09 DIC 2002

CATIE Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza

Caracterización molecular y morfológica de genotipos superiores de cacao nacional (*Theobroma cacao L.*) de Ecuador

JAMES GONZALO QUIROZ VERA

CENTRO AGRONOMICO TROPICAL DE INVESTIGACION Y ENSEÑANZA
PROGRAMA DE EDUCACION PARA EL DESARROLLO Y LA CONSERVACION

ESCUELA DE POSGRADO

"CARACTERIZACION MOLECULAR Y MORFOLOGICA DE GENOTIPOS SUPERIORES CON CARACTERISTICAS DE CACAO NACIONAL (*Theobroma cacao L.*) DE ECUADOR."

Por:

James Gonzalo Quiroz Vera

CATIE

Turrialba, Costa Rica

2002

CENTRO AGRONOMICO TROPICAL DE INVESTIGACION Y ENSEÑANZA

PROGRAMA DE EDUCACION PARA EL DESARROLLO Y LA CONSERVACION
ESCUELA DE POSGRADO

"CARACTERIZACION MOLECULAR Y MORFOLOGICA DE GENOTIPOS SUPERIORES CON CARACTERISTICAS DE CACAO NACIONAL (*Theobroma cacao L.*) DE ECUADOR."

Tesis sometida a consideración de la Escuela de Posgrado, Programa de Educación para el Desarrollo y la Conservación del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza como requisito parcial para optar por el grado de:

Magister Scientiae

Por:

James Gonzalo Quiroz Vera

Turrialba, Costa Rica

2002

Esta tesis ha sido aceptada en su presente forma por el Programa de Educación para el Desarrollo y la Conservación y la Escuela de Posgrado del CATIE y aprobada por el Comité Consejero del Estudiante como requisito parcial para optar por el grado de:

MAGISTER SCIENTIAE

FIRMANTES:

Carlos Astorga Domian, M.Sc.
Consejero Principal

Wilberth Phillips, M.Sc.
Miembro Comité Consejero

Oscar Brenes, M.Sc.
Miembro Comité Consejero

Gustavo Adolfo Enríquez, Ph.D.
Miembro Comité Consejero

Ali Moslemi, Ph.D.
Director Programa de Educación y
Decano de la Escuela de Posgrado

James Gonzalo Quiroz Vera
Candidato

DEDICATORIA

A Dios inseparable compañero en todos los momentos de mi vida y de mi familia.

A la memoria de mi Abuela Rosa Flores y mi Tía Berenice Quiroz, que en paz descansen.

A mi Esposa Alexandra y a mis hijos

Marlon Jairo Quiroz Correa
Andree Gonzalo Quiroz Correa
Michelle Alexandra Quiroz Correa

Por su amor, comprensión y sacrificio

A mis Padres

Cesar Gonzalo Quiroz Flores
Celeste Genoveva Vera Troya

Quienes a pesar de la distancia siempre han estado conmigo.

A mis Hermanas y Hermano

Con mucho cariño

A mi suegra

Luisa Tacurí Enríquez

Con mucho cariño

A mi familia en general sobrinos propios y políticos así como a mis cuñadas y cuñados.

Con mucho cariño

AGRADECIMIENTOS

Deseo dejar constancia de mis sinceros agradecimientos a todas aquellas personas e instituciones que de una u otra manera contribuyeron en el desarrollo de la presente investigación:

Carlos Astorga Domian por su alto espíritu de colaboración, amistad ofrecida a lo largo del desarrollo del trabajo de investigación, así como por las sugerencias en la revisión y edición de la tesis.

A Wilberth Phillips miembro del comité asesor por su amplio apoyo y oportunas sugerencias para un mejor desarrollo de la investigación

A los demás miembros del comité asesor Gustavo Enríquez y Oscar Brenes por su amistad y por el tiempo dedicado al trabajo de tesis.

A Olman Quirós por su gran apoyo en la fase de desarrollo en el laboratorio de biología molecular por sus sugerencias y ayuda incondicional y a Geover Peña y Jhonny Zambrano por la toma de los datos morfológicos de cacao en Ecuador.

Al personal de la Unidad de Biotecnología y Recursos Fitogenéticos del CATIE, por su alto grado de colaboración y espíritu de cuerpo demostrado.

Al Programa de Modernización de Servicios Agropecuarios (PROMSA), BIRF – 4075- EC. por otorgarme la beca de estudios en el exterior.

A la UEFC Unidad Ejecutora del Fondo Competitivo.

Al NRI (Natural Resources Internacional Ltd). administradora técnica y financiera de la beca y a todas aquellas personas que de una u otra forma facilitaron un mejor desarrollo de este proceso.

Al Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP-Ecuador), Estación Experimental Tropical Pichilingue en la persona del M.Sc Ignacio Sotomayor H., Director y M.Sc Freddy Amores P., Líder Nacional del Programa Nacional de Cacao y Café, por su apoyo incondicional, además por brindarme la oportunidad de continuar con mis estudios.

Al personal de la Escuela de Posgrado y Biblioteca Conmemorativa ORTON del CATIE por su gran ayuda.

Finalmente, un especial agradecimiento a todas y cada una de las personas y amigos en Ecuador y en CATIE, quienes directa o indirectamente me impulsaron a continuar con mis estudios y compartieron mis alegrías y tristezas.

CONTENIDO

		Pág.
CONTENIDO		VII
LISTA DE CUADROS		X
LISTA DE FIGURAS		XI
LISTA DE ANEXOS		XII
RESUMEN		XV
SUMMARY		XVIII
I.	**INTRODUCCIÓN**	1
1.1	**Objetivos**	2
	A. Generales	2
	B. Específicos.	2
1.2	**Hipótesis**	3
II.	**REVISIÓN DE LITERATURA**	4
2.1	Origen y distribución del cacao	4
2.2	Clasificación botánica	5
2.3	Biología del cacao.	5
2.4	Domesticación del cacao	6
2.5	Historia del cacao en Ecuador	7
2.6	Complejo genético de cacao	8
2.6.1	Grupo de cacao Criollo.	8
2.6.2	Grupo de cacao Forastero.	9
2.6.3	Grupo de cacao Trinitario.	9
2.6.4	Cacao Nacional.	9
2.7	Colecciones de germoplasma	11
2.8	Mejoramiento genético convencional.	12
2.9	Características morfológicas	13

2.10 Marcadores moleculares. 14

2.10.1 Avances y descubrimientos de la cadena de ADN. 14

2.11 Marcadores moleculares AFLP (Amplified fragment length polymorphism) 15

2.11.1 Digestión del ADN genómico 15

2.11.2 Ventajas de los marcadores AFLP 17

2.11.3 Desventajas de los marcadores AFLP 17

2.12 Relación entre la caracterización morfológica y molecular 18

2.13 Análisis estadístico 18

2.13.1 Taxonomia numérica 18

2.13.2 Valor discriminante de los caracteres 20

2.13.3 Métodos estadísticos multivariados aplicados en biología molecular 21

2.14 Comparación de matrices molecular y morfológica 22

III. MATERIALES Y METODOS 24

3.1 Localización del estudio. 24

3.2 Material experimental. 24

3.2.1 Recolección de material vegetal 27

3.2.2 Extracción de ADN 28

3.2.3 Cuantificación del ADN 28

3.2.4 Selección de la combinación de "primers" 28

3.2.5 Amplificación de marcadores AFLP 29

3.2.5.1 Digestión del ADN 29

3.2.5.2 Ligación 30

3.2.5.3 Preamplificación 30

3.2.5.4 Amplificación 30

3.2.5.5 Desnaturalización 31

3.2.5.6 Preparación del gel de poliacrilamida 31

3.2.5.7 Montaje de las muestras 31

3.2.5.8 Revelado del gel de poliacrilamida 31

3.3 Caracterización morfológica 32

3.3.1 Características de la Flor 32

3.3.2 Características del fruto 33

3.3.3 Características de la semilla 33
3.3.4 Características de la hoja 34
3.4 Análisis Estadístico 35
3.4.1 Evaluación de datos moleculares 35
3.4.1.1 Diseño experimental 35
3.4.1.2 Esquema del análisis estadístico 35
3.4.2 Evaluación de datos morfológicos 38
3.4.2.1 Análisis de componentes principales 38
3.4.2.2 Análisis "Cluster" 38
3.4.2.3 Análisis discriminante canónico 39
3.4.2.4 Análisis de variancia (ANDEVA) 39
3.5 Relación entre las matrices de datos morfológicos y moleculares 41

IV. RESULTADOS Y DISCUSION 43
4.1 Caracterización molecular con marcadores AFLP 43
4.1.1 Aislamiento y determinación de la concentración de ADN 43
4.1.2 Digestión / Ligación y Preamplificación del ADN 44
4.1.3 Amplificación del ADN 45
4.1.4 Definición de Grupos genéticos 48
4.1.5 Diversidad Genética 51
4.2 Caracterización morfológica 54
4.2.1 Análisis morfológico 54
4.2.2 Análisis de grupos 56
4.2.3 Análisis discriminante canónico 60
4.2.4 Análisis de varianza y prueba de DUNCAN 62
4.3 Relación entre marcadores moleculares y morfológicos 65

V. CONCLUSIONES 67

VI. RECOMENDACIONES 69

VII. BIBLIOGRAFÍA 70

VIII. ANEXOS 83

LISTA DE CUADROS

Pág.

Cuadro 1. Clones de cacao Nacional y de referencia de los grupos genéticos, presentes en la región Amazónica que se utilizaron para la caracterización fenológica y molecular. 25

Cuadro 2. Combinación enzima-primers, número de fragmentos detectables y porcentaje de polimorfismo de las siete combinaciones enzimas-primers para marcadores moleculares de clones de cacao Nacional y otros orígenes de la colección de Ecuador. 29

Cuadro 3. Promedios de bandas totales, número de bandas polimorficas, porcentaje de polimorfismo y peso molecular observado por combinaciones enzima-primers en 63 clones de cacao Nacional y otros orígenes de la colección de Ecuador. 48

Cuadro 4. Distribución por grupo de los 51 clones de cacao tipo Nacional y de otros orígenes de acuerdo al análisis de varianza mínima de Ward (1967). 55

Cuadro 5. Análisis discriminante canónico (CAN-1; CAN-2 y CAN-3), para las características morfológicas evaluadas en los 51 clones de cacao tipo Nacional y de otros orígenes de la colección de cacao Ecuador. 61

Cuadro 6 Promedio, coeficiente de variación, desviación estándar y nivel de significancia para las características discriminantes en la caracterización morfológica de 51 clones de cacao de tipo Nacional y de otros orígenes de la colección de cacao de Ecuador. 64

LISTAS DE FIGURAS

Pág.

Fig. 1 Diagrama de análisis de los datos moleculares a partir de la información generada con la técnica de AFLP en clones de cacao Nacional y de otros orígenes de Ecuador. 37

Fig. 2 Diagrama de análisis estadísticos de los datos morfológicos de clones de cacao Nacional y de otros orígenes de la colección de Ecuador. 40

Fig. 3 Diagrama del análisis de la relación entre los datos morfológicos y moleculares de clones de cacao Nacional y de otros orígenes de la colección de Ecuador. 42

Fig. 4 Cuantificación de la concentración de ADN de 56 muestras de clones de cacao de Ecuador por electroforesis en gel de agarosa al 0.8 %. 44

Fig. 5 Ejemplo de amplificación de las siete combinaciones "enzima-primer" mostrando el número de bandas amplificadas por estas, en la caracterización molecular de clones de cacao Nacional y otros orígenes de Ecuador. 46

Fig. 6 UPGMA dendograma del agrupamiento de 63 genotipos de cacao Nacional y de otros orígenes de la colección de Ecuador, según la matriz de distancia y similitud de Nei & Li's (1979). 49

Fig. 7 Dendograma de 51 clones de cacao Nacional y de otros orígenes de Ecuador a partir de datos morfológicos, por medio del método de Ward (1967). 58

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 1. Protocolo de extracción de ADN para Cacao.	84
Anexo 2. Protocolos para preparar la solución de Tampón MATAB (Mixed Alkyltri-Methylammonium Bromide), y Tampón SORBITOL.	85
Anexo 3. Preparación para la mezcla de digestión del ADN.	86
Anexo 4. Preparación de las soluciones de adaptadores de *EcoRI-MseI* para la digestión del ADN.	87
Anexo 5. Protocolos de PCR para AFLP (Polimorfismo de Longitud de Fragmentos Amplificados), utilizados en la caracterización genética de cacao Nacional (tinción con nitrato de plata).	88
Anexo 6. Preparación de varias formulaciones usadas en el proceso de aplicación de marcadores AFLP.	91
Anexo 7. Preparación de gel de agarosa.	92
Anexo 8. Preparación del gel de acrylamida.	93
Anexo 9. Matriz de similiridad de 63 clones de cacao Nacional y otros orígenes de la colección de germoplasma de Ecuador generada a partir de datos moleculares por el índice de Nei & Li's (1979).	97
Anexo 10 Análisis de varianza y prueba de Duncan para la variable dependiente Relación largo/ ancho del sépalo de los clones de cacao Nacional y de otros orígenes de la colección de Ecuador.	101
Anexo 11. Análisis de varianza y prueba de Duncan para la variable dependiente Largo de ligula de los clones de cacao nacional y de otros orígenes de la colección de Ecuador.	101

Anexo 12 Análisis de varianza y prueba de Duncan para la variable dependiente Relación largo / ancho de ligula de los clones de cacao Nacional y de otros orígenes de la colección de Ecuador. 102

Anexo 13 Análisis de varianza y prueba de Duncan para la variable dependiente Largo del ovario de los clones de cacao Nacional y de otros orígenes de la colección de Ecuador. 103

Anexo 14. Análisis de varianza y prueba de Duncan para la variable dependiente Ancho del ovario de los clones de cacao Nacional y de otros orígenes de la colección de Ecuador. 103

Anexo 15. Análisis de varianza y prueba de Duncan para la variable dependiente Número de óvulos por ovario de los clones de cacao Nacional y de otros orígenes de la colección de Ecuador. 104

Anexo 16. Análisis de varianza y prueba de Duncan para la variable dependiente Relación largo / ancho de la mazorca de los clones de cacao Nacional y de otros orígenes de la colección de Ecuador. 105

Anexo 17. Análisis de varianza y prueba de Duncan para la variable dependiente Espesor de lomo de la mazorca de los clones de cacao Nacional y de otros orígenes de la colección de Ecuador. 105

Anexo 18. Análisis de varianza y prueba de Duncan para la variable dependiente Peso de cáscara de la mazorca de los clones de cacao Nacional y de otros orígenes de la colección de Ecuador. 106

Anexo 19. Análisis de varianza y prueba de Duncan para la variable dependiente Peso de testa de la semilla de los clones de cacao Nacional y de otros orígenes de la colección de Ecuador. 107

Anexo 20. Análisis de varianza y prueba de Duncan para la variable dependiente Peso de semilla seca de los clones de cacao Nacional y de otros orígenes de la colección de Ecuador. 107

Anexo 21. Análisis de varianza y prueba de Duncan para la variable dependiente Largo de la semilla de los clones de cacao Nacional y de otros orígenes de la colección de Ecuador. 108

Anexo 22. Análisis de varianza y prueba de Duncan para la variable dependiente Ancho de la semilla de los clones de cacao Nacional y de otros orígenes de la colección de Ecuador. 109

Anexo 23. Análisis de varianza y prueba de Duncan para la variable dependiente Relación largo / ancho de la hoja de los clones de cacao Nacional y de otros orígenes de la colección de Ecuador. 109

Anexo 24. Análisis de varianza y prueba de Duncan para la variable dependiente Relación largo / longitud de la base a la parte ancha de la hoja de los clones de cacao Nacional y de otros orígenes de la colección de Ecuador. 110

Anexo 25. Análisis de varianza y prueba de Duncan para la variable dependiente Angulo basal de la hoja de los clones de cacao Nacional y de otros orígenes de la colección de Ecuador 111

Quiroz, VJ. 2002 Caracterización molecular y morfológica de genotipos superiores con características de Cacao Nacional (***Theobroma cacao L.***) de Ecuador. Tesis Mag. Sci. CATIE. Turrialba, Costa Rica. 111 p.

Palabras claves: *Theobroma cacao*, Cacao, Caracterización, *Crinipellis perniciosa*, *Moniliophthora roreri*, Variedad, Marcadores moleculares, Recursos Genéticos, Variabilidad Genética, AFLP.

RESUMEN

El cultivo de cacao es tradicional en el Ecuador, en la actualidad existen aproximadamente 370.000 ha, sembradas con una producción promedio de 90.000 TM por año, constituyéndose en el cuarto rubro de exportación, del cual el 75 % es considerado como cacao fino de aroma denominada "arriba" proveniente de la variedad de cacao conocida como Nacional.

Sin embargo, durante la primera y segunda mitad del siglo pasado, debido a la aparición de las enfermedades Escoba de bruja (***Crinipellis perniciosa)*** y Monilia (***Moniliophthora roreri)***, los productores comenzaron a sustituir la variedad tradicional por híbridos de origen trinitario con altos niveles de producción y con una aparente resistencia a las enfermedades antes mencionadas, provocando una pérdida paulatina de la variedad del cacao Nacional.

Ecuador y la comunidad internacional han reconocido la necesidad de mantener el mercado basado en la calidad, para lo cual durante 1996 el Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) conjuntamente con la empresa de Chocolates Nestle de Ecuador y el Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG), realizaron una recolección de genotipos de tipo Nacional en fincas de productores donde se identificaron árboles con edades que se presumieron superiores a 80 años, altos niveles de producción (80-120 mazorcas / árbol / año), y resistentes a Escoba de bruja (Quiroz 1996), los cuales sirvieron de base para este estudio.

Se caracterizó molecularmente 63 genotipos de cacao Nacional y de otros orígenes, de los cuales solo 51 clones fueron caracterizados morfológicamente debido a la falta de flores y frutos durante el periodo de evaluación, además, se incluyeron dentro de este estudio tres genotipos de referencia de los tipos genéticos Trinitario (UF-676), Forastero Amazónico (Matina) y el Criollo (Criollo-36).

Para la caracterización molecular se utilizó la técnica de marcadores moleculares AFLP con siete combinaciones "enzima–primers" reportadas por Risterucci (2000) y Motamayor

(2001), con el mayor número de bandas polimórficas en trabajos con los mismos marcadores moleculares en otros genotipos de cacao.

Se observó un alto grado de polimorfismo para las siete combinaciones de primers, reveladas por el método de tinción no radiactivo utilizando nitrato de plata ($AgNo_3$). El número de bandas polimórficas totales fue de 321, con un mínimo de 29 bandas polimórficas para la combinación EACG/MCTT y un máximo de 59 bandas polimórficas para la combinación EAAG/MCAA. con un porcentaje promedio de polimorfismo de 70,79 %.

Con esta información se calculo la matriz de similaridad usando Nei & Li's (1979), el cual demostró que la distancia genética presente en los 63 clones de cacao tipo Nacional y de otros orígenes es muy amplia cuyo rango es de 0,832 para los clones más similares genéticamente y de 0,225 para los más diferentes. El dendograma UPGMA, para los 63 clones de cacao demuestran la no-conformación de grupos genéticos específicos, pero si separados por su origen y su constitución genética.

Cabe señalar que el grupo con el menor índice de similaridad entre ellos y con los demás clones en estudio fue el conformado por los genotipos UF-676, Criollo-36 con un 0,402 de similaridad , unido a este el clon CC-267 (Matina), con un grado de similaridad de 0,505, lo cual concuerda con lo reportado por Cruzillat (2000), y Lecertaud *et al.* (1996), quienes reportan que los cacaos Nacionales de Ecuador son independientes de los tres grupos genéticos conocidos y que el origen de esta variedad es aún desconocida.

Para la caracterización morfológica se utilizaron 34 variables cuantitativas y 13 cualitativas, se utilizó el tamaño de muestra para flores, frutos, semillas y hojas, recomendadas por Soria y Enríquez (1981) y el IBPGR (1981), para caracterizar clones y árboles de cacao.

Se observó que se conformaron cinco grupos bien definidos, el primero con 18 clones constituidos por genotipos CCAT y EB representando el 35,3 % de la variabilidad total. El grupo dos lo conformaron 10 clones con el 19,6 % de la variabilidad y está constituido mayoritariamente por los clones CCAT y EB con la salvedad que a este grupo se encuentran unidos los clones SCA-6 y SCA-12.

El grupo 3 conformado por 15 clones representa el 29,4 % de la variabilidad y consta de materiales de origen amazónico, subdividido en dos subgrupos, el primero (A) formado por cinco clones procedentes de la parte norte de la amazonía ecuatoriana y los clones EBC-138 y EBC-148 (Expedición Botánica Caquetá Colombia), y el otro subgrupo (B) formado por los

clones provenientes de las riveras de los ríos Tapiche, Tiputine, Napo, Bobonaza y el Clon Escobar.

El grupo cuatro constituido por cinco clones con el 9,8 % de la variabilidad total y finalmente el grupo cinco conformado por los clones UF-676, Matina muy relacionados entre sí y unido a este el Criollo-36 pero independientes de los demás materiales estudiados.

Finalmente se determinó que a través de la caracterización morfológica permitió identificar claramente 16 características que discriminan entre los clones de cacao tipo Nacional y otros orígenes, las cuales explican el 95,15 % de la variabilidad presente en la población en estudio. Las características más discriminantes fueron: Relación largo/ancho del sépalo, Largo de la lígula, Relación largo/ancho de lígula, Largo del ovario, Ancho del ovario, Número de óvulos por ovario, Relación largo/ancho de la mazorca, Peso de la cascara, Peso de la testa, Peso seco de la semilla, Largo de la semilla, Ancho de la semilla, Relación largo/ancho de la hoja, Relación largo/ LBA y Angulo basal.

Quiroz, V J. 2002. Molecular and morphological characterization for superior genotypes with cacao Nacional characteristics (*Theobroma cacao* L.) from Ecuador. Mag. Sci thesis. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 111p.

Key words: *Theobroma cacao*, characterization, *Crinipellis perniciosa*, *Moniliophthora roreri*, variety, molecular markers, genetic variability, AFLP

SUMMARY

Cacao is a traditional crop in Ecuador, there are approximately 370.000 ha, which have an average production of 90.000 tm per year. It constitutes the fourth export commodity in Ecuador and the 75% is considered as a fine aroma cacao called "arriba", which comes from the variety know as "cacao Nacional".

During the first and second half of the last century, two diseases showed up, witches broom (*Crinipellis perniciosa*) and Monilia (*Moniliophthora roreri*). Because of that, farmers started to substitute traditional varieties for Trinitario hybrids which is characterized by high production levels and an apparent resistance to both diseases.

Ecuador and the international community have recognized the importance of quality products for markers. For this reason during 1996 the Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) in collaboration with Chocolates Nestle de Ecuador Company and the Ministry of Agriculture and Livestock (MAG), collected the National genotypes. Collection was in farms that were identified to have more than 80 years of planting, high yield levels (80 to 120 pods / tree / year) and resistant to witches broom (Quiroz, 1996). This materials were used for this study.

In this study, 63 cacao Nacional genotypes and other origins were molecularly characterized. However only 51 clones were morphologically characterized since the left clones did not produce flowers and fruits during the evaluation period. In addition three genotypes of reference were included from the genetic groups "Trinitario" (UF 273), "Forastero Amazónico" (Matina) and "Criollo" (Criollo 36).

For the molecular characterization the AFLP molecular markers with seven combinations of "enzyme-primer" as reported by Risterucci (2000) and Motamayor (2001) was used.

They reported the major polymorphic bands in studies with the same molecular markers in other cacao genotypes.

DNA was extracted based on MATAB method, by using small samples (1 cm diameter) from fresh and dry leaves which allow to obtain a concentration equal or higher than 80 ng / ul.

A high degree of polymorphism for the seven primer combinations was observed. They were reveled by a non-radioactive method with silver nitrate ($AgNo_3$), in polyacrilamide gel. The total number of polymorphic bands were 452 for the seven combinations with spread of 44 bands for the combination EACG/MCTT and 89 for EAAG/MCAA. The polymorphism's average were 70,79% for the used combinations. With this information was calculated the similarity matrix by using Nei an Li's (1979) coefficient, then the dendrogram and a bootstrap analysis were generated.

The dendrogram for the 63 cacao clones showed a no specific genetic group conformation, separated from the origin or genetic constitution, with genetic distances from 0,225 to 0,832. In this study, it is important to mention that the less similarity among genotype groups were UF 273, Criollo 36 and clone CC 267 (Matina). This result is supported by the findings to Crouzillat (2000) and Lecertaud *et al* (1996) who reported that the Nacional cocoas form Ecuador were independent from the three known genetic groups and the origin of this variety is even unknown.

For the morphological characterization, 34 quantitative characteristics and 13 qualitative characteristics were utilized. The minimal sample for flowers, fruits and seeds recommended by Soria and Enríquez (1981) and IBPGR (1981) were used to characterize clones and cocoa trees.

Based on the results obtained in the morphological characterization, five groups well defined were formed. The first is constituted by 18 clones mainly by CCAT and EB genotypes which represent the 35,3 % of the total variability. The second group is conformed by 10 clones with the 19,6% of the variability and is constituted mainly by clones CCAT, EB and the clones SCA-6 and SCA-12. The third group is conformed by 15 clones representing the 29,4% of the variability and is constituted by materials from the Amazonian region. It is subdivided into two subgroups, the first being formed by five clones which come from the north part of the Ecuadorian Amazonian region and the clones EBC-138 and EBC-148 (Botanical Expedition

Caqueta Colombia) and the second being formed by clones from the margin of the rivers Tapiche, Tiputine, Napo and Bobonaza and the Escobar clon.

The fourth group is conformed by five clones representing the 9,8% of the total variability. Finally the five group is conformed by clones UF-273 and Matina, Criollo-36 is very related to other but is independent from the rest of the studied materials.

It is possible to observe that the morphological characterization clearly permits to identify 13 discriminant characteristics namely: sepal length/wide relation, ligule length, ligule length/wide relation, ovary length, ovary wide, ovule per ovary number, pod length/wide relation, shell weight, test weight, dry seed weight, seed length, seed wide, leaf length/wide relation, length/ LBA relation and basal angle.

I. INTRODUCCION

El cultivo del cacao (*Theobroma cacao* L), es tradicional en Ecuador, existen en la actualidad aproximadamente 370.000 ha sembradas en 60.000 unidades de producción, para el periodo de 1997-1998, represento el 4 % de la producción mundial, la cual se estimó en aproximadamente 100.000 Tm./año (ICCO 1999). El cacao es el cuarto rubro de exportación del Ecuador, en donde el 75 % de la producción es considerada como cacao fino de aroma denominado arriba, proveniente de la variedad conocida como Nacional (FAO 2000).

La variedad Nacional es más homogénea que los Trinitarios y su almendra por su alta calidad obtiene precios altos con relación a otros cacaos comerciales (Vera 1993). Es autóctona del Ecuador en donde se cultiva desde principios del siglo XVIII y es posible que se haya originado de pocas mazorcas llevadas hace mucho tiempo desde un lado al otro de la cordillera de los Andes en el mismo país (Soria 1967).

Con la aparición de las enfermedades escoba de bruja (*Crinipellis perniciosa)* y monilia (*Moniliophthora roreri)*, en fechas cercanas a 1900, los productores iniciaron el proceso de sustitución de la variedad de cacao Nacional por híbridos de origen Trinitario con altos niveles de producción y con una aparente resistencia a las enfermedades antes señaladas.

El país y la comunidad internacional han reconocido la necesidad de mantener el mercado de cacao basado en la calidad. En 1996, el Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) con el apoyo de la empresa de Chocolates Nestle de Ecuador y el Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG), procedieron a realizar una recolección de genotipos de cacao tipo Nacional en fincas de productores. Los criterios utilizados para la recolección de los materiales fueron que los árboles presentaran una edad superior a los 80 años, altos niveles de producción (80-120 mazorcas / árbol / año), y resistencia a escoba de bruja.

Producto de ese trabajo, el INIAP conserva una colección de 60 accesiones representadas por 10 plantas por accesión, recolectadas en diferentes localidades, la cual representa la variabilidad existente a nivel del país de la variedad de cacao Nacional (Quiroz 1997).

Las técnicas de biología molecular, y en particular el uso de marcadores moleculares, han permitido conocer y caracterizar el contenido genético de los organismos, así como, estimar la diversidad y las relaciones genéticas entre grupos de interés (Phillips 1995).

En los últimos años han surgido diversos métodos de detección de polimorfismos genéticos detectados a nivel del ADN. La utilización de enzimas de restricción permitió el análisis del polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción de ADN (Restricction Fragment Length Polymorphism - RFLP), (Beckman 1991), y la amplificación de la cadena de ADN con el desarrollo de la técnica PCR (Saiki *et al*. 1988), que ha dado origen a muchos otras clases de marcadores moleculares.

Los marcadores AFLP, son una técnica que combina la reacción en cadena de la polimeraza (PCR) y los análisis de fragmentos de restricción para detectar polimorfismos debido a cortes provocados en diversos sitios por enzimas de restricción (Liscum y Oeller 1997).

La técnica detecta múltiples loci polimórficos a través del genoma y es útil para generar huellas genéticas o para mapeo genético (Simpson 1997). Las ventajas que ofrece este método son su confiabilidad y consistencia, debido a las condiciones de alta astringencia bajo las cuales se llevan a cabo las reacciones en cadena de polimeraza, y la habilidad de detectar rápidamente muchos locis polimorficos (Mueller y Wolfenbarger 1999).

Considerando lo anterior, y tomando en cuenta que los marcadores moleculares AFLP's permiten tener una adecuada caracterización de la variabilidad genética del cacao, independiente de la influencia del ambiente y combinada con la caracterización morfológica, permitirán elegir la base genética de los padres y las mezclas clónales de genotipos de cacao tipo Nacional en diferentes etapas del mejoramiento genético con el fin de conformar poli clones con genotipos afines para poder recomendarlos a los productores de cacao de Ecuador.

1.1 OBJETIVOS

A. General:

- Caracterizar molecular y morfológicamente 63 clones de cacao de tipo Nacional para determinar el nivel de variación de la población elite de genotipos de la colección de germoplasma de Ecuador.

B. Específicos:

- Determinar el grado de variabilidad genética presente en las accesiones del cacao tipo Nacional por medio de marcadores moleculares y características agro-morfológicas.
- Determinar la eficiencia del método MATAB mini preparaciones para la extracción de ADN de Cacao tipo Nacional.
- Determinar la eficiencia de los marcadores AFLP para caracterizar la base genética del cacao tipo Nacional.

- Tipificar mediante análisis multivariado los diferentes agrupamientos de los clones de cacao tipo Nacional.
- Correlacionar las características obtenidas con los marcadores moleculares (AFLP) y las características agro-morfológicas.

1.2 Hipótesis.

Las hipótesis planteadas para el presente trabajo de investigación se enumeran a continuación:

- Existe variabilidad genética entre los 63 clones de la colección de cacao tipo Nacional detectada usando marcadores moleculares y estimaciones morfológicas.
- Los marcadores moleculares AFLP son eficientes para la caracterización genética de cacao tipo Nacional.
- Existe relación entre los resultados de marcadores AFLP con las características agro-morfológicas.
- Existe un patrón de comportamiento de los 63 clones susceptibles de tipificación o agrupamiento por medio de características similares.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Origen y distribución del cacao

Él genero *Theobroma* es nativo del nuevo mundo y desde México hasta Perú se encuentran especies silvestres, con un aparente centro de origen en la cuenca alta del Amazonas.

El cacao se ha encontrado circunscrito a las cuencas del Amazonas y del Orinoco en Sur América al este de los Andes y cerca de la frontera entre Colombia y Ecuador (Wood, 1959). Cheessman (1944), señala que, tomando en consideración los rangos de variabilidad encontrada por Pound (1938), en sus expediciones de colecta por el bajo amazonas, indica con mayor precisión que el fenómeno de diferenciación sucedió en los valles formados por los ríos Napo, Putumayo y Caquetá afluentes del Amazonas cerca de las fronteras orientales de Ecuador y Colombia y algunos afluentes del Orinoco tales como el Guaviare y el Inírida, donde según Pound (1938), en esa área ocurre un tipo enteramente silvestre, llamado "Criollo de la montagne", formado por frutos de formas extremadamente variables y con cierto grado de pigmentación.

Soria (1970), indica que la distribución natural de la especie avanza hasta 15 ^{0} de latitud sur, en los ríos Alto Beni y Mamoré, en el territorio boliviano y por el norte, hasta cerca de los 10 ^{0} en los límites de los llanos venezolanos y por las vertientes bajas de las sierras de Parima y Paraima, que dividen Venezuela de Brasil.

Por su parte Cuatrecasas (1964), confirma esta teoría de que el centro de origen del cacao se sitúa en la cuenca del Amazonas, y además propone la existencia de dos subespecies correspondiente a los Criollos y los Forasteros, sugiriendo también que la subespecie correspondiente a los criollos son originarios de América Central, y a la subespecie de los Forasteros le atribuye como su centro de origen el bajo amazonas mencionando que evolucionaron independientemente.

Finalmente a partir de estudios realizados con ayuda de diferentes tipos de marcadores moleculares, Laurent *et al* (1994), propone un esquema de diferenciación de poblaciones de cacao de acuerdo con la hipótesis de Cuatrecasas (1964), donde los forasteros serian dispersados a partir del alto amazonas dando lugar al forastero, mientras que el criollo evolucionaría independientemente del otro lado de la cordillera andina.

2.2 Clasificación Botánica

Hardy (1961), indica que el cacao es una planta tropical que pertenece a la familia de las Esterculiáceas, orden Malvales, género *Theobroma* el cual comprende unas veintidós especies; *Theobroma cacao* es la especie mas conocida por su importancia económica y social. Otras especies como *T. bicolor* (conocido en el Ecuador como "cacao blanco" o "patas"), y *T. Angustifolia* se utilizaron en América Central, desde la época anterior a la conquista, para la preparación del chocolate.

Por mucho tiempo ha existido confusión en la clasificación taxonómica del cacao comercial, debido a su variabilidad genética respecto a caracteres de color, forma y dimensiones de las distintas partes de la flor, del fruto y la semilla. Sin embargo, como punto de partida se admite que la mayor parte del cacao comercial pertenece a una sola especie *T. cacao*, que comprende tres complejos genéticos; los Criollos, Forasteros o Amazónicos, y Trinitarios, este último se originó por el cruce de los dos anteriores (Cuatrecasas 1964).

2.3 Biología del Cacao

El cacao es una planta perenne diploide (2n=20), principalmente alógama, dispersada en casi todas las regiones húmedas tropicales de baja altitud. Empieza a producir al tercero o cuarto año, considerándosele económicamente rentable durante 25 o 30 años, sin embargo existen ciertos árboles que pueden producir por 100 años o más.

El tronco del árbol es vertical de crecimiento continuo, su brotación es discontinua, así como su floración. La flor de cacao es hermafrodita y se da en racimos llamados cojinetes en las partes viejas de la planta (cauliflora), pentámera con cinco loculos dentro de los cuales existen de 6 a 12 óvulos (Hardy 1961).

La polinización natural es esencialmente entomófila, el polen una vez liberado es viable durante 48 horas, una planta puede producir alrededor de 100000 a 150000 flores por año de las cuales solo el 0,1 al 0,3 % es fecundada, sin embargo, existen un sinnúmero de factores que afectan él número final de frutos, uno de estos es el "Cherelle Wilt" o muerte prematura que afecta a estos en su etapa temprana y puede reducirlos en un 20 a 90 % debido a un problema de regulación fisiológica del número de frutos o como consecuencia de un sistema de auto incompatibilidad del cacao, o por efecto de estrés (Cope 1976).

Los frutos de cacao maduran entre cinco a seis meses después de polinizados y pueden contener entre 20 a 40 semillas, las cuales pueden germinar inmediatamente extraídas de la mazorca. La semilla es cotiledonar cubierta de una pulpa mucilaginosa de color blanco, los cotiledones pueden ser de blanco a violeta, contienen una media del 50% de lípidos que una vez extraídos constituyen la manteca del cacao. La semilla seca generalmente posee un peso de entre 0,8 a 1,5 g.

La autocompatibilidad es un carácter genético de alguna frecuencia en cacao y en algunos cultivos alógamos, consiste en que ciertos genes influyen para que el propio polen de algunas plantas no pueda fecundar sus óvulos, la primera explicación genética que se ha dado para este fenómeno es que la fecundación es controlada por una serie de cinco alelos en el mismo locus, que se ha denominado S, con el siguiente orden de dominancia: $S_1 > S_2 = S_3 > S_4 > S_5$ (Knight y Rogers 1955). Posteriormente propusieron la presencia de un sexto alelo S_6, recesivo a los otros, y de dos factores adicionales diferentes e independientes a los que se llamó A y B. Se cree que estos últimos tienen que ver con la producción de alguna sustancia o sustancias sobre las que actúan los factores S para producir sus respectivos antígenos y anticuerpos (Cope 1958).

El conocimiento de los sistemas de compatibilidad de los diferentes clones de cacao constituye una información importante para su futura utilización, tanto en plantaciones comerciales como en programas de hibridación.

2.4 Domesticación del cacao

Se sabe que el centro de origen de *Theobroma* es el alto Amazonas (Mariaca y Hernández 1992), y que su domesticación comenzó en el sur de México, y América Central con los Mayas, que fue el primer pueblo conocido que se dio cuenta de las valiosas cualidades de la almendra de cacao hace más de 2000 años (Nosti, 1953; Cope, 1976; Bradeau, 1981).

Los Españoles fueron los primeros en llevar cacao a Europa, y promover su cultivo en América. A partir del siglo XVI en adelante se sembró en muchas de las regiones tropicales de Centro y Sur América y en algunas Islas del Caribe (Urquhart 1963), quien indica además, que los Españoles cultivaron cacao en Trinidad desde 1525, pero que se desconocía de donde obtuvieron el material para la siembra, no existiendo evidencias de que el cacao fuera nativo de Trinidad aunque se encontraron algunos árboles silvestres en el bosque que presentaban semejanzas con las formas mexicanas.

Los Forasteros que fueron localizados en la cuenca del río amazonas, es el genotipo que sienta las bases del cultivo en América del Sur y se cree que fueron parcialmente domesticados por los nativos del Amazonas en la época precolombina (Figueira *et al* 1994), cuyo grupo según el origen geográfico que

lo conforman, han sido subdivididos en Forasteros del Alto Amazonas (silvestres y semi silvestres) y Forasteros del bajo Amazonas (Cacaos amelonados) siendo estos últimos los que predominan en los cacaos cultivados mundialmente.

Los Trinitarios, son considerados un tipo intermedio entre los Criollos y Forasteros (Warren, 1994), y su origen se ubica en el siglo XVIII, donde debido a la destrucción del Cacao Criollo-semilla blanca existente en Trinidad fue sustituido por material Forastero llevado desde Venezuela el cual se cruzó naturalmente con el remanente Criollo. Otra hipótesis señala que el cacao Trinitario se originó de cruzamientos realizados por poblaciones indígenas ubicadas en la cuenca del bajo Orinoco, entre el Criollo Suramericano y el Forastero Amazónico cuyas generaciones fueron introducidas a Trinidad (Yamada, 1991).

2.5 Historia del cacao en Ecuador

Bergmann (1968), en su artículo sobre la distribución del cultivo de cacao en América Precolombina sita a Prescott (1843), quien indica que en la expedición de Gonzalo Pizarro a lo largo de las costas ecuatorianas durante 1526-1527 encontraron plantaciones de cacao, refiriéndose básicamente a las costas de la Provincia de Esmeraldas, donde describe que existían terrenos cultivados con maíz amarillo, papa , y diversificado en las áreas bajas por florecientes plantaciones de cacao.

También Erneholm (1948), citó fuentes donde indica que en 1741 había plantaciones en la Isla Puná en el Golfo de Guayaquil, sin embargo, esto es dos siglos más tarde de la conquista de los españoles. Por otra parte el obispo Lizarraga (1908) al hablar sobre la isla no menciona al cacao como uno de los productos comercializados en Guayaquil durante 1605, con lo cual se debilita la teoría de la existencia de cacao en el noreste Sudamericano en el tiempo de Pizarro.

Por su parte Arosemena (1991), citando a historiadores españoles como Diego de Trujillo, acompañante de Pizarro indica que este en 1571 al llegar a Puerto viejo, escribió "*Cacao de lo de México, aunque poco*", indicando además que no existe ningún relato que confirme que en 1537 los indios del territorio que actualmente es la Provincia del Guayas consumieran cacao a la llegada de los Españoles, y que sea probable que los primeros colonos españoles comenzaran a cultivarlo tan tarde como 1590 y exportarlo a partir de 1593.

Soria (2002), por su parte indica que a la mitad de siglo XVI el negocio del cacao era rentable, e indica que Don Diego de Portugal, Corregidor de Guayaquil en 1623 informa a la corte de España que había un gran número de plantas de cacao sembradas a lo largo de las riveras de los ríos afluentes del Guayas y que se comercializaban clandestinamente a través de Acapulco en México y posteriormente a

través de Sonsonate en El Salvador y Ajacutla y Amapala en Guatemala. Este autor también indica que desde principios de 1600 ya había pequeñas plantaciones de cacao a orillas del río Guayas y que se expandieron a orillas de sus afluentes el Daule y el Babahoyo, ríos arriba, lo cual, origino el nombre de cacao "Arriba" en el mercado internacional, mencionando también que la variedad que da origen a este cacao se denomina "Nacional" y que botánicamente pertenece a los denominados forasteros amazónicos, reconocida mundialmente por su aroma floral, concluyendo que las áreas preferidas de siembra eran la Provincia de los Ríos (Vinces, Babahoyo, Palenque, Baba, Pueblo Viejo, Catarama y Ventanas), al sur de la provincia del Guayas (Naranjal, Balao, Tenguel) y en El Oro (Machala y Santa Rosa).

Las variedades cultivadas en Ecuador fueron inicialmente, el cacao Nacional y que se sembró única y exclusivamente hasta 1890, (Wood 1959), variedad con características fijas y constantes y que pertenece al tipo Forastero amelonado (Rorer 1914). Posteriormente con las introducciones desde Venezuela y Trinidad del cacao Trinitario conocido como venezolano amarillo y morado, dio lugar a un cruzamiento natural entre la variedad local y la introducida formando el complejo Nacional-Trinitario en diferentes grados de relación; así para la región de Machala fue de 1 a 1 y para Bahía mostró ser de 8 a 1, mientras que para la parte nor-este del país parte de la región "arriba" la relación fue de 70 árboles nacionales por 1 de venezolano (Fowler y López 1949).

2.6 Complejo genético de cacao

Botánicamente se reconocen tres grandes grupos de cacao, considerándose la situación del cacao Nacional de Ecuador como diferente:

2.6.1 Grupo de cacao Criollo

El término criollo (indígena) originalmente fue atribuido por los conquistadores españoles, al cacao cultivado en esa época, en Venezuela.

Actualmente, se ubica en este grupo todos los cacaos que muestran las mismas características de los antiguos criollos venezolanos. Las características fenotípicas de este grupo son: mazorca cilíndrica, con 10 surcos profundos simples o en pares, cáscara rugosa, delgada o gruesa, con una ligera capa lignificada en el centro del pericarpio con o sin constricción en el cuello, puntas agudas en cinco ángulos, rectas o encorvadas, el color de la mazorca inmadura puede variar del verde al rojo (Soria 1966).

Los árboles son relativamente bajos y menos robustos respecto a otras variedades, cuya copa es redonda, hojas pequeñas, ovaladas, de color verde claro y gruesas. Las flores presentan un pedicelo corto, estaminoides y líneas guías de los pétalos rosado claro. Los tipos con cotiledones color blanco se cultivan principalmente en América Central, México, Colombia y parte de Venezuela. Este grupo se caracteriza por ser muy susceptible a las principales enfermedades (Nosti 1953).

2.6.2 Grupo de cacao Forastero

El grupo de cacao Forastero comprende los cacaos cultivados en Brasil y África Occidental, los que proporcionan el 80% de la producción mundial. También se llaman amazónicos, porque están distribuidos en forma natural, en la cuenca de ese río y sus afluentes. Se reconoce como centro de origen de este complejo genético el área localizada entre los ríos Napo, Putumayo y Caquetá, en América del Sur (Soria 1966).

Posee mazorcas amarillas cuando maduras, ovoides, amelonadas, con 10 surcos superficiales o profundos, cáscara lisa o ligeramente rugosa, delgada o gruesa con una capa lignificada en el centro del pericarpio, y los dos extremos redondos y a veces con un pequeño cuello de botella en la base. Los estaminoides son pigmentados de color violeta, semillas más o menos aplastadas en estado fresco, de color púrpura oscuro de forma triangular en corte transversal, aplanadas y pequeña. (Enríquez 1992).

2.6.3 Grupo de cacao Trinitario

Los cultivares de cacao Trinitario ocupan del 10 al 15% de la producción mundial. Botánicamente son un grupo complejo, constituido por una población híbrida que se originó en la isla de Trinidad, cuando la variedad original (criollo de Trinidad), se cruzo con una variedad introducida de la cuenca del río Orinoco, de allí que las características morfológicas, genéticas y de calidad son intermedias entre Criollos y Forasteros. Dentro de este grupo se ubica la mayor parte del cacao cultivado en América (Soria 1966).

2.6.4 Cacao Nacional

La variedad de cacao Nacional es nativa del Ecuador y proviene de los declives orientales de la cordillera de los Andes en la hoya amazónica; y se conservó como exclusiva hasta 1890, cuando se inició la introducción de material de Venezuela de origen trinitario (Wood *et al.* 1959).

De acuerdo con Cheesman (1944), Bowman (1950) y Nosti (1953) el cacao Nacional esta ubicado dentro del grupo de los Forasteros Amazónicos, basado en su aparente relación taxonómica,

cuya teoría es soportada por Soria (1970), sin embargo, Enríquez (1992), basado en que la mazorca del tipo Nacional es típica y puede ser identificada frente a otros genotipos, y considerando además que la forma y color de la semilla no son similares a los forasteros, y basándose en el tiempo de fermentación, calidad y aroma, indica que es más razonable que esta variedad esté cerca del grupo Criollo, pero que su origen es el alto amazonas en la región del oriente ecuatoriano, donde se han identificado materiales similares, en las provincias de Tena, Archidona y Macas, desde donde sus frutos posiblemente fueron transportados a ambos lados de los Andes, originándose de pocas mazorcas la variedad Nacional, conocida por su especial calidad organoléptica. Soria (1987), cree que la variedad se originó de pocas semillas cosechadas de árboles introducidos en tiempos lejanos procedentes de la cordillera de los Andes.

Por otra parte Lecertaud (1996) y Lecertaud *et al.* (1997), mediante trabajos de caracterización molecular y datos fenotipicos, encontraron que el cacao Nacional a pesar de ser considerado dentro del grupo de Criollos por unos autores y Forastero por otros, tiene características independientes a estos grupos con rasgos morfológicos y organolépticos especiales.

Crouzillat *et al.* (2000) en recientes estudios realizados en 416 genotipos de cacao de orígenes diferentes, determinaron niveles de heterozigocidad y diversidad genética que le permitieron concluir que el origen exacto del cacao Nacional es aun desconocido pero que las pruebas de RFLP realizadas indican que este grupo es genéticamente diferente a los Forasteros, Criollos y grupos Trinitarios.

Los árboles adultos de cacao Nacional son grandes, con alturas promedios de 8 metros, pero alturas de 10 y aún 12 metros son comunes. Fowler (1952), indica que a medida que el árbol envejece, los troncos se inclinan, convirtiéndose en una característica muy pronunciada, la cual es poco común en plantaciones de Criollos y Trinitarios. La longitud total de árbol inclinado, puede, sin embargo exceder de 13 m, el diámetro medio del tronco es más o menos de 18 cm con una variación entre 9 y 29 cm. La raíz principal del sistema radical primario es más maciza en el árbol adulto de cacao Nacional que en otros tipos (Enríquez 1992).

Las ramas jóvenes y las hojas son típicamente glandular pubescentes pero tienen apariencia glabrosa en la madurez. Las hojas jóvenes son flácidas de color verde amarillentas, las hojas maduras tienen generalmente forma oblongo elíptica, con un promedio de 25cm de largo por 7cm de ancho, asemejándose a la de los tipos Trinitarios. Las mazorcas son de color amarillo, tornándose en bronceadas cuando están expuestas a luz solar con el desarrollo de un pigmento rojizo.

Las flores del cacao Nacional, son pequeñas, sin aroma y sin néctar. Hay, sin embargo una diferencia principal con respecto a los Trinitarios, Criollos y Amazónicos, que los estambres del cacao Nacional son pigmentados.

Se ha observado árboles de más o menos 75 años produciendo más de 80 mazorcas árbol^{-1} año^{-1}. Un árbol superior produce por lo menos 100 mazorcas y algunos árboles se conoce que producen hasta 170 mazorcas árbol^{-1} año^{-1} (Quiroz 1996).

El cacao Nacional en Ecuador produce una cosecha principal anualmente, la que comienza aproximadamente en diciembre y termina en mayo.

El fruto maduro típico del cacao Nacional es elíptico, ligeramente verrugoso o áspero, con una constricción basal poco profunda y un ápice puntiagudo y prominente. Aunque, se le describe generalmente como un amelonado, difiere del verdadero tipo amelonado en que es más liso y profundamente acanalado con una pared o cápsula más gruesa y una constricción basal menos profunda. En realidad, la mazorca del cacao Nacional típica esta entre el tipo amelonado y cundeamor (Quiroz y Soria 1994).

La mazorca tiene un diámetro y un grosor de cáscara significativamente más grande que las de los grupos Criollo, Forastero y Trinitario. Así también, el número de almendras promedio por mazorca es de 33, de forma redondeada y más pequeñas y rellenas que la de los cacaos Trinitarios (Enríquez 1992).

2.7 Colecciones de Germoplasma.

Hasta 1991 el "International Cocoa Germplasm Database" (ICGD), había registrado en su base de datos, información de alrededor de 8000 clones que incluía materiales procedentes de recolecciones de material silvestre y materiales seleccionados por programas de mejoramiento genético de algunos países.

Dentro de los países con el mayor número de accesiones están Brasil, con clones colectados durante 1965 en el bajo amazonas brasileño, por ejemplo las series CEPEC, SIC y SIAL. Costa Rica con accesiones internacionales y locales denominadas CC, UF y ARF, Trinidad y Tobago los clones del Banco Internacional de cacao de Trinidad (End *et al.* 1992).

Ecuador, posee un número de accesiones de alrededor de 1150 materiales distribuidos en seis colecciones ubicadas en dos estaciones experimentales del Instituto Nacional de Investigaciones

Agropecuarias (INIAP), en la parte costera del pacífico sur y en la Amazonía. De estas, 500 accesiones corresponden a materiales seleccionados en diferentes trabajos de mejoramiento, 490 a clones y materiales silvestres y los restantes 160 materiales con características de Nacional introducidos en los últimos cinco años, de los cuales 63 corresponden a selecciones realizadas a nivel de finca de productores por su alto grado de resistencia a Escoba de Bruja (*Crinipellis perniciosa)* y por su alta producción y calidad intrínseca del cacao Nacional de Ecuador (Quiroz 1997).

2.8 Mejoramiento genético convencional

El mejoramiento genético del cacao actualmente está dirigido a alcanzar dos grandes objetivos, incremento del rendimiento de cultivares y resistencia a enfermedades. El rendimiento medio para América Latina es de 300 Kg/ha /año mientras que para África es de 400 Kg/ha/año (FAO 1988), la mayoría de los países informan de perdidas de aproximadamente el 50 % de la producción por ataque de enfermedades y del 21 % por plagas.

Actualmente están disponibles diferentes métodos de mejoramiento: selección de clones y selección genealógica por producción de híbridos.

La selección clonal fue muy empleada al inicio de los años de 1940 y 1970 y consiste en propagar vegetativamente, individuos superiores seleccionados a partir de descendencias híbridas. Este método permite aumentar los rendimientos y la homogeneidad de las plantaciones, sin embargo, presenta algunas limitantes, dependiendo de la técnica de propagación usada (injertos, estacas). Por ejemplo, si se toman ramas plagiotrópicas, el crecimiento de las plantas será lateral lo que obligaría al uso de un tutor para sostener la planta, también su sistema radical será superficial no permitiendo un adecuado anclaje a la planta (Bowman 1949).

La selección de descendencia híbridas es muy utilizada. Se basa en la creación de descendientes F1 o híbridos de clones que son utilizados como progenitores de semillas híbridas permitiendo obtener una fuerte heterosis para el rendimiento, vigor y precocidad (Lanaud 1987).

El ciclo de selección toma algunos años, incluye la selección de diferentes individuos dentro de una colección con características deseables (productivos, resistente a plagas y enfermedades y calidad), luego mediante polinización manual se realizan los cruzamientos.

Posteriormente, se realiza la evaluación de las mejores descendencias respecto a los padres que son multiplicados vegetativamente para ser establecidos en el campo de producción de semillas, para

finalmente, por medio de polinización natural o artificial obtener semillas con buen valor en sus descendencias y posteriormente distribuir híbridos seleccionados a los productores.

El mejoramiento genético por selección genealógica presenta algunos problemas, los descendientes son muy heterogéneos, probablemente debido al grado de heterocigocidad de los padres. Trabajos realizados por Lanaud *et al.* (1987) con ciertos híbridos provenientes de clones que fueron seleccionados, indican que el 80% de la producción se basó en la recolecta de solamente el 30% de los árboles. Esto posiblemente se debió al uso de progenitores maternos auto incompatibles, permitiendo una mayor obtención de frutos producto de cruzamientos y no de auto fecundación, pues los insectos generalmente mezclan el polen del mismo árbol, este inconveniente disminuye la ventaja que produce el aporte de la heterosis.

2. 9 Características morfológicas

La mayoría de las plantas cultivadas con importancia económica tienen sus patrones de identificación, caracterización y evaluación, para llegar a estos protocolos se han realizado estudios de las características en el sentido de conocer la variabilidad de los caracteres dentro y entre plantas, luego se ha seleccionado aquellas características cualitativas o cuantitativas que han resultado ser más útiles para la descripción. (Enríquez 1966).

Así, los órganos más importantes para la descripción morfológica son aquellos que están menos influenciados por el ambiente, entre estos órganos quizás los más importantes son la flor y el fruto, le siguen en importancia las hojas, tronco, ramas, raíces y los tejidos celulares que muchas veces son difíciles de caracterizar (Enríquez 1991).

Pound (1932), fue uno de los primeros investigadores en señalar que algunas características de la flor y la semilla son útiles en la caracterización de clones de cacao, cuyo criterio fue confirmado por Dejean (1948), y por Ostendorf (1965), quien concluyó que las piezas florales que mejor caracterizan los clones son los pétalos, el pistilo y el número de óvulos por ovario.

Enríquez y Soria (1967), presentaron una lista de 11 caracteres descriptivos de la flor, así como el tamaño de muestra, mismos que fueron ratificados por Engels, Bartley y Enríquez (1980), e incluidos dentro del grupo de descriptores que actualmente se recomiendan para cacao.

Stockdale (1928), realizó los primeros estudios acerca de la forma de la semilla tomando como base el largo, ancho y espesor de esta para describir algunas poblaciones de cacao, Pound (1932) indicó que el tamaño de la semilla es un carácter muy variable requiriéndose una muestra muy grande para su

estimación. Esta autor concluyó que el peso seco de la almendra es el rasgo más confiable para la descripción morfológica.

Quiroz y Soria (1994), encontraron que las características fenotípicas distintivas que representan los genotipos Nacionales son: la pigmentación rojo-rosada en el filamento del estambre, falta de pigmentación en los sépalos, forma amelonada, más esférica y una ligera estrangulación en la base; cáscara con una rugosidad media, más gruesa y suave para el corte, menor número de óvulos y semillas por fruto en los Nacionales puros, también observaron que los pedúnculos a pesar de su mayor grosor comparado con los otros tipos de cacao, son más fáciles de cortar y esto parece estar relacionado con la presencia de haces vasculares poco lignificados. Se concluye que la variedad Nacional tiene características diferenciales de las flores, frutos y semillas, además de su sabor y aroma característico, mundialmente reconocido por la industria chocolatera internacional.

2.10 Marcadores Moleculares

El pequeño número de marcadores morfológicos distintos en un mismo linaje reduce la probabilidad de encontrar asociaciones significativas entre estos marcadores y caracteres de importancia económica a través del estudio de poblaciones segregantes. Por lo tanto, solo ocasionalmente eran identificados marcadores morfológicos ligados a los genes de importancia económica, lo cual limitaba su empleo en programas de mejoramiento genético (Tanksley *et al.* 1995).

Con el desarrollo de técnicas modernas de biología molecular, surgieron diversos métodos de detección de polimorfismo genético directamente al nivel de ADN. Inicialmente, la utilización de enzimas de restricción permitió el análisis del polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción de ADN (Restriction Fragment Length Polymorphism - RFLP), (Beckman 1991). El proceso de amplificación de la cadena de ADN polimerasa- PCR (Saiki *et al.*. 1988), llevó a la descripción de otras clases de marcadores moleculares.

Estas metodologías, aliadas a las técnicas de clonación y secuenciamiento del ADN, han hecho posible obtener y acumular gran número de información sobre la estructura del genoma eucariótico. Estas nuevas tecnologías contribuyeron al descubrimiento y estudio de diversas clases de secuencias repetitivas de ADN llamadas Mini y Microsatélites (Beckman 1991)

2.10.1 Avances y descubrimientos de la cadena de ADN

Las técnicas de biología molecular, y en particular el uso de marcadores moleculares, ha permitido conocer y caracterizar el contenido genético de los organismos, así como, estimar la

diversidad y las relaciones genéticas entre grupos de interés. Los avances históricos de los marcadores moleculares se presentan a continuación (Phillips-Mora, 1998)

1953	Descubrimiento de la cadena de ADN por Watson y Crick.
1954	Se realizan los primeros estudios genéticos usando electroforesis.
1970	Aislamiento de la primera endonucleasas de restricción.
1974	Marcadores RFLP
1975	Reacción en cadena de polimeraza (PCR) (Saiki *et al*. 1985)
1989	Marcadores microsatélites.
1990	Marcadores RAPDs (Williams *et al*.. 1990, Welsh y McClelland 1990)
1995	Marcadores AFLP (Vos P. *et al* 1995).

Es así, que la caracterización molecular usando estos marcadores tiene varias ventajas, tales como: 1) No es influenciada por el ambiente; 2) Puede ser usada cualquier parte de la planta en cualquier estado de crecimiento; 3) el número de análisis es ilimitado; 4) se requiere de pequeñas cantidades de material vegetal 5) ADN es altamente ilimitado; 6) alto polimorfismo (número de alelos / locus); y 7) distribuidos por todo el genoma (León 1998).

2. 11 Marcadores Moleculares AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)

Los marcadores moleculares AFLP, son una técnica que combina la reacción en cadena de la polimeraza (PCR), y análisis de fragmentos de restricción para detectar polimorfismos debido a cortes provocados en diversos sitios por enzimas de restricción (Liscum y Oeller 1997).

La técnica detecta múltiples loci polimorficos a través del genoma. Son útiles para generar huellas genéticas o para mapeo genético (Simpson 1997). Las ventajas que ofrece el método AFLP's son confiabilidad y consistencia, debido a las condiciones de alta astringencia bajo las cuales se llevan a cabo las reacciones en cadena de polimerasa, y la habilidad de detectar rápidamente muchos locis polimorficos (Mueller y Wolfenbarger 1999).

La metodología que utiliza la técnica de AFLP consiste de varios pasos que se describen a continuación:

2.11.1 Digestión del ADN genómico

Se realiza con una enzima de corte raro (*EcoRI*) combinada con una enzima de corte frecuente (*MseI*). Las enzimas de corte raro reconocen de 6 a 8 pares de bases o una secuencia rara de bases. Las

reacciones se realizan separadamente, tratando primero el ADN con la enzima de corte raro y después con la de corte frecuente. Con esta digestión secuencial se generan tres clases de fragmentos que difieren en cuatro de las extremidades.

La segunda etapa consiste en la incorporación de adaptadores específicos que poseen terminales complementarios en los extremos resultantes del corte con las enzimas de restricción. Por ejemplo, los adaptadores *EcoRI*, específicos se unen a los extremos "adhesivos" producidos por la enzima *EcoRI*, mientras que los adaptadores *MseI* se unen específicamente a los extremos resultantes del corte con la enzima *MseI*. Los adaptadores poseen de 20 a 30 pares de bases cuyas secuencias son diferentes en cada uno de ellas. En este paso, podría ser amplificado un gran número de fragmentos mediante la reacción en cadena de la polimerasa, dirigida con "primers" específicos a partir de las secuencias de los adaptadores. Sin embargo, este número sería excesivamente grande para obtener una buena difusión de fragmentos individuales, inclusive en geles de alta resolución. Por lo tanto, son necesarias algunas etapas de selección de una subpoblación de fragmentos hasta llegar a un número tal que sea posible visualizarlos convenientemente en un gel (Ferreira y Grattapaglia 1998).

La tercera etapa consiste en la selección de los fragmentos que serán amplificados. Esta se realiza mediante una estrategia basada esencialmente en el concepto de los polimorfismos RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), o sea, la utilización de "primers" de secuencia arbitraria. Los "primers" utilizados para dirigir la reacción de PCR están construidos de tal forma que, además de la secuencia especifica de 20 a 25 nucleótidos complementarios a la secuencia de los adaptadores, contienen de 1 a 3 nucleótidos adicionales de secuencia arbitraria en su extremo 3'. La especificidad en esta extremidad es crucial, dado que justamente en este sitio es donde se inicia la polimerización. Con esto, los "primers" hibridaran solamente con aquellos fragmentos que posean la secuencia complementaria a su secuencia arbitraria adicional. Por lo tanto, se produce una acción selectiva en el momento en que es realizada la reacción PCR y solamente una subpoblación de fragmentos es amplificada (Simpson 1997)

El polimorfismo de AFLP depende de la relación entre el número de nucleótidos selectivos en los "primers" de la reacción de PCR y la complejidad del genoma. Para genomas menos complejos, como los de microorganismos por ejemplo, debe ser utilizado un menor número de nucleótidos selectivos para obtener el número adecuado de bandas visualizadas. A medida que se analizan genomas más complejos, debe utilizarse mayor número de nucleótidos selectivos. Por lo tanto, en caso de no estar bien definida la complejidad genómica del organismo de interés, es importante determinar experimentalmente el número adecuado de nucleótidos selectivos que serán utilizados en los "primers" (Rouppe van der Voort *et al* 1998).

2.11.2 Ventajas de los marcadores AFLP

Ferreira y Grattapaglia (1998), indican que desde su desarrollo y divulgación esta técnica ha sido utilizada de forma creciente para diversas finalidades, tales como "fingerprinting", mapeamiento genético localizado y construcción de mapas genéticos, principalmente en especies de plantas cultivadas que presentan una baja tasa de polimorfismo de ADN.

La ventaja que más destaca de esta técnica respecto a la técnica de RFLP y RAPD's es indiscutiblemente el gran número de fragmentos que se originan y revelan en un único gel, es él más alto entre las técnicas de marcadores disponibles hasta el momento. La técnica de AFLP es por lo tanto, muy eficiente para el muestreo amplio y simultáneo de un genoma. Una vez que es posible obtener decenas de marcadores polimorficos en un único gel, es también posible imaginar la construcción de un mapa genético con aproximadamente 200 a 300 marcadores obtenidos solamente a partir de cinco a siete geles de electroforesis de alta resolución (Becker *et al* 1995).

La segunda ventaja de la técnica AFLP es el gran poder de detección de variabilidad genética. Ya que explora simultáneamente el polimorfismo de presencia y ausencia de sitios de restricción, como el ensayo de RFLP y la existencia o no de amplificación a partir de secuencias arbitrarias, tal como el ensayo RADP. Con esto se consigue una flexibilidad significativa en la obtención de marcadores polimorficos. De la misma manera que el ensayo RAPD, el de AFLP no requiere información previa de la secuencia de ADN (Ferreira y Grattapaglia 1998).

La tercera ventaja de esta técnica es la mayor robustez del estudio AFLP comparado con el de RAPD. Esto se debe básicamente a que se utilizan "primers" más largos en la reacción de PCR, lo que aumenta significativamente la especificidad de la amplificación, evitando la competencia que ocurre durante la reacción de PCR en el ensayo RAPD. AFLP reúne, por lo tanto, la ventaja de la reacción de PCR específica con la ventaja de la técnica RAPD de explorar secuencias arbitrarias (Ferreira y Grattapaglia 1998).

2.11.3 Desventajas de los marcadores AFLP.

De forma análoga a los marcadores RAPD, la principal limitación de los marcadores AFLP es el bajo contenido de información genética por locus. Nuevamente solo se detecta un alelo, o sea, el fragmento que se amplifica. Las demás variaciones alélicas son clasificadas conjuntamente como un alelo nulo. Los marcadores AFLP son, por tanto, marcadores "dominantes" y los datos tienen naturaleza binaria.

El análisis de marcadores AFLP incluye un mayor número de etapas que el análisis de RAPD. Es necesario una mayor cantidad de reactivos, y un mayor número de equipamiento de biología molecular. El ADN necesario debe ser más puro, lo que demanda métodos de extracción más elaborados (Thomas *et al* 1995).

2.12 Relación entre la caracterización morfológica y molecular

La diversidad genética de un cultivo se puede estudiar por medio de las más avanzadas técnicas moleculares y también por los rasgos morfológicos. La diversidad molecular no considera las interacciones genotipo por medio ambiente; por lo tanto, estas dos técnicas se complementan una con otra (Taba 1991).

Los descriptores cualitativos son independientes del genotipo y del medio ambiente e incluyen caracteres morfológicos y agronómicos útiles como por ejemplo precocidad o resistencia a sequía, no todos ellos son convenientes para el estudio de la biodiversidad (Hamon *et al* 1995)

El problema es el grado de concordancia entre los marcadores moleculares y las características morfo-agronómicas que a pesar de que la zona ecológica es útil en el establecimiento de colecciones núcleo, no existe siempre una clara correlación entre la distancia geográfica y la distancia genética (Lefort-Busson y De Vienne 1985).

Gepts (1995) concluye que esta relación entre los marcadores moleculares y agro-morfológicos es posible siempre para poder identificar mostrando o no concordancia entre patrones de diversidad identificados por marcadores moleculares y rasgos morfológicos. Hillis (1987), aporta un argumento útil manifestando que los trabajos morfológicos en grandes colecciones y los marcadores moleculares en pequeñas muestras y estudios, si se combinan maximizan la información y su utilidad.

2.13 Análisis Estadístico

2.13.1 Taxonomía numérica

Según Sneath y Sokal (1973), la taxonomía numérica consiste en el agrupamiento de unidades taxonómicas por métodos numéricos sobre la base del estado de sus características. La posición fundamental de la taxonomía numérica señala que entre mayor sea el contenido de la información en la taxa de una clasificación y entre más caracteres sobre los cuales este basada, mejor será la clasificación. Cada carácter es de igual peso en la creación de una taxa natural

La técnica de conglomerados se ha empleado dentro de la taxonomía numérica de caracteres como un instrumento efectivo en la búsqueda científica de varias áreas del conocimiento. La utilización de algoritmos en el proceso de agrupamiento permite obtener tipos de agrupamientos más consistentes que procedimientos visuales convencionales (Sneath y Sokal 1973)

El análisis de conglomerados puede ser usado para revelar la estructura y relaciones de los datos, además, de que puede contribuir directamente al desarrollo de esquemas válidos de clasificación. Además, no hay lugar para saber si un agrupamiento es bueno o malo, debido a que los grupos no son interesantes en si mismos, sino que el punto de interés esta en las inferencias acerca de la estructura de los datos a través del agrupamiento (Anderberg 1973).

Se han establecido dos grandes grupos de agrupamiento: los jerárquicos y los no jerárquicos (Anderberg 1973). Los jerárquicos trabajan sobre la matriz de similaridad construida a partir de las medidas de asociación aplicada a los datos; el resultado final es un árbol o dendograma que identifica relaciones entre las entidades agrupadas. Los niveles jerárquicos se basan en escoger una partición inicial de las unidades de datos y luego alterar los miembros de cada grupo para obtener una mejor partición.

Crici y López (1983) mencionan que las técnicas numéricas constituyen el lenguaje matemático de la clasificación biológica; a igual que Anderberg (1973), concuerdan en que los procedimientos elementales de un análisis de agrupamiento son:

1) Elección de las unidades taxonómicas operativas (OTU):
2) Elección de los caracteres
3) Construcción de una matriz básica de datos
4) Obtención de un coeficiente de similitud para cada par posible de OTU
5) Construcción de una matriz de similitud.
6) Conformación de grupos mediante técnicas de análisis de agrupamiento (Estructura taxonómica)
7) Caracterización de los grupos mediante la prueba de homogeneidad de varianza o prueba de F o a través del análisis de frecuencia y sus pruebas estadísticas como Coeficiente de Contingencia, Chi cuadrado, Valor Cramer y el Coeficiente Phi.

Peeters y Martinelli (1989), señalan que con el incremento de las colecciones de germoplasma, los algoritmos multivariados tales como el análisis de agrupamiento jerárquico y sus variantes en métodos de ligamiento simple, ligamiento completo, método del centroide, así como el método de Ward, parecen particularmente útiles.

El método de Ward (1963), hace posible encontrar en cada estado, aquellos dos grupos cuya unión produzca el mínimo incremento en la suma total de cuadrados del error, dentro de grupos. Adicionalmente, el mínimo incremento en la suma de cuadrados del error, es proporcional al cuadrado de la distancia Euclidiana entre los centroides de los grupos unidos. Wishart (1969), demostró como el algoritmo de Ward podía ser implementado a través de la producción de una matriz del cuadrado de las distancias euclidianas entre centroides de grupos.

2.13.2 Valor discriminante de los caracteres

El valor discriminante o índice "D" de un descriptor cuantitativo es el número de diferencias significativas detectadas por la prueba de Duncan, expresadas como una fracción del número total de posibles comparaciones dentro de un grupo de clones. La comparación permitirá seleccionar los descriptores con mayor valor discriminante. El valor del índice "D" para caracteres cualitativos se basa en el número de pares de taxa que un cierto descriptor pueda separar y sobre la cantidad de información que este descriptor comparta con otros descriptores del mismo estudio. La comparación de valores de "D" entre un grupo de descriptores permitirá seleccionar aquellos con mayor valor discriminante. En general, la magnitud de "D" expresa la mayor o menor relación entre clones de un grupo con relación a un determinado carácter, entre mayor es la relación de los clones de un grupo, menor será el valor de "D" (Engels 1983)

La comparación de los valores "D" entre un conjunto de caracteres permite seleccionar aquellos que tienen el mayor valor discriminante y por ende, más eficientes para la identificación de clones, variedades y accesiones, dentro de poblaciones (Engels 1983).

Engels (1983), señala que cuando se tienen varios grupos de unidades taxonómicas o accesiones, los valores "D", calculados al comparar las accesiones en cada grupo, pueden unirse dando lugar a un nuevo valor, "Dw", al promediar los valores "D" y ponderarlos por el número de unidades existentes en cada grupo. El carácter con mayor "Dw" se identifica como el más discriminante para la separación de accesiones y los "Dw" restante deberán recalcularse mediante la sustracción de la información que comparten lo más discriminantes. Por eso es necesario utilizar una matriz de correlaciones entre los caracteres involucrados para conocer el grado de asociación y la información que comparten entre sí. La fórmula indica que $D'w = Dw\ (1-r^2)$ es el coeficiente de no determinación que expresa la proporción de la varianza de un carácter que no ha sido explicada por otro.

En la taxonomía de plantas es frecuente el uso de caracteres como la forma, el color, textura, dureza, etc. Este tipo de caracteres cualitativos tienen estados que son mútuamente excluyentes, es

decir, expresiones fenotípicas discontinuas de una característica. Las fórmulas de Pankhurtst (1978), citado por Engels (1983), permiten calcular el valor discriminante de accesiones dentro de grupos para los caracteres cualitativos sobre la base del número de accesiones que pueden separarse y el número total de pares. Engels (1983), implementó el ajuste de este valor "D" originando un nuevo valor "D", mediante $D' = D(1-r^2)$.

2.13.3 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:

a) Aquellos que tiene como propósito evaluar la variabilidad, clasificación, estructura y composición genética de las poblaciones.
b) Los desarrollados para la construcción de mapas cromosómicos o genómicos, cuando se utilizan marcadores genéticos moleculares, y
c) Los denominados QTL (Quantitative trait loci), los cuales son loci asociados con caracteres cuantitativos de importancia agronómica, como el rendimiento, y que provee al fitomejorador de una herramienta molecular ágil, precisa y oportuna de selección indirecta por los caracteres cuantitativos de interés envueltos en el programa de fitomejoramiento.

Para la presente investigación se ocuparan los primeros, cuyo uso se enfatiza en poblaciones que convencionalmente se reconocen como recursos genéticos naturales. Los métodos estadísticos más utilizados formalmente son distancias genéticas, índices de similitud, dendogramas y coordenadas principales (Martínez 1995).

Los cálculos de distancia genética utilizan los índices de Simple Apareamiento o Índice de Afinidad y el Índice de Jaccard. Ambos métodos se utilizan para medir variables binarias, conformadas por dos eventos como en el caso de presencia (1) – ausencia (0).

En el esquema siguiente se presenta las combinaciones posibles que se pueden obtener al evaluar dos individuos:

Individuo B

		1	0	Total
Individuo A	**1**	**a**	**b**	**a + b**
	0	**c**	**d**	**c + d**
	Total	**a + c**	**b + d**	**n**

Donde n = a + b + c + d.

Para el cálculo de la distancia genética entre dos individuos, el índice de Jaccard y el índice de Nei no consideran la condición d, es decir la doble ausencia de las variables (0-0) en los dos individuos.

$$\textbf{Índice de Jaccard} = \frac{a}{a + b + c}$$

$$\textbf{Índice de Nei} = \frac{2a}{2a + b + c}$$

(Fuente. Anderberg, 1973)

2.14 Comparación de matrices moleculares y morfológicas

El programa realiza una prueba no paramétrica de comparación de las dos matrices, la cual permite determinar si existe correlación entre las dos matrices. , Por ejemplo entre las distancias genéticas y las distancias morfológicas, donde el valor de un programa de asociación "Z", (Coeficiente de Mantel), entre las dos matrices (X y Y), es calculado a partir de las bases reales comparándolos a la serie de valores obtenidos por permutaciones aleatorios de las poblaciones dentro de una de las dos matrices de distancia donde:

$Z = S_i S_{jxij} * Y_{ij}$,

Donde:

i = Número de líneas y

j = Número de columnas

El estadístico Mantel no provee un análisis paramétrico de la Ho: El valor de un elemento de X no es relativo al valor del correspondiente elemento de Y. Sin embargo, la distribución de Z particularmente para X y Y puede ser derivada calculando Z para cada posible permutación de las

matrices y entonces las Z observados pueden ser determinados Hubert (1983), es decir, Z fue estimado de una muestra al azar de todas las posibles permutaciones de las matrices generadas.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Localización del Estudio

El estudio morfológico se realizó en la colección de germoplasma de Cacao de la Estación Experimental Tropical Pichilingue (EETP), del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) de Ecuador, ubicada en el Km. 5 ½ vía Quevedo, El Empalme, Cantón Quevedo, Provincia de los Ríos, con una altitud de 120 msnm y sus coordenadas geográficas son 79 ^{0} 21' de Longitud Oeste y 1 ^{0} 06' de Latitud Sur, con una temperatura promedio de 27 ^{0} C y una precipitación promedio de 2200 mm anuales, distribuidos en los primeros seis meses del año.

La caracterización molecular de los genotipos de cacao se realizó en el laboratorio de Biología Molecular del CATIE, Turrialba, Costa Rica.

3.2 Material Experimental

Para la caracterización molecular y fenológica se utilizaron 40 clones elites de cacao Nacional de la colección de germoplasma de la EETP (Cuadro 1), Dentro de estos materiales se incluye clones nacionales con resistencia a escoba de bruja (EB), producto de la prospección, selección y recolección en el ámbito de finca de productores de cacao en todas las regiones cacaoteras de Ecuador donde aún se encuentra árboles de cacao con ascendencia de tipo Nacional. Esta colecta fue realizada por el INIAP con el apoyo de LATINRECO (Nestle-Ecuador) y del Programa Nacional del Cacao (PNCC) del Ministerio de Agricultura y Ganadería. Los productores identificaron árboles sobresalientes de edad avanzada (80 –100 años), productivos y sin escoba de bruja, cuya resistencia de campo fue evaluada posteriormente mediante inoculaciones artificiales y seguimiento durante dos años. Producto de esta misión se introdujeron a la EETP los mejores clones que presentaron altos niveles de resistencia (Quiroz *et al.* 2001).

Por otra parte los clones del Centro de Cacao de Aroma Tenguel (CCAT), utilizados en el estudio son materiales seleccionados a partir de la evaluación de 500 árboles de esta colección, que fueron evaluados por su resistencia a escoba de bruja (*Crinipellis perniciosa*), monilla (*Moniliophthora roreri*) y mal de machete (*Ceratocysti fimbriata*) y producción (Quiroz 1997).

Además, se incluyeron en el estudio dos clones uno de origen venezolano y otro tipo criollo; así como 18 clones representativos de la región amazónica Ecuatoriana (Chalmers 1970, 1972), Colombiana (Baker *et al.* 1954) y Peruana (Pound 1938) que se encuentran ubicados en áreas del

posible origen del cacao Nacional. Además, se incluyó un genotipo representativo de los tres grupos genéticos de cacao Criollo, Trinitario y Forastero que actuaron como testigos de referencia.

Cuadro 1. Clones de cacao Nacional y de referencia de los grupos genéticos, presentes en la región Amazónica que se utilizaron para la caracterización morfológica y molecular.

Número	Nombre Clon	Código	Genotipo	Procedencia
J-1	EET-511*	EB - 0501	Nacional	Guayas
J-2	EET-513	EB - 1011	Nacional	Guayas
J-3	EET-514	EB - 1013	Nacional	Guayas
J-4	EET-516	EB - 1203	Nacional	Los Ríos
J-5	EET-517	EB - 1516	Nacional	Los Ríos
J-6	EET-519	EB - 1915	Nacional	Los Ríos
J-7	EET-520	CCAT - 1916	Nacional	Guayas
J-8	EET-521*	EB - 1922	Nacional	Guayas
J-9	EET-522*	CCAT - 1928	Nacional	Guayas
J-10	EET-525	EB - 2003	Nacional	Los Ríos
J-11	EET-527*	EB - 2009	Nacional	Los Ríos
J-12	EET-529*	EB - 2102	Nacional	Guayas
J-13	EET-533	EB - 2222	Nacional	Manabí
J-14	EET-534*	EB - 2225	Nacional	Manabí
J-15	EET-537	EB - 2236	Nacional	Los Ríos
J-16	EET-538	EB - 2237	Nacional	Los Ríos
J-17	EET-544	CCAT - 1119	Nacional	Guayas
J-18	EET-545	CCAT - 1201	Nacional	Guayas
J-19	EET-547	CCAT - 1858	Nacional	Guayas
J-20	EET-548*	CCAT - 1930	Nacional	Guayas
J-21	EET-552	CCAT - 2240	Nacional	Guayas
J-22	EET-558	CCAT - 2564	Nacional	Guayas
J-23	EET-559	CCAT - 2664	Nacional	Guayas
J-24	EET-560	CCAT – 3050	Nacional	Guayas
J-25	EET-561	CCAT - 3061	Nacional	Guayas
J-26	EET-562*	CCAT - 3260	Nacional	Guayas

Continua cuadro 1....

Número	Nombre Clon	Código	Genotipo	Procedencia
J-27	EET-566	CCAT - 4260	Nacional	Guayas
J-28	EET-567	CCAT - 4265	Nacional	Guayas
J-29	EET-571	CCAT - 4583	Nacional	Guayas
J-30	EET-572	CCAT - 4584	Nacional	Guayas
J-31	EET-574	CCAT - 4668	Nacional	Guayas
J-32	EET-575	CCAT - 4675	Nacional	Guayas
J-33	EET-576	CCAT - 4688	Nacional	Guayas
J-34	EET-577	CCAT - 4998	Nacional	Guayas
J-35	EET-578	CCAT - 5064	Nacional	Guayas
J-36	EET-581 (2)	CCAT - 5206	Nacional	Guayas
J-37	EET- 563*	CCAT - 3345	Nacional	Guayas
J-38	EET- 536*	EB - 2233	Nacional	Manabí
J-39	EET-547*	CCAT 18 - 58	Nacional	Guayas
J-40	EET- 503	BCH - 9	Nacional	Guayas
J-41	BOBONAZA-3		Amazónico	Pastaza
J-42	BOBONAZA- 8.		Amazónico	Pastaza
J-43	COCA 3335		Amazónico	Orellana
J-44	COCA 3338		Amazónico	Orellana
J-45	CURARAY - 15		Amazónico	Pastaza
J-46	EBC - 138 (1)		Amazónico	Caquetá
J-47	EBC - 148		Amazónico	Caquetá
J-48	EET – 117	Tenguel - 7	Venz Ama	Guayas
J-49	ESCOBAR	-------	---------	Esmeraldas
J-50	IMC-67	EET - 116	For Amaz	Perú
J-51	NAPO 30		Amazónico	Napo
J-52	NAPO 41*		Amazónico	Napo
J-53	SAN MIGUEL 9		Amazónico	Sucumbios
J-54	SCAVINA - 6	EET - 11	For Amaz	Peru
J-55	SCAVINA - 12	EET - 110	For Amaz	Peru
J-56	TAPICHE – 1		Amazónico	Ecuador
J-57	TAPICHE - 3		Amazónico	Ecuador

Continua cuadro 1.....

Número	Nombre Clon	Código	Genotipo	Procedencia
J-58	TAPICHE - 11		Amazónico	Ecuador
J-59	TIPUTINE – 1		Amazónico	Ecuador
J-60	TIPUTINE - 4		Amazónico	Ecuador
J-61	UF - 676		Trinitario	CATIE
J-62	CRIOLLO – 36		Criollo	CATIE
J-63	CC – 267	Matina	For. Amaz	CATIE

Simbología.

Venz Amar	=	Venezolano Amarillo
For Amaz.	=	Forastero Amazónico
Amaz	=	Amazónico
UF	=	Unite Fruit
CC	=	Centro de Cacao
*	=	Caracterización Molecular únicamente

3.2.1 Recolección de Material Vegetal

Se recolectaron hojas maduras de clones de cacao de origen Nacional procedentes de la colección de cacao Nacional resistentes a Escoba de Bruja (EB), de la colección del Centro de Cacao de Aroma Tenguel (CCAT), y clones de las recolecciones realizadas por Chalmers (1970 – 1972), y Allen (1983) representativos de las zonas de posible origen del cacao Nacional (Quiroz 1983).

Las hojas de los clones de cacao representativos de los grupos genéticos de cacao (Criollo, Forastero y Trinitario), se colectaron en la colección de germoplasma de la Unidad de Recursos Fitogenéticos del CATIE en Turrialba, Costa Rica.

Las hojas cosechadas en Ecuador se secaron en una estufa a 50 ^{0}C por 48 horas y se empacaron en bolsas de polietileno para su traslado al Laboratorio de Biología Molecular del CATIE.

3.2.2 Extracción de ADN.

Para la extracción de ADN se utilizó el método de extracción MATAB, (Sorbitol-Matab), modificado por Agwanda y Lashermes (1997). Discos de hoja madura de un centímetro de diámetro se maceraron con un pistilo en un mortero utilizando el tampón de extracción sorbitol bisulfito de sodio frío, luego se centrifugaron e incubaron en baño de maría, hasta completar el proceso de extracción de ADN. Se utilizó una centrífuga BECKMAN J2-HS, con un rotor tipo: JA–14 137 (Anexo 1)

3.2.3 Cuantificación del ADN

La cuantificación del ADN se realizó a través de electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % (Anexo 4), se utilizó el Marcador Fago Lambda / Hind III (PROMEGA) de "100 pb. LADDER", y dos ADN's de café (*Coffea arabica*), de referencia a una concentración de 100 ng/ ul.

Para cuantificar el ADN se tomó 3 ul de la solución de ADN más 7 ul de agua grado AFLP y 5 ul de azul bromofenol al 50%. Las muestras se colocaron en el gel de agarosa en una cámara de electroforesis (200 ml), y se dejo migrar por espacio de 40 minutos a 70 wats.

La concentración de ADN de las muestras de cacao se determinó por la intensidad de la banda después de la coloración con el bromuro de etidio, visualizada en una lámpara de luz ultravioleta. Se estimó la concentración de ADN comparando la banda de cada muestra respecto a la escalera y los ADN's de referencia.

Una vez obtenido el ADN se procedió a aplicar el protocolo de caracterización molecular con marcadores AFLP elaborado y descritos por Vos (1995), modificado por Risterucci *et al.* (2000) y optimizando la cantidad de reactivos a ser utilizados en las reacciones (Anexo 2).

3.2.4 Selección de la combinación de "Primers"

Para determinar las combinaciones de "primers" para la técnica de marcadores AFLP utilizados para la caracterización molecular de genotipos de cacao tipo Nacional, se tomó como base los resultados obtenidos por Motamayor (2001) y Risterucci *et al.* (2000). Estas combinaciones fueron las que presentaron el mayor grado de polimorfismo (Cuadro 2).

Cuadro 2. Combinación de "primers", número de fragmentos detectables y porcentaje de polimorfismo de las siete combinaciones de "primers" para marcadores AFLP utilizados en la caracterización molecular.

Combinaciones enzimas "primers"	Marcadores Polimorficos		Fragmentos detectables	% Marcadores Polimorficos
	Motamayor	Risterucci		
EAAG / MCAA	19	17	66	25.7
EACG / MCTT	9	6	53	11.3
EAAG / MCTC	17	21	85	24.7
EACT / MCTT	13	11	61	18.0
EACA / MCTT	20	9	77	11.7
EAAG / MCTT	19	8	71	11.2
EAAG / MCTA	11	21	85	24.7

3.2.5 Amplificación de marcadores AFLP

Se utilizó la metodología AFLP que combina la especificidad, resolución y poder de muestreo de la digestión del ADN con enzimas de restricción utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), utilizada para la caracterización genética del Cacao Nacional y de otros orígenes de la colección de Ecuador. Para el revelado de los marcadores moleculares se utilizo tinción con nitrato de plata ($AgNO_3$) al 1 %. (Bassam *et al.* 1991).

Las reacciones de PCR del ADN para el estudio de la colección de cacao tipo nacional se realizó en un Termociclador Amplifier Biosistem, Perkin Elmers, Modelo: GENE-AMP PCR-Systems – 9700. El protocolo de AFLP para la amplificación de ADN incluye los siguientes procedimientos:

3.2.5.1 Digestión del ADN.- Se utilizó enzimas de restricción que son las que cortan el ADN utilizándose enzimas de corte poco frecuente o raro que reconocen de 6 a 8 pares de bases (*EcoRI*), y las de corte frecuente que reconoce 4 pb (*MseI*). Producto de la reacción se genera tres tipos de fragmentos, grandes, pequeños y medianos producto de la combinación de las dos enzimas. Se preparó la mezcla de digestión utilizando 5 ul de Buffer 5X de reacción, 2 ul de las enzimas *EcoRI* / *MseI* a una concentración de 10 U/ul y 5 U/ul respectivamente y 13 ul de agua grado AFLP, dando un volumen total de 20 ul por muestra; a la cual posteriormente se le agregó 5 ul de ADN a una concentración de 50

ng/ul. Se realizó la digestión por 2 horas a 37 ^{0} C, 15 minutos a 70 ^{0} C y luego las muestras fueron enfriadas hasta alcanzar los 4 ^{0} C.

3.2.5.2 Ligación.- Consistió en incorporar adaptadores específicos que poseen de 20 a 30 pb, cuyas secuencias son diferentes para cada uno, se preparó la mezcla de ligación con 24 ul de adaptador de ligación más 1 ul de T4 DNA ligasa, obteniéndose un volumen de 25 ul, a la cual se le adicionó 25 ul de ADN digerido y se realizó la reacción por 3 horas a 37 ^{0} C y 10 minutos a 60 ^{0} C luego se enfriaron las muestras hasta alcanzar 4 ^{0} C.

3.2.5.3 Preamplificación.- Consistió en la selección de los fragmentos que fueron amplificados utilizando primers de secuencias arbitrarias que poseen de 1 a 3 nucleótidos complementarios en su extremo 3´. Para esto se diluyó la muestra de ADN producto de la ligación en una proporción de 1 a 10 en agua grado AFLP, posteriormente se preparo la mezcla de preamplificación utilizando los volúmenes recomendados por Risterucci (2000), para cacao y modificados por Vos (1995), en cantidades reducidas 4 y 5 veces.

La mezcla de reacción utilizada consistió de 10 ul de la mezcla de indicadores "Preamplificación", 1.25 ul de Tampón PCR 10X para AFLP, y 0.05 ul de Taq ADN polymerasa a una concentración de 1 U / ul, dando un volumen total de 11.30 ul por muestra. A esta solución se le agrego 1.25 ul del ADN (dilución 1/10) y se realizó la reacción de PCR que consistió de 20 ciclos cada uno de: 30 segundos a 94 ^{0} C, 1 minuto a 56 ^{0} C y 1 minuto a 72 ^{0} C.

3.2.5.4 Amplificación.- Antes del proceso de amplificación se verificó el producto de la Preamplificación en un gel de agarosa al 1 %, tomándose 4 ul del producto resultante de esta y 10 ul de colorante azul bromofenol.

Después de haberse realizado la confirmación se diluye 1 en 10 el producto de la reacción de preamplificación, utilizando para la mezcla 3,41 ul/muestra de agua grado AFLP; 0,09 ul de primer *EcoRI* (27,8 ng/ul); 2.25 ul de primer *MseI* (6,6 ng/ul); 1,0 ul de Tampón PCR 10X para AFLP y 0.05 ul de DNA Taq polimeraza (5 U/ul).

El programa utilizado para la reacción de PCR consistió de un ciclo inicial de 2 minutos, 30 segundos para desnaturalizar la cadena de ADN a 94^{0}C (apertura de la cadena ADN), seguido de 30 segundos a 65^{0} C con un gradiente de – 0,7 ^{0}C (unión Primers ADN), y 60 segundos de acoplamiento del primer ciclo de extensión de la cadena de ADN a 72 ^{0}C (Anexo 2), seguido de 12 ciclos idénticos

por espacio de 2 minutos cada uno y finalmente de los ciclos 14 al 36, 94^0C por 30 segundos, 56^0 C por 30 segundos y 72^0C por 30 segundos.

3.2.5.5 Desnaturalización.- Antes de introducir las muestras al gel de Poliacrilamida (Anexo 8), se debe realizar una desnaturalización de las muestras calentándolas a 72 ^{0} C por 10 minutos.

3.2.5.6 Preparación del gel de Poliacrilamida.- Se preparó un gel de acrilamida con una solución de Urea 41,6 gr. Acrylamide/bis – Acrylamide (40 %) 12,5 ml, Agua desionizada y destilada 29,1 ml y TBE 10X 8.3 ml, la misma que se coloca en un frasco ámbar. Posteriormente se deben lavar los vidrios el grande que lleva en su haber 2 ml de Sigmascote (repulsivo) y el vidrio pequeño una solución atractiva constituida de 1 ml de Etanol al 95 %, más 3 ul de Bind Silane y 5 ul de ácido acético.

Los vidrios son sujetados posteriormente con un soporte o empaque de hule y prensas metálicas a más de una cinta adhesiva antes de colocar la solución de persulfato de amonio al 10 % (Anexo 8). Y colocar un peine como separador, que va ha dar lugar a la formación de los posos donde se ubicará las muestras, dejándolo secar por espacio de una hora antes de colocarlo en la cámara de electroforesis.

3.2.5.7 Montaje de las muestras.- Estas son colocadas en el gel posterior a la colocación de los vidrios en la cámara de electroforesis donde se agrega previamente Buffer TBE 1X y extraer el separador (peine), y apagar la fuente de poder que se mantiene a 70 Watts para el calentamiento previo de los vidrios.

Las muestras son retiradas del termociclador cuando están a 72 ^{0} C y se colocan de 7 a 8 ul de cada reacción en cada poso he inmediatamente se ajusta la fuente de poder a 50 Watts y se deja migrar aproximadamente 1:45 a 2:00 horas.

3.2.5.8 Revelado del gel de Poliacrilamida.- El revelado se realizó mediante la fijación en un litro de ácido acético al 10% donde se coloca el vidrio pequeño y se agita por espacio de 20 minutos a 95 rpm, una vez concluida esta fase se pone el gel en un recipiente conteniendo una solución de nitrato de plata al 1% y agitarlo a 85 rpm por una hora.

Se lava el gel rápidamente con agua deshionizada y se revela este en presencia de carbonato de sodio, 30gr por litro, agregándole a los dos litros de carbonato de sodio 400 ul de tiosulfato de sodio al 1,5 % y 3 ml de formaldehído al 37 %. Se agita suavemente las cubetas hasta que se empieza a notar las bandas y luego se transfiere a la segunda cubeta para terminar la coloración, luego se adiciona el ácido acético al 10 % para fijar la coloración de las bandas y detener la reacción (Anexo 8).

3.3 Caracterización Morfológica.

Para la caracterización morfológica se utilizó la información parcial disponible de cacao Nacional recolectada por Zambrano (2000), la cual fue completada en el periodo de enero a junio del 2002 con el apoyo del Ing. Geover Peña, se utilizó la metodología y el tamaño de muestra para el registro de la información de características de flores, frutos, semillas y hojas recomendadas por Engels (1981), Soria y Enríquez (1981) y el IBPGR (1981), para caracterizar clones y árboles de cacao.

Los descriptores cualitativos y cuantitativos utilizados para caracterizar clones de cacao tipo Nacional de Ecuador y de otros orígenes se describen a continuación:

3.3.1 Características de la Flor.

Se tomó el tamaño de muestra de 20 flores recién abiertas, sin síntomas de enfermedades y luego con la ayuda de una placa milimétrica, un estereoscopio y pinzas de disección se registraron las siguientes características:

A) Características Cualitativas:

- Color del pedúnculo **(CP)**
- Pigmentación del sépalo **(PS)**
- Filamento estaminal **(FE)**

Considerándose la siguiente escala arbitraria Pigmentado (P), Medianamente Pigmentado (MP), y No pigmentado (NP).

B) Características Cuantitativas:

- Largo del sépalo en mm **(LS)**.- Distancia desde el punto de unión de este con el receptáculo hasta su ápice. n = 10
- Ancho del sépalo en mm **(AS)**.- Distancia entre los bordes laterales en la parte más ancha. n = 20
- Largo de la lígula en mm, (Pétalo) **(LL)**.- A partir del punto de inserción del ribete de la cogulla hasta el ápice. n = 15
- Ancho de la lígula en mm, **(AL)**.- Se mide en la parte más ancha de esta. n = 15
- Largo del estaminoide en mm, **(LE)**.- Distancia desde la altura de encuentro con la columna estaminal hasta el ápice. n = 6
- Largo del estilo en mm, **(LE)**.- Distancia entre el ápice y el punto de inserción con el ovario. n = 10

- Largo del ovario en mm, **(LO)**.- Desde el punto de soldadura con el receptáculo hasta el punto de inserción. n = 10
- Ancho del ovario en mm, **(AO)**.- Distancia entre los bordes sobresalientes del ovario. n = 10
- Número de óvulos por ovario **(NO)**.- Se procedió a hervir los óvulos en un vaso de precipitación por espacio de 30 minutos, luego con la ayuda de un estereoscopio y una aguja de disección se contaron los óvulos locus por locus y finalmente se sumaron. n = 5.

Para definir la forma del sépalo y la ligula de los clones en estudio se calculó la relación largo/ ancho.

3.3.2 Características del Fruto

De cada clon en evaluación se colectaron al azar 20 mazorcas fisiológicamente maduras sin síntomas de enfermedad, utilizando un calibrador o "vernier" graduado en centímetros, y para los pesos una balanza de precisión.

- Largo del fruto en cm, **(LF)**.- Distancia desde la base en la unión del pedúnculo hasta el ápice. n = 20.
- Ancho del fruto en cm, **(AF)**.- Se mide en la parte más ancha de la mazorca. n = 20.
- Peso del fruto en gr. **(PF)**.- Peso total de la mazorca n = 20
- Peso de cáscara en gr. **(PC)**.- Una vez separado las semillas se pesó el fruto. n = 20.
- Espesor de cáscara en el lomo en cm, **(EL)**.- Se considera para la medida la parte más gruesa. n = 20
- Espesor del surco en cm, **(ES)**.- Se mide la parte intermedia entre dos lomos. n = 20.
- Número de semillas por fruto **(NSF)**.- Se consideran solo semillas con desarrollo normal. n = 20.

Para definir la forma de la mazorca se consideró la relación largo /ancho del fruto

3.3.3 Características de la Semilla

A) Características cuantitativas.

De 20 frutos tomados al azar se utilizaron cinco semillas frescas por fruto para evaluar, con la ayuda de un calibrador, pinzas y balanza lo siguiente:

- Peso de semilla húmeda con pulpa y testa en gr. **(PSHPT)**.- Se pesaron cinco semillas por fruto en una balanza

- Peso de la semilla húmeda sin pulpa y testa en gr. (**PSHSPT**).- Las mismas cinco semillas se les retiró la pulpa y la testa y se pesaron.
- Peso de la pulpa y testa en gr. (**PPT**).- Valor obtenido de la diferencia entre el peso de la semilla húmeda con pulpa y testa y sin pulpa y testa.
- Largo de semilla en cm. (**LS**).
- Ancho de semilla en cm (**AS**).- Se consideró la parte más ancha de la semilla.
- Espesor de la semilla en cm. (**ES**)
- Peso de la semilla seca en gr. (**PSS**).- Se depositaron las cinco semillas en cajas petri debidamente identificadas y se seco en la estufa a 60 ^{0} C por 24 horas y posteriormente se tomó el peso.

B) Característica Cualitativa

- Color de semilla (**CS**).- Se evaluó con la siguiente escala: Rojo Oscuro (**RO**), Rojo Claro (**RC**) y Blanca (**B**).

Para definir la forma de la semilla se consideró la relación Largo/Ancho de esta.

3.3.4 Características de la Hoja

Para el registro de las características de la hoja se tomaron 30 hojas de ramas plagiotrópicas maduras de la segunda o tercera posición a partir del ápice, donde con la ayuda de una regla y transportador se tomaron los siguientes datos:

- Largo de la hoja en cm, (**LH**).- Distancia desde el punto de inserción del pecíolo en la base del limbo hasta el ápice.
- Ancho de la hoja en cm, (**AH**).- Considerando tangentes trazadas en ambos bordes laterales, paralelo a la línea del largo.
- Relación largo / ancho (**L/A**).- Se obtuvo dividiendo el largo por el ancho de las hojas.
- Largo desde la base hasta el punto más ancho del limbo (**LBA**).- Distancia entre la base y la parte más ancha de la hoja.
- Forma de la hoja.- Tomando en cuenta la relación **LH / LBA** se clasificó la forma de esta de acuerdo a lo siguiente:

L / LBA < 2 = Ovalada

L / LBA > 2 = Elíptica

L / LBA = 2 = Oblonga

- Angulo basal **(AB)**.- Se expresó en grados, refiriéndose al ángulo formado por las tangentes trazadas en los bordes del limbo y el punto de inserción del pecíolo, clasificándolos según su mayor o menor abertura:

Angulo $< 90^0$ = Agudo

Angulo $> 90^0$ = Obtuso.

Angulo apical **(AA)**.- Abertura del ángulo formado por las tangentes trazadas desde el ápice del limbo con los bordes, clasificándolo como:

Angulo $< 90^0$ = Agudo

Angulo $> 90^0$ = Obtuso.

3.4 Análisis Estadístico

3.4.1 Evaluación de datos moleculares

El análisis estadístico de los datos moleculares se generó a partir de la evaluación de la amplificación de las muestras de ADN de los genotipos de cacao en estudio.

3.4.1.1 Diseño Experimental.

Para la caracterización molecular de 63 clones de cacao no se utilizó diseño experimental, a partir de cada experimento se generaron datos que consisten en la presencia (1) de marcadores moleculares y ausencia de marcadores moleculares (0), lo que permite generar una matriz de datos binarios (Figura 1) para posteriormente realizar el estudio de diversidad genética de la población en estudio.

3.4.1.2 Esquema de análisis Estadístico

Los análisis estadísticos de los datos se realizaron, con el programa MVSP (Multi Variate Statistical Package) (Kovach 1999). Se determinó el coeficiente de similitud a partir del coeficiente de Nei & Li's, (Nei 1979), utilizando la siguiente formula:

$$NLC_{ij} = 2a / (a + b) + (a + c)$$

Donde:

NLC_{ij} = Coeficiente de similitud entre dos accesiones i y j.

a = El número de bandas presentes en ambas accesiones i y j.

b = El número de bandas presentes en i y ausentes en j.

c = El número de bandas presentes en j y ausente en i.

A su vez se generó la matriz de distancia genética, donde la distancia genética es una función decreciente del coeficiente de similaridad por la formula:

$$D_1 = 1 - S$$

Donde:

D_1 = Distancia genética.

S = Coeficiente de similaridad.

Producto de la matriz de distancia genética se agruparon los clones de cacao en una estructura bidimensional llamada dendograma, la cual permite hacer inferencias estadísticas de semejanzas o diferencias entre los individuos analizados Martínez (1995).

El dendograma se construyó usando el coeficiente de Nei & Li's (1979) contenido en el programa MVSP considerándose a cada clon como un grupo, para luego agruparlos en grupos que mantienen características similares entre materiales.

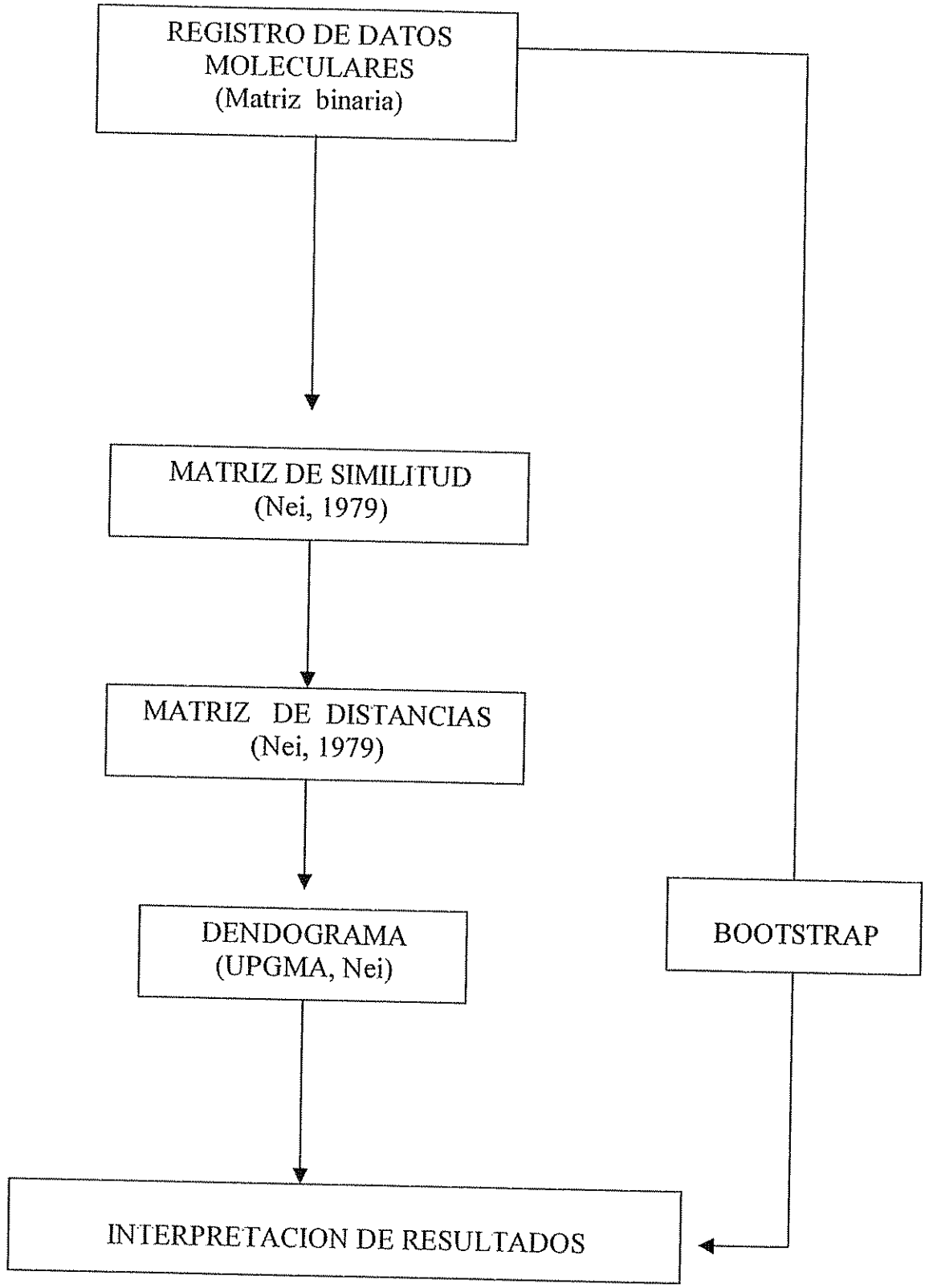

Figura 1. Diagrama de análisis de los datos moleculares generados a partir de la información generada con la técnica de AFLP en clones de cacao tipo Nacional y de otros orígenes de Ecuador.

3.4.2 Evaluación de datos morfológicos

El análisis estadístico de los datos de las características morfológicas se realizó a partir de los datos colectados por Zambrano (2000) y completados por Geover Peña (2002), de 51 clones de cacao de la EET- Pichilingue.

Debido a que los 12 clones no produjeron flores ni frutos durante el periodo del estudio, no fue posible completar la información para el análisis de los datos respecto a la población caracterizada por marcadores moleculares; la secuencia de análisis de la información se presenta en la Figura 2.

3.4.2.1 Análisis de componentes principales

Los datos morfológicos de los 51 clones de cacao fueron analizados con el programa SAS versión 6.12 (SAS Institute Inc. Cary, NC, USA 1999), con un análisis de componentes principales, para estandarizar los datos y definir el número de grupos más recomendables para agrupar los clones.

3.4.2.2 Análisis de Cluster

A partir del análisis de componentes principales generados con las variables morfológicas y con la ayuda del coeficiente de similaridad general de Gower (Kovach 1999), se agruparon los clones en una estructura jerárquica bidimensional para construir el dendograma entre los clones estudiados, utilizando el método de Ward (1963). Contenido en el programa computacional SAS Versión 6.12 (SAS Institute Inc), Cary, NC, USA 1999, el cual permite hacer inferencias estadísticas de semejanzas o diferencias entre los individuos.

Formula de Gower

$$GGSc_{ij} = \frac{\sum_{k=1}^{n} \left(W_{ijk} S_{ijk} \right)}{\sum_{k=1}^{n} W_{ijk}}$$

Donde $S_{ijk} = 1 - \frac{|X_{ik} - X_{ik}|}{rango(K)}$ Para datos cuantitativos.

W_{ijk} = 1 Para aciertos de datos binarios o multivariados
= 0 Para los diferentes
= 0 Para aciertos negativos de datos binarios
= 1 En todas las otras situaciones.

3.4.2.3 Análisis discriminante Canónico

A través del análisis multivariado y de aproximaciones de F, con el procedimiento CANDISC, del programa SAS, se determino cuales de las variables cualitativas y cuantitativas son las más discriminantes y contribuyen a explicar la diversidad presente en los clones de cacao estudiados.

3.4.2.4 Análisis de Varianza (ANDEVA)

Utilizando las variables dependientes originales se realizó un análisis de varianza con el procedimiento GLM de SAS para determinar si existen diferencias significativas entre las características morfológicas cuantitativas y cualitativas evaluadas en los clones de cacao, además se estimo el coeficiente de variación de estas características.

Además, se realizó una prueba de medias de Duncan para cada una de las características estudiadas y determinar cuales son las variables que más aportan para discriminar entre los clones de cacao estudiados.

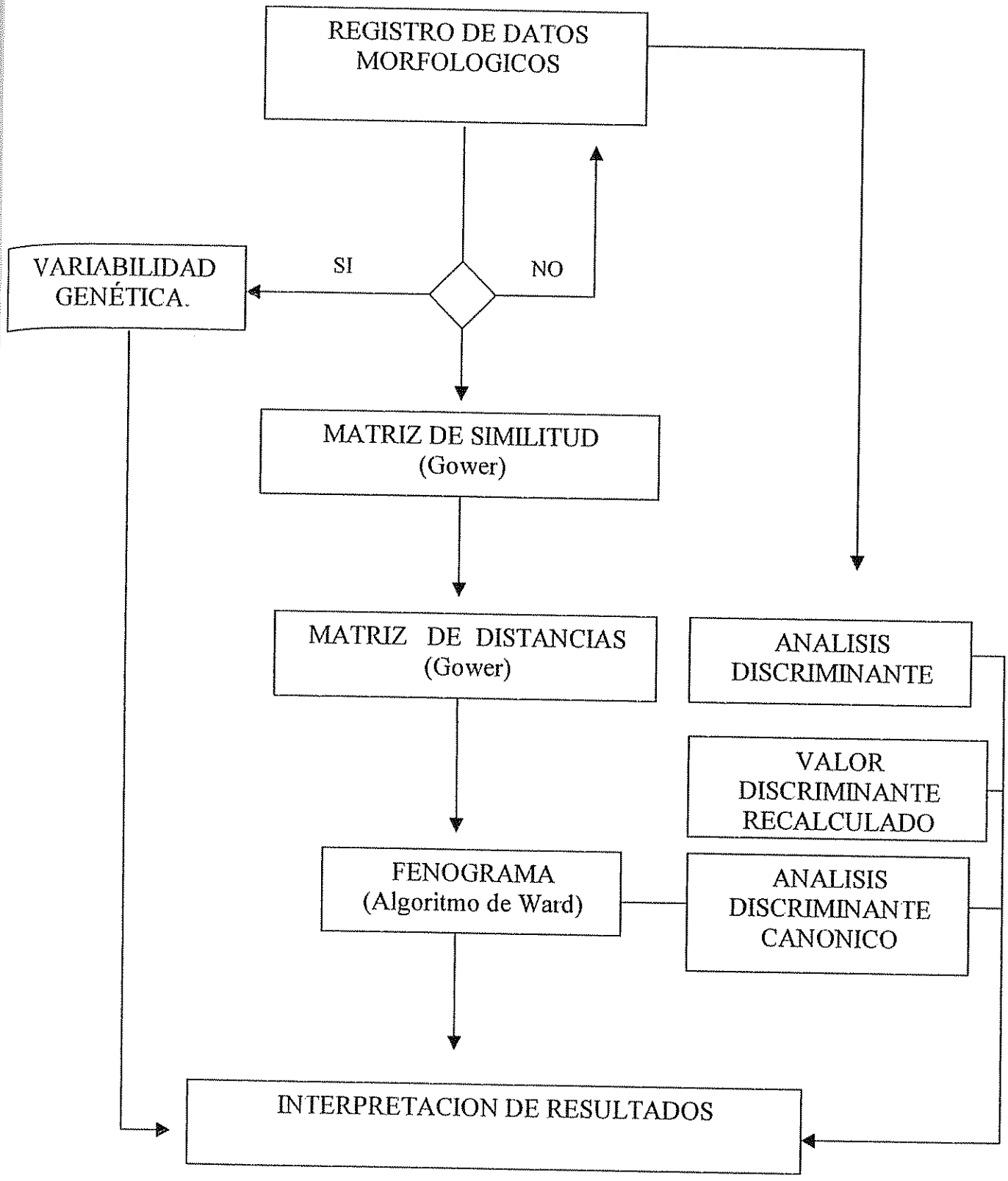

Figura.2 Diagrama de análisis estadísticos de los datos morfológicos de clones de cacao tipo Nacional y de otros orígenes de la colección de Ecuador.

3.5 Relación entre las matrices de datos morfológicos y moleculares

Para el estudio de la relación de los datos morfológicos y genéticos (Mantel 1967), se utilizaron las matrices de distancias moleculares "X" de Nei & Li, (1979), y las morfológicas "Y" de (D Gower), y se correlacionaron entre ellas con el estadístico Mantel (Figura 3).

El programa realiza una prueba no paramétrica de comparación de dos matrices, la cual permite determinar si existe correlación entre las dos matrices. Por ejemplo, entre las distancias genéticas y las distancias morfológicas, donde el valor de un programa de asociación "Z" (Coeficiente de Mantel), entre las dos matrices (X y Y), es calculada a partir de las bases reales comparándolas a la serie de valores obtenidos por permutaciones aleatorias de las poblaciones dentro de una de las matrices de distancia donde:

$Z = SiSjxij*Yij$

Donde:

i = Número de líneas

j = Número de columnas

El estadístico Mantel no provee un análisis paramétrico de la Ho: el valor de un elemento de X no es relativo al valor del correspondiente elemento de Y. Sin embargo, la distribución de Z particularmente para la X y Y puede se derivada calculando Z para cada posible permutación de las matrices y entonces la Z observadas pueden ser determinadas (Hubert 1983), es decir, Z fue estimada de una muestra al azar de todas las posibles permutaciones de las matrices generadas.

Se debe considerar que el número máximo teórico de permutaciones N (N= Número de permutaciones), no deberán ser mayor que 5000, para este caso se realizó sobre la base de 1000 permutaciones.

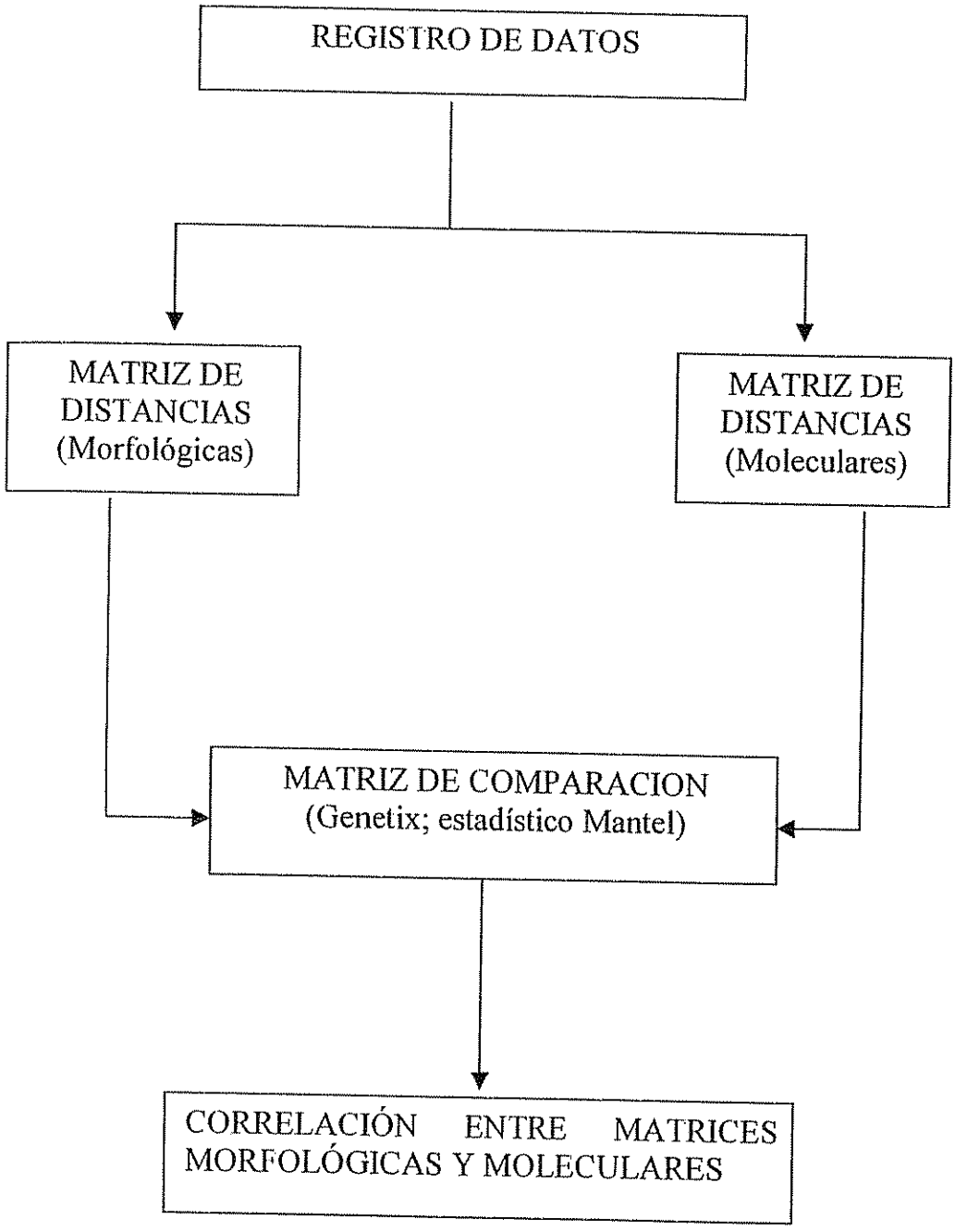

Figura 3. Diagrama de análisis de la relación entre los datos morfológicos y moleculares de clones de cacao tipo Nacional y de otros orígenes de la colección de Ecuador.

IV RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 Caracterización molecular con marcadores AFLP

Un prerrequisito para una evaluación de la variación genómica es la efectiva extracción del ADN, sin embargo algunas opciones que han sido probadas han resultado inapropiadas para cacao debido a los altos niveles de polisacáridos y compuestos fenólicos que tienen los tejidos de este cultivo (Couch y Fritz 1990). Unido a esto hay que considerar que algunos protocolos desarrollados específicamente para cacao son complejos y requieren pasos extensos de centrifugación y frecuentemente el uso de gradientes de Cloruro de cesio (Figueira *et al.* 1992; Laurent *et al.* 1993; Lanaud *et al* 1995 y Ronning *et al.* 1995)

4.1.1 Aislamiento y determinación de la concentración de ADN.

El método de aislamiento de ADN, MATAB (Sorbitol-Matab), utilizado en este estudio, permitió obtener altos rendimiento de forma rápida y sencilla con muestras pequeñas de tejidos (discos de 1 cm de diámetro de hojas adultas frescas o secas).

La maceración del material fue muy intensa, lo cual permitió realizar una pulverización completa de las muestras de hoja. Se obtuvo ADN de buena calidad y pureza. La figura 4, muestra la limpieza de las bandas de ADN reveladas en gel de agarosa donde se determinó que la concentración de ADN extraído fue de 100 ng / ul para cada una de las 63 muestras de cacao en estudio.

La concentración de ADN obtenida fue superior a lo reportado por Perry (1998), quien utilizando la metodología propuesta por Jofuku y Goldberg (1988), y modificando la preparación del método de extracción CTAB, Gawel y Jarret (1991), reporta concentraciones de ADN entre 25 y 50 ng/ul con una mínima concentración de polisacáridos y compuestos fenólicos .

Finalmente la concentración de ADN de las 63 muestras de cacao fue uniforme, no existiendo diferencia entre ellas, lo cual, demuestra que el protocolo y la cantidad de muestra utilizada fueron eficientes como se demostró al cuantificarlo, comparando la intensidad de las bandas obtenidas, respecto a las bandas del marcador de peso molecular conocido (100 ug/ml), y las muestras de referencia.

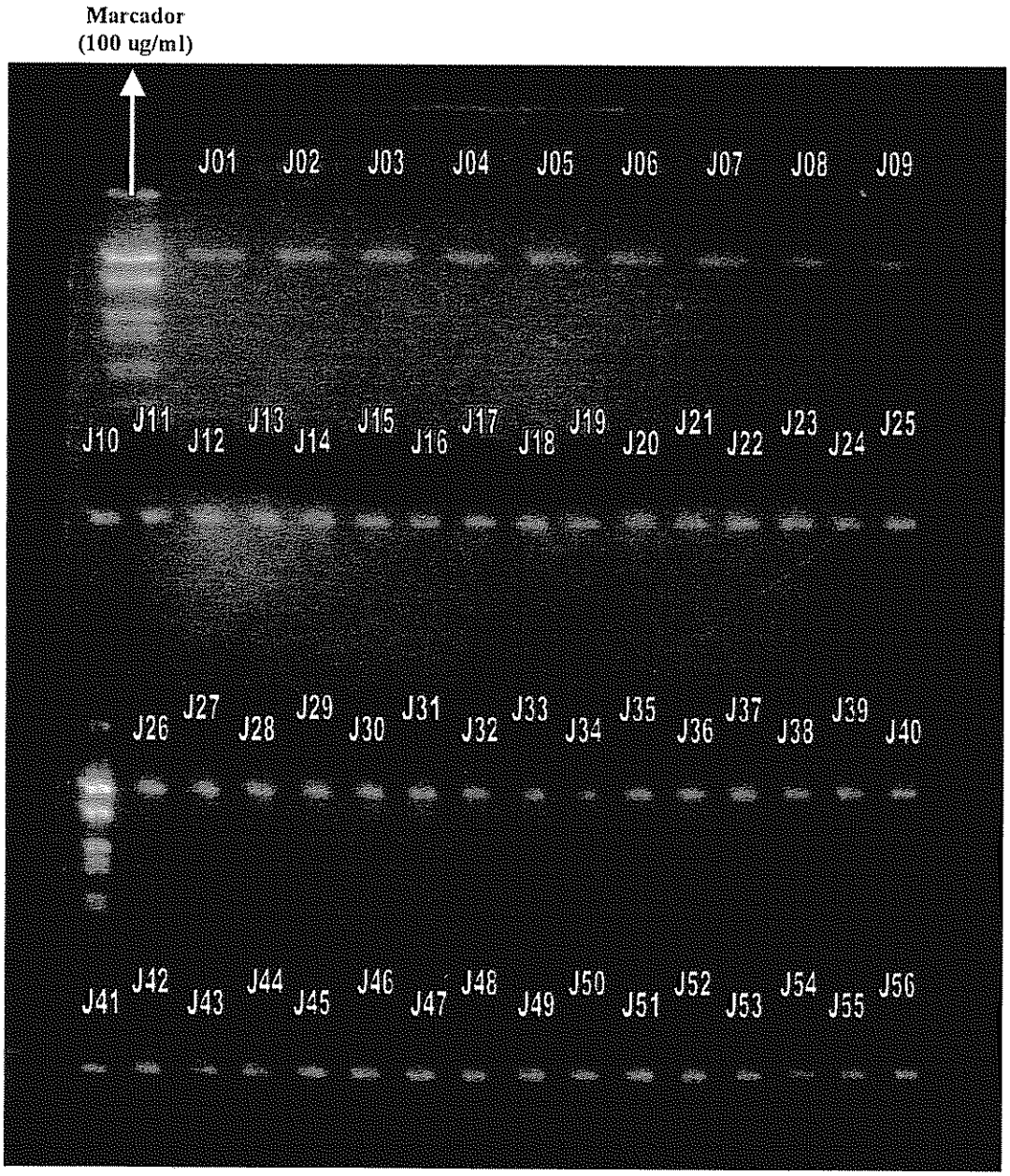

Figura. 4 Cuantificación de la concentración de ADN de 56 muestras de clones de cacao de Ecuador por electroforesis en gel de agarosa al 0.8 %.

4.1.2 Digestión / Ligación y Preamplificación del ADN.

La digestión, ligación y preamplificación de las muestras de ADN se realizaron de acuerdo al procedimiento descrito en la sección de materiales y métodos y el Anexo 4. Se determinó el producto de la reacción en gel de agarosa, donde se observó una banda (mancha), representativa de que se produjo

la digestión, ligación y preamplificación del ADN con el uso de las enzimas de restricción. Estos resultados son determinantes para continuar con las siguientes fases.

4.1.3 Amplificación del ADN

El alto grado de polimorfismo para las siete combinaciones de "primers" utilizadas y reveladas por el método no radiactivo, utilizando nitrato de plata ($AgNO_3$), en un gel de Poliacrilamida se presenta en la Figura 5.

El número de bandas amplificadas por cada combinación de "primers" fue variable, se obtuvo un mínimo de 44 bandas amplificadas por muestra para la combinación EACG/MCTT y un máximo de 89 bandas por muestra para la combinación enzima-primer EAAG/MCAA.

El número total de bandas polimorficas generadas por las siete combinaciones fue de 321, donde el número mínimo de bandas polimórficas fue de 29 para EACG/MCTT y el máximo se presentó en la combinación EAAG/MCAA con 59 bandas.

Las variaciones en el porcentaje de polimorfismo oscilaron entre 62 % para la combinación EACT/MCTC y 90,6 % para la combinación EAAG/MCTC. El porcentaje promedio de polimorfismo para las siete combinaciones utilizadas es de 70,79 % (Cuadro 4). El rango de amplificación de las bandas amplificadas fue entre 750 y 30 pb.

En este estudio se determinó que las 321 bandas polimórficas es alto, para las 7 combinaciones enzimas-primers. El promedio por combinación fue de 66,5 bandas, lo cual es significativamente más alto que lo reportado por Risterucci (2000) con un promedio de 9,5 bandas polimórficas y un máximo de 21 bandas, y lo reportado por Motamayor (2001), con un máximo de 20 bandas polimórficas y un promedio de 15 bandas para las mismas combinaciones, utilizando revelado por radiactividad. Sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo concuerdan con lo indicado por (Saunders *et al* 2000), quien indica que con "primers" óptimos producen fácilmente bandas escoreables y de buena reproducibilidad entre muestras y un alto número de bandas polimórficas que ponen en claro la diversidad y discriminan entre muestras, concluyendo que un análisis de ADN con AFLP produce entre 70 y 90 fragmentos por "primers".

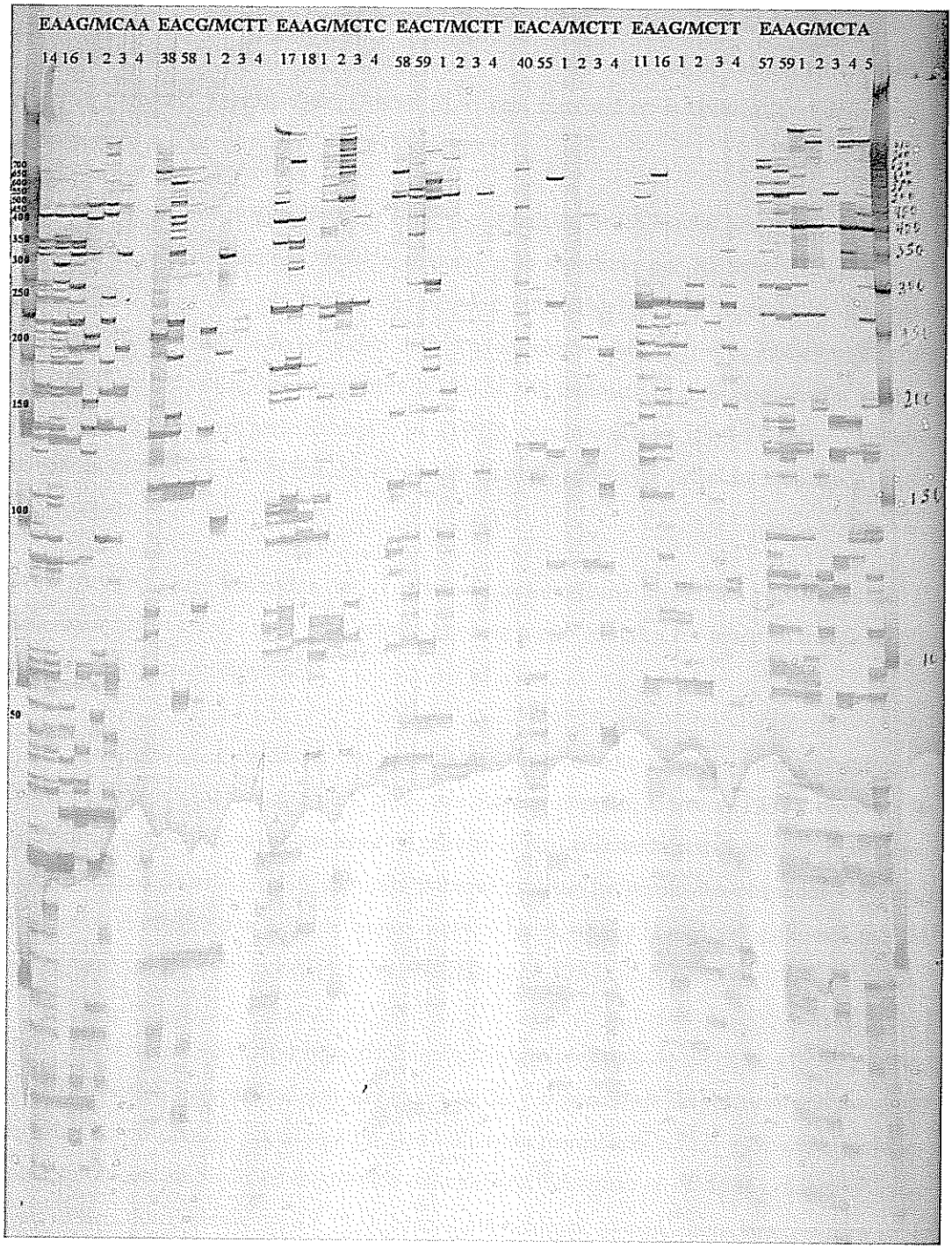

Figura 5.- Ejemplo de amplificación de las siete combinaciones "enzima-primer" mostrando el número de bandas amplificadas por estas, en la caracterización molecular de clones de cacao Nacional y otros orígenes de Ecuador.

Una de las razones de haber obtenido estos resultados con los clones de cacao tipo Nacional y de otros orígenes de Ecuador se atribuye a las condiciones óptimas de trabajo en el laboratorio y el ajuste del protocolo y molaridades (Anexo 5), el cual consistió en la optimización de las cantidades de los reactivos y la concentración de ADN (Vos 1995).

Por otra parte se debe destacar el rango del tamaño de las bandas amplificadas que fluctúo entre 30 y 750 pb, diferenciándose también respecto a lo reportado por Risterucci (2000), quien obtuvo bandas entre 50 y 500 pb, utilizando métodos radiactivos para el revelado de los productos de amplificación. En este estudio se utilizó tinción en nitrato de plata, el cual es más eficiente en el proceso de revelado de los marcadores, respecto a la tinción con radioactividad de acuerdo con lo reportado por Gu Cho (1996). Por otra parte Bassan *et al.* (1991), concluye que los niveles de resolución obtenidos en las bandas cuando se utiliza tinción en nitrato de plata son mejor definidas respecto a la tinción con radiactividad.

Además, las diferencias en el nivel de polimorfismo reportado por Risterucci (2000), y Motamayor (2001), respecto a esté estudio obedece a que en todos los casos se trabajo con genotipos (poblaciones) de cacao diferentes.

Sin embargo, comparando los resultados de este estudio respecto a los reportados para otras especies se puede observar que para la especie forestal pópulos, Cervera (1998), obtuvo 150 bandas polimórficas para cuatro combinaciones de primers el cual concuerda con el promedio obtenido para los clones de cacao de este estudio. Por otra parte al analizar los resultados obtenidos en otras especies como arroz, el número promedio de bandas visibles fue de 47.3 y la media de polimorfismo fue de 10.4 bandas para un 22% de polimorfismo (Maheswaran *et al.* 1997).

En el cereal más importante de Etiopía (*Eragrostis* spp), Ayele *et al.* (1999) obtuvo un bajo número de bandas polimorficas con una media de 36 y el porcentaje de polimorfismo fue de 43,5, cosa parecida ocurrió para 25 accesiones de soya utilizando marcadores AFLP y 15 combinaciones primers donde se obtuvo un 36 % de fragmentos polimórficos (Maughan *et al.* 1996), mientras que en avena (Yu y Wise 2000), obtuvo un 12 % de bandas polimórficas, lo cual, demuestra que para los clones de cacao estudiados en este trabajo los niveles de polimorfismos encontrados son altos.

Cuadro 4. Promedios de bandas totales, número de bandas polimórficas, porcentaje de polimorfismo y peso molecular observado por combinación "enzima-primers", en 63 clones de cacao tipo Nacional y otros orígenes de la colección de Ecuador.

Combinaciones "Primers"	Promedio de bandas totales por muestra	Número de bandas polimorficas	Porcentaje de polimorfismo	Rango de amplificación en pares de bases.
1) EAAG/MCAA	89	59	66.3	60 – 500
2) EACG/MCTT	44	29	65.9	45 – 350
3) EAAG/MCTC	53	48	90.6	50 – 750
4) EACT/MCTT	71	44	62.0	50 – 650
5) EACA/MCTT	70	46	65.7	30 - 550
6) EAAG/MCTT	63	47	74.6	40 – 450
7) EAAG/MCTA	62	48	77.4	60 - 600
Total		321	502.5	
Promedio	64.57	45.86	71.79	

4.1.4 Definición de grupos genéticos

El análisis de datos moleculares se realizó con el programa estadístico MVSP (Kovach 1999), el cual, permitió generar el dendograma UPGMA a partir de la matriz de similaridad (Figura 6), el cual muestra como se agrupan los 63 clones de cacao utilizados en el presente trabajo de investigación analizados con los marcadores AFLP's.

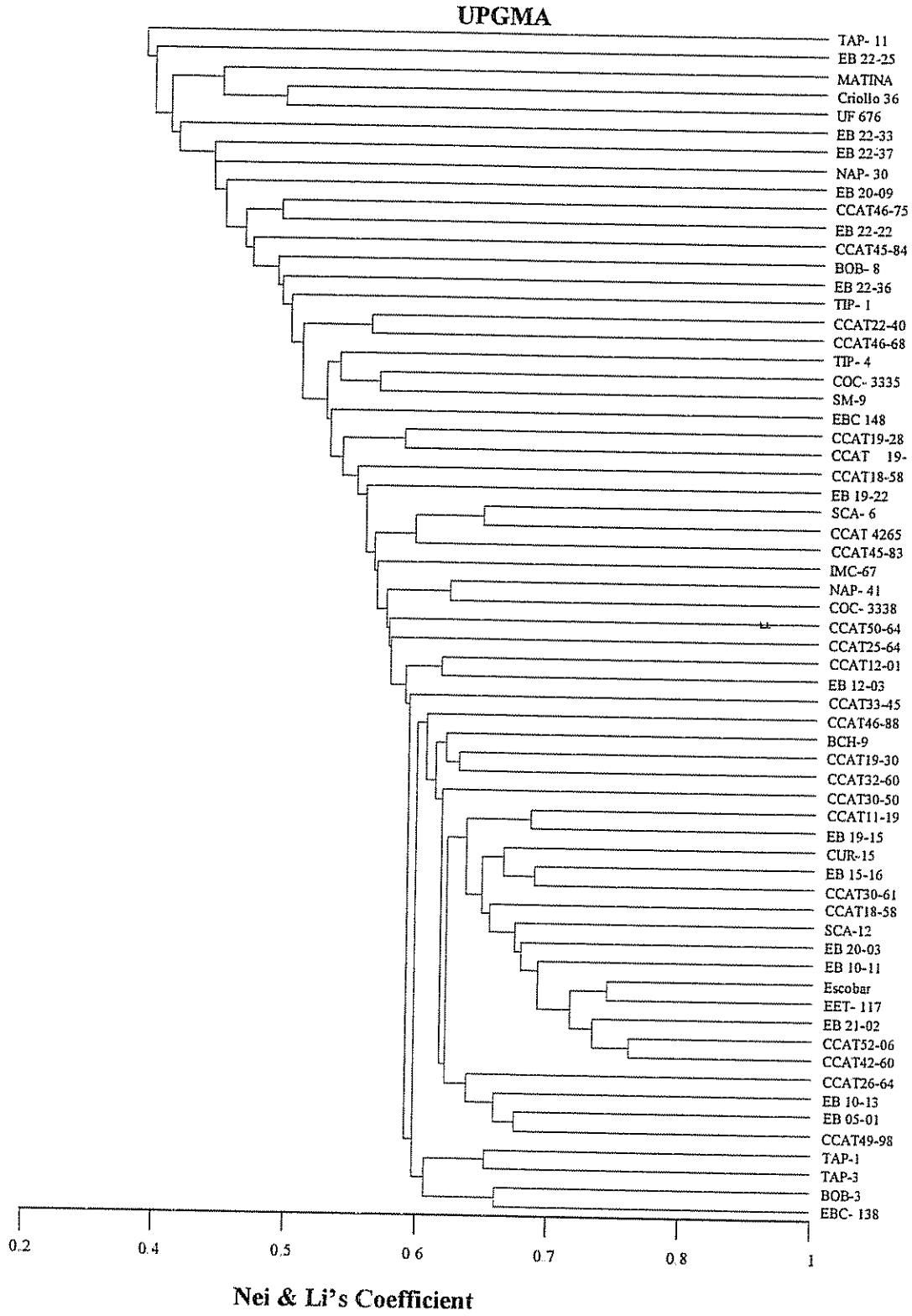

Figura. 6. UPGMA dendograma del agrupamiento de 63 genotipos de cacao tipo Nacional y de otros orígenes de la colección de Ecuador, segun la matriz de distancia y similitud de Nei & Li´s (1979).

Se observó que no se conforman grupos genéticos específicos de materiales que representan o responden a un origen determinado por su constitución genética, por el contrario se presentan en un amplio número de pequeños grupos relacionados estrechamente entre sí (Anexo 9), e incluso solos entre si.

Los resultados demuestran que la población de cacao de tipo Nacional y de otros orígenes está estrechamente relacionados entre sí, de allí que la conformación de grupos específicos no se da, sin embargo, se puede estimar que la variabilidad genética entre ellos es amplia posiblemente debido al grado de introgresión de genes de clones de origen forastero (Lerceteau *et al.* 1997).

También, se debe destacar que se presenta una separación bastante clara de los clones de cacao tipo Nacional y de otros orígenes con los clones de referencia UF-676, Criollo-36 y Matina. El clon UF-676 es de origen Trinitario seleccionado por la compañía "United Fruit Company" (Lanaud *et al.* 2000); y el Matina, es un clon de origen Forastero amazónico (Soria 1966), estos tres clones representaron en el estudio a los tres grupos genéticos de cacao (Criollo, Forastero y Trinitario), y aunque se consideró que de una u otra manera estarían relacionados a las poblaciones de cacao tipo Nacional de Ecuador, esta relación no fue evidente, sin embargo, el clon Criollo-36 se agrupo con los clones UF-676 y el Matina . Su separación con respecto al grupo de nacionales posiblemente se deba a la gran cantidad de líneas que comparten esa población y que no están presentes en estos grupos genéticos.

Respecto al clon Matina de origen Forastero, probablemente no es uno de los más representativos de este grupo genético para determinar el grado de afinidad entre los clones de cacao tipo Nacional de Ecuador y el grupo genético de los Forasteros.

Los clones SCA-6 y SCA-12 de origen Forastero si mostraron un alto grado de afinidad con los clones: CCAT 42-65; CCAT 45-83 y EB 20-03; EB 10-11; EB 21-02; CCAT 52-06; CCAT 42-60; CCAT 18-58; CCAT 30-61; EB 15-16; EB 19-15 y CCAT 11-19, de cacao Nacional de Ecuador en su orden (Figura 6).

De acuerdo con lo reportado por Bartley (2001), los clones SCA-6 y SCA-12 fueron utilizados como progenitores masculinos para introducir resistencia a la enfermedad Escoba de Bruja, a los clones de cacao tipo Nacional, lo cual concuerda con el agrupamiento de los clones de cacao tipo Nacional obtenidos por el análisis de los datos moleculares como lo demuestra el dendograma (Figura 6).

A través, del análisis de la información molecular, es posible determinar cierta afinidad respecto al origen geográfico de los clones de cacao Nacional (Quiroz 1997), a pesar de no presentar grupos genéticos definidos. Se observa que se agrupan materiales provenientes de la provincia de Los

Ríos, (como los clones CCAT 11-19; CCAT 42-60 y CCAT 52-06), pertenecientes al Centro de Cacao de Aroma Tenguel (CCAT), que fueron recolectados por la United Fruit Company en los años 1940, en fincas de productores de cacao de la región.

Esta cercanía genética puede interpretarse en dos sentidos, uno en que se muestra el posible origen de los materiales que dieron origen a la colección CCAT, y el otro podría ser a la inversa, donde muchos de los actuales clones recolectados en fincas de productores por haber mostrado altos grados resistencia a Escoba de Bruja (EB), en las provincias de El Guayas, Los Ríos y Manabí, podrían tener su origen a partir de la colección del Centro de Cacao de Aroma Tenguel.

4.1.5 Diversidad Genética

La diversidad genética de los 63 clones de cacao en estudio y el grado de similitud o distancia genética entre ellos se determinó con el paquete estadístico MVSP (Kovach 1999), para este análisis se utilizó el coeficiente de Nei & Li's (1979). Las distancias genéticas entre los clones de cacao son de 0,225 para los clones TAP-11 con Criollo-36 notándose que corresponde a los menos similares y 0,832 para los materiales CCAT 46-60 con CCAT 52-06 como los más semejantes (Anexo 9).

A pesar de la no conformación de grupos genéticos definidos con los marcadores moleculares, a continuación se presenta un agrupamiento de los genotipos por su índice de similaridad de los clones dentro del dendograma partiendo de los más similares hasta los más diferentes en concordancia con la matriz de similaridad generada tomándose como ejemplo los 14 clones más similares. Entre los que destacan cinco materiales CCAT cinco EB (Resistentes a Escoba de Bruja), los genotipos EET-117, Escobar, SCA-12 y CUR-15.

Estos materiales provienen de algunos sectores de la provincia de Los Ríos, lo cual, explica su grado de asociación con los genotipos de la colección CCAT, sin embargo, en este grupo también se encuentra el clon Scavina 12 que procede de la región de Ucayalí en la Amazonía Peruana.

De acuerdo con Bekele (1994), posterior a la recolección del SCA-12 por Pound (1938), fue utilizado en programas de mejoramiento genético por su alta producción, vigor y resistencia a ciertas enfermedades como Escoba de Bruja. Esto es confirmado por Bartley (2000), quien indica que los clones SCA-6 y SCA-12, fueron usados para introgresar genes de resistencia a Escoba de Bruja (*Crinipellis perniciosa),* en los materiales Nacionales, y producir híbridos que posteriormente fueron distribuidos en las áreas de producción de cacao, por lo cual no es extraño que materiales que conforman este grupo mayoritario presenten introgresión de material genético del clon Scavina-12.

Por otra parte la presencia del clon CUR-15 en este grupo también indica un alto grado de similitud entre este y el clon Scavina-12 ambos de origen amazónico, esto tiene sentido al considerar lo reportado por Allen (1983), quien indica que en sus prospecciones y recolección de cacao en la amazonía Ecuatoriana observó que algunas poblaciones de materiales silvestres al parecer fueron propagadas por los indígenas utilizando semillas de árboles silvestres de la zona lo cual explicaría en cierto modo esta afinidad.

Otro material genético importante de resaltar en este grupo es el clon Escobar cuyo origen no está bien definido en la colección de cacao y presenta un 0,774 de similitud con el clon Scavina-12, esto permite considerar que el origen de este clon está estrechamente relacionado a este clon de origen amazónico.

Otros clones que se agrupan son los conformados por cuatro clones (dos CCAT y dos EB), donde los genotipos CCAT 49-98 y EB 05-01 (Anexo 9). Los dos clones EB son procedentes del área Cone y Milagro (Quiroz 1997), correspondiente a la Provincia de El Guayas en una área no mayor a 5 Km. de distancia, lo cual podría explicar que estos genotipos geográficamente muy cercanos son autóctonos de la región y de alli fueron llevados al Centro de Cacao Tenguel o viceversa.

Cuatro clones de origen amazónico se unen entre sí, donde los clones EBC-138 y BOB-3 presentan un 0,713 de similitud, mientras que los clones TAP-1 y TAP-3 comparten un índice de similaridad de 0,703 respecto a los clones EBC-138 y BOB-3.

Estos clones son los más similares genéticamente después del primer agrupamiento y está constituido por dos clones del mismo origen geográfico de la amazonia ecuatoriana, que son el TAPICHE-1 y TAPICHE-3, mientras que el clon EBC-138 proviene de la región del Caquetá en Colombia (Baker *et al.* 1954). Este clon está estrechamente relacionado con el clon Bob-3 procedente de la rivera del Río Bobonaza en la parte norte de la región amazónica del Ecuador, lo que demuestra el grado de afinidad entre estos clones de origen amazónico y tiene su explicación en lo mencionado por Allen (1983), sobre la multiplicación de materiales silvestres por parte de los nativos de la región con materiales del alto amazonas.

Los genotipos, SCA-6 y el CCAT 42-65 son similares en un 0,694 y el clon CCAT 45-83 presenta un ligamen muy estrecho con SCA-6, indicando que estos dos materiales tipo Nacionales serian híbridos de Nacional por SCA-6, concordando con lo reportado por Cruzillat (1996)

Los clones CCAT 32-62 y CCAT 19-30 comparten un 0,675 de similaridad y el clon BCH-9 ligado a estos en un 0,651 de similaridad, considerando que el clon BCH-9 es un material típico

Nacional con un porcentaje de heterocigosis no mayor al 9 % (Lecertaud 1997), y al estar relacionado a dos clones CCAT, indicaría que estos son clones típicos de Nacional y que además proceden de la misma región geográfica (Tenguel), provincia del Guayas.

Los clones CCAT 19-16 y CCAT 19-28 con un 0,624 de similaridad unido a ellos está el clon EBC-148 del valle del Caquetá en Colombia con un 0,512, donde los primeros se encuentran ubicados en la misma hilera en la colección (19), con un intervalo de 12 plantas entre ellos lo que induciría a pensar que los materiales de la colección de cacao de Aroma Tenguel, son el resultado de la recolección de mazorcas de árboles con características deseables en algunas áreas del Ecuador, específicamente en la provincia del Guayas donde la United Fruit Company llegó a poseer grandes extensiones de terreno, cultivadas con cacao (Uggen 1993). A este grupo se encuentra relacionado el clon EBC-148 con un grado de similitud de 0,511. Siendo este de origen amazónico de la región del Caquetá en Colombia lo que podría indicar que existe algún grado de relación de estos materiales con los genotipos provenientes de este sector de la región del amazonas.

Otros clones importantes de resaltar son los CCAT 22-40 y CCAT 46-68 similares en un 0,589, a este grupo están ligados en diferentes grados de similaridad con los clones TIP-1 (0,468), EB 22-36 (0,467), BOB-8 (0,462) y el CCAT 45-84 (0,408) en su orden. A los dos clones CCAT se unen con cierto grado de similaridad los clones TIP-1 y un EB-2236 (Provincia de Manabí), y el Bob-8, esto implicaría que alguno de los clones tipo Nacional contarían en su constitución con genes de clones amazónicos, lo que podría inducir a considerar un posible origen Amazónico de estos materiales Nacionales de Ecuador.

Es importante resaltar que los materiales de menor índice de similaridad son los utilizados como referencia y están constituidos por los clones UF-676 y CRIOLLO-36 similares en un 0,402 acompañados por el clon CC-267 (Matina), con un grado de similitud de 0,505 para el genotipo UF-676 y 0,508 para el Criollo-36. Se une a estos el clon EB 22-25 compartiendo el mismo grado de similaridad con el clon Matina (CC-267) en un 0,236 y el material TAP-11 de origen amazónico, siendo éste el clon más diferente de los materiales estudiados.

El análisis molecular demuestra que no existe una estrecha relación entre los clones de cacao Nacional y los clones de referencia representativos de los grupos genéticos Forasteros, Criollos y Trinitarios. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Lecertaud (1996), Cruzillat (1996), Motamayor (2001) y Lanaud (1997), quienes encontraron resultados similares utilizando otras técnicas de marcadores moleculares y con poblaciones de cacao que incluían en algunos casos materiales de procedencia similar a los de este estudio.

Estos resultados permitirán sustentar la teoría propuesta por Soria (1966) y Cheesman (1947), quienes mencionan que los materiales Nacionales de Ecuador son un grupo que evolucionó en la parte costera del país, a partir de pocas mazorcas provenientes de la parte amazónica y que posee características propias a pesar de haber sufrido un alto grado de introgresión en los últimos tiempos.

Los marcadores moleculares han permitido evaluar con mayor precisión las relaciones filogeneticas presentes en genotipos de cacao, caracterizar germoplasma, determinar diversidad genética y establecer ligamiento entre genes y características agronómicas importantes, aunque no siempre han coincidido con las separaciones tradicionales, basados en tipos morfo-geográficos del germoplasma de cacao Forasteros de Sur América y Criollos de Mesoamerica, (Figueira *et al.* 1994; Beckele 1996).

Así análisis previos en accesiones de árboles de cacao Nacional han mostrado dificultades para clasificar a este genotipo tradicional de Ecuador, donde al estudiar el polimorfismo del ADN citoplasmático mostró similaridad entre los clones Nacionales y Criollos (Laurente *et al.* 1993 a), mientras que el polimorfismo del ADN nuclear, induce a pensar que algunos de los cacao Nacionales están más relacionados a los del alto amazonas y Trinitarios (N'goran *et al.* 1994), y se ha comprobado además que este tiene un ADN nuclear especifico.

Por otra parte, debido a la introducción de genotipos llamados venezolanos desde Trinidad a Ecuador, los cuales se han hibridado con los Nacionales (Lercetaud *et al.* 1997), dando lugar a que los materiales presentes en las plantaciones de cacao presenten diferentes grados de heterocigocidad al ser analizados con marcadores RFLP, como es el caso de los clones Sebastián Arteaga (SA) y Balao Chico (BCH) con niveles de hasta 5% de heterocigocidad (Crouzillat *et al.* 2000).

4.2 Caracterización Morfológica

La variabilidad genética observada en los clones en estudio utilizando las caracteristicas morfológicas han permitido caracterizar los clones de cacao Nacional y observar el grado de relación o diferenciación con sus homólogos orientales y de otros orígenes genéticos como son los de tipo Trinitario, Criollo y Forasteros típicos o de referencia.

4.2.1 Análisis Morfológico

Con base en los datos obtenidos mediante la caracterización morfológica de 34 variables cuantitativas y 13 cualitativas (transformadas a porcentajes), de 51 clones de cacao Nacional y otros orígenes a los cuales inicialmente se les aplicó un análisis exploratorio de componentes principales, se determinó la no-existencia de datos atípicos.

Producto de este análisis se obtuvo inicialmente una distribución de cinco grandes grupos (Cuadro 5), donde se puede apreciar la frecuencia de los clones por grupo, así como el porcentaje, frecuencia acumulada y el porcentaje acumulado.

En este cuadro se observa que el grupo 1 esta constituido por 18 clones que representa el 35,3 % de la variabilidad total; el grupo 2 esta formado por 10 materiales con el 19,6 %; 15 clones conforman el grupo 3 representando el 29,4 % y los dos últimos grupos (4 y 5), están constituidos por 5 y 3 clones respectivamente con una representación del 9,8 y 5,9 % de la variabilidad total de los clones en estudio.

Cuadro 4. Distribución por grupo de los 51 clones de cacao tipo Nacional y de otros orígenes de acuerdo al análisis de varianza mínima de Ward (1967)

Grupo	Frecuencia	Porcentaje	Frecuencia acumulada	Porcentaje acumulado
1	18	35.3	18	35,3
2	10	19.6	28	54,9
3	15	29.4	43	84,3
4	5	9.8	48	94,1
5	3	5.9	51	100,0

Las 47 variables cuantitativas y cualitativas utilizadas para el análisis morfológico permitieron evaluar la variabilidad de los clones en estudio agrupándolos de tal forma que se conformaron grupos constituidos por individuos de las mismas regiones. Así, se puedo observar la conformación de un grupo mayoritario constituido por 18 clones CCAT y EB, los cuales fenotipicamente se puede interpretar como que un gran número de esos están estrechamente relacionados.

Por otra parte, el grupo tres lo conforman 15 materiales donde se agrupan básicamente los clones procedentes de la región amazónica, los cuales a su vez se dividieron en dos subgrupos notándose que los clones procedente de la parte norte del Ecuador incluidos los EBC (Expedición

Botánica Caquetá), de Colombia se agruparon más estrechamente mientras que el otro grupo esta constituido por los restantes materiales de la amazonía incluido el clon Escobar, cuyo origen no esta muy bien definido.

Este grupo representa el 29,4 % de la variabilidad presente entre los clones de origen nacional y otros orígenes de esta colección en estudio. Seguido a estos se encuentra el grupo dos con 10 clones con un 19,6 % de la variabilidad total, estos tres grandes grupos representan el 84,3 % de la variabilidad total de los clones estudiados y contienen 43 accesiones de los 51 clones estudiados.

Los dos grupos restantes el cuatro y cinco están constituidos por cinco (9,8 %) y tres (5,9 %), clones respectivamente donde las diferencias morfológicas serian mayores respecto a los otros materiales en estudio.

4.2.2 Análisis de Grupos.

La figura 7, muestra el dendograma de la clasificación de los clones evaluados, el cual se obtuvo por el método de Ward. Donde se puede apreciar lo siguiente:

Grupo uno: esta constituido por clones procedentes de la colección Centro de Cacao de Aroma Tenguel (CCAT), y clones considerados resistentes a Escoba de Bruja (EB). Subdividido en dos subgrupos:

El subgrupo (A), lo conforman 11 clones CCAT (Centro de Cacao de Aroma Tenguel) y el clon EB-1013 el cual fue seleccionado en el Cantón Milagro (Quiroz 1997), un sector cercano a Tenguel, lo que indica que este clon proviene posiblemente de esta colección debido al sistema de reproducción por semilla utilizado por los productores, considerando además, que este centro fue por mucho tiempo el lugar de multiplicación y distribución de materiales para los productores a raíz de la crisis causada por la enfermedad Escoba de Bruja.

El subgrupo (B), confirma parte de esta apreciación al estar constituidos por tres clones de procedencia del CCAT y tres EB, (EB 15-16; EB22-22 y EB 22-36), donde el primero de estos fue colectado en la parte correspondiente al área denominada "arriba" del cacao Nacional en la Provincia de Los Ríos, mientras que los otros dos EB, (EB 22-22 y EB 22-36), corresponden a la provincia de Manabí en los sectores de Camareta y Canuto muy próximos el uno del otro.

Estos resultados se pueden interpretar como que la dispersión se pudo haber efectuado en ambos sentidos, sin embargo, es poco probable que la United Fruit Company allá recolectado materiales

en la provincia de Manabí, pues no existen evidencias de esto y que más bien su área de acción fue la parte sur del país en la provincia del Guayas y parte de los Ríos, por lo que estos materiales EB bien pudieron haber sido trasladados por los productores en mazorca para ser sembrados en sus predios.

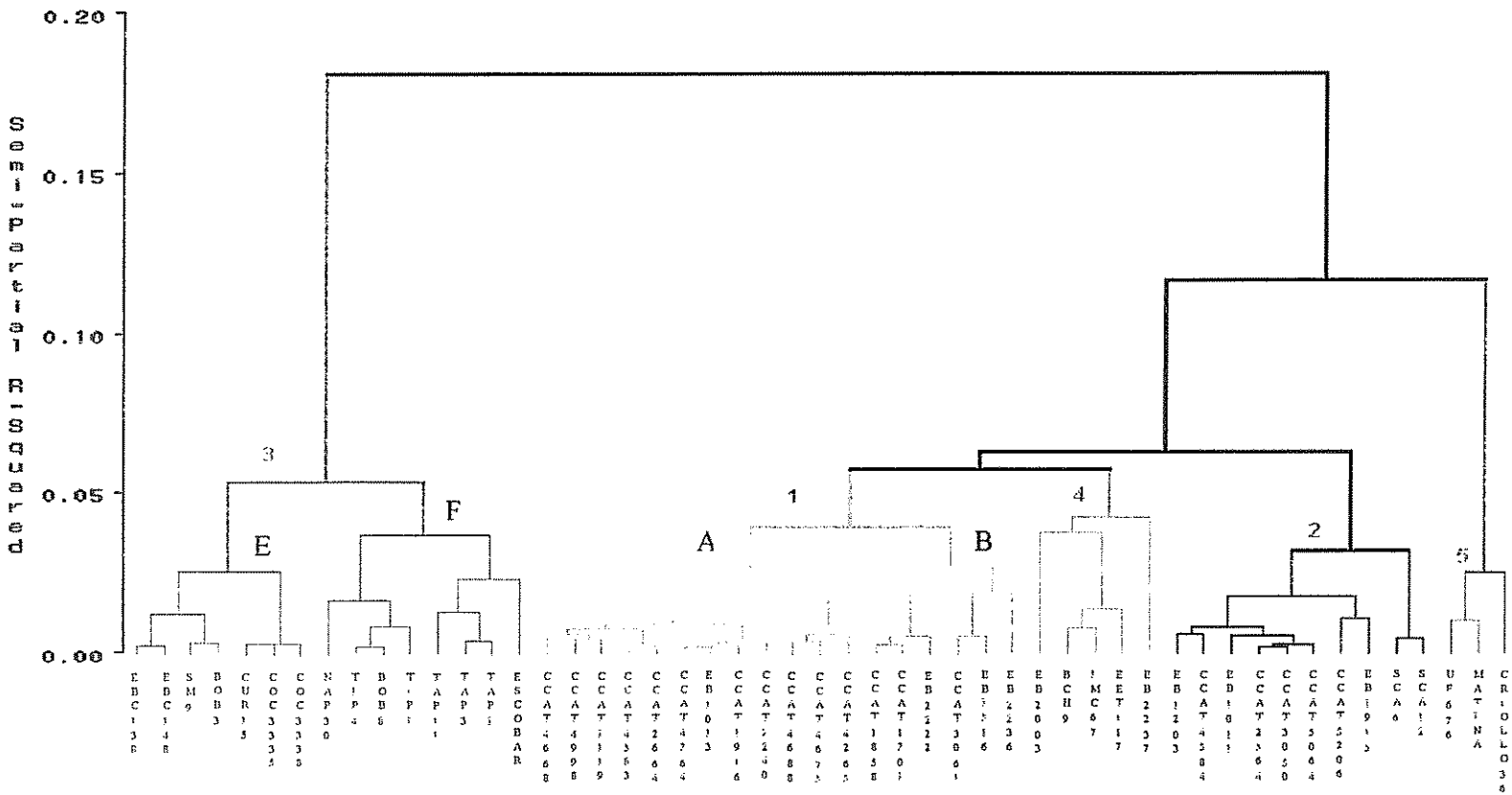

Figura 7. Dendograma de 51 clones de cacao Nacional y de otros origenes de Ecuador a partir de datos Morfológicos, por medio del método Ward.

Grupo dos: se subdivide también en dos grupos de los cuales el subgrupo (C) esta conformado por 5 clones CCAT y tres EB, mientras que el Subgrupo (**D**) lo componen los clones SCA-6 y SCA-12. , lo que mostraría que morfológicamente este grupo de materiales tipo nacional tendrían introgresión de algunas características de los clones Scavina.

Lo anterior tiene sentido pues algunos de los materiales considerados Nacionales en este estudio tendrían en su haber introgresiones de Scavina, debido a los cruces realizados a inicios de los años 1940 en Ecuador en los trabajos tendientes a introducir genes de resistencia a Escoba de Bruja (Soria 1970).

Los clones Scavina recolectados por Pound (1938), se utilizaron como padres para formar híbridos, lo que coincide con Bartley (2001), quien indica que después de la recolección en la cuenca alta del río Amazonas, los clones Scavina, después de las primeras observaciones y evaluaciones fueron distribuidos en varias áreas de producción debido a su alta habilidad combinatoria, lo cual confirma y no descarta la posibilidad de que muchos de los clones actualmente recolectados como tipos Nacionales en el ámbito de finca de productores presenten características fenotípicas de estos, siendo para el caso de los clones en estudio que el 19,6 % de la variabilidad presentan en mayor o menor grado una relación morfológica con los clones Scavina.

Grupo tres: al igual que en los grupos anteriores esta constituido por dos grandes subgrupos, el (**E**) básicamente formado por cinco clones procedentes de la parte norte de la amazonía Ecuatoriana, recolectados en las riveras de los ríos San Miguel, Coca y Bobonaza (Chalmers 1968), y dos accesiones EBC–138 y EBC–148 producto de la expedición botánica Caquetá realizada por Baker (1954), lo cual muestra un grado de similaridad morfológica entre materiales muy distantes geográficamente, confirmando lo mencionado por Allen (1983), quien indica que algunas áreas con árboles silvestres encontrados en la amazonía hayan sido plantadas con semilla silvestre local.

El Subgrupo **F** conformado por siete clones de origen amazónico procedente de las riveras de los ríos Tapiche, Tiputine, Napo, Bobonaza y el clon Escobar, procedentes tanto de la parte norte y centro del Ecuador, donde se incluye el clon Escobar, cuyo origen genético posiblemente está en algún grado relacionado con estos materiales amazónicos, considerando las características morfológicas, lo que implicaría que a pesar de la alta diversidad genética observada en la amazonía existen ciertos grados de similitud fenológica entre estos.

Grupo cuatro: conformado por cinco accesiones, dos clones son EB (EB 20-03 y EB 22-37), además de los materiales BCH-9, IMC-67 y el EET- 117, de los cuales el BCH-9 según trabajos realizados con marcadores moleculares RFLP por Lecerteau (1996), es un material muy homocigótico, debido a que proviene de una población de cacao Nacional pura recolectado en un predio con edad superior a 120 años (Quiroz y Soria 1994), por lo que se ubicaría como el mayor representante de los materiales Nacionales.

Sin embargo, se agrupa morfológicamente con los clones IMC-67 y EET-117, el primero de origen Amazónico y el segundo de tipo Venezolano Amarillo, lo cual, indicaría que estos clones comparten ciertas características fenológicas que los hacen ser muy parecidos, y a estos se agrupan dos materiales más que son producto de la recolección de los EB, uno de la provincia de Manabí y otro de la provincia de los Ríos, lo cual demostraría que estos comparten características muy típicas del cacao Nacional como son el color rojo rosado del filamento estaminal, tamaño y color de la semilla entre otras (Soria 1970 y Enríquez 1992).

Grupo cinco: constituido por tres clones, el UF-676 y Matina muy relacionados, mientras que el Clon Criollo-36 es independiente, los mismos que fueron considerados como materiales de referencia de los genotipos Trinitarios, Forasteros y Criollo.

Sin embargo, la poca relación mostrada con el resto de materiales en estudio permiten adelantar criterios que los clones Nacionales y los de procedencia del Amazonas utilizados en este estudio, morfológicamente difieren de estos tres grandes grupos genéticos, apoyando el criterio de algunos autores como Soria (1966) y Enríquez (1993), de que los materiales de cacao Nacional de Ecuador son un tipo aparte de cacao y que su evolución se efectuó en la parte costera del Ecuador, manteniendo a pesar de su contaminación genética características fenológicas propias de su tipo.

4.2.3 Análisis discriminante canónico.

En el cuadro 6 se presenta el resultado obtenido, a partir del análisis discriminante canónico. Las variables Largo del estilo (LE), Angulo basal (AB), Pigmentación mediana del estaminoide (PME), Número de óvulos por ovario (NO), Espesor del surco de la mazorca (ESM), y Peso de semilla sin pulpa (PSSP), son los caracteres con mayor valor discriminante para la variable canónica uno (CAN-1), la cual explica el 61,38 % de la variabilidad total presente en la población en estudio.

La variable canónica dos (CAN-2) explica el 24,04 % de la variabilidad total a través de las siguientes características: Espesor del lomo en la mazorca (EL), Relación L/A de la hoja (L/A H), y Relación L/LBA de la hoja.

Por ultimo la variable canónica tres (CAN-3), explica el 9,72 % de la variabilidad total donde sobresalen las características, Largo de la semilla (LS), Sépalos no pigmentados (SNP), y Mediana pigmentación (MP) con y el Ancho de la semilla (AS).

Las variables CAN-1; CAN-2 y CAN-3 en conjunto explican el 95,15 % de la variabilidad total presente en los 51 genotipos de cacao caracterizados morfológicamente.

Cuadro 5. Análisis discriminante canónico (CAN-1; CAN-2 y CAN-3), para las características morfológicas evaluadas en los 51 clones de cacao tipo Nacional y de otros orígenes de la colección de cacao de Ecuador.

Descriptores	CAN - 1	CAN - 2	CAN - 3
Flor			
Largo de ligula	---	---	0.3517
Largo de estilo	0.4865	---	---
Largo de ovario	---	---	0.4643
Ancho de ovario	---	---	0.5998
Núm. óvulos /ovario	0.4422	---	---
Sépalos no pigmentados	---	---	0.6646
Sépalo mediana pigmentación	---	---	0.6646
Filamento pigmentación	---	---	0.4482
Filamento no pigmentado	---	---	0.3949
Estaminoide mediana pigmentación	0 4544	0.6344	---
Pedúnculo no pigmentado	---	0.7182	---

Mazorca			
Espesor de lomo	---	0.7992	---
Espesor del surco	0.3949	---	---
Semilla			
Sin pulpa	0.3907	---	---
Pulpa más testa	---	---	0.3314
Peso seco	---	---	0.5415
Largo de la semilla	---	---	0.7317
Ancho de la semilla	---	---	0.6414
Hoja			
Largo	---	0.5902	0.3570
Relación largo / ancho.	---	0.7633	---
Largo desde la base a la parte ancha (LBA)	---	---	0.3869
Relación largo/LBA	---	0.7612	---
Angulo basal	0.4793	---	---

4.2.4 Análisis de varianza y prueba de DUNCAN.

Este análisis permitió definir las características individuales más discriminantes con bajos coeficientes de variación (Cuadro 7), los cuales varían entre 8,43 hasta 15,58 % con niveles de significancia del 95 y 99% respectivamente:

La Flor.- Presentó seis características discriminantes: relación Largo / ancho del sépalo; largo de lígula; relación Largo / ancho de la lígula; largo del ovario; ancho del ovario y número de óvulos por ovario con coeficientes de variación que se encuentran entre 8,43 hasta 15,58 para el largo del ovario, la prueba de Duncan mostró diferencias significativas estableciendo tres y cuatro grupos por variable (Anexo 10 al 25), para las características discriminantes obtenidas.

Los resultados obtenidos concuerdan con lo descrito por Ostendorf (1965), quien concluyó que las estructuras que mejor caracterizan clones de cacao son los pétalos, el pistilo y el número de óvulos, lo que es confirmado también por Enríquez y Soria (1967) quienes propusieron 11 caracteres para la descripción de clones por medio de la flor, lo cual

posteriormente fue confirmado por Engels, Bartley y Enríquez (1980). Así también, López y Enríquez (1988) concluyeron que el número de óvulos es el mejor indicador de campo y no es significativamente afectado por el ambiente y por último estas características también son recomendadas por Bekele (1994), como una lista corta de descriptores morfológicos para caracterizar cacao.

Cabe señalar que dentro de las características morfológicas evaluadas la pigmentación del filamento del estambre no resultó ser discriminante en este estudio como lo describen Fowler (1952), Soria (1966) y Enríquez (1993), quienes lo reportan como una característica útil para discriminar entre clones de cacao. A su vez Quiroz y Soria (1994), consideran a esta característica como única de los tipos Nacionales, sin embargo, esta característica se presento en genotipos de origen Amazónico incluidos en este estudio y en los genotipos de cacao Nacional, lo que indica que existe cierto grado de afinidad o similitud entre ambos grupos de genotipos de cacao.

Fruto.- En este trabajo se observó que las dos variables discriminantes para este órgano fueron la relación Largo/ancho de la mazorca y peso de cáscara, con lo cual se confirmaría lo reportado por Quiroz y Soria (1994) quienes afirman que el fruto es un carácter discriminante de cacao Nacional.

La Semilla.- Se observaron cuatro características discriminantes con altos niveles de significancia (Probabilidad <.0001), peso de la testa; peso de semilla seca; largo de la semilla y ancho de la semilla, las cuales han sido útiles para describir entre poblaciones de cacao (Stockdale 1928).

Sin embargo Pound (1932), indicó que el tamaño de la semilla era un carácter muy variable por lo que recomendaba un tamaño de muestra grande. Por otra parte Enríquez y Soria (1968) señalan que los descriptores de la semilla eran largo, ancho, espesor, peso seco, con y sin pulpa y porcentaje de testa, sugiriendo que con cinco semillas por mazorca, de un total de 20 mazorcas se obtendría una buena descripción, lo anterior lo reafirma López y Méndez (1992).

Se debe resaltar que el color de la semilla no fue una característica discriminante en este estudio lo cual no concuerda con lo reportado por Soria (1996), quien indica que encontró porcentajes entre 51 y 100 % de almendras más claras comparadas en los grupos de cacao Nacional al compararlos con genotipos de origen Forastero Amazónico. En este estudio se encontró que el color de la semilla tanto blancas como rojo claras se comparte entre clones de cacao Nacional y genotipos de origen amazónico. Los resultados obtenidos concuerdan con lo

reportado por Chalmers (1970), quien menciona que los materiales provenientes del Río Coca presentan un 87 % de almendras blancas, mientras que los del Río San Miguel poseen un 29% de almendras blancas, 21 % de semillas moteadas y 23 % de semillas rojo claro, lo cual, al ser considerados en este trabajo como materiales de referencia indicarían que los clones amazónicos escogidos en este estudio también presentarían esta característica como discriminante.

Otra característica reportada como discriminante para el cacao Nacional que no resultó discriminante en este estudio es el espesor de la semilla, o almendra "redondeada" que de acuerdo con Fowler (1952); Soria (1966) y Quiroz y Soria (1994), la reportan como un carácter discriminante del cacao Nacional o del complejo Nacional respecto a otros grupos genéticos. Los resultados obtenidos permite concluir que no existe diferencia entre los grupos de cacao en estudio para esta característica. Sin embargo el largo y el ancho de la semilla discriminan bien entre grupos con coeficientes de variación de 8,5 y 9,49 respectivamente (Anexo 10 y 25), lo cual, concuerda con lo reportado por Stockdale (1928), quien tomó como base el largo, ancho y espesor de la semilla para describir algunas poblaciones de cacao. A su vez, Pound (1938), concluyó que el peso de la semilla es el carácter mas confiable para la descripción e identificación de un clon de cacao.

La Hoja.- En este órgano las características más discriminantes fueron: Relación largo / ancho; relación Largo / longitud de la base a la parte más ancha de la hoja y ángulo basal, Fowler (1952) encontró que la forma oblonga-elíptica es típica en cacao Nacional, por lo tanto los resultados obtenidos demuestran que se presentan diferencias en la forma de la hoja entre genotipos. Además, se debe considerar que las hojas son muy influenciadas por el ambiente como lo menciona Braudeau (1975), quien indica que el desarrollo de la hoja depende principalmente de la luz, ya que materiales bajo sombra emiten hojas más grandes y alargadas.

Cuadro 6. Promedio, coeficiente de variación, desviación estándar y nivel de significancia para las características discriminantes en la caracterización morfológica de 51 clones de cacao de tipo Nacional y de otros orígenes de la colección de Ecuador.

Descriptores	Promedio	Coeficiente de Variación	Desviación Estándar	Nivel de Significancia
Relación largo / ancho el sépalo.	3.62 mm	10.38	0.376	0.0057
Largo de lígula	5.98 mm	11.57	3.532	0.0001

Relación Largo/ancho lígula	2.52	9.06	0.229	0.0002
Largo de ovario	1.96 mm	15.58	0.305	0.0005
Ancho de ovario	1.42 mm	11.71	0.166	0.0001
Número de óvulos por ovario	42.69	8.43	3.599	<0.0001
Relación lar/anch de mazorca	1.979	11.35	0.225	0.0057
Espesor del lomo de la mazorca	1.475 cm	10.97	0.162	<0.0001
Peso de la cáscara	404.979 g	18.79	76.10	0.0036
Peso de la testa de la semilla	2.379 g	22.10	0.526	<0.0001
Peso de la semilla seca	1.05 g	16.79	0.177	<0.0001
Largo de la semilla	2.04 cm	8.506	0.174	<0.0001
Ancho de la semilla	1.17	9.50	0.111	<0.0001
Relación largo / ancho de la hoja	2.97	7.51	0.223	<0.0001
Relación Largo /LBA	2.05	5.69	0.117	<0.0001
Angulo basal de la hoja	109.12	10.80	11.78	<0.0001

4.3 Relación entre marcadores moleculares y morfológicos

La comparación de las matrices de similaridad de los datos morfológicas y moleculares se realizó sobre la base de 51 clones, pues los restantes 12 clones no presentaron flores ni frutos, por lo tanto no se logró completar la caracterización morfológica durante el periodo de estudio.

Las matrices de similaridad fueron generadas por el método de Gower, para los datos morfológicos y de Nei & Li's (1979), para los datos moleculares. Las matrices de similaridad

fueron analizadas mediante una prueba no paramétrica de comparación de dos matrices de distancia, mediante el valor de Z, de Mantel (1967), que fue derivado de 1000 permutaciones.

Se utilizo para estos análisis el programa GENETIX versión 4.04 para Windows ™ (Belkhir 1996-2001), y la interpretación del grado de significancia de estas correlaciones fue utilizando el coeficiente Z, considerando las primeras 20 permutaciones.

Para el caso que estudiamos se acepta que existe relación entre las matrices, lo cual demuestra que existe relación entre los datos obtenidos entre la caracterización morfológica y molecular de los clones de cacao Nacional y otros orígenes de Ecuador.

V. CONCLUSIONES

Para las características Moleculares.

- Los resultados moleculares muestran que la población de tipo Nacional estudiada no conforma agrupamientos que permitan discriminar los materiales por su origen geográfico o series de colectas debido posiblemente al alto grado de introgresión que estos materiales posiblemente tienen de otros grupos genéticos.

- La presencia de clones Forasteros como los SCA y de materiales de otros grupos genéticos dentro del continum que forman los clones tipo Nacional en el dendograma apuntarían a soportar esta hipótesis.

- Las características morfológicas fueron más eficientes en separar los genotipos con los distintos grupos genéticos lo cual se deba a que la recolección de los clones de la colección de cacao nacional fue realizada en base a características fonológicas innatas de esta variedad que haría que estos mantengan caracteres discriminates entre genotipos.

- El método de extracción de ADN con MATAB, utilizado en pequeñas muestras de hojas de cacao tanto frescas como secas, permitió obtener altas cantidades de este con un buen grado de pureza. Los rendimientos de ADN obtenidos en promedio fue de 100 ng / ul, y no representaron diferencias entre genotipos.

- Los tres clones de referencia representativos de los grupos Criollo, Forastero y Trinitario, presentaron un bajo grado de similaridad con la mayoría de los clones estudiados. Esto puede atribuir a que los clones seleccionados no son representativos de los materiales correspondientes de los grupos genéticos que se introdujeron a Ecuador.

- El agrupamiento de los clones CCAT y EB entre sí está estrechamente relacionado con su origen geográfico, o lugar de recolección de estos. Lo cual puede indicar que si bien es cierto los clones EB fueron seleccionados recientemente, considerando como un parámetro la edad de la plantación (80-100 años de edad) la información proporcionada por los productores pudo haber sido errónea siendo más bien que los clones tengan un origen común a los CCAT.

- La mayor separación o distribución de los clones y su grado de relación genética observada con la utilización de los marcadores AFLP se debe posiblemente a que las condiciones ambientales tienen influencia sobre las características morfológicas, permitiendo por lo tanto a los marcadores moleculares hacer una mejor caracterización de los clones de cacao estudiados.

- Se determinó que se presenta una alta diversidad genética entre los clones de cacao Nacional y de otros orígenes, esto es una de las razones por las cuales no fue posible obtener grupos genéticamente cercanos.

- A pesar de existir una relación genética alta dentro de los grupos o subgrupos se puede observar que los materiales tienen un amplio rango de variabilidad genética, lo cual permitirá realizar programas de cruzamientos entre los clones más distantes genéticamente pero que mantengan sus características de cacao Nacional.

Para las características Morfológicas.

- La caracterización morfológica permitió definir claramente 16 características cuantitativas y cualitativas como discriminantes para la caracterización de los clones de la colección de cacao Nacional y de otros orígenes de Ecuador.

- Se determinó que tres variables canónicas compuestas por Largo del estilo, Angulo basal, Pigmentación media del estaminoide, Número de óvulos por ovario, Espesor del surco de la mazorca, Peso de la semilla, Espesor del lomo de la mazorca, Relación largo / ancho de la hoja, Relación largo / largo de la base a la parte ancha de la hoja, Largo de la semilla, Sépalo no pigmentados, Mediana pigmentación y el Ancho de la semilla explican el 95,15 % de la variabilidad genética de la población en estudio.

VI. RECOMENDACIONES

- Analizar la población usando un marcador codominante para definir el origen genético de los clones Nacionales o tipos Nacionales y su relación genética, como sucedería con marcadores Microsatélites SSR (Lanaud et al 1999), para completar la información del grado de heterosis de los clones estudiados.

- Seleccionar los clones con mayor porcentaje de disimilaridad pero con características deseables dentro de los grupos Nacionales y de otros orígenes considerando previamente sus características agronómicas de producción y calidad, para implementar trabajos de cruzamientos dirigidos a fin de combinar características deseables y obtener poblaciones de híbridos a ser posteriormente recomendados a los productores.

- Seleccionar los clones de origen genético similar pero que posean diferentes grados de similitud, pues los resultados muestran que estos poseen la variabilidad suficiente para ser utilizados como árboles cabeza de clon.

VII. BIBLIOGRAFIA

Adams, WT. 1993. Application of isozymes in tree breeding. In: Isozymes in plant genetics and breeding. Part A. Tanksley, SPD & Orton, T.J.(eds.) Elservier Science Publishers, Amsterdam pp. 60-64.

Agwanda, CO; Lashermes, P; Trouslot, P; Lombes, M.C; Charrier, A. 1997. Identification of RAPD marker for resistance to coffee Berry Disease, Colletotrichum Kahawae, In Arabic coffee. Euphytica 97: 241- 248.

Allen, JB. 1983. London cocoa trade Amazon project: final report, phase 1. Cocoa Grower's Bulletin 34 : 1 – 71

Ayele, M; Tefera, H; Assefa, K; Nguyen, HT. 1999. Genetic characterization of two *Eragrostis* species using AFLP and morphological traits. Hereditas 130: 33-40.

Arosemena, AG. 1991. El fruto de los Dioses. Origen del Cacao en Ecuador. Guayaquil. Edit Graba. Vol. 1 pp. 24 –27

Bassam, BJ; Caetano-Anollés, G; Gresshoff, PM. 1991. Fast and Sensitive Silver Staining of DNA in Polyacrylamide Gels. Analytical Biochemistry 196: 80-83.

Baker R, ED; Cope, FW; Holliday, PC; Bartley B, GD; Taylor, DJ. 1954. The Anglo-Colombian Cacao Collecting Expedition. Report on Cacao Research, 1953. Imperial College of Tropical Agriculture, Trinidad.

Bartley B, GD. 2000. REFRACTARIO- An Explanation of the Meaning of the Term and its Relationship to the Introductions from Ecuador in 1937. Ingenic newsletter (5) : 10-15

Becker, J; Vos, P; Kuiper, M; Salamini, F; Heun, M. 1995. Combined mapping of AFLP and RFLP markers in barley. Mol. Gen. Genet. 249: 65-73.

Beckman, JS. 1991. Genomic genetics and plant genetic improvement. In: Gene-mapping techniques and applications. Schook, L.B.; Lewin, H.A. & McLaren D.G. (eds.) Marcel Dekker Inc., New York pp.201-230.

Beckmann, JS. & Soller, M. 1990. Toward a unified approach to genetic mapping of eukaryotes based on sequence tagged microsatellite sites. Biotechnology 8:930-932.

Bekele FL; Kennedy, AJ; Mc David, C; Lauckner, B; Bekele, I. 1994. Numerical taxonomic studies on cacao (*Theobroma cacao L*) in Trinidad. Euphytica, 75: 231-240.

Belkhir, K; Borsa, P; Chikhi, L; Raufaste, N. & Bonhomme, F. 1996 – 2001. GENETIX 4.02, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier (France). e-mail : genetix@crit.univ-montp2.fr

Bergmann., JF. 1969. The Distribution of cacao cultivation In Pre-Columbian America. Cacao Cultivation. Annals of the Association of American Geographers, 59: 85-96.

Bostein, D; White, RL; Skolnick, M. & Davis, RW. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. Am. J. Hum. Genet. 32:314-331.

Bowman, GF. 1949. Desarrollo de plantaciones clonales de cacao con material superior. Cacao Information Bulletin, IICA, Turrialba (Costa Rica) 1 (20) : 1-4.

Bowman, GF. 1950. Quality in cacao. Cacao Information Bulletin, IICA, Turrialba (Costa Rica) 2 (5): 1-4.

Bradeau, J. 1975. El cacao 2da ed. (Trad) Angel Hernandez. Madrid, España, Blume pp 26-58; 236-297.

Bradeau, J. 1981. El Cacao, México, Edit. Blume pp. 30-56.

Caetano-Anolles, G; Bassam, BJ. & Gresshoff PM. 1991b. DNA Amplification fingerprinting: a strategy for genome analysis. Plant Mol. Biol. Rep. 4:294-307.

Cervera, M.T; Storme, V; Steenackers, M; Ivens, B; Michiels, B; Gusmao, J; Van Montagu, M; Boerjan, W. 1998. Empleo de marcadores moleculares en el estudio genético y mejora de las especies forestales: Populos In. Identificacion molecular de germoplasma de Vid. pp. 167-175.

Crici, JV; Lopez, MF. 1983. Introducción a la teoría de la taxonomia numérica. Washintong, D.C., Secretaria General de la Organizacional de los Estados Americanos. 132 p.

Crouzillat, D; Lerceteau, E; Pétiar, V; Morera J; Morera, J; Rodriguez, H; Walker, D; Phillips, W; Ronning, C; Scnell, R; Osei, J; Fritz, P. 1996. *Theobroma cacao* L: a genetic linkage map and quantitative trait loci analysis. Theor. Appl., 93 : 205-214.

Crouzillat, D; Bellanger, L; Rigoreau, M; Bucheli, P; Pétiard, V. 2000. Genetic Structure, Characterization and Selection of National Cocoa Compared to Other Genetic Groups. In International Workshop on New Technologies and Cocoa Breeding. Kota Kinabalu, Sabah, Malaysia. pp. 47-64.

Cope, FW. 1958. Incompatibility in cacao. Unpublished paper. 12 p.

Cope, FW. 1976. Cacao. *Theobroma Cacao L.* (Sterculiaceae), IM: Simmonds N. W. (ed). Evolution of Crop Plants . Longman, London and New York, pp. 285-289.

Couch, JA; Fritz, PJ. 1990. Isolation of DNA from plants high in phenolics. Plant. Mol. Biol. Rep 8: 8-12.

Chalmers, WS. 1968. Cacao Germplasm Colleting in the Oriente Region of Ecuador, In Annual Reports on Cocoa Research, Trinidad. Imperial College of Tropical Agriculture / University of the West Indies, Trinidad pp 32 –39.

Chalmers, WS. 1970. Cacao Germplasm Colleting in the Oriente Region of Ecuador, In Annual Reports on Cocoa Research, Trinidad. Imperial College of Tropical Agriculture / University of the West Indies, Trinidad pp 30 –31.

Cheesman, EE. 1944. Notes on the nomenclature, classification and possible relationships of cacao populations. Trop. Agric (Trinidad), 21 (8), 144-159.

Dejean , M. 1984. Floración del cacao. Boletín Informativo del Cacao. (Costa Rica) 1 (3) : 1-3.

End, MJ; Wadsworth, RM; Hadley, P. 1992. International Cocoa Germplasm Database. Departments of Botany and Horticulture, University of Reading, UK 355 P

Engels J, MM. 1983a. A systematic description of cacao clones 1. The discriminative value of quantitative characteristics. Euphytica (Holanda) 32: 377-385.

Engels J, MM. 1983b. A systematic description of cacao clones 2. The discriminative value of quantitative characteristics. Euphytica (Holanda) 32: 387 – 396.

Engels J, MM; Bartley B, GD; Enriquez, GA. 1980. Cacao descriptors their states and modus operanti. Turrialba, 30 : 209-218.

Enríquez, GA. 1966. Selección y estudio de las características de la flor, la hoja y la mazorca, útiles para la identificación y descripción de cultivares de cacao. Tesis. Ma. Sci. Turrialba, Costa Rica. IICA. 97 p.

Enriquez, GA; Soria, VJ. 1967. Cacao cultivars registers. Turrialba, Costa Rica, IICA. Teaching and Research Center. sp.

Enriquez, GA; Soria, J. 1968. The variability of certain bean characteristics of cacao (*Theobroma cacao* L). Euphytica, 17: 114-120.

Enriquez, GA; Soria, VJ. 1987. Selección y estudio de los caracteres útiles de la flor para la identificación y descripción de cultivares de cacao (Costa Rica) 12 (1): 8-15.

Enríquez, GA. 1991. Descripción y evaluación de los recursos genéticos. In Técnicas para el manejo y uso de recursos genéticos vegetales. Castillo, R. Estrella, J. Tapia, C. eds. Editorial Porvenir. Quito, Ecuador. Pp 116-160.

Enríquez, GA. 1992. Characteristics of cacao "Nacional" of Ecuador. International workshop on conservation, characterization and utilization of cocoa genetic resources in the 21 st century. Port-of-Spain, Trinidad. 13-17 th September the cocoa research Unit, the University of the West Indies. Pp 269-278.

Erneholm, I. 1948. Cacao Production of South America. Historical Development and Present Geographical Distribution (Gothenburg: Goteborgs Hogskolas Geografiska Institution) p 53.

FAO, 1988. Annuaire de la production. Collection FAO statistiques # 88. XVII. Rome. Italie.

Ferreira, ME; Grattapaglia, D. 1998. Introducción al uso de marcadores moleculares en el Análisis Genético 1ra ed. Brasilia, DF: EMBRAPA-CENARGEN pp. 220

Figueira, A; Janick, J; Morris, L; Goldsbrough, P. 1992. Genome size and DNA polymorphism in *Theobroma cacao* L. Journal of the American Society for Horticultural Science, 117: 673-677.

Figueira, AJ; Janick, J; Levy, M; Goldsbrough, P. 1994. Reexamining the classification of *Theobroma cacao L.* Using molecular markers. J. Amer. Soc. Hort. Sci 119 (5): 1073 – 1082.

Fowler, RL; López R, GH. 1949. The cacao industry of Ecuador. In Foreign Agriculture Report. Office of Foreign Agricultural Relations U.S. Departament of Agriculture Washinton, D.C. (34) : 1-48.

Fowler, R. 1952. Características de cacao Nacional, Turrialba (Costa Rica), 2 (4) : 161-166.

Gawel, NJ; Jarret, RL. 1991. A modiefied CTAB. DNA extraction procedure for *Musa* and *Ipomoea*. Plant Mol Biol Rep 9: 262-266.

Geps, P. 1995. Genetic markers and core collections. In Core collections of plant genetic resources. Chichester, UK; John Wiley & Sons. pp. 127 – 146.

Gu Chu Yong; Matthew, W; Panaud, O; McCouch, SR. 1996. Cloning and mapping of variety-specific rice genomic DNA sequences: amplified fragment length polymorphisms (AFLP) from silver-stained polyacrylamide gels. Genome 39 : 373-378.

Hamon, S; Dussert, S; Noirot, M; Anthony, F; Hodgkin, T. 1995. Core collections-accomplishments and callenges. Plant Breeding Abstracts 65: 8, 1126-1133.

Hardy, F. 1961. Manual del cacao Turrialba, Costa Rica, Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas 362 p.

Hillis, D. 1987. Molecular versus morphological approached systematics. Annual Review of ecological and Systematics 18: 23.

Hubert, L. 1983. Inference procedures for the evaluation and comparison of proximity matrices. *In* Felsenstein, J. (ed.) Numerical taxonomy. NATO ASI series, Vol. G1. Springer-Verlag, Berling. S.P pp. 209 – 228.

ICCO (Organización Internacional del Cacao). 1999. Programa del cacao sostenible. In boletín de cacao de la ICCO Londres. Reino Unido SIN 1353-4572.

ICCO (Organización Internacional del Cacao). 2001. Producción mundial de cacao. Servicio de Información Agropecuaria del Ministerio de Agricultura y Ganadería del Ecuador. 2 p.

International Board for Plant Genetic Resources. 1981. Genetic resources of cocoa Roma, (IBPGR, # APG: IBPGR/80/156) 25 p.

Jofuku, KD; Goldberg, RA. 1988. Analysis of plant gene structure, In: Shaw CH (ed.), Plant Molecular Biology- A Practical Approach, pp. 37-66. IRL Press, Oxford

Keim, P; Shoemaker, CC. & Palmer, RG. 1989. Restriction fragment length polymorphism diversity in soybean. Theor. Appl. Genet. 77: 786-792

Knight, R. & Rogers, HH. 1955. Incompatibility in *Theobroma cacao*. Heredity 9 (1) : 69-77.

Kovach, WL. 1999. MVSP – A Multi Variate Statistical Package for Windows, *ver.* 3.1. Kovach Computing Services, Pentraeth, Wales, U.K. pp. 44 – 49.

Lanaud, C. 1987. Nouvelles donnees sur la biologie du cacaoyer (*Theobroma cacao L.*), diversité des populations, systemes d'imcompatibilite, haploides spontanés. Leurs consequences pour l'amélioration génetique de cette espéce. Doctorat d'état, Paris IX.

Lanaud, C; Risterucci, AM; N'Goran A, KJ; Clément, D; Flament, MH; Laurent, V; Falque, M. 1995. A genetic linkage map of Theobroma cacao L. Theor. Appl. Gen., 91 : 987-993.

Laurent, V; Risteuricci, AM; Lanaud, C. 1993. Variability for nuclear ribosomal genes within *Theobroma cacao*. Heredity 71: 96-103.

Lefort-Busson, M; De Vienne, D. 1985. Les distances genetique. Versailles, France. INRA.

León, J. 1997. Botánica de los cultivos tropicales, San José Costa Rica, IICA.

León, O. 1998. Marcadores moleculares: principales tipos, bases moleculares, ventajas y limitaciones. In Uso de los marcadores moleculares en la genética y la selección de las plantas. Eds. M. Cordine; H. Olivares; D. Planas. Habana, Cuba. pp. 1-18.

Lerceteau, E; Crouzillat, D; Petiard, V. 1992. Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) and restriction fragment length polymorphism (RFLP) to evaluate genetic variability within the *Theobroma genus*. International workshop on conservation, characterization and utilization of cocoa genetic resources in the 21st century. Port-of-Spain, Trinidad. 13-17 th September. The cocoa research Unit, The University of the West Indies. Pp 332 –344.

Lerceteau, E; Flipo, S; Petiard, V; Crouzillatt, D. 1996. Genetic, Diferentation Among Ecuadorian Theobroma Cacao L. Accesiones Using Molecular and Morphological Analisis. In Diversite genetique, recherché de QTL et analyse des profiles proteiques de feves de *Theobroma cacao L.* Pendant la fermentation. Consequences sur la qualite. (France) 50-68 p.

Lerceteau, E; Quiroz, J; Soria, J; Flipo, S; Pétiard, V; Crouzillat, D. 1997. Genetic differentiation among Ecuadorian Theobroma cacao L. accessions using DNA and morphological analyses. Euphytica 95 : 77-87.

Lerceteau, E; Rober, T; Pétiard, V; Crouzillat, D. 1997. Evaluation of the extent of genetic variability among Theobroma cacao L accessions using RAPD and RFLP markers. Theor. Appl. Gen., 95 : 10-19.

Life-Technologies TM 1997/1998. Markers and Standars. 50 bp DNA Ladder. *In* Gibco BRL Products & Reference Guide. 16-3 http://www.lifetech.com

Liscum, M; Oeller, P. 1997. AFLP: not only for fingerprinting, but for positional cloning. Department of Plant Biology Carnegie Institution of Washington Stanford, CA 94305. pp 1-11.

Litt, M. & Luty, JA. 1989. A hypervariable microsatellite revealed in Vitro amplification of a dinucleotide reap within the cardiac muscle act in gene. Am. J. Hum. Genet 44: 398-401.

Lizárraga., De Reginaldo. 1908. Descripción y Población de las Indias (Lima: Imprenta Americana p 12.

Lopez, OB. & Enriquez, GA. 1988. Inheritance of dry weight and bean shape in cacao. Proceedings of the 10th International Cocoa Research Conference, Santo Domingo, Dominican Republic, 1987. pp. 691-694.

Lopez, B. O; Mendez, WD. 1992. Caracteristicas de la flor y semilla del germoplasma de cacao, *Theobroma cacao* L. Seleccionado en Rosario Izapa, Chiapas. *In* Agric. Téc. Méx. Vol 18 (1-2): 39-48.

Maheswaran, M; Subudhi, PK; Nandi, S; Xu, JC; Parco, A; Yang, DC and Huang, N. 1997. Polymorphism, distribution, and segrgation of AFLP markers in a doubled haploid rice population. Theor Appl Genet. 94: 39-45

Mantel, N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. Cancer Res. 27: 209-220.

Martínez, O. 1995. Métodos estadísticos multivariados en biología molecular y su aplicación en investigación agrícola. *In* Agronomía Colombiana XII: 66-71

Mariaca, MR; Hernández, XE. 1992. Origen y Domesticación del Cacao (Theobroma cacao L.), Tierra y Agua La Antropología en Tabasco. 3 : 7-16.

Maughan, PJ; Saghai Maroof, MA; Buss, GR; Huestis, GM. 1996. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) in soybean: species diversity, inheritance, and near-isogenic line analysis. Theor. Appl. Genet. 93 : 392-401.

Moore, SS; Sargeant, LL; King, TJ; Mattick, JS; Georges, M. & Hetzel D, JS. 1991. The conservation of dinucleotide microsatellites among mammalian genomes allows the use of heterologous PCR primer Paris in closely related species. Genomics 10:654-660.

Motamayor, JC. 2001. Etude de la diversité génetique et de la domestication des cacaoyers du groupe Criollo (*Theobroma cacao L*), á l'aide de marqueurs moléculaires. These Le Grade de Docteur en Ciences de L'Universite Paris XI Orsay. pp. 91 – 93.

Motamayor, JC; Risterucci, AM; Lopez, PA; Moreno, A; Lanaud, C. 2001a. cacao domestication I: Genetic evidence of a South American origen and domestication of *Theobroma cacao* L. (submitted to Heredity)

Mueller, UG; Wolfenbarger, L. 1999. AFLP genotyping and fingerprinting. *TREE*, 14 (10): 389-393.

Nei, M; Li, W. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76: 10 5269-5273

N'goran, JA; Laurent, V; Risterucci, AM; Lanaud, C. 1994. Comparative genetic diversity studies of Theobroma cacao L. using RFLP and RAPD markers. Heredity, (73): 589-597.

Nosti, NJ. 1953. Cacao, Café y Te. Barcelona, España, Salvat. P 1-137 p.

Ostendorf, FW. 1965. Identifying characters for cacao clones Crop. *In*: Reuniao do Comite Técnico Interamericano do Cacau, VI. Salvador, Bahía, Brasil p. 89-110.

Paran, L; Vessel, R. & Michelmore, R. 1991. Identification of restriction fragment length polymorphism and random amplified polymorphic DNA markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce, using nearisogenic lines. Genome 34:1021-1027.

Peeters, JP; Martinelli, JA. 1989. Hirarchical cluster analysis as a tool to manage variation in germplasm collections. Theor. Appl. Genet. 78: 42 – 48.

Perry, MD; Davey, MR; Brian Power, J; Lowe, KC; J Bligh, HF; Roach, PS; Jones, C. 1998. DNA Isolation and AFLP ™ Genetic Fingerprinting of *Theobroma cacao* L. Plant Molecular Biology Reporter 16: 49-59.

Phillips-Mora, W; Rodríguez, H; Fritz, PJ. 1995. Marcadores de ADN: Teoría, Aplicaciones y Protocolos de trabajo. Unidad de Biotecnología Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, CATIE, Turrialba, Costa Rica. 183 p.

Prescott., W.H 1843 History of Conquest of Peru (first-editions)

PROMEGA 2000 SILVER SEQUENCE ™ DNA Sequencing System. Technical Manual # 023. 24pp. http://www.promega.com.

Pound, FJ. 1932. The genetic constitution of the cacao Crop. In: Imperial College of Tropical Agriculture, Trinidad. Annual report on cacao Research, II. P. 27-29.

Pound , FJ. 1938. Cacao and Witchbroom disease (*Marasmius perniciosus*) of South America with notes on other species of *Theobroma*. Yuille's Printery. Port-of – Spain, Trinidad and Tobago. Reprinted 1982 in Arch. Cocoa Res., 1:20-72.

Quiroz., J. 1997. Recolección de genotipos y establecimiento de un banco de germoplasma de cacao Nacional en Ecuador. Quito, Ecuador, INIAP Estación Experimental Tropical Pichilingue. Boletín Técnico # 75 12p.

Quiroz, J; Suárez, C; Decazy, B. 1996. Recolección y Selección de Cacao Nacional con resistencia a enfermedades en Ecuador In International Workshop on the Contribution of Disease Resístanse to Cocoa Variety Improvement, Salvador, Brazil pp. 123 – 126.

Quiroz, J; Soria, J. 1994. Caracterización fenotípica del cacao Nacional del Ecuador. Quito, Ecuador. INIAP Estación Experimental Tropical Pichilingue. Boletín Técnico # 74

Risterucci, AM; Grivet, L; N'Goran J, AK; Pieretti, I; Flament, MH; Lanaud, C. 2000. A high-density linkage map of *Theobroma cacao L.* Theor Appl Genet 101: 948 – 955.

Ronning, CM; Schnell, RJ; Kuhn, DN. 1995. Inheritance of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) markers in Theobroma cacao. J. Am. Soc. Hort. Sci 120: 681-686.

Rorer, BJ. 1914. Enfermedades y Plagas del Cacao en el Ecuador y Metodos Modernos Apropiados al Cultivo del Cacao. *In* Informe presentado al Presidente y Miembros de la Asociación de Agricultores del Ecuador. 80 p.

Rouppe van der Voort, JN.A.M; VanEck, HJ; Draaistra, J; van Zandvoort, PM; Jacobsen, E; Bakker. J. 1998. An online catalogue of AFLP markers covering the potato genome. Mol. Breed. 4: 73-77.

Saiki, RK; Gelfand, DH; Stoeffel, S; Shcarf, SJ; Higuchi, G; Horn, GT; Mullis, KB & Erlich, HA. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Sience 239: 487-491.

Saunders, JA; Hemeida, AA; Mischke, S. 2000. USDA DNA Fingerprinting Programme for Identification of Theobroma cacao Accessions. In International Workshop on New Technologies and Coccoa Breeding. Kota Kinabalu, Sabah, Malaysia 16-17 October 2000. 108-114.

Simpson, J. 1997. Amplified Fragment Length Polymorphisms (AFLP's) *In* Bol. Soc. Bot. Mexico 60: 119-122

Sneath, HF; Sokal, RR. 1973. Numerical Taxonomic. The principles and practice of numerical classification. Eds. D. Kennedy; R. B. Park. San Francisco, W. H. Freeman. 573 p.

Soller B, WS. & Beckmann, JS. 1983. Genetic polymorphism in varietal identification and genetic improvement. Theor. Appl. Genet 67:25-33.

Soria, VJ. 1966. Principales variedades de cacao cultivadas en América Tropical. Turrialba (Costa Rica) 16 (3): 261-266.

Soria, VJ. 1967. Notas sobre las principales variedades de cacao cultivadas en América Conférence international sur les recherches agronomiques cacaoyeres, Abidján, 15-20 novembre 1965. Paris pp. 247-253.

Soria, VJ. 1970a. The latest cocoa expeditions to the Amazon basin. Cacao (Turrialba) 15: (1) 5-15.

Soria, VJ. 1970b. Tendencias de la variabilidad de algunas caracteristicas de los frutos, flores y semillas en los cacaos nativos de la hoya amazonica.Cacao. Instituto Ineramericano de Ciencias Agricolas OEA. Centro de Enseñanza e Investigación. Turrialba-Costa Rica. Vol. XV : 1.

Soria, VJ. 1987. Selección y estudio de los caracteres útiles de la flor para la identificación y descripción de cultivares de caco. Revista Costa Rica 12 (1): 8-16.

Soria, VJ. 2002 Breve historia del cultivo de cacao en el Ecuador. Inicios del Cultivo. pp. 1-4.

Stockdale, FA. 1928. An examination of the type forms of fruit presents in the progeny of a simple forastero cacao. Tropical Agriculturist 71 (6) : 328-342.

Stone, D. 1984. "Pre-columbian Migration of *Theobroma cacao L.* and Manihot esculenta Grantz from Northern South America into Mesoamerica: A partially Hypotetical View". Pre-columbian Plant Migration, D. Stone, (Ed.) Harvard University Press, pp 67-84

Taba, S. 1991. Caracterización y evaluación de germoplasma de maíz. In Técnicas para el manejo y uso de recursos genéticos vegetales. Castillo, R. Estrella, J. Tapia, C. eds. Editorial Porvenir. Quito, Ecuador. Pp. 161 – 166.

Tanksley, SD. & Orton, TJ (eds.). 1983. Isozymes in plant genetics and breeding (Parts A & b). Elsevier Science Publishers, Amsterdam.

Tanksley, SD; Ganal, MW. & Martin, GB. 1995. Chromosome landing: a paradigm for map-based gene cloning in plants with large genomes. Trends in Genetics 11(2) 63-68.

Thomas, CM; Vos, P; Zabeau, M; Jones, DA; Norcott, KA; Chadwick, BP; Jones J, DG. 1995. Identification of amplified restriction fragment polymorphism (AFLP) markers tightly linked to the tomato Cf-9 gene for resistance to *Cladosporium fulvum*. Plant J. 8: 785-794.

Uggen, JF. 1993. Tenencia de la tierra y movilizaciones campesinas. Zona de Milagro, ACLAS, Quito, p. 41.

Urquhart, DH. 1963. Cacao Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de la O.E.A Turrialba – Costa Rica. 322 p.

Vera, J. 1993. Antecedentes históricos . In manual del cultivo de cacao. Quevedo, Ecuador. Estación Experimental Tropical Pichilingue. Manual 25 p. 6

Vos, PR; Hogers, M; Bleeker, M; Reijans, T; Van de Lee, M; Hornes, A; Freijters, J; Pot, J; Peleman, M; Kuiper and Zabeau, M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Res 23: 4407-4414

Ward, jr. JH. 1963. Hierarchical grouping tooptimize an objective function. Journal of the American statistical Association (EEUU) 58 : 236 – 244.

Warren, JM. 1994. Isozyme variation in a number of population of *Theobroma cacao L.* Obtained through various sampling regimens. Euphytica 72: 121-126.

Weising, K; Weigand, F; Driesel, AJ; Kahl, G; Zischeler, H. & Epplen, JT. 1989. Polymorphic simple GATA/GACA repeats in plant genomes. Nucl. Acid Res. 17:120-128.

Welsh, J. & McClelland, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acids Res. 18:7213-7218.

Williams, JG; Kubelik, AR; livak, KJ; Rafalski, LA. & Tingey, SV. 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids res. 18:6531-6535.

Williams J, GK; Rafalski, JA & Tingey, SV. 1993. Genetic analysis using RAPD markers. Methods Enzymol. 218:704-740.

Wishart, D. 1969. An algorithm for hierarchical classification. Biometrics (EEUU) 22 (1) : 165 – 170.

Wood G, AR. 1957. Report on cacao growing in The Dominican Republic, Mexico, Guatemala and Costa Rica, Gran Bretaña, Cadbury Bro. LTD.

Wood G, AR; B.A, DTA. 1959. El cacao en Ecuador. *In* Notes on Three cocoa Diseases, Cocoa-Growing in Venezuela, Colombia and Ecuador. Cadbury Brothers LTD. Bournville. pp 35 – 52.

Wood G, AR. 1979. Cacao Londres, Logman.

Yamada M. 1991. Genetic studies in cacao (Theobroma cacao L.), Ph. D. Thesis University of Wisconsin-Madison 179 p.

Yeh, F; Yang, R; Boyle, T. 1997. PopGene version 1.21. Microsoft window-based freeware for population genetic analysis. A joun project development by Francis C. Yeh and Rang-Yang, University of Alberta and Tim Boyle, Center for International Forestry Research

Yu, Gong-Xin and Wise, RP. 2000. An anchored AFLP- and retrotransposon-based map of diploid Avena. Genome 43: 736-749.

Zambrano M, JE. 2000. Caracterización fonológica de 67 genotipos de cacao (*Theobroma cacao L*) tipo nacional y de otros orígenes en la colección de la Estación Experimental Tropical Pichilingue-INIAP. Tesis Ing Agr. Manta Manabí Ecuador. Facultad de Ciencias Agropecuarias Escuela de Ingeniería Agropecuaria. Universidad Laica "Eloy Alfaro" de Manabí. 61 p.

XIII Anexos

Anexo 1

Protocolo de extracción de ADN para Cacao

1. - Colocar en un mortero un disco de hoja madura de cacao de un centímetro de diámetro (Punta de espátula)

2. - Agregar 1 ml de tampón de extracción sorbitol + bisulfito de sodio frió (ph 7,5), macerarlo con un pistilo hasta obtener un macerado uniforme, añadir 1 ml del mismo tampón y decantar en un tubo eppendorf de 2 ml de capacidad.

3. - El disco de hoja macerado se centrifuga a 5000 rpm durante 10 minutos a 0^0C.

4. - Decantar el sobrenadante, escurrir y se resuspende el precipitado en 800 ul de tampón MATAB. Se agita brevemente en el vortex. (en esta fase los tubos se pueden congelar y continuar con el paso siguiente posteriormente, paso 5)

5. - Los tubos conteniendo el ADN se incuban durante 2h a 65^0C en un baño de maría.

6. - Agregar a cada tubo 800 ul de cloroformo alcohol isoamílico (CIAA), y hacer una emulsión y centrifugar a 5000 RPM durante 10 minutos.

7. - Recuperar la fase acuosa en un nuevo tubo conteniendo 100 ul de RNA-ase, e incubar los tubos por 30 minutos a 37^0C (baño de María)

8. - Para precipitar el ADN se agrega 800 ul de isopropanol frío, agitando por inversión el tubo eppendorf y se coloca por dos horas en el congelador a -20^0C.

9. - Centrifugar a 6000 rpm durante 10 minutos, vaciar y escurrir el sobrenadante. Observar la presencia de un precipitado (pelet), dejar los tubos abiertos boca abajo para eliminar el remanente de isopropanol por evaporación.

10. - Lavar el precipitado con etanol al 70%, agregando 1000 ul para luego dejar en reposo por espacio de 10 minutos (Agitar en un bortex)

11. - Centrifugar adicionalmente a 8000 RPM / 10 minutos, a 0^0 C.

12. - Secar el precipitado por una hora a temperatura ambiente y resuspender en agua ultra pura (200 ul), usando el vortex para disolver el precipitado y dejar 1 hora en solución, (Se puede dejar a 4 ^{0}C por una noche)

13. - Posteriormente verificar la concentración de ADN en un gel de agarosa al 0.8 %.

Anexo 2

Protocolos para preparar la solución de Tampón MATAB (Mixed Alkyltri-Methylammoníum Bromide), y Tampón SORBITOL.

Tampón MATAB

Reactivo	Molaridad	Peso / 100 ml
TRIS	0.1 M	1.21 g
NaCl	1.25 M	7.30 g
MATAB	4 %	4.0 g
EDTA	0.02 M	0.74 g

Tampón SORBITOL pH = 8

Reactivo	Molaridad	Peso / 100 ml
SORBITOL	0.35 M	6.37 g
TRIS	0.1 M	1.21 g
EDTA	0.005 M	0.188 g
Bisulfito de Sodio	0.5 %	0.5 g

Anexo 3

Preparación para la mezcla de digestión del ADN.

Reactivo	Concentración	Fabricante	Cantidad / tubo	Para 63 muestras
EcoRI	10 u / ul	Gibco BRL	0.2 ul	12.6 ul
MseI	5 u / ul	Gibco BRL	0.2 ul	12.6 ul
Tampón	T4 ligase 5X	Gibco BRL	5.0 ul	315 ul
Agua para AFLP			14.4 ul	907.2 ul
ADN	10 ng / ul		5.0 ul	
Total			25 ul	1247.4 ul

Preparación.- Distribuir la mezcla de digestión dentro de los tubos de 0.5 ml no estéril para lo cual se debe usar un Vortex y efectuar el siguiente programa en un Termociclador.

Programa para la digestión del ADN.

37 ^{0}C ---------- 2 Horas
70 ^{0}C ---------- 15 Min.
4 ^{0}C ---------- 4 Min.

El ADN de cada muestra se agrega independientemente a cada tubo que contiene la mezcla de digestión.

Anexo 4

Preparación de las soluciones de adaptadores de *EcoRI* y *MseI* para la digestión del ADN.

Adaptador EcoRI	Concentración	Volumen
Oligo 1 *EcoRI*	100 ng / ul	17 ul
Oligo 2 *EcoRI*	100 ng / ul	15 ul
Tampón Ligase	5X Gibco	12 ul
Agua para AFLP		16 ul
Total		60 ul

Adaptador *MseI*	Concentración	Volumen
Oligo 1 *MseI*	1 ug / ul	16 ul
Oligo 2 *MseI*	1 ug / ul	14 ul
Tampón Ligase	5X Gibco	12 ul
Agua para AFLP		18 ul
Total		60 ul

- Calentar a 95 ^{0} C durante un minuto y dejar enfriar a temperatura ambiente.

NOTA: Estas soluciones deben ser preparadas siempre y cuando no se compre el Kid de AFLP.

Anexo 5

Protocolos de PCR para AFLP (Polimorfismo de Longitud de Fragmentos Amplificados) utilizados en la caracterización genética de cacao Nacional (tinción con nitrato de plata).

Después de obtenido el ADN de las 63 muestras en estudio se procedió a efectuar la dilución de estas en una proporción de un medio de la concentración original (½), colocándose 150 ul de agua ultra pura para AFLP y 150 ul de ADN obteniéndose un volumen total de 300 ul (Tubos blancos)

Digestión.- Utilizando tubos bien identificados (pueden ser color rosado), se procedió a efectuar lo siguiente:

1) Mezcla de Digestión	ul / muestra	Total / 63 muestras
5X reacción Buffer	5	315
Enzimas EcoRI/MseI	2	126
H_2O AFLP	13	819
Total	**20.0 ul**	**1260 ul**
2) Mezcla de Digestión	20.0 ul	
ADN (50 ng/ ul)	5.0 ul	
Total	**25.0 ul**	

3) PCR de Digestión

a) 37^0C 2 horas

b) 70^0C 15 min.

4^0C Colocar los tubos en hielo.

Ligación.- Utilizando el mismo tubo de la digestión

Preparación para la mezcla de ligación.

-Agitar el tampón ligasa en un vortex, tratando de conservar el volumen necesario.

-Agitar los compuestos de la solución y voltear suavemente el tubo, el T4 Ligase es muy frágil.

1) Mezcla de Ligación	ul / muestras
Adaptador ligación	24 ul
T4 DNA Ligase	1 ul
Volumen total	25 ul

2. - Distribuir la mezcla dentro de los tubos, procedentes de la digestión:

Mezcla de ligación	25 ul
ADN digerido	25 ul
Total	**50 ul**

3. - Ejecutar el programa de PCR para ligación.

a) 37^0C 3 horas

b) 60^0C 10 minutos

c) 4^0C

Una vez retirados los tubos del termociclador se pueden colocar los tubos en el congelador dejándolos hasta el día siguiente de ser necesario. En esta fase se debe preparar un gel de agarosa al 1 % para realizar la verificación de la reacción de digestión ligación. (Anexo 7)

Utilizar el buffer de TBE 1X para electroforesis y en cada pozo del gel se depositan 10 ul del producto de la digestión / ligación más 5 ul de Bromofenol azul (Glicerol), al 50 %.

Preamplificación.

Diluir las muestras producto de la digestión-ligación en una reacción de 1/10 utilizando agua AFLP (Por ejemplo 10 ul de ADN + 90 ul de agua), identificar los tubos apropiadamente.

Preparar la mezcla de preamplificación.

Para preparar la mezcla de preamplificación identificar los tubos apropiadamente.

1) Mezcla de preamplificación	ul / Muestra	63 muestras.
Mezcla de indicadores de preamplificación.	10.0 ul	630
Tampón PCR 10X para AFLP	1.25 ul	78.75
Taq ADN polymeraza (1 U/ ul)	0.05 ul	3.15
Total	**11.30 ul**	

Agitar y distribuir las mezcla dentro de los tubos de 0.5 ml (Estériles)

Adicionar ADN (Dilución 1/10) 1.25 ul.

Agitar antes de efectuar el siguiente programa:

94^0C por 30 seg.

56^0C por 1min

72^0C por 1 min.

20 Ciclos

NOTA: Cada ciclo dura 4 minutos 12 segundos. El total de los 20 ciclo dura 1 hora 24 min.

Verificación de la preamplificación.- Se toman 4 ul del producto de preamplificación, más 10 ul de colorante (Bromofenol), y se coloca en un gel de agarosa al 1 % para la verificación respectiva.

Amplificación selectiva.

Diluir en una proporción de 1/10 el producto de la reacción de preamplificación (5 ul de ADN preamplificación + 45 ul de agua AFLP), identificar apropiadamente los tubos de amplificación.

1) Mezcla de amplificación:	ul / muestra	63 muestras
Agua grado AFLP	3.41	214.83
Iniciador EcoRI (27.8 ng / ul)	0.09	5.67
Iniciador MseI (6.6 ng / ul)	2.25	141.75

Tampón PCR 10x para AFLP.	1.00	63.00
DNA Taq polimeraza (5 u/ul)	0.05	3.15
Total	**6.80**	

Se recomienda preparar la mezcla considerando un 5 % más.

Agregar 3.0 ul de ADN preamplificado (dilución 1/10)

Ejecutar el programa de PCR de amplificación.

Ciclo 1	94°C por 30 seg.
	65°C por 30 seg. – 0.7°C / seg.
	72°C por 60 seg.
Ciclo 2 –13	94°C por 30 seg.
	65°C por 30 seg.
	72°C por 60 seg.
Ciclo 14 – 36	94°C por 30 seg.
	56°C por 30 seg.
	72°C por 60 seg.

Después de la amplificación agregar 10 ul de azul AFLP, el producto de la amplificación puede conservarse en un congelador (-20 °C), hasta el día siguiente.

Desnaturalización.- Antes de iniciar la electroforesis en el gel de Poliacrilamida al 6 % con urea al 7 % (Anexo 8) se debe realizar una desnaturalización de las muestras y retirarlas cuando han alcanzado la temperatura de 72°C, e inmediatamente después colocarlas en el gel para la electroforesis.

Anexo 6

Preparación de varias formulaciones usadas en el proceso de aplicación de marcadores AFLP.

A) Formulaciones de azul para AFLP:

Azul Formamide:	Volumen / 50 ml
Formamide 98 %	49 ml
EDTA 10 mM	186 mg,
Azul de Bromefenol	150 mg
Xylene Cyanol	1 Pizca (Punta de espátula)

B) EDTA 0.5 M – ph 8, para la preparación de las soluciones de trabajo (Buffer de electroforesis)

EDTA	186 g
Na OH (pellet)	20 g
H_2O Aforar a....	1000 ml

C) TBE 10x para la electroforesis

Tris	216 g
Ácido Bórico	55 g
EDTA (0.5 Mph_8)	40 ml + H_2O 1000 mm.

D) Azul de bromofenol al 50 %

Azul de Bromofenol	125 mg
EDTA 0.5 M (ph 8)	10 ml
Glycerol	25 ml
Agua destilada	15 ml (Para completar)
Total	**50 ml.**

Anexo 7

Preparación de Gel de Agarosa.

Reactivos:

TBE, Buffer (10X)	12.0 cc
Agua destilada	108.0 cc
Agarosa	1.2 gr.

Colocar esta solución en el Microondas por el espacio de 4 minutos.

Pasos previos:

Antes de la preparación del Gel de agarosa se debe realizar los siguientes pasos:

- Preparar la bandeja, colocándole un recipiente (porta-bandeja), donde se ubicara los peines.
- Agregar 40 ul de bromuro de Etidio a una concentración de 0.0000001 % (1 ug por 1000 cc), presionando la tapa de la botella que lo contiene y evitando salpicar fuera de la cubeta. (Altamente toxico)
- Calentar la solución de agarosa colocada en un erlenmeyer en el horno microondas por 3 minutos a 90 ^{0}C, esperar a retirar el pirex del microondas
- Retirar el erlenmeyer del horno microondas usando un guante de caucho, de forma inclinada con la boca hacia fuera del cuerpo con el objeto de evitar absorber los gases emitidos por este.
- Agregar el contenido del erlenmeyer en forma circular sobre la bandeja conteniendo el bromuro de etidio a fin de distribuirlo uniformemente.
- Colocar los peines en las ranuras de las bandejas
- Esperar a que el gel solidifique (Aproximadamente 20 minutos)
- Retirar los peines
- Colocar el gel en la cámara de electroforesis.
- Colocar la solución conteniendo el ADN en el gel
- Conectar la cámara horizontal Kodak BIOMAX-MP.1015. a la fuente de poder y dejar correr por espacio de 20 minutos, a 100 watts y 50 miliamperios.

Anexo 8.

Preparación del gel de acrylamida.

Primer paso.- Preparación de la solución de Acrylamide/ bis-Acrilamide 6%.

Producto	Para seis geles.
Urea	250 gr.
Acryl amide / bis- Acrylamida (40%) 19/1	75 ml
Agua desionizada y destilada.	175 ml
TBE 10X	50 ml
Volumen Total.	**500 ml**

Esta solución básica para la preparación de geles de acrylamide debe colocársela en un envase ámbar utilizando un embudo y un filtro.

Segundo paso.- Limpieza de Vidrios.

1. - Limpiar los vidrios (Corto y Largo), muy bien con agua y jabón.
2. - Eliminar el jabón con abundante agua fría y caliente luego remojarlos con agua desionizada y destilada.
3. - Lavarlos con cloroformo.
4. - Limpiar los vidrios cambiando el papel (Kleenex), para cada vidrio con agua desionizada.
5. - Limpiar los dos vidrios con Etanol absoluto (Alcohol 99%), utilizando un papel (Kleenex), para cada vidrio.

A.- Agregar 2 ml de repulsivo SIGMACOTE al vidrio más grande, y distribuirlo uniformemente sobre todo el vidrio.

- Dejar secar 4 a 5 minutos y luego limpiar nuevamente usando alcohol al 99% y utilizar papel (Kleenex), para eliminar el exceso de producto Sigmacote.

Nota: Mantener ambos vidrios bien identificados con etiquetas para trabajar siempre del mismo lado.

B.- Preparación de la solución atractiva:

- 1 ml de Etanol al 95 %
- 3 ul de Bind Silane (methacryloxipropyltri-methoxysilane)
- 5 ul de Ácido Acético Glacial

Mezclar para homogenizar

Preparar en dos tubos de 1.5 ml, para ser agregados al vidrio pequeño.

- Repetir los primeros cuatro pasos de la limpieza en el vidrio pequeño.
- Agregar y distribuir la solución atractiva sobre todo el vidrio pequeño con un papel Kleenes.
- Eliminar el exceso de atractivo, agregando dos ml de Etanol y limpiarlo con un papel (Kleenex), de forma vertical y Horizontal, repitiéndolo 3 veces cambiando de papel Kleenex cada vez.

Pasos previos a la preparación del gel:

1. - Limpiar las guías (Blancas), con Etanol Absoluto y colocarlos sobre los extremos del vidrio grande con la espuma hacia arriba.

2. -Levantar el vidrio corto sin tocar la parte interna y colocarlo sobre el vidrio largo tocando la espuma de los separadores o guías.

3. - Sostener los vidrios con las prensas de metal.

4. - Colocar cinta adhesiva, en la base de los vidrios.

5. - Colocar el soporte o empaque de hule (Azul), prensando los dos vidrios. Importante que los pies del empaque queden hacia abajo.

6. - Presionar para que se ajuste bien los vidrios con el empaque.

C.- Preparación de la solución de persulfato de amonio al 10 % (10 mg / 1 ml)

Preparar para cada semana de trabajo.

a.- Utilizar una botella limpia de 80 ml.

b.- Agregar 80 ml de solución Acrylamide/ bis-Acrylamide al 6%

c.- Colocar 300 ul de Persulfato al 10 %

d.- Agregar 30 ul de TEMED agitar y chorrear.

7. - Chorrear la solución de acrilamida rápidamente doblando los vidrios hacia un extremo, para evitar que gelifique la acrylamida.

8. - Se coloca el espaciador (Peine), en el centro del gel, aproximadamente hasta la mitad de los huecos, dentro de la lamina del mismo, y ajustarla con prensas (cuatro), para una mejor formación del pozo.

9. - Dejar secar por espacio de una hora como mínimo.

Preparación de la cámara de electroforesis.

1. - Colocar los vidrios con todo y empaque en una cubeta, se lava con agua caliente para eliminar el exceso de urea, limpiando cuidadosamente los bordes y extremos.

2. - Se desprende el empaque de hule y se lava.

3. - Luego con una toalla en la mesa se seca cuidadosamente el vidrio por ambos lados.

4. - Colocar los vidrios en la cámara, revisando previamente que la guía de hule tenga un poco de silicone y se ajusta el vidrio.

Importante cerrar la llave que sirve para drenar la cámara ubicada a mano derecha.

5. - Agregar el buffer TBE 1X (preparado a partir de la solución 10X), aproximadamente 500 ml para cada contenedor. Revisar que no existan fugas.

6. - Extraer el separador (peine), y encender la fuente de poder, con el siguiente ajuste previo.

- Voltaje 3000 Volts
- Amperaje 300 mA
- Watts a 50 para la migración y para el calentamiento previo 70 watts.

Se debe verificar la presencia de burbujas y mantenerse el paso previo de calentamiento por espacio de 15 a 20 minutos.

Durante este lapso utilizando una jeringuilla se toma parte del buffer y extraer la urea remanente dentro del poso (Dos o tres veces)

Denaturalización (Termociclador GENE AMP PCR System 9700)

Programa denatura:

94^0 C por dos minutos.

72^0 C Indefinidamente

Este paso se realiza inmediatamente antes de colocar las muestras en el gel de acrylamida.

7. - Lavar para eliminar el exceso de urea con una jeringa antes de colocar el peine.

8. - Colocar el peine con las puntas hacia abajo, cuidadosamente teniendo cuidado de que apenas toque el gel de acrylamida.

9. - Ajustar la potencia a 50 watts.

10. - Retirar las muestras del Termociclador cuando están a 72^0 C.

11. - Colocar la fuente de poder en "Stop" para colocar las muestras.

12. - En los extremos del gel colocar colorante AFLP.

13. - Colocar aproximadamente 7 a 8 ul de cada reacción en cada poso he inmediatamente se ensiende la fuente de poder y se ajusta a 50 watts.

14. - Apagar la fuente de poder cuando el azul de bromo fenol sale completamente del gel (1:45 a 2:00 horas aproximadamente)

15. - Abrir la llave para drenar la cámara colocada en su extremo inferior derecho, posteriormente retirar el peine y luego sacar los vidrios de la cámara.

16. - Colocar los vidrios sobre la mesa con el extremo corto hacia abajo, retirar los espaciadores y luego se separan utilizando para el efecto una espátula insertándola en uno de los extremos de estos.

Revelado del gel de poliacrylamida.

1. - Fijación con ácido acético al 10%, para lo cual se coloca el vidrio pequeño dentro de una cubeta en la cual se adiciona un litro de la solución antes indicada, colocarlo en un ajitador orbital automático, agitar por 20 minutos a 95 rpm.

2. - Preparar tres cubetas con un litro de agua desionizada y destilada cada una

3. - Terminada la Fijación se coloca el gel por el espacio de 2 a 3 minutos en cada una de las cubetas removiendo constantemente (para remover el exceso de ácido acético)

Nota.- El ácido acético utilizado en la fijación se recoge en un recipiente para luego utilizarlo para fijar el gel después de la tinción con nitrato de plata.

4. - Preparación de la solución de nitrato de plata ($AgNo_3$) al 1 %:

a.- Un gramo de nitrato de plata.

b.- 1.5 ml de Formaldehído

c.- Un litro de agua desionizada y destilada.

5. - Colocar el gel en una cubeta donde se agrega la solución de nitrato de plata al 1 % y agitar a 85 r.p.m. por el espacio de una hora en un agitador orbital.

6. - Lavar el gel en agua desionizada y destilada por 3 segundos (muy rápidamente)

7. - Revelar el gel en presencia de carbonato de sodio, 30 gr. por litro. Agregarle a los dos litros de Carbonato de Sodio 400 ul de Tiosulfato de sodio la misma que se encuentra a 1.5 % ($Na_2S_2O_3.5H_2O$), también 3 ml de Formaldehído al 37 % .

Esta mezcla se realiza justo antes de utilizar el carbonato de Sodio.

Importante.- El carbonato de Sodio debe prepararse utilizando 60 gr., de carbonato de sodio en dos litros de Agua desionizada y destilada, y efectuarse con mucha anterioridad para que permanezca frió para el proceso de revelado.

8. - Repartir los dos litros en dos cubetas y luego de colocar el gel se agita suavemente hasta que empieza a notarse las bandas, luego se transfiere a la segunda cubeta para terminar la coloración.

9. - Una vez notada la totalidad de bandas se agrega el ácido acético al 10 % para fijar la coloración de las bandas y detener la reacción del carbonato de sodio.

10. - Realizar dos lavados en agua desionizada y destilada para concluir el proceso de revelado.

11. - Finalmente se recoge la solución de nitrato de plata y se agrega 10 gr. de cloruro de sodio y se deja precipitar.

Anexo 9

J-01 1.000
J-02 0.642 1.000
J-03 0.553 0.496 1.000
J-04 0.472 0.530 0.549 1.000
J-05 0.665 0.599 0.630 0.611 1.000
J-06 0.643 0.521 0.625 0.561 0.716 1.000
J-07 0.715 0.633 0.674 0.647 0.784 0.782 1.000
J-08 0.582 0.507 0.642 0.572 0.727 0.664 0.684 1.000
J-09 0.462 0.469 0.589 0.528 0.576 0.489 0.576 0.518 1.000
J-10 0.640 0.576 0.654 0.673 0.732 0.678 0.807 0.697 0.565 1.000
J-11 0.655 0.526 0.634 0.539 0.707 0.687 0.776 0.640 0.477 0.704 1.000
J-12 0.467 0.416 0.393 0.429 0.481 0.458 0.494 0.485 0.386 0.496 0.469 1.000
J-13 0.622 0.560 0.500 0.491 0.574 0.613 0.658 0.566 0.443 0.595 0.611 0.515 1.000
J-14 0.665 0.538 0.622 0.578 0.651 0.668 0.779 0.617 0.562 0.720 0.698 0.472 0.596 1.000
J-15 0.548 0.483 0.487 0.453 0.480 0.546 0.528 0.451 0.408 0.495 0.529 0.362 0.520 0.439 1.000
J-16 0.704 0.623 0.621 0.607 0.686 0.692 0.832 0.637 0.504 0.725 0.737 0.481 0.638 0.763 0.503 1.000
J-17 0.658 0.515 0.519 0.457 0.588 0.607 0.672 0.595 0.406 0.590 0.680 0.488 0.623 0.612 0.494 0.736 1.000
J-18 0.672 0.567 0.558 0.512 0.624 0.636 0.754 0.591 0.493 0.667 0.654 0.514 0.586 0.673 0.429 0.756 0.744 1.000
J-19 0.651 0.561 0.622 0.592 0.659 0.649 0.747 0.635 0.477 0.707 0.710 0.484 0.617 0.680 0.468 0.750 0.677 0.672 1.000
J-20 0.628 0.537 0.601 0.564 0.673 0.657 0.717 0.623 0.498 0.676 0.640 0.467 0.591 0.645 0.496 0.686 0.592 0.674 0.682 1.000
J-21 0.557 0.451 0.601 0.567 0.587 0.673 0.654 0.631 0.488 0.644 0.606 0.513 0.618 0.607 0.477 0.623 0.591 0.623 0.681 0.598 1.000
J-22 0.626 0.541 0.592 0.554 0.640 0.618 0.710 0.607 0.517 0.674 0.689 0.392 0.660 0.627 0.492 0.700 0.633 0.678 0.675 0.646 0.615 1.000
J-23 0.675 0.608 0.550 0.573 0.659 0.648 0.711 0.626 0.477 0.645 0.724 0.460 0.607 0.621 0.552 0.685 0.665 0.655 0.681 0.646 0.588 0.637 1.000
J-24 0.577 0.588 0.566 0.679 0.670 0.632 0.708 0.642 0.495 0.685 0.640 0.487 0.552 0.635 0.472 0.702 0.571 0.634 0.663 0.618 0.588 0.581 0.645 1.000
J-25 0.678 0.637 0.623 0.601 0.690 0.714 0.805 0.618 0.535 0.708 0.716 0.490 0.659 0.736 0.554 0.793 0.663 0.716 0.693 0.663 0.655 0.672 0.706 0.713 1.000
J-26 0.610 0.512 0.495 0.541 0.556 0.608 0.642 0.574 0.477 0.595 0.641 0.467 0.617 0.607 0.506 0.638 0.519 0.605 0.618 0.566 0.569 0.595 0.647 0.595 0.676 1.000
J-27 0.520 0.511 0.515 0.542 0.551 0.519 0.583 0.526 0.489 0.593 0.579 0.347 0.522 0.559 0.410 0.596 0.526 0.514 0.617 0.521 0.528 0.579 0.523 0.548 0.601 0.624 1.000
J-28 0.587 0.488 0.575 0.544 0.609 0.553 0.649 0.543 0.496 0.568 0.632 0.415 0.559 0.571 0.486 0.650 0.581 0.595 0.608 0.562 0.510 0.579 0.597 0.555 0.599 0.507 0.470 1.000
J-29 0.638 0.527 0.517 0.581 0.592 0.612 0.650 0.553 0.479 0.622 0.621 0.392 0.556 0.632 0.492 0.670 0.589 0.597 0.657 0.602 0.582 0.588 0.612 0.587 0.606 0.576 0.503 0.553 1.000
J-1 J-2 J-3 J-4 J-5 J-6 J-7 J-8 J-9 J-10 J-11 J-12 J-13 J-14 J-15 J-16 J-17 J-18 J-19 J-20 J-21 J-22 J-23 J-24 J-25 J-26 J-27 J-28 J-29

Matriz de similaridad de 63 clones de cacao Nacional y otros orígenes de la colección de germoplasma de Ecuador, generada a partir de datos moleculares por el índice de Nei & Li's (1979).

Continuación Anexo 9

J-30 0.633 0.570 0.587 0.518 0.611 0.589 0.690 0.614 0.498 0.640 0.661 0.406 0.583 0.660 0.481 0.704 0.652 0.650 0.669 0.585 0.603 0.626 0.663 0.623 0.672 0.578 0.534 0.593 0.620
J-31 0.653 0.569 0.592 0.569 0.672 0.663 0.754 0.625 0.493 0.648 0.701 0.441 0.613 0.682 0.484 0.733 0.655 0.680 0.732 0.625 0.601 0.688 0.665 0.676 0.716 0.601 0.541 0.646 0.599
J-32 0.598 0.532 0.556 0.559 0.671 0.602 0.689 0.596 0.430 0.657 0.650 0.442 0.591 0.675 0.413 0.694 0.616 0.611 0.669 0.593 0.559 0.614 0.632 0.596 0.677 0.561 0.583 0.588 0.584
J-33 0.462 0.365 0.465 0.481 0.460 0.490 0.489 0.444 0.458 0.505 0.470 0.381 0.508 0.487 0.374 0.476 0.372 0.459 0.544 0.445 0.464 0.480 0.502 0.518 0.465 0.535 0.464 0.400 0.449
J-34 0.609 0.571 0.556 0.546 0.641 0.625 0.714 0.577 0.552 0.652 0.634 0.449 0.585 0.670 0.464 0.708 0.610 0.678 0.634 0.623 0.605 0.590 0.602 0.596 0.741 0.598 0.623 0.563 0.608
J-35 0.444 0.364 0.436 0.477 0.465 0.502 0.487 0.450 0.396 0.502 0.460 0.297 0.480 0.497 0.412 0.486 0.448 0.449 0.475 0.458 0.494 0.462 0.467 0.430 0.502 0.490 0.452 0.462 0.408
J-36 0.517 0.508 0.520 0.479 0.509 0.571 0.566 0.523 0.467 0.547 0.527 0.372 0.481 0.521 0.464 0.579 0.452 0.505 0.517 0.447 0.502 0.464 0.469 0.539 0.533 0.454 0.488 0.494 0.500
J-37 0.394 0.356 0.378 0.372 0.378 0.464 0.456 0.422 0.421 0.444 0.387 0.438 0.419 0.451 0.406 0.444 0.413 0.455 0.414 0.408 0.423 0.379 0.392 0.404 0.490 0.448 0.385 0.333 0.362
J-38 0.585 0.477 0.534 0.485 0.565 0.614 0.652 0.570 0.401 0.585 0.629 0.436 0.571 0.672 0.444 0.652 0.561 0.605 0.612 0.593 0.532 0.559 0.583 0.538 0.658 0.534 0.479 0.543 0.528
J-39 0.595 0.551 0.569 0.572 0.630 0.658 0.674 0.607 0.543 0.636 0.598 0.434 0.573 0.669 0.475 0.668 0.629 0.603 0.654 0.570 0.602 0.607 0.606 0.599 0.665 0.609 0.533 0.509 0.587
J-40 0.693 0.543 0.601 0.513 0.683 0.685 0.755 0.645 0.542 0.665 0.721 0.509 0.675 0.706 0.534 0.763 0.718 0.706 0.676 0.605 0.604 0.670 0.659 0.633 0.744 0.669 0.565 0.624 0.631
J-41 0.509 0.481 0.527 0.387 0.536 0.537 0.532 0.547 0.396 0.527 0.534 0.340 0.526 0.489 0.383 0.473 0.515 0.469 0.509 0.524 0.508 0.460 0.557 0.484 0.500 0.496 0.443 0.453 0.453
J-42 0.433 0.372 0.413 0.396 0.408 0.439 0.462 0.393 0.376 0.459 0.430 0.356 0.436 0.478 0.470 0.418 0.403 0.402 0.412 0.423 0.404 0.460 0.398 0.357 0.411 0.395 0.402 0.365 0.368
J-43 0.635 0.546 0.574 0.529 0.681 0.650 0.731 0.630 0.492 0.668 0.656 0.505 0.649 0.635 0.497 0.711 0.653 0.699 0.614 0.631 0.596 0.617 0.599 0.684 0.692 0.572 0.506 0.592 0.606
J-44 0.527 0.379 0.470 0.377 0.449 0.502 0.468 0.466 0.345 0.452 0.481 0.408 0.471 0.484 0.430 0.450 0.455 0.491 0.460 0.481 0.485 0.445 0.490 0.436 0.441 0.457 0.389 0.413 0.430
J-45 0.486 0.458 0.485 0.483 0.525 0.505 0.562 0.549 0.412 0.594 0.492 0.425 0.456 0.565 0.383 0.570 0.498 0.553 0.553 0.542 0.506 0.510 0.466 0.542 0.553 0.480 0.508 0.440 0.552
J-46 0.517 0.515 0.452 0.523 0.528 0.535 0.590 0.529 0.395 0.570 0.575 0.476 0.518 0.572 0.442 0.592 0.529 0.579 0.567 0.483 0.567 0.547 0.553 0.619 0.631 0.589 0.541 0.495 0.547
J-47 0.440 0.351 0.335 0.358 0.398 0.380 0.391 0.391 0.352 0.427 0.391 0.400 0.407 0.421 0.358 0.405 0.385 0.415 0.364 0.371 0.449 0.383 0.397 0.355 0.396 0.420 0.351 0.292 0.374
J-48 0.562 0.537 0.575 0.571 0.590 0.585 0.629 0.529 0.426 0.598 0.596 0.447 0.519 0.620 0.471 0.599 0.510 0.524 0.596 0.581 0.545 0.514 0.558 0.591 0.616 0.473 0.520 0.503 0.559
J-49 0.615 0.491 0.539 0.493 0.651 0.627 0.638 0.645 0.475 0.638 0.642 0.482 0.588 0.583 0.464 0.612 0.616 0.597 0.611 0.556 0.625 0.580 0.621 0.543 0.583 0.624 0.494 0.556 0.573
J-50 0.613 0.500 0.496 0.467 0.660 0.637 0.651 0.592 0.462 0.592 0.621 0.460 0.607 0.571 0.492 0.610 0.594 0.602 0.602 0.575 0.572 0.579 0.571 0.622 0.582 0.553 0.533 0.556 0.513
J-51 0.545 0.466 0.462 0.445 0.493 0.493 0.509 0.530 0.455 0.513 0.546 0.394 0.541 0.533 0.442 0.535 0.463 0.477 0.550 0.480 0.476 0.476 0.496 0.485 0.525 0.496 0.502 0.439 0.432
J-52 0.620 0.615 0.527 0.517 0.616 0.624 0.656 0.571 0.512 0.605 0.598 0.504 0.648 0.627 0.518 0.631 0.575 0.590 0.622 0.595 0.587 0.573 0.592 0.580 0.567 0.541 0.505 0.510 0.541
J-53 0.657 0.597 0.594 0.558 0.676 0.655 0.724 0.615 0.514 0.697 0.678 0.447 0.610 0.660 0.462 0.670 0.598 0.638 0.669 0.616 0.643 0.626 0.613 0.623 0.667 0.579 0.575 0.563 0.626
J-54 0.713 0.605 0.530 0.534 0.649 0.615 0.711 0.565 0.502 0.654 0.613 0.502 0.618 0.614 0.537 0.676 0.587 0.646 0.647 0.570 0.567 0.591 0.591 0.619 0.674 0.536 0.537 0.596 0.573
J-55 0.528 0.457 0.468 0.460 0.484 0.575 0.580 0.535 0.471 0.597 0.524 0.404 0.500 0.530 0.432 0.555 0.513 0.502 0.554 0.479 0.560 0.489 0.509 0.543 0.548 0.517 0.468 0.401 0.432
J-56 0.598 0.585 0.538 0.585 0.606 0.596 0.673 0.553 0.422 0.672 0.606 0.477 0.561 0.617 0.490 0.678 0.551 0.627 0.617 0.610 0.573 0.591 0.584 0.694 0.634 0.598 0.564 0.547 0.532
J-57 0.684 0.630 0.639 0.569 0.695 0.672 0.799 0.628 0.498 0.726 0.729 0.467 0.651 0.725 0.485 0.814 0.691 0.701 0.708 0.691 0.625 0.663 0.658 0.683 0.755 0.603 0.573 0.653 0.653
J-58 0.594 0.545 0.567 0.558 0.625 0.648 0.719 0.569 0.452 0.672 0.706 0.422 0.565 0.678 0.503 0.741 0.652 0.649 0.672 0.640 0.625 0.605 0.650 0.630 0.710 0.542 0.525 0.609 0.672

J-1 J-2 J-3 J-4 J-5 J-6 J-7 J-8 J-8 J-9 J-10 J-11 J-12 J-14 J-15 J-16 J-17 J-18 J-19 J-20 J-21 J-22 J-23 J-24 J-25 J-26 J-27 J-28 J-29

Matriz de similaridad de 63 clones de cacao Nacional y otros orígenes de la colección de germoplasma de Ecuador, generada a partir de datos moleculares por el índice de Nei & Li's (1979).

Continuación Anexo 9

J-30 1.000
J-31 0.717 1.000
J-32 0.675 0.676 1.000
J-33 0.438 0.487 0.474 1.000
J-34 0.675 0.619 0.651 0.451 1.000
J-35 0.481 0.491 0.522 0.371 0.529 1.000
J-36 0.531 0.532 0.479 0.402 0.527 0.345 1.000
J-37 0.426 0.454 0.392 0.452 0.478 0.372 0.335 1.000
J-38 0.628 0.608 0.599 0.359 0.611 0.534 0.489 0.433 1.000
J-39 0.621 0.656 0.596 0.504 0.654 0.417 0.515 0.475 0.570 1.000
J-40 0.704 0.748 0.681 0.503 0.687 0.507 0.538 0.458 0.627 0.669 1.000
J-41 0.539 0.489 0.491 0.392 0.505 0.507 0.436 0.372 0.449 0.457 0.552 1.000
J-42 0.376 0.422 0.375 0.312 0.430 0.358 0.412 0.296 0.365 0.429 0.435 0.370 1.000
J-43 0.646 0.703 0.646 0.444 0.663 0.448 0.535 0.418 0.574 0.624 0.733 0.522 0.364 1.000
J-44 0.443 0.462 0.418 0.347 0.388 0.418 0.398 0.313 0.442 0.424 0.444 0.428 0.320 0.476 1.000
J-45 0.534 0.535 0.510 0.400 0.564 0.398 0.407 0.373 0.563 0.564 0.535 0.390 0.390 0.544 0.387 1.000
J-46 0.550 0.594 0.558 0.426 0.584 0.475 0.484 0.466 0.577 0.572 0.573 0.465 0.307 0.589 0.410 0.534 1.000
J-47 0.390 0.413 0.397 0.355 0.453 0.309 0.421 0.405 0.380 0.372 0.434 0.367 0.351 0.377 0.421 0.438 0.427 1.000
J-48 0.517 0.585 0.570 0.400 0.533 0.494 0.487 0.325 0.569 0.522 0.566 0.445 0.391 0.575 0.453 0.599 0.592 0.354 1.000
J-49 0.629 0.606 0.616 0.423 0.616 0.481 0.466 0.435 0.549 0.593 0.683 0.555 0.377 0.594 0.472 0.548 0.558 0.442 0.570 1.000
J-50 0.587 0.617 0.595 0.479 0.582 0.475 0.515 0.388 0.549 0.556 0.643 0.498 0.350 0.647 0.542 0.526 0.521 0.475 0.529 0.664 1.000
J-51 0.487 0.566 0.540 0.454 0.484 0.498 0.472 0.327 0.465 0.443 0.577 0.431 0.396 0.535 0.421 0.469 0.450 0.362 0.545 0.528 0.560 1.000
J-52 0.588 0.580 0.621 0.456 0.627 0.413 0.502 0.443 0.544 0.627 0.619 0.524 0.434 0.629 0.477 0.505 0.530 0.441 0.564 0.607 0.625 0.654 1.000
J-53 0.651 0.636 0.680 0.525 0.639 0.431 0.533 0.413 0.538 0.595 0.665 0.540 0.452 0.602 0.491 0.556 0.525 0.443 0.613 0.642 0.639 0.546 0.703 1.000
J-54 0.623 0.614 0.576 0.458 0.624 0.440 0.556 0.414 0.564 0.649 0.650 0.469 0.389 0.642 0.455 0.565 0.539 0.403 0.577 0.565 0.609 0.520 0.648 0.665 1.000
J-55 0.507 0.529 0.455 0.481 0.524 0.486 0.471 0.507 0.464 0.535 0.561 0.493 0.396 0.487 0.458 0.500 0.520 0.383 0.491 0.486 0.527 0.494 0.506 0.564 0.587 1.000
J-56 0.609 0.591 0.565 0.428 0.571 0.426 0.543 0.377 0.564 0.584 0.620 0.467 0.398 0.629 0.446 0.571 0.579 0.350 0.595 0.527 0.577 0.502 0.553 0.604 0.629 0.593 1.000
J-57 0.663 0.725 0.704 0.481 0.668 0.472 0.590 0.447 0.655 0.650 0.737 0.538 0.426 0.678 0.453 0.551 0.624 0.399 0.615 0.602 0.616 0.543 0.670 0.724 0.675 0.570 0.667 1.000
J-58 0.600 0.647 0.639 0.479 0.639 0.497 0.497 0.419 0.618 0.587 0.637 0.455 0.381 0.620 0.497 0.569 0.582 0.372 0.609 0.599 0.598 0.489 0.587 0.634 0.569 0.519 0.601 0.767 1.000
J-30 J-31 J-32 J-33 J-34 J-35 J-36 J-37 J-38 J-39 J-40 J-41 J-42 J-43 J-44 J-45 J-46 J-47 J-48 J-49 J-50 J-51 J-52 J-53 J-54 J-55 J-56 J-57 J-58

Matriz de similaridad de 63 clones de cacao Nacional y otros origenes de la colección de germoplasma de Ecuador, generada a partir de datos moleculares por el indice de Nei & Li's (1979)

Continuación Anexo 9

J-59 0.662 0.583 0.565 0.578 0.692 0.670 0.796 0.608 0.456 0.699 0.747 0.449 0.599 0.742 0.489 0.781 0.654 0.679 0.690 0.615 0.589 0.618 0.642 0.708 0.736 0.574 0.545 0.591 0.642
J-60 0.510 0.500 0.553 0.550 0.627 0.590 0.639 0.590 0.486 0.657 0.631 0.477 0.565 0.559 0.468 0.650 0.619 0.619 0.607 0.548 0.606 0.571 0.623 0.620 0.615 0.532 0.496 0.495 0.532
J-61 0.448 0.430 0.458 0.426 0.497 0.525 0.528 0.447 0.288 0.477 0.497 0.419 0.406 0.480 0.402 0.510 0.482 0.493 0.485 0.491 0.425 0.422 0.507 0.482 0.459 0.439 0.376 0.444 0.444
J-62 0.408 0.383 0.377 0.329 0.377 0.375 0.429 0.333 0.348 0.384 0.393 0.434 0.425 0.382 0.313 0.412 0.403 0.480 0.368 0.359 0.395 0.409 0.390 0.403 0.451 0.420 0.286 0.384 0.346
J-63 0.400 0.434 0.421 0.388 0.430 0.391 0.458 0.410 0.330 0.427 0.428 0.381 0.465 0.434 0.276 0.452 0.380 0.408 0.491 0.414 0.387 0.363 0.445 0.424 0.424 0.355 0.314 0.424 0.363
J-1 J-2 J-3 J-4 J-5 J-6 J-7 J-8 J-9 J-10 J-11 J-12 J-13 J-14 J-15 J-16 J-17 J-18 J-19 J-20 J-21 J-22 J-23 J-24 J-25 J-26 J-27 J-28 J-29

J-59 0.638 0.687 0.681 0.480 0.638 0.431 0.538 0.429 0.649 0.613 0.695 0.476 0.373 0.703 0.465 0.545 0.630 0.365 0.662 0.593 0.663 0.532 0.613 0.671 0.678 0.552 0.674 0.814 0.774
J-60 0.567 0.628 0.556 0.463 0.556 0.419 0.493 0.442 0.529 0.604 0.671 0.482 0.405 0.633 0.443 0.445 0.556 0.332 0.555 0.577 0.548 0.475 0.542 0.574 0.570 0.586 0.582 0.636 0.649
J-61 0.477 0.479 0.467 0.364 0.425 0.391 0.323 0.364 0.448 0.416 0.450 0.400 0.289 0.472 0.417 0.415 0.446 0.295 0.466 0.435 0.463 0.316 0.427 0.444 0.452 0.395 0.465 0.504 0.511
J-62 0.415 0.428 0.346 0.277 0.368 0.330 0.290 0.328 0.375 0.350 0.420 0.332 0.289 0.408 0.347 0.300 0.357 0.225 0.343 0.370 0.378 0.242 0.357 0.395 0.397 0.349 0.377 0.431 0.431
J-63 0.438 0.428 0.450 0.373 0.347 0.352 0.283 0.341 0.398 0.368 0.412 0.353 0.236 0.401 0.349 0.320 0.374 0.241 0.376 0.336 0.370 0.340 0.439 0.418 0.449 0.396 0.463 0.474 0.444
J-30 J-31 J-32 J-33 J-34 J-35 J-36 J-37 J-38 J-39 J-40 J-41 J-42 J-43 J-44 J-45 J-46 J-47 J-48 J-49 J-50 J-51 J-52 J-53 J-54 J-55 J-56 J-57 J-58

J-59 1.000
J-60 0.657 1.000
J-61 0.507 0.464 1.000
J-62 0.415 0.397 0.402 1.000
J-63 0.438 0.405 0.505 0.508 1.000
J-59 J-60 J-61 J-62 J-63

Matriz de similaridad de 63 clones de cacao Nacional y otros orígenes de la colección de germoplasma de Ecuador, generada a partir de datos moleculares por el índice de Nei & Li's (1979)

Anexo 10.

Análisis de varianza y prueba de Duncan para la variable dependiente Relación largo / ancho del sépalo **de los clones de cacao Nacional y de otros orígenes de la colección de Ecuador.**

Fuente de Variación	G.L	S.C	C.M	Valor F	Pr > F
Modelo	4	2.36145673	0.59036418	4.18	0.0057
Error	46	6.49408444	0.14117575		
Total Corregido	50	8.85554118			

R-Cuadrado	C.V	Raíz CME	Media de la Relación L/A de Sépalo
0.266664	10.38444	0.375734	3.618235

Agrupamiento DUNCAN	Promedios	Número de clones	Grupos
A A B A B A B A C B C B C C C	3.9067	3	5
	3.8280	10	2
	3.7444	18	1
	3.4040	5	4
	3.3407	15	3

Anexo 11.

Análisis de varianza y prueba de Duncan para la variable dependiente Largo de ligula **de los clones de cacao Nacional y de otros orígenes de la colección de Ecuador.**

Fuente de Variación	G.L	S.C	C.M	Valor F	Pr > F
Modelo	4	14.12931026	3.53232757	7.38	0.0001
Error	46	22.02418778	0.47878669		
Total Corregido	50	36.15349804			

R-Cuadrado	C.V	Raíz CME	Media Largo de Ligula
0.390814	11.57135	3.53232757	5.979804

Agrupamiento DUNCAN	Promedios	Número de clones	Grupos
A	7.4333	3	5
B	6.6410	10	2
C C	5.8660	5	4
C C C	5.7167	15	3
C	5.6211	18	1

Anexo 12.

Análisis de varianza y prueba de Duncan para la variable dependiente Relación largo/ ancho de Ligula **de los clones de cacao Nacional y de otros orígenes de la colección de Ecuador.**

Fuente de Variación	G.L	S.C	C.M	Valor F	Pr > F
Modelo	4	1.43855124	0.35963781	6.88	0.0002
Error	46	2.40526444	0.05228836		
Total Corregido	50	3.84381569			

R-Cuadrado	C.V	Raíz CME	Media de la Relación L/A Ligula
0.374251	9.064193	0.228666	2.522745

Agrupamiento DUNCAN	Promedios	Número de clones	Grupos
A	3.0033	3	5
B B	2.6830	10	2
C B C	2.5261	18	1
C C C	2.3780	15	3
C	2.3360	5	4

Anexo 13.

Análisis de varianza y prueba de Duncan para la variable dependiente Largo del ovario **de los clones de cacao Nacional y de otros orígenes de la colección de Ecuador.**

Fuente de Variación	G.L	S.C	C.M	Valor F	Pr > F
Modelo	4	2.29368471	0.57342118	6.15	0.0005
Error	46	4.29201333	0.09330464		
Total Corregido	50	6.58569804			

R-Cuadrado	C.V	Raíz CME	Media de Largo del Ovario
0.348283	15.58304	0.305458	1.960196

Agrupamiento DUNCAN	Promedios	Número de clones	Grupos
A A	2.1033	18	1
A A	2.0693	15	3
B A	1.9000	10	2
B B C	1.5860	5	4
C C	1.3800	3	5

Anexo 14.

Análisis de varianza y prueba de Duncan para la variable dependiente Ancho del ovario **de los clones de cacao Nacional y de otros orígenes de la colección de Ecuador.**

Fuente de Variación	G.L	S.C	C.M	Valor F	Pr > F
Modelo	4	0.82004098	0.20501025	7.39	0.0001
Error	46	1.27647667	0.02774949		
Total Corregido	50	2.09651765			

R-Cuadrado	C.V	Raíz CME	Media de Ancho del Ovario
0.391144	11.7171	0.166582	1.422353

Agrupamiento DUCAN	Promedios	Número de clones	Grupos
A A	1.53667	18	1
B A B A	1.42000	15	3
B A B B	1.41900	10	2
B	1.25600	5	4
C	1.03667	3	5

Anexo 15.

Análisis de varianza y prueba de Duncan para la variable dependiente Número de óvulos por ovario **de los clones de cacao Nacional y de otros orígenes de la colección de Ecuador.**

Fuente de Variación	G.L	S.C	C.M	Valor F	Pr > F
Modelo	4	405.053725	101.263431	7.82	<. 0001
Error	46	595.906667	12.954493		
Total Corregido	50	1000.960392			

R-Cuadrado	C.V	Raíz CME	Media # de Óvulos por Ovario
0.404665	8.431832	3.599235	42.68627

Agrupamiento DUCAN	Promedios	Número de clones	Grupos
A	49.120	5	4
B B	43.767	18	1
C B C B	42.820	10	2
C B C C	42.167	3	5
C	39.260	15	3

Anexo 16.

Análisis de varianza y prueba de Duncan para la variable dependiente relación largo / ancho de la mazorca **de los clones de cacao Nacional y de otros orígenes de la colección de Ecuador.**

Fuente de Variación	G.L	S.C	C.M	Valor F	Pr > F
Modelo	4	0.84471863	0.21117966	4.18	0.0057
Error	46	2.32225000	0.05048370		
Total Corregido	50	3.16696863			

R-Cuadrado	C.V	Raíz CME	Media de Relación L/A de Mazorca
0.266758	11.35226	0.224686	1.979216

Agrupamiento DUNCAN	Promedios	Número de clones	Grupos
A A	2.2967	3	5
B A B	2.0693	15	3
B B	2.0230	10	2
B C C	1.8900	18	1
C	1.7520	5	4

Anexo 17.

Análisis de varianza y prueba de Duncan para la variable dependiente Espesor de lomo de la mazorca **de los clones de cacao Nacional y de otros orígenes de la colección de Ecuador.**

Fuente de Variación	G.L	S.C	C.M	Valor F	Pr > F
Modelo	4	3.34626059	0.83656515	31.97	<. 0001
Error	46	1.20361000	0.02616543		
Total Corregido	50	4.54987059			

R-Cuadrado	C.V	Raíz CME	Media Espesor de Lomo Mazorca
0.735463	10.96879	0.161757	1.474706

Agrupamiento DUNCAN	Promedios	Número de clones	Grupos
A	1.86200	15	3
B B	1.45200	5	4
C B C B C B C C	1.32167	18	1
	1.29000	3	5
	1.23600	10	2

Anexo 18

Análisis de varianza y prueba de Duncan para la variable dependiente Peso de cáscara de la mazorca **de los clones de cacao Nacional y de otros orígenes de la colección de Ecuador.**

Fuente de Variación	G.L	S.C	C.M	Valor F	Pr > F
Modelo	4	104933.8240	26233.4560	4.53	0.0036
Error	46	266411.3977	5791.5521		
Total Corregido	50	371345.2217			

R-Cuadrado	C.V	Raíz CME	Media Peso de Cáscara Mazorca
0.282578	18.79174	76.10225	404.9771

Agrupamiento DUNCAN	Promedios	Número de clones	Grupos
A A	465.40	3	5
A A	463.82	5	4
B A B	440.87	18	1
B C C C	369.29	15	3
	346.35	10	2

Anexo 19.

Análisis de varianza y prueba de Duncan para la variable dependiente Peso testa de la semilla **de los clones de cacao Nacional y de otros orígenes de la colección de Ecuador.**

Fuente de Variación	G.L	S.C	C.M	Valor F	Pr > F
Modelo	4	12.45833987	3.11458497	11.27	<. 0001
Error	46	12.71811111	0.27648068		
Total Corregido	50	25.17645098			

R-Cuadrado	C.V	Raíz CME	Media de Peso Testa Semilla
0.494841	22.10214	0.525814	2.379020

Agrupamiento DUNCAN	Promedios	Número de clones	Grupos
A A	2.8422	18	1
B A B A	2.7760	5	4
B A B	2.4760	10	2
B C C	2.1700	3	5
C	1.6680	15	3

Anexo 20.

Análisis de varianza y prueba de Duncan para la variable dependiente Peso de semilla seca **de los clones de cacao Nacional y de otros orígenes de la colección de Ecuador.**

Fuente de Variación	G.L	S.C	C.M	Valor F	Pr > F
Modelo	4	1.40053359	0.35013340	11.2	<. 0001
Error	46	1.43816444	0.03126444		
Total Corregido	50	2.83869804			

R-Cuadrado	C.V	Raíz CME	Media de Semilla Seca
0.493372	16.78960	0.176818	1.053137

Agrupamiento DUNCAN	Promedios	Número de clones	Grupos
A	1.62000	3	5
B B	1.11400	5	4
B B B	1.06556	18	1
C B	1.04000	15	3
C C	0.85000	10	2

Anexo 21.

Análisis de varianza y prueba de Duncan para la variable dependiente Largo de la semilla **de los clones de cacao Nacional y de otros orígenes de la colección de Ecuador.**

Fuente de Variación	G.L	S.C	C.M	Valor F	Pr > F
Modelo	4	2.16900771	0.54225193	17.95	<. 0001
Error	46	1.38925111	0.03020111		
Total Corregido	50	3.55825882			

R-Cuadrado	C.V	Raíz CME	Media de Largo de Semilla
0.609570	8.506592	0.173785	2.042941

Agrupamiento DUNCAN	Promedios	Número de clones	Grupos
A	2.65333	3	5
B B	2.19200	15	3
C B	2.09000	5	4
C C D D	1.91944	18	1
D	1.83500	10	2

Anexo 22.

Análisis de varianza y prueba de Duncan para la variable dependiente Ancho de la semilla **de los clones de cacao Nacional y de otros orígenes de la colección de Ecuador.**

Fuente de Variación	G.L	S.C	C.M	Valor F	Pr > F
Modelo	4	0.54999765	0.13749941	11.22	<. 0001
Error	46	0.56385333	0.01225768		
Total Corregido	50	1.11385098			

R-Cuadrado	C.V	Raíz CME	Media del Ancho de Semilla
0.493780	9.497788	0.110714	1.165686

Agrupamiento DUNCAN	Promedios	Número de clones	Grupos
A	1.49000	3	5
B B	1.25200	5	4
B B	1.19867	15	3
C B	1.13000	18	1
C C	1.04000	10	2

Anexo 23.

Análisis de varianza y prueba de Duncan para la variable dependiente Relación largo / ancho de la hoja **de los clones de cacao Nacional y de otros orígenes de la colección de Ecuador.**

Fuente de Variación	G.L	S.C	C.M	Valor F	Pr > F
Modelo	4	4.00661275	1.00165319	20.17	<. 0001
Error	46	2.28385000	0.04964891		
Total Corregido	50	6.29046275			

R-Cuadrado	C.V	Raíz CME	Media de la Relación L/A de Hoja
0.636935	7.507821	0.222820	2.967843

Agrupamiento DUNCAN	Promedios	Número de clones	Grupos
A	3.3893	15	3
B B	2.9520	5	4
C B C B C B C C	2.8083	18	1
C B	2.7220	10	2
C	2.6633	3	5

Anexo 24.

Análisis de varianza y prueba de Duncan para la variable dependiente Relación largo / longitud de la base a la parte ancha de la hoja **de los clones de cacao Nacional y de otros orígenes de la colección de Ecuador.**

Fuente de Variación	G.L	S.C	C.M	Valor F	Pr > F
Modelo	4	1.60410007	0.40102502	29.38	<. 0001
Error	46	0.62784111	0.01364872		
Total Corregido	50	2.23194118			

R-Cuadrado	C.V	Raíz CME	Media de la Relación L/LBA Hoja
0.718702	5.694012	0.116828	2.051765

Agrupamiento DUNCAN	Promedios	Número de Clones	Grupos
A	2.31400	15	3
B B	1.99444	18	1
C B C B C B C C	1.96800	5	4
C B	1.89333	3	5
C	1.85100	10	2

Anexo 25.

Análisis de varianza y prueba de Duncan para la variable dependiente Angulo basal de la hoja **de los clones de cacao Nacional y de otros orígenes de la colección de Ecuador.**

Fuente de Variación	G.L	S.C	C.M	Valor F	Pr > F
Modelo	4	5671.09535	1417.77384	10.21	<. 0001
Error	46	6386.26831	138.83192		
Total Corregido	50	12057.36366			

R-Cuadrado	C.V	Raíz CME	Media del Angulo Basal de Hoja.
0.470343	10.79763	11.78270	109.1229

Agrupamiento DUNCAN	Promedios	Número de clones	Grupos
A	138.120	5	4
B	123.657	3	5
C C	105.027	15	3
C C C	104.872	18	1
C	104.060	10	2