

DIVERSIDAD GENÉTICA Y SELECCIÓN DE UNA COLECCIÓN NÚCLEO PARA LA CONSERVACIÓN A LARGO PLAZO DE CACAO (*Theobroma cacao* L)

Carlos Hugo Avendaño-Arrazate, Pablo López-Gómez, Leobardo Iracheta-Donjuan, Alfredo Vázquez-Ovando, Regina Bouchan, Moisés Cortés-Cruz y Ernesto Borrayo

RESUMEN

Se estudiaron 99 accesiones del Banco de Germoplasma de Cacao del Campo Experimental Rosario Izapa, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, México, con el objetivo de evaluar la diversidad genética y así sentar las bases para un programa de conservación a largo plazo de los materiales representativos de la diversidad mediante una colección núcleo. Se utilizaron 14 marcadores microsatélites. Para analizar el polimorfismo se registró la ausencia/presencia (0/1) de bandas para cada locus y se generó una matriz binaria con la información generada con todos los cebadores; los parámetros de diversidad fueron obtenidos con el programa GenAlex 6.5 y el software utilizado para la selección de la colección núcleo fue un algoritmo basado en K-MEANS y FFT para el desarrollo de la

colección núcleo CorColl ver. 2.3. Con el uso de 14 SSR se amplificaron 75 bandas, de las cuales el 79,7% fueron polimórficas. El número de alelos diferentes fue de dos para todos los cebadores, en tanto que el número de alelos efectivos varió de 1,105 a 1,384 (promedio= 1,213). El índice de Shannon mostró valores considerados muy bajos (0,167-0,407; promedio= 0,267). Lo anterior concuerda con la heterocigosidad esperada (0,085-0,255; promedio= 0,153). Sin embargo, con la diversidad observada fue posible obtener varios grupos. La colección núcleo se construyó con valores de $K=16, 18, 20$ y 22 y la mejor propuesta fue con $K=22$ debido a que representa eficientemente la diversidad de la colección original y se puede proponer para la conservación a largo plazo mediante crioconservación.

Introducción

El cacao es de gran importancia económica, al ser cultivado por más de dos millones de productores en más de 50 países. En México se cultiva en los estados del sureste, Chiapas, Tabasco y Guerrero, principalmente (Avendaño-Arrazate *et al.*, 2011); el área establecida con cacao es de 61.397ha, con una producción a nivel nacional de 28.006ton para el año 2015, un rendimiento promedio de 470kg/ha y un valor de la producción de

MXN\$ 1.034.792.000 (SIAP, 2016). El cacao fue cultivado exclusivamente en el continente americano hasta 1890, cuando comenzó a sembrarse en África (Ogata, 2006). En la actualidad, los países africanos obtienen los mayores volúmenes de producción de grano. En México, considerado como centro de domesticación de esta especie, se encuentra una amplia diversidad genética (Ogata, 2006), lo que se refleja en los diferentes tamaños, formas, colores de frutos y semillas (Avendaño *et al.*, 2010).

La especie *Theobroma cacao* L ($2n= 2x= 20$) pertenece a la familia de las Malvaceae y tradicionalmente se le ha clasificado en tres grupos morfogeográficos principales: Forastero, Criollo y Trinitario (Cheesman, 1944). Las poblaciones de cacao provenientes de la cuenca del Amazonas pertenecen al grupo Forastero, y a su vez pueden ser subdivididas en grupo Forastero de la región superior del Amazonas y grupo Forastero de la región inferior del Amazonas. El grupo Criollo contiene

poblaciones presentes desde Centro América hasta el Norte de Venezuela y Colombia, mientras que en el grupo Trinitario se consideran materiales híbridos entre Forastero y Criollo.

T. cacao abarca un gran número de poblaciones morfológicamente variables y con problemas de fertilidad, a pesar de que la flores son hermafroditas. Este fenómeno se explica debido a los mecanismos de incompatibilidad gametofítica, lo que propicia que la mayoría de los materiales

PALABRAS CLAVE / Cacaos Criollos / Cacaos Forasteros / Cacaos Trinitarios / Diversidad / Microsatélites /

Recibido: 05/02/2018. Modificado: 22/10/2018. Aceptado: 26/10/2018.

Carlos Hugo Avendaño-Arrazate (Autor de correspondencia). Ingeniero Agrónomo, Universidad Autónoma de Chapingo (UACH), México. Maestría y Doctorado en Genética, Colegio de Postgraduados (COLPOS), México. Investigador, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Dirección: Campo Experimental Rosario Izapa (CERI), INIFAP, Chiapas. Km. 18 Carretera Tapachula-Cacaohatán C.P.

30870. México. e-mail: avendano.carlos@inifap.gob.mx

Pablo López-Gómez. Ingeniero Biotecnólogo, Universidad Autónoma Chiapas (UNACH), México. Maestría en Ciencias Biológicas, Centro de Investigación Científica de Yucatán, México. Investigador, CERI-INIFAP, México.

Leobardo Iracheta-Donjuan. Ingeniero Agrónomo, Universidad Autónoma de Nuevo León, México. Maestría y Doctorado en Gené-

tica, COLPOS, México. Investigador, CERI-INIFAP, México.

Alfredo Vázquez-Ovando. Ingeniero Biotecnólogo, UNACH, México. Doctorado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México. Profesor, Instituto de Biociencias, UNACH, México.

Regina Bouchan. Ingeniero Agrónomo, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, México. Maestría en Genética, COLPOS, México.

Moisés Cortés-Cruz. Ingeniero Agrónomo, UACH, México. Ph.D. en Agronomía, Universidad de Missouri, University of Missouri, EEUU. Investigador, Centro Nacional de Recursos Genéticos, INIFAP, México.

Ernesto Borrayo. Biólogo y Doctor en Genética Humana, Universidad de Guadalajara (UDG), México. Profesor, UDG, México. Investigador, Gene Research Center, University of Tsukuba, Japón.

GENETIC DIVERSITY AND SELECTION OF A CORE COLLECTION FOR LONG TERM CONSERVATION OF COCOA (*Theobroma cacao* L)

Carlos Hugo Avendaño-Arrazate, Pablo López-Gómez, Leobardo Iracheta-Donjuan, Alfredo Vázquez-Ovando, Regina Bouchan, Moisés Cortés-Cruz and Ernesto Borrayo

SUMMARY

Ninety-nine accessions of the Cocoa Germplasm Bank in the Rosario Izapa Experimental Station, INIFAP, Mexico, were studied in order to evaluate the genetic diversity and thus lay the foundation for a long-term conservation program of materials representative of diversity through a core collection. Fourteen microsatellite (SSR's) markers were used. To analyze polymorphism the absence/presence (0/1) of bands for each locus was recorded, and a binary matrix was generated with the information generated with all the primers. Diversity parameters were obtained with the GenAlex 6.5 program and an algorithm based on K-MEANS and FFT was used for the development of Core Collection CorColl ver. 2.3; Windows executable of a Python implementation of the original algorithm in FreeMat. Overall analysis of the 99

accessions and the use of 14 combinations of SSR's, allowed to amplify 75 bands, of which 79.7% were polymorphic. The number of different alleles was two for all the primers, while the number of effective alleles varied from 1.105 to 1.384 (average= 1.213). The Shannon index varied from 0.167 to 0.407 (average= 0.267), which are considered to be low values. The above agrees with the expected heterozygosity, which varied from 0.085 to 0.255 (average= 0.153). However, with the observed diversity it was possible to obtain a dendrogram with several groups. The core collection was constructed with values of K= 16, 18, 20 and 22 and the best proposal was with K= 22 because it efficiently represents the diversity of the original collection and can be proposed for long-term conservation by cryopreservation.

DIVERSIDADE GENÉTICA E SELEÇÃO DE UMA COLEÇÃO NÚCLEO PARA A CONSERVAÇÃO A LONGO PRAZO DE CACAU (*Theobroma cacao* L)

Carlos Hugo Avendaño-Arrazate, Pablo López-Gómez, Leobardo Iracheta-Donjuan, Alfredo Vázquez-Ovando, Regina Bouchan e Moisés Cortés-Cruz e Ernesto Borrayo

RESUMO

Estudaram-se 99 acessos do Banco de Germoplasma de Cacao do Campo Experimental Rosário Izapa, Instituto Nacional de Pesquisas Florestais e Agropecuária, México, com o objetivo de avaliar a diversidade genética e desta forma estabelecer as bases para um programa para conservação a longo prazo dos materiais representativos da diversidade mediante uma coleção núcleo. Utilizaram-se 14 marcadores microssatélites. Para analisar o polimorfismo se registrou a ausência/presença (0/1) de bandas para cada locus e foi gerada uma matriz binária com a informação obtida com todos os primers; os parâmetros de diversidade foram obtidos com o programa GenAlex 6.5 e o software utilizado para a seleção da coleção núcleo foi um algoritmo baseado em K-MEANS e FFT para o desen-

volvimento da coleção núcleo CorColl ver. 2.3. Com o uso de 14 SSR foram amplificadas 75 bandas, das quais 79,7% foram polimórficas. O número de alelos diferentes foi de dois para todos os primers, entretanto o número de alelos efetivos variou de 1,105 para 1,384 (média= 1,213). O índice de Shannon mostrou valores considerados muito baixos (0,167-0,407; média= 0,267). Isto é consistente com a heterozigosidade esperada (0,085-0,255; média= 0,153). Com a diversidade observada foi possível obter vários grupos. A coleção núcleo foi construída com valores de K=16, 18, 20 e 22, sendo que a melhor proposta foi com K=22 devido a que representa eficientemente a diversidade da coleção original e pode ser proposto para conservação a longo prazo mediante crioconservação.

silvestres sean de polinización cruzada, aunque los materiales cultivados son autocompatibles (Motamayor *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2009). Un fruto de cacao puede contener numerosas semillas, pero estas semillas son recalcitrantes, condicionando que las colecciones de cacao deban mantenerse como árboles vivos propagados de manera vegetativa (Cheesman, 1944; Cuatrecasas, 1964). La colección de cacao establecida en el Campo Experimental Rosario Izapa (CERI) del INIFAP es la más importante en México, estando constituida por 228 clones, entre foras-

teros, trinitarios y criollos provenientes de colectas nacionales e introducciones internacionales. La colección del CERI cuenta con genotipos con diferentes grados de resistencia a la moniliasis, lo que la convierte en la única institución en México que cuenta con este recurso genético (Avendaño *et al.*, 2011). Esta colección se conserva actualmente bajo condiciones de campo, por lo que existe el riesgo de perderla debido a diversos factores bióticos y abióticos. Además, el mantener bancos de germoplasma en campo genera altos costos de mantenimiento, por lo

que el uso de la biotecnología a través de técnicas de crioconservación o conservación por métodos de crecimiento limitado *in vitro*, ofrece una herramienta que permite mantener y preservar una gran cantidad de recursos fitogenéticos a largo plazo, con el consecuente ahorro de espacio y costos de mantenimiento. Por otro lado, estas técnicas son altamente dependientes del genotipo, por lo que no es factible su aplicación en todas las accesiones que componen una colección. Para ello, es necesario conocer la diversidad existente en dicha colección y, bajo

un enfoque de conservar solo aquellos individuos que representan dicha diversidad, podría iniciarse un programa de conservación a largo plazo con técnicas tales como la crioconservación de un grupo de accesiones pequeño, pero con la mayor diversidad, de dicha colección (Guzmán *et al.*, 2017).

La aplicación de los marcadores moleculares en los procesos de caracterización constituyen un método eficaz para reducir los tiempos y costos de identificación de materiales (Phillips-Mora y Castillo, 1999; Phillips-Mora *et al.*, 2005). En cacao se han utilizado marca-

dores RFLP's (*restriction fragment length polymorphisms*), cuyos resultados lo sugieren como una herramienta para la generación de mapas de ligamiento y la identificación de QTL's (*quantitative trait loci*) (Guiltinan *et al.*, 2007). Por su parte Russell *et al.* (1993) mencionan que con los marcadores RAPD (*random amplification of polymorphic DNA*) fue posible diferenciar 25 accesiones de cacao, de acuerdo a su origen geográfico. Con marcadores AFLP's (*amplified fragment length polymorphism*) Perry *et al.* (1998) reportaron la identificación de progenitores y sus correspondientes híbridos en cacao. Los microsatélites (SSR's; *simple sequence repeats*) es uno de los sistemas de marcadores ampliamente utilizados en cacao, lo que ha permitido la caracterización del germoplasma (Lanaud *et al.*, 1999). Lo anterior se debe a que el sistema de microsatélites se caracteriza por ser codominante y multialélico, lo que permite una discriminación precisa de clones. Con el uso de 15 SSR's, Zhang *et al.* (2009) detectaron 180 casos de mal etiquetado y se reconstruyeron 78 familias de hermanos completos anidados a 48 familias de medios hermanos, lo cual indica que la colecta se hizo a partir de 48 árboles madre, al estudiar 612 accesiones del Perú. Por su parte, Zhang *et al.* (2012) observaron un perfil genético único del cacao nacional boliviano (CNB) contra el de otros grupos de América del Sur, donde la diversidad dentro de las poblaciones de CNB fue relativamente alta, pero baja comparada con la de otras poblaciones amazónicas al estudiar 168 accesiones.

El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar la diversidad genética de una colección de cacaos del Campo Experimental Rosario Izapa del INIFAP, con la finalidad de sentar las bases para un programa de conservación a largo plazo de los materiales representativos de la diversidad mediante una colección núcleo.

Materiales y Métodos

Material biológico para la extracción de ADN

Como material biológico se utilizaron hojas de 99 accesiones de *Theobroma cacao* (Tabla I) del Banco de Germoplasma del Campo Experimental Rosario Izapa. El ADN genómico total de todas las muestras se extrajo de acuerdo a lo descrito por Dellaporta

et al. (1983), en la versión microprep. La concentración y calidad de ADN se determinó por espectrofotometría.

Condiciones de PCR en marcadores microsatélites (SSR's)

La mezcla de reacción de amplificación de SSR en un volumen final de 15µl consistió en 3ng·µl⁻¹ del templado de ADN genómico (1,5µl del stock

30ng·µl⁻¹); 1X amortiguador de PCR (1,5µl del stock 10X); 0,2mM de dNTP's (1,5µl del stock 2mM dNTP's); 1,5mM MgCl₂ (0,45µl del stock 50mM), 1µM (1,5µl del stock 10µM) del cebador sentido y antisentido (F y R, Tabla II); 1,6 U/µl de Taq ADN-polimerasa (0,5µl del stock de 5 U/µl); y 6,55µl de agua libre de nucleasas. Los iniciadores microsatélites evaluados fueron sugeridos por Lanaud *et al.* (1999).

TABLA I
GENOTIPOS DE CACAO, PROCEDENCIA Y ORIGEN GENÉTICO, ANALIZADOS EN LA CARACTERIZACIÓN MOLECULAR CON 14 MARCADORES MICROSATÉLITES

Genotipo	Procedencia	Clave	Genotipo	Procedencia	Clave
RIM-117	Chiapas-T	T1	CH-25	Chis-Tab-C	C19
RIM-113	Chiapas-T	T2	F32A	Tabasco-C	C20
RIM-106	Chiapas-T	T3	C-36	Criollo Chis-C	C21
RIM-105	Chiapas-T	T4	C-21	Criollo Chis-C	C22
RIM-101	Chiapas-T	T5	F-20	Tabasco-C	C23
RIM-100	Chiapas-T	T6	F-49	Tabasco-C	C24
RIM-71	Chiapas-T	T7	F-61	Tabasco-C	C25
RIM-52	Chiapas-T	T8	RIM 76 ^a	Chiapas-C	C26
RIM-48	Chiapas-T	T9	RIM 68	Chiapas-C	C27
RIM-44	Chiapas-T	T10	LAC-1	Selva Lacandona-C	C28
RIM-13	Chiapas-T	T11	LAC-2	Selva Lacandona-C	C29
RIM-41	Chiapas-T	T12	LAC-3	Selva Lacandona-C	C30
RIM-88	Chiapas-T	T13	LAC-4	Selva Lacandona-C	C31
RIM-39	Chiapas-T	T14	LAC-5	Selva Lacandona-C	C32
RIM-34	Chiapas-T	T15	LAC-6	Selva Lacandona-C	C33
CRIM-24	Chiapas-T	T16	LAC-7	Selva Lacandona-C	C34
CRIM-44	Chiapas-T	T17	LAC-8	Selva Lacandona-C	C35
CRIM-56	Chiapas-T	T18	LAC-9	Selva Lacandona-C	C36
CRIM-88	Chiapas-T	T19	LAC-10	Selva Lacandona-C	C37
CRIM-105	Chiapas-T	T20	LAC-11	Selva Lacandona-C	C38
TAB-AMEL	Tabasco-T	T21	LAC-12	Selva Lacandona-C	C39
TAB-ANG	Tabasco-T	T22	LAC-13	Selva Lacandona-C	C40
TAB-CUND	Tabasco-T	T23	LAC-14	Selva Lacandona-C	C41
TAB-CAL	Tabasco-T	T24	LAC-15	Selva Lacandona-C	C42
UF-273	Costa Rica-F	F1	LAC-16	Selva Lacandona-C	C43
CC-226	Costa Rica-F	F2	LAC-17	Selva Lacandona-C	C44
UF-296	Costa Rica-F	F3	LAC-18	Selva Lacandona-C	C45
Santa Clara 3	Costa Rica-F	F4	LAC-19	Selva Lacandona-C	C46
PA-169	Perú-F	F5	LAC-20	Selva Lacandona-C	C47
H-13	Híbrido-F	F6	LAC-21	Selva Lacandona-C	C48
H-16	Híbrido-F	F7	LAC-22	Selva Lacandona-C	C49
H-20	Híbrido-F	F8	LAC-23	Selva Lacandona-C	C50
C-22	Criollo Chis-C	C1	LAC-24	Selva Lacandona-C	C51
C-30	Criollo Chis-C	C2	LAC-25	Selva Lacandona-C	C52
C-38	Criollo Chis-C	C3	LAC-26	Selva Lacandona-C	C53
F-43	Tabasco-C	C4	LAC-27	Selva Lacandona-C	C54
F-35	Tabasco-C	C5	LAC-28	Selva Lacandona-C	C55
CH-3	Chis-Tab-C	C6	LAC-29	Selva Lacandona-C	C56
Y-1	Yucatán-C	C7	LAC-30	Selva Lacandona-C	C57
P-50	Chiapas-C	C8	CARMELO	Tabasco-C	C58
CH-10	Chis-Tab-C	C9	TAJR-1	Chiapas-C	C59
CH-8	Chis-Tab-C	C10	TAJR-2	Chiapas-C	C60
F-36	Tabasco-C	C11	TAJR-3	Chiapas-C	C61
CH-12	Chis-Tab-C	C12	AGG-25	Soconusco, Chis-C.	C62
F-45	Tabasco-C	C13	AGG-26	Soconusco, Chis-C.	C63
CH-19	Chis-Tab-C	C14	AGG-20	Soconusco, Chis-C.	C64
TS-1	Veracruz-C	C15	SGP-5	Soconusco, Chis-C.	C65
CH-14	Chis-Tab-C	C16	YAX-1	Yucatán-C	C66
PI	Chiapas-C	C17	ZOZ-1	Veracruz-C	C67
CH-4	Chis-Tab-C	C18			

F: Forastero, T:Trinitario, C: Criollo.

TABLA II
INICIADORES SSR'S DE *Theobroma cacao*

Iniciador	Secuencia	Temperatura de alineamiento (°C)
MTcCIR1F	GCAGGGCAGGCTCAGTGAAGCA	51
MTcCIR1R	TGGGCAACCAGAAAACGAT	
MTcCIR6F	TTCCCTCTAAACTACCCTAAAT	46
MTcCIR6R	TAAAGCAAAGCAATCTAACATA	
MTcCIR7F	ATGCGAATGACAACCTGGT	51
MTcCIR7R	GCTTTCGTCCTTTGCTT	
MTcCIR8F	CTAGTTTCCCATTACCA	46
MTcCIR8R	TCCTCAGCATTCTTTCT	
MTcCIR11F	TTTGGTGATTATTAGCAG	46
MTcCIR11R	GATTCTGATTGATGTGAG	
MTcCIR12F	TCTGACCCCAAACCTGTA	46
MTcCIR12R	ATTCCAGTTAAAGCACAT	
MTcCIR15F	CAGCCGCTCTTGTAG	46
MTcCIR15R	TATTTGGGATTCTTGATG	
MTcCIR22F	ATTCTCGCAAAAACCTTAG	46
MTcCIR22R	GATGGAAGGAGTGAAATAG	
MTcCIR24F	TTTGGGGTGATTTCTTCTGA	46
MTcCIR24R	TCTGTCTCGTCTTTGGTGA	
MTcCIR26F	GCATTATCAATACATTC	46
MTcCIR26R	GCACTCAAAGTTCATACTAC	
MTcCIR33F	TGGGTTGAAGATTTGGT	51
MTcCIR33R	CAACAATGAAAATAGGCA	
MTcCIR37F	CTGGGTGCTGATAGATAA	46
MTcCIR37R	AATACCCTCCACAAAAT	
MTcCIR40F	AATCCGACAGTCTTAATC	51
MTcCIR40R	CCTAGGCCAGAAATGGA	
MTcCIR60F	CGCTACTAACAACATCAAA	51
MTcCIR60R	AGAGCAACCATCACTAATCA	

F: Forward; R: Reverse.

La reacción de amplificación se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: desnaturalización a 94°C durante 5min (un ciclo), seguido de 35 ciclos a 94°C durante 30s, alineamiento a 46 o 51°C (dependiendo del iniciador según temperatura de alineamiento indicado en la Tabla II) durante 1min y extensión a 72°C durante 1min, seguido de una extensión final durante 7min a 72°C, en un termociclador de gradiente.

Electroforesis del ADN producto de la amplificación

Una vez realizada la amplificación, se mezclaron 2µl de colorante de carga 6X DNA (10mM de Tris-HCl a pH 7,6; 0,03% de azul de bromofenol; 0,03% de xileno cianol FF, 60% de glicerol; y 60mM de EDTA) con 3µl del producto de reacción de amplificación de PCR. Los productos de amplificación se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 3%, ya que permite la resolución suficiente para la detección de alelos SSR. Como referencia se cargó un carril del

gel con el marcador de peso molecular ADN pBR322/Msp I de 622 pb. El gel se corrió con amortiguador TBE 1X a 7V·cm⁻¹ por 3h. Los geles se analizaron con luz UV y se fotografiaron con un equipo fotodocumentador.

Análisis de datos

El análisis de los datos para evaluar el nivel de polimorfismo consistió en que las bandas de igual tamaño y movilidad generadas por la misma combinación de cebadores para varias muestras se trataron como idénticas para ese locus. Para analizar el polimorfismo se registró la ausencia/presencia (0/1) de bandas para cada locus, y se generó una matriz binaria con la información generada con todos los cebadores. Se utilizó el programa NTSYS-PC (versión 2.21q) para calcular la similitud genética utilizando el coeficiente de Jaccard, obtenido por la expresión $J = A / (A + B + C)$; donde A: número de especies comunes con similitud A, B: número de especies comunes con similitud B, y C: número de especies con

similitudes comunes entre A y B. Los valores de similitud de Jaccard obtenidos se utilizaron para generar un dendograma mediante el procedimiento UPGMA (*unweighted pair-group with arithmetic mean*). Este dendograma se soportó con un bootstrap de 1000 repeticiones con la ayuda del programa FreeTree.

Con las matrices binarias, se calculó el contenido de información polimórfica (PIC), que es determinado como $PIC = 2f_i(1-f_i)$, donde f_i : frecuencia con la que están presentes los fragmentos del marcador. Por otro lado, se calcularon el poder de resolución (RP) con la fórmula $RP = \sum I_b$, donde $I_b = 1 - [2|0,5-p|]$ y p: proporción de accesiones que contienen una banda I (Prevost y Wilkinson 1999; Roldán-Ruiz *et al.* 2000).

Parámetros de diversidad

Con la ayuda del programa Excel se calcularon el número de bandas totales por combinación de cebadores, el porcentaje de polimorfismo basado en las frecuencias alélicas (se consideraron polimórficas aquellas bandas con una frecuencia >5%). Los calculados por individuo se realizaron con la ayuda del programa GenAlex 6.5 (Peakall y Smouse, 2012). Asimismo, se calcularon el número de alelos diferentes (Na), el número de alelos efectivos (Ne), índice de Shannon (I) heterocigosidad esperada (He). Con las distancias genéticas, se llevó a cabo un análisis de coordenadas principales (PCoA). Finalmente, se llevó a cabo el análisis molecular de varianza (AMOVA), basado en 999 permutaciones para determinar el nivel de variación dentro y entre las poblaciones. Para determinar el grado de diferenciación de las poblaciones se calculó el coeficiente de fijación PhiPT, en función de las frecuencias alélicas. Todo lo anterior fue realizado con la ayuda del programa GenAlex 6.5.

Colección núcleo

El software utilizado para la selección de la colección nú-

cleo fue un algoritmo basado en K-MEANS y FFT para el desarrollo de Core Collection CorColl ver. 2.3, ejecutable de Windows de una implementación en Python de el algoritmo original en FreeMat (Borrayo *et al.*, 2016; Guzmán *et al.*, 2017).

Resultados

Análisis de la diversidad genética

Con base en el análisis de las 99 accesiones de cacao estudiadas y con el uso de 14 combinaciones de iniciadores SSR se amplificaron un total de 75 bandas, de las cuales el 79,7% fueron polimórficos. En general, el polimorfismo fue de 45,5 a 100%. La combinación MTcCIR1 presentó el polimorfismo más bajo con 45,5% mientras que cinco de los 14 iniciadores SSR revelaron un 100% de polimorfismo. Estos corresponden a los cebadores MTcCIR6, MTcCIR11, MTcCIR33, MTcCIR37 y MTcCIR60, por lo que corresponden a los más informativos para el estudio de diversidad en cacao. En cuanto al contenido de información polimórfica (PIC), este varió de 0,14 a 0,36 con un promedio de 0,23. El mayor PIC fue observado en el cebador MTcCIR60 con 0,36 mientras que el poder de resolución fue desde 0,84 en el cebador MTcCIR15, hasta 2,9 observado en el cebador MTcCIR60, con un promedio de 1,64 para todos los cebadores (Tabla III).

El número de alelos diferentes fue de dos para todos los cebadores, en tanto que el número de alelos efectivos varió de 1,105 a 1,384 con un promedio de 1,213. El índice de Shannon varió de 0,167 a 0,407, con un promedio de 0,267; valores que son considerados como muy bajos. Lo anterior esta en concordancia a la heterocigosidad esperada, el cual varió de 0,085 a 0,255 con un promedio de 0,153 (Tabla III).

El dendograma producto del análisis de agrupamientos (UPGMA) a partir de las distancias genéticas calculadas

TABLA III
 CARACTERÍSTICAS DE 99 ACCESIONES DE *Theobroma cacao* L.,
 CON EL USO DE 14 CEBADORES SSR's

Nº	Iniciador	P (%)	NTB	PIC	RP	Rango (pb)	Na	Ne	I	He	
1	MTcCIR1	45,5	11	0,14	1,97	123-350	2,00	1,105	0,167	0,085	
2	MTcCIR6	83,3	6	0,19	1,43	180-300	2,00	1,138	0,216	0,113	
3	MTcCIR7	100	7	0,26	2,36	150-238	2,00	1,200	0,284	0,158	
4	MTcCIR8	60	5	0,19	1,29	150-350	2,00	1,157	0,216	0,119	
5	MTcCIR11	100	6	0,29	2,18	150-350	2,00	1,210	0,313	0,172	
6	MTcCIR12	80	5	0,21	1,33	100-350	2,00	1,155	0,234	0,126	
7	MTcCIR15	66,7	3	0,19	0,84	150-250	2,00	1,335	0,281	0,184	
8	MTcCIR22	80	5	0,26	1,71	150-350	2,00	1,204	0,288	0,161	
9	MTcCIR24	50	4	0,15	0,92	175-350	2,00	1,148	0,182	0,104	
10	MTcCIR26	75	4	0,19	1,07	150-350	2,00	1,162	0,224	0,124	
11	MTcCIR33	100	5	0,27	1,79	150-350	2,00	1,216	0,298	0,167	
12	MTcCIR37	100	5	0,28	2,02	150-350	2,00	1,252	0,316	0,184	
13	MTcCIR40	75	4	0,22	1,17	200-350	2,00	1,317	0,308	0,189	
14	MTcCIR60	100	5	0,36	2,9	125-300	2,00	1,384	0,407	0,255	
Total			75								
Promedio		79,7	5,4	0,23	1,64	123-350	2	1,213	0,267	0,153	
SE							0	0,024	0,019	0,014	

P: polimorfismo, NTB: número total de bandas, PIC: contenido de información polimórfica, RP: poder de resolución, Rango: rango de banda, Na: número de alelos diferentes, Ne: número de alelos efectivos, I: índice de Shannon, He: heterocigosidad esperada.

con el coeficiente de similitud genética de Jaccard, mostró similitudes que fueron de 0, en tanto que la similitud entre los genotipos LAC-18 y LAC-19; RIM-88 y LAC-10; y LAC-15 y LAC-16 fue de 1 (Figura 1). El genotipo que se separó totalmente del resto de los individuos estudiados fue el CRIM-88 (T19), con una similitud de 0. A partir de la similitud de 0,182 se pueden observar dos grupos, el grupo A contiene a los genotipos C20 y C24 a partir de una similitud de 0,25. En el grupo B se encuentran la mayoría de los genotipos. El subgrupo B1 está integrado por los genotipos C41, C42 y C43. El subgrupo B2 contiene a los subgrupos B3 y B4; el B3 está integrado por los genotipos C7, C8, C9, C12, C13, C14 y C15. El B4, se dividió en B5 y B6, el primero está integrado por T13, C36, C37 y C60. El B6 está integrado por los subgrupos B7 y B8, el B7 se dividió a su vez en B9 y B10. El B9 está integrado por C48, C49, C50, T16, T18, C56, C51, C53, T17, C57, C52, C54 y C55. El B10 está conformado por T12, T14, C29, C30, C33, T15, C32, C34, C28, C31 y C35. El B8 se dividió en B11 y B12, el B11 a su vez en B13 y B14. El subgrupo B13 contiene a T2, T7, T4, T8, T11,

T9, T10 y T3. Por su parte el B14 contiene a C16, C18, C22, C19, C17, C21 y C23. El subgrupo B12, contiene a los subgrupos B15 y B16. El B15, se dividió en B16 y B17, el B16 está integrado por C39, C40, C42, C45 y C46. El B17 a su vez se dividió en B18 y B19, el subgrupo B18 está integrado por T20, C62, C63, C65, C58, C64, C61 y T21; el B19 está conformado por F4, C10, C11, C27, T6, C26, T5, C6, T23, T24, C66 y C67. Por último, el B16 se dividió en B20 y B21; el primero sólo contuvo al F5; mientras que el B21 está integrado por el T1, C5, F2, C3, F8, C4, F3, F7, F1, C1, C2 y F6 (Figura 1).

La población de criollos presentó un mayor grado de heterocigosidad promedio (0,147), seguido de los trinitarios (0,144), mientras que los forasteros presentó el valor más bajo (0,095). La alta heterocigosidad encontrada en los criollos en parte se puede deber al origen diverso de los materiales que conforman esta población.

Colección núcleo

Con el objetivo de constituir la colección núcleo (CN) del germoplasma conservado en el Banco de Germoplasma de

tra de la CO y la muestra más cercana a la CN) más pequeña representa la diversidad de la colección original y es homogéneamente representada por la CN. Por otro lado, la ENE (distancia promedio entre cada muestra de la CN y la muestra más cercana de la colección original) y E (distancia promedio entre las muestras de la CN) indican la dispersión de los datos de la CN, donde los valores más altos indican una mejor representación de los valores extremos.

El valor de ANE disminuye conforme el tamaño de la CN incrementa; esto se debe a que los individuos de la CN más grande llenan el vacío de la CN más pequeña, y disminuye la distancia promedio entre los elementos seleccionados de la CN y los de la CO. Los valores de ENE más grandes en la CN22 indica que el grupo de individuos de la CN presentan la dispersión más amplia. El valor de E incrementa en tanto el número de individuos de la CN incrementa; esto indica que los individuos extremos son incluidos como valores extremos que forman un simple grupo. La cobertura de alelos (CA) está por arriba de 90% cuando la CN excede los 20 individuos y continúa incre-

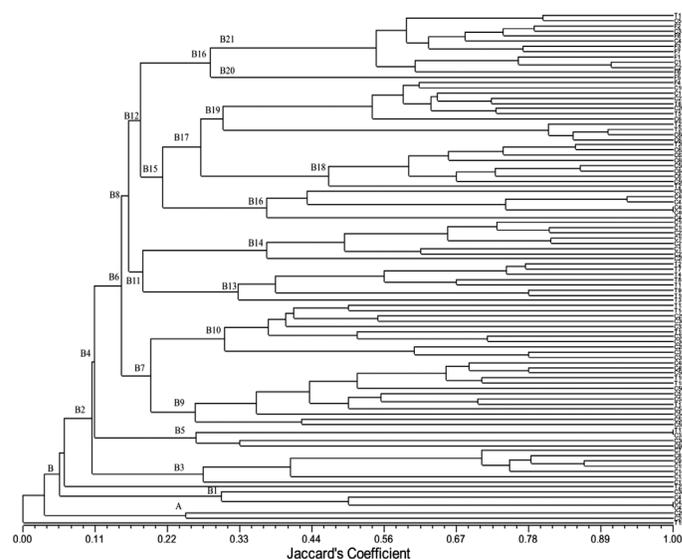


Figura 1. Dendrograma producto del análisis de conglomerados con el procedimiento UPGMA, basado en el coeficiente de Jaccard de 99 accesiones de *Theobroma cacao* L. de origen Trinitario (barra gris), Forastero (barras blancas) y Criollo (barras negras), con el uso de 14 cebadores SSR.

TABLA IV
EVALUACIÓN DE LA COLECCIÓN NÚCLEO
PARA DIFERENTES VALORES DE K

K	12	14	16	18	20	22
ANE	0,3263	0,2898	0,2781	0,2362	0,2324	0,2385
ENE	0,5887	0,5629	0,4786	0,4554	0,4309	0,4459
E	0,7397	0,7588	0,773	0,7484	0,7883	0,7917
MD	0	0	0	0	0	0
VD	64	56	49,3333	64	62,6667	52
CR	66,6667	77,3333	78,6667	77,3333	80	89,3333
CV	70,5555	76,7748	77,3246	80,2585	83,9211	87,3369
CA	0,8333	0,8867	0,8933	0,8867	0,90	0,9467

K: elementos incluidos en la CN, ANE: distancia promedio entre la colección original y las muestras más cercanas a la CN, ENE: distancia promedio entre la muestra de la CN y la muestra más cercana a la CN, E: distancia promedio entre la muestra de la CN, MD: prueba de homogeneidad de medias (diferencia promedio % entre CN y la colección inicial más cercana), VD: prueba de homogeneidad de varianza (diferencia en la varianza % entre la CN y la colección inicial), CR: proporción de coincidencia (CR % retenida por la CN no es menos que el 80%), CV: proporción variable (<20% de la características que tienen diferente media entre la CN y la colección inicial), CA: cobertura de alelos.

mentando conforme se incrementan los individuos en la CN (Tabla V).

La distribución de las accesiones de acuerdo al análisis de componentes principales se observa en la Figura 2. Con valores de K= 20 y 22 se observa una mejor distribución de las accesiones representadas en la CN. Las accesiones representadas en cada CN de acuerdo al valor de K se observan en la Figura 3. Con un valor de K= 16 las accesiones que formarían la colección núcleo son C53, C45, C5, C,27, C8, C18, C23, C34, C28, C10, C4, T21, T13, T8, T18 y T24; para un valor de K= 18 las accesiones son C50, C63, C5, C18, C8, C51, C47, C30, C58, C25, C34, T13, T5, T24, T11, T14, T9 y F8; para un valor de K= 20 las accesiones son C25, C5, C18, C34, C10, C12, C45, C58, C4, C28, C20, C23, C8, T24, T18, T11, T10, T5, T13 y T17; finalmente con un valor de K= 22 las accesiones son C10, C65, C8, C45, C23, C28, C21, C20, C3, C31, C6, T7, T13, T18,

T24, T17, T21, T3, T6, T10, F7 y F1. Las colecciones núcleo que se formarían con valores de K= 16 y 20 solo se conformarían con tipos genéticos criollos y trinitarios; mientras que con valores de K= 18 y 22 se conformarían con los tres tipos genéticos de cacao.

Discusión

Diversidad genética del BGC

Los parámetros de diversidad encontrados en las accesiones del Banco de Germoplasma de Cacao fueron bajos ($P= 79,7\%$; $N_e= 1,21$ y $H_e= 0,153$) respecto a los reportados por otros autores. Zhang *et al.* (2009) al estudiar diferentes materiales de cacao desde el Alto Amazonas hasta México ($H_e= 0,63$ y $H_o= 0,65$) encontraron un alto nivel de riqueza alélica debido a los diversos grupos genéticos estudiados. Resultados similares reportan Avalos *et al.* (2012), donde el origen de los materiales jugó un papel importante para

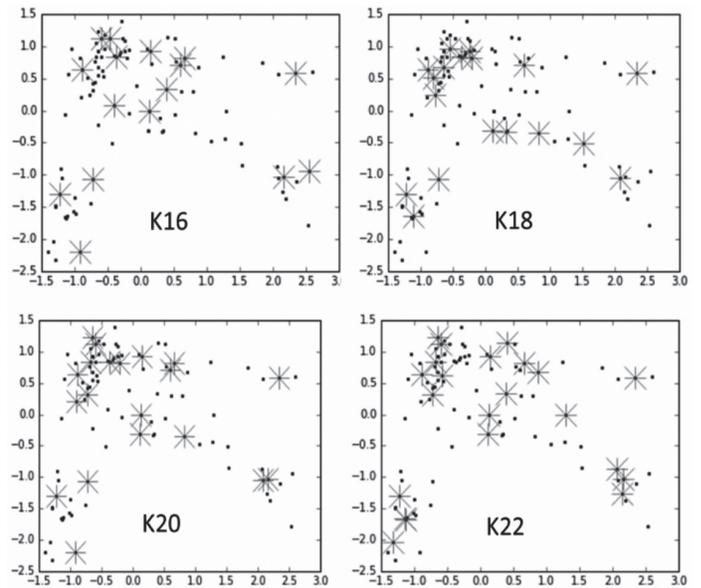


Figura 2. Distribución de las accesiones de cacao de acuerdo al análisis ACP.

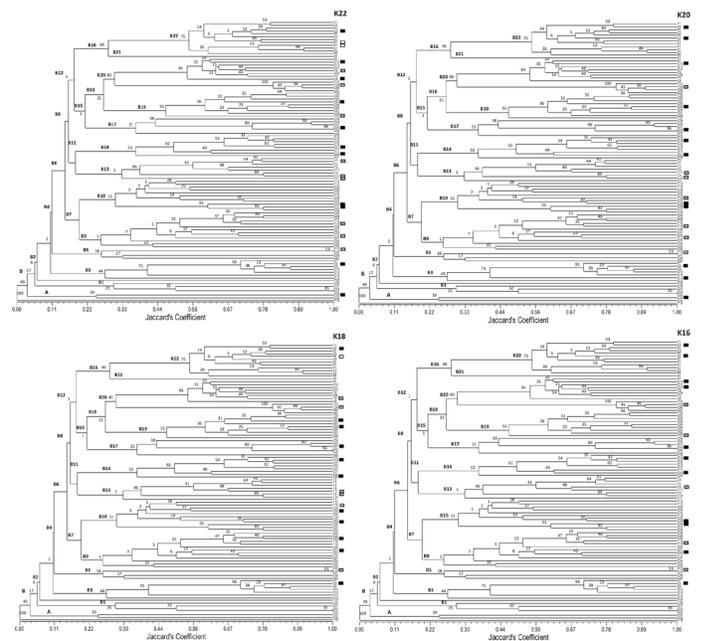


Figura 3. Posición en el dendrograma de las accesiones seleccionadas para la colección núcleo de acuerdo al coeficiente de Jaccard (K= 16, 18, 20 y 22).

separar los grupos genéticos criollos y mejorados. De igual manera reportan Morillo *et al.*

(2014) en poblaciones de cacao de Colombia, donde consiguan que la diversidad de los materiales se debió al origen diverso al tipo de propagación por semilla. Por su parte, Ramírez (2014) al estudiar cacaos de Tabasco, México, reporta valores altos de $H_e= 0,39$ y una gran cantidad de alelos privados (27), debido probablemente a que utilizó a árboles provenientes de semillas con una amplia diversidad en las

TABLA V
RESUMEN DE RESULTADOS DEL ANÁLISIS
DE VARIANZA MOLECULAR (AMOVA)

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Componentes de la varianza	Variación (%)
Entre poblaciones	2	50,819	0,722	8
Dentro de poblaciones	96	803,060	8,365	92
Total	98	853,879	9,088	100
Índice de fijación		PhiPT 0,079	P (rand≥data)= 0,001	

parcelas de los productores. También, Ji *et al.* (2012) usando SNP (*single nucleotide polymorphism*) reportan valores altos de He (0,367) al estudiar variedades de cacao de productores de Honduras y Nicaragua, una situación parecida al trabajo de Ramírez (2014). La mayor heterocigosidad encontrada en los cacaos criollos (0,147), seguido de los trinitarios (0,144), se debe probablemente al origen de los cacaos criollos que provienen de la Selva Lacandona.

Lerceteau *et al.* (1997), al estudiar accesiones de bancos de germoplasma usando RAPD's y RFLP's, y de acuerdo al origen geográfico, encontraron para las accesiones de México un porcentaje de polimorfismo $P= 54,8\%$, valor por debajo del encontrado en este estudio ($P= 79,7\%$), comportamiento que pudo ser debido a que tomaron pocas accesiones (15) y $H_o= 0,275$; por arriba al $H_e= 0,153$ encontrado en este estudio. También estos autores estudiaron la diversidad por grupo morfológico y encontraron para el tipo Forastero, con 29 accesiones, $P= 90,3$, $H_o= 0,188$; para el Trinitario (29 accesiones) $P= 80,7\%$, $H_o= 0,383$; y para el Criollo (9 accesiones) $P= 80,7\%$ y $H_o= 0,301$. En este estudio la heterocigosidad promedio para el grupo genético de los forasteros (8 accesiones) fue de 0,095; para los trinitarios (24 accesiones) de 0,144 y para los criollos (67 accesiones) de 0,147, debido probablemente a que se tomó un mayor número de accesiones por grupo morfológico, lo cual demuestra que probablemente los valores bajos de diversidad que se reportan en los tipos criollos se puedan deber a que se utilizan muestras pequeñas, como lo reportan Motamayor y Lanaud (2002) para los cacaos criollos de la Selva Lacandona de México y Whitkus *et al.* (1998), quienes reportan solo 8,8% de banda polimórficas para los materiales de cacao de Yucatán, reportando con ello baja diversidad genética en estos materiales.

De igual manera, Cruzillat *et al.* (2000), usando marcadores RFLP's en 86 accesiones del BNC del INIFAP, reportan baja variabilidad genética al reportar $N_a=1,67$ y 40,3% de heterocigosidad, sugiriendo que la mayoría de las accesiones son híbridos, sobre todo las accesiones de la serie RIM.

Al analizar la varianza molecular de las poblaciones analizadas, ésta fue de 8%, entre poblaciones y de 92% dentro de poblaciones, con un índice de fijación de 0,079 (Tabla V); es decir, existe una diferenciación genética moderada entre poblaciones, o bien deficiencia de heterocigotos, lo cual es común en poblaciones pequeñas. Al respecto Zhang *et al.* (2009), al estudiar cacaos de diferente origen geográfico desde el Alto Amazonas hasta México reportaron una varianza molecular entre poblaciones de 15,4% y dentro de poblaciones de 84,6%, por debajo al encontrado en este estudio. Por otro lado, Ramírez (2014) en cacaos de Tabasco, México, reporta una varianza molecular entre poblaciones de 1 y 99% dentro de poblaciones, por arriba al encontrado en este estudio. Es importante señalar que en este estudio la muestra de cacaos criollos fue más alto (67,67%) que los forasteros (8,08%) y los trinitarios (24,4%), contrario a los valores reportados por Whitkus *et al.* (1998), Zhang *et al.* (2009) y Lins *et al.* (2016).

Desde el punto de vista de las características morfológicas de los tres grupos genéticos no se observó una separación clara entre criollos y trinitarios, pero sí entre forasteros (Figura 1). El grupo genético de forasteros se caracterizan por presentar frutos de forma redonda a oblonga, sin surcos, sin constricción basal y muy poca rugosidad; las semillas son de color violeta a púrpura y aplanadas. Por otro lado, el grupo genético criollo, se caracterizaron por presentar frutos pequeños a medianos, con rugosidad y presencia de surcos y un alto porcentaje (80%) de semillas de color crema (Avendaño *et al.*, 2010). Final-

mente, el gupo genético trinitario, que proviene de la cruce de los crollos con forasteros, se caracterizaron por presentar frutos grandes, alargados con rugosidad y constricción basal pronunciada y el color de las semillas variaron desde crema, rosado hasta púrpuras.

Colección núcleo y la conservación a largo plazo de la colección del BGC

La conservación de largo plazo de especies tropicales de importancia económica, ambiental y con semillas recalcitrantes como es el cacao, es una de las estrategias más urgentes a fin de conservar la diversidad para las futuras generaciones. Lerceteau *et al.* (1997), al estudiar diferentes tipos de cacao de distintos orígenes proponen la realización de colecciones núcleo en cacao, debido a debido a que las principales colecciones mundiales de cacao, como la de Trinidad y Tobago y la del CATIE de Costa Rica, se encuentran en colecciones vivas en campo (Avendaño *et al.*, 2011) y están sujetas a desastres naturales y amenazas de plagas y enfermedades. La conservación *ex situ*, de las colecciones de cacao a nivel mundial debe considerar la generación de colecciones núcleo que permitan resguardar la diversidad mediante la crioconservación. Como alternativa, los avances recientes en técnicas *in vitro* y de crioconservación han demostrado ser eficaces en la protección de especies recalcitrantes como la papa (Yamamoto *et al.*, 2015). En México, Guzmán *et al.* (2017) reportan en aguacate la generación de una colección núcleo a partir de 298 individuos seleccionaron una $K= 36$ (36 individuos) y reportan valores de $CA= 0,81$. En este estudio, a partir de 99 accesiones, la colección núcleo que se propone es de $K= 22$ con una $CA= 0,94$.

Conclusiones

El Banco de Germoplasma de Cacao del INIFAP resguarda una importante diversidad,

sobre todo en los tipos criollos mexicanos, seguido de los trinitarios y finalmente de forasteros. Esta diversidad está siendo utilizada ampliamente en el programa de mejoramiento genético de cacao del INIFAP. La colección núcleo seleccionada representa eficientemente la diversidad de la colección original y se puede proponer para la conservación a largo plazo mediante crioconservación, como lo sugieren diferentes autores.

REFERENCIAS

- Avalos A, Porres MA, Pöhl E, Dardón E., Arévalo LA, Rosales JA (2012) Caracterización agronómica, botánica y molecular de clones de cacao tipo criollo y mejorado de la zona sur de Guatemala. *Rev. Univ. del Valle Guatemala* 24: 99-104.
- Avendaño-Arrazate CH, Ogata-Aguilar N, Gallardo-Méndez RA, Mendoza-López A, Aguirre-Medina JF, Sandoval-Esquívez A (2010) *Cacao diversidad en México*. Campo Experimental Rosario Izapa. INIFAP. México. 86 pp.
- Avendaño-Arrazate CH, Villarreal-Fuentes JM, Campos-Rojas E, Gallardo-Méndez RA, Mendoza-López A, Aguirre-Medina JF, Sandoval-Esquívez A, Espinosa-Zaragoza S (2011) *Diagnóstico del Cacao en México*. Universidad Autónoma Chapingo. 76 pp.
- Borrayo E, Takeya M (2015) Signal-processing tools for core-collection selection from genetic-resource collections. *F1000 Res.* 4: 97. DOI 10.12688/f1000research.6391.1
- Borrayo E, Machida-Hirano R, Takeya M, Kawase M, Watanabe K (2016) Principal components analysis - K-means transposon element based foxtail millet core collection selection method. *BMC Genet.* 17: 42. doi: 10.1186/s12863-016-0343-z
- Cheesman EE (1944) Notes on the nomenclature, classification and possible relationships of cocoa population. *Trop. Agric.* 21: 144-159.
- Cruzillat D, Bellanger L, Rigoreau M, Bucheli P, Pétiard V (2000) Genetic Structure, Characterisation and Selection of Nacional Cacao Compared to Other Genetic Groups. Proc. Int. Workshop on New Technologies and Cocoa Breeding. (16-17/10/2000). Kota Kinabalu, Malasia. pp. 48-66.
- Cuatrecasas J (1964) Cacao and its Allies. A Taxonomic Revision of

- the Genus *Theobroma*. Smithsonian Institution. Washington, DC, EEUU. *Cotrib US Natl. Herbarium* 35: 375-614.
- Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB (1983) A plant DNA mini-preparation: Version II. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1: 19-21.
- Guiltnan MJ, Verica J, Zhang D, Figueira A (2008) Genomics of *Theobroma cacao*, "The Food of the Gods". En Moore PH, Ming R (Eds.) *Genomics of Tropical Crop Plants*. Springer. Nueva York, EEUU. pp. 145-170.
- Guzmán LF, Machida-Hirano R, Borrayo E, Cortés-Cruz M, del Carmen Espíndola-Barquera M, García EH (2017) Genetic structure and selection of a core collection for long term conservation of avocado in Mexico. *Front. Plant Sci.* 8: 243. DOI 10.3389/fpls.2017.00243
- Ji K, Zhang D, Motilal IA, Boccara M, Lachenaud P, Meinhardt LW (2012) Genetic diversity and parentage in farmer varieties of cacao (*Theobroma cacao* L.) from Honduras and Nicaragua as revealed by single nucleotide polymorphism (SNP) markers. *Genet. Resour. Crop Evol.* 13 pp. DOI 10.1007/s10722-012-9847-1
- Lanaud C, Risterucci AM, Pieretti I, Falque M, Bouet A, Lagoda PJJ (1999) Isolation and characterization of microsatellites in *Theobroma cacao* L. *Mol. Ecol.* 8: 2141-2143.
- Lerceteau E, Robert T, Petiard V, Crouzillat D (1997) Evaluation of the extent of genetic variability among *Theobroma cacao* accessions using RAPD and RFLP markers. *Theor. Appl. Genet.* 95: 10-19.
- Lins AB, Lawinsky PR, Barbosa AMM, Gaiotto FA, Correa RX (2016) Molecular genetic diversity in a core of cocoa (*Theobroma cacao* L.) clones with potential for selection of disease resistance, plant height and fruit production. *Afr. J. Biotechnol.* 15: 2517-2523.
- Morillo CY, Morillo AC, Muñoz FJE, Ballesteros WP, González A (2014) Molecular characterization of 93 genotypes of cocoa (*Theobroma cacao* L.) with random amplified microsatellites RAMs. *Agron. Colomb.* 32: 315-325.
- Motamayor JC, Lachenaud P, da Silva e Mota J, Loo R (2008) Geographic and genetic population differentiation of the Amazonian chocolate tree (*Theobroma cacao* L.). *PLoS One* 3: e3311.
- Motamayor JC, Risterucci AM, Lopez PA, Ortiz CF (2002) Cacao domestication I: the origin of the cacao cultivated by the Mayas. *Heredity* 89: 380-386.
- Ogata N, Gómez-Pompa A, Taube K (2006) The domestication of cacao in the Neotropics. En McNeil CL (Ed.) *Chocolate in Mesoamerica: A Cultural History of Cacao*. University Press of Florida. Gainesville, FL, EEUU. pp. 69-89.
- Peakall R, Smouse PE (2012) GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics* 28: 2537-2539.
- Perry MD, Davey MR, Power JB, Lowe KC, Bligh HFJ, Roach PS, Jones C (1998) DNA isolation and AFLP genetic fingerprinting of *Theobroma cacao* L. *Plant Mol. Biol. Rep.* 16: 49-59.
- Phillips MW, Castillo J (1999) Artificial inoculations in cacao with the fungo *Moniliophthora roreri* (Cif, EtPar.) Evans *et al* and *Phytophthora palmivora* (Bult) Butler. *Actas IV Semana Científica; Logros de la Investigación para el Nuevo Milenio*. Serie Técnica. CATIE. Turrialba, Costa Rica. pp. 32-35.
- Phillips MW, Castillo J, Krauss U, Rodríguez E, Wilkinson MJ (2005) Evaluation of cacao (*Theobroma cacao*) clones against seven Colombian isolates of *Moniliophthora roreri* from four pathogen genetic groups. *Plant Pathol.* 54: 483-490.
- Prevost A, Wilkinson MJ (1999) A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. *Theor. Appl. Genet.* 98: 107-112.
- Ramírez GMA (2014) *Caracterización Morfológica y Molecular de Genotipos de Cacao (Theobroma cacao L.) en Plantaciones de Tabasco, México*. Tesis. Colegio de Posgraduados. México. 124 pp.
- Roldán-Ruiz I, Dendaaw J, Van-Bockstaele E, Depicker A, De Loose M (2000) AFLP's markers reveal high polymorphic rates in ryegrasses (*Lolium* spp.). *Mol. Breed.* 6: 125-134.
- Russell JR, Hosein F, Johnson E, Waugh R, Powell W (1993) Genetic differentiation of cocoa (*Theobroma cacao* L.) populations revealed by RAPD analysis. *Mol. Ecol.* 2: 89-97.
- SIAP (2016) *Sistema de Información Agropecuario*. Secretaría de Agricultura Ganadería, Pesca y Desarrollo Rural. México. www.siap.sagarpa.mx
- Whitkus R, de la Cruz M, Mota-Bravo L, Gómez-Pompa A (1998) Genetic diversity and relationships of cacao (*Theobroma cacao* L.) in southern Mexico. *Theor. Appl. Genet.* 96: 621-627.
- Yamamoto SI, Rafique T, Arizaga MV, Fukui K, Gutiérrez EJC, Martínez CRC, Watanabe K, Niino T (2015) The aluminum crioplate increases efficiency of criopreservation protocols for potato shoot tips. *Am. J. Potato Res.* 92: 250-257
- Zhang D, Arevalo GE, Motilal LA, Baligar V, Bailey B, Zuñiga CL, Arevalo ACE, Meinhardt L (2011) Dissecting genetic structure in farmer selections of theobroma cacao in the Peruvian Amazon: Implications for on farm conservation and rehabilitation. *Trop. Plant Biol.* 4: 106-115. DOI 10.1007/s12042-010-9064-z
- Zhang D, Mischke S, Johnson ES, Phillips MW, Meinhardt M (2009) Molecular characterization of an international cacao collection using microsatellite markers. *Tree Genet. Genom.* 5: 1-10. DOI 10.1007/s11295-008-0163-z