1. DESCRIPTORES DE PASAPORTE.....	21
3.12.2.2. DESCRIPTORES DE MANEJO.....	22
3.12.2.3. DESCRIPTORES DEL SITIO Y EL MEDIO AMBIENTE.....	22
3.12.2.4. DESCRIPTORES DE CARACTERIZACIÓN.....	22
3.12.2.5. DESCRIPTORES DE EVALUACIÓN.....	22
3.13. ESTADOS DEL DESCRIPTOR Y TIPOS DE DATOS.....	23

3.13.1. FORMA CUALITATIVA.....	23
3.13.2. FORMA CUANTITATIVA.....	23
3.13.3. ORGANIZACIÓN DE LOS DATOS, MATRIZ BÁSICA DE DATOS...	24
3.14. MÉTODOS PARA EL ANÁLISIS DE DATOS DE CARACTERIZACIÓN.....	24
3.14.1. ESTADÍSTICOS SIMPLES.....	24
3.14.2. LA MEDIA ARITMÉTICA.....	24
3.14.3. EL RANGO DE VARIACIÓN O AMPLITUD TOTAL.....	25
3.14.4. EL COEFICIENTE DE VARIACIÓN.....	25
3.14.5. LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR.....	25
3.14.6. DENDOGRAMAS.....	25
3.15. MÉTODOS ESTADÍSTICOS MULTIVARIADOS APLICADOS EN BIOLOGÍA MOLECULAR.....	25
3.15.1 HETEROCIGOSIDAD ESPERADA.....	26
3.15.2. HETEROCIGOSIDAD OBSERVADA.....	26
3.15.3. ANÁLISIS DE VARIANZA MOLECULAR (AMOVA).....	26
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
4.1. ETAPA DE CAMPO.....	28
4.1.1. ETAPA DE CAMPO.....	29
4.1.2. TOMA DE DATOS EN CAMPO.....	30
4.1.3. SELECCIÓN DE LOS ÁRBOLES.....	30
4.2. CARACTERIZACION MORFOLÓGICA.....	31
4.2.1. HOJA.....	31
4.2.1.1. DESCRIPTORES CUALITATIVOS.....	31
4.2.1.2. DESCRIPTORES CUANTITATIVOS.....	32
4.2.2. FLOR.....	32
4.2.2.1. DESCRIPTORES CUALITATIVOS.....	32
4.2.3. FRUTO.....	33
4.2.3.1. DESCRIPTOPRES CUALITATIVOS.....	33
4.2.3.2. DESCRIPTORES CUANTITATIVOS.....	35
4.2.4. SEMILLA.....	35
4.2.4.1. DESCRIPTORES CUALITATIVOS.....	35
4.2.4.2. DESCRIPTORES CUANTITATIVOS.....	36
4.3. SELECCIÓN Y TOMA DE LA MUESTRA PARA LA ETAPA DE LABORARORIO.....	38
4.3.1. LIMPIEZA Y SECADO DE HOJAS DE <i>T. cacao</i>	38
4.4. CARACTERIZACION MOLECULAR.....	40
4.4.1. FASE DE MACERADO DE LAS HOJAS DE CADA ACCESIÓN DE <i>T.</i> <i>Cacao</i>	40
4.4.2. FASE DE EXTRACCIÓN DE ADN DE LAS HOJAS DE CADA ACCESIÓN DE <i>T. cacao</i>	41
4.4.2.1. PROCEDIMIENTO DE PURIFICACIÓN DE ADN DE PLANTAS....	41
4.4.2.1.1. LISADO DE LAS HOJAS.....	41
4.4.2.1.2. ENLACE DE ADN (BINDING DNA).....	41
4.4.2.1.3. LAVADO DE ADN.....	42
4.4.2.1.4. ELUCIÓN DE ADN.....	42
4.4.3. FASE VISUALIZACIÓN DEL GEL DE CALIDAD DE ADN.....	43

4.4.3.1. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PARA LA VISUALIZACION DE LA CALIDAD DE ADN DE CADA UNA DE LAS ACCESIONES.....	43
4.4.4. FASE DE AMPLIFICACIÓN DEL ADN POR PCR Y VISUALIZACIÓN DEL GEL DE AGAROSA PARA LA TOMA DE DATOS.....	44
4.4.4.1. MIGRACIÓN DE ADN EN GEL DE AGAROSA.....	45
4.4.4.2. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS.....	46
5. RESULTADOS.....	48
5.1. CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS.....	48
5.1.1. EVALUACION DE VARIABLES CUALITATIVAS.....	48
5.1.1.1. HOJA.....	50
5.1.1.2. FLOR.....	50
5.1.1.3. FRUTO.....	50
5.1.1.4. SEMILLA.....	51
5.1.2. EVALUACIÓN DE VARIABLES CUANTITATIVAS.....	51
5.1.2.1. HOJA.....	51
5.1.2.1.1. LARGO DE LA HOJA.....	51
5.1.2.1.2. ANCHO DE LA HOJA.....	52
5.1.2.1.3. RELACION LARGO/ANCHO DE LA HOJA.....	52
5.1.2.2. FRUTO.....	53
5.1.2.2.1 LARGO DEL FRUTO.....	53
5.1.2.2.2 ANCHO DEL FRUTO.....	53
5.1.2.2.3. RELACIÓN LARGO/ANCHO DEL FRUTO.....	54
5.1.2.2.4. NÚMERO DE SEMILLAS POR FRUTO.....	54
5.1.2.3. SEMILLA.....	56
5.1.2.3.1. LARGO DE LA SEMILLA.....	56
5.1.2.3.2. ANCHO DE LA SEMILLA.....	56
5.1.2.3.3. RELACION LARGO/ANCHO DE LA SEMILLA.....	57
5.2. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR.....	58
6. DISCUSIÓN.....	62
7. CONCLUSIONES.....	64
8. RECOMENDACIONES.....	65
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67
10. ANEXOS.....	72

INDICE DE TABLAS

Nº		Pág.
1.	Clasificación taxonómica de <i>Theobroma cacao</i>	7
2.	Matriz básica de datos (Franco e Hidalgo, 2003).....	25
3.	Marcadores microsatélites SSRs utilizados para la amplificación de ADN de cada una de las accesiones (Lanaud et al, 1999 y Motamayor et al, 2008).....	45
4.	Características morfológicas cualitativas que se utilizaron en el análisis de las accesiones de <i>T. cacao</i>	49
5.	Caracterización de los descriptores cualitativos de la hoja, flor, fruto y semilla, según el porcentaje en que fueron encontrados de acuerdo al análisis del descriptor morfológico utilizado.....	49
6.	Accesiones con menor y mayor número de semillas por fruto.....	56
7.	Descriptores morfológicos cuantitativos con los valores máximos, mínimos y la media de las 76 accesiones de <i>T. cacao</i>	59
8.	Número de alelos y Heterogocidad de las 76 accesiones de <i>T. cacao</i> evaluado mediante el estadístico Gen Alex.....	60

ÍNDICE DE FIGURAS.

N°		Pág.
1.	Distribución de grupos genéticos naturales de cacao (Lachenaud, 1997 y Motamayor et al, 2008).....	5
2.	Zonas productoras de cacao en El Salvador durante la época precolombina (A) Núcleo primario de los Izalcos; (B) Núcleo secundario San Miguel (Castañeda et al, 2016).....	6
3.	Morfología del árbol de <i>T. cacao</i> (Jiménez et al, 2007).....	7
4.	Tallo de árbol de <i>T. cacao</i> con crecimiento dismorfico (García y Martínez, 2018).....	8
5.	(A) Brotes de hojas jóvenes de cacao con tonos verde pálido y rojizos; (B) Hojas maduras de árbol de cacao (Estrada et al, 2011 y García y Martínez, 2018).....	8
6.	(A) Cojín floral; (B) Partes de la flor de cacao (Castañeda et al, 2016).....	10
7.	Frutos de cacao, la flecha indica el arilo blanco que recubre a la semillas (Fotografía tomada por Wendy Ayala, 2018).....	10
8.	Colores de cotiledones de <i>T. cacao</i> según el grupo genético al que pertenecen (Jiménez et al, 2007).....	11
9.	Grupos genéticos de <i>T. cacao</i> L. (A) frutos de cacao Criollo; (B) Frutos de cacao Forastero y (C) Frutos de cacao Trinitario (Arévalo et al, 2017).....	12
10.	(A) Frutos de cacao Criollo y (B) cotiledones de cacao Criollo (Fotografías tomadas por Wendy Ayala, 2018).....	14
11.	(A) Fruto de cacao Forastero y (B) Cotiledones característicos de cacao Forastero (Fotografías tomadas por Wendy Ayala, 2018).....	14
12.	A) Frutos de cacao Trinitario y (B) cotiledones de cacao Trinitario (Arévalo et al, 2017).....	15
13.	Origen del Clúster genético (Motamayor et al, 2008).....	22
14.	Tipos de datos y descriptores (Franco e Hidalgo, 2003).....	25
15.	Ubicación geográfica de Finca El Carmen, Municipio de Nahuilingo, Departamento de Sonsonate.....	29
16.	(A) Mapa del departamento de Sonsonate señala con flecha roja la Ubicación de Finca El Carmen; (B) Mapa amplificado de Finca El Carmen Municipio de Nahuilingo Sonsonate.....	30
17.	Árbol de <i>T. cacao</i> con cosecha superior a cincuenta frutos, ejemplifica una de las características utilizadas en la selección de los muestreos (Fotografías tomadas por Wendy Ayala, 2018).....	31
18.	Selección de las mazorcas con características de interés: buen porte, tamaño y cantidad de semillas indicadas para la selección en el muestreo (Fotografías tomadas por Wendy Ayala, 2018).....	31
19.	Tabla de colores utilizada para la clasificación de los colores de las hojas jóvenes y maduras (Los códigos de los colores utilizados corresponden a la marca Sherwin Williams).....	32

20.	Base de la hoja clasificada según el ángulo interno que conforma el margen de la hoja con la nervadura central: 1 = 90° aguda, 2 = $90^\circ$$150^\circ$ obtusa, 3 = $151^\circ$$180^\circ$ redondeada y 4 = cordiforme (Jiménez, 2007).....	32
21.	Hojas de cacao con presencia de pulvínulo (Fotografías tomadas por Wendy Ayala, 2018).....	33
22.	Relación de la longitud Largo/Ancho de las hojas de <i>T. cacao</i> (Jiménez, 2007).....	33
23.	(A) Color de la hoja joven y madura; (B) Longitudes Largo/Ancho de la hoja joven y madura (Fotografías tomadas por Wendy Ayala, 2018).....	33
24.	Tabla de colores utilizada para la clasificación de los colores del pedúnculo floral (Los códigos de los colores utilizados corresponden a la marca Sherwin Williams).....	34
25.	(A) Presencia y ausencia de antocianinas en sépalos de las flores de cacao;(B) Antocianinas en pétalos de flores de cacao (Fotografías tomadas por Wendy Ayala, 2018).....	34
26.	Tabla de colores utilizada para la clasificación de los colores de los frutos jóvenes y maduros (Los códigos de los colores utilizados corresponden a la marca Sherwin Williams).....	34
27.	Frutos de <i>T. cacao</i> según el fenotipo: 1=Oblongo, 2=Elíptico, 3=Ovoidal, 4=Redondeada, 5=esferoide (Jiménez et al, 2007 y García, 2012).....	35
28.	Ápice del fruto de <i>T. cacao</i> según su fenotipo: (1) Atenuada, (2) aguda, (3) obtusa, (4) redondeada y (5) mamiforme o apezonada (Jiménez et al, 2007 y Castañeda et al, 2016).....	35
29.	Rugosidad de la superficie del fruto de cacao (García, 2012).....	35
30.	Forma, rugosidad de colores correspondientes a los frutos maduros e inmaduros (Fotografías tomada por Wendy Ayala, 2018).....	36
31.	Tabla de medición utilizada para obtener la longitud de los frutos (largo y ancho) (Fotografía tomada por Wendy Ayala, 2018).....	36
32.	Tabla de colores utilizada para la clasificación de los tonos de las semillas, dicha paleta presenta los códigos de colores de la marca Sherwin Williams....	37
33.	Morfología y colores que presenta la semilla de <i>T. cacao</i> (Jiménez et al, 2007).....	37
34.	Mediciones de las longitudes de la semillas de <i>T. cacao</i> (fotografías tomadas por Wendy Ayala, 2018).....	37
35.	Protocolo de etapa de campo.....	38
36.	Lavado y secado de accesiones de <i>T. cacao</i> en el laboratorio para continuar con el proceso de extracción de ADN (Fotografías tomadas por Margarita Pérez, 2018).....	39
37.	Secado de muestras en incubadora a 55°C (fotografía tomada por Wendy Ayala, 2018).....	40
38.	El laboratorio de CENSALUD, Universidad de El Salvador, en la Ciudad de San Salvador; cuyas Coordenadas geográficas son 13°42'54.67" N y 89°11'54.01" O.....	41
39.	Protocolo de laboratorio.....	48
40.	Dendograma mediante el algoritmo UPGMA para las 76 accesiones de <i>T. cacao</i> , basado en el índice de disimilitud de Jaccard.....	62

41. Matriz de distancia de Jaccard con 76 accesiones de *T. cacao* en donde se muestra la distribución de los individuos en un espacio de baja dimensión..... **63**

ÍNDICE DE GRÁFICAS.

Nº		Pág.
1.	Distribución de frecuencia del largo de la hoja.....	53
2.	Distribución de frecuencia del ancho de la hoja.....	53
3.	Distribución de frecuencia del largo/ancho de la hoja.....	54
4.	Distribución de frecuencia del largo del fruto.....	55
5.	Distribución de frecuencia del ancho del fruto.....	55
6.	Distribución de frecuencia del largo/ancho del fruto.....	56
7.	Distribución de frecuencia del número de semillas por fruto.....	57
8.	Distribución de frecuencia del largo de la semilla.....	58
9.	Distribución de frecuencia del ancho de la semilla.....	58
10.	Distribución de frecuencia del largo/ancho de la semilla.....	59

ANEXOS.

N°		Pág.
1.	Gel de agarosa utilizado para determinar la calidad del ADN de las accesiones.	72
2.	Gel de agarosa con ADN de producto de PCR.....	72
3.	Gel de agarosa con 35 ADN's producto de PCR.....	73
4.	Gel de agarosa visto por medio de un Documentador de geles.....	73
5.	Etiquetas para las muestras que fueron utilizadas durante los muestreos.....	74
6.	Hoja de colecta de la toma de datos en campo.....	74
7.	Descriptores cuantitativos de la hoja (largo, ancho y relación largo/ancho)....	75
8.	Descriptores cualitativos de la hoja y la flor.....	77
9.	Descriptores cualitativos del fruto.....	80
10.	Descriptores cuantitativos del fruto (largo, ancho, la relación largo/ancho y número de semillas por fruto).....	83
11.	Descriptores cualitativos de la semilla.....	86
12.	Descriptores cuantitativos de la semilla (largo, ancho y la relación largo/ancho).....	89
13.	Siglas.....	91
14.	Unidades de medida.....	92
15.	Glosario.....	93

RESUMEN

En El Salvador en la época precolombina El cultivo de *Theobroma cacao* se exportó a gran escala y tuvo un papel muy importante como núcleo primario en la zona de los Izalcos y núcleo secundario en San Miguel. Pese a esto actualmente son pocos los estudios realizados para la identificación y caracterización del germoplasma de Cacao en el país.

Esta investigación tuvo por objetivo Caracterizar una colección de *Theobroma cacao*, mediante descriptores morfológicos y marcadores moleculares Microsatélites (SSRs), en la finca El Carmen, municipio de Nahuilingo, Sonsonate. Se evaluaron 76 accesiones de *T. cacao* utilizando 24 descriptores morfológicos más representativos según el CIRAD (Lanaud et al, 1999 y Dubon et al, 2016), de los cuales se consideraron como los más discriminantes la forma de la semilla con el 44% para la forma elíptica, la forma del ápice del fruto más predominante atenuada con 45%, la forma del fruto fue la oblonga con 35%, la rugosidad del fruto con 62% fue la intermedia, resultados que indicaron la presencia de tipos Híbrido y Criollo.

Se utilizaron 12 marcadores microsatélites SSRs, donde todos los cebadores presentaron el 100% de polimorfismo, el número de alelos detectados por locus osciló entre 2 a 10, con un total de 64 alelos. La heterocigosidad observada varió entre 0.0 a 0.274, mientras que la heterocigosidad esperada osciló entre 0.328 a 0.749.

El cebador con mayor número de alelos efectivo fue MTcCIR12 con 3.991 y el cebador con menor número de alelos efectivo fue MTcCIR24 con 1.488 lo que indica que estos marcadores son discriminantes. El análisis mediante el algoritmo de ligamiento promedio, de acuerdo con la medida de similitud del índice de Jaccard se obtuvo 39 grupos de las 76 accesiones a una distancia de 0.91, donde el individuo más distante fue la accesión SESELC20 con un valor de 0.20, mientras que 39 accesiones presentaron un valor alto de similaridad entre ellas.

Se realizó un análisis de coordenadas principales a partir de la matriz de distancia de Jaccard donde se logró visualizar la distribución de los individuos en un espacio de baja dimensión donde se observaron dos grupos que acumularon la mayor variabilidad.

Mediante el análisis molecular se encontró únicamente la presencia de cacao tipo Criollo con 94% y 6% de hibridación, indicando la importancia de los análisis moleculares.

1. INTRODUCCIÓN.

El cacao representó una especie de gran importancia para diversas culturas indígenas que habitaron Centroamérica y Mesoamérica, quienes lo utilizaban como una bebida sagrada y como trueque o moneda (Browning, 1968, Osorio, 2009 y Aystas, 2009). El nombre del género *Theobroma* significa "alimento de los Dioses", comprende alrededor de unas 25 especies, pero solo una (*Theobroma cacao* L.) es cultivado con fines comerciales (Castañeda et al, 2016). El cacao pertenece a la familia de las Malvaceae; a la subfamilia Byttnerioideae y puede tener entre 10 mil a 20 mil genes (Phillips, 1995). Tradicionalmente desde el punto de vista botánico *T. cacao* ha sido clasificado en tres grupos genéticos que poseen un origen geográfico particular: El Forastero o Amazónico originario del Alto y bajo Amazonas, por otro lado El Criollo distribuido en Mesoamérica, norte de Venezuela y Colombia y El trinitario producto de la hibridación entre el Criollo Mesoamericano y el Forastero (Castañeda et al, 2011).

Entre 1920 y 1940 se iniciaron las primeras colecciones de germoplasma de *T. cacao*, por diferentes científicos en el mundo, utilizando únicamente los marcadores morfológicos o conocidos también marcadores agro-morfológicos; sin embargo gracias a los avances en la Genética y la Biología Molecular (Lanaud et al, 1999) se implementó el uso de los Marcadores Moleculares SSRs en accesiones de *T. cacao*. Con dicha herramienta se conoció la caracterización genética en individuos ubicados en los diferentes bancos de germoplasma del mundo, logrando determinar el estado de homocigosis y heterocigosis en que se encuentran las regiones específicas dentro del cromosoma, características muy útiles para la selección objetiva de materiales élites, lo que ha permitido el establecimiento de identidades de genotipos, las relaciones genéticas y la elección de programas internacionales de cría y fitomejoramiento de *T. cacao*.

En esta investigación se seleccionaron 76 accesiones de *T. cacao* de la Finca el Carmen, Municipio de Nahuilingo, Sonsonate, dichas accesiones fueron sometidas a 24 descriptores morfológicos y 12 marcadores moleculares microsatélites (SSRs) desarrollados por el CIRAD (Lanaud et al, 1999) e implementados por (Carrión, 2012 y Gómez, 2019). Con la finalidad de determinar la diversidad y pureza genética de los diferentes genotipos de *T. cacao*, que son conservados en dicho sitio.

2. OBJETIVOS.

2.1. OBJETIVO GENERAL.

- Caracterizar una colección de *Theobroma Cacao*, mediante descriptores morfológicos y marcadores moleculares Microsatélites (SSRs), en la finca El Carmen, municipio de Nahuilingo, Sonsonate.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- 1- Analizar mediante los principales descriptores morfológicos una colección de *Theobroma cacao*, en la finca El Carmen, municipio de Nahuilingo, Sonsonate.
- 2- Reconocer la pureza genética de una colección de *Theobroma cacao* mediante marcadores moleculares Microsatélites SSRs, en la finca El Carmen, municipio de Nahuilingo, Sonsonate.

3. MARCO TEÓRICO.

3.1. ORIGEN Y DISTRIBUCIÓN DE *Theobroma cacao*.

Se cree que la población de *Theobroma cacao* se distribuyó de forma natural desde la cuenca del Amazonas hasta el sur de México y las poblaciones se convirtieron en dos diferentes formas geográficas separadas por el istmo de Panamá; dichas formas originales al ser aisladas se diferenciaron en gran medida presentando caracteres particulares dando origen a subespecies con cruzamiento viable, es decir a híbridos fértiles (Cuatrecasas, 1964; Ayestas, 2009 y Dostert et al, 2011).

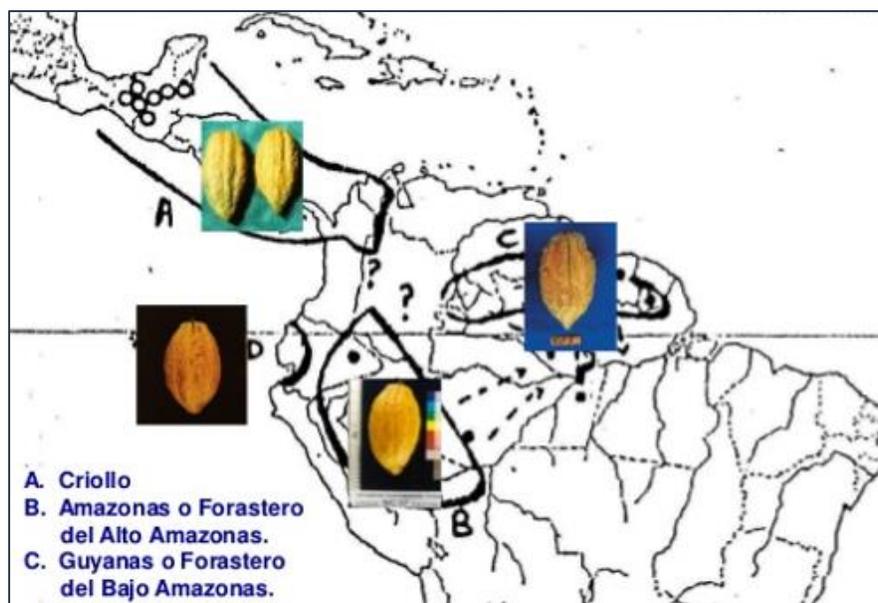


Figura 1. Distribución de grupos genéticos naturales de cacao (Lachenaud, 1997 y Motamayor et al, 2008).

Se ha encontrado evidencia arqueológica que antes de la llegada de los españoles, grupos étnicos como las culturas mayas y aztecas ya cultivaban *T. cacao* y que a su vez fueron responsables de dispersar las semillas (Browning, 1968; Osorio, 2009 y Ayestas, 2009). Recientemente los científicos han descubierto que el cacao se originó en el alto Amazonas en sur América y luego fue domesticado por las diferentes culturas y grupos étnicos en América central, dichas investigaciones han sido realizadas a nivel genético y se basan en análisis de microsatélites y el polimorfismo de longitud en los fragmentos de restricción RFLP (Osorio, 2009).

Motamayor et al, (2002) propusieron "la teoría de Refugios", argumentando el aislamiento que dio origen a poblaciones más uniformes de cacao, incluyendo a "Criollos", según la teoría esto sería consecuencia de ciclos de contracción y expansión de bosques de galería a lo largo de ríos dispersos, ocasionados por transformaciones geológicas y climas extremos durante el periodo cuaternario. Consecutivamente, la domesticación y la selección dieron lugar a "Cuellos de botella" poblaciones adicionales y a la fijación de ciertos caracteres distintivos.

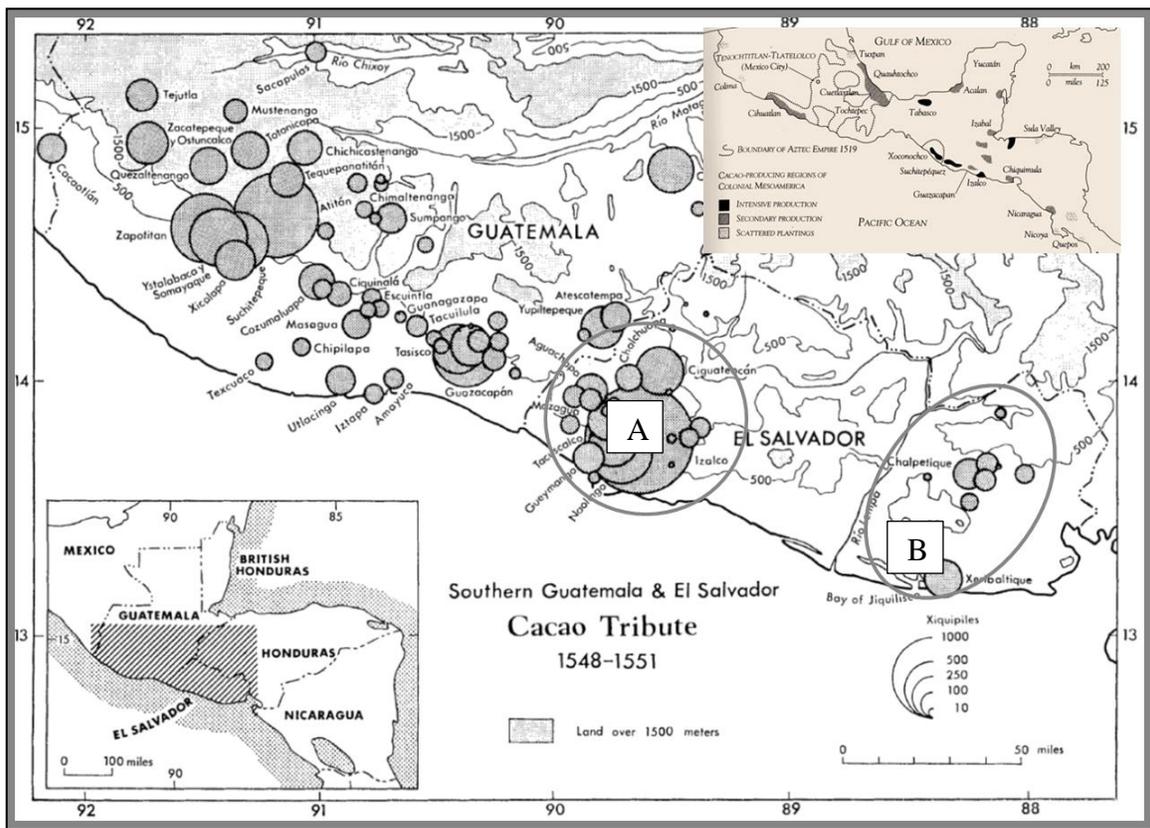


Figura 2. Zonas productoras de cacao en El Salvador durante la época precolombina: A) Núcleo primario los Izalcos; B) Núcleo secundario San Miguel (Castañeda et al, 2016).

3.2. TAXONOMÍA DE *Theobroma cacao*.

Se ha investigado arduamente la sistemática de esta especie y aunque la especie está claramente delimitada, aún existen interrogantes en torno a la posición sistemática exacta y su contexto evolutivo (Dostert et al, 2011). Comprende alrededor de 22 especies que son

originarias de Bosques húmedos tropicales. Esta planta puede tener entre 10 mil a 20 mil genes (Gómez, 2019 y Phillips, 1995). El género y especie *Theobroma cacao* corresponde a la familia Malvaceae. El nombre *Theobroma* significa "Alimento de los Dioses", pero solo *T. cacao* se cultiva a nivel comercial (García, 2018 y Castañeda et al, 2016).

Tabla 1. Clasificación taxonómica de *Theobroma cacao* (Gómez, 2018).

Reino	Plantae
Sub-reino	Tracheobionta
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Dileniidae
Orden	Malvales
Familia	Malvaceae
Subfamilia	Byttnerioideae
Tribu	Theobromeae
Género	<i>Theobroma</i>
Especie	<i>T. cacao</i> L.



Figura 3. Morfología del árbol de *T. cacao* (Jiménez et al, 2007).

3.2.1. MORFOLOGÍA DE *T. cacao*.

El arbusto o árbol de *T. cacao* puede llegar a medir entre 12-20 metros de altura, sin embargo, normalmente en un cultivo se mantiene entre los 4 a 8 metros, el tallo es glabro o parcialmente pubescente en plántulas jóvenes, la corteza puede presentar un color gris a café oscuro, las ramas son cafés y a veces presentan vellosidades (Dostert et al, 2011 y Gómez, 2018).

3.2.1.1. SISTEMA RADICAL.

T. cacao posee una raíces principal denominada pivotante aunque el modo de reproducción de la planta, así como la estructura, textura y consistencia del suelo son

características que inciden fundamentalmente en el desarrollo y forma de las raíces. Se ha determinado que si el suelo presenta buena aireación y suficiente profundidad la raíz puede llegar crecer y desarrollarse hasta 2 metros de profundidad (Gómez, 2018).

3.2.1.2. TALLO DE *T. cacao*.

El tallo desarrolla un crecimiento dismorfo, en su primera fase de crecimiento es ortotrópico (vertical) durante un periodo de 12-15 meses, finalmente se interrumpe pasado ese tiempo y se da la formación de 4-5 ramitas secundarias (“horqueta”), que son de crecimiento plagiotrópico (García y Martínez, 2018).



Figura 4. Tallo de árbol de *T. cacao* con crecimiento dismorfo (García y Martínez, 2018).

3.2.1.3. HOJA DE *T. cacao*.

El tamaño de las hojas es según los caracteres genéticos y la posición en que estén presentes en el árbol, las hojas que se ubican en la periferia del árbol se someten más a la luz solar por lo que son más pequeñas en comparación a las que están en el medio del tronco del árbol (Castañeda et al, 2016).

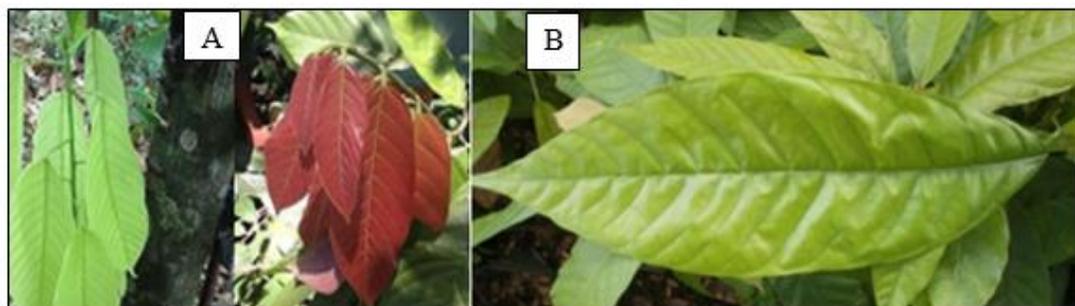


Figura 5. Brotes de hoja joven de cacao con tonos verde pálido y rojizo A) y B) Hoja madura de árbol de cacao (García y Martínez, 2018).

En el haz y el envés la hoja suele tener superficie lisa y brillante, con colores morados hasta verde pálido (Pérez, 2009; Dostert et al, 2011 y Castañeda et al, 2016). La longitud del peciolo en ramas ortotrópicas es más grande y en ramas plagiotrópicas el peciolo suele ser más pequeño (Castañeda et al, 2016).

3.2.1.4. FLOR DE *T. cacao*.

Una planta de *T. cacao* puede llegar a producir de 100.000 a 150.000 flores por año (Pérez, 2009 y Castañeda et al, 2016). Las inflorescencias suelen ser caulinares y cimosas, las flores son actinomorfas, hermafroditas y pentámeras, su péndulo floral suele ser de 1-3 cm (Dostert et al, 2011). Las flores del cacao suelen aparecer en estructuras vegetativas denominadas cojines florales y se localizan en el punto de inserción de la hoja tanto en el tronco como en las ramas (ver Figura 6. A) (Castañeda et al, 2016).

Las estructuras que componen la flor son el pedicelo largo y fino de 1.0 a 1.5 cm de longitud, cinco sépalos agudos de 6 a 8 mm de largo, la corola de cinco pétalos, un tubo estaminal compuesto de cinco estambres fértiles cortos y doblados hacia afuera encerrados en un pétalo cada uno, poseen cinco estaminodios internos, agudos, largos y erectos que están rodeando al gineceo, presenta un ovario súpero con cinco celdas y placentación central que contiene de 30 a 50 rudimentos seminales, el estilo suele abrirse mediante cinco ramas estigmáticas algunas de las cuales se encuentran usualmente soldadas, las anteras se encuentran recurvadas hacia afuera bordeadas por los pétalos, separadas del estigma por los estaminodios, por ello es necesario para la flor obtener el polen de otra flor para que ocurra la fecundación; sin embargo debido a la frecuencia de autocompatibilidad de un gran número de las flores de cacao solo el 5% de ellas son fecundadas y llegan a producir un fruto (Pérez, 2009).

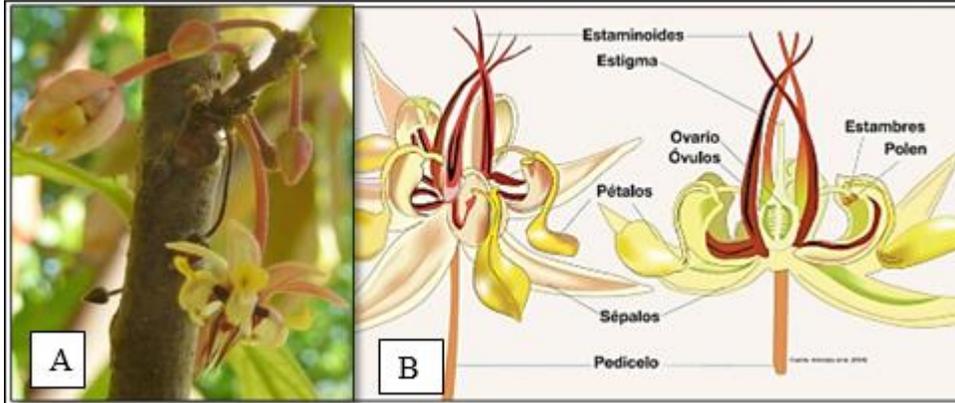


Figura 6. A) Cojín floral fotografía tomada por (Wendy Ayala, 2018). B) Partes de la flor de cacao (Castañeda et al, 2016).

3.2.1.5. FRUTO DE *T. cacao*.

El fruto del cacao se denomina botánicamente como una baya grande, que también es llamada mazorca, la forma del fruto suele ser de tipo polimorfa, esférica a fusiforme, (Dostert et al, 2011). Los frutos suelen tardar en madurar de 5 a 6 meses después de ser polinizados, tanto el tamaño como la forma de los frutos suelen cambiar según las características genéticas, el medio ambiente donde crece y se desarrolla el árbol así como también el manejo en la plantación; el color de los frutos suele ser de acuerdo a las características genéticas que presente, las tonalidades de la mazorca suelen ser de verdes, amarillos a púrpuras (Castañeda et al, 2016). En ocasiones la superficie del fruto suele presentar ciertas rugosidades o



protuberancias, este carácter suele adjudicarse según los grupos genéticos (ver figura 27) (García, 2012).

Figura 7. Frutos de cacao, la flecha indica el arilo blanco que recubre a las semillas (Fotografía tomada por Wendy Ayala, 2018).

3.2.1.6. SEMILLA DE *T. cacao*.

La pulpa que reviste a las semillas de cacao se denomina arilo de color blanco, cuyas semillas o cotiledones presentan formas y colores característicos al grupo genético al que pertenecen, la forma oblonga de color rosa o lila suele corresponder a Trinitario, la forma elíptica de tonalidad blanca o crema destaca el cacao Criollo y la forma ovoide de tonalidades morado intenso a ocres corresponde al cacao Forastero (Jiménez et al, 2007).



El tamaño de dichas semillas es entre 1.2 a 3 cm, el fruto del cacao puede llegar a tener entre 20, 40 o 60 semillas según el tipo genético del cual procedan (Pérez 2009; Ayestas 2009; Dostert et al, 2011 y Castañeda et al, 2016).

Figura 8. Colores de cotiledones de *T. cacao* según el grupo genético al que pertenecen (Jiménez et al, 2007).

3.3. GRUPOS GENÉTICOS DE *T. cacao*.

Desde la perspectiva botánica las formas de cacao se clasifican tradicionalmente en tres grupos genéticos que poseen un origen geográfico singular; Criollo: distribuido en Mesoamérica, norte de Venezuela y Colombia; Forastero o Amazónico: cuya distribución es el alto y bajo Amazonas y Trinitario: producto de la hibridación del Criollo Mesoamericano y el Forastero (Castañeda et al, 2011). Sin embargo en la actualidad a través de nuevos estudios se ha mostrado que la clasificación habitual no describe totalmente la variabilidad de las especies, como es el caso del grupo Forastero, ya que abarca una alta variabilidad genética, mientras que las formas de cacao Criollo son genéticamente más estrechas y definidas (Dostert et al, 2011).

Los grupos genéticos de cacao Criollo y Forastero presentan disimilitudes morfológicas que establecen de forma clara la discrepancia entre ambos grupos; por otro lado el grupo genético Trinitario por ser una mezcla o hibridación natural entre los grupos Criollo y Forastero, comparten un alto porcentaje de características morfológicas (Castañeda et al,

2011). Se ha determinado en estudios sobre la diversidad genética del cacao Criollo respecto al Forastero y Trinitario, en que la base genética del cacao Criollo existente es muy estrecha pese a la amplia distribución entre Colombia, Venezuela y el sur de México, demostrando que el grupo de los Forasteros presentan una mayor variabilidad genética, por otro lado el grupo de cacao Trinitario presenta una alta variabilidad donde se ubican genotipos semejantes a los grupos de cacao Criollo y Forastero encontrando un gran número de genotipos con características intermedias entre ambos grupos, este descubrimiento originó “La teoría del cacao Criollo Moderno”, cuyos genotipos corresponden a híbridos con cierta similitud a los cacaos Trinitarios que se encuentran distribuidos ampliamente en Centro América (Motamayor et al, 2002).

Mediante marcadores moleculares Motamayor et al, (2003) determinó que el cacao Criollo Antiguo es altamente homocigótico y poco polimórfico, en contrario a los cacaos Criollos Modernos que se mantienen en colecciones de germoplasma o en algunas plantaciones, con frecuencia los Criollos encontrados en las plantaciones se han considerado como Criollos Antiguos con introgresiones más o menos fuertes de Forasteros provenientes de la baja Amazonia. Los marcadores han indicado que los cacaos Criollos Modernos, son en realidad formas híbridas comparables a los Trinitarios y la variabilidad morfológica observada podría ser el resultado de formas híbridas diferentes con porciones cromosómicas provenientes solo de Forastero, Criollo o híbridos dependiendo de la región (Motamayor et al, 2003; Salazar, 2016).

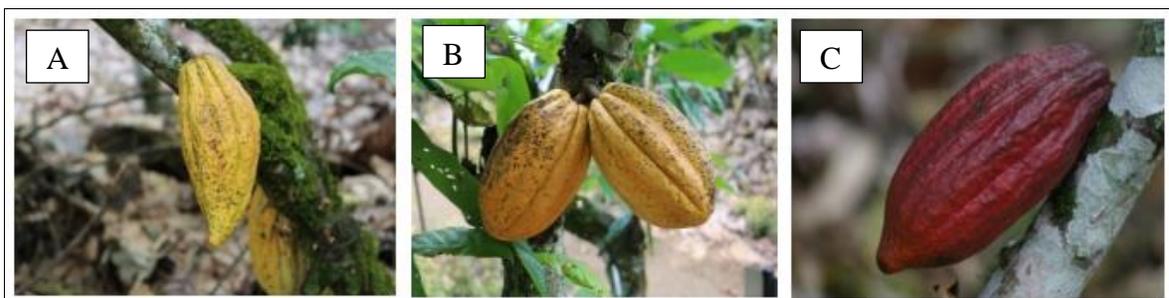


Figura 9. Grupos genéticos de *T. cacao* A) fruto de cacao Criollo, B) fruto de cacao Forastero y C) fruto de cacao Híbrido Trinitario (Arévalo et al, 2017).

3.4. TIPOS GENÉTICOS DE CACAO PRESENTES EN EL SALVADOR.

Tradicionalmente el cacao ha sido clasificadas en tres grupos: Criollos y Forasteros y su forma híbrida denominada Trinitaria; cada una distinguida morfológicamente por sus mazorcas, semillas y calidad de chocolate (Cuatrecasas, 1964 y Salazar, 2016).

3.4.1. CRIOLLOS.

El cacao Criollo fue probablemente domesticado por los mayas hace más de 3000 años, hasta la mitad inicial del siglo XVIII fue la forma de cacao que se cultivó con mayor frecuencia (Dostert et al, 2011). Los árboles son bajos y menos robustos en comparación a otras variedades, la copa es redonda, las hojas suelen ser ovaladas, de color verde claro muy gruesas, la forma del fruto suele ser cilíndrico con diez surcos profundos o cinco en pares, el pericarpio con o sin depresión en el centro, normalmente presenta una capa lignificada en el centro del pericarpio, con puntas agudas en cinco ángulos, rectas o recurvadas, la semilla posee un excelente sabor y buena fermentación.

El cacao Criollo posee características aromáticas que difieren en gran medida a los de tipo Forastero. Muchos países productores de cacao como Venezuela los consideran un elemento estratégico para el desarrollo económico (Salazar, 2016). El fruto característico del cacao Criollo, posee forma de la base elíptica, forma del ápice obtuso, con rugosidad de la cascara es fuerte, color en el estado inmaduro suele ser verde pigmentado y el color del fruto maduro puede variar en algunos casos es de tonalidad verde grisáceo hasta morado intenso (Ver figura 9. A) (García, 2012).

Este tipo de cacao posee un cotiledón de color marfil a castaño claro (Ver figura 10. B). La forma de la semilla o cotiledón se encuentra en sección longitudinal elíptica, en forma en sección transversal es redondeada, con un olor a cacao dulce unido a un aroma delicado característico (García, 2012; Pérez, 2009 y Osorio, 2009).



Figura 10. A) Fruto de cacao Criollo y B) Cotiledones de cacao Criollo (Fotografías tomadas por Wendy Ayala, 2018).

3.4.2. FORASTEROS.

Los cacaos forasteros suelen ser conocidos como amazónicos, son originarios de Sur América, este tipo de cacao comprende aquellos que no son criollos ni de origen híbridos (Dostert et al, 2011). El fruto de cacao Forastero, forma redondeada a elíptica, su textura suele ser en forma lisa (ver figura 11. A) (García, 2012). Este grupo presenta mayor resistencia a enfermedades en comparación con los criollos, posee un follaje intenso y los árboles suelen ser muy vigorosos, presentan frutos o mazorcas ovoides, amelonadas, con diez surcos superficiales o profundos, endocarpos ligeramente verrugosos a lisos, delgadas a gruesas con una capa lignificada al centro del pericarpio, los extremos redondos y en



ocasiones con un pequeño cuello de botella en la base (Osorio, 2009). Poseen granos aplanados, pequeños de color morado y sabor amargo (Pérez, 2009). (Ver figura 11. B).

Figura 11. A) Fruto de cacao Forastero y B) Cotiledones característicos de cacao Forastero (Fotografías tomadas por Wendy Ayala, 2018).

3.4.3. TRINITARIOS.

Este grupo surgió a mediados del siglo XVIII, se ha considerado genéticamente muy heterogéneo y morfológicamente polimorfo (Dostert et al, 2011). En la actualidad se cultiva

en México, Centro América, Colombia, Venezuela, Oeste de África y suroeste de Asia (Osorio, 2009).

Están constituidos por poblaciones híbridas a partir de cruces naturales entre Criollos y Forasteros, algunos se consideran poblaciones segregadas que naturalmente se originaron de Forasteros de bajo Amazonas y Criollos, esta hibridación dio origen a diferentes formas de frutos conocidos como amelonado, cundeamor, angoleta y calabacillo (Castañeda et al, 2016 y Ruiz, 2014). Las plantas de los Trinitarios se usan como material de injerto para multiplicarlo sin perder las características, los mejores cruces combinan la rusticidad del cacao Forastero con el sabor del cacao Criollo (Osorio, 2009). Los frutos de los Trinitarios son verdes, rojizos hasta amarillos y con semillas violeta claro a violeta oscuro (Dostert et al, 2011).



Figura 12 A) Fruto de cacao Trinitario y B) cotiledones de cacao Trinitario (Arévalo et al, 2017).

3.5. CARACTERIZACIÓN DE GERMOPLASMA.

Una caracterización de germoplasma consiste en la descripción y determinación del valor principal que posee el germoplasma (Querol, 1992 y López, 1999). Para la caracterización es necesario realizar una colecta de datos, esto permite describir y diferenciar accesiones de una misma especie con la identificación taxonómica correcta, la evaluación de caracteres agroeconómicos, la estimación de variabilidad fenotípicas y a su vez las relaciones entre sus características (Sevilla y Holle, 1995 y López, 1999).

En la actualidad existen patrones de identificación, caracterización y evaluación, que contribuyen con la determinación de especies de plantas de manera correcta; para poder llegar a dichos protocolos o metodologías ha sido necesario la realización de estudios básicos que

han servido como antecedentes, en donde fueron evaluadas ciertas características cualitativas y cuantitativas necesarias para la correcta descripción morfológica (López, 1999).

3.6. BANCOS DE GERMOPLASMA.

Alrededor de los años 1920 a 1940 se iniciaron las colecciones de germoplasma de *T. cacao*, en regiones sur americanas, como zonas de la amazonia brasileña, Ecuador y Perú. Hasta el año 2009 se registraban 28 colecciones de germoplasma de cacao en países como Venezuela con 300 accesiones, Malasia 400 accesiones, Guyana francesa 400 accesiones, Costa de Marfil 600 accesiones, Ecuador y Costa Rica 800 accesiones y en el caso de Trinidad y Tobago 2,300 accesiones de germoplasma de cacao (Osorio, 2009). Los bancos de germoplasma albergan recursos fitogenéticos mediante colecciones que son grupos de accesiones representativas de una variación genética, cuyo objetivo de preservación se alberga en instituciones de investigación, un país o región, adquiriendo el germoplasma para conservar las características, potencialidad, utilidad y asegurar la supervivencia manteniendo disponible el recurso (Osorio, 2009).

En la actualidad según Vásquez et al, (2012) los marcadores moleculares son de gran utilidad en estudios relacionados con aspectos sobre la biología y genealogía de *T. cacao*, siendo indispensables en estudios de etiquetados de accesiones de los bancos de germoplasma más importantes del mundo, donde antiguamente la clasificación y el etiquetado había sido erróneo ya que solamente habían sido basados mediante los caracteres morfológicos. El uso de marcadores morfológicos tiene grandes limitantes, debido a que su expresión está sujeta a factores fenológicos y ambientales; además pueden ocurrir cambios epigenéticos que limitan en gran medida el número de marcadores que pueden ser evaluados sin equivocación en la población segregante (Azofeifa, 2006 y Phillips et al, 1995). Sin embargo gracias a los avances en la biología molecular se han desarrollado métodos más eficaces que los métodos tradicionales (Azofeifa, 2006).

3.7. MARCADORES MOLECULARES.

En 1980 se inició la incorporación de los marcadores moleculares, que permitieron acelerar los avances en los programas de búsqueda genética en diversos organismos vivos (Ruiz, 2014). Inicialmente se manejaron marcadores morfológicos para el análisis genético,

fueron los primeros en ser mapeados y se utilizaron en el análisis de segregación de cruzamientos (Álvarez, 2011).

Anteriormente en los estudios de genética y mejoramiento de organismos, se utilizaban los marcadores por elección, que se regulaban por genes asociados a los caracteres morfológicos y de rendimiento, es decir fenotipos de fácil cuantificación e identificación visual, gracias a la evolución de la tecnología actualmente se utilizan los marcadores moleculares y su aplicación se realiza prácticamente a todas las especies de organismos vivos (Vásquez et al, 2012).

Los marcadores moleculares se definen como cualquier diferencia fenotípica controlada genéticamente, considerando cualquier molécula orgánica e inorgánica que sea característica de un organismo o proceso sea un marcador; según Azofeifa, (2006) los marcadores idóneos son los de ADN, siendo válido cualquier fragmento que se encuentre muy cerca del gen o de la secuencia de interés y que no afecte al carácter de estudio. Otra definición de marcadores moleculares es que son variantes alélicas utilizadas para marcar estructuras biológicas; cualquier diferencia fenotípica controlada genéticamente y utilizada en un análisis genético. Un locus marcador deberá ser polimórfico; hoy en día se utiliza con una doble finalidad, para marcar y señalar el locus que controla la diferencia fenotípica para marcar otro locus ligado y así controlar el carácter de interés (Álvarez, 2011).

Una de las bondades que poseen los marcadores moleculares es ser fenotípicamente neutros, presentan mayor segregación o polimorfismo que los morfológicos, permiten la evaluación desde los primeros estadios de la plántula, son aplicables a cualquier tipo de material vegetal, se pueden utilizar en el análisis en cualquier época del año, están libres de efectos epistáticos y permiten la correcta identificación de las variedades sin necesidad de tomar muchos caracteres (Azofeifa, 2006). Los estudios en los que se emplean marcadores moleculares han permitido el uso de un nuevo sistema de clasificación de germoplasma de *T. cacao*, a través del estudio de relaciones genéticas de accesiones de cacao silvestre o cultivado y la utilización de datos de pasaporte (Castañeda et al, 2016). Existen dos tipos de marcadores moleculares: las proteínas (principalmente las Isoenzimas) y los marcadores de ADN (Phillips et al, 1995 y Azofeifa, 2006).

3.8. ISOENZIMAS.

Se les conoce también como aloenzimas y se definen como variantes de una misma enzima que comparten un sustrato en común. Diferentes individuos en una misma población pueden tener diferentes formas moleculares de la misma proteína. Esa variabilidad en cuanto a la estructura de la proteína es producida por factores genéticos o epigenéticos (Azofeifa, 2006).

Las Isoenzimas según Phillips et al, (1995) fueron los primeros marcadores moleculares usados en genética de plantas para mapear poligenes, obteniendo un éxito considerable en comparación a los estudios en donde solo se utilizaba marcadores morfológicos. El análisis con las Isoenzimas se realiza extrayendo la enzima de los tejidos de la planta, tras las variantes son separadas con electroforesis y visualizadas mediante tinción de gel con colorantes específicos (Phillips et al, 1995).

3.9. MARCADORES DE ADN.

Algunos marcadores genéticos son los llamados polimórficos o multi alélicos codominantes; no epistémicos, cuando se puede leer el genotipo a partir del fenotipo, independiente del genotipo de otros loci neutros, las situaciones alélicas no tienen otros efectos fenotípicos; insensibles al ambiente, cuando el genotipo se infiere al fenotipo y es independiente al medio (Álvarez, 2011).

Los Marcadores de ADN incluyen tres categorías básicas:

A. Métodos basados en la reacción de cadena de polimerasa Polimerase Chain Reaction (PCR) por ejemplo los Polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados (RFLP) y número variable de repeticiones en tandem (VNTRs).

B. Técnicas que utilizan iniciadores "Cebador o Cebadores", arbitrarios o semi arbitrarios. Por ejemplo Iniciadores de PCR Perfiles Múltiples Arbitrarios de Amplicones (MAAP); Amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD); Amplificación aleatoria del polimorfismo de microsatélites (RAMPO).

C. PCR con sitio objetivo específico, por ejemplo, Repeticiones de Secuencias Cortas (SSRs), Inter Secuencia Simple Repetida (ISSR). Las categorías B y C se basan en la PCR (Álvarez, 2011 y Azoifeifa, 2006).

3.9.1. POLIMORFISMO EN LA LONGITUD DE LOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS (LOS RFLP).

Los análisis con RFLP son capaces de generar grandes cantidades de marcadores genéticos, y se han utilizado ampliamente para la caracterización de germoplasma en plantas, para la estimación de los niveles de variación en las colecciones de germoplasma, en estudios filogenéticos, en el monitoreo de pureza de semillas híbridas, en la selección de ligamiento de características agronómicas de importancia, en la creación de mapas de ligamiento y en el descifrado de componentes genéticos de caracteres cuantitativos; sin embargo presenta costos demasiado elevados que limitan su utilización, otra limitación es que en algunos casos la variación inter-específica es alta, no obstante la población es baja lo cual reduce la posibilidad de encontrar polimorfismo útil (Phillips et al, 1995).

3.9.2. REPETICIONES DE SECUENCIAS CORTAS (MICROSATÉLITES SSRs).

Los Microsatélites SSRs son regiones de secuencias cortas, de dos a diez pares de bases repetidas de ADN, arregladas en series, las cuales se cree que se distribuyen por todo el ADN son secuencias altamente variables dispersas al azar a través del genoma de diversos organismos, los cuales pueden o no estar asociados a genes, son loci altamente mutables que pueden estar presentes en muchos sitios del genoma. Dado a que, la repetición por sí misma no codifica para formar ninguna proteína y debido a que las secuencias de ADN repetitivo pueden recombinarse y expandirse más frecuentemente que otros tipos de secuencias, estas regiones son comúnmente variables y consecuentemente útiles para medir el polimorfismo entre especies o variedades muy relacionadas (Phillips et al, 1995; Azoifeifa, 2006 y Castañeda et al, 2011).

Se han utilizado con frecuencia en muestras vegetales para los estudios de diversidad, la construcción de mapas genéticos, el análisis de caracteres de loci de carácter cuantitativos QTLs (Rasgo Cualitativo de Loci), la identificación y pureza varietal entre otras aplicaciones. Según Álvarez, (2011), son secuencias cortas de ADN que se distribuyen de

manera uniforme y amplia en el genoma de la mayoría de los eucariotas, no transcribibles en el ARN, pero poseen funciones como la regulación genética.

Los Microsatélites moleculares SSRs en comparación a otros marcadores como los RAPDs (Amplificación aleatoria de ADN polimórfico), AFLPs (Polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados), tienen ventajas como en la selección de polimorfismo intervarietales para la construcción de mapas de ligamientos, particularmente para estudios de población y de tipo evolutivo, este método ha sido muy útil para el desarrollo de mapas genéticos, así mismo en la identificación de individuos, se utiliza ampliamente en estudios de ADN en organismos vegetales, son codominantes, es posible observar de forma separada el aporte genético de ambos padres. Los SSRs permiten conocer el estado de homocigosis o heterocigosis, en que se encuentran las regiones específicas dentro del cromosoma, características útiles para la selección objetiva de materiales élites, con potencial de elección en programas de fitomejoramiento (Castañeda et al, 2011 y Osorio, 2009).

3.10. APLICACIONES DE MARCADORES MOLECULARES EN EL MEJORAMIENTO DE *T. cacao*.

El primer estudio de diversidad de cacao fue realizado con Isoenzimas (Lanaud, 1987), posteriormente en la década de los 90's, se publicaron diversos trabajos empleando los RAPDs (Wilde et al, 1992 y Figueira et al, 1994) y RFLPs desarrollados con sondas de diversas procedencias como ADN genómico, ADN de cloroplasto, mitocondrial y ribosoma; los individuos evaluados provenían de colecciones de germoplasma y de plantaciones comerciales (Lanaud et al, 1994).

Los marcadores moleculares microsatélites (SSRs) fueron desarrollados por el CIRAD Centro de cooperación internacional en investigación agronómica para el desarrollo (Lanaud et al, 1999) y son reportados en la base de Datos Internacional de Germoplasma de cacao (García, 2012).

3.11. MICROSATÉLITES EN LA IDENTIFICACIÓN DE GERMOPLASMA DE *Theobroma cacao*.

Lanaud et al, (1999) inició el desarrollo de los marcadores moleculares para *T. cacao*, gracias a este avance se ha permitido la realización de estudios de caracterización de

diversidad genética en individuos de *T. cacao* presentes en los bancos de germoplasma del mundo. Los SSRs han sido de gran utilidad para la determinación de la identidad genética, en el descubrimiento de relaciones evolutivas de colecciones de *T. cacao*; sirviendo además en el establecimiento de identidades de genotipos, la determinación de lagunas genéticas, relaciones genéticas como en la selección de programas internacionales de cría y selección de cacao (Boza et al, 2014).

En Colombia hasta el año 2007 se realizó el primer estudio sobre la caracterización molecular de 100 accesiones utilizando doce marcadores microsatélites (Sánchez et al, 2007). Posteriormente Murillo et al, (2011) realizó un estudio preliminar sobre la diversidad genética de 12 clones de cacao, utilizando marcadores microsatélites SSRs. Motamayor et al, (2008) utilizó 106 marcadores moleculares microsatélites SSRs para el estudio del origen, clasificación y diferenciación de la población de *T. cacao*, encontrando 10 grupos genéticos o clusters dentro de la especie, determinando con mayor precisión la diversidad genética disponible, dichos grupos genéticos encontrados fueron: Criollo, Marañón, Curaray Iquitos, Nanay Contamana, Amelonado, Purus, Guayana y Nacional.

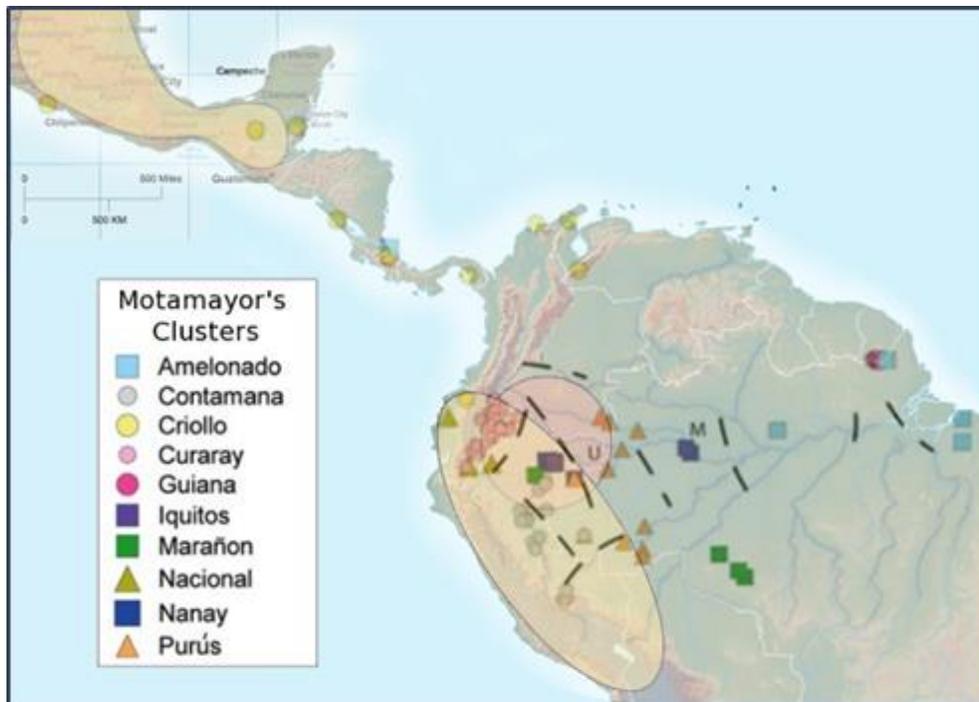


Figura 13. Origen de Clúster genético (Motamayor et al, 2008).

Ruiz, (2014) realizó un estudio sobre diversidad genética de cacao en tres poblaciones de Colombia, utilizando marcadores moleculares Microsatélites, dicha investigación fue realizada con el propósito de utilizar los resultados para el futuro desarrollo de conservación, selección de materiales élites e integración de programas de fitomejoramiento integral para cultivo de *T. cacao*.

3.12. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA.

3.12.1. DESCRIPTORES.

Un descriptor es una característica o atributo cuya expresión es fácil de medir, registrar o evaluar y que hace referencia a la forma, estructura o comportamiento de una accesión. Y es utilizado para discriminar entre fenotipos (Franco e Hidalgo, 2003).

Los descriptores son altamente heredables, pueden ser detectados a simple vista y se expresan de igual forma en todos los ambientes (Franco e Hidalgo, 2003). Los órganos más importantes para la descripción morfológica son aquellos que están menos influenciados por el ambiente; los más importantes son; la flor y el fruto en importancia decreciente las hojas, el tronco, las ramas, raíces y los tejidos celulares (Enríquez, 1991).

Varios autores han propuesto listas de descriptores morfológicos para la identificación y evaluación del germoplasma de cacao (July, 2007). Por ejemplo, el IBPGR (Junta Internacional de Recursos Fitogenéticos) usa 65 descriptores, mientras Phillips y Enríquez, (1988) propusieron una lista de 26 descriptores morfológicos y el CIRAD 24 (July, 2007). Los descriptores han sido empleados desde hace más de 20 años, para caracterizar el germoplasma de las colecciones en diferentes centros de investigación tales como Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), El Banco Internacional de Cacao en Trinidad (ICGT) y La base de datos internacional de germoplasma de cacao (ICGD), El Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI) entre otros centros de investigación (July, 2007).

3.12.2. TIPOS DE DESCRIPTORES.

3.12.2.1. DESCRIPTORES DE PASAPORTE.

Describen los parámetros que se deben observar cuando se hace la recolección original y proporcionan la información básica que se utiliza para el manejo general de la

accesión, incluyendo el registro en el banco de germoplasma y cualquier otra información de identificación (Franco e Hidalgo, 2003).

3.12.2.2. DESCRIPTORES DE MANEJO.

Se suele utilizar para las fechas de multiplicación, cantidad de semillas disponibles y en el porcentaje de viabilidad. Proporcionan las bases para el manejo de las accesiones en el banco de germoplasma y ayudan durante su multiplicación y regeneración (Franco e Hidalgo, 2003).

3.12.2.3. DESCRIPTORES DEL SITIO Y EL MEDIO AMBIENTE.

Se encarga de la descripción de parámetros específicos del sitio y del ambiente, contribuye en la interpretación de resultados cuando se realizan pruebas de caracterización y evaluación. Suele incluirse en esta clasificación los descriptores del sitio de recolección del germoplasma como las coordenadas geográficas y las características edafoclimáticas (Franco e Hidalgo, 2003).

3.12.2.4. DESCRIPTORES DE CARACTERIZACIÓN.

Permiten y facilita la discriminación entre fenotipos, Franco e Hidalgo, (2003) los definen como caracteres altamente heredables y fáciles de detectar a simple vista ya que suelen expresarse de forma similar en todos los ambientes. Los descriptores de caracterización pueden incluir un número limitado de caracteres adicionales considerados como deseables por consenso de los usuarios de un cultivo en particular como es el caso del color, forma del tallo, hojas, flores, semillas y frutos. En la actualidad gracias a los avances en la Biología molecular, utilizando la técnica de electroforesis se ha podido aplicar adicionalmente descriptores relacionados con los marcadores moleculares (Franco e Hidalgo, 2003).

3.12.2.5. DESCRIPTORES DE EVALUACIÓN.

La expresión de la mayoría de los descriptores de esta categoría depende del medio ambiente, en consecuencia, se requieren métodos experimentales especiales para su evaluación. La evaluación puede también involucrar métodos complejos de caracterización molecular o bioquímica. Este tipo de descriptores incluye caracteres de rendimiento,

productividad agronómica, susceptibilidad a estrés y caracteres bioquímicos y citológicos, los cuales son de mayor interés en el mejoramiento de los cultivos (Franco e Hidalgo, 2003).

3.13. ESTADOS DEL DESCRIPTOR Y TIPOS DE DATOS.

Se espera que las características visibles de una especie sean más o menos homogéneas, sin embargo, todas no se expresan con la misma intensidad y algunos miembros de la población pueden presentar diferentes grados de expresión que se traducen en diferentes tipos de datos o categorías de variables (Franco e Hidalgo, 2003). Existen distintas categorías de datos, según la expresión del descriptor que puede ser en forma cualitativa o cuantitativa.

3.13.1. FORMA CUALITATIVA.

Se pueden generar datos binarios (también llamados de doble estado), datos con secuencia (ordinales) y datos sin secuencia (nominales).

3.13.2. FORMA CUANTITATIVA.

Los datos generados pueden ser discontinuos (llamados también discretos) y continuos.

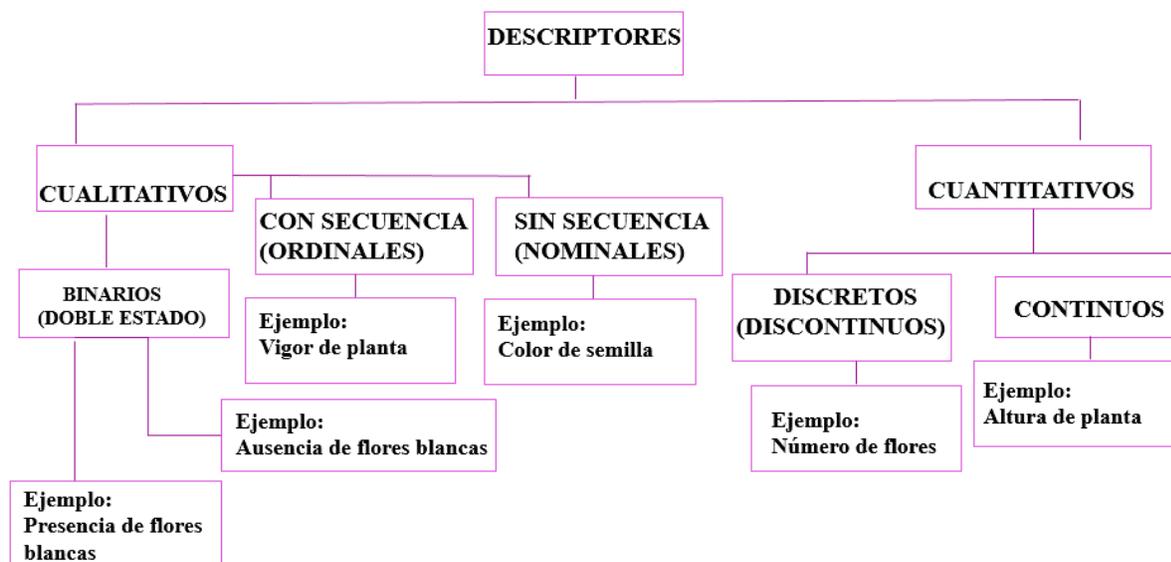


Figura 14. Tipos de datos y descriptores (Franco e Hidalgo, 2003).

3.13.3. ORGANIZACIÓN DE LOS DATOS, MATRIZ BÁSICA DE DATOS.

Se construye a partir de la información que se obtiene en la caracterización y evaluación de especies. Consiste en un arreglo en forma de cuadrícula con tantas filas como accesiones existentes (n) y una columna para cada variable (p) (Franco e Hidalgo, 2003).

Tabla 2. Matriz básica de datos (Franco e Hidalgo, 2003).

ACCESIONES		VARIABLES			
A1	X1	X2	X3	X4... XP	
A2					
A3					
A4					
An					

3.14. MÉTODOS PARA EL ANÁLISIS DE DATOS DE CARACTERIZACIÓN.

Los datos se pueden analizar mediante el empleo de métodos simples o complejos, que van desde el uso de gráficos y estadísticos de tendencia central y dispersión hasta los multivariados. El análisis tiene el propósito de reducir el volumen de información característico en trabajos de esta naturaleza (Franco e Hidalgo, 2003).

3.14.1. ESTADÍSTICOS SIMPLES.

Permiten estimar y describir el comportamiento de las diferentes accesiones en relación con cada carácter. Los más comunes son el promedio, la media aritmética, el rango de variación, la desviación estándar (DE) y el coeficiente de variación (CV), que se utilizan para el análisis de datos cuantitativos (Franco e Hidalgo, 2003).

3.14.2. LA MEDIA ARITMÉTICA.

Es una medida de tendencia central que ayuda a caracterizar el germoplasma y permite relacionar un atributo de una accesión con un valor central de dicho atributo.

3.14.3. EL RANGO DE VARIACIÓN O AMPLITUD TOTAL.

Es la diferencia entre el valor mínimo y el máximo de cualquier variable sobre el conjunto de accesiones con un valor central de dicho atributo.

3.14.4. EL COEFICIENTE DE VARIACIÓN.

Es una medida relativa de variación que define más intrínsecamente la magnitud de la variabilidad de los caracteres estudiados debido a que es independiente de las unidades de medida.

3.14.5. LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR.

Cuantifica la magnitud de la variación respecto a la media aritmética y se expresa en las mismas unidades que las observaciones originales.

3.14.6. DENDOGRAMAS.

Los dendogramas se construyen a partir de una matriz ($p \times p$) de distancia o de coeficientes de similitud. Las $p(p-1)/2$ posibles distancias o similitudes obtenidas de p poblaciones se condensan en el dendograma lo cual facilita y simplifica las inferencias de semejanzas o disimilitudes entre los diferentes grupos y subgrupos de las poblaciones en estudio (Martínez, 1995 y López, 1999).

Por otro lado también pueden obtenerse dendogramas a través de métodos de matriz de distancia o clúster análisis. También se utilizan métodos de parsimonia con el objetivo de proveer patrones filogenéticos. En donde un criterio específico es definido al realizar comparaciones alternativas filogenéticas. Por otro lado es posible utilizar algoritmos específicos para computar los árboles que están en máxima concordancia con el criterio (López, 1999).

3.15. MÉTODOS ESTADÍSTICOS MULTIVARIADOS APLICADOS EN BIOLOGÍA MOLECULAR.

Según Martínez, (1995) los métodos y procedimientos estadísticos disponibles para el análisis de los resultados provenientes de ensayos biotecnológicos se pueden agrupar en las siguientes categorías.

- 1) Aquellos que tienen como propósito evaluar la variabilidad, clasificación, estructura y composición genética de las poblaciones.
- 2) Los desarrollados para la construcción de mapas cromosómicos o genómicos, cuando se utilizan marcadores genéticos moleculares.
- 3) Los denominados QLT "Quantitative trait loci", los cuales son loci asociados con caracteres cuantitativos de importancia económica.

Los métodos estadísticos más utilizados formalmente son distancias genéticas, índices de similitud, dendogramas y coordenadas principales (Martínez, 1995).

3.15.1. HETEROCIGOSIDAD ESPERADA.

Nei, (1987) asegura que el promedio de heterocigosidad o diversidad genética es el método de medición más adecuado de la variación genética, pues no depende de la arbitrariedad de la definición de polimorfismo y puede ser definida sin ambigüedad en términos de frecuencias alélicas.

La heterocigosidad esperada de una población (H_e) es la media de los valores obtenidos para cada locus en dicha población. Cuando las poblaciones están bajo equilibrio Hardy-Weinberg, la heterocigosidad puede ser calculada a partir de la frecuencia alélica. Por lo tanto, la heterocigosidad esperada cuantifica la igualdad o equitatividad de las frecuencias alélicas en los loci (González, 2011).

3.15.2. HETEROCIGOSIDAD OBSERVADA.

Es la proporción de individuos heterocigotos observados en una muestra de la población (Gutiérrez, 2009).

3.15.3. ANÁLISIS DE VARIANZA MOLECULAR (AMOVA).

Prueba la proporción de la variación genética en general atribuible a la variación dentro de las poblaciones, entre las poblaciones y entre los grupos de poblaciones en una región. Este análisis también puede usarse para determinar la distribución relativa a la variabilidad genética entre grupos, entre poblaciones dentro de grupos o dentro de las

poblaciones; así que la estructura jerárquica es frecuentemente cuantificada a través del AMOVA (González, 2011).

4. MATERIALES Y MÉTODOS.

Esta investigación fue llevada a cabo mediante dos etapas: etapa de campo y etapa de laboratorio.

4.1. ETAPA DE CAMPO.

Esta etapa se desarrolló en el municipio de Nahuilingo, limitado al Norte y al Este por los municipios de Izalco y Sonsonate; situado a 62 Km de San Salvador Ciudad Capital; con una población de 13,285 habitantes. Está ubicado a 7.1 Km del municipio de Izalco. La finca El Carmen se encuentra ubicada en el municipio de Nahuilingo (El cultivo de cacao desarrollado en la finca El Carmen, fue creado como una medida compensatoria por parte del ministerio de Medio ambiente a CASSA). Las coordenadas geográficas son $13^{\circ} 42' 20.2''$ N y $89^{\circ} 42' 33.3''$ O.

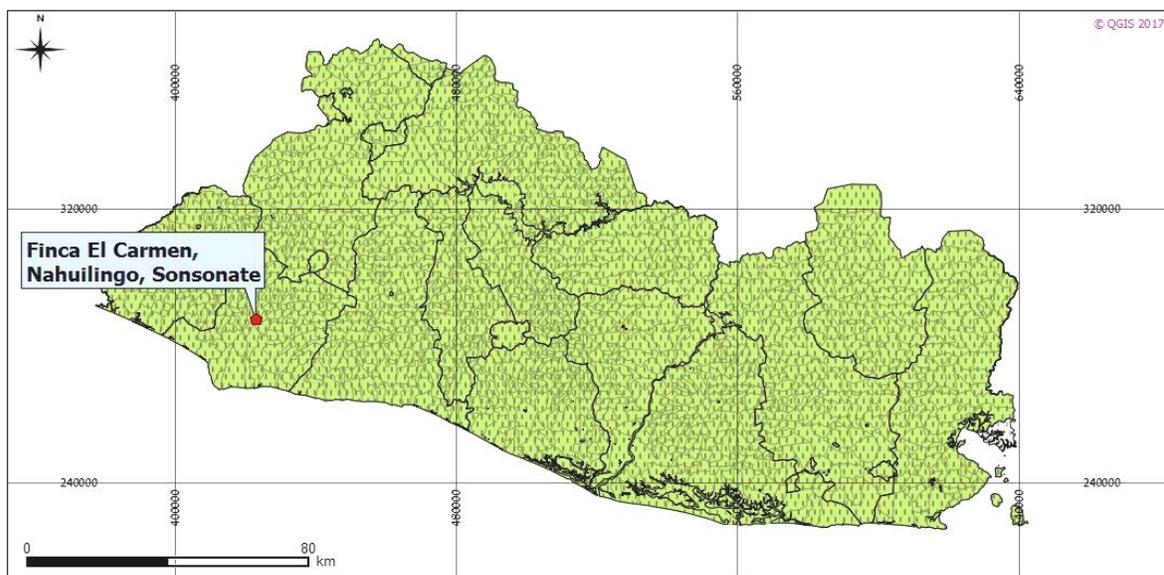


Figura 15. Ubicación geográfica de La Finca El Carmen, Municipio de Nahuilingo, Departamento de Sonsonate, sus coordenadas geográficas son $13^{\circ} 42' 20.2''$ N y $89^{\circ} 42' 33.3''$ O. escala : 1:164,096 m; Diseñado con el programa QGIS 2.2.

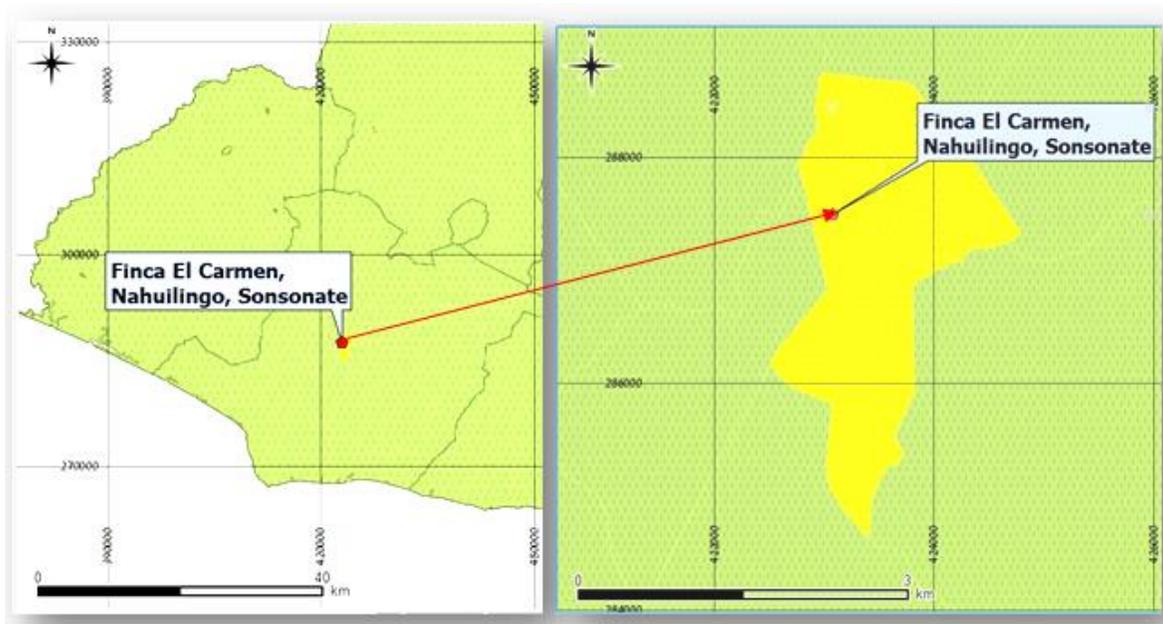


Figura 16. A) Mapa del Departamento de Sonsonate. Señala con una flecha roja, el sitio en el que se ubica La finca El Carmen, municipio de Nahuilingo. Escala: 1:153,898 m. B). Mapa ampliado del sitio de ubicación de la finca El Carmen, en el Municipio de Nahuilingo, escala: 1:13,643 m y ambos mapas diseñados con el programa QGIS 2.2.

4.1.1. ETAPA DE CAMPO.

El trabajo de campo se realizó en 8 viajes a la Finca El Carmen, por un periodo de dos meses donde se seleccionaron 76 árboles de *Theobroma cacao*, tomando datos de los descriptores morfológicos más sobresalientes; las variables cualitativas fueron: color de hoja madura y color de la hoja inmadura, base de la hoja, ausencia y presencia de peciolo, color del pedúnculo floral, antocianinas en sépalos, antocianinas en pétalos, color del fruto inmaduro y color de fruto maduro, forma del fruto, forma del ápice del fruto, rugosidad del fruto, color y forma de la semilla. Las variables cuantitativas fueron: longitud de la hoja, ancho de la hoja y relación largo/ancho de la hoja; longitud del fruto, ancho del fruto y relación entre largo/ancho del fruto; número de semillas por fruto, largo de la semilla, ancho de la semilla y relación entre largo/ancho de la semilla, según recomiendan especialistas del (CIRAD) (Lanaud et al, 1999) e implementados por (Carrión, 2012, Dubon et al, 2016 y Gómez, 2019).

Se realizó la colecta de cinco hojas de cada árbol evaluado y posteriormente se llevaron al laboratorio de Biología Molecular de CENSALUD donde se sometieron al análisis de marcadores moleculares Microsatélites (SSRs).

4.1.2. TOMA DE DATOS EN CAMPO.

En la etapa de toma de datos en campo se utilizó una libreta de campo, lápiz, plumón, bolsas de papel, cuchilla o tijeras de podar, machete, Sistema de Posicionamiento Global (GPS), cámara fotográfica y tabla de medición.

4.1.3. SELECCIÓN DE LOS ÁRBOLES.

Se seleccionaron árboles que cumplieron con las siguientes características: Tener una producción mayor a cincuenta mazorcas sanas (Ver figura 17).



Figura 17. Árbol de *Theobroma cacao* con una cosecha superior a los cincuenta frutos, ejemplifica las características que se utilizaron en dicha selección (Fotografía tomada en Finca El Carmen por Wendy Ayala, 2018).

- a. El árbol debía poseer buena salud, libre de herbívoros o cualquier plaga.
- b. Los frutos debían presentar buen tamaño de la mazorca de 25 cm en adelante y tener un buen número de semillas por mazorca (45 semillas por mazorca en adelante) (Ver figura 18).



Figura 18. Selección de las mazorcas con características de interés: buen porte, tamaño y cantidad de semillas indicadas para la selección en el muestreo (Fotografía tomada en Finca El Carmen por Wendy Ayala, 2018).

Una vez seleccionados los árboles, se procedió a tomar los datos de los descriptores morfológicos más sobresalientes entre ellos los cualitativos y los cuantitativos.

4.2. CARACTERIZACION MORFOLÓGICA.

4.2.1. HOJA.

4.2.1.1. DESCRIPTORES CUALITATIVOS.

a. Colores de hoja joven y madura:

1= SW 6440 (Verde oscuro); 2= SW 6711 (Verde claro); 3= SW 6879 (Naranja); 4= SW 6862 (Ocre); 5= SW 6286 (Vino).

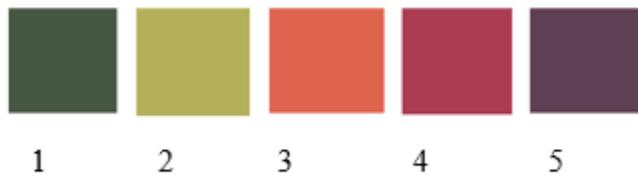


Figura 19. Tabla de colores utilizada para la clasificación de los tonos de las hojas jóvenes y maduras, dicha paleta de colores con los códigos respectivos fueron extraídas de la marca Sherwin Williams.

b. Base de la hoja: aguda, obtusa, redondeada, cordiforme.

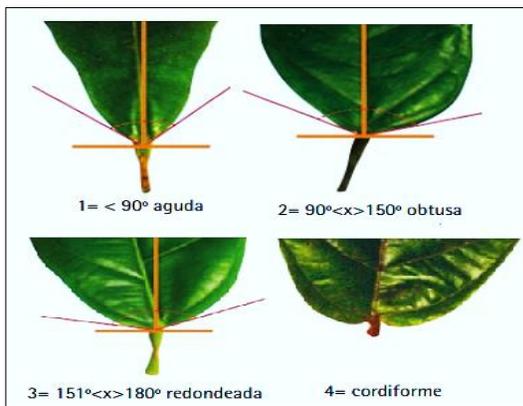


Figura 20. Base de la hoja clasificada según el ángulo interno que conforma el margen de la hoja con la nervadura central: 1 = $< 90^\circ$ aguda, 2 = $90^\circ < x < 150^\circ$ obtusa, 3 = $151^\circ < x < 180^\circ$ redondeada y 4 = cordiforme (Jiménez et al, 2007).

c. Pecíolo de la hoja: con pulvínulo o sin pulvínulo (Ver figura 21).



Figura 21. Hojas de cacao con presencia de pulvínulo (Fotografía tomada en Finca El Carmen por Wendy Ayala, 2018).

4.2.1.2. DESCRIPTORES CUANTITATIVOS.

A) Largo (cm), B) ancho (cm), C) Relación Largo /Ancho, (L/A).

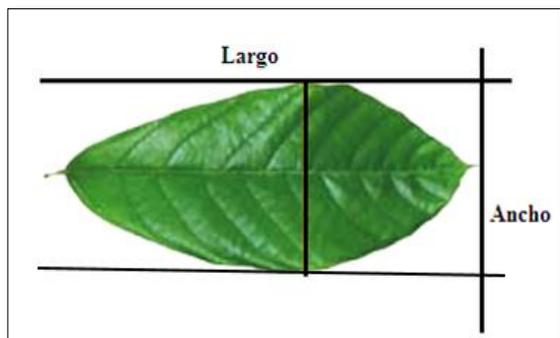


Figura 22. Relación de la longitud Largo/ancho de la hoja de cacao (Jiménez et al, 2007).

Esta característica morfológica cuantitativa, se obtienen al dividir los valores del largo entre el valor del ancho de las hojas de cacao muestreadas.



Figura 23. A) Color de hoja joven y madura, B). Longitudes Largo y ancho de la hoja joven y madura (Fotografías tomadas por Wendy Ayala, 2018).

4.2.2. FLOR.

4.2.2.1. DESCRIPTORES CUALITATIVOS.

A) Color del pedúnculo: **1 = SW6587** (cereza); **2 = SW6563** (Rosado); **3 = SW6590** (Rosado claro); **4 = SW6711** (Verde); **5 = SW6702** (Verde claro).

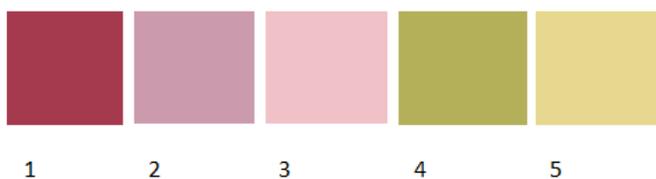


Figura 24. Tabla de colores utilizada para la clasificación de los colores del pedúnculo floral (Los códigos de los colores utilizados corresponden a la marca Sherwin Williams).

B) Antocianina en los sépalos: presente, ausente.

C) Antocianina en los pétalos: presente, ausente.

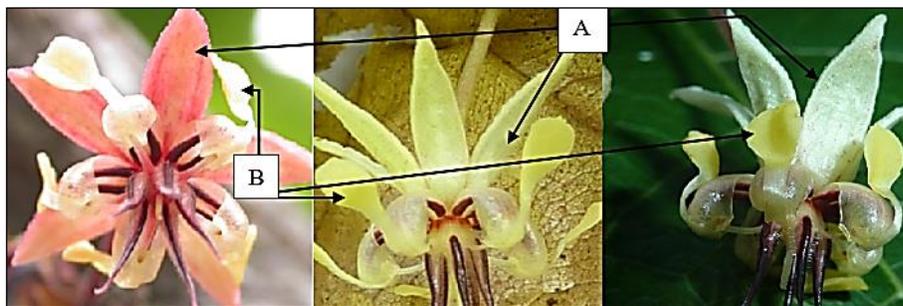
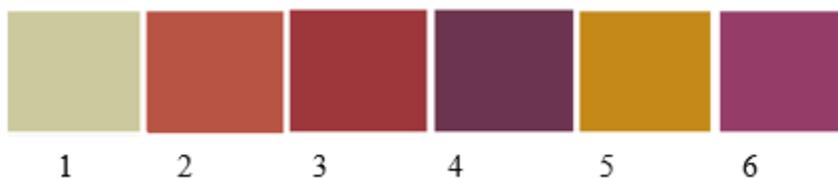


Figura 25 A) Presencia y ausencia de antocianinas en los sépalos en flores de cacao. B) Antocianinas en pétalos de las flores de cacao. (Fotografías tomadas por Wendy Ayala, 2018).

4.2.3. FRUTO.

4.2.3.1. DESCRIPTORES CUALITATIVOS.

A) Colores de frutos maduros e inmaduros: **1 = SW6422** (Verde grisáceo); **2 = SW6615** (Naranja intenso); **3 = SW6594** (Ocre oscuro); **4 = SW6293** (Vino intenso); **5 = SW6692** (Amarillo mostaza) **6 = SW6841** (Rosado intenso).



utilizados corresponden a la marca Sherwin Williams).

Figura 26. Tabla de colores utilizada para la clasificación de los colores de los frutos jóvenes y maduros (Los códigos de los colores

B) Forma del fruto: oblonga, elíptica, ovoide, redondeada, esferoide.

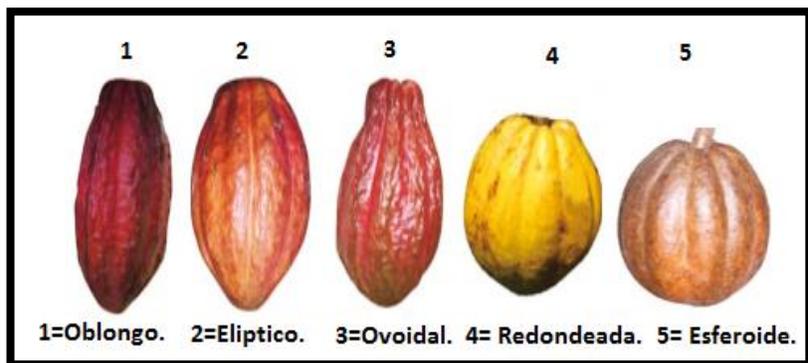


Figura 27. Frutos de *T. cacao* según el fenotipo: 1=Oblongo, 2=Elíptico, 3=Ovoidal, 4=Redondeada, 5=esferoide (Jiménez et al, 2007 y García, 2012).

C) Forma del ápice: atenuado, agudo, obtuso, redondeado, mamiforme.

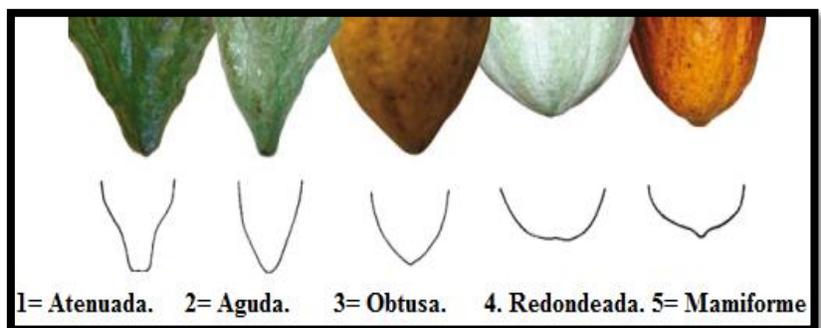


Figura 28. Ápice del fruto de *T. cacao* según su fenotipo: 1) Atenuada, 2) aguda, 3) obtusa, 4) redondeada y 5) mamiforme o apezonada (Jiménez et al, 2007 y Castañeda et al, 2016).

D) Rugosidad: ausente, ligera, intermedia, intensa.

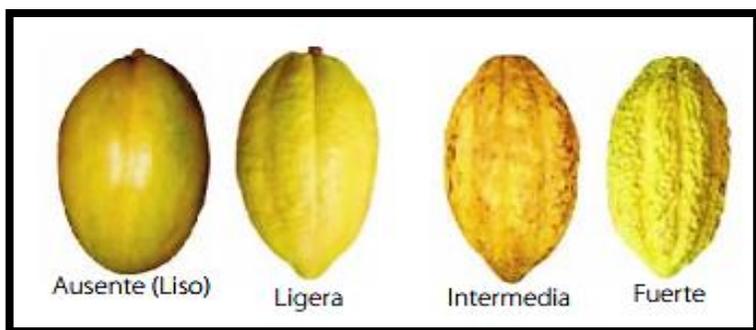


Figura 29. Rugosidad de la superficie del fruto *T. cacao* (García, 2012).



Figura 30. Forma, rugosidad de colores correspondientes a los frutos maduros e inmaduros (Fotografías tomada por Wendy Ayala, 2018).

4.2.3.2. DESCRIPTORES CUANTITATIVOS.

Los descriptores cuantitativos tomados fueron los siguientes.

- A) Largo del fruto (cm) y Ancho del fruto (cm).
- B) Relación Largo/Ancho del fruto (L/A).
- C) Número de semillas por fruto.

Dichas características pueden observarse en la siguiente figura 31.



Figura 31. Tabla de medición utilizada para obtener la longitud de los frutos (largo y ancho) (Fotografía tomada por Wendy Ayala, 2018).

4.2.4. SEMILLA.

4.2.4.1. DESCRIPTORES CUALITATIVOS.

- A) Color: la tabla de colores estandarizada muestra los tonos que se observaron en las semillas de *T. cacao*: **1 = SW6300** (Vino); **2 = SW6825** (Purpura); **3 = SW6839** (Morado); **4 = SW6851** (Rosado); **5 = SW6886** (Crema).



Figura 32. Tabla de colores utilizada para la clasificación de los tonos de las semillas, dicha paleta presenta los códigos de colores de la marca Sherwin Williams.

B) Forma: 1) oblonga, 2) elíptica y 3) ovoide (ver figura 33).

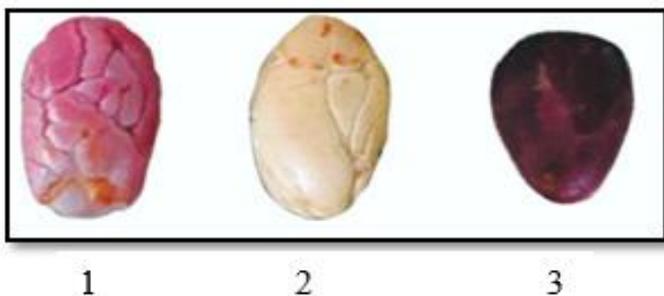


Figura 33. Morfología y colores que presenta la semilla de *T. cacao*, Forma oblonga, elíptica y ovoide (Jiménez et al, 2007).

4.2.4.2. DESCRIPTORES CUANTITATIVOS.

A) Largo de la semilla (cm).

B) Ancho de la semilla (cm).



Figura 34. Medición de la longitud de las semillas de *T. cacao*. (Fotografías tomadas por Wendy Ayala, 2018).

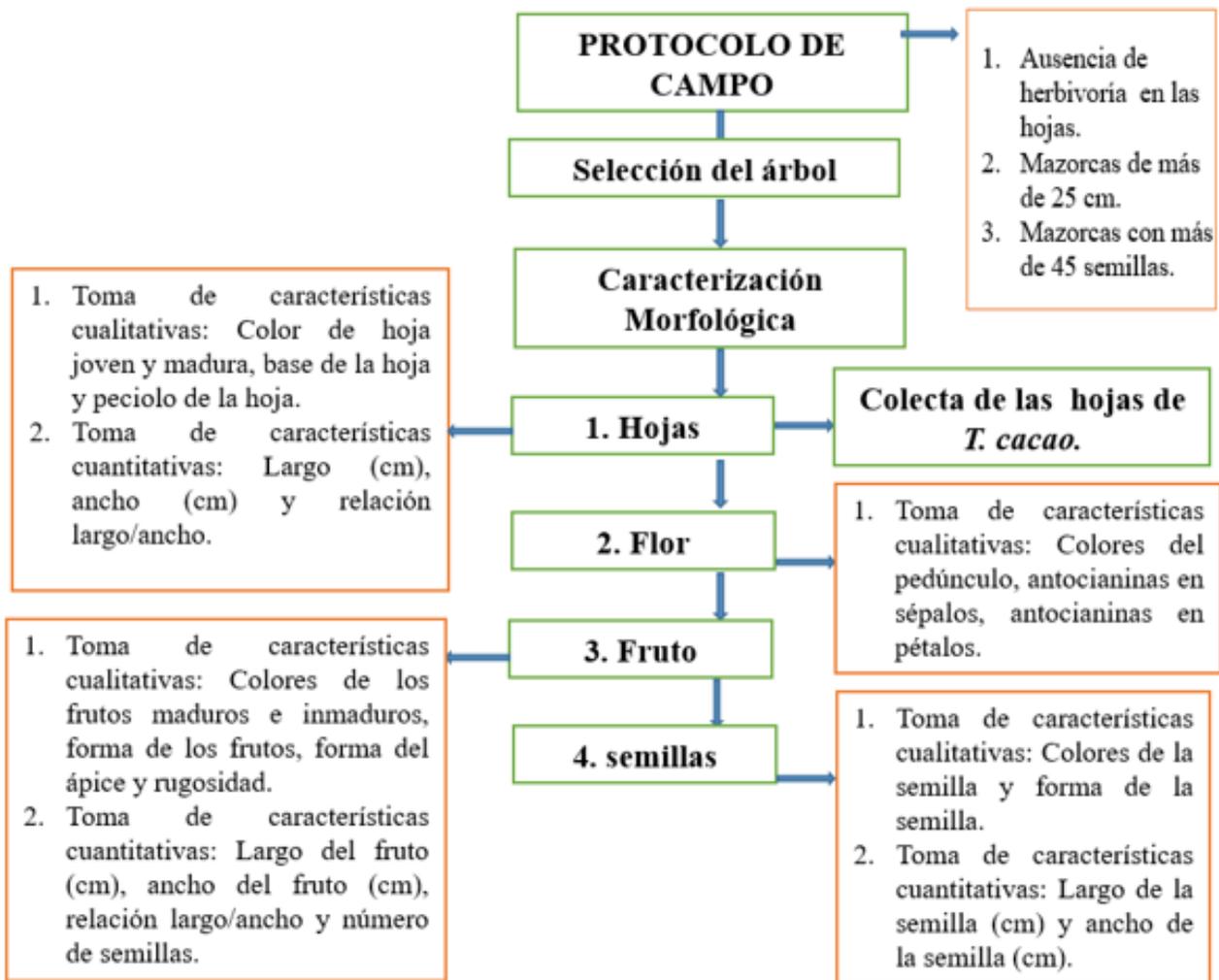


Figura 35. Protocolo de etapa de campo.

4.3. SELECCIÓN Y TOMA DE LA MUESTRA PARA LA ETAPA DE LABORARORIO.

Por cada árbol seleccionado se colectaron 5 hojas maduras y sanas, para la extracción de ADN, se introdujeron en un sobre de papel filtro no plastificado, con su etiqueta respectiva de identificación, con el nombre de la finca, el nombre del dueño, número de árbol muestreado, la fecha y hora de colecta. Las muestras de hojas fueron trasladadas en condiciones óptimas al laboratorio de Biología Molecular en CENSALUD.

4.3.1. LIMPIEZA Y SECADO DE HOJAS DE *T. cacao*.

La limpieza y secado de las hojas se realizó en el laboratorio de extracción de ADN en CENSALUD, dichas muestras fueron esterilizadas con papel toalla previamente humedecido con agua desmineralizada estéril, con la finalidad de eliminar cualquier agente contaminante en el haz y el envés de las hojas (ver figura 36). Aquellas hojas que eran pertenecientes a la misma muestra fueron colocadas en una página de papel filtro no plastificado con su viñeta de identificación respectiva (ver anexo 5).



Figura 36. Lavado y secado de accesiones de *T. cacao* en el laboratorio de extracción de ADN en CENSALUD (Fotografías tomadas por Margarita Pérez, 2018).

En el secado las hojas se ordenaron en sobres de papel filtro no plastificado con su viñeta de identificación, se introdujeron en una incubadora y se procedió al secado a temperatura de 55 °C por 24 horas (ver figura 37). Transcurrido este periodo se extrajeron de la incubadora y se envolvieron en servilletas para almacenarlas en bolsas tipo Ziploc (de 25X35cm) en un freezer a -20°C para su preservación.

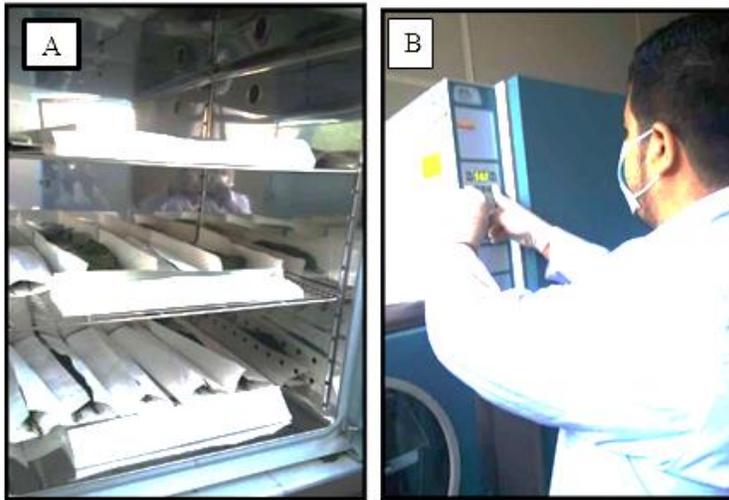


Figura 37. A) y B). Secado de las muestras en incubadora a 55 °C (fotografía tomada por Wendy Ayala, 2018).

4.4. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR.

La etapa de laboratorio se desarrolló en el Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD), Ubicado en La Universidad de El Salvador, San Salvador, Cede Central, del departamento de San Salvador, cuyas Coordenadas geográficas son 13°42'54.67" N y 89°11'54.01" O.

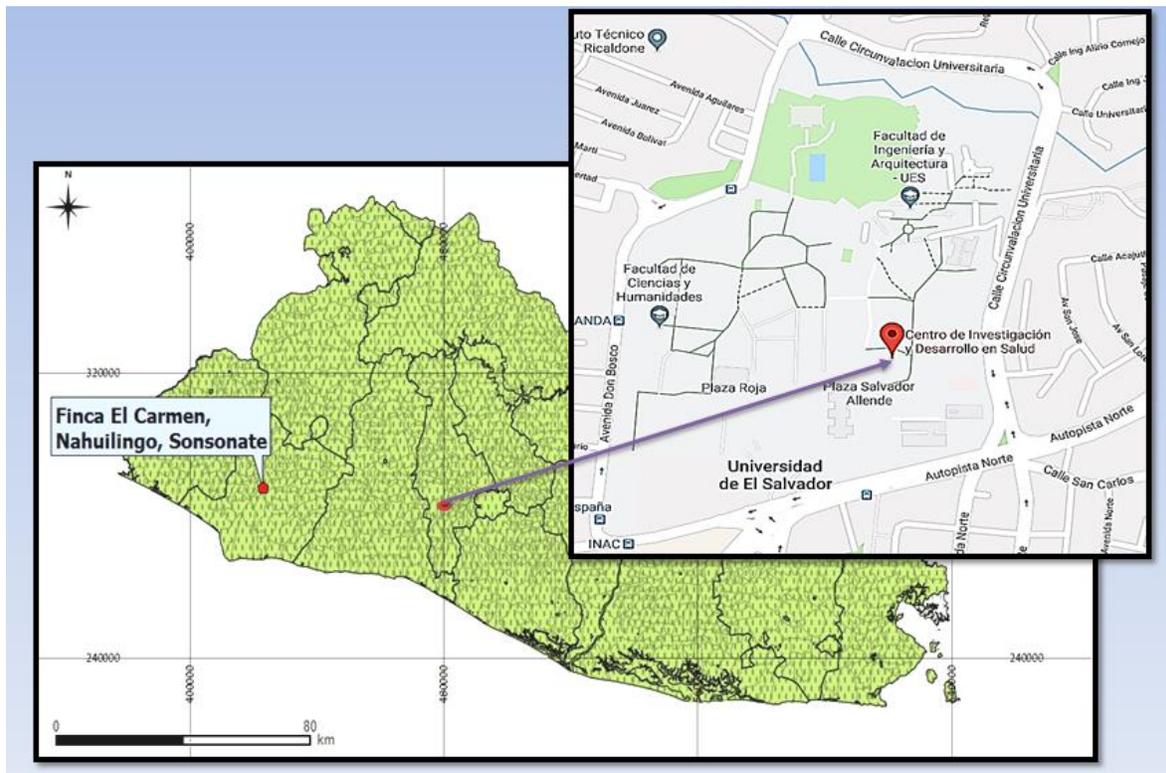


Figura 38. El laboratorio de CENSALUD, Universidad de El Salvador, en la Ciudad de San Salvador; cuyas Coordenadas geográficas son 13°42'54.67" N y 89°11'54.01" O.

Esta etapa se desarrolló en 4 fases, las cuales se describen a continuación: 1) Macerado de las hojas de cada accesión de *T. cacao*, 2) Extracción de ADN de las hojas de cada accesión de *T. cacao*, 3) Visualización del gel de calidad de ADN y 4) Amplificación del ADN por PCR y Visualización del gel de Agarosa para la toma de datos.

4.4.1. FASE DE MACERADO DE LAS HOJAS DE CADA ACCESIÓN DE *T. cacao*.

Para el macerado de las hojas de cacao, se tomó una hoja seca y con la ayuda de una tijera se retiró la venación central, luego se colocó el trozo de la hoja dentro de un mortero

de porcelana, se agregó Nitrógeno líquido y se procedió a triturar la muestra con el pistilo de porcelana y se colocó en un tubo para microcentrífuga de 1.5 ml rotulado con un código respectivo correspondiendo a la accesión y la fecha del proceso. Terminado el proceso el macerado fue colocado en un freezer a una temperatura de -20°C.

4.4.2. FASE DE EXTRACCIÓN DE ADN DE LAS HOJAS DE CADA ACCESIÓN DE *T. cacao*.

Para la extracción de ADN, se utilizó el Kit de Extracción de ADN para Plantas: PureLink® Plant Total DNA Purification Kit, For purification of DNA from plant. Marca: Invitrogen.

4.4.2.1. PROCEDIMIENTO DE PURIFICACIÓN DE ADN DE PLANTAS.

4.4.2.1.1. LISADO DE LAS HOJAS.

Este procedimiento consistió en la preparación del lisado a ≤ 50 mg de tejido de la planta como se describe a continuación:

- a. Se añadieron 500 μ l de Buffer de Resuspension R2 (Resuspension Buffer R2)
- b. Se homogenizó mediante un vortex.
- c. Se añadió 15 μ l de SDS al 20% y 15 μ l de RNasa A (20 mg/ml).
- d. Se Incubó el lisado a 55°C durante toda la noche en un bloque de calentamiento seco.
- e. Se centrifugó el lisado a máxima velocidad por 10 minutos. Se transfirió el sobrenadante transparente a un tubo de Microcentrífuga de 1.5 ml (sin perturbar el sedimento).
- f. Se añadió 100 μ l de Buffer de Precipitación N2 (Precipitation Buffer N2), se mezcló con el vortex y se dejó incubar en hielo durante 5 minutos y se centrifugó a máxima velocidad por 5 minutos.
- g. Se transfirió 250 μ l de lisado transparente a un tubo de microcentrífuga nuevo y se añadieron 375 μ l de Buffer de Unión B4 (Binding Buffer B4). Seguidamente se mezcló una vez más a máxima velocidad en la centrifuga (Invitrogen™, 2012).

4.4.2.1.2. ENLACE DE ADN (BINDING DNA).

- a. Se tomó un tubo de Spin Cartridge del Kit.
- b. Se adicionó a este tubo la muestra anterior.

- c. Se centrifugó a 10,000 rpm por un 1 minuto. Se descartó el sobrenadante del tubo y luego se colocó un nuevo tubo de lavado (Invitrogen™, 2012).

4.4.2.1.3. LAVADO DE ADN.

- a. Se añadió 500 µl de Buffer de lavado W4 (Wash Buffer W4).
- b. Se centrifugó el tubo a 10,000 rpm por un 1 minuto. Luego se desechó el sobrenadante del tubo y se colocó la columna de nuevo en el tubo.
- c. Se añadió 500 µl de Buffer de Lavado W5 (Wash Buffer W5) a la columna.
- d. Se centrifugó el tubo a 10,000 rpm por un 1 minuto. Luego se desechó el sobrenadante del tubo de lavado y se colocó nuevamente el cartucho en el tubo.
- e. Se añadieron 500 µl de Buffer de Lavado W5 (Wash Buffer W5) a la columna. Se centrifugó en el tubo a 10,000 rpm por un 1 minuto. Se descartó el sobrenadante del tubo de lavado y se colocó el cartucho en el mismo el tubo.
- f. Se centrifugó el tubo a máxima velocidad durante 2 minutos. Inmediatamente se descartó el tubo de Lavado (Invitrogen™, 2012).

4.4.2.1.4. ELUCIÓN DE ADN.

- a. Se colocó el Spin Cartridge en un tubo de Microcentrífuga de 2.0 ml.
- b. Se añadió 100 µl de Buffer de Elución E1 (Elution Buffer E1).
- c. Se incubó a temperatura ambiente durante 1 minuto. Seguidamente se centrifugó el tubo a 14000 rpm por un 1 minuto (El tubo de la microcentrífuga contenía el ADN purificado).
- d. Para recuperar más ADN, se colocó 100 µl de Buffer de Elución E1 (Elution Buffer E1) en el mismo tubo.
- e. Se incubó a temperatura ambiente durante un 1 minuto. Posteriormente se centrifugó en el tubo a 14000 rpm por un 1 minuto.
- f. Se retiró la columna del tubo de Microcentrífuga.
- g. Se colocaron los tubos con ADN extraído en hielo y se guardaron en la refrigeradora a una temperatura de -20°C (Invitrogen™, 2012).

4.4.3. FASE VISUALIZACIÓN DEL GEL DE CALIDAD DE ADN.

Previamente a la ejecución de la etapa de PCR se verificó la calidad del ADN. En un gel de agarosa al 1%, en solución buffer de TBE al 0.5 X.

- a. Se pesaron 0.40 mg de agarosa en una balanza analítica y se depositó en un erlenmeyer de 100 ml, de inmediato se adicionó 40 ml de Buffer TBE a una concentración de 0.5X.
- b. Se colocó el erlenmeyer en un hot-plate con un agitador magnético para mezclar la agarosa con el Buffer TBE, se cubrió el erlenmeyer con un papel.
- c. Se colocó el Erlenmeyer en un horno microondas donde fue calentado en periodos cortos de 30 segundos y dos periodos cortos de 15 segundos hasta diluir completamente la agarosa.
- d. Se dejó enfriar por unos minutos y se esterilizó la cámara de electroforesis, la cama de gel y su peine con alcohol al 70%.
- e. Se agregó 1.5 μ l de Gel Red con la micropipeta a la agarosa preparada y se mezcló bien, se vertió el gel en la cámara de electroforesis y se dejó reposar hasta que el gel se volvió sólido.
- f. Se retiró el peine y se colocó el Buffer TBE al 0.5 X en la cámara, el Buffer TBE cubrió completamente el gel y se introdujeron las muestras de ADN con la micropipeta en cada uno de los pozos (LENAP s. a).

4.4.3.1. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PARA LA VISUALIZACIÓN DE LA CALIDAD DE ADN DE CADA UNA DE LAS ACCESIONES.

El ADN y el Buffer de carga se colocó en un depósito con hielo triturado, para evitar la degradación del ADN, para realizar la corrida de ADN en los geles, cada muestra se mezcló con Buffer de carga, en las siguientes cantidades: 1 μ l de Buffer de carga, 5 μ l de ADN extraído.

Pasos realizados en esta etapa:

- a. Se tomó un cuadro de papel parafilm.
- b. Con una micropipeta se colocó 1 μ l de Buffer de carga sobre el papel para cada muestra.
- c. Se tomó 5 μ l del tubo que contenía la muestra de ADN y se mezcló con el Buffer de carga que se colocó sobre el papel Parafilm.

d. Se cargó la mezcla del Buffer de carga y del ADN en el gel. (Se realizaron los mismos pasos para cada una de las muestras). Pasado el tiempo del corrido del ADN en el gel, se observó el gel de agarosa en el documentador de geles. El equipo contiene una cámara que toma fotografías de la migración de ADN en el gel con ayuda del programa Visión Works 8.20. Se tomaron las fotografías de los geles para documentar los resultados (ver anexo 3).

4.4.4. FASE DE AMPLIFICACIÓN DEL ADN POR PCR Y VISUALIZACIÓN DEL GEL DE AGAROSA PARA LA TOMA DE DATOS.

Para la amplificación se realizó una Master Mix la cual se describe a continuación:

- a) 30.75 µl de agua ultra pura.
- b) 5 µl de Buffer 10X.
- c) 3 µl de MgCl₂.
- d) 1 µl de ANTPS.
- e) 0.25 µl de Taq.
- f) 5 µl del “Cebador” (ver tabla 1)
- g) 5 µl del ADN de la muestra.

Tabla. 3. Marcadores microsatélites SSRs utilizados para la amplificación de ADN de cada una de las accesiones (Lanaud et al, 1999, Motamayor et al, 2008 y Gómez 2019).

Nombre del marcador	EMBL Accesoión número	Secuencia demarcador (3'5'- 5'3')	Ta(°C)	Tamaño del alelo clonado (pares de bases)
mTcCIR6	Y16980	TTCCCTCTAAACTACCCTAAAT TAAAGCAAAGCAATCTAACATA	46	224-253
mTcCIR7	Y16981	ATGCGAATGACAACTGGT GCTTTCAGTCCTTTGCTT	51	150-167
mTcCIR8	Y16982	CTAGTTTCCATTTACCA TCCTCAGCATTTTCTTTC	46	290-307
mTcCIR11	Y16985	TTTGGTGATTATTAGCAG GATTTCGATTTGATGTGAG	46	286-321
mTcCIR15	Y16988	CAGCCGCTCTTGTTAG TATTTGGGATTCTTGATG	46	234-263
mTcCIR18	Y16991	GATAGCTAAGGGGATTGAGGA GGTAATCAATCATTTGAGGATA	51	333-357

mTcCIR9	Y16983	ACCATGCTTCCTCCTTCA ACATTTATACCCCAACCA	51	274
mTcCIR12	Y16986	TCTGACCCCAAACCTGTA ATTCCAGTTAAAGCACAT	46	188
mTcCIR24	Y16996	TTTGGGGTGATTTCTTCTGA TCTGTCTCGTCTTTTGGTGA	46	198
mTcCIR1	Y16883	GCAGGGCAGGCTCAGTGAAGCA TGGGCAACCAGAAAACGAT	51	143
mTcCIR17	Y16990	AAGGATGAAGGATGTAAGAGAG CCCATACGAGCTGTGAGT	51	271
mTcCIR25	Y16997	CTTCGTAGTGAATGTAGGAG TTAGGTAGGTAGGGTTATCT	46	153

Luego se programó el termociclador según el “Cebador” que era utilizado (46°C y otros a 51°C) durante 3 horas (Castañeda et al, 2011).

4.4.4.1. MIGRACIÓN DE ADN EN GEL DE AGAROSA.

- a. Se pesó 1.0 g de agarosa en una balanza analítica, se colocó en un erlenmeyer de 100 ml y se adicionó 40 ml de Buffer TBE 0.5X.
- b. El erlenmeyer se colocó en un hot-plate con un agitador magnético para mezclar y disolver la agarosa con el Buffer TBE. El erlenmeyer se cubrió con un papel parafilm y se le hicieron pequeños agujeros con la ayuda de un alfiler, se colocó en un horno microondas en periodos cortos, dos de 30 segundos, se extrajo, se volvió a colocar en el microondas nuevamente durante dos periodos cortos de 15 segundos hasta que la agarosa se volviera transparente.
- c. Se colocó 1.5 µl de gel red a la agarosa y se mezcló en forma de 8, evitando la formación de burbujas. El gel se virtió en la bandeja de electroforesis y se le colocó el peine para formar los pozos en el gel de agarosa, hasta que se gelificó. Una vez gelificado se retiró el peine del gel de electroforesis.
- d. Se colocó el Buffer TBE al 0.5X en la cámara, hasta sumergir el gel, seguidamente las muestras del producto de PCR fueron colocados en los posos (LENAD. s.a).

4.4.4.2. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS.

El ADN amplificado y el Buffer de carga se depositaron en hielo triturado, para evitar la degradación del ADN. Para realizar el corrido de ADN en los geles, cada muestra se mezcló previamente con Buffer de carga, en las siguientes cantidades: 2 μ l de Buffer de carga, 15 μ l de ADN amplificado. La visualización del ADN amplificado en el gel se realizó en trans-iluminador ultravioleta y en documentador de geles mediante una cámara óptica que transmitió la imagen de los geles al programa “VisionWorks” instalado en la computadora del laboratorio (ver anexo 4).

Las bandas que amplificaron para cada “Cebador” correspondiente a las accesiones, se analizaron utilizando el software “gen Alex”, se determinó el número de alelos observados, el número de alelos efectivos, la heterocigosidad observada y la esperada. También se realizó un dendograma mediante el algoritmo UPGMA basado en el índice de disimilitud de Jaccard y una matriz de Jaccard (ver Figura 39).

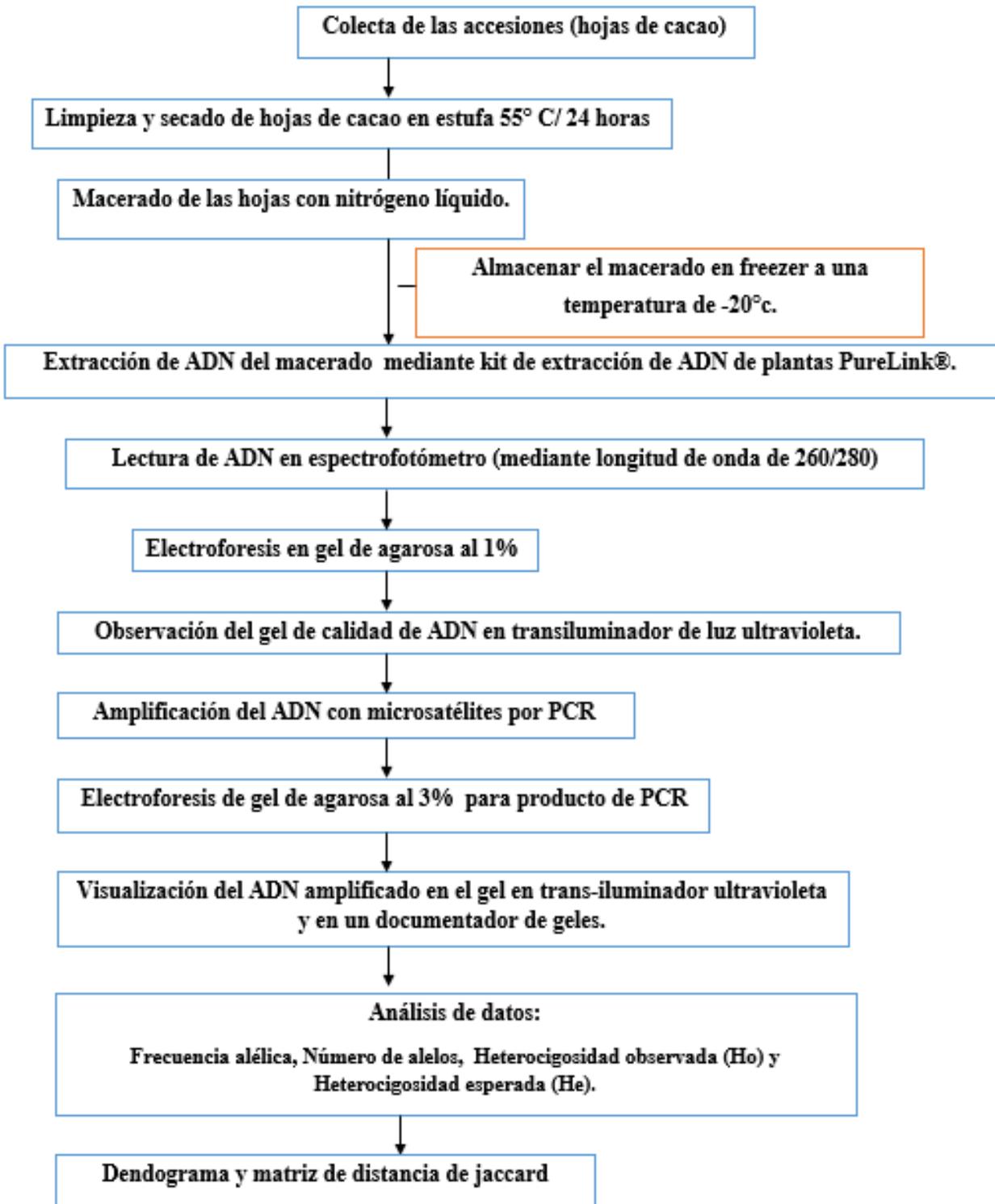


Figura 39. Diagrama de la metodología de Laboratorio.

5. RESULTADOS.

5.1. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS.

5.1.1. EVALUACIÓN DE VARIABLES CUALITATIVAS.

En la tabla 4 se presentan las características morfológicas para el análisis de las accesiones de *T. cacao*.

Tabla 4. Muestra detalladamente las características morfológicas cualitativas utilizadas en el análisis de las accesiones de *T. cacao*.

Características Morfológicas			
Hoja	Flor	Fruto	Semilla
Base	Color del pedúnculo	Color inmaduro	Color
Peciolo	Antocianina en los sépalos	Color maduro	Forma
Color joven	Antocianina en los pétalos	Forma	
Color maduro		Forma del ápice	
		Rugosidad	

En la tabla 5 se observan las caracterización de los descriptores cualitativos de la hoja, flor, fruto y semilla, según el porcentaje en que fueron encontrados según reveló el análisis del descriptor morfológico utilizado.

Tabla 5. Descriptores cualitativos de la hoja, flor, fruto y semilla de *T. cacao*.

Descriptor	Categoría	Porcentaje
Base de la hoja	Aguda	15%
	Obtusa	42%
	Redondeada	13%
	Cordiforme	30%
Peciolo de la hoja	Con pulvínulo	74%
	Sin pulvínulo	26%
Color de la hoja joven	Verde oscuro	0%
	Verde claro	35%
	Naranja	30%

	Ocre	32%
	Vino	3%
Color de la hoja madura	Verde oscuro	97%
	Verde claro	3%
Color del pedúnculo de la flor	Cereza	32%
	Rosado	9%
	Rosado claro	12%
	Verde	38%
	Verde claro	9%
Antocianina en los sépalos	Presente	71%
	Ausente	29%
Antocianina en los pétalos	Presente	57%
	Ausente	43%
Color del fruto inmaduro	Verde grisáceo	76%
	Naranja intenso	0%
	Ocre	9%
	Vino intenso	11%
	Amarillo mostaza	1%
	Rosado intenso	3%
Color del fruto maduro	Amarillo mostaza	61%
	Rosado intenso	8%
	Vino intenso	1%
	Ocre	5%
	Naranja intenso	9%
	Verde grisáceo	16%
Forma del fruto	Oblonga	35%
	Elíptica	29%
	Ovoidal	25%
	Redondeada	11%
	Esferoide	0%
Forma del ápice del fruto	Atenuada	45%
	Aguda	8%
	Obtusa	17%
	Redondeada	4%
	Mamiforme	26%
Rugosidad del fruto	Ausente	0%
	Ligera	21%
	Intermedia	62%
	Intensa	17%
Color de la semilla	Vino	29%
	Purpura	20%
	Morado	18%
	Rosado	15%
	Crema	18%
	Oblonga	26%

Forma de la semilla	Elíptica	44%
	Ovoide	30%

5.1.1.1. HOJA.

En los descriptores para la hoja, se obtuvo el valor más alto con el 42% de accesiones indicando base obtusa y 13% correspondió al valor más bajo con base redondeada. En el peciolo de la hoja el 74% de las accesiones presento pulvínulo y el 26% de las accesiones indico la ausencia de pulvínulo.

El descriptor "color de la hoja madura" indicó el 97% para el color verde oscuro y el 3% restante fue para el color verde claro.

El descriptor "color de la hoja joven" indicó el porcentaje más alto con el 35% para el color verde claro, el 3% de las accesiones correspondió al color vino, siendo también el porcentaje más bajo (ver anexo 8).

5.1.1.2. FLOR.

En el caso de los descriptores de la flor, un 71% de las accesiones presentaron ausencia de antocianina en los sépalos, mientras que el 29% presentaron la presencia de antocianinas. Para las antocianinas en pétalo 57% de las accesiones indicaron la presencia y 43% correspondió a la ausencia. Con el descriptor color del pedúnculo el porcentaje más alto de las accesiones indicó la presencia del color verde con el 38%, el 9% de las accesiones presentaron coloraciones verde claro y rosado indicando el porcentaje más bajo (ver anexo 8).

5.1.1.3. FRUTO.

Se observó que el 62% de los frutos presentaron "rugosidad intermedia" y no se registraron muestras con una "rugosidad ausente". Las variables forma del fruto presentaron los siguientes porcentajes: 35% para la forma oblonga, mientras que la forma esferoide obtuvo el menor porcentaje con el 0%.

En la variable "ápice del fruto" se obtuvo que un 45% de las accesiones presentaron el ápice atenuado y solamente el 4% presento ápice redondeado.

Los valores obtenidos según los "colores de los frutos inmaduros" fueron los siguientes: el color verde grisáceo con el 76% fue el valor más alto, mientras que el amarillo mostaza obtuvo el 1% y el naranja intenso no obtuvo ningún valor en las accesiones con respecto al descriptor.

El porcentaje más alto del descriptor color del "fruto maduro" correspondió al color amarillo mostaza el 61% y el porcentaje más bajo correspondieron para las accesiones que presentaron frutos maduros color vino intenso el 1% (ver anexo 9).

5.1.1.4. SEMILLA.

El color de la semilla con el porcentaje más alto lo obtuvo el color vino con el 29%, y el porcentaje más bajo lo obtuvo el color rosado con el 15%. Para el descriptor "forma de la semilla" la forma elíptica fue la más representativa con el 44%.

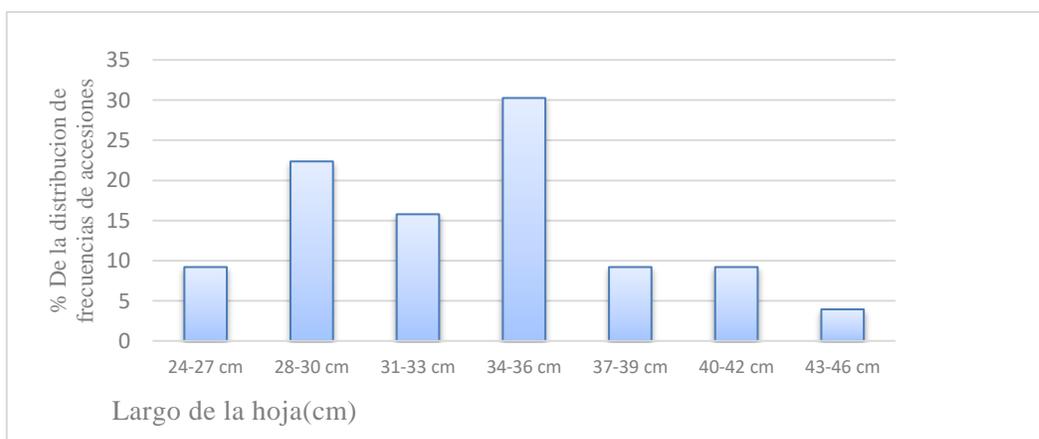
5.1.2. EVALUACIÓN DE VARIABLES CUANTITATIVAS.

5.1.2.1. HOJA.

Tres variables cuantitativas fueron registradas para la hoja: largo, ancho y la relación largo/ancho de la hoja (ver anexo 9).

5.1.2.1.1. LARGO DE LA HOJA.

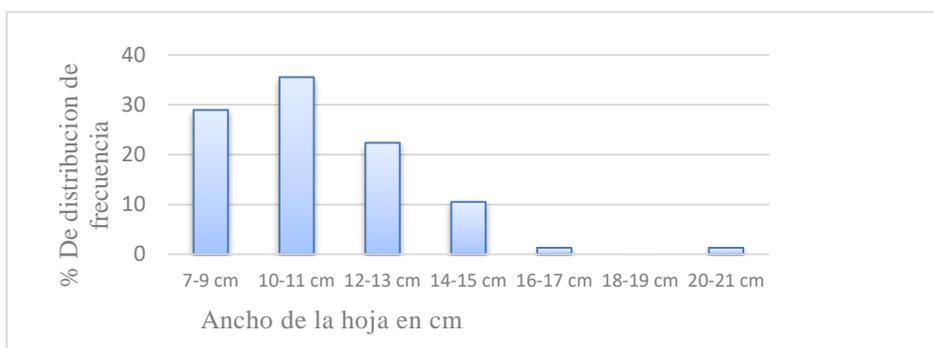
En la gráfica 1 se observa que del total de 76 accesiones que se tomaron el 30% presento un largo de hoja de 34 cm a 36 cm, mientras que el porcentaje más bajo fue para el rango 43 cm a 46 cm con el 4%.



Gráfica 1. Distribución de frecuencias de la longitud del largo de la hoja de las accesiones.

5.1.2.1.2. ANCHO DE LA HOJA.

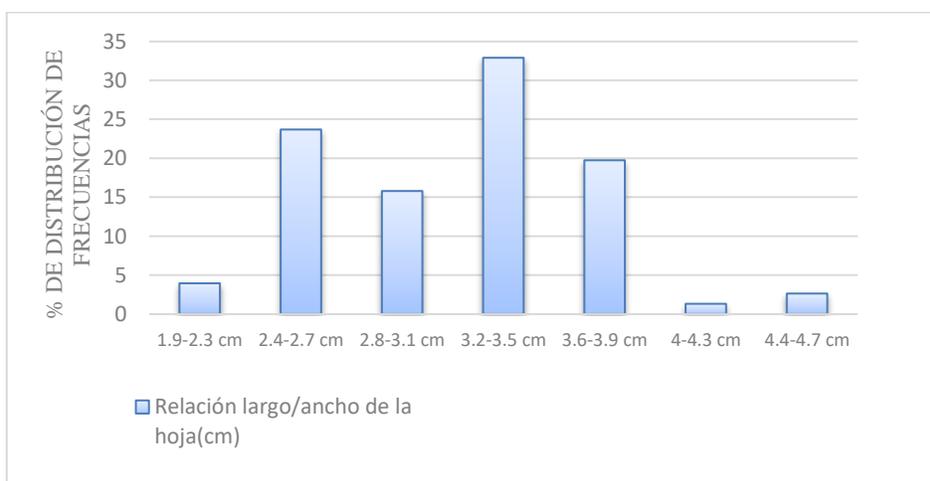
En la gráfica 2 se observa que del total de 76 accesiones el 35% presentó un ancho de hoja de 10 cm a 11 cm mientras que los porcentajes más bajos 1.3% para los rangos 16 cm a 17cm y 20 cm a 21 cm (ver anexo 9).



Gráfica 2. Distribución de frecuencias para el ancho de la hoja.

5.1.2.1.3. RELACIÓN LARGO/ANCHO DE LA HOJA.

En la gráfica 3 se observa que del total de 76 accesiones el 32% presentó una relación largo/ancho de 3.2 cm a 3.5 cm mientras que el porcentaje más bajo fue para el que estaba entre 4.0 cm a 4.3 cm con el 1%. (Ver anexo 10).



Gráfica 3. Distribución de frecuencias para la relación de longitudes largo/ancho de la hoja

5.1.2.2. FRUTO.

5.1.2.2.1. LARGO DEL FRUTO.

Para el descriptor “largo del fruto” se obtuvo un valor máximo de 28 cm y el mínimo fue de 12 cm. En la gráfica 4 se observó que el 30% de las accesiones presentó un largo de fruto con un rango entre 19 cm a 21 cm, mientras que el 3% fue el más bajo, con rangos entre 12 cm a 14 cm de largo del fruto (ver anexo 10).

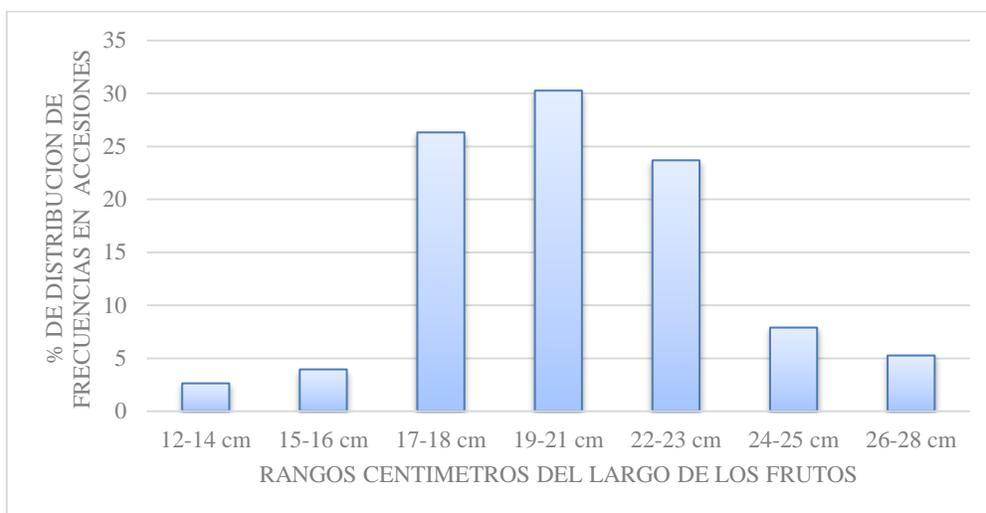


Gráfico 4. Distribución de frecuencia del largo del fruto de *T. cacao*.

5.1.2.2.2. ANCHO DEL FRUTO.

En este descriptor morfológico el 59% de las accesiones correspondieron a los frutos con rangos entre 7.8 cm a 9.1 cm y 1.31% de las accesiones osciló entre los 12.8 cm a 14 cm ver grafica 43 (ver anexo 10).

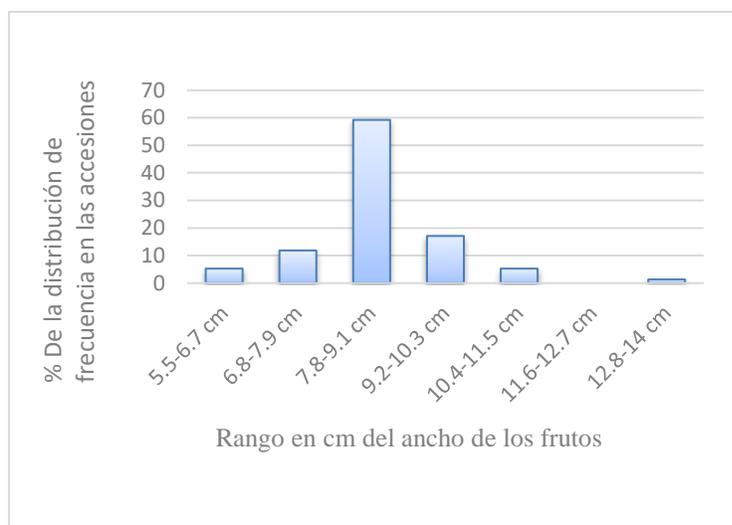
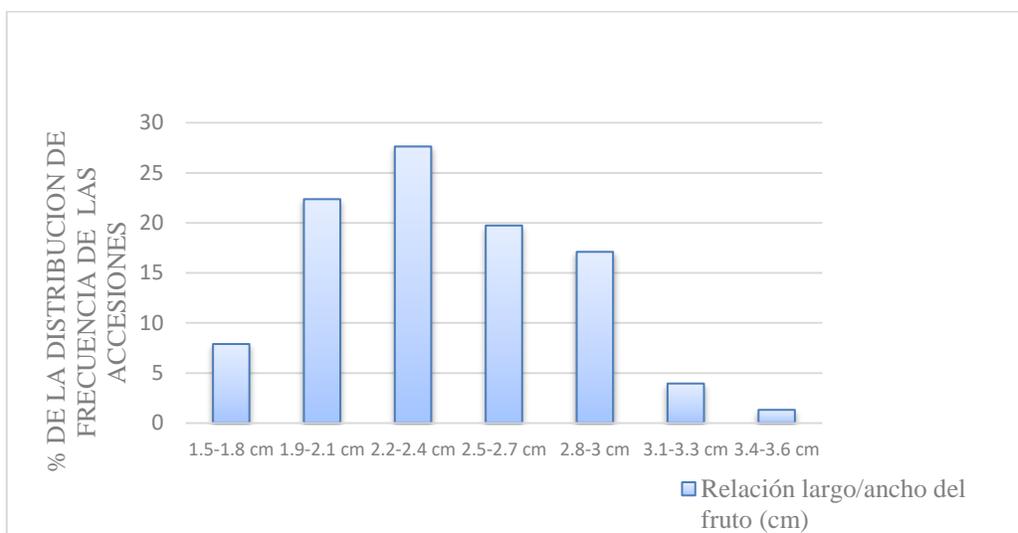


Gráfico 5. Distribución de frecuencia para el ancho del fruto.

5.1.2.2.3. RELACIÓN LARGO/ANCHO DEL FRUTO.

Para el descriptor largo/ancho del fruto el porcentaje más alto fue de 27% para el rango 2.2 cm a 2.4 cm y el porcentaje más bajo con 1.35% correspondió al rango 3.4 cm a 3.6 cm (Ver anexo 10).



Gráfica 6. Distribución de frecuencia para la relación largo/ancho del fruto.

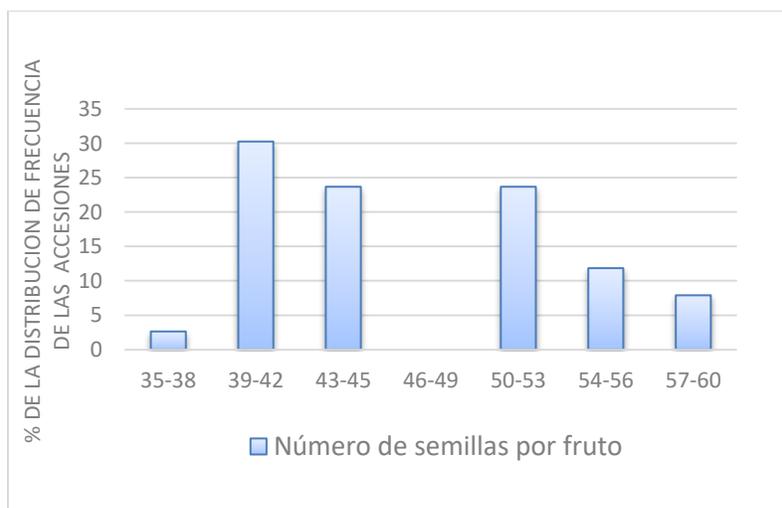
5.1.2.2.4. NÚMERO DE SEMILLAS POR FRUTO.

Para el descriptor "número de semillas por fruto" se obtuvo un valor máximo de 60 semillas por fruto y un mínimo de 35 (ver tabla 6).

Tabla 6. Accesiones con menor y mayor número de semillas por fruto.

Accesiones	Número de semillas por fruto
SESELC17	60
SESELC18	35
SESELC20	60
SESELC32	35
SESELC55	60
SESELC56	60
SESELC72	60
SESELC74	60

En la tabla anterior dos de las 76 accesiones (SESEL18 y SESELC32) presentaron 35 semillas en el fruto muestreado, mientras que en seis accesiones se obtuvieron 60 semillas. De las 76 accesiones el 30% de ellas presentaron un rango entre 39 a 42 semillas por fruto mientras que el 0% presentó el rango entre 46 a 49 semillas por fruto, esto puede verificarse en la gráfica 7 (ver anexo 11).



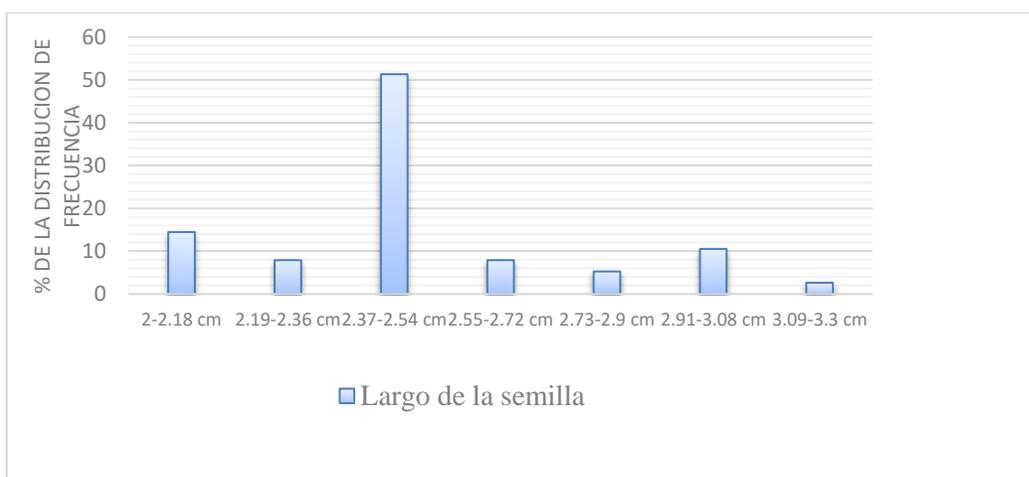
Gráfica 7. Distribución de frecuencia para el número de semillas por fruto.

5.1.2.3. SEMILLA.

Las variables cuantitativas registradas fueron: las longitudes largo, ancho y la relación largo/ancho.

5.1.2.3.1. LARGO DE LA SEMILLA.

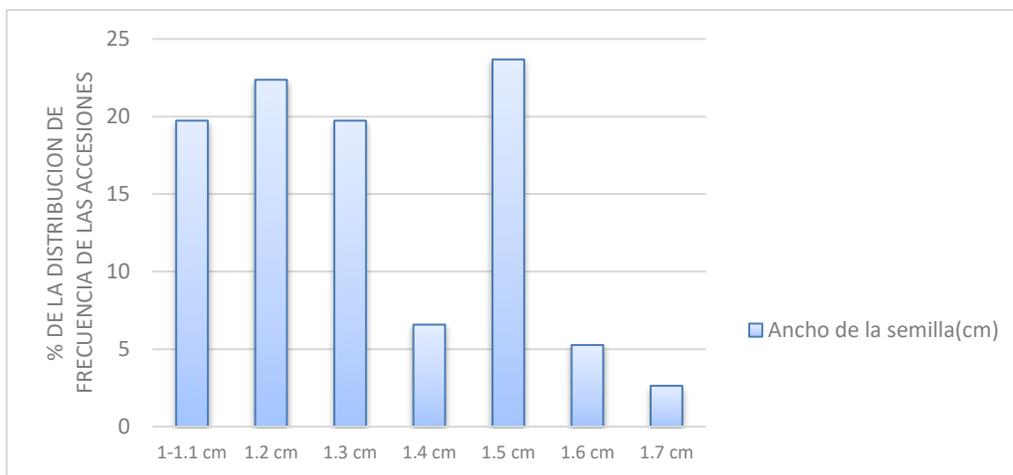
Se observó que del total de las 76 accesiones, el 51% presentó un largo de semilla entre 2.37 cm y 2.54 cm, mientras que el porcentaje más bajo del 2% se presentó en el rango entre 3.09 cm y 3.30 cm (ver anexo 12).



Gráfica 8. Distribución de frecuencias del largo de las semillas.

5.1.2.3.2. ANCHO DE LA SEMILLA.

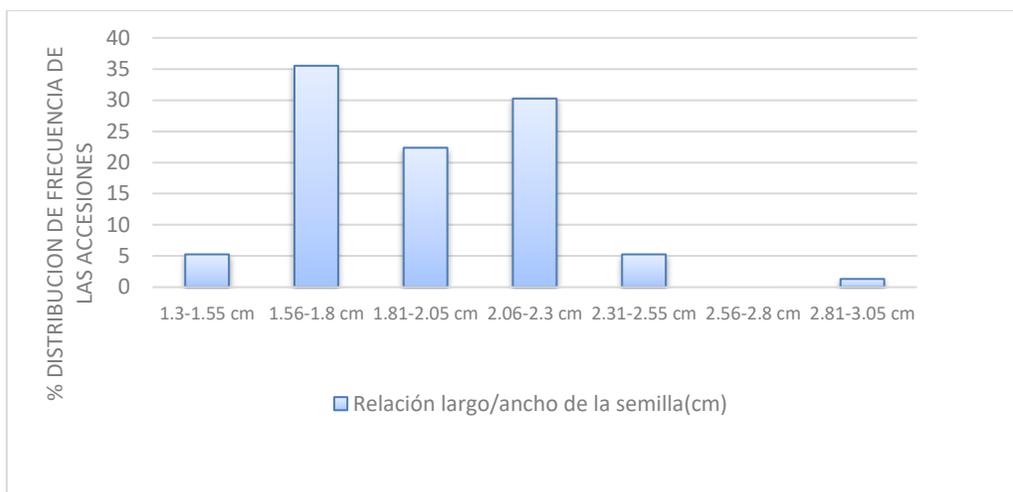
De las 76 accesiones el 23% presentó un ancho de semilla de 1.5 cm mientras que el porcentaje más bajo fue el 2.6% con semillas de 1.7 cm de ancho. Esto se puede apreciar en la gráfica 9 (ver anexo 12).



Gráfica 9. Distribución de frecuencias del ancho de la semilla de las accesiones.

5.1.2.3.3. RELACIÓN ENTRE LARGO/ANCHO DE LA SEMILLA.

En la gráfica 10 se observa que del total de 76 accesiones el 35% presentan una relación largo/ancho de la semilla de 1.56 cm a 1.80 cm mientras que el porcentaje más bajo fue el 0% para los rangos correspondientes a 2.56 cm a 2.80 cm (ver anexo 12).



Gráfica 10. Distribución de frecuencias del largo/ancho de las accesiones de la semilla de *T. cacao*.

Tabla 7. Descriptores morfológicos cuantitativos con los valores máximos, mínimos y la media de las 76 accesiones de *T. cacao*.

Descriptores cuantitativos	Máximo	Mínimo	Media
Largo de la hoja (cm).	46	24	33.75
Ancho de la hoja (cm).	21	7	10.93
Relación largo/ancho de la hoja (cm).	4.6	1.9	3.15

Largo del fruto (cm).	28	12	20.27
Ancho del fruto (cm).	14	5.5	8.61
Relación largo/ancho del fruto (cm).	3.5	1.5	2.39
Número de semillas por fruto.	60	35	46.77
Largo de la semilla (cm.)	3.3	2	2.50
Ancho de la semilla (cm).	1.7	1	1.30
Relación largo/ancho de la semilla (cm).	3	1.3	1.94

5.2. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR.

La amplificación de PCR permitió el análisis de la heterocigosis y la homocigosis que se determinó mediante la lectura de las bandas amplificadas en los geles de agarosa (ver anexos 1 y 2).

Tabla 8. Número de alelos y Heterocigosis observada y esperada de las 76 accesiones de *T. cacao* evaluado mediante el programa Gen Alex.

Locus	Número de alelos			Heterocigosis	
	Totales	Observados	Efectivos	Observada	Esperada
MTcCIR1	67	4	2.289	0.179	0.563
MTcCIR6	61	3	1.973	0.082	0.493
MTcCIR7	64	5	1.747	0.016	0.428
MTcCIR8	61	6	3.710	0.000	0.730
MTcCIR9	62	7	1.937	0.081	0.484
MTcCIR11	57	7	3.910	0.035	0.744
MTcCIR12	69	10	3.991	0.174	0.749
MTcCIR15	73	6	2.162	0.000	0.537
MTcCIR17	62	6	3.007	0.274	0.667
MTcCIR18	58	4	2.895	0.000	0.655
MTcCIR24	58	2	1.488	0.000	0.328
MTcCIR25	47	4	2.232	0.021	0.552
Total		64		0.072	0.577

El marcador molecular con mayor número de alelos efectivos fue el MTcCIR12 con 3.991 seguido por el MTcCIR11 con 3.910, el valor más bajo fue 1.488 para el microsatélite MTcCIR24 también presentó el menor número de alelos observados, y el MTcCIR12 presentó el mayor número de alelos observados.

Se presentaron valores bajos de heterocigosidad observada (H_o) con promedio de 0.072, siendo los valores más bajos para los “Cebadores” MTcCIR8, MTcCIR15, MTcCIR18 Y MTcCIR24 todos con un valor de 0.000, mientras que el valor más alto fue para el “Cebador” MTcCIR17 con 0.274. La heterocigosidad esperada (H_e), que es uno de los indicadores del potencial de un marcador para evaluar diversidad presentó un valor promedio de 0.655, el “Cebador” con mayor información es el MTcCIR12 con 0.749, mientras que el “Cebador” con menor información fue MTcCIR24 con 0.328.

Los genotipos se agruparon en el dendograma obtenido mediante el algoritmo UPGMA de acuerdo con la medida de disimilitud del índice de Jaccard (figura 40). Se observan 39 agrupamientos con las 76 accesiones de *T. cacao* a un nivel cofenético de 0.91 con diversos subgrupos internos que se organizan en orden de distancia.

El individuo más distante es la accesión SESELC20 con un nivel cofenético de 0.20. las accesiones: SESELC25, 35, 05, 49, 12, 31, 32, 52, 71, 72, 02, 22, 28, 53, 10, 11, 13, 14, 18, 34, 39, 41, 42, 55, 58, 61, 66, 70, 73, 74, 15, 16, 17, 59, 69, 06, 07, 04 y 51 presentaron un nivel cofenético de 1.0 y por ende un alto valor de similaridad entre ellas, lo que sugiere la presencia de materiales duplicados.

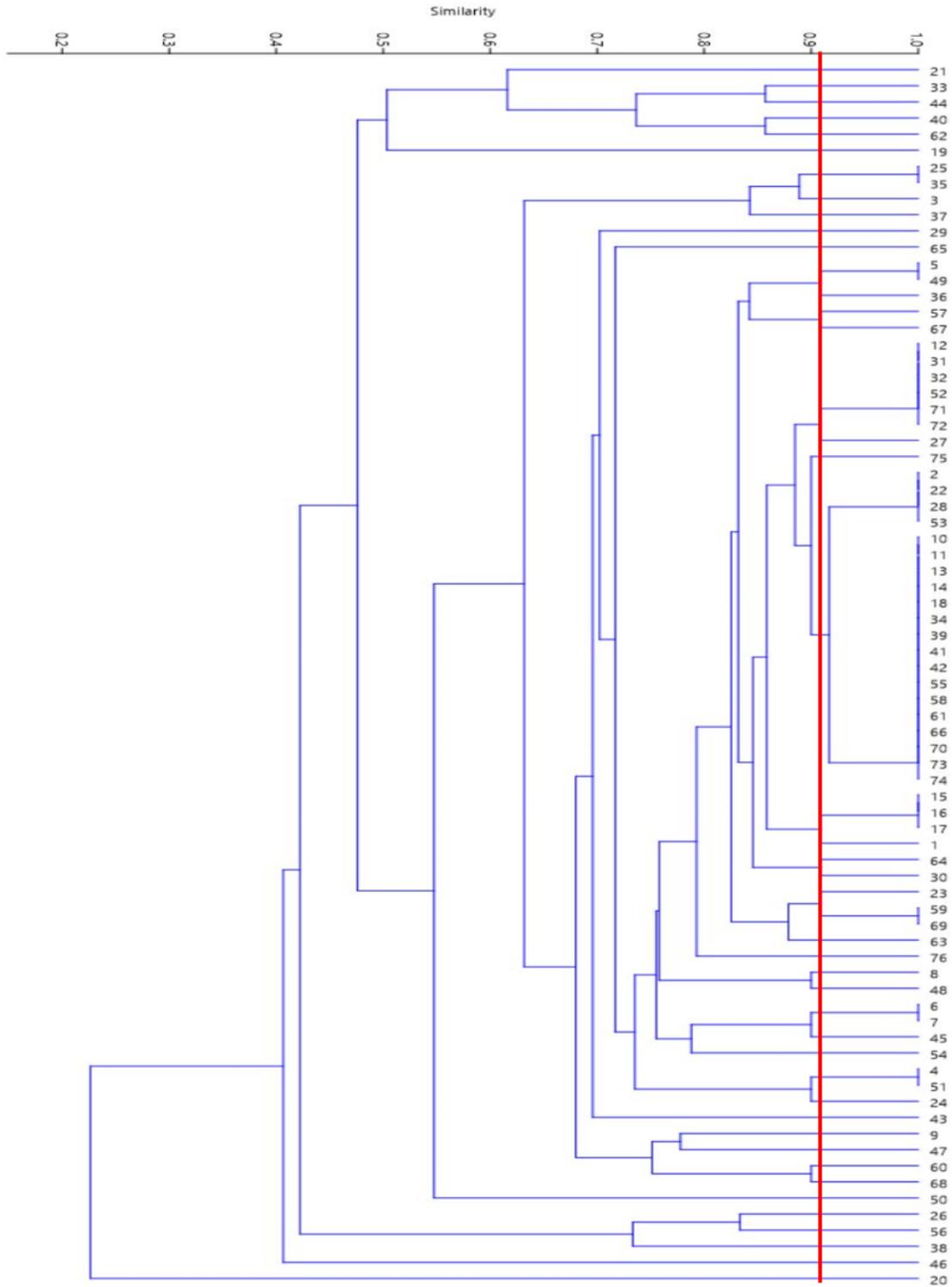


Figura 40. Dendrograma mediante el algoritmo UPGMA para las 76 accesiones de *T. cacao*, basado en el índice de disimilitud de Jaccard obtenida con el programa GenAlEx, 2018.

Para visualizar las relaciones entre las accesiones de *T. cacao* en el dendograma, también se procedió a generar un análisis de coordenadas de componentes principales a partir de la matriz de distancia de Jaccard, con este análisis se puede visualizar la distribución de los individuos en un espacio de baja dimensión en él se pueden observar dos grupos que acumulan la mayor variabilidad (figura 41). En el gráfico se pueden observar dos tendencias generales de agrupamiento, la primera de ella es donde se agrupan los materiales SESELC01, 04, 06, 07, 09, 15, 16, 17, 24, 48, 51 y 57.

Por otro lado el segundo grupo grande está conformado por los materiales SESELC61, 74, 47, 60, 59, 69, 75, 68, 29, 30, 05, 73, 64 y 49.

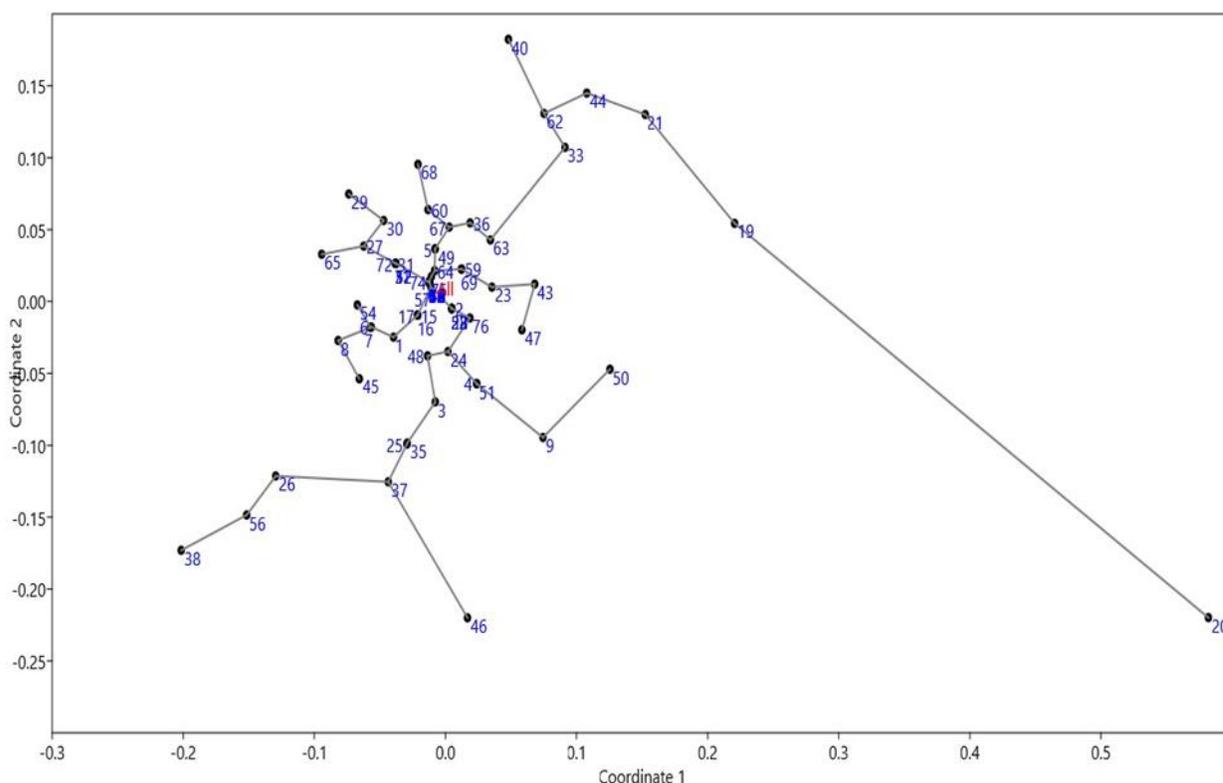


Figura 41. Matriz de distancia de Jaccard, con las 76 accesiones de *T. cacao* donde se muestra la distribución de los individuos en un espacio de baja dimensión, obtenida con el programa GenAlEx, 2018.

6. DISCUSIÓN.

En el presente estudio se obtuvieron 8 descriptores morfológicos más discriminantes (color del pedúnculo de la flor, antocianina en los sépalos y en los pétalos, forma del fruto, forma del ápice del fruto, rugosidad del fruto, color de la semilla y forma de la semilla) de los 24 utilizados para la caracterización morfológica, donde algunos de ellos fueron utilizados por Gutiérrez, (2011) quien realizó un estudio Agromorfológico y fisicoquímico de ecotipos de cacao en los municipios de Izalco y Nahuilingo en El Salvador, en el cual se clasificaron cuatro muestras como Criollas, basándose en aspectos morfológicos como la rugosidad y en la forma del fruto, una muestra como Forastero, basándose en la forma del fruto y forma de la base de la hoja; y otra muestra fue clasificada como Trinitaria basándose únicamente en la presencia de antocianinas en el fruto.

Marroquín, (2011) realizó un estudio similar en tres municipios de Usulután, en el que determinó mediante el análisis morfológico, la presencia de cacaos Criollos y Trinitarios. García, (2011) determinó la presencia de cacaos Criollos y Forasteros en los municipios de Usulután y California mediante descriptores morfológicos como forma y tonalidad de fruto, semilla, hoja y características de la flor.

Pérez, (2009) evaluó 160 clones de cacao utilizando cinco características morfológicas del fruto (forma, rugosidad, constricción basal, forma del ápice y color a distintas edades), la investigación permitió una mayor precisión en la identificación fenotípica del material de estudio ya que se identificaron 27 árboles que no correspondían con el tipo de referencia.

Martínez, (2007) realizó una caracterización morfológica y molecular del Cacao Nacional Boliviano, evaluaron 164 genotipos utilizando siete variables cuantitativas y seis variables cualitativas, de los cuales los más discriminantes fueron: forma del fruto, rugosidad de fruto, forma del ápice y color de la semilla; al realizar el análisis molecular con microsatélites, permitió ubicar al Cacao nacional Boliviano silvestre en un grupo diferente al Forastero y Trinitario.

En esta investigación se encontró un alto nivel de polimorfismo al igual que en estudios realizados con Isoenzimas por Lanaud, (1987), RAPDs por Lecerteau et al, (1997), SSRs por Martínez, (2007), SSRs por Osorio, (2009). El polimorfismo detectado con los 12 microsatélites evaluados fue del 100%. En total se obtuvieron 64 alelos, un promedio de 5.33 bandas por microsatélite, lo cual es un valor mayor al reportado en estudios realizados por Smulders et al, (2009) y Sereno et al, (2006) quienes encontraron valores promedio de bandas de 4.5 y 4.45 respectivamente, Zhang et al, (2006) reportó con un valor promedio de 3.7 por microsatélite.

En esta investigación se encontró un bajo nivel de polimorfismo en comparación a lo reportado por Risterucci et al, (2001) con un promedio de 9.5 bandas por microsatélite, Motamayor, (2001) reportó en su estudio 15 bandas por microsatélite, Lanaud et al, (2004) reportó un promedio de 5.6 bandas por microsatélite, July, (2007) reportó un promedio de 13 bandas por microsatélite, Osorio, (2009) reportó un promedio de 5.46 bandas por microsatélite y Ruiz, (2014) reportó 6.75 bandas por microsatélite. Lo que indica también que en el presente estudio se encontró una alta diversidad genética, el cebador MTcCIR 12 fue el microsatélite que más bandas amplificó. Los análisis realizados en este estudio revelaron un bajo nivel de Heterocigosidad observada con un valor promedio de 0.072. En comparación con algunos valores reportados por Sereno et al, (2006) en las poblaciones de la Amazonía entre Colombia y Ecuador en donde se determinó 0.39 de Heterocigosidad observada, en otro estudio Motamayor et al, (2008) reportó 0.480 Heterocigosidad observada en poblaciones de la alta Amazonía Brasileira y Osorio Guarín, (2009) en el Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas Sinchi reportó tan solo 0.295 de Heterocigosidad observada. Según Lanaud, (1987) y Risterucci et al, (2001) los análisis moleculares en genotipos cultivados han mostrado niveles bajos de heterocigosidad observada, lo cual explicaría los resultados bajos de Heterocigosidad observada en este estudio y en los antes mencionados.

En este estudio y se determinó la heterocigosidad observada es más baja que la heterocigosidad esperada, esto sucede también en los trabajos de Sereno et al, (2006), Lanaud et al, (1999) y Osorio, (2009) con un set similar de microsatélites, así también Schnell et al, (2005) y Risterucci et al, (2001) con Isoenzimas y RFLPs respectivamente.

7. CONCLUSIONES.

- Al realizar el análisis morfológico utilizando 24 descriptores, 8 fueron los más discriminantes para poder determinar la presencia de cacao de tipo Criollo y cacao de tipo Híbrido Trinitario.
- Según su morfología se presentó variabilidad en los 8 descriptores más discriminantes:

Descriptores más discriminativos	Cacao tipo Criollo	Cacao tipo Híbrido Trinitario
Color del pedúnculo de la flor	59%	41%
Antocianina en los sépalos	29%	71%
Antocianina en los pétalos	43%	57%
Forma del fruto	89%	11%
Forma del ápice del fruto	53%	47%
Rugosidad del fruto	17%	83%
Color de la semilla	33%	67%
Forma de la semilla	44%	56%

- Al realizar los análisis moleculares utilizando 12 microsatélites se encontró que el cacao tipo Criollo posee un 94% de pureza genética y el 6% de hibridación.
- Mediante el algoritmo de ligamiento promedio, de acuerdo con la medida de similitud del índice de Jaccard, se determinaron 39 grupos, de las 76 accesiones a un nivel cofenético de 0.91, indicando que la accesión SESELC20 es el individuo más distante con un nivel cofenético de 0.20, mientras que 39 accesiones presentaron un valor alto de similitud entre ellas a una distancia de 1.0, indicando la presencia de materiales duplicados entre sí.
- El análisis morfológico demostró que en las 76 accesiones se encontraban árboles con características fenotípicas del tipo Criollo y del tipo Híbrido Trinitario, mientras que el análisis molecular demostró la presencia de cacao del tipo Criollo con muy poca hibridación.

8. RECOMENDACIONES.

- Algunos frutos de *T. cacao* morfológicamente presentan características que sugieren pertenecer a ciertos grupos genéticos de la especie y al realizar análisis moleculares y estudiar su ADN, se ha demostrado que pertenecen a otros grupos genéticos de la especie, por lo que se recomienda realizar estudios fisicoquímicos y climatológicos, en los cultivares de cacao con la finalidad de descubrir si existe una posible relación en la nutrición del suelo y la humedad que incida en los caracteres como la coloración de las hojas, flores, frutos y semillas; así como en el desarrollo y crecimiento fruto y semilla. Para poder comprender la razón, por la que han sido clasificados erróneamente en los bancos de germoplasma.
- Incluir mayor número de Marcadores Moleculares Microsatélites que permitan reconocer más regiones en el genoma del cacao para obtener una mayor información genética de los tipos de cacaos presentes en El Salvador y determinar si existen nuevos grupos genéticos de la especie *T. cacao*.
- En El Salvador los análisis moleculares deben ser considerados necesarios en futuras investigaciones para obtener una identificación más exacta del germoplasma de *T. cacao*.
- Fortalecer alianzas con instituciones nacionales e internacionales, ONGs y cooperativas interesadas en el rescate del germoplasma autóctono del Cacao, para poder llevar a cabo proyectos de evaluación morfológica y molecular que permitan la creación de oportunidades de fuentes de empleo, desarrollo científico y tecnológico de El Salvador.
- Se recomienda la creación de planes de manejo y conservación “*In Situ*” y “*Ex Situ*” del germoplasma autóctono de *T. cacao*.

- Se recomienda que en futuras investigaciones se incluya el descriptor morfológico número de frutos por árbol, para determinar la existencia de una alta o baja productividad en los cultivos de *T. cacao*.

- Para futuras investigaciones se recomienda aplicar estadísticos que permitan reconocer la existencia diferencia significativa entre los descriptores morfológicos retomados en esta investigación.

- Se recomienda incluir en futuras investigaciones la incidencia que presentan los polinizadores en la productividad de los cultivos de *T. cacao*.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- Álvarez Gil M. 2011. La selección asistida por marcadores (MAS, “Marker-assisted selection”) en el mejoramiento genético del tomate (*Solanum lycopersicum* L.). *Cultiv. Trop.* 32:154–171.
- Ayestas Villega D. 2009. Caracterización morfológica de cien árboles promisorios de *Theobroma cacao* L. en Waslala, RAAN, Nicaragua, [engineer]. Universidad Nacional Agraria, UNA. Managua, Nicaragua. Pp68. [accessed 2017 Mar 17]. <http://repositorio.una.edu.ni/2109/>
- Azofeifa Delgado. A. 2006. Usos de Marcadores Moleculares en Plantas; Aplicaciones en frutales del trópico. *Agronomía Mesoamericana.* 17(2): 221-242
- Boza EJ;. JC. Motamayor;. FM. Amores;. Cedeño-Amador;. Tondo;. Livingstone;. Schnell;. Gutiérrez. 2014. Genetic Characterization of the Cacao Cultivar CCN 51: Its Impact and Significance on Global Cacao Improvement and Production. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 139:219–229.
- Browning, D. 1968. El Salvador, La Tierra y el Hombre. Dirección de publicaciones e impresos, Ministerio de Cultura, San Salvador El Salvador. Pp 425.
- 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. Pp 12-18.
- Castañeda de Abrego, Aránzazu Hernández;. Hernández Lovato;. Quintanilla Monjaras;. Morán Rodríguez. 2016. Guía de conceptos básicos de genética en cacao, para su aplicación en la caracterización del germoplasma de cacao nativo de El Salvador. Mesa Nacional del Cacao El Salvador C.A. Programa alimentario sostenible, CENSALUD, USAID, RUTA, UNOPS. San Salvador El Salvador. Pp71.
- Cuatrecasas. J. 1964. Cacao and its allies: A Taxonomic revision of the genus *Theobroma*. *Smithsonian Institute Bulletin of the United States. National Museum Contributions from the U.S. National Herbarium.* Vol. 3. Part6. Pp614.
- Dostert, N. Roque. J., Cano A., La Torre. M. I. y M. 2011. Hoja Botánica: Cacao (*Theobroma cacao* L.). Primera Edición. Proyecto Perubiodiverso. Programa desarrollo rural sostenible-GIZ. Lima, Perú. Pp20.
- Dubon, A. Sánchez J. 2016. Manual de producción de cacao, Segunda edición. Fundación Hondureña de Investigación Agrícola (FHIA). Cortez Honduras. Pp264.
- Enríquez, G. 1991. Descripción y evaluación de los recursos genéticos. In técnicas para el manejo y uso de los recursos genéticos vegetales. Editorial porvenir, Quito, Ecuador. Pp116-160.
- Erazo X.R;. Pinzón MA;. Coronado YM;. Coronado ACM;. Arana AC;. González A. 2015. Comparación genética de tres fuentes del cacao *Theobroma cacao* L., mediante el uso de

marcadores microsatélites. Ingresar Rev. 13. [accessed 2017 Mar 17]. <http://revistabiocologia.unicauca.edu.co/revista/index.php/biociologia/article/view/365>

Franco, T.; Hidalgo, R. 2003. Análisis Estadístico de datos de caracterización Morfológica de Recursos Filogenéticos. Boletín técnico no. 8, Instituto Internacional de Recursos Filogenéticos (IPGRRI), Cali, Colombia. p89.

Figueira. A.; J. Janick;. M. Levy;. P. Goldsbrough. 1994. Reexaminar la Clasificación de *Theobroma cacao* L. Utilizando marcadores moleculares. Departamento de Horticultura. Universidad de Sao Paulo. Brasil. 19(5)1073-1165

García Escobar. H. M. y Martínez Ramírez. R. N. (2018) Determinación del perfil de sabor de doce cacaos autóctonos (*Theobroma cacao* L.) producidos en siete fincas cacaoteras de El Salvador. Tesis para optar al grado de Ingeniero Agroindustrial, Facultad de Ciencias Agronómicas, Ciudad Universitaria. San Salvador, El Salvador. Pp 268.

García Carrión. L. F. 2012. Catálogo de Cultivares de Cacao del Perú. Ministerio de Agricultura. Dirección General de Cooperación Agraria. Lima. Perú. Pp112.

García López. M. P. 2011. Estudio Agromorfológico y fisicoquímico de ecotipos de cacao cultivados en los municipios de Usulután y California del departamento de Usulután en El Salvador. Tesis para optar al grado de Ingeniero en Industria. Universidad Dr. José Matías Delgado. San Salvador El Salvador. Pp60.

Gómez Guevara. B. M. 2019. Caracterización de 30 Acciones de *T. cacao* L. Seleccionados en pequeños cultivos de Cacao en El Salvador mediante marcadores Moleculares Microsatélites. Tesis para optar al grado de Licenciada en Biología. Universidad de El Salvador, Facultad de Ciencias Naturales y Matemática. Ciudad Universitaria. San Salvador, El Salvador. Pp82.

González González, E. A. 2011. Análisis de la diversidad genética en poblaciones naturales de especies vegetales amenazadas: *Ilex perado* ssp. *Lopezlilloi* (Aquifoliaceae), *Silene nocteolens* (Caryophyllaceae) y *Sorbus aria* (Rosaceae), Departamento de Biología, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. p242.

Gutiérrez, C. 2009. Estudio sobre la caracterización genética de las razas caprinas mallorquina e ibicenca, Universidad de Córdoba, Córdoba.

Gutiérrez Hernández, B. E. 2011. Estudio Agromorfológico y fisicoquímico de ecotipos de cacao cultivados en los municipios de Izalco y Nahulingo, en El Departamento de Sonsonate en El Salvador. Tesis para optar al grado de Ingeniería en Alimentos. Universidad Dr. José Matías Delgado. San Salvador El Salvador. Pp116.

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.

- IPGRI, (International Plant Genetic Resources Institute). 2000. Working procedures for cocoa germplasm evaluation and selection. Proceedings of the CFC/ICCO/IPGRI project Workshp 1998 Montpellier, FR. Eds Eskes, AB; Engels, JMM; Lass, RA. Pp176.
- Jiménez;. Castillo;. Gómez;. Ramos;. Chacon;. Moya;. Rumbos;. Vidal;. Alborndz;. Gutierrez;. Vivas;. Moralez;. Ramis. 2007. Manual Práctico para la caracterización morfológica de cacao
- July W. 2007. Caracterización morfológica y molecular del Cacao Nacional Boliviano y de selecciones élites del Alto Beni, Bolivia, CATIE, Turrialba, Costa Rica. Pp101.
- 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. 8:2141–2152. Pp12.
- Lanaud, C. 1987. Doubled Haploids of Cocoa (*Theobroma cacao* L) 1. Observations of Monogenic and Polygenic Characters, Plant breeding. 99:3-196.
- Lachenaud, P. 1997. Genetic/Taxonomic structuring of the *Theobroma cacao* L. species- Fresh hypothesis. INGENIC Newsletter, issue N° 3. Pp10-11.
- LENAP (Laboratorio de Entomología Aplicada y Parasitología). s. a. Practica 3: Elaboración de geles y montaje. Universidad de San Carlos de Guatemala; Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia; Laboratorio de Entomología Aplicada y Parasitología. 2pp.
- López Ventura Y E, 1999. Caracterización morfológica y molecular de genotipos silvestres de *Quassia amara* L. ex Blom de Centroamérica. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, Programa de educación para el desarrollo y la conservación Escuela de Posgrado. Turrialba, Costa Rica. Pp118.
- Martínez O, 1995. Métodos estadísticos multivariados en Biología Molecular y su aplicación en la investigación agrícola, Agronomía Colombiana Vol XII (1) 66-71 p.
- Marroquín Rodríguez A. M. 2011. Estudio Agromorfológico y fisicoquímico de ecotipos de cacao cultivados en los municipios de Usulután y Tecapan del departamento de Usulután en El Salvador. Tesis para optar al grado de Ingeniero en Alimentos. Universidad Dr. José Matías Delgado. San Salvador El Salvador. Pp 57.
- Mayo;. Castiñeiriras;. Shagarosky;. M. Torres;.. Barrios;. Moreno;. Fragata;. Fernández;. Fuentes;. Sánchez;. Lescano;. Alonso;. Cristobal;. Orellana;. SF. Oviedo. Conservación y Manejo de los Recursos fitogenéticos en El Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical. Revista Agrotecnia de Cuba. Pp27.
- Motamayor. J.C;. A.M. Risterucci;. P.A. López;. C.F. Ortiz;. A. Moreno;. C. Lanaud. 2002. Cacao domestication I: the origin of the cacao cultivated by the Mayas. Heredity 89:380–386
- Motamayor. J;. A. Risterucci; M. Heath; C. Lanaud;. (2003) Cacao domestication II: progenitor germplasm of the Trinitario cacao cultivar. Heredity 91: 322-330

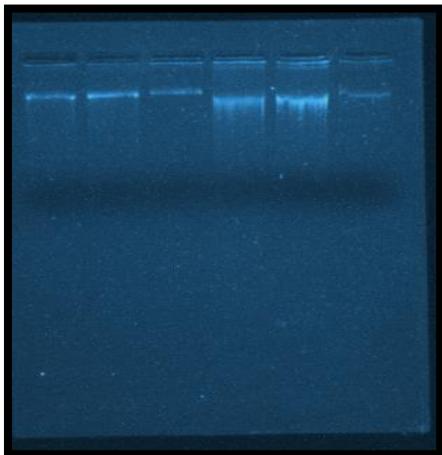
- Motamayor J.C., P. Lachenaud, J.W. da Silva e M., R. Loor, D.N. Kuhn, J.S. Brown, R.J. Schnell. 2008. Geographic and Genetic Population Differentiation of the Amazonian Chocolate Tree (*Theobroma cacao* L.). PLoS ONE 3(10): e3311. doi:10.1371/journal.pone.0003311
- Murillo. J.; Gil, D.; Aguilar, S.; Rivera, F. y López, G. 2011. Caracterización molecular de clones de *Theobroma cacao* L., por medio de marcadores moleculares microsatélites. En: Revista Luna Azul, no 32, enero – junio, p. 52 – 60.
- Nei. M. 1987. Molecular Evolutionary Genetics. Columbia University Press. New York, USA. p512
- Osorio Guarín J. A. 2009. Caracterización Molecular del Banco de Germoplasma de Cacao (*Theobroma cacao* L.) del Instituto Amazónico de investigaciones científicas SINCHI mediante marcadores moleculares Microsatélites. Pp.61.
- Pérez Zúñiga. J. I. 2009. Evaluación y caracterización de selección de cacao (*Theobroma cacao* L.) del programa de mejoramiento de CATIE. Tesis para optar al grado de Magister Scientiae en Agricultura Ecológica. Escuela de Posgrado CATIE. Turrialba, Costa Rica. Pp169.
- Phillips W.; Enríquez, G. 1988. Catálogo de cultivares de cacao. CATIE, Turrialba, Costa Rica. Pp18-60.
- Phillips M.; H. Rodríguez; P. Fritz. 1995. Marcadores de ADN Teoría, aplicaciones y protocolos de trabajo con ejemplos de investigaciones de cacao (*Theobroma cacao*). Unidad de Biotecnología Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. Turrialba, Costa Rica. Pp 173.
- Querol D. 1992. Recursos genéticos, nuestro tesoro olvidado. Lima Perú. Pp 252.
- 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. Colombia. Pp 80.
- Salazar J. 2016. Análisis de diversidad genética del Cacao (*Theobroma cacao* L). Venezolano reguardado en bancos de germoplasma de mejoramiento genético. Universidad Central de Venezuela, Facultad de agronomía. Venezuela. Pp 173
- Sánchez, I.; Zarate, L.; Gallego, G. y Tohme, J. 2007. Análisis de la diversidad genética de accesiones de *Theobroma cacao* L. del banco de conservación a cargo de CORPOICA. En: Revista Corpoica – Ciencia y Tecnología Agropecuaria, 8 (2): 26 – 31.
- Sevilla R.; Holle M. 1995. Recursos Genéticos Vegetales. Lima Perú. Pp 320.
- Sherwin Williams (Junio de 2018) Recuperado de: <https://www.sherwin-williams.com/homeowners/color/find-and-explore-colors/paint-colors-by-family?q=SW6841>

Vásquez-Ovando A.; Molina-Freaner. F.; Nuñez-Farfan. J. y Figueroa Miguel. S. 2012. Potencial de los marcadores moleculares para el rescate de individuos de *Theobroma cacao L.* de alta calidad. Centro de Biociencias, Universidad autónoma de Chiapas. México. Pp. 21.

Wilde J.; R. Waugh;. W. Powell. (1992) Genetic fingerprinting of *Theobroma* clones using randomly amplified polymorphic DNA markers. *Theor Appl Genet* 83 871-877

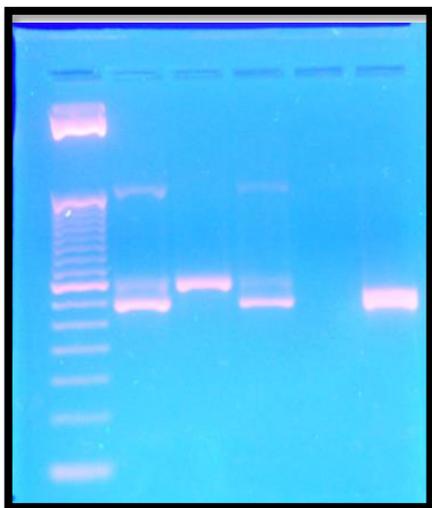
10. ANEXOS.

Anexo 1. Gel de agarosa utilizado para determinar la calidad del ADN de las accesiones.



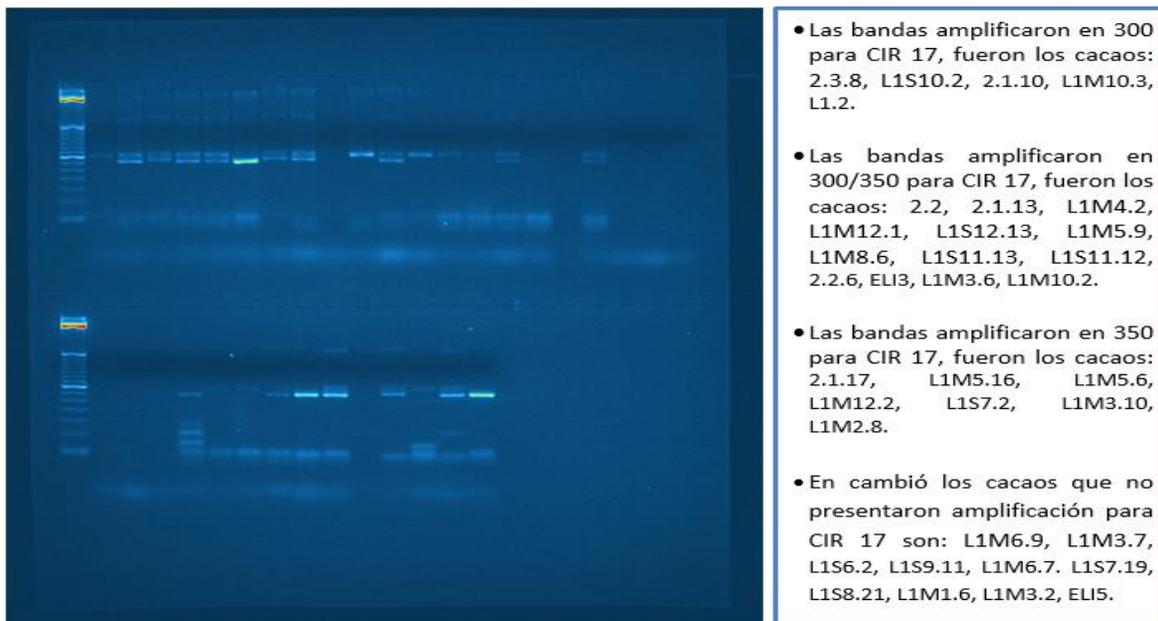
Al finalizar el gel de control de calidad se observaba en el Documentador de geles; si el ADN se encontraba en perfectas condiciones (Como se observa en la fotografía), se procedía a realizar la amplificación de ADN en el termociclador para luego correr los geles del producto de PCR.

Anexo 2. Gel de agarosa con ADN de producto de PCR.



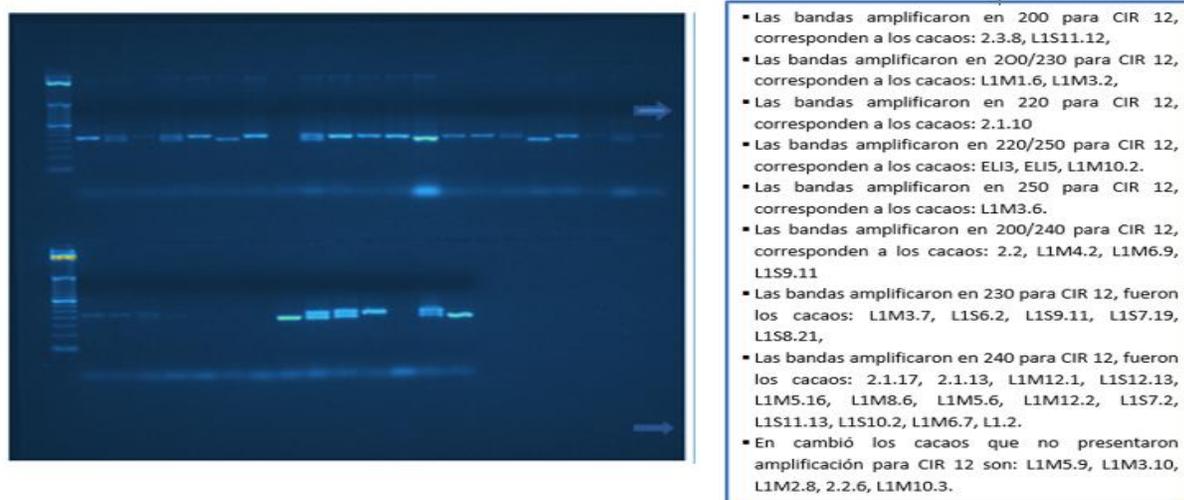
Corrido de gel de agarosa con las muestras 2.1.2, 2.1.4, 2.1.6, L1S3.8, L1S4.18, del ADN producto de PCR, el Cebador utilizado corresponde mTcCIR11, el gel se visualizo en el trans-iluminador, a la derecha en el Cebador pozo se observa el marcador de peso molecular con 50 pares de bases.

Anexo 3. Gel de agarosa con 35 ADNs producto de PCR.



El gel de Agarosa contenía 35 diferentes ADNs del producto de PCR, utilizando el Cebador mTcCIR17. Este fue visualizado con el Documentador de geles, a la izquierda se aprecia el análisis de la amplificación del gel.

Anexo 4. Gel de agarosa visto por medio de un Documentador de geles.



El gel de Agarosa contenía 35 diferentes ADNs del producto de PCR, utilizando el Cebador mTcCIR12. Este fue visualizado con el Documentador de geles, a la izquierda se aprecia el análisis de la amplificación del gel

Anexo 5. Etiquetas para las muestras que fueron utilizadas durante los muestreos.

Etiqueta para las muestras	
Fecha de colecta	
sitio de muestreo	
numero de muestra	

Anexo 6. Hoja de colecta de la toma de datos en campo.

HOJA DE COLECTA EN CAMPO.

Nombre de la finca: _____ fecha: _____

Nombre del dueño: _____

Nº del Árbol: _____ Hora de colecta: _____

Nº de frutos: _____

CARACTERISTICAS	
HOJA	
Largo (cm)	
Ancho (cm)	
Base de la hoja	
Pecíolo	
Relación L/A	
FRUTO	
Forma del fruto	
Color del fruto inmaduro	
Color del fruto maduro	
Largo del fruto (cm)	
Ancho del fruto (cm)	
Relación L/A	
Forma del ápice	
Rugosidad	
Número de semillas por fruto	
FLOR	
Color del pedúnculo	
Antocianina en los sépalos	
Antocianina en los pétalos	
SEMILLA	
Color	
Largo (cm)	
Ancho (cm)	
Forma	
Observaciones:	

Anexo 7. Descriptores cuantitativos de la hoja (largo, ancho y relación largo/ancho) expresados en centímetros.

Accesiones	Largo de hoja (cm).	Ancho de hoja (cm).	Relación largo/ancho de hoja (cm).
SESELC01	30	12	2.5
SESELC02	34	12	2.8
SESELC03	40	15	2.7
SESELC04	34	14	2.4
SESELC05	30	12	2.5
SESELC06	30	12	2.5
SESELC07	36	8	4.5
SESELC08	38	10	3.8
SESELC09	33	11	3
SESELC10	30	12	2.5
SESELC11	40	21	1.9
SESELC12	33	10	3.3
SESELC13	30	12	2.5
SESELC14	36	9	4
SESELC15	37	15	2.5
SESELC16	32	9	3.6
SESELC17	35	9	3.9
SESELC18	30	9	3.3
SESELC19	41	13	2
SESELC20	37	14	2.6
SESELC21	36	13	2.8
SESELC22	29	12	2.4
SESELC23	37	14	2.6
SESELC24	24	11	2.2
SESELC25	28	8	3.5
SESELC26	30	8.5	3.8
SESELC27	30	8	3.8
SESELC28	33	13	2.5
SESELC29	32	7	4.6
SESELC30	25	7	3.6
SESELC31	32	8.5	3.8
SESELC32	30	12	2.5
SESELC33	40	12	3.3
SESELC34	36	12	3
SESELC35	45	17	2.6
SESELC36	32	9	3.6
SESELC37	31	11	2.8
SESELC38	34	11	3.1
SESELC39	35	12	2.9
SESELC40	40	11	3.6
SESELC41	35	11	3.2
SESELC42	27	10	2.7
SESELC43	31	8	3.9
SESELC44	37	11	3.4
SESELC45	41	14	2.9
SESELC46	32	9	3.6

SESELC47	34	10	3.4
SESELC48	27	8	3.4
SESELC49	45	15	3
SESELC50	35	10	3.5
SESELC51	30	9	3.3
SESELC52	46	15	3.1
SESELC53	30	9	3.3
SESELC54	37	11	3.4
SESELC55	28	8	3.5
SESELC56	25	7	3.6
SESELC57	43	13	3.3
SESELC58	41	12	3.4
SESELC59	35	10	3.5
SESELC60	34	9	3.8
SESELC61	35	11	3.2
SESELC62	36	10	3.6
SESELC63	30	11	2.7
SESELC64	35	12	2.9
SESELC65	30	10	3
SESELC66	27	8	3.4
SESELC67	36	11	3.3
SESELC68	36	11	3.3
SESELC69	30	11	2.7
SESELC70	35	11	3.2
SESELC71	33	10	3.3
SESELC72	35	9	3.9
SESELC73	34	10	3.4
SESELC74	26	10	2.6
SESELC75	37	11	3.4
SESELC76	32	10	3.2

Anexo 8. Descriptores cualitativos de la hoja y la flor. Dichos descriptores son representados por números utilizados para simbolizar la descripción del descriptor. Dicha descripción se encuentra al pie de la tabla.

accesiones	base de la hoja	Pecíolo de la hoja	color de la hoja joven	color de la hoja madura	color del pedúnculo de la flor	antocianina en los sépalos de la flor	antocianina en los pétalos de la flor
SESELC01	2	2	2	1	4	2	1
SESELC02	3	2	3	1	4	2	2
SESELC03	3	1	4	1	2	1	1
SESELC04	4	1	3	1	2	2	2
SESELC05	3	1	4	1	4	2	2
SESELC06	2	2	3	1	1	1	1
SESELC07	1	2	4	1	1	1	1
SESELC08	1	2	3	1	4	2	2
SESELC09	2	2	3	2	4	2	2
SESELC10	2	2	2	1	4	2	2
SESELC11	1	1	2	1	3	1	2
SESELC12	2	2	4	1	3	1	1
SESELC13	3	2	2	1	3	2	2
SESELC14	2	1	4	1	3	1	2
SESELC15	3	2	3	1	3	2	2
SESELC16	2	2	4	1	5	2	2
SESELC17	1	2	4	1	4	2	1
SESELC18	1	2	4	1	1	1	2
SESELC19	3	2	3	1	4	2	2
SESELC20	2	2	4	1	5	2	1
SESELC21	2	2	4	1	5	2	2
SESELC22	4	1	4	1	1	2	1
SESELC23	2	2	5	1	1	1	1
SESELC24	2	2	4	1	1	2	1
SESELC25	4	2	2	1	2	2	2
SESELC26	1	2	5	1	5	2	1
SESELC27	4	2	2	1	4	2	1
SESELC28	2	1	2	1	5	2	1
SESELC29	2	2	4	1	1	2	1
SESELC30	3	2	3	1	1	1	1
SESELC31	2	2	4	1	2	1	1
SESELC32	4	2	2	1	5	2	2
SESELC33	1	2	4	1	4	2	2

SESELC34	2	1	3	1	4	2	2
SESELC35	4	2	3	1	4	2	2
SESELC36	4	2	4	1	1	1	1
SESELC37	4	1	3	1	4	2	2
SESELC38	2	2	3	1	4	2	1
SESELC39	1	1	4	1	2	2	2
SESELC40	4	2	4	1	4	2	2
SESELC41	2	2	3	1	1	1	1
SESELC42	4	2	3	1	4	2	1
SESELC43	4	2	3	1	1	2	2
SESELC44	2	2	3	1	1	2	2
SESELC45	4	1	2	1	4	2	1
SESELC46	2	2	3	2	4	2	2
SESELC47	1	2	2	1	4	2	1
SESELC48	4	2	2	1	4	2	2
SESELC49	2	2	2	1	3	2	2
SESELC50	2	2	2	1	4	1	1
SESELC51	1	1	3	1	4	2	2
SESELC52	2	2	2	1	4	2	2
SESELC53	3	2	4	1	4	2	2
SESELC54	3	2	2	1	4	2	1
SESELC55	2	2	2	1	4	2	2
SESELC56	4	1	2	1	5	2	1
SESELC57	4	1	2	1	4	2	1
SESELC58	2	2	3	1	2	2	2
SESELC59	4	2	4	1	1	1	1
SESELC60	4	1	2	1	1	1	1
SESELC61	2	2	3	1	3	2	1
SESELC62	2	2	3	1	1	1	1
SESELC63	4	2	2	1	3	1	1
SESELC64	4	2	2	1	3	1	1
SESELC65	2	2	4	1	1	2	2
SESELC66	4	1	2	1	1	2	1
SESELC67	4	2	2	1	1	2	1
SESELC68	2	2	3	1	1	2	1
SESELC69	1	2	3	1	1	2	1
SESELC70	2	1	2	1	1	1	1
SESELC71	3	1	4	1	2	2	1
SESELC72	2	1	2	1	1	1	1
SESELC73	2	1	4	1	4	2	1

SESELC74	4	2	4	1	1	2	1
SESELC75	2	2	2	1	4	1	1
SESELC76	4	2	2	1	1	1	1

Interpretación de la tabla:

Base de la hoja: 1= aguda, 2= obtusa, 3= redondeada y 4= cordiforme.

Pecíolo de la hoja: 1= sin pulvínulo y 2= con pulvínulo.

Color joven de la hoja: 1= verde oscuro, 2= verde claro, 3= naranja, 4= ocre y 5= vino.

Color maduro de la hoja: 1= verde oscuro 2= verde claro.

Color del pedúnculo de la flor: 1=cereza, 2= rosado, 3= rosado claro, 4= verde y 5= verde claro.

Antocianina en los sépalos de la flor: 1= presente y 2= ausente.

Antocianina en los pétalos de la flor: 1= presente y 2= ausente.

Anexo 9. Descriptores cualitativos del fruto, los números indicados en los descriptores representan valores que se explican al pie de la tabla.

Accesiones	Color inmaduro Del fruto	Color maduro del fruto	Forma del fruto	Forma del ápice Del fruto	Rugosidad del fruto
SESELC01	1	5	3	1	5
SESELC02	1	5	1	2	7
SESELC03	4	5	3	1	5
SESELC04	3	5	1	1	5
SESELC05	4	5	1	1	5
SESELC06	4	5	3	1	5
SESELC07	1	5	3	1	5
SESELC08	1	2	1	2	5
SESELC09	1	5	3	1	5
SESELC10	1	2	2	3	3
SESELC11	1	5	3	1	5
SESELC12	4	5	3	1	5
SESELC13	1	2	2	1	5
SESELC14	1	5	2	1	5
SESELC15	1	1	2	1	3
SESELC16	1	5	2	1	5
SESELC17	1	5	2	1	5
SESELC18	1	5	2	1	3
SESELC19	1	5	2	1	5
SESELC20	1	5	3	1	5
SESELC21	1	5	1	1	7
SESELC22	1	5	3	1	5
SESELC23	1	1	4	3	3
SESELC24	1	5	2	1	5
SESELC25	1	1	1	2	7
SESELC26	1	5	2	1	5
SESELC27	1	5	3	1	3
SESELC28	1	1	1	1	7
SESELC29	1	5	2	1	5
SESELC30	6	2	3	5	3
SESELC31	1	5	3	2	7
SESELC32	1	5	1	5	5
SESELC33	1	5	2	5	5
SESELC34	1	5	1	1	5
SESELC35	1	5	1	5	5

SESELC36	4	3	2	5	3
SESELC37	1	2	3	5	7
SESELC38	1	5	2	5	5
SESELC39	4	5	2	5	5
SESELC40	1	5	1	3	5
SESELC41	1	1	4	4	3
SESELC42	1	5	3	5	5
SESELC43	1	1	1	5	5
SESELC44	1	5	4	4	5
SESELC45	1	5	2	5	5
SESELC46	1	5	2	3	7
SESELC47	1	1	1	2	7
SESELC48	1	5	1	1	7
SESELC49	1	5	4	5	5
SESELC50	1	5	2	3	3
SESELC51	1	5	2	3	5
SESELC52	1	5	1	5	5
SESELC53	1	5	4	3	3
SESELC54	1	2	2	3	5
SESELC55	1	2	1	4	5
SESELC56	1	1	3	5	5
SESELC57	1	5	1	5	5
SESELC58	1	5	3	5	3
SESELC59	3	3	1	5	3
SESELC60	1	5	3	2	5
SESELC61	4	3	3	1	5
SESELC62	3	6	3	3	3
SESELC63	6	3	1	1	7
SESELC64	1	1	4	5	5
SESELC65	1	5	2	3	5
SESELC66	1	5	4	5	3
SESELC67	1	1	1	3	3
SESELC68	3	6	1	3	5
SESELC69	3	6	1	1	7
SESELC70	3	6	4	3	3
SESELC71	1	1	2	5	5
SESELC72	1	5	1	1	5
SESELC73	1	1	1	1	5
SESELC74	3	4	1	1	7
SESELC75	4	6	1	1	7

SESELC76	5	7	1	1	5
----------	---	---	---	---	---

Interpretación de la tabla:

Color inmaduro del fruto y color maduro del fruto: 1= verde grisáceo, 2 = naranja intenso, 3 = ocre, 4 = vino intenso, 5 = amarillo mostaza y 6 = rosado intenso.

Forma del fruto: 1= oblonga, 2 = elíptica, 3 = ovoidal, 4 = redondeada y 5 = esferoide.

Forma del ápice del fruto: 1= atenuada, 2= aguda, 3= obtusa, 4= redondeada y 5 = mamiforme.

Rugosidad del fruto: 0 = ausente, 3 = ligera, 5 = intermedia y 7 = intensa.

Anexo 10. Descriptores cuantitativos del fruto (largo, ancho, relación largo/ancho y número de semillas por fruto). Dichos descriptores son expresados en centímetros.

Accesiones	Largo del fruto (cm).	Ancho del fruto (cm)	Relación largo/ancho del fruto (cm)	Número de semillas por fruto
SESELC01	21	9	2.3	50
SESELC02	24	8	3	45
SESELC03	25	9	2.8	45
SESELC04	17	5.5	3.1	50
SESELC05	18	6	3	45
SESELC06	18	7	2.6	40
SESELC07	18	9	2	40
SESELC08	20	7	2.9	40
SESELC09	24	8	3	55
SESELC10	17	9	1.9	50
SESELC11	12	6	2	40
SESELC12	13	6	2.2	45
SESELC13	16	7	2.3	40
SESELC14	15	9	1.7	40
SESELC15	24	10	2.4	50
SESELC16	16	7	2.3	45
SESELC17	21	9	2.3	60
SESELC18	18	7	2.6	35
SESELC19	22	8	2.8	50
SESELC20	23	9	2.6	60
SESELC21	24	9	2.7	50
SESELC22	19	8	2.4	55
SESELC23	22	14	1.6	40
SESELC24	18	10	1.8	45
SESELC25	28	8	3.5	45
SESELC26	17	8.5	2	40
SESELC27	20	8.5	2.4	40
SESELC28	23	8	2.9	55
SESELC29	18	9	2	45
SESELC30	18	9	2	45
SESELC31	18	8.5	2.1	45
SESELC32	18	7	2.6	35
SESELC33	21	10	2.1	45

SESELC34	23	8	2.3	55
SESELC35	26	10	2.6	45
SESELC36	17	8	2.1	40
SESELC37	22	10	2.2	40
SESELC38	23	11	2.1	40
SESELC39	20	10	2	40
SESELC40	18	8	2.3	55
SESELC41	19	11	1.7	40
SESELC42	22	10	2.2	50
SESELC43	23	7	3.3	50
SESELC44	22	11	2	45
SESELC45	19	8	2.4	40
SESELC46	20	9	2.2	40
SESELC47	25	9	2.8	40
SESELC48	22	8	2.8	40
SESELC49	17	9	1.9	45
SESELC50	20	9	2.2	50
SESELC51	20	9	2.2	55
SESELC52	19	8	2.4	45
SESELC53	22	10	2.2	40
SESELC54	20	8	2.5	40
SESELC55	19	7	2.7	60
SESELC56	21	9	2.3	60
SESELC57	23	8	2.9	50
SESELC58	20	8	2.5	40
SESELC59	20	8	2.5	45
SESELC60	17	7	2.4	50
SESELC61	21	8	2.6	50
SESELC62	18	8	2.3	50
SESELC63	26	8	3.3	55
SESELC64	20	10	2	40
SESELC65	20	10	2	40
SESELC66	17	10	1.7	45
SESELC67	22	8	2.8	50
SESELC68	22	8	2.8	55
SESELC69	20	8	2.5	50
SESELC70	17	11	1.5	50
SESELC71	20	10	2	50
SESELC72	18	9	2	60
SESELC73	27	10	2.7	55

SEELC74	23	9	2.6	60
SEELC75	23	9	2.6	45
SEELC76	22	8	2.8	50

Anexo 11. Descriptores cualitativos de la semilla. (Los números indicados en los descriptores representan valores que se explican al pie de la tabla).

Accesiones	Color de la semilla	Forma de la semilla
SESELC01	4	1
SESELC02	3	3
SESELC03	1	3
SESELC04	5	2
SESELC05	3	2
SESELC06	3	1
SESELC07	1	3
SESELC08	4	3
SESELC09	4	3
SESELC10	4	3
SESELC11	5	1
SESELC12	1	3
SESELC13	3	3
SESELC14	1	3
SESELC15	3	3
SESELC16	2	3
SESELC17	4	2
SESELC18	4	2
SESELC19	3	2
SESELC20	2	3
SESELC21	1	3
SESELC22	3	2
SESELC23	1	2
SESELC24	4	2
SESELC25	5	2
SESELC26	2	1
SESELC27	5	2
SESELC28	2	3
SESELC29	1	2
SESELC30	2	1
SESELC31	2	1
SESELC32	3	1
SESELC33	1	1
SESELC34	5	1
SESELC35	2	3
SESELC36	3	1

SESELC37	2	3
SESELC38	1	3
SESELC39	3	2
SESELC40	1	3
SESELC41	2	2
SESELC42	5	3
SESELC43	1	3
SESELC44	1	2
SESELC45	2	2
SESELC46	3	2
SESELC47	4	2
SESELC48	2	2
SESELC49	1	1
SESELC50	5	1
SESELC51	1	2
SESELC52	1	2
SESELC53	1	2
SESELC54	4	1
SESELC55	2	3
SESELC56	5	1
SESELC57	3	2
SESELC58	2	2
SESELC59	1	2
SESELC60	1	2
SESELC61	3	2
SESELC62	5	1
SESELC63	4	2
SESELC64	5	1
SESELC65	5	1
SESELC66	1	3
SESELC67	1	2
SESELC68	5	1
SESELC69	5	1
SESELC70	3	2
SESELC71	4	2
SESELC72	1	2
SESELC73	2	2
SESELC74	1	2
SESELC75	2	3
SESELC76	5	1

Interpretación de la tabla:

Color de la semilla: 1 = vino, 2 = púrpura, 3 = Morado, 4 = rosado y 5 =crema.

Forma de la semilla: 1 = oblonga, 2 = elíptica y 3 = ovoide.

Anexo.12. Descriptores cuantitativos de la semilla (largo, ancho y la relación largo /ancho).

ACCESIONES	Largo de la semilla (cm).	Ancho de la semilla (cm).	Relación largo/ancho de la semilla (cm).
SESELC01	3	1	3
SESELC02	2	1.1	1.8
SESELC03	2.5	1	2.5
SESELC04	3	1.3	2.3
SESELC05	2.5	1.1	2.3
SESELC06	2.5	1.2	2.1
SESELC07	2.5	1.2	2.1
SESELC08	2.5	1	2.5
SESELC09	3	1.3	2.3
SESELC10	2.4	1	2.4
SESELC11	2.5	1.6	1.5
SESELC12	2	1	2
SESELC13	2.4	1.3	1.8
SESELC14	2.5	1.4	1.8
SESELC15	2.5	1.5	1.6
SESELC16	2.4	1.2	2
SESELC17	2.3	1	2.3
SESELC18	2	1	2
SESELC19	2.5	1.2	2.1
SESELC20	2.5	1.5	1.6
SESELC21	2.5	1.4	1.8
SESELC22	2.5	1.2	2.1
SESELC23	2.4	1.5	1.6
SESELC24	2.7	1.2	2.2
SESELC25	2	1.2	1.7
SESELC26	2.9	1.6	1.8
SESELC27	2.8	1.3	2.1
SESELC28	2	1.2	1.7
SESELC29	2.5	1.5	1.7
SESELC30	2.7	1.3	2.1
SESELC31	2.7	1.5	1.8
SESELC32	2.2	1	2.2
SESELC33	2.3	1.2	1.9
SESELC34	2.5	1.3	1.9
SESELC35	3.3	1.5	2.2

SESELC36	2.2	1.3	1.7
SESELC37	2.8	1.6	1.8
SESELC38	3	1.4	2.1
SESELC39	2.3	1.2	1.9
SESELC40	2.3	1.1	2.1
SESELC41	2.5	1.3	1.9
SESELC42	2.4	1.5	1.6
SESELC43	2.1	1.3	1.6
SESELC44	2	1.2	1.7
SESELC45	2.4	1.2	2
SESELC46	2.5	1.3	1.9
SESELC47	2.4	1.2	2
SESELC48	3	1.4	2.1
SESELC49	3	1.5	2
SESELC50	2.5	1.2	2.1
SESELC51	2.5	1.1	2.3
SESELC52	2	1	2
SESELC53	3.2	1.5	2.1
SESELC54	2.5	1.5	1.7
SESELC55	2	1.2	1.7
SESELC56	2.5	1	2.5
SESELC57	3	1.6	1.9
SESELC58	2.5	1.5	1.7
SESELC59	2.5	1.5	1.7
SESELC60	2.6	1.3	2
SESELC61	2.5	1.5	1.7
SESELC62	2.5	1.7	1.5
SESELC63	2.5	1.3	1.9
SESELC64	2.5	1.5	1.7
SESELC65	2	1.5	1.3
SESELC66	2	1.3	1.5
SESELC67	2.5	1.2	2.1
SESELC68	2.5	1.1	2.3
SESELC69	2.5	1.4	1.8
SESELC70	2.7	1.3	2.1
SESELC71	2.5	1.2	2.1
SESELC72	3	1.7	1.8
SESELC73	2.6	1.3	2
SESELC74	2.8	1.5	1.9
SESELC75	2.5	1.5	1.7

SESELC76	2.5	1.5	1.7
----------	-----	-----	-----

Anexo 13. SIGLAS.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

AMOVA: Molecular Variance Analysis (Análisis de Varianza Molecular).

AFLP: Polymorphism in the Length of the Amplified Fragments (Polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados).

CATIE: Tropical Agronomic Center for Research and Teaching (Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza).

CENSALUD: Centro de Investigación y Desarrollo en Salud.

CIRAD: Centre de Cooperation Internationale en Recherche Agronomique Pour le Developpement (Centro de cooperación internacional en investigación agronómica para el desarrollo).

CV: Coefficient of variation (Coeficiente de variación).

DNTPs: Deoxyribonucleotide Triphosphate (Desoxirribonucleotido Trifosfato).

DE: Standard deviation (Desviación estándar)

IBPGR: International Board for Plant Genetic Resources (Junta Internacional de Recursos Fitogenéticos).

IICA: Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura.

ICGT: International Cocoa Genebank at Trinidad (Banco Internacional de Cacao en Trinidad).

ICGD: Internacional Cocoa Germplasm Database (Base de datos Internacional de germoplasma de Cacao).

ISSR: Inter Simple Sequence Repeats (Intersecuencia Simple Repetidas).

IPGRI: International Institute of Plant Genetic Resources (Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos).

MAAP: Arbitrary Multiple Amplicon Profiles (Perfiles Múltiples Arbitrarios de Amplicones).

pb: Pares de bases.

PCR: Polymerase Chain Reaction (Reacción en Cadena de la Polimerasa).

PIC: Content of Polymorphic Information (Contenido de Información Polimórfica).

QLTs: Qualitative Trait Loci (Rasgo Cualitativo Loci).

RAPD: Random Amplification of Polymorphism (Amplificación aleatoria de ADN polimórfico).

RAMPO: Random Amplification of Microsatellite Polymorphism (Amplificación aleatoria del polimorfismo de microsatelites).

RPM: Revolutions per minute (Revoluciones por minuto).

SDS: Sodium Dodecyl Sulfate (Dodecilsulfato Sódico).

SSRs: Short Sequence Repeats (Repeticiones de Secuencias Cortas).

TBE: Tris, Borato y Edta.

VNTRs: Variable Number of Repeats in Tandem (Número Variable de Repeticiones en Tandem).

Anexo 14. UNIDADES DE MEDIDA.

mg: miligramos.

mM: Milimoles.

ml: Mililitros.

ng: Nanogramos.

μl: Microlitro.

μg: Microgramo.

μM: Micromoles.

Anexo 15. GLOSARIO.

Accesión: es una muestra singular e identificable, que debe ir codificada en forma alfa numérica que permita el reconocimiento del resto de un banco de germoplasma, esta unidad de conservación puede ser una hoja, semilla o planta.

ADN genómico: ácido nucleico constituido por una secuencia particular y estable de nucleótidos, capaz de autoreplicarse y transmitir la información hereditaria de una generación a otra.

Agarosa: es una fracción extraída de algas productoras de agar y es la responsable fundamental del poder gelificante de éste. Presenta una histéresis (diferencia entre temperaturas de fusión y gelificación) importante, que la hace idónea para técnicas de separación tales como electroforesis, cromatografía y otras, empleadas en el campo de la Bioquímica y Biología molecular.

Alelo: cada una de las formas que puede tener un gen, que codifica para una característica específica. Todos los individuos heredan 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 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 de producto genético normal o cuya secuencia fenotípica es la desaparición de la función normal.

Amplicon: Conjunto de moléculas de ADN idénticas, que son resultado de una reacción en cadena de polimerasa (PCR), Es decir un clon molecular.

Amplificación de ADN: Producción de réplicas o copias de un fragmento de ADN particular en las células mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Banco de Germoplasma: Instalación dedicada a la conservación y gestión de los recursos filogenéticos de un cultivo.

Banda heterocigota: Banda en la cual se presenta dos alelos con pesos moleculares diferentes.

Banda homocigota: Banda en la cual se presenta dos alelos, con pesos moleculares idénticos.

Biología Molecular: Rama de la Biología encargada de estudiar todos los procesos que se desarrollan en los seres vivos en función de las características de su estructura molecular.

Buffer: También denominadas soluciones tampón son aquellas que se oponen a los cambios de pH, cuando se les adiciona ácidos álcalis (hidróxidos). Su acción se basa principalmente en la absorción de iones (H^+) o iones (OH^-). En forma general, una solución amortiguadora está conformada por una mezcla binaria de un ácido débil y una sal del mismo ácido proveniente de base fuerte ó también, una base y una sal de esta base proveniente de un ácido fuerte.

Caracterización Molecular: detección de variantes en las secuencias de ADN, que no son afectadas por el ambiente, cuando se comparan por distintos fenotipos, poblaciones o especies.

Caracterización morfológica: Es la determinación de conjuntos de caracteres mediante el uso de descriptores definidos que permiten diferenciar taxonómicamente a las plantas, algunos caracteres son altamente heredables, fáciles de observar y de expresar en cualquier ambiente.

Cebador o Primer: Se les denomina a los oligonucleótidos de 5-20 nucleótidos de longitud que constituyen el punto inicial en la replicación del ADN.

Codominante: Es cuando ambos alelos contribuyen a formar el fenotipo en forma independiente y ninguno de ellos domina sobre otro.

Cotiledón: Hoja embrionaria presente en la semilla; en las de las dicotiledóneas son dos y en los de las monocotiledóneas uno; en las plántulas de las dicotiledóneas son las hojas que inicialmente realizan la fotosíntesis y resultan útiles para su identificación.

Chupón: Vástago que brota de las ramas principales, en el tronco o en las raíces de los árboles. El consumo energético de los chupones es muy alto y popularmente esta denominación procede de esta característica.

Cuello de botella: Reducción en el tamaño efectivo poblacional, lo cual disminuye la diversidad genética de las poblaciones e intensifica la deriva genética.

Descriptor morfológico: Características fenotípicas de fácil identificación visual, estas pueden ser de tipo cualitativos o tipo cuantitativos. Algunos de los cuales son cruciales en la identificación e inscripción de nuevas variedades.

Diversidad genética: Número total de características genéticas dentro de cada población o especie, cuya función principal es mantener un reservorio de condiciones de respuestas al medio, que permita la adaptación y la supervivencia de dicha especie o población.

Envés: Cara inferior de la hoja, se opone al haz. Es la parte que recibe menor radiación solar, y por ello suele presentar mayor número de estomas que el haz.

Electroforesis en gel: Es la técnica utilizada en Biología molecular para separar fragmentos de ADN u otras macromoléculas, como ARN y proteínas, por su tamaño y carga, las moléculas se desplazan por el gel en diferentes direcciones o a distintas velocidades, con las que se separa una de las otras.

Estambre: órgano reproductor masculino de las plantas, que consta de un filamento y la antera, donde se encuentran los sacos polínicos que contienen el polen; el conjunto de estambres forman el androceo.

Estaminodio: estambre estéril, generalmente rudimentario, protegen la parte femenina de la flor y a traen a las mosquitas polinizadoras del cacao.

Estigma: es la parte de la flor que se encarga de recibir los granos de polen.

Fenotipo: expresión física del genotipo, existen dos categorías fenotipos cualitativos los cuales se describen y fenotipos cuantitativos los cuales se miden. Los términos fenotipos y carácter son sinónimos.

Glabro: ausente de pelo, lampiño.

Gel red: es un tinte fluorescente, para ácidos nucleicos ultrasensibles, extremadamente estable y ambientalmente seguro, diseñado para reemplazar al Bromuro de etidio extremadamente tóxico para la tinción de dsDNA, ssDNA o RNA en geles de agarosa o geles de poliacrilamida.

Genética Molecular: campo de la genética que estudia la estructura y función de los genes a nivel molecular, considerando a un gen como la unidad física y funcional de la herencia.

Genotipo: acervo genético completo de un organismo, que comprende los factores hereditarios nucleares y extra nucleares de sus células.

Germoplasma: es un conjunto de genes que se transmiten por la reproducción a la descendencia por medio de gametos o células reproductoras. Se utiliza comúnmente para designar a la diversidad genética de la especie de vegetales silvestres y cultivados de interés para la agricultura.

Haz: parte superior de una hoja, se opone al envés. Es la cara de la hoja que capta la radiación solar directamente.

Hoja: órgano laminar especializado en realizar la fotosíntesis, que normalmente consta de limbo o lámina y peciolo; el peciolo puede ensancharse en su base, formando una vaina, y presentar estípulas.

Heterocigoto: célula que presenta dos alelos distintos de un mismo gen en los cromosomas homólogos en las especies diploides.

Heterocigosidad esperada: es la media de los valores obtenidos para cada locus en dicha población, cuantifica la igualdad o equitatividad de frecuencias alélicas en los loci.

Heterocigótico: individuo que presenta dos alelos distintos del mismo gen en los cromosomas homólogos en especies diploides.

Heterocigosidad observada: es la proporción de individuos observados en una muestra de la población.

Homocigoto: individuo o población cuyo genotipo está constituido por dos alelos iguales del mismo gen. Es cuando en un gen los dos alelos codifican la misma información para un carácter.

Locus: (proviene del latín: lugar; cuyo plural es loci) es denominado locus a la posición fija de un gen en un cromosoma.

Marcador Molecular: 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.

Marcador de peso molecular: conocido también como escalera, es un estándar de referencia que contiene fragmentos de ADN de longitudes conocidas.

Microsatélite: regiones de secuencias cortas, de dos a diez pares de bases repetidas, arregladas en series, las cuales se asume que son altamente variable

Oblongo: hojas alargadas, más largas que anchas.

Perfil genético: denominado también "huella genética", es utilizado para distinguir entre los individuos de una misma especie utilizando muestras de su ADN.

Pecíolo: parte de la hoja que une el limbo al tallo.

Pedicelo: el rabillo que une cada flor al eje de la inflorescencia (pedúnculo).

Pétalos: piezas de la flor que en conjunto forman la corola; normalmente suelen presentar colores vistosos para atraer a los insectos y permitir la polinización; junto a los sépalos del cáliz forman el perianto.

Polen: es el encargado de fecundar al ovulo. Se les denomina a los granos microscópicos que producen las angiospermas.

Polimorfismo: cambio localizado en una secuencia específica de ADN dentro del genoma, el cual existe generalmente por deleciones, inversiones, inserciones o arreglos; estas mutaciones permiten el arreglo de distintos alelos para un locus específico.

Pubescente: en las plantas se denomina pubescente al órgano provisto o cubierto de finos.

Pulvínulo: engrosamiento o ensanchamiento en forma de cojinete de la base de las hojas o del peciolo de las hojas o folíolos de ciertas especies y que por variaciones de turgencia de sus tejidos, puede provocar cambios de posición o movimientos de las hojas.

Pureza genética: expresión en el comportamiento de la planta que se refiere al potencial productivo. Posee características botánicas y agromorfológicas bien definidas, como es el ciclo, hábitat de crecimiento, arquitectura de la planta, color, brillo de la cascara y la resistencia a enfermedades.

SSRs: secuencias cortas de dos a diez pares de bases repetidas de ADN, arregladas en series, las cuales se cree que se distribuyen por todo el ADN, son secuencias altamente variables dispersas al azar a través del genoma de diversos organismos, los cuales pueden estar o no asociados a genes, son altamente mutables y pueden estar presentes en muchos sitios del genoma.

Secuencia: sucesión de letras representando la estructura primaria de una molécula real o hipotética de ADN o banda, con la capacidad de transportar información.

Sépalos: piezas de la flor que en conjunto forman el cáliz; tienen una función protectora; junto a los pétalos de la corola forman el perianto.

Taq Polimerasa: es utilizada cuando se requiere de una amplificación de alta fidelidad, es termoestable, capaz de trabajar a elevadas temperaturas, se origina a partir de la bacteria *Thermus aquaticus*.

Termociclador: aparato utilizado en Biología molecular que permite realizar los ciclos de temperatura necesarios en la amplificación de diversas hebras de ADN en la técnica de PCR.