

**PROGRAMA DE EDUCACIÓN PARA EL DESARROLLO Y LA
CONSERVACIÓN**

ESCUELA DE POSGRADO

**Caracterización morfológica y molecular del Cacao Nacional Boliviano y de
selecciones élites del Alto Beni, Bolivia.**

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 para optar por el grado de:

Magister Scientiae

Por:

WINDSON JULY MARTINEZ

CATIE

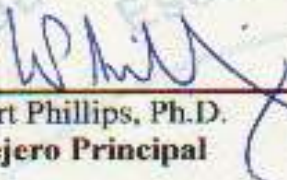
Turrialba, Costa Rica,

2007

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:



Wilbert Phillips, Ph.D.
Consejero Principal




Eduardo Somarriba, Ph.D.
Miembro del Comité Consejero




Carlos Astorga, M.Sc.
Miembro del Comité Consejero



Elizabeth Johnson, Ph.D.
Miembro del Comité Consejero



Glenn Galloway, Ph.D.
Decano de la Escuela de Posgrado



Windson July Martinez
Candidato

DEDICATORIA

Con mucho cariño a mis hijitos; Melanie Daniela y Windson Gabriel, por ser fuentes de inspiración y motivación, son el mejor tesoro que Dios me dio, tómenlo como un ejemplo de lucha y superación en sus vidas.

A mi esposa; Virginia Paula, por su apoyo, confianza y comprensión. Te amo Viquicita.

A mis padres; Irma Martinez y Ruperto July por el apoyo incondicional en cada etapa de mi vida.

A mi hermano Víctor Hugo, por ser ejemplo de estudio, lucha y sacrificio.

AGRADECIMIENTOS

Mis más sinceros agradecimientos;

A Dios por bendecir mi vida y permitir que siga en el camino de mi destino.

Al claustro de profesores del CATIE, a los cuales debo mi formación de maestría.

A Wilberth Phillip, por su amistad, colaboración y sus valiosas sugerencias en la revisión de la tesis.

A Eduardo Somarriba, por brindarme su amistad, confianza y facilitar el apoyo financiero para el trabajo de tesis.

A Carlos Astorga, por ser amigo y por su alto espíritu de colaboración.

A Elizabet Jonson, por brindarme su amistad y por el apoyo prestado en la interpretación de datos moleculares.

Al personal de la Unidad de Biotecnología y Recursos Fitogenéticos, por brindarme su amistad y confianza, en especial a: Allan Meneses y Adriana Archienegas.

A la Cooperación Técnica Belga, por otorgarme una beca parcial, que hizo posible mis estudios en el CATIE, en especial a la Lic. Myriam Tamayo, muchas gracias.

Al USDA/ARS, por financiar las expediciones y los insumos de laboratorio.

A la cooperativas El CEIBO, Sapecho Bolivia por acogerme como tesista investigador durante la fase de campo.

Al Consejo Indígena del Pueblo Tacana, (CIPTA) Bolivia. Celín Quenevo, Juan Gonzáles, Aiza Terrazas, Federico Yaraví, que me brindaron su amistad y apoyo en las expediciones en el Norte de La Paz y río Beni.

A la WCS (Wildlife Conservation Society), Cantuta Lara, Richard Rojas, Erika Alandia, que me apoyaron en la investigación.

Al coro SEÑOR DE LAS NACIONES, Henry, Rolando, José Antonio, Alvaro, Carlos, Abrahan, Liseth y Cataina, por hacer las misas de domingos gratos alabando a Dios.

Un especial agradecimiento a las personas quienes directa o indirectamente apoyaron en la culminación de mi tesis; Compañeros de la promoción 2006 - 2007 del CATIE, personal de la Biblioteca Conmemorativa Orton, amigos en Bolivia. Muchas gracias.

CONTENIDO

DEDICATORIA	III
AGRADECIMIENTOS	IV
CONTENIDO	V
RESUMEN	XII
SUMMARY	XIII
1 INTRODUCCIÓN	1
1.1 Objetivos del estudio	3
1.1.1 Objetivo general	3
1.1.2 Objetivos específicos	3
1.1.3 Hipótesis del estudio	3
2 MARCO CONCEPTUAL	4
2.1 Taxonomía, origen y distribución del cacao	4
2.2 Grupos genéticos	4
2.2.1 Cacao forastero	5
2.2.2 Cacao criollo	5
2.2.3 Cacao Trinitario	6
2.3 Características del Cacao Nacional Boliviano (CNB)	6
2.4 Colecciones de germoplasma en el mundo	6
2.5 Cultivo del cacao en Bolivia (Alto Beni)	7
2.6 El Cacao Nacional Boliviano	8
2.7 Caracterización Morfológica	9
2.8 Marcadores moleculares	9
2.8.1 Microsatélites (SSRs)	10
2.9 Métodos estadísticos multivariados aplicados a la biología molecular	13
3 MATERIALES Y METODOS	14
3.1 Generalidades de la investigación	14

3.1.1	Región norte de La Paz	15
3.1.2	Río Beni	15
3.1.3	Alto Beni	15
3.2	Fase de campo	16
3.2.1	Recolección de muestras foliares	16
3.2.1.1	Expedición 1	18
3.2.1.2	Expedición 2	18
3.2.1.3	Expedición 3	18
3.2.2	Colecta selecciones élite de Alto Beni	20
3.2.3	Colecta de material vegetativo para análisis molecular	20
3.2.4	Caracterización morfológica <i>in-situ</i>	20
3.2.4.1	Características de fruto	20
3.2.4.2	Características de la semilla	21
3.2.4.3	Análisis de calidad de almendras	21
3.3.5	Análisis estadístico de datos morfológicos	21
a)	Análisis de Varianza	21
b)	Análisis de conglomerados	21
c)	Análisis de componentes principales	22
d)	Análisis discriminante canónico	22
3.3	Fase de laboratorio	22
3.3.1	Caracterización Molecular	22
3.3.2	Extracción de ADN	22
3.3.3	Cuantificación de ADN	22
3.3.4	Amplificación de ADN	23
3.3.5	Análisis de datos moleculares	23
4	RESULTADOS	24
4.1	Notas sobre las expediciones	24
4.1.1	Expedición 1; Norte de La Paz	24
4.1.2	Expedición 2; Río Beni	25

4.1.3	Expedición 3: Alto Beni.....	26
4.2	Caracterización morfológica.....	28
4.2.1	Evaluación de parámetros morfológicos para el Cacao Nacional Silvestre.....	28
4.2.2	Evaluación de variables cualitativas del fruto y semilla.....	30
4.3	Caracterización morfológica del Cacao Nacional Boliviano en cultivo.....	32
4.3.1	Evaluación de variables cualitativas del fruto y semilla.....	34
4.4	Diferencias morfológicas entre el Cacao Nacional Boliviano silvestre y el Cacao Nacional Boliviano en cultivo.....	37
4.4.1	Análisis de varianza.....	37
4.4.2	Análisis de conglomerados.....	37
4.4.3	Análisis de Componentes principales.....	39
4.4.4	Análisis discriminante canónico.....	41
4.5	Análisis de calidad de almendras.....	41
4.6	Evaluación de parámetros morfológicos para las Selecciones élites de la región de Alto Beni.....	42
4.6.2	Evaluación de variables cualitativas del fruto y semilla.....	46
4.6.3	Análisis de conglomerados.....	48
4.6.4	Análisis componentes principales.....	49
4.7	Caracterización molecular.....	49
4.7.1	Extracción y cuantificación ADN.....	49
4.7.2	Análisis Secuencia Simple Repetida (SSRs).....	50
4.7.3	Definición de grupos genéticos.....	52
4.6.4	Análisis de consenso entre características moleculares y morfológicas.....	54
5	DISCUSION.....	55
5.1	Caracterización morfológica del Cacao Nacional Boliviano.....	56
5.2	Caracterización morfológica de Selecciones élites de Alto Beni.....	58
5.3	Caracterización molecular del Cacao Nacional Boliviano.....	58
6	CONCLUSIONES.....	61

7	RECOMENDACIONES	63
8	BIBLIOGRAFÍA	64
	ANEXOS	70

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Variables cuantitativas de fruto y semilla de 57 genotipos de Cacao Nacional Boliviano silvestre en 11 lugares de colecta.....	29
Cuadro 2. Evaluación de 57 accesiones de cacao silvestre Boliviano: variables cualitativas de fruto y semilla.....	30
Cuadro 3. Características cualitativas por genotipo de Cacao Nacional Boliviano silvestre.....	31
Cuadro 4. Variables cuantitativas de fruto y semilla de 107 accesiones de Cacao Nacional Boliviano en cultivo en 8 lugares de colecta.....	33
Cuadro 5. Evaluación de 107 accesiones de Cacao Nacional Boliviano en cultivo: variables cualitativas de fruto y semilla.....	34
Cuadro 6. Características cualitativas por genotipo de cacao nacional cultivado.....	35
Cuadro 7. Resumen de variables estudiadas, estadística descriptiva y probabilidad ($p < 0.05$) Test Tukey, en la comparación del cacao nacional silvestre y en cultivo.....	37
Cuadro 8. Tabla de resultados, componentes principales de las variables cuantitativas.....	39
Cuadro 9. Análisis discriminante canónico para características morfológicas evaluadas en 164 genotipos de cacao nacional Boliviano	41
Cuadro 10. Variables cuantitativas de fruto y semilla de 61 Selecciones élites de la región de Alto Beni, Bolivia.....	43
Cuadro 11. Evaluación de 61 selecciones élites del Alto Beni: variables cualitativas de fruto y semilla.....	46
Cuadro 12. Características cualitativas por accesión de cacao selecciones élites.....	47
Cuadro 13. Resultados del análisis componentes principales cacao selecciones élites.....	49
Cuadro 14. Resultado del análisis de los marcadores moleculares SSRs utilizados.....	50
Cuadro 15. Resumen de resultados moleculares por primers	51
Cuadro 16. Resultados del análisis Procrustes Generalizado (APG) combinando información morfológica y molecular de 129 genotipos de cacao nacional Boliviano.....	54

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Clasificación esquemática de la diversidad genética de <i>T. cacao</i>	4
Figura 2. Mapa de Bolivia y ubicación de los sitios donde se colectaron las muestras ubicándolas con coordenadas geográficas UTM.....	17
Figura 3. Mapa de ubicación de los sitios de colecta de muestras de (<i>Theobroma cacao</i> L.) en Bolivia.....	19
Figura 4. Rodal de cacao silvestre, región de Macagua, Norte del Departamento de La Paz, Bolivia 2007.....	25
Figura 5. Cacao silvestre colectado en la región de Tequeje, Río Beni, Bolivia 2007.....	29
Figura 6. Cacao Nacional Boliviano, cultivado en la zona de Alto Beni.....	27
Figura 7. Dendrograma basado en las distancias Euclidea y método Ward para 19 lugares de colecta basado en 164 genotipos de cacao Nacional Boliviano silvestres y cultivados.....	38
Figura 8. Grafico Biplot, componentes principales de las variables cuantitativas y su relación con los lugares y los tipos de cacao silvestre y cultivados.....	40
Figura 9. Dendrograma basado en las distancias Euclideas y método Ward para 61 genotipos (selecciones élites) de la región de Alto Beni	48
Figura 10. Cuantificación de ADN para 31 muestras de cacao y marcador de peso (MM), electroforesis en gel 1%, 100V- 40minTBE 1X.....	50
Figura 11. Dendrograma Simple Matching y método Ward basado en 174 muestras y 11 clones testigo <i>T. cacao</i> a partir de datos moleculares.....	53

LISTA DE ANEXOS

- Anexo 1.** Ubicación geográfica de los sitios de colecta en Bolivia de cacao silvestre y cultivado
- Anexo 2.** Genotipos selecciones élite de (*Theobroma cacao* L) de Alto Beni, Bolivia
- Anexo 3.** Características morfológicas de fruto y semillas utilizadas para la evaluación *in situ* de árboles de cacao
- Anexo 4.** Aislamiento de ADN de cacao usando el "FastPrep" System (Qbiogene)
- Anexo 5.** Análisis de varianza y prueba de Tukey para las variables cuantitativas, comparación entre cacao nacional silvestre y cacao nacional boliviano en cultivo.
- Anexo 6.** Análisis de varianza y prueba de Tukey para las variables cuantitativas, comparación entre conglomerados para el cacao selecciones élites de Alto Beni, Bolivia
- Anexo 7.** Matriz de distancias euclideana por genotipos procedentes de 19 sitios donde se encuentra cacao Nacional Boliviano silvestre y en cultivos.
- Anexo 8.** Resultados del análisis de calidad de 12 muestras de Cacao Nacional Boliviano.
- Anexo 9.** Primers microsatélites (SSRs) usados como estándares internacionales para la caracterización molecular de *Theobroma cacao* L.

July Martinez, W. 2007. Caracterización morfológica y molecular del Cacao Nacional Boliviano y de selecciones élites del Alto Beni, Bolivia. Tesis M.Sc. CATIE. Turrialba, Costa Rica. 88 p.

Palabras clave: *Theobroma cacao*, diversidad genética, cacao silvestre, SSRs, microsatélites, calidad industrial, recursos fitogenéticos, río Beni, prueba de consenso.

RESUMEN

Se analizó la variabilidad morfológica y genética del Cacao Nacional Boliviano (CNB), silvestre y cultivado. Se evaluaron 164 genotipos de CNB con diferente nivel de domesticación (57 silvestres, 107 cultivados) y 61 selecciones élites de fincas de productores de la cooperativa El Ceibo, Bolivia. Se midieron *in-situ* 13 variables de fruto y semilla; se hicieron análisis univariados (ANOVA), y multivariados (componentes principales, conglomerados, discriminante canónico), para identificar las variables que más discriminan entre grupos y lugares de colecta. Se analizó la calidad de 12 muestras de cacao de genotipos silvestres y cultivados. Se utilizaron 14 *primers* para el análisis molecular y se determinó la relación morfológica y molecular con la prueba de consenso.

La variabilidad genética del cacao silvestre es baja, las características relevantes son diámetro y largo de semilla, formas cundeamor y angoleta, ápice obtuso, constricción basal 49 % ausente, la rugosidad del mesocarpo 63 % intermedia, color de semilla 100% púrpura. Para el cacao cultivado la variabilidad es media. Las variables que más discriminan fueron diámetro de semilla y largo de la mazorca. El estudio de microsatélites, ubicó al CNB silvestre en un grupo diferente al Forastero y Trinitario. Todos los *primers* resultaron ser polimórficos 100 %, los *primers* informativos fueron: CIR1, CIR24, CIR7, y CIR18. La calidad del cacao de tres sitios presentan buenos perfiles, dos muestras dieron perfiles similares al cacao Nacional del Ecuador. Las selecciones élites de Alto Beni, presentaron diferencias significativas entre ellas, las características típicas fueron: forma de mazorca angoleta, forma del ápice puntiaguda, constricción basal escasa, rugosidad del mesocarpo áspera, el color de mazorca amarillo 78% y color de semilla púrpura 98,4 %. Se concluye que el cacao Boliviano silvestre es diferente de los complejos genéticos conocidos. Se recomienda comparar con cacaos silvestres de la región de Itenes y río Mamore en Bolivia y con genotipos de Cacao Nacional de Ecuador, conservar este material para futuros trabajos de investigación y estudios de tolerancia a enfermedades.

July Martinez, W. 2007. Morphologic and molecular characterization of the National Bolivian and selections Cacao the Alto Beni elites, Bolivia. Thesis M.Sc. CATIE. Turrialba, Costa Rica. 88 p.

Key words: *Theobroma cocoa*, genetic diversity, wild cocoa, SSRs, microsatellites, quality industrial, resources fitogenéticos, river Beni, proof of consent.

SUMMARY

The morphologic variability and genetics of the Bolivian National Cacao (BNC), wild and cultivated, were analyzed. 164 genotypes of BNC with different level of domestication (57 wild and 107 cultivated) and 61 producer's farms elite selections of the cooperative El Ceibo, Bolivia were evaluated. 13 variables of fruit and seed *in situ* were measured. Univariate analysis of variance (ANOVA) and multivariate analysis of variance (principal components, conglomerates, canonical discriminant) were done, in order to identify the variables which have more power to discriminate groups and collection places. The quality of 12 wild and cultivated cacao was examined. 14 primers were utilized for the molecular analysis and the morphologic and molecular relation was determined with the consent test.

The genetic variability of the wild cocoa is low; the relevant characteristics are diameter and seed size, *cundeamor* and *angoleta* forms, obtuse apex, basal constriction 49 absent %, the mesocarpo's rugosity 63 % intermediate, seed color 100 % purple. Variability is medium for the cultivated cacao. The variables which had more power to discriminate were seed diameter and pod length. The Microsatellites study located the wild BNC in a different group to the Forastero and Trinitario. All the primers resulted to be polymorphic 100 %, the informative primers were: CIR1, CIR24, CIR7, and CIR18. The quality of tree sites cacao (Tequeje, Mototoy and San Antonio communities) presented good profile, two samples presented similar characteristics to the National cacao of Ecuador. The Alto Beni elite selections presented significant differences among them, the typical characteristics were: *angoleta* pod form, sharp-pointed apex's form, scarce basal constriction, the mesocarpo's rough rugosity, the yellow pod color 78 % and the purple seed color 98.4 %. It is concluded that the Bolivian wild cocoa is different to the genetic acknowledged complexes. It is recommended to compare river Beni genotypes with wild cacao of Itenes's region and river Mamore in Bolivia and with genotypes of National Cacao of Ecuador, to preserve this material for future research works and studies of diseases tolerance.

1 INTRODUCCIÓN

El cacao (*Theobroma cacao* L.), se cultiva en Bolivia en las áreas tropicales de los departamentos de La Paz, Beni, Pando, Santa Cruz y Cochabamba, encontrándose también en forma silvestre, la zona de mayor producción de Bolivia se ubica en Alto Beni, departamento de La Paz. El cultivo de cacao en Alto Beni es una de las principales actividades agrícolas, con una producción de 1000 toneladas/año y constituye el 13 % de los ingresos de los hogares Alto Benianos (July 2002, Somarriba y Trujillo 2005, Miranda y Somarriba 2005).

El cacao ha sido cultivado en Bolivia por los nativos mosetenes por más de 200 años, fue fomentado por las misiones Franciscanas y Jesuitas a lo largo del río Beni (Cortés 1997; Villegas 2004). El cultivo fue promovido por el gobierno de Bolivia en la década de 1960, como la principal fuente de ingresos para los agricultores del altiplano boliviano que colonizaron la región amazónica del Alto Beni (Zeballos y Terrazas 1970), una situación que se mantiene hasta hoy. Los nuevos colonos fueron provistos de semilla híbrida traída inicialmente de Ecuador y luego producida localmente mediante polinización controlada de una lista de clones internacionales introducidos de Trinidad y Tobago, el CATIE (Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza) en Costa Rica y la Estación de Cuarentena Intermedia de la Universidad de Reading en el Reino Unido (Somarriba y Trujillo 2005).

En Bolivia, al cacao local se le conoce internamente como “Cacao Nacional Boliviano” (CNB) o “cacao criollo”, aunque no debe confundirse este nombre con el grupo genético de los criollos pues se trata más bien de un cacao Forastero. El CNB es el germoplasma tradicionalmente cultivado en Bolivia desde la época colonial pero su origen geográfico y genético las características que lo distinguen de otros genotipos y su relación genética con los otros Forasteros (aunque se le ha vinculado con ciertos genotipos brasileños) son desconocidos. El CNB se encuentra en condiciones silvestres y en cultivo con diferentes grados de cruzamiento con materiales introducidos.

A pesar del gran potencial comercial del CNB para desarrollar en Bolivia un cacao diferenciado de mayor rentabilidad, este cacao es actualmente explotado en forma limitada. Se considera que su adaptación a las condiciones de la Amazonía Boliviana, su calidad industrial es aprovechada actualmente por al menos dos compañías internacionales (Felchlin Switzerland y Rainforest

Exquicite), su corto período de fermentación y su aparente tolerancia a la escoba de bruja, son elementos que resaltan el potencial del material.

El CNB podría ser eventualmente complementado con otras fuentes importantes de germoplasma, como por ejemplo selecciones hechas al nivel de finca, las cuales podrían aportar otras características de interés como la resistencia a enfermedades, alta producción, adaptación a ambientes específicos, etc. La “Central de Cooperativas El Ceibo” ha identificado, seleccionado y evaluado por al menos diez años, 60 selecciones élite a partir de unos 500 árboles pertenecientes a sus socios. Estos genotipos superiores son conservados en los bancos de germoplasma de cacao de la Estación Experimental Sapecho (EES) y El Ceibo, ambos en Sapecho, Alto Beni. En los últimos cinco años, se ha impulsado el establecimiento de nuevas plantaciones de cacao injertado usando clones internacionales y los árboles élite seleccionados.

Durante los últimos años, en Alto Beni se han realizado varios estudios sobre distintos aspectos de la producción de cacao, sin embargo, sólo un estudio estuvo relacionado con el germoplasma disponible en el país, a pesar de que este es uno de los elementos estratégicos para modernizar la cacaocultura boliviana. En dicha investigación se caracterizó morfológicamente selecciones cultivadas del Cacao Nacional de la zona de Alto Beni (Villegas y Astorga 2005).

En la presente investigación se recopiló información bibliográfica disponible sobre el CNB y se colectó en el campo material con diferente grado de domesticación, el cual será estudiado morfológica y molecularmente para determinar la diversidad genética del CNB, así como su relación genética con el grupo de los Forasteros. Se enviaron muestras a la compañía Guittard en Estados Unidos para determinar la calidad. También se caracterizó morfo-fisiológicamente selecciones élites locales del banco de germoplasma del CEIBO para hacer una preselección de las más promisorias. La información generada en este estudio es de gran utilidad para valorizar los recursos genéticos locales de cacao, precisar mejor lo que se conoce como CNB y orientar la selección de nuevos materiales de siembra para ser usados en las nuevas plantaciones bolivianas.

1.1 Objetivos del estudio

1.1.1 Objetivo general

Valorizar e incrementar el conocimiento del Cacao Nacional Boliviano, mediante la caracterización morfológica, molecular y de calidad de genotipos silvestres y con diferente grado de domesticación.

1.1.2 Objetivos específicos

- Caracterizar morfológicamente *in situ* genotipos de CNB silvestre y cultivado.
- Caracterizar molecularmente los genotipos usando la técnica de microsatélites.
- Determinar el nivel de variación genética dentro y entre los grupos colectados de CNB.
- Ubicar al CNB dentro de la diversidad genética conocida de *Theobroma cacao*.
- Determinar el grado de polimorfismo de los marcadores moleculares en CNB.
- Determinar la calidad industrial de muestras de CNB silvestre y cultivado.
- Caracterizar morfológicamente selecciones locales élites del banco de germoplasma de la cooperativa El Ceibo.

1.1.3 Hipótesis del estudio

- Los genotipos de CNB silvestre muestran diferencias morfológicas entre ellos y con los cultivados.
- La caracterización morfológica *in situ* permite diferenciar la diversidad genética.
- Existe diferenciación genética entre los grupos de CNB (silvestre y cultivado).
- El CNB presenta características moleculares que lo distinguen de otros grupos genéticos.
- Existen genotipos dentro del CNB con potencial para calidad.
- Existe variación morfológica entre las selecciones élites del banco de germoplasma de El Ceibo.

2 MARCO CONCEPTUAL

2.1 Taxonomía, origen y distribución del cacao

El cacao (*Theobroma cacao* L.) pertenece a la familia Malvaceae, orden Malvales y es una de las 22 especies del género *Theobroma*. Tiene un número cromosómico $2n = 20$ (Arguello *et al.* 2000). Su centro de origen es la cuenca del Alto Amazonas (Soria 1966; Wood 1982).

El cacao está distribuido en las tierras bajas tropicales y se cultiva principalmente entre los 20° latitud norte y 20° de latitud sur. Sin embargo las mejores plantaciones están localizadas entre de latitud norte y 10° sur. En América el cacao se cultiva desde el sur de México hasta Brasil y Bolivia (Ochse *et al.* 1974). La distribución natural del cacao en Suramérica alcanza hasta los 15° de latitud sur, en los ríos Alto Beni y Mamoré del territorio boliviano y por el norte hasta cerca de los 10° de latitud en los límites de los llanos venezolanos por las vertientes bajas de las sierras de Parimá, que dividen a Venezuela de Brasil (Soria 1966). Los agricultores Mayas fueron los primeros en cultivar el cacao en América Central y en especial en México.

2.2 Grupos genéticos

El cacao se divide genéticamente en tres grandes grupos: Criollos, Forasteros y una mezcla de los criollos y forasteros denominada Trinitarios (Hardy 1969). La dificultad de aplicar el término variedad a la clasificación del cacao, hizo necesario hablar de poblaciones. Cheesman citado por Wood (1982) sugiere la siguiente clasificación:

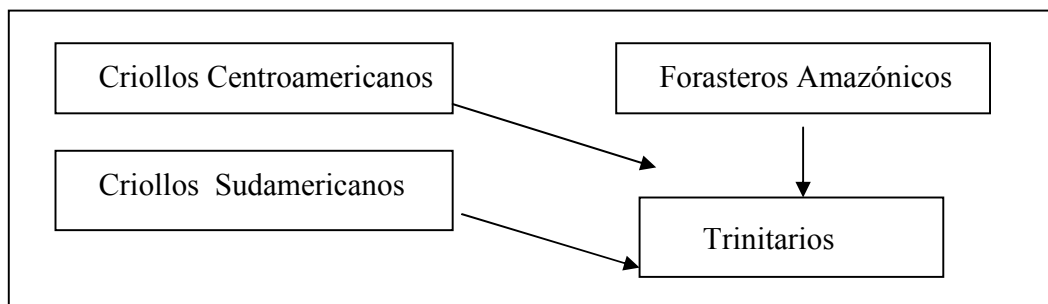


Figura 1. Clasificación esquemática de la diversidad genética de *T. cacao*.

A continuación se detallan algunas características de los grupos principales:

2.2.1 Cacao forastero

Los cacaos forasteros, conocidos también como cacaos Amazónicos y/o amargos son originarios de América del Sur. Su centro de origen es la parte alta de la cuenca del Amazonas en el área comprendida entre los ríos Napo, Putumayo y Caquetá. Esta población es la más cultivada en las regiones cacaoteras de África y Brasil y proporcionan más del 80 % de la producción mundial (Motamayor *et al.* 2002). El cacao forastero es muy variable y se encuentra en forma silvestre en la alta (Perú, Ecuador y Colombia) y baja Amazonia (Brasil, Guyanas y a lo largo del río Orinoco en Venezuela), presenta estaminoides con pigmentación púrpura, mazorcas verdes con más de 30 semillas, de color púrpura, con alta astringencia y bajo contenido de grasa. A este grupo pertenecen todos los cacaos comerciales del Brasil, oeste Africano y este de Asia, así como el cacao nacional del Ecuador, y líneas del bajo Amazonas de tipo amelonado que incluye Iquitos, Nanay, Parinari, y Scavina. (Arguello *et al.* 2000). Estos tipos de cacao son originarios del alto Amazonas y dispersados naturalmente, por dicha cuenca (Braudeau 1970). Tal vez resulte útil hacer una distinción entre los cacaos ordinarios que se establecieron desde hace bastante tiempo en África Occidental y Brasil y los Forasteros Amazónicos que se han originado de colectas recientes. El cacao amelonado del África Occidental es una población muy homogénea, resultante de una pequeña introducción, pero en la actualidad representa la mayor parte de la producción mundial (Wood 1982).

2.2.2 Cacao criollo

El apelativo “criollo” (indígena) fue en su origen atribuido por los españoles al cacao cultivado inicialmente en Venezuela, en América Central y México y cuyos granos de cotiledones blancos proporcionaban un chocolate de superior calidad (Braudeau 1970). El cacao criollo se caracteriza por tener estaminoides rosados, mazorcas verdes o rojas del tipo Cundeamor, de superficie rugosa y surcos profundos; posee entre 20 y 30 semillas de color blanco ó crema, alto contenido de grasa, sin astringencia y bastante aroma; son usados en la industria cosmética. Los principales tipos criollos incluyen cacao Pentágona, cacao Real y cacao Porcelana (Arguello *et al.* 2000).

2.2.3 Cacao Trinitario

Este grupo es el resultado del cruzamiento entre individuos criollos y forasteros. Comprende formas híbridas heterogéneas, su calidad y características botánicas son intermedias entre los dos grupos (Arguello *et al.* 2000). Se cultiva en México, Centro América, Norte de Sudamérica, Trinidad, Colombia, Venezuela y oeste de África y suroeste de Asia (Sánchez 1983). Este grupo se usa como material de injerto para multiplicarlo sin perder sus características, las mejores cruas combinan el sabor del cacao criollo con la rusticidad del Forastero, produciendo cacao de mucha demanda por su aplicación en los chocolates de alto grado de “sabor” (Davies 1986).

2.3 Características del Cacao Nacional Boliviano (CNB)

Se conoce como CNB a las variedades forasteras encontradas en Bolivia, en cultivo ó en condiciones silvestres. El CNB presenta las siguientes características: mazorca inmadura de color verde, frutos pequeños de forma alargada, ápice del fruto de punta pequeña, superficie de la mazorca ligeramente rugosa con 10 surcos bajos, semilla de color púrpura y sin pigmentación en el filamento del estambre de la flor (Allen y Lass 1983). Las semillas son pequeñas, lo que dificulta su comercialización como materia prima (Milz 1990). Las características de fruto y semilla del CNB difieren claramente de los cacaos criollos (Sánchez 1983). El CNB es poco atacado por la escoba de bruja (*Moniliophthora perniciosa*).

En Bolivia, la incidencia de está enfermedad es menor al 35 % en el CNB mientras que en híbridos supera el 75 % y en clones internacionales el 60 % (Cerde 2004). Debido a que la época de fructificación del CNB es más temprana que la de los forasteros, los frutos escapan a la infección de la mazorca negra (*Phytophthora palmivora*) que requiere de épocas frías y húmedas para su desarrollo y formación de inóculo.

2.4 Colecciones de germoplasma en el mundo

Existen colecciones en 28 países productores de cacao; Trinidad Tobago (2300 accesiones), Costa Rica (800) incluyendo 10 % de clones criollos; Ecuador (800); Costa de Marfil (600); Guyana Francesa (400); Malasia (400); Ghana (300) y Venezuela con 300 accesiones (Butler y Umaharan 2004). Hasta 1991 el “Internacional Cocoa Germplasm Database” (ICGD) había registrado en su base de datos, información de alrededor de 8000 clones, incluyendo materiales silvestres y

seleccionados por programas de mejoramiento genético. Existen dos bancos genéticos internacionales calificados como “colecciones internacionales” por el IPGRI; uno en Trinidad (*The International Cocoa Genebank at Trinidad* (ICG, T)) y el otro en CATIE (*The International Cacao Collection at CATIE* (IC3)). Los países con mayor número de accesiones conservadas en colecciones son: Brasil, con clones colectados en el bajo amazonas Brasileño y las series locales CEPEC, SIC y SIAL; Costa Rica con accesiones de las series locales CC, UF, PMCT y ARF; y Trinidad y Tobago que contiene la colección más grande del mundo (End *et al.* 1992).

2.5 Cultivo del cacao en Bolivia (Alto Beni)

Antes de 1950, la mayoría de la producción de cacao en Bolivia provenía de plantas silvestres provenientes del Beni y Alto Beni (Pérez 1957). En 1968 se inició un programa de mejoramiento utilizando clones internacionales resistentes a la escoba de bruja (Zeballos y Terrazas 1970). En los años 80 esta enfermedad se expandió masivamente y muchos agricultores abandonaron o eliminaron los cacaotales y establecieron plantaciones de papaya, cítricos, plátano y arroz. En 1977 se creó la Central de Cooperativas El Ceibo con el propósito de mejorar los precios pagados al productor. El Ceibo fundó su departamento agropecuario (COOPEAGRO) e inició la producción de cacao híbrido. En 1993, El Ceibo inició la producción y distribución de cacao injertado a sus asociados y entre 1996 y 1998 promovió el uso de sistemas agroforestales sucesionales multiestratos como sombra para el cacao. El interés en cultivar cacao resurgió a partir del año 2000 debido al aumento en los precios. A partir del 2002, se inició una nueva fase de cambio tecnológico en el cultivo del cacao en Alto Beni, basado en el uso masivo de plantas de cacao injertado, plantadas en diseños agroforestales para la producción de cacao, fruta y madera (Somarriba y Trujillo 2005).

El CNB es el más antiguo presente en Alto Beni. Sin embargo, aproximadamente hace unos 50 años se inició la introducción de material foráneo. La cronología descrita por Somarriba y Trujillo (2005) es la siguiente:

- a) Cacao nacional Boliviano fue introducido por los jesuitas entre 1739 a 1809 (Cortés 1997) y fue cultivado por nativos mosetenes desde hace más de 240 años con la ayuda de misioneros franciscanos. El cultivo del cacao se mantuvo sin cambios hasta el inicio de la colonización (1960 a 1980).

- b) La Corporación Boliviana de Fomento y el Instituto Nacional de Colonización, promovieron el cacao como el principal cultivo en la zona de Alto Beni, a partir de 1960. En 1962 se introdujo semilla híbrida de los cruces: (SILECIA-1 x SCA-6; SILECIA-5 x SCA-6) procedían de Ecuador, Perú y Trinidad-Tobago (Universidad de West Indies) introdujo germoplasma diverso de su colección internacional, con los que se produjo semilla híbrida y se establecieron las primeras colecciones de germoplasma en la Estación Experimental de Sapecho, Alto Beni.
- c) En 1980 se introducen clones internacionales del banco de germoplasma del CATIE (Costa Rica).
- d) El año 2001 se introducen clones internacionales de la Universidad de Reading; Gran Bretaña por iniciativa de USDA/CICAD.
- f) Entre 2002 y 2005, CATIE introduce clones como el CCN-51 y materiales superiores locales élites identificados por El Ceibo en los últimos 10 años.

2.6 El Cacao Nacional Boliviano

Según Davies (1986), el cacao “Boliviano” se clasifica en dos grandes grupos que son:

- a) **Cacao silvestre o cacao de monte**, que se refiere a los árboles que no han sido sistemáticamente plantados por el hombre, pero que se reproducen vegetativamente o sexualmente son luego dispensados por la acción de los animales. El cacao silvestre prolifera a lo largo de las márgenes de los ríos Ichilo y Beni. A este material se le denominará en la presente investigación como “CNB silvestre”.
- b) **Cacao criollo**, esta clasificación se refiere a poblaciones que han sido plantadas por la mano del hombre, tienen un alto grado de variabilidad genética y posiblemente derivan originalmente del “cacao silvestre”. A menudo no se hace distinción entre las clasificaciones de “criollo y silvestre”, usándose ambos términos en forma intercambiable. A este material se le llamará en la presente investigación como CNB cultivado, con diferente grado de pureza.

Soria (1966), describió el cacao de la región del Alto Beni de Bolivia manifestando que las plantas son similares al cacao silvestre de la región del bajo Beni y al cacao de la Amazonía brasileña. Milz (1990) indica que el CNB se encuentra bien adaptado a las condiciones climáticas del lugar y que ha sobrevivido sin manejo a pesar de las enfermedades locales.

2.7 Caracterización Morfológica

Un descriptor es un atributo cuya expresión es fácil de medir de la forma, estructura o comportamiento de una accesión. Sirve para discriminar entre fenotipos. Los descriptores son altamente heredables, pueden ser detectados a simple vista y se expresan de igual forma en todos los ambientes. (Hidalgo 2003). Los órganos mas importantes para la descripción morfológica son aquellos que están menos influenciados por el ambiente; los mas importantes son; la flor y el fruto en importancia decreciente las hojas, tronco, ramas, raíces y los tejidos celulares (Enríquez 1991).

Varios autores han propuesto listas de descriptores morfológicos para la identificación y evaluación del germoplasma de cacao. Por ejemplo, el IBPGR ha usa 65 descriptores, mientras Phillips y Enríquez (1988) propusieron una lista de 26 descriptores morfológicos y el CIRAD 24. Los descriptores han sido empleados desde la década pasada para caracterizar el germoplasma de las colecciones en diferentes centros de investigación tales como el CATIE, el ICGT y el ICGD entre otros (IPGRI 2000).

Pound (1932), señaló que algunas características de la flor y la semilla son de suma importancia en la caracterización de clones de cacao, lo cual es confirmado por Dejean (1984) y Ostendorf (1965) quienes propusieron que los pétalos, el pistilo y el número de óvulos por ovario son los mejores descriptores para caracterizar los clones de cacao. Enríquez y Soria (1967), propusieron una lista de 11 caracteres para la evaluación de las flores, que fueron usados por Engels (1983), Bartley (2000).

Para la caracterización morfológica el IBPGR (1981) recomienda 35 frutos Las características de las almendras; ancho, largo, espesor, peso húmedo sin testa, peso seco sin testa, porcentaje de testa y pulpa, están entre los mejores descriptores para caracterizar una población, usando una muestra de 12 a 20 mazorcas (Enríquez 1966).

2.8 Marcadores moleculares

La información genética de las plantas se encuentra almacenada en la secuencia del ácido desoxirribonucleico (ADN) de los cromosomas nucleares y en los genomas de las organelas. La definición de la estructura molecular del ADN por parte de Watson y Crick en los años 50, abrió todo un mundo de nuevas posibilidades científicas para el conocimiento y el mejor aprovechamiento de plantas, animales y microorganismos, contribuyendo en gran parte a lo que se ha dado en llamar

la revolución de la biotecnología (Phillips 1998). La tecnología de los marcadores moleculares es fruto del desarrollo de la tecnología del ADN que se inició a comienzos de la década de los 70 (Ángel, 2000). Las técnicas de biología molecular y particularmente 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. Los marcadores moleculares han aportado información relevante en áreas clave de la conservación *in situ* y *ex situ* (Karp *et al.* 1997).

Las ventajas de la caracterización de ADN sobre la caracterización morfológica es que no está influenciada por el ambiente y se puede utilizar parte de la planta en cualquier estado de desarrollo (Powell, 1992; Rao y Riley, 1994). Los rasgos moleculares están aparentemente libres de efectos epistáticos y se puede evaluar virtualmente un número ilimitado de ellos (Phillips 1998).

La mayoría de los marcadores moleculares se basan en la técnica de reacción en cadena de polimerasa ó PCR sus siglas en inglés (Polymerase Chain Reaction), una técnica que permite la ampliación de regiones específicas del ADN dependiendo de los iniciadores o (primers) usados (Newton y Graham, 1995). La reacción se lleva a cabo en equipos denominados termocicladores y en un tubo de reacción que contiene el ADN a amplificar, al cual se le adiciona una solución amortiguadora, la enzima ADN polimerasa, cloruro de magnesio y los iniciadores que pueden ser aleatorios ó específicos, y un conjunto de desoxinucleótidos (Valverde y Paredes 1996). Existen varios tipos de marcadores de ADN como son los RFLP (Restricción fragment Length Polymorphism), RAPDs (Random Amplified Polymorphic), AFLP (Amplified Fragment Length Polimorphism) y SSR (Secuencia Simple Repetida ó microsatélites) (Phillips 1998). La selección del tipo de marcador a usar depende de los objetivos del estudio, de la especie de interés y de la disponibilidad de recursos técnicos y financieros con que se cuenta (López 1999).

2.8.1 Microsatélites (SSRs)

Los microsatélites son secuencias consecutivas de nucleótidos (1 - 6 bases nucleotídicas) repetidas hasta 50 veces, flanqueadas en sus extremos por secuencias únicas, las cuales se mantienen estables dentro de una misma especie. Estas secuencias se encuentran localizadas en diferentes partes del genoma, son abundantes, hipervariables en el número de copias de los microsatélites y por ende altamente polimórficos entre individuos (Davierwala *et al.* 2001). Phillips *et al.* (1995a), mencionan

que los microsatélites son regiones de secuencias pequeñas (dos a 10 pares de bases) repetidas, arregladas en serie, las cuales se asume que están distribuidas al azar en el ADN. Son secuencias de ADN altamente variables dispersas a través del genoma, las cuales pueden o no estar asociadas con genes. Son loci altamente mutables que pueden estar presentes en muchos sitios del genoma. Dado que, la repetición por sí misma no codifica para formar ninguna proteína y debido a que las secuencias de ADN repetitivo pueden recombinarse y expandirse más frecuentemente que otros tipos de secuencias, estas regiones son a menudo altamente variables y consecuentemente útiles para medir el polimorfismo entre especies o variedades muy relacionadas (Phillips *et al.* 1995b).

La visualización de los microsatélites se hace usando el procedimiento PCR que consiste en la replicación del ADN en los organismos eucariotas realizada por la ADN polimerasa. Estas enzimas realizan la síntesis de una cadena complementaria de ADN en el sentido 5' → 3' usando un molde de cadena sencilla, pero a partir de una región de doble cadena. Para crear esta región doble cadena se utilizan iniciadores (llamados también cebadores o *primers* en inglés) específicos, que son fragmentos cortos de ADN de una sola cadena. Estos iniciadores incluyen de dos a cinco nucleótidos como por ejemplo; AT (Adenina y Timina), CTT (Citosina, Timina, Timina) y ATGT (Adenina, Timina, Guanina, Timina).

La ventaja de los SSRs a diferencia de otros marcadores moleculares como RAPDs, AFLPs, etc, es que son codominantes, o sea, es posible visualizar por separado el aporte de ambos padres. El marcador molecular SSR, permite conocer de forma clara el estado (homocigoto o heterocigoto) en que se encuentran y regiones específicas dentro de los cromosomas del cacao. Esta característica le concede a los SSR ventajas frente a otras técnicas y puede ser usados por los fitomejoradores para seleccionar de forma más precisa y en menor tiempo, materiales élites con potencial para ser incluidos en programas de mejoramiento genético (Loo y Amores 2003). Los SSR son útiles para la selección de polimorfismos intervarietales, para construcción de mapas de ligamento, particularmente para estudios de poblaciones y de tipo evolutivo (Phillips *et al.* 1995a). Este método es utilizado por genetistas en el desarrollo de mapas genéticos e identificación de individuos y ahora se están utilizando ampliamente para estudios de ADN en plantas (Caetano-Anolles y Gresshoff 1998).

El procedimiento de SSRs es similar al PCR, con la diferencia que se usa un par de iniciadores específicos (20 – 30 pares de bases) complementarios a las secuencias que flanquean los

microsatélites (Phillips 1998). Cornide (1998) indica que, para la obtención de los microsatélites se debe seguir el siguiente procedimiento, el cual normalmente no es desarrollado por la mayoría de los investigadores quienes parten de iniciadores que ya están disponibles y son específicos para cada especie en particular:

- Construcción de una biblioteca genómica mediante el empleo de una enzima de corte frecuente (Ej. *Mse*1) y la selección de fragmentos de entre 280 y 600 pares de bases.
- Selección de copias SSR. Se usan sondas sintéticas complementarias a los elementos más comunes repetidos. Se identifican los segmentos polimórficos y se construye los iniciadores de PCR para el ADN.
- Secuenciación y diseño de los pares de iniciadores de secuencias únicas cuidadosamente seleccionadas, se flanquean las secuencias repetitiva e identifican las frecuencias de los microsatélites.
- Separación de los fragmentos, hebras de ADN simple, una será líder y otra será rezagada pero contendrá bases nitrogenadas.
- Hacer múltiples copias de una parte del microsatélite seleccionado utilizando un termociclador y dos iniciadores (*forward* y *reverse*) por cada microsatélite.

La determinación del polimorfismo SSR se realiza con un PCR y la separación de los productos mediante electroforesis en geles de agarosa, poliacrilamida ó geles de secuenciación. Las variaciones detectadas por los SSR son el resultado de cambios en el número de unidades repetidas (Lowe *et al.* 2004).

El procedimiento para el PCR se basa en la repetición de un ciclo formado por tres etapas:

- **Desnaturalización del ADN de doble cadena.** En la primera etapa (desnaturalización) la doble hélice de ADN se separa en dos hebras mediante una incubación de la muestra a altas temperaturas (93-97°C) en un termociclador. La renaturalización se producirá cuando la temperatura disminuya.
- **Hibridación de los iniciadores a la zona 3' específica de cada una de las hebras.** En el segundo paso (hibridación) los cebadores se unen a las zonas 3' complementarias que flanquean el fragmento que queremos amplificar. Se realiza gracias a la reducción de la temperatura (50-65° C).

- **Extensión del cebador por actuación de la ADN polimerasa.** En la tercera etapa (elongación) se produce la síntesis de una cadena sencilla (produciéndose un fragmento de doble cadena por la complementariedad) en la dirección 5'- 3' mediante la acción de la enzima ADN polimerasa, la cual incorpora los desoxinucleótidos fosfato presentes en el medio siguiendo la cadena molde.

Todo este proceso se realiza en un instrumento llamado termociclador, donde se duplica y se amplifica los el *primer*. La amplificación se realiza geoméricamente. La visualización de las SSR se realiza mediante gel agarosa pasando por electroforesis usando Bromuro de etilo y por luz ultravioleta, ó a través de un secuenciador automático usando cebadores con fluorescencia (Lowe *et al.* 2004).

2.9 Métodos estadísticos multivariados aplicados a la biología molecular

Los métodos y procedimientos estadísticos de utilidad en ensayos biotecnológicos son agrupados por Martínez (1995) en aquellos que tienen como propósito evaluar la diversidad, clasificar la estructura y composición genética de las poblaciones, los desarrollados para la construcción de mapas cromosómicos o genómicos y los denominados QTL “Quantitative Trait Loci”, los cuales son loci asociados con características cuantitativas de importancia económica. Los métodos estadísticos más usados son las distancias genéticas, índices de similitud, dendrogramas y coordenadas principales. Hidalgo (2003) indica que entre los datos multivariados mas usados para el análisis de datos se encuentran el de componentes principales y análisis de conglomerados, por los métodos de agrupamiento jerárquico y no jerárquico. Lebeda y Jendruleck (1987), indican que el análisis de conglomerado puedes ser usado para la evaluar la similitud genética y que derivaciones del método han sido usadas extensivamente en otros tipos de análisis filogenéticos; pero que, el problema se encuentra en la dificultad de la elección del algoritmo y en la selección de los caracteres.

Los índices de similitud con base en características de forma binaria se conocen como coeficientes de asociación y sus matrices, como matrices de asociación. Estos coeficientes expresan la concordancia entre cada par de unidades experimentales, unidades de organización taxonómicas, genotipos e individuos de una población, etc. Los indicadores de asociación pueden ser de tres tipos; pero los más usados en trabajos de marcadores moleculares son los que resaltan la doble presencia y en especial los de Nei y Li (1979) y Jaccard.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Generalidades de la investigación

La investigación se desarrolló de diciembre 2006 a octubre 2007 e incluyó una fase de campo en Bolivia y una fase de laboratorio, llevada a cabo en el laboratorio de Biología Molecular del CATIE, Turrialba Costa Rica y en los laboratorios del USDA/ARS-Beltsville, Estados Unidos. La ubicación de los sitios de colecta de muestras y de la caracterización *in situ* de los genotipos se registró tomando las coordenadas geográficas (Universal Transversal de Mercator) UTM (Anexo1).

La fase de campo involucró:

- Tres expediciones para colectar muestras foliares y caracterización morfológica *in situ* de fruto y semillas de genotipos de CNB silvestres y cultivados en tres áreas de Bolivia: (Figura 2)
 - Norte del departamento de La Paz, en las comunidades de las TCO (Tierras Comunitarias de Origen), y el Parque Nacional Madidi.
 - Cauce del río Beni y algunos afluentes, departamentos de La Paz y Beni.
 - Alto Beni de La Paz, donde se encuentra el CNB cultivado, aparentemente introducido inicialmente por las misiones jesuitas y franciscanas en el siglo XVIII.
- Colectas de muestras de almendras, de cacao silvestre y cultivado para analizar la calidad industrial del chocolate.
- Colecta de muestras foliares y caracterización morfológica *in situ* de 61 selecciones élites locales ubicadas en el banco de germoplasma de la Cooperativa El Ceibo en la localidad de Sapecho, Alto Beni.
- Se evaluaron 164 genotipos de CNB con diferente nivel de domesticación (57 silvestres y 107 cultivados) 61 accesiones de cacao selecciones élites locales de la central de cooperativas El Ceibo disponibles en el banco de germoplasma de la cooperativa El Ceibo en Sapecho y en fincas de productores de Alto Beni, Bolivia.

3.1.1 Región norte de La Paz

El norte del departamento de La Paz, específicamente la Provincia Abel Iturralde, es la provincia con mayor extensión territorial del departamento, con 42,815 km.². Se encuentra conformada por los municipios de Ixiamas y San Buenaventura, Limita al norte con el departamento de Pando, al sur con la provincia Franz Tamayo, al oeste con la república de Perú y al este con el departamento de Beni. Los pobladores incluyen colonizadores altiplanicos e indígenas nativos de las etnias Tacana, Guarayos, Araonas y Esse-ejja. Una gran parte de la provincia Iturralde tiene un clima húmedo y caliente, temperatura promedio anual entre 25°C y 26°C, las máximas temperaturas pueden llegar a los 38°C. entre los meses de octubre a enero y Entre los meses de marzo a junio se presentan los frentes fríos (surazos) que baja la temperatura hasta < 10°C y aumento de humedad. En Ixiámas, a 370 msnm de altitud, se registra una precipitación anual de 2335 mm y una temperatura anual media de 26.1° C.

3.1.2 Río Beni

El río Beni pertenece a la cuenca del Amazonas, es el segundo río en importancia fluvial de Bolivia con una longitud de 850 km. entre Puerto Motor (cerca de la localidad de Rurrenabaque) y Riberalta. El río Beni nace en los Andes de la confluencia de los ríos Alto Beni y Kaka en las proximidades de Puerto Pando. La profundidad máxima del río es de 21,3 m aguas abajo de Rurrenabaque, siendo la profundidad promedio de 9 m. El ancho máximo es de 900 m en las proximidades de Rurrenabaque, siendo su ancho promedio de 380 m. Las comunidades de la ribera son; Rurrenabaque, San Buenaventura, Altamarani, Copacabana, Cachichira, San Marcos, San Miguel, Tequeje, Carmen del Emero, Golondrina, Paltal, Isla del Oro, Puerto Cabinas y Riberalta.

3.1.3 Alto Beni

La región de Alto Beni, Bolivia está ubicada a 270 km al noroeste de la ciudad de La Paz, entre las coordenadas 15° 10' y 15° 55' S, 66°55' y 67°40' O. Posee alturas que oscilan entre 350 a 560 msnm. La región comprende las provincias de Sud Yungas, Caranavi y Larecaja Tropical. El Alto Beni está dividido geográficamente en siete áreas y contiene 93 comunidades o colonias, que se diferencian en tres zonas de vida: Bosque húmedo sub-tropical, transición a seco y Bosque muy húmedo (Somarriba y Trujillo 2005). Alto Beni está compuesto por valles que se extienden en ambas márgenes del río Beni (350-500 msnm) y tienen topografía plana a levemente ondulada. El clima es cálido y húmedo, con amplias variaciones estacionales. La precipitación anual promedio

varía desde 1300 mm en el valle (estación Covendo, 15°47', altitud 560 m) hasta casi 2000 mm en las colinas altas (estación Entre Ríos, 15°39', altitud 1000 m). En Sapecho (15°32', altitud 450 m), la precipitación promedio anual es de 1580 mm, la temperatura promedio anual es de 26 °C, pero las mínimas absolutas pueden bajar a 11 °C en los meses de junio y agosto, época de frentes fríos del sur o “surazos”. La temperatura mensual promedio varía entre 16°C (junio a agosto) y 26 °C (enero a marzo, época de verano o lluvias). La humedad relativa promedio anual varía entre 70-80%, promedio 85%, mínima en septiembre y máxima en mayo (Somarriba y Trujillo 2005).

3.2 Fase de campo

3.2.1 Recolección de muestras foliares

Se escogieron comunidades donde se reporta la existencia de CNB silvestre, para el cacao cultivado se selecciono fincas de productores que tienen parcelas de CNB cultivado. Se escogieron los árboles más diferenciados y representativos en cada rodal ó finca visitada, de cada árbol muestreado se colectaron tres hojas jóvenes y sanas. . Las comunidades visitadas en el río Beni, Norte de La Paz, pertenecen a la etnia Tacana, que está representado por su entidad matriz CIPTA (Consejo Indígena de los pueblos Tacanas) y las comunidades de Covendo, San José de la zona de Alto Beni, pertenecen a la etnia Mosesten representado por su entidad matriz OPIM (Organización del pueblo Indígena Mosesten). Las expediciones al Norte de La Paz, cuenca del Río Beni y Alto Beni se detalla en el Anexo 1 y en la Figura 3.

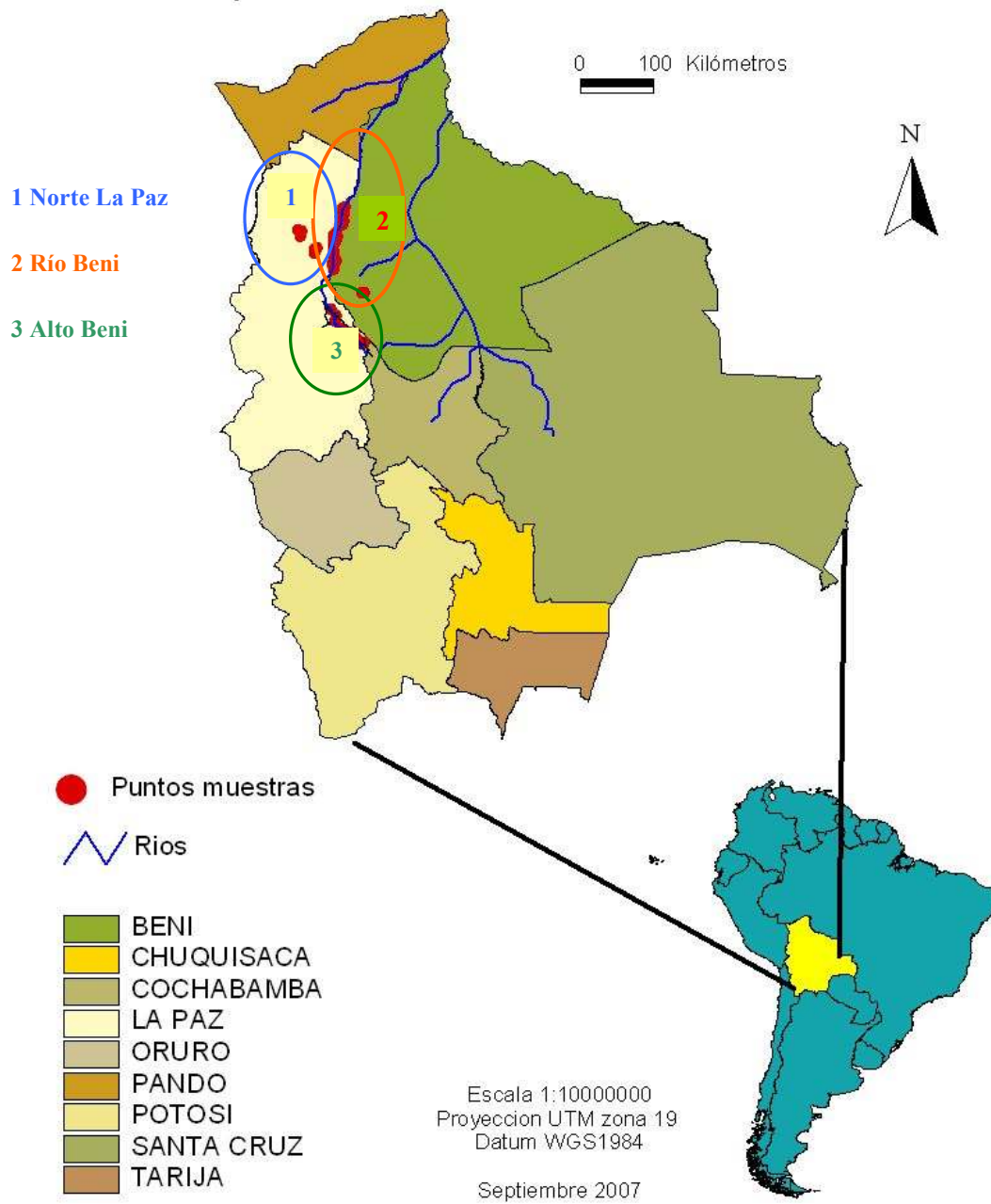


Figura 2. Mapa de Bolivia y ubicación de los sitios donde se colectaron las muestras ubicándolas con coordenadas geográficas UTM.

3.2.1.1 Expedición 1

Se realizó del 17 de enero al 15 de febrero, en las localidades de Tumupasa, San Silvestre, Ixiámas, Macagua y Santa Fe, ubicadas al norte del departamento de La Paz, provincia Abel Iturralde. Todas pertenecen a comunidades de las Tierras Comunitarias de Origen (TCO) de los indígenas Tacanas.

3.2.1.2 Expedición 2

La expedición más larga y peligrosa se realizó en fecha del 01 al 20 de marzo. Se navegó en el río Beni comunidades de Copacabana, Altamarani, Cachichira, San Marcos, Tequeje, Carmen del Emero, Golondrina, Rodales de Isla del Oro y Paltal en los departamentos del Beni y La Paz.

3.2.1.3 Expedición 3

Se realizó del 10 de abril al 12 de mayo en Alto Beni, departamento de La Paz, comunidades de; Covendo, San José, San Miguel de Huachi, San Antonio, Mototoy, Cocochi, Covendo, Inicua Bajo, Santa Ana, Sararia y Muchane. Se caracterizó y colectó muestras de CNB en cultivo y silvestres en comunidades originarias de la etnia Mosenen, y en parcelas de productores colonizadores, llamados colonos.

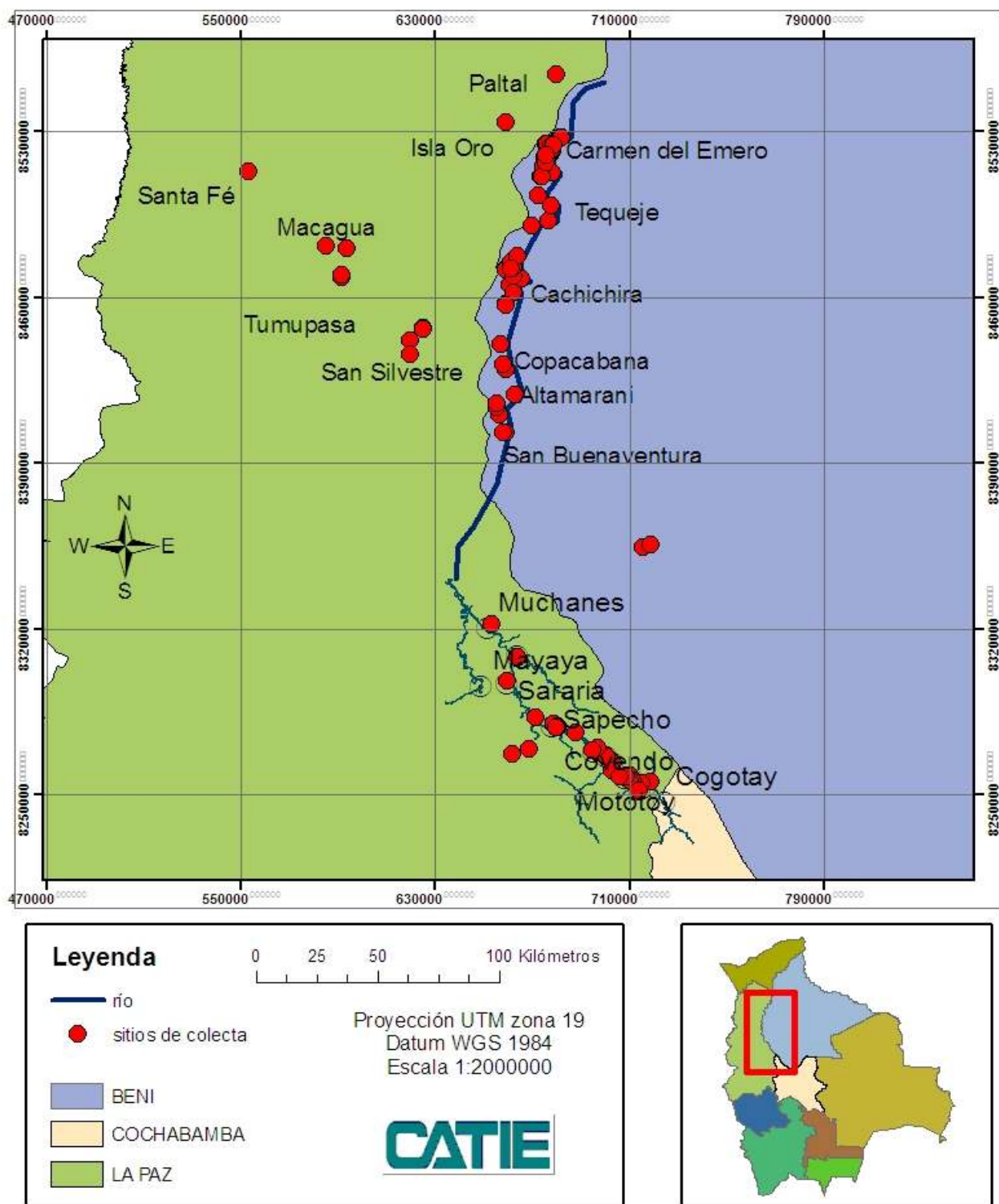


Figura 3. Mapa de ubicación de los sitios de colecta de muestras de *Theobroma cacao* L. en Bolivia.

3.2.2 Colecta selecciones élite de Alto Beni.

Se realizó del 16 al 20 de enero y del 15 al 25 de mayo en la localidad de Sapecho, provincia Sud Yungas, del Departamento de La Paz. La colecta se realizó en el Centro Experimental PIAF-EL CEIBO y Estación Experimental Sapecho, dependiente de la Universidad Mayor de San Andrés UMSA. Se evaluaron 61 selecciones élite, de un total de más de 200.

3.2.3 Colecta de material vegetativo para análisis molecular

Se colectaron tres hojas sanas de cada accesión de CNB, en tres réplicas, una para enviar a los laboratorios del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA), otra para enviar al CATIE y la última copia de respaldo en La Paz, Bolivia de igual manera se hizo con las selecciones élites locales.

En los sitios lejanos, luego de cortadas las hojas se secaron en lugares ventilados bajo sombra, evitando su oxidación. En sitios cercanos, se secó en un horno automático a una temperatura de 50 °C por 48 horas, se empacaron en sobres de papel, se rotularon, sellaron, codificaron y se enviaron al Laboratorio de Biología Molecular del CATIE para la extracción de ADN.

Se colectaron muestras de semilla de los rodales de cacao silvestre, se fermentaron en bolsas de tela y se secaron al sol por 48 horas. Se tomo una muestra por rodal con el fin de tener los parámetros organolépticos y de calidad industrial.

3.2.4 Caracterización morfológica *in-situ*

Se utilizó una lista de descriptores para cacao publicadas en 1981 por el Consejo Internacional de Recursos Fitogenéticos IBGRI (ahora Bioversity International) y los descriptores cualitativos y cuantitativos publicados por Engels *et al.* (1980). Se utilizaron 13 descriptores de fruto y semilla, que se podían realizar en condiciones de campo.

3.2.4.1 Características de fruto

De cada accesión se evaluaron al menos tres mazorcas fisiológicamente maduras sin síntomas de enfermedad. Se evaluaron y registraron tres características cuantitativas (largo, diámetro, peso) y cuatro cualitativas (forma de mazorca, forma del ápice, forma de la base, color de la mazorca) (Anexo 3).

3.2.4.2 Características de la semilla

De los frutos colectados se contó la cantidad de semillas íntegras y vanas y se determinó el número de semillas y el peso fresco de semillas. De cada fruto se tomaron 3 semillas y se les midieron cinco características cuantitativas (número de semillas, largo, diámetro, peso húmedo, peso seco) y una cualitativa (color de almendra). El peso seco se determinó después del proceso de fermentación y secado. Debido a las condiciones difíciles de accesibilidad y traslado en las expediciones. Estas muestras se hicieron fermentar indistintamente en condiciones ambientales por un período de 4 días en bolsas de tela. Se evaluaron 100 semillas por muestra usando los parámetros de peso seco, largo y diámetro.

3.3.4.3 Análisis de calidad de almendras

Se enviaron 1074 g de 12 muestras de cacao seco, de genotipos silvestres y cultivados de CNB a la Compañía Guittard en Estados Unidos, para los respectivos análisis de calidad, donde se midió nivel de astringencia, ácidos, sabor, aroma, grasa.

3.3.5 Análisis estadístico de datos morfológicos

a) Análisis de Varianza

Para el estudio de las variables morfológicas se usó un diseño irrestricto al azar y ANOVA, el cual seguía el siguiente modelo:

$$Y_{ij} = \mu + S_i + \epsilon_{ij}$$

Donde:

Y_{ij} = Cada característica morfológica

μ = media general

S_i = Efecto i-ésimo grupo (sitio, grupo)

ϵ_{ij} = Error experimental

b) Análisis de conglomerados

Para conformar grupos y analizar las similitudes entre cacaos silvestres y cultivados con base en las variables cuantitativas y sitios de colecta y para determinar similitudes entre las selecciones élites.

c) Análisis de componentes principales

Se usó para identificar las variables que más peso tienen para diferenciar los tipos de cacao (silvestre y cultivado). Con un gráfico Biplot se analizó la relación entre sitios y variables.

d) Análisis discriminante canónico

Para determinar las características morfológicas que discriminan a los grupos definidos *a priori*.

3.3 Fase de laboratorio

3.3.1 Caracterización Molecular

La extracción de ADN a partir de muestras de hoja se realizó en el laboratorio de Biología Molecular. Las muestras del ADN se enviaron al Laboratorio de Biología Molecular del Centro de Investigaciones Agrícolas Beltsville (BARC) del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA).

El material experimental consistió en hojas sanas y secas colectadas en Bolivia, en las tres expediciones mencionadas anteriormente, 164 muestras de CNB, y 11 clones testigo de los complejos Trinitario (ISC-6; ICS-8) y forastero (EET-400; PA-121; Catongo blanco; TJ-1; Pound-7; Pound-12; SCA-6; IMC-67). Además se colectó muestras del clon OC – 77 que se conoce es de origen Venezolano y de padre criollo.

3.3.2 Extracción de ADN

Se emplearon tres *Kits* para extracción del ADN (Q – BIO gene, MP FastDNA Kit), de 236 muestras de hoja, utilizando el protocolo de extracción de ADN descrito en el Anexo 4. Las muestras de ADN fueron cuantificadas, liofilizadas y enviadas a USDA/ARS-Beltsville, para seguir el proceso en el secuenciador.

3.3.3 Cuantificación de ADN

Se realizó a través de electroforesis en gel de agarosa al 1 % en una cámara de electroforesis marca KODAK, Bio MAX. HR2025. Para ello se prepararon 110 ml de TBE 1X, Buffer 10 X, se agregó 1 g de agarosa, se calentó por 1,5 minutos en microondas (Marca SAMSUNG modelo MG6920w). Se preparó una bandeja de electroforesis donde se colocaron 4 gotas de bromuro de etilo y luego se

chorreó el gel. Se utilizaron 20 μ l de preparación (ADN, agua y búfer de carga 6x). Para preparar cada muestra se agregó 10 μ l de ADN, 7 μ l de agua destilada y 3 μ l del búfer 6X). Las muestras se colocaron en el gel junto a un marcador de peso, testigo y agua. Se dejaron migrar por un tiempo de 40 minutos a 100 watts. Esta técnica se basa en la cuantificación de fluorescencia producida por el bromuro de etilo en el ADN a través de una cámara de luz ultravioleta.

3.3.4 Amplificación de ADN

Para la amplificación de ADN se utilizó la metodología de Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR). Se utilizaron los iniciadores para microsatélites seleccionados (Anexo 8) para la caracterización molecular de cacao (Loor y Amores 2003). Los resultados son bandas que indican la homocigocidad, si son copias del mismo alelo ó la heterocigocidad, si son alelos diferentes.

3.3.5 Análisis de datos moleculares

El análisis de datos moleculares se hizo con el software CEQ 8000 *Series Genetic Analysis System* Software Versión 9.0 y el análisis estadístico con el programa INFOGEN con base a los datos obtenidos de las amplificaciones de ADN. Con el peso molecular de cada alelo se construyó una base de datos las cuales se realizó los siguientes análisis estadísticos:

- Determinación de marcadores polimórficos
- Análisis de conglomerados (Simple Matching y Ward)
- Análisis de consenso entre características moleculares y morfológicas

4 RESULTADOS

4.1 Notas sobre las expediciones.

4.1.1 Expedición 1; Norte de La Paz

El CNB silvestre se encontró en el bosque, llamados localmente como “chocolatales” los cuales se encuentran alejados de los poblados a 8 horas de caminata. A 50 km por carretera del lugar mas poblado San Buenaventura se encuentra Tumupasa y a 14 Km mas allá está la comunidad de San Silvestre. En dos comunidades existe cacao silvestre, los árboles se encuentran a espaciamientos aproximados de 10 x 11 metros entre plantas muy separados una a otra, unos 90 árboles / ha. Los fustes de los árboles de cacao son erectos, altos, copas densas y con mazorcas amarillas, verdes, comidas por animales, algunas mazorcas están en el tallo secas en el mismo árbol debido a la sobremadurez. La cosecha de estos rodales de cacao la realiza la comunidad local en grupo ó en forma individual. Toda la comunidad tiene derecho a este recurso. Las mazorcas de cacao son usadas primero para hacer refresco o licor usando el mucílago y la placenta. Posteriormente, las almendras son secadas al sol, sin fermentación, tras lo cual se tuestan y muelen artesanalmente en batanes de piedra (dos bloques de piedra que sirve para moler alimentos). Los pobladores nativos consumen la infusión de chocolate, el cual es acido debido a que no paso por el proceso de fermentación. El excedente de pepitas secas es llevado al mercado local en Tumupasa y vendido a intermediarios.

Siguiendo la carretera troncal que es la única, a 240 Km. de Tumupasa se encuentra la localidad de Ixiámas, caminando 6 horas por monte virgen se encuentra el rodal de Santa Fé. Se observó la existencia de un rodal de cacao con pocos árboles a una densidad aproximada de 15 árboles/ha. Solo se colectó dos muestras de hojas y frutos, no se evidencio frutos al parecer fueron cosechados en forma previa por cazadores que frecuentan estos lugares. También, se observó un “chaco” (área habilitada para cultivos) hecho por nuevos asentamientos humanos ilegales sin permisos y en áreas protegidas. Se observaron árboles de cacao y maderables cortados con motosierra. La comunidad no conoce de normas y leyes, el corregidor (autoridad local) recomienda a su gente que no corten árboles de cacao en los chocolatales.

A dos horas de caminata de Ixiámas se encuentra otro chocolatal de la comunidad Macagua. Allí se observaron muchas plantas de cacao con fruto, espaciadas a 25 x 35 m, unos 16 árboles/ha. Estos

árboles son altos, de tres horquetas, crecimiento erecto ortotrópico. Los tallos con musgos dificultaron la colecta de frutos y hojas. En este rodal se tomaron muy buenas muestras, tanto de almendras como de hojas (Figura 4).



Figura 4. Rodal de cacao silvestre, región de Macagua, Norte del Departamento de La Paz, Bolivia 2007.

4.1.2 Expedición 2; Río Beni

El primer lugar que se visitó fue Copacabana, a 37 km del sitio más poblado San Buenaventura (punto de partida). En Copacabana solo vivía una familia, existen pocas plantas de cacao, pues casi todo lo cortaron para cultivar. Navegando 16 km río abajo se llegó a la comunidad de Cachichira, una población con 10 familias. La existencia de cacao en el poblado es evidente. Se colectaron muestras de los lugares cercanos a la población. Siguiendo el recorrido del río a 56 km de Cachichira se llegó a la comunidad de San Antonio de Tequeje donde viven 9 familias. Se observaron plantas de cacao a orillas del río y en los senderos que utilizan los pobladores. Las mazorcas de cacao son pequeñas (Figura 5), promedio 14 cm de largo y semillas pequeñas, 43 semillas por mazorca. Siguiendo el recorrido río abajo se llegó a la comunidad de Carmen del Emero al extremo Norte de la TCO Tacana, a 290 Km del sitio más poblado que es San Buenaventura por río. Carmen del Emero es una comunidad Tacana constituida por 47 familias que aprovechan ancestralmente y de manera tradicional el cacao silvestre de los chocolatales. De esta comunidad se navegó en “peque peque” (motores de 6 a 16 HP) a los rodales de Paltal e Isla del oro,

se encontraron mazorcas de cacao en el mes de marzo; según comentó el Sr. Federico Yarari (Guía de la expedición) la cosecha finaliza en mayo.

Estas comunidades utilizan el cacao de la siguiente forma: primero se aprovecha el mucílago, que se hace escurrir por una noche en sacos de yute. El líquido es consumido como refresco ó fermentado como agua ardiente. Secan las semillas al sol, tras lo que pasan por un proceso de tostado, molienda en batanes de piedra, amasado con las manos formando bolas de pasta de chocolate. Se raspan las bolas y se mezclan con agua caliente para consumirlo como infusión. El excedente de almendras es vendida o cambiada por productos de primera necesidad con intermediarios.

Las hojas tiernas de cacao se usan, para curar el pitai (granitos pequeños que causan comezón) y otras infecciones cutáneas. Las hojas se machacan y se frotan en la parte afectada (uso externo).



Figura 5. Cacao silvestre colectado en la región de Tequeje, Río Beni, Bolivia 2007.

4.1.3 Expedición 3: Alto Beni

Se encontraron plantaciones de CNB en las comunidades de Covendo y San Miguel de Huachi, Alto Beni. Las plantaciones miden unas 4 hectáreas cada una. Estas parcelas son viejas, fueron establecidas por las misiones jesuitas y franciscanas asentadas en la zona hace mas de 100 años (Villegas y Astorga 2005). No se sabe exactamente la edad de estas plantas, ni el origen de la semilla que se utilizó para la siembra, aunque los habitantes llaman a este cacao “criollo” (Figura 6).

Actualmente estas parcelas pertenecen a productores locales; solo la parcela ubicada en la comunidad de Covendo pertenece a los mosetenes administrada por la Iglesia Católica. Los árboles son frondosos y altos, la cosecha la realizan trepando a los árboles y con cosechadoras de altura. Por recomendación de técnicos locales se realizan podas de raleo, con el fin de permitir la entrada de luz antes de la época de floración. No se observaron ataques de escoba de bruja (*M. pernicioso*), enfermedad común en la zona que ataca a cacaos foráneos.

En las comunidades de San Antonio, Mototoy, Cocomi y San José se colectaron muestras de CNB en cultivo, perteneciente a productores de cacao entre otros cultivos las parcelas son más jóvenes que las encontradas en Covendo y San Miguel de Huachi. Las plantaciones. Los productores de esta zona, están capacitados en el proceso de beneficiado, fermentación separado CNB y cacao foráneo. El CNB se fermenta solo tres días mientras que el cacao foráneo seis días. El CNB es secado al sol en huarachas (mesas de madera ó bambú) expuestas al sol; el cacao es seleccionado por tamaño y vendido a instituciones de acopio local en algunos casos a intermediarios.

Las comunidades de Santa Ana de Mosetenes, Sararí y Muchane, se encuentran distribuidos en un recorrido de 120 km por el río Alto Beni, cultivan el CNB en cultivo y venden el producto a intermediarios locales. El proceso por el que pasa el cacao es similar a lo mencionado en el párrafo anterior.



Figura 6. Cacao Nacional Boliviano, cultivado en la zona de Alto Beni, Bolivia.

4.2 Caracterización morfológica

Se evaluaron 164 genotipos de CNB usando siete variables cuantitativas (peso de mazorca, diámetro de mazorca, largo de mazorca, peso húmedo, peso seco, largo de semilla y ancho de semilla) y seis variables cualitativas (forma de mazorca, forma del ápice, constricción basal, rugosidad del mesocarpo, color de la mazorca, color de la semilla) (Anexo 3). Tanto para los genotipos silvestres como para los cultivados, la caracterización se realizó *in situ* en 19 lugares (11 lugares para el cacao silvestre y 8 lugares para el cultivado) (Anexo 1). Estos sitios están ubicados en tres macro regiones de Bolivia: Río Beni, Norte del departamento de La Paz y Alto Beni. De igual forma para la evaluación de 61 selecciones élites de la región de Alto Beni (Anexo 2), se utilizó la metodología descrita. Para las evaluaciones se usaron tres frutos por accesión. Para aquellos genotipos donde no se encontraron los frutos necesarios se evaluaron los existentes, lo cual fue indicado.

4.2.1 Evaluación de parámetros morfológicos para el Cacao Nacional Silvestre.

En el Cuadro 1, se indican los resultados obtenidos en la evaluación de 57 genotipos silvestres de CNB, la cual, fue realizada en 11 lugares de colecta en dos zonas (Norte de del departamento de La Paz y riberas del Río Beni). El peso promedio de los frutos fue de 272,6 g. El peso máximo se obtuvo para la muestra de Cachichira (383,3 g) y el más bajo para la muestra de Macagua (227 g). El Largo del fruto varió entre 11,5 (San Silvestre) y 16,6 cm (Tequeje) . El diámetro de fruto varió entre 7 (Copacabana y Macagua) y 8,1 cm (Cacahichira). El número promedio de semillas por fruto fue de 38 semillas, con un máximo de 43 semillas (Cachichira) y un valor mínimo de 34 semillas (Carmen del Emero y Paltal). El peso húmedo varió entre 65 (Carmen del Emero) y 95 g (Cachichira). El peso seco presentó una media de 24,6 g por fruto con un máximo de (227,6 g) y un mínimo de (283,3). El largo varió entre 1,8 (Copacabana) a 2,9 cm (San Silvestre). El diámetro menor de semilla (0,9 cm) lo obtuvieron los genotipos de Cachichira, Tequeje y Copacabana, mientras que el mayor (1,3 cm) fue para los genotipos de San Silvestre.

Solo las variables largo y diámetro de semilla presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$), entre lugares de colecta.

Cuadro 1. Variables cuantitativas de fruto y semilla de 57 genotipos de Cacao Nacional Boliviano silvestre en 11 lugares de colecta.

Lugar de colecta	Región	Frutos evaluados	Características del fruto			Características de semilla				
			Peso (g)	Largo (cm)	Diámetro (cm)	Número semillas por fruto	Peso húmedo (g)	Peso seco (g)	Largo (cm)	Diámetro (cm)
Cacahichira	Río Beni	9	383,3	15,3	8,1	42,6	95	29,7	2,1	0,9
Paltal	Río Beni	21	277,1	14,1	7,3	35,1	69,3	21,7	2,2	1
San Marcos	Río Beni	21	275,7	13,6	7,4	38,1	78,6	24,6	2	1
Tequeje	Río Beni	18	320	16,1	7,6	40,3	80	25	1,9	0,9
Carmen del Emero	Río Beni	21	247,1	13,1	7,1	34,1	65	20,3	2,1	1
Copacabana	Río Beni	6	230	13	7	40	70	21,9	1,8	0,9
Isla del Oro	Río Beni	30	271	14,3	7,2	38,2	73	22,8	2,1	1
Macagua	Norte La Paz	15	227,6	12,7	7	37,8	82	25,6	2,3	1,1
San Silvestre	Norte La Paz	12	250	11,6	7,5	36,8	80	25	2,3	1,3
Santa Fé	Norte La Paz	9	245	12	7,1	40,5	80	25	2,3	1,1
Tumupasa	Norte La Paz	15	272	13,1	7,6	34,4	92	28,8	2,4	1,2
Media			272,6	13,5	7,4	38	78,6	24,6	2,1	1
Mínimo			227,6	11,6	7	34,1	65	20,3	1,8	0,9
Máximo			383,3	16,1	8,1	42,6	95	29,7	2,4	1,3
Desvío Standard			45,1	1,3	0,3	2,7	9,2	2,9	0,3	0,1
Coefficiente de Variación			16,5	9,9	4,5	7,2	11,7	11,7	13,5	12,4
Coefficiente de Variación por lugar de colecta			26,47	15,5	9	19,5	26,9	26,9	10,4	6,6
ANOVA Test Tukey (p<0,05) por lugares de colecta.			0,2368 ns	0,0942 ns	0,5141 ns	0,7923 ns	0,5201 ns	0,5173 ns	0,0001*	0,0001*

* significativo

ns = no significativo

4.2.2 Evaluación de variables cualitativas del fruto y semilla

La mayoría de las accesiones evaluadas poseen en promedio frutos de forma cundeamor (40,4 %), sin constricción basal (41,1 %) y con una rugosidad intermedia (63,2 %). El ápice de los frutos fue mayormente agudo (29,8 %). El porcentaje de las accesiones con frutos de color verde fue de 100 %. El color de las semillas en su totalidad fue de color púrpura (100 %) (Cuadro 2).

Cuadro 2. Evaluación de 57 genotipos de Cacao Nacional Boliviano silvestre: variables cualitativas de fruto y semilla.

Descriptor	Categoría	Porcentaje
Forma de la mazorca	Angoleta	35,1
	Amelonado	21,1
	Cundeamor	40,4
	Calabacillo	3,5
Forma del Ápice	Puntiagudo	5,3
	Agudo	29,8
	Obtuso	33,3
	Redondeado	10,5
	Pezón	15,8
	Dentado	5,3
Constricción basal	Ausente	49,1
	Escasa	38,6
	Intermedia	7,0
	Bien marcada	5,3
Rugosidad del mesocarpo	Lisa	19,3
	Intermedia	63,2
	Áspera	17,5
Color de mazorca	Verde	100,0
Color de la semilla	Púrpura	100,0

El Cuadro 3 muestra, las características cualitativas por genotipos silvestres y los lugares de colecta, lo que reafirma la información del Cuadro 2 corrobora el cuadro resumen que antecede, en el cual se describen las características generales de los genotipos de cacao silvestre Boliviano.

Cuadro 3. Características cualitativas por genotipo de Cacao Nacional Boliviano silvestre

Nº	ID	Región	Lugar	Constricción Basal	Forma mazorca	Forma del ápice	Color de mazorca	Rugosidad mesocarpo	Color semilla
1	TC-1549	Norte La Paz	Macagua	Intermedia	Cundeamor	Obtuso	Verde	Intermedia	Púrpura
2	TC-1550	Norte La Paz	Macagua	Escasa	Amelonado	Pezón	Verde	Intermedia	Púrpura
3	TC-1551	Norte La Paz	Macagua	Ausente	Amelonado	Pezón	Verde	Intermedia	Púrpura
4	TC-1552	Norte La Paz	Macagua	Escasa	Angoleta	Pezón	Verde	Intermedia	Púrpura
5	TC-1553	Norte La Paz	Macagua	Escasa	Cundeamor	Agudo	Verde	Lisa	Púrpura
6	TC-1541	Norte La Paz	San Silvestre	Ausente	Amelonado	Redondeado	Verde	Intermedia	Púrpura
7	TC-1542	Norte La Paz	San Silvestre	Ausente	Cundeamor	Agudo	Verde	Intermedia	Púrpura
8	TC-1543	Norte La Paz	San Silvestre	Ausente	Calabacillo	Obtuso	Verde	Intermedia	Púrpura
9	TC-1660	Norte La Paz	San Silvestre	Ausente	Amelonado	Pezón	Verde	Intermedia	Púrpura
10	TC-1554	Norte La Paz	Santa Fé	Ausente	Cundeamor	Obtuso	Verde	Áspera	Púrpura
11	TC-1555	Norte La Paz	Santa Fé	Ausente	Cundeamor	Obtuso	Verde	Áspera	Púrpura
12	TC-1544	Norte La Paz	Tumupasa	Ausente	Amelonado	Redondeado	Verde	Intermedia	Púrpura
13	TC-1545	Norte La Paz	Tumupasa	Ausente	Cundeamor	Obtuso	Verde	Áspera	Púrpura
14	TC-1546	Norte La Paz	Tumupasa	Escasa	Amelonado	Obtuso	Verde	Intermedia	Púrpura
15	TC-1547	Norte La Paz	Tumupasa	Ausente	Amelonado	Obtuso	Verde	Áspera	Púrpura
16	TC-1548	Norte La Paz	Tumupasa	Bien marcada	Cundeamor	Puntiagudo	Verde	Áspera	Púrpura
17	TC-1634	Río Beni	Cacahichira	Ausente	Angoleta	Agudo	Verde	Áspera	Púrpura
18	TC-1635	Río Beni	Cacahichira	Ausente	Calabacillo	Obtuso	Verde	Intermedia	Púrpura
19	TC-1636	Río Beni	Cacahichira	Intermedia	Cundeamor	Agudo	Verde	Áspera	Púrpura
20	TC-1626	Río Beni	Carmen Emero	Escasa	Angoleta	Agudo	Verde	Intermedia	Púrpura
21	TC-1627	Río Beni	Carmen Emero	Escasa	Cundeamor	Agudo	Verde	Intermedia	Púrpura
22	TC-1628	Río Beni	Carmen Emero	Ausente	Angoleta	Redondeado	Verde	Intermedia	Púrpura
23	TC-1629	Río Beni	Carmen Emero	Escasa	Cundeamor	Agudo	Verde	Intermedia	Púrpura
24	TC-1630	Río Beni	Carmen Emero	Escasa	Cundeamor	Puntiagudo	Verde	Intermedia	Púrpura
25	TC-1631	Río Beni	Carmen Emero	Escasa	Angoleta	Redondeado	Verde	Lisa	Púrpura
26	TC-1632	Río Beni	Copacabana	Ausente	Angoleta	Obtuso	Verde	Intermedia	Púrpura
27	TC-1633	Río Beni	Copacabana	Ausente	Angoleta	Obtuso	Verde	Intermedia	Púrpura
28	TC-1650	Río Beni	Isla del Oro	Escasa	Angoleta	Obtuso	Verde	Lisa	Púrpura
29	TC-1651	Río Beni	Isla del Oro	Escasa	Cundeamor	Pezón	Verde	Lisa	Púrpura
30	TC-1652	Río Beni	Isla del Oro	Bien marcada	Amelonado	Obtuso	Verde	Áspera	Púrpura
31	TC-1653	Río Beni	Isla del Oro	Escasa	Amelonado	Agudo	Verde	Lisa	Púrpura
32	TC-1654	Río Beni	Isla del Oro	Escasa	Angoleta	Agudo	Verde	Lisa	Púrpura
33	TC-1655	Río Beni	Isla del Oro	Escasa	Angoleta	Agudo	Verde	Intermedia	Púrpura
34	TC-1656	Río Beni	Isla del Oro	Ausente	Cundeamor	Agudo	Verde	Lisa	Púrpura
35	TC-1657	Río Beni	Isla del Oro	Ausente	Amelonado	Pezón	Verde	Intermedia	Púrpura
36	TC-1658	Río Beni	Isla del Oro	Escasa	Angoleta	Pezón	Verde	Intermedia	Púrpura
37	TC-1659	Río Beni	Isla del Oro	Escasa	Amelonado	Pezón	Verde	Intermedia	Púrpura
38	TC-1643	Río Beni	Paltal	Ausente	Angoleta	Obtuso	Verde	Intermedia	Púrpura
39	TC-1644	Río Beni	Paltal	Ausente	Angoleta	Obtuso	Verde	Intermedia	Púrpura
40	TC-1645	Río Beni	Paltal	Escasa	Cundeamor	Agudo	Verde	Intermedia	Púrpura
41	TC-1646	Río Beni	Paltal	Ausente	Angoleta	Dentado	Verde	Intermedia	Púrpura
42	TC-1647	Río Beni	Paltal	Ausente	Angoleta	Dentado	Verde	Intermedia	Púrpura
43	TC-1648	Río Beni	Paltal	Bien marcada	Cundeamor	Dentado	Verde	Intermedia	Púrpura
44	TC-1649	Río Beni	Paltal	Escasa	Cundeamor	Obtuso	Verde	Lisa	Púrpura
45	TC-1618	Río Beni	San Marcos	Intermedia	Cundeamor	Agudo	Verde	Lisa	Púrpura
46	TC-1619	Río Beni	San Marcos	Ausente	Cundeamor	Agudo	Verde	Lisa	Púrpura
47	TC-1620	Río Beni	San Marcos	Ausente	Cundeamor	Pezón	Verde	Intermedia	Púrpura
48	TC-1621	Río Beni	San Marcos	Ausente	Angoleta	Redondeado	Verde	Lisa	Púrpura
49	TC-1623	Río Beni	San Marcos	Ausente	Cundeamor	Obtuso	Verde	Intermedia	Púrpura
50	TC-1624	Río Beni	San Marcos	Ausente	Angoleta	Agudo	Verde	Intermedia	Púrpura
51	TC-1625	Río Beni	San Marcos	Ausente	Cundeamor	Obtuso	Verde	Intermedia	Púrpura
52	TC-1637	Río Beni	Tequeje	Escasa	Angoleta	Agudo	Verde	Intermedia	Púrpura
53	TC-1638	Río Beni	Tequeje	Escasa	Cundeamor	Obtuso	Verde	Áspera	Púrpura
54	TC-1639	Río Beni	Tequeje	Escasa	Cundeamor	Obtuso	Verde	Intermedia	Púrpura
55	TC-1640	Río Beni	Tequeje	Escasa	Angoleta	Agudo	Verde	Intermedia	Púrpura
56	TC-1641	Río Beni	Tequeje	Ausente	Amelonado	Redondeado	Verde	Intermedia	Púrpura
57	TC-1642	Río Beni	Tequeje	Intermedia	Angoleta	Puntiagudo	Verde	Áspera	Púrpura

ID: Código muestra; TC: *Theobroma cacao*

4.3 Caracterización morfológica del Cacao Nacional Boliviano en cultivo.

El Cuadro 4, muestra los resultados obtenidos de la evaluación de 107 genotipos de CNB en cultivo, realizados en ocho lugares de colecta en la zona de Alto Beni. Los frutos muestran una media en peso de 335 g. Los pesos más altos fueron obtenidos por los genotipos de Mototoy con 430 g y los más bajos 250 g por los de Remolino. El largo de fruto varió de 12,1 a 14,7 cm los genotipos de Mototoy registran los frutos más largos y los de Remolino los menores. El diámetro de fruto entre 7,2 a 8,6 cm.

El número promedio de semillas fue de 34,7 semillas, el máximo 41,3 para la comunidad de Remolino mientras que el más bajo 27,8 para San José. El peso húmedo varió entre 62,6 a 106 gr los genotipos que registraron mayores pesos húmedos fueron de Mototoy mientras que los más bajos fueron de la Estación Experimental de Sapecho. El peso seco presentó una media de 24,1 g por fruto. El largo varió de 2,1 a 2,5 cm, el mínimo se registró en genotipos de Remolino y el máximo en San Antonio. El diámetro menor 1,1 cm se registró en accesiones de Covendo y Remolino mientras que el mayor en la Estación Experimental de Sapecho y Mototoy.

Las variables peso de mazorca, largo de mazorca, diámetro de semilla, largo de semilla mostraron diferencias significativas ($p < 0,05$).

Cuadro 4. Variables cuantitativas de fruto y semilla de 107 genotipos de Cacao Nacional Boliviano en cultivo en 8 lugares de colecta.

Lugar de colecta	Región	frutos evaluados	Características del fruto			Características de semilla				
			Peso (g)	Largo (cm)	Diámetro (cm)	Número semillas por fruto	Peso húmedo (g)	Peso seco (g)	Largo (cm)	Diámetro (cm)
Cocochi	Alto Beni	16	310	13,2	7,9	36,8	89,5	28	2,4	1,2
Covendo	Alto Beni	54	397,8	13,1	8,4	31,6	70	21,9	2,2	1,1
Estación Exp	Alto Beni	186	267,3	13,5	7,2	33,4	62,6	19,6	2,2	1,3
Mototoy	Alto Beni	12	430	14,7	8,6	38,7	106	33,1	2,5	1,3
Remolino	Alto Beni	12	250	12,1	7,6	41,3	71,7	22,4	2,1	1,1
San Antonio	Alto Beni	12	333,3	14,6	7,8	35,3	82,7	25,8	2,5	1,2
San José	Alto Beni	12	327,5	14,3	7,9	27,8	65	20,3	2,2	1,2
San M. Huachi	Alto Beni	30	364	12,3	8,4	32,9	70,5	22	2,2	1,2
Media			335	13,5	8	34,7	77,3	24,1	2,3	1,2
Mínimo			250	12,1	7,2	27,8	62,6	19,6	2,1	1,1
Máximo			430	14,7	8,6	41,3	106	33,1	2,5	1,3
Desvío Standard			61,3	1	0,5	4,3	16,6	4,6	0,2	0,1
Coefficiente de Variación			18,3	7,4	5,9	12,2	19	18,9	6,8	6,3
Coefficiente de Variación por lugares de colecta			31,2	18,3	10,2	29,9	41	41	7,4	7,4
ANOVA Test Tukey (p<0,05)			0,0001*	0,6260 ns	0,0001*	0,6515 ns	0,1304 ns	0,1302 ns	0,0080*	0,0004*

* significativo

ns = no significativo

4.3.1 Evaluación de variables cualitativas del fruto y semilla

El 39 % de los frutos tuvo forma angoleta, con escasa constricción basal (59,8 %) y una rugosidad intermedia (46,7 %). El ápice de la mayoría de los frutos fue obtuso (31,8 %) o agudo (30,8 %). El porcentaje de los genotipos con frutos de color verde fue del 100 %, de igual manera el color de las semillas en su totalidad fue de color púrpura (100 %) (Cuadro 5).

Cuadro 5. Evaluación de 107 genotipos de Cacao Nacional Boliviano cultivado: variables cualitativas de fruto y semilla.

Descriptor	Categoría	Porcentaje
Forma de la mazorca	Angoleta	39,3
	Amelonado	16,8
	Cundeamor	35,5
	Calabacillo	8,4
Forma del Ápice	Puntiagudo	14,0
	Agudo	30,8
	Obtuso	31,8
	Redondeado	6,5
	Pezón	14,0
	Dentado	2,8
Constricción basal	Ausente	49,5
	Escasa	59,8
	Intermedia	8,4
	Bien marcada	1,9
Rugosidad del mesocarpo	lisa	21,5
	Intermedia	46,7
	Áspera	31,8
Color de mazorca	Verde	100,0
Color de la semilla	Púrpura	100,0

El Cuadro 6, muestra las características cualitativas por genotipos cultivados y lugares de colecta, que corrobora la información del Cuadro 5, en el cual se describió las características generales de fruto y semilla que distinguen al cacao nacional cultivado.

Cuadro 6. Características cualitativas por genotipo de cacao nacional cultivado.

Nº	ID	Región	Lugar	Constricción Basal	Forma mazorca	Forma del ápice	Color de mazorca	Rugosidad mesocarpo	Color semilla
1	TC-1680	Alto Beni	Cocochi	Ausente	Amelonado	Pezón	Verde	Lisa	Púrpura
2	TC-1681	Alto Beni	Cocochi	Escasa	Amelonado	Pezón	Verde	Intermedia	Púrpura
3	TC-1682	Alto Beni	Cocochi	Ausente	Calabacillo	Obtuso	Verde	Lisa	Púrpura
4	TC-1683	Alto Beni	Cocochi	Ausente	Angoleta	Obtuso	Verde	Áspera	Púrpura
5	TC-1661	Alto Beni	Covendo	Ausente	Angoleta	Obtuso	Verde	Áspera	Púrpura
6	TC-1662	Alto Beni	Covendo	Escasa	Cundeamor	Puntiagudo	Verde	Áspera	Púrpura
7	TC-1663	Alto Beni	Covendo	Ausente	Cundeamor	Obtuso	Verde	Áspera	Púrpura
8	TC-1664	Alto Beni	Covendo	Escasa	Cundeamor	Pezón	Verde	Áspera	Púrpura
9	TC-1665	Alto Beni	Covendo	Ausente	Cundeamor	Agudo	Verde	Intermedia	Púrpura
10	TC-1666	Alto Beni	Covendo	Ausente	Amelonado	Redondeado	Verde	Intermedia	Púrpura
11	TC-1667	Alto Beni	Covendo	Ausente	Amelonado	Obtuso	Verde	Lisa	Púrpura
12	TC-1668	Alto Beni	Covendo	Escasa	Cundeamor	Agudo	Verde	Intermedia	Púrpura
13	TC-1669	Alto Beni	Covendo	Ausente	Calabacillo	Dentado	Verde	Lisa	Púrpura
14	TC-1670	Alto Beni	Covendo	Ausente	Calabacillo	Pezón	Verde	Lisa	Púrpura
15	TC-1671	Alto Beni	Covendo	Ausente	Calabacillo	Dentado	Verde	Intermedia	Púrpura
16	TC-1672	Alto Beni	Covendo	Escasa	Angoleta	Obtuso	Verde	Intermedia	Púrpura
17	TC-1673	Alto Beni	Covendo	Ausente	Angoleta	Dentado	Verde	Intermedia	Púrpura
18	TC-1674	Alto Beni	Covendo	Escasa	Cundeamor	Agudo	Verde	Intermedia	Púrpura
19	TC-1675	Alto Beni	Covendo	Ausente	Cundeamor	Agudo	Verde	Intermedia	Púrpura
20	TC-1676	Alto Beni	Covendo	Escasa	Cundeamor	Agudo	Verde	Intermedia	Púrpura
21	TC-1677	Alto Beni	Covendo	Escasa	Amelonado	Pezón	Verde	Intermedia	Púrpura
22	TC-1678	Alto Beni	Covendo	Ausente	Angoleta	Obtuso	Verde	Intermedia	Púrpura
23	TC-1556	Alto Beni	Estación Exp	Ausente	Angoleta	Pezón	Verde	Lisa	Púrpura
24	TC-1557	Alto Beni	Estación Exp	Ausente	Angoleta	Obtuso	Verde	Áspera	Púrpura
25	TC-1558	Alto Beni	Estación Exp	Ausente	Angoleta	Obtuso	Verde	Intermedia	Púrpura
26	TC-1559	Alto Beni	Estación Exp	Escasa	Angoleta	Agudo	Verde	Áspera	Púrpura
27	TC-1560	Alto Beni	Estación Exp	Ausente	Angoleta	Pezón	Verde	Lisa	Púrpura
28	TC-1561	Alto Beni	Estación Exp	Escasa	Angoleta	Agudo	Verde	Áspera	Púrpura
29	TC-1562	Alto Beni	Estación Exp	Ausente	Calabacillo	Pezón	Verde	Lisa	Púrpura
30	TC-1563	Alto Beni	Estación Exp	Escasa	Cundeamor	Puntiagudo	Verde	Intermedia	Púrpura
31	TC-1564	Alto Beni	Estación Exp	Intermedia	Cundeamor	Agudo	Verde	Intermedia	Púrpura
32	TC-1565	Alto Beni	Estación Exp	Ausente	Angoleta	Agudo	Verde	Intermedia	Púrpura
33	TC-1566	Alto Beni	Estación Exp	Escasa	Angoleta	Redondeado	Verde	Áspera	Púrpura
34	TC-1567	Alto Beni	Estación Exp	Intermedia	Cundeamor	Agudo	Verde	Áspera	Púrpura
35	TC-1568	Alto Beni	Estación Exp	Ausente	Angoleta	Agudo	Verde	Intermedia	Púrpura
36	TC-1569	Alto Beni	Estación Exp	Ausente	Angoleta	Obtuso	Verde	Áspera	Púrpura
37	TC-1570	Alto Beni	Estación Exp	Ausente	Angoleta	Obtuso	Verde	Áspera	Púrpura
38	TC-1571	Alto Beni	Estación Exp	Ausente	Angoleta	Agudo	Verde	Áspera	Púrpura
39	TC-1572	Alto Beni	Estación Exp	Ausente	Angoleta	Obtuso	Verde	Áspera	Púrpura
40	TC-1573	Alto Beni	Estación Exp	Intermedia	Cundeamor	Agudo	Verde	Áspera	Púrpura
41	TC-1574	Alto Beni	Estación Exp	Intermedia	Cundeamor	Puntiagudo	Verde	Áspera	Púrpura
42	TC-1575	Alto Beni	Estación Exp	Intermedia	Cundeamor	Puntiagudo	Verde	Áspera	Púrpura
43	TC-1576	Alto Beni	Estación Exp	Escasa	Cundeamor	Agudo	Verde	Áspera	Púrpura
44	TC-1577	Alto Beni	Estación Exp	Escasa	Amelonado	Pezón	Verde	Áspera	Púrpura
45	TC-1578	Alto Beni	Estación Exp	Escasa	Cundeamor	Puntiagudo	Verde	Áspera	Púrpura
46	TC-1579	Alto Beni	Estación Exp	Ausente	Angoleta	Obtuso	Verde	Intermedia	Púrpura
47	TC-1580	Alto Beni	Estación Exp	Ausente	Angoleta	Agudo	Verde	Áspera	Púrpura
48	TC-1581	Alto Beni	Estación Exp	Bien marcada	Cundeamor	Agudo	Verde	Intermedia	Púrpura
49	TC-1582	Alto Beni	Estación Exp	Ausente	Angoleta	Obtuso	Verde	Intermedia	Púrpura
50	TC-1583	Alto Beni	Estación Exp	Escasa	Amelonado	Obtuso	Verde	Intermedia	Púrpura
51	TC-1584	Alto Beni	Estación Exp	Escasa	Cundeamor	Obtuso	Verde	Intermedia	Púrpura
52	TC-1585	Alto Beni	Estación Exp	Ausente	Cundeamor	Agudo	Verde	Áspera	Púrpura
53	TC-1586	Alto Beni	Estación Exp	Ausente	Cundeamor	Agudo	Verde	Intermedia	Púrpura

Continuación Cuadro 6.

Nº	ID	Región	Lugar	Constricción Basal	Forma mazorca	Forma del ápice	Color de mazorca	Rugosidad mesocarpo	Color semilla
54	TC-1587	Alto Beni	Estación Exp	Ausente	Cundeamor	Obtuso	Verde	Áspera	Púrpura
55	TC-1588	Alto Beni	Estación Exp	Intermedia	Cundeamor	Obtuso	Verde	Lisa	Púrpura
56	TC-1589	Alto Beni	Estación Exp	Escasa	Amelonado	Obtuso	Verde	Lisa	Púrpura
57	TC-1590	Alto Beni	Estación Exp	Escasa	Cundeamor	Agudo	Verde	Intermedia	Púrpura
58	TC-1591	Alto Beni	Estación Exp	Escasa	Amelonado	Obtuso	Verde	Lisa	Púrpura
59	TC-1592	Alto Beni	Estación Exp	Escasa	Cundeamor	Puntiagudo	Verde	Áspera	Púrpura
60	TC-1593	Alto Beni	Estación Exp	Escasa	Amelonado	Obtuso	Verde	Intermedia	Púrpura
61	TC-1594	Alto Beni	Estación Exp	Escasa	Cundeamor	Redondeado	Verde	Intermedia	Púrpura
62	TC-1595	Alto Beni	Estación Exp	Escasa	Cundeamor	Obtuso	Verde	Lisa	Púrpura
63	TC-1596	Alto Beni	Estación Exp	Intermedia	Cundeamor	Agudo	Verde	Intermedia	Púrpura
64	TC-1597	Alto Beni	Estación Exp	Escasa	Amelonado	Obtuso	Verde	Lisa	Púrpura
65	TC-1598	Alto Beni	Estación Exp	Escasa	Cundeamor	Puntiagudo	Verde	Lisa	Púrpura
66	TC-1599	Alto Beni	Estación Exp	Ausente	Angoleta	Puntiagudo	Verde	Intermedia	Púrpura
67	TC-1600	Alto Beni	Estación Exp	Intermedia	Angoleta	Puntiagudo	Verde	Áspera	Púrpura
68	TC-1601	Alto Beni	Estación Exp	Escasa	Angoleta	Obtuso	Verde	Intermedia	Púrpura
69	TC-1602	Alto Beni	Estación Exp	Ausente	Angoleta	Obtuso	Verde	Áspera	Púrpura
70	TC-1603	Alto Beni	Estación Exp	Escasa	Angoleta	Obtuso	Verde	Áspera	Púrpura
71	TC-1604	Alto Beni	Estación Exp	Escasa	Angoleta	Redondeado	Verde	Intermedia	Púrpura
72	TC-1605	Alto Beni	Estación Exp	Bien marcada	Cundeamor	Agudo	Verde	Áspera	Púrpura
73	TC-1606	Alto Beni	Estación Exp	Ausente	Angoleta	Agudo	Verde	Áspera	Púrpura
74	TC-1607	Alto Beni	Estación Exp	Escasa	Amelonado	Agudo	Verde	Intermedia	Púrpura
75	TC-1608	Alto Beni	Estación Exp	Intermedia	Cundeamor	Obtuso	Verde	Áspera	Púrpura
76	TC-1609	Alto Beni	Estación Exp	Ausente	Angoleta	Puntiagudo	Verde	Intermedia	Púrpura
77	TC-1610	Alto Beni	Estación Exp	Ausente	Amelonado	Agudo	Verde	Intermedia	Púrpura
78	TC-1611	Alto Beni	Estación Exp	Escasa	Amelonado	Pezón	Verde	Intermedia	Púrpura
79	TC-1612	Alto Beni	Estación Exp	Escasa	Cundeamor	Agudo	Verde	Intermedia	Púrpura
80	TC-1613	Alto Beni	Estación Exp	Escasa	Cundeamor	Agudo	Verde	Intermedia	Púrpura
81	TC-1614	Alto Beni	Estación Exp	Ausente	Angoleta	Obtuso	Verde	Intermedia	Púrpura
82	TC-1615	Alto Beni	Estación Exp	Escasa	Cundeamor	Agudo	Verde	Lisa	Púrpura
83	TC-1616	Alto Beni	Estación Exp	Ausente	Cundeamor	Agudo	Verde	Lisa	Púrpura
84	TC-1617	Alto Beni	Estación Exp	Ausente	Angoleta	Obtuso	Verde	Lisa	Púrpura
85	TC-1684	Alto Beni	Mototoy	Ausente	Calabacillo	Redondeado	Verde	Lisa	Púrpura
86	TC-1685	Alto Beni	Mototoy	Ausente	Cundeamor	Agudo	Verde	Intermedia	Púrpura
87	TC-1686	Alto Beni	Mototoy	Ausente	Calabacillo	Redondeado	Verde	Intermedia	Púrpura
88	TC-1679	Alto Beni	Remolino	Escasa	Amelonado	Pezón	Verde	Lisa	Púrpura
89	TC-1704	Alto Beni	Remolino	Escasa	Angoleta	Agudo	Verde	Intermedia	Púrpura
90	TC-1705	Alto Beni	Remolino	Ausente	Amelonado	Obtuso	Verde	Intermedia	Púrpura
91	TC-1691	Alto Beni	San Antonio	Escasa	Angoleta	Obtuso	Verde	Áspera	Púrpura
92	TC-1692	Alto Beni	San Antonio	Ausente	Angoleta	Agudo	Verde	Lisa	Púrpura
93	TC-1693	Alto Beni	San Antonio	Escasa	Amelonado	Pezón	Verde	Intermedia	Púrpura
94	TC-1687	Alto Beni	San José	Ausente	Angoleta	Pezón	Verde	Intermedia	Púrpura
95	TC-1688	Alto Beni	San José	Escasa	Amelonado	Obtuso	Verde	Intermedia	Púrpura
96	TC-1689	Alto Beni	San José	Escasa	Cundeamor	Puntiagudo	Verde	Áspera	Púrpura
97	TC-1690	Alto Beni	San José	Escasa	Cundeamor	Agudo	Verde	Áspera	Púrpura
98	TC-1694	Alto Beni	San M. Huachi	Ausente	Angoleta	Agudo	Verde	Áspera	Púrpura
99	TC-1695	Alto Beni	San M. Huachi	Ausente	Angoleta	Puntiagudo	Verde	Intermedia	Púrpura
100	TC-1696	Alto Beni	San M. Huachi	Escasa	Angoleta	Puntiagudo	Verde	Intermedia	Púrpura
101	TC-1697	Alto Beni	San M. Huachi	Ausente	Angoleta	Pezón	Verde	Intermedia	Púrpura
102	TC-1698	Alto Beni	San M. Huachi	Ausente	Angoleta	Puntiagudo	Verde	Intermedia	Púrpura
103	TC-1699	Alto Beni	San M. Huachi	Ausente	Cundeamor	Obtuso	Verde	Intermedia	Púrpura
104	TC-1700	Alto Beni	San M. Huachi	Ausente	Calabacillo	Redondeado	Verde	Lisa	Púrpura
105	TC-1701	Alto Beni	San M. Huachi	Escasa	Angoleta	Obtuso	Verde	Intermedia	Púrpura
106	TC-1702	Alto Beni	San M. Huachi	Ausente	Angoleta	Puntiagudo	Verde	Lisa	Púrpura
107	TC-1703	Alto Beni	San M. Huachi	Ausente	Calabacillo	Pezón	Verde	Lisa	Púrpura

4.4 Diferencias morfológicas entre el Cacao Nacional Boliviano silvestre y el Cacao Nacional Boliviano en cultivo.

4.4.1 Análisis de varianza.

Se compararon los genotipos de cacao nacional silvestre y cultivado en términos de los caracteres morfológicos de fruto y semilla. Se encontraron diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$) para seis variables cuantitativas, solo las variables diámetro y largo de mazorca resultaron no significativas. La variable “diámetro de semilla” registró el menor coeficiente de variación 9,46 %, y la variable peso húmedo registró el mayor CV = 36,52 % (Cuadro 7).

Cuadro 7. Resumen de variables estudiadas, estadística descriptiva y probabilidad ($p < 0,05$) Test Tukey, en la comparación del cacao nacional silvestre y en cultivo.

Variable	n	Media	mín.	máx.	Desviación Estándar	Coefficiente de variación	p-valor
Peso mazorca	164	296,18	115	600	99,32	33,17	0,0336 *
Diámetro mazorca	164	7,52	5,1	9,6	0,86	11,32	0,0336 ns
Largo mazorca	164	13,51	8,5	22,5	2,37	17,57	0,3245 ns
Número de semillas	164	32,89	10	51	9,25	26,32	0,0001 *
Diámetro semilla	164	1,16	0,83	1,53	0,15	9,46	0,0001 *
Largo semilla	164	2,22	1,6	3,1	0,24	10,64	0,0501 *
Peso húmedo	164	71,04	18	190	26,27	36,51	0,0239 *
Peso seco	164	22,21	5,6	59,4	8,21	36,48	0,0241 *

* = significativo

ns = no significativo

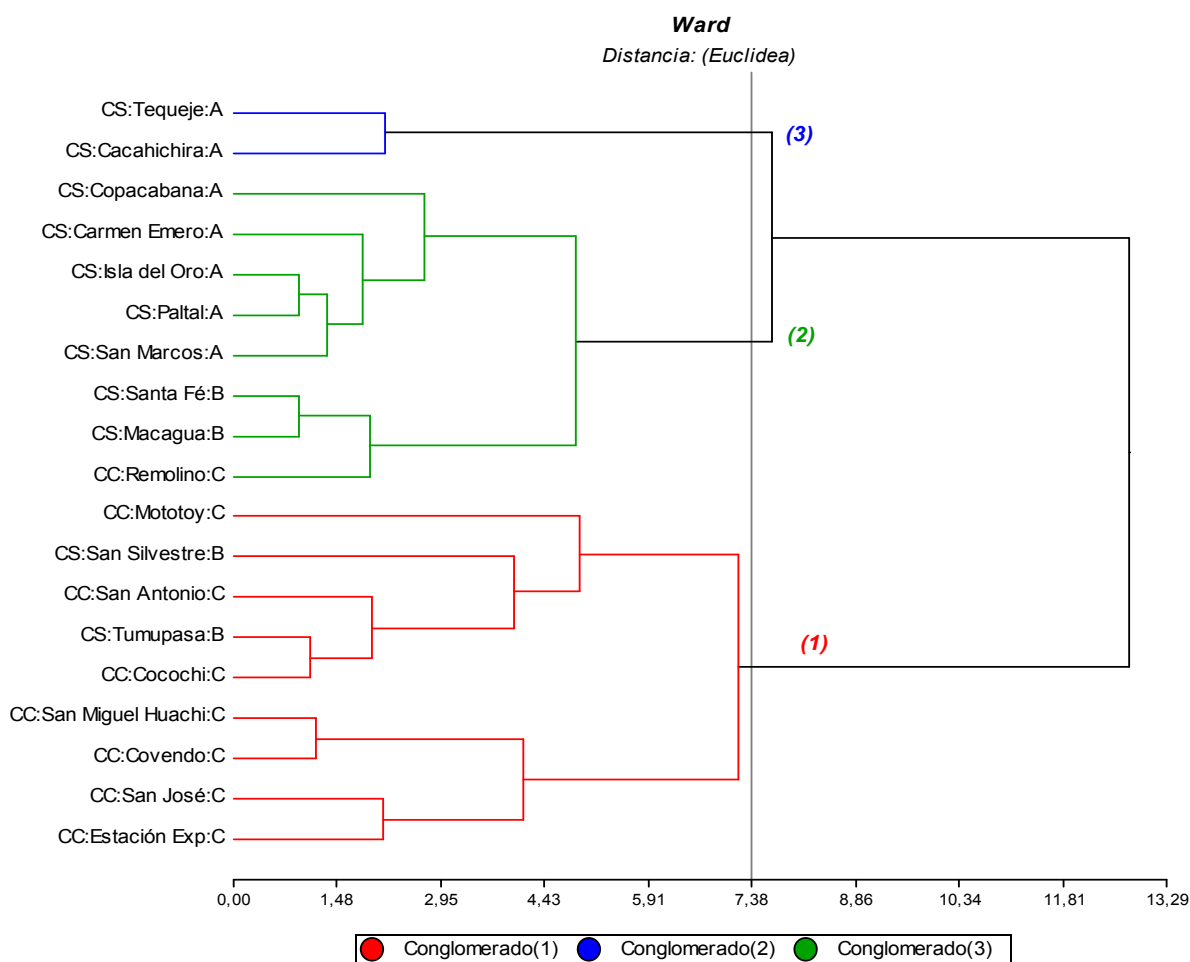
4.4.2 Análisis de conglomerados

Este análisis se hizo usando todas las características cuantitativas de fruto y semilla. La estructura obtenida por el método de agrupamiento jerárquico de Ward (1963) y la distancia euclidiana, se representó por medio de un dendrograma (Figura 7).

Se identificaron tres grupos a una distancia de 7,38. El grupo (1) de color rojo está conformado principalmente por genotipos procedentes de la zona de Alto Beni de lugares donde existe CNB en cultivo (CC). También incluye genotipos silvestres de San Silvestre y Tumupasa de la región del Norte de La Paz, sugiriendo que los cacaos en cultivo indicados puedan tener ese origen.

El grupo (2) de color verde está conformado por siete lugares que poseen genotipos silvestres, ubicados en las causes del río Beni. También incluye genotipos silvestres CS de Macagua y Santa Fé que son de la región Norte de La Paz. Dentro del grupo solo los genotipos de Remolino están en cultivo y provienen de la región del Alto Beni. Probablemente la semilla de siembra fue llevada de alguno de los sitios donde se encuentra el cacao en forma silvestre.

El grupo (3) de color azul, agrupó genotipos silvestres de Cachichira y Tequeje ubicados en el río Beni. Este grupo se distingue por poseer características morfológicas particulares de semilla pequeña.



CS: cacao silvestre; CC: cacao en cultivo; A: río Beni; B: norte de La Paz; C: región de Alto Beni

Figura 7. Dendrograma basado en las distancias Euclídea y método Ward para 19 lugares de colecta basados en 164 genotipos de cacao Nacional Boliviano silvestres y cultivados.

El análisis de distancias y similitudes euclidianas (Anexo 7), muestra las distancias entre genotipos agrupados por los lugares de colecta para CC y CS. Este análisis muestra que la mayor distancia (7,8) se da entre las comunidades de Copacabana y Mototoy, la primera ubicada en el río Beni y la segunda al Norte de La Paz. La primera comunidad se caracteriza por la presencia de genotipos silvestres y la segunda por genotipos en cultivo. La menor distancia (1) entre las comunidades se da entre Isla del oro y San Marcos, ambas ubicadas en el cause del río Beni.

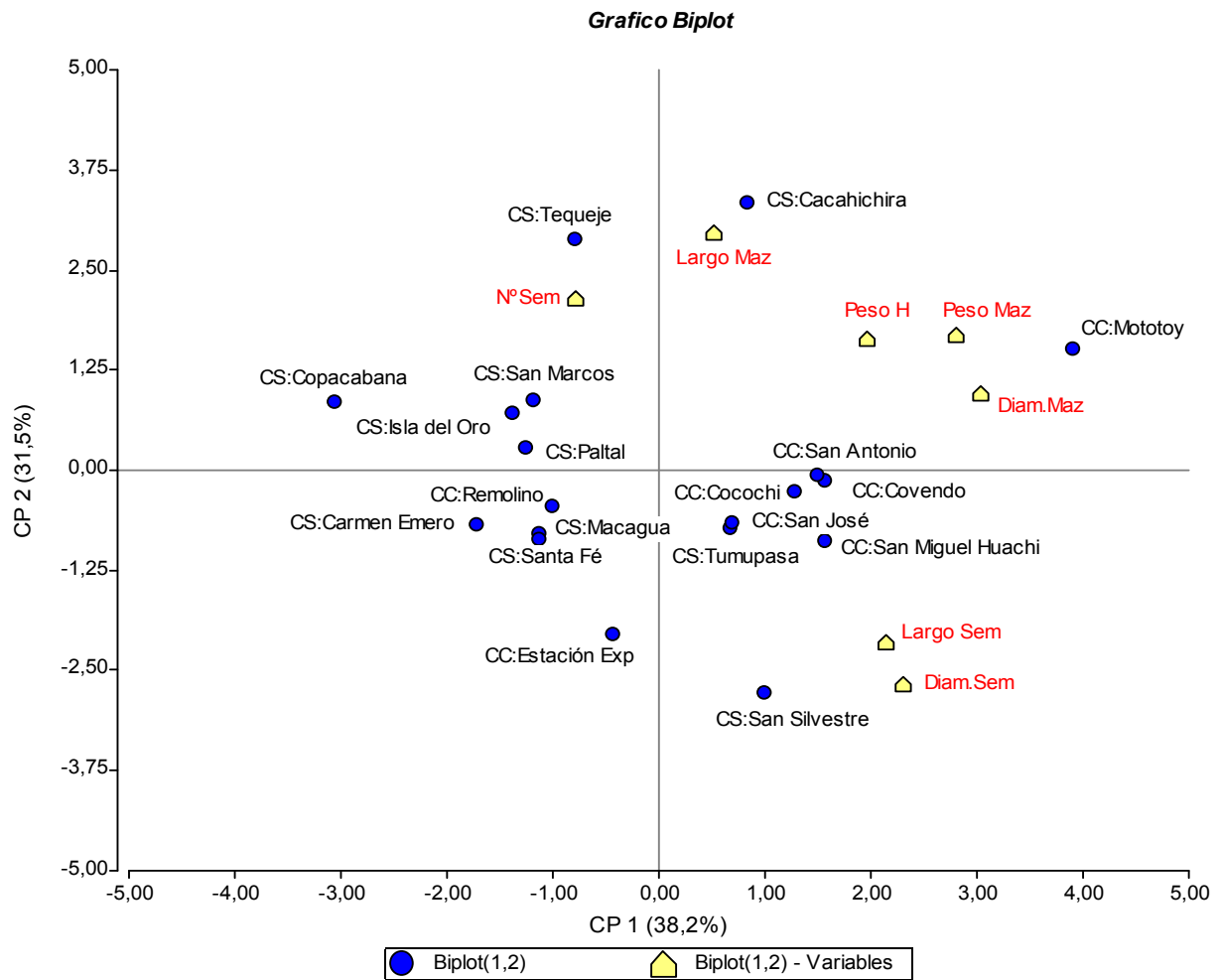
4.4.3 Análisis de Componentes principales

Se observó que las variables, largo y diámetro de semilla están asociados con el lugar de colecta de San Silvestre del Norte de La Paz, Las variables número de semilla y diámetro de semilla, presentan correlación positiva. La variable Largo de mazorca se asocia con los genotipos silvestres de Cachichira. El peso húmedo, peso de mazorca y diámetro de mazorca están asociadas a los genotipos de Mototoy. Sin embargo las variable número de semilla se asocia a los genotipos de Tequeje río Beni.

Con los dos primeros componentes se explica el 70 % de de la variabilidad (Cuadro 8) y (Figura 8). Los autovectores (e1 y e2) muestran los coeficientes con que cada variable original fue ponderada, para conformar los componentes principales CP1 (e1) y CP2 (e2). La variable número de semillas recibe el peso negativo más alto (-0,14) y la variable “diámetro de mazorca” con peso positivo más alto (0,54), estás variables son las que mas diferencian a los cacaos silvestres de los cacaos en cultivo en este eje. Se destacó la variabilidad producida por largo de mazorca (0,53) y diámetro de semilla (-0,47) no explicada por la CP1, es decir estás variables también tienen peso para separar grupos de cacao silvestre de los en cultivo. Ambas variables indican que el tamaño de la semilla es un carácter importante para diferenciar al cacao nacional Boliviano silvestre y en cultivo.

Cuadro 8. Tabla de resultados, componentes principales de las variables cuantitativas

Autovalores				Autovectores		
Lambda	Valor	Proporción	Prop Acum	Variables	e1	e2
1	2,67	0,38	0,38	Diámetro mazorca	0,54	0,17
2	2,2	0,31	0,70	Largo mazorca	0,09	0,53
3	1,35	0,19	0,89	Diámetro semilla	0,41	-0,47
4	0,51	0,07	0,96	Largo de semilla	0,38	-0,38
5	0,16	0,02	0,98	Número de semilla	-0,14	0,38
6	0,07	0,01	1	Peso húmedo	0,35	0,29
7	0,03	4,70E-03	1	Peso mazorca	0,5	0,3



CS: cacao silvestre; CC: cacao en cultivo

Figura 8. Grafico Biplot, componentes principales de las variables cuantitativas y su relación con los lugares y los tipos de cacao silvestre y cultivado.

4.4.4 Análisis discriminante canónico

El análisis discriminante canónico permitió corroborar el análisis de componentes principales, y determinar características discriminantes (Cuadro 9). La variable diámetro de semilla es la más importante para discriminar entre cacaos silvestres y cacaos cultivados, con el valor positivo más alto (0,98). Sin embargo el eje 2 muestra la variable “largo de mazorca” con un valor de (0,99) indica que es la característica que más importante para discriminar entre tipos de cacao silvestre y en cultivo al igual que los lugares de origen.

Cuadro 9. Análisis discriminante canónico para características morfológicas evaluadas en 164 genotipos de cacao nacional Boliviano

Variables	1	2
Diámetro mazorca	-0,17	-0,53
Largo mazorca	-0,13	0,99
Diámetro semilla	0,98	-0,08
Largo semilla	0,02	0,54
Número de semilla	-0,12	0,22
Peso húmedo	0,15	0,24
Peso mazorca	0,07	-1,12

4.5 Análisis de calidad de almendras

Los resultados del análisis de calidad (Anexo 8) realizado en la Compañía Guittard de los Estados Unidos, indican que las muestras de cacao silvestre de Isla del oro, Tequeje y Santa Fé, tienen buenas características, el sabor es medianamente amargo y aroma agradable tienen un buen perfil de sabor. Las muestras de cacao en cultivo de Cocomi y Santa Fé, resultaron con parámetros de calidad muy buenos, pese a que en las muestras se registra una fermentación deficiente justificado por las condiciones difíciles de colecta y el proceso de fermentación que se realizó en medio de las expediciones. Es interesante mencionar que las muestras de San José y Santa Fé se asemejan al cacao Nacional del Ecuador.

4.6 Evaluación de parámetros morfológicos para las Selecciones élites de la región de Alto Beni.

Los resultados obtenidos se muestran en el Cuadro 10, El peso de fruto varió entre 2020 g (IV-18) y 440 g (IIa-10) y presentó una media general de 869 g. Los pesos más altos fueron obtenidos por los genotipos IV-17 (1920 g), IV – 19 (1260 g) III-07 (1235 g) y IIa-16 (1220 g). Los materiales más bajos en peso fueron III-14 (520 g) y el III-42 (550 g). El Largo de fruto varió entre 16 cm (III-42) y 32 cm (VII-92), la media general fue de 21.6 cm. El diámetro de fruto presenta una media de 10 cm y varió de 8 cm (IIa-02) a 13,8 cm (IV-18).

La media del número de semillas fue de 43,5, siendo el número máximo 58 (III-16) y el mínimo 11 (III-42). El peso húmedo varió de 60 g (III-42) y 320 g (IV-18) g. El peso seco presenta una media de 53,4 g por fruto. El largo de semilla varió de 2,2 cm (I-04) a 3,6 cm (IV-06). El diámetro de semilla menor 1,3 cm se registró en (I-205) mientras que el mayor 1,8 cm (IV-31) y presenta una media general de 1,6 cm.

El análisis ANOVA entre grupos conformados indica diferencias significativas a ($p < 0,05$) para las ocho variables evaluadas entre genotipos.

Cuadro 10. Variables cuantitativas de fruto y semilla de 61 selecciones élites de la región de Alto Beni, Bolivia.

Genotipo	Región	Frutos evaluados	Características del fruto			Características de semilla				
			Peso (g)	Largo (cm)	Diámetro (cm)	Número semillas por fruto	Peso húmedo (g)	Peso seco (g)	Largo (cm)	Diámetro (cm)
I-04	Alto Beni	3	1220	22	11,5	48	190	56,4	2,2	1,6
I-05	Alto Beni	3	730	19	9,4	43	150	44,5	2,8	1,5
I-12	Alto Beni	3	1040	26	10,5	30	90	26,7	2,5	1,6
I-201	Alto Beni	3	600	20	8,9	51	200	59,3	3,1	1,5
I-202	Alto Beni	3	750	24	8,9	50	230	68,2	2,8	1,6
I-205	Alto Beni	3	500	19	8,4	48	140	41,5	3,1	1,3
IIa-00	Alto Beni	3	780	20	10,2	31	130	38,6	3,3	1,7
IIa-02	Alto Beni	3	500	17	8	50	130	38,6	2,3	1,3
IIa-05	Alto Beni	3	600	19	9,5	36	130	38,6	3	1,5
IIa-06	Alto Beni	3	600	18	9,5	43	180	53,4	3,2	1,6
IIa-10	Alto Beni	3	440	16	9,1	30	105	31,2	3	1,6
IIa-11	Alto Beni	3	1000	24	10,3	45	215	63,8	3,2	1,5
IIa-13	Alto Beni	3	800	22	9,5	50	205	60,8	3,3	1,5
IIa-16	Alto Beni	3	1220	26	11,1	48	240	71,2	3,2	1,6
IIa-17	Alto Beni	3	820	21,5	10,5	49	210	62,3	3	1,6
IIa-18	Alto Beni	3	850	21	10	45	200	59,3	3	1,6
IIa-20	Alto Beni	3	630	21	9,2	44	155	46	2,6	1,5
IIa-22	Alto Beni	3	650	21	8,6	47	170	50,4	3,1	1,6
IIa-40	Alto Beni	3	720	20	9,1	42	195	57,9	3,1	1,7
IIa-42	Alto Beni	3	500	17	8,3	47	160	47,5	3	1,5
IIa-50	Alto Beni	3	900	20	10,5	41	200	59,3	3	1,5
IIa-53	Alto Beni	3	650	19	10	50	200	59,3	3	1,7
IIa-54	Alto Beni	3	630	19	8,6	47	170	50,4	3	1,6

Cuadro 10. Continuación

Genotipo	Región	Frutos evaluados	Características del fruto			Características de semilla				
			Peso (g)	Largo (cm)	Diámetro (cm)	Número semillas por fruto	Peso húmedo (g)	Peso seco (g)	Largo (cm)	Diámetro (cm)
Ila-56	Alto Beni	3	830	20	9,7	53	210	62,3	2,9	1,6
Ila-57	Alto Beni	3	710	21	8,9	55	250	74,2	2,9	1,5
Ila-58	Alto Beni	3	1050	24	10,5	40	170	50,4	2,7	1,6
Ila-59	Alto Beni	3	810	20	9,7	47	205	60,8	3	1,5
Ila-73	Alto Beni	3	800	19	10,3	44	200	59,3	3	1,6
III-01	Alto Beni	3	850	26	8,9	48	160	47,5	2,5	1,4
III-04	Alto Beni	3	800	22	10,1	51	215	63,8	3	1,5
III-07	Alto Beni	3	1235	28	11	50	240	71,2	2,9	1,7
III-11	Alto Beni	3	690	22	8,9	39	140	41,5	2,8	1,5
III-12	Alto Beni	3	700	20	9,9	35	150	44,5	3,2	1,6
III-13	Alto Beni	3	1050	22	10,8	52	220	65,3	2,9	1,5
III-14	Alto Beni	3	520	20	8,3	48	130	38,6	2,6	1,5
III-16	Alto Beni	3	730	21,5	9,7	58	225	66,8	3	1,5
III-20	Alto Beni	3	1130	22	11	53	250	74,2	3,1	1,6
III-28	Alto Beni	3	650	20	8,9	45	150	44,5	2,7	1,4
III-31	Alto Beni	3	1100	22	11,3	48	225	66,8	3,2	1,6
III-33	Alto Beni	3	760	22	9,4	36	150	44,5	3,2	1,6
III-42	Alto Beni	3	550	16	8,9	11	60	17,8	3	1,6
III-44	Alto Beni	3	1030	24	10	40	140	41,5	2,8	1,5
III-82	Alto Beni	3	1130	24	10,8	48	220	65,3	3,3	1,7
IV-01	Alto Beni	3	1050	25	9,7	43	230	68,2	3,1	1,6
IV-06	Alto Beni	3	1110	20	11,5	16	120	35,6	3,6	1,8
IV-17	Alto Beni	3	1920	24	13,7	33	205	60,8	3,4	1,6

Cuadro 10. Continuación.

Genotipo	Región	Frutos evaluados	Características del fruto			Características de semilla				
			Peso (g)	Largo (cm)	Diámetro (cm)	Número semillas por fruto	Peso húmedo (g)	Peso seco (g)	Largo (cm)	Diámetro (cm)
IV-18	Alto Beni	3	2020	26,5	13,8	41	320	95	3,4	1,7
IV-19	Alto Beni	3	1260	24	11,3	42	230	68,2	3,5	1,7
IV-21	Alto Beni	3	840	19	11,1	38	150	44,5	2,9	1,5
IV-22	Alto Beni	3	915	24,5	10	53	215	63,8	2,8	1,5
IV-31	Alto Beni	3	870	20,5	12,4	40	230	68,2	3,5	1,8
IV-33	Alto Beni	3	880	19	10,2	40	120	35,6	2,7	1,5
Sel-Rojo	Alto Beni	3	1050	24	10,7	37	180	53,4	3,1	1,5
VII-01	Alto Beni	3	750	21	9,2	32	120	35,6	2,5	1,4
VII-02	Alto Beni	3	840	23	8,9	44	150	44,5	2,9	1,4
VII-03	Alto Beni	3	700	22,5	9,4	49	180	53,4	2,9	1,5
VII-07	Alto Beni	3	820	23	9,9	38	130	38,6	2,9	1,6
VII-08	Alto Beni	3	790	20	10,2	51	185	54,9	2,6	1,7
VII-86	Alto Beni	3	820	21	10,5	50	180	53,4	2,9	1,5
VII-87	Alto Beni	3	660	22	9,1	55	200	59,3	3	1,5
VII-92	Alto Beni	3	850	32	9,9	35	130	38,6	3	1,5
Media			859	21,6	10	43,5	180	53,4	3	1,6
Mínimo			440	16	8	11	60	17,8	2,2	1,3
Máximo			2020	32	13,8	58	320	95	3,6	1,8
Desvío Standard			288	2,9	1,2	8,7	46,5	13,8	0,3	0,1
Coefficiente de Variación			33,62	13,45	11,68	19,96	25,84	25,84	9,35	6,58
Coefficiente Variación por conglomerado			25,3	12,3	9,3	16,4	14,3	14,3	8	6,1
ANOVA Test Tukey (p<=0,05)			0,0001*	0,0017*	0,0001*	0,0001*	0,0001*	0,0001*	0,0001*	0,0052*

* significativo

4.6.2 Evaluación de variables cualitativas del fruto y semilla

El 63 % del total de genotipos evaluados presentó mazorca angoleta, con escasa constricción basal (43,3 %), y una rugosidad predominante áspera (31,1 %) (Cuadro 11). La forma del ápice es en su mayoría aguda (47,5 %). El porcentaje de accesiones con frutos verdes es mayor (78,7%), mientras que las mazorcas rojas representaron el 21,3 %. Solo se observó en un genotipo con semillas blancas (1,6 %) predominando el color púrpura en el 98,4 % de los genotipos.

Cuadro 11. Evaluación de 61 selecciones élites del Alto Beni: variables cualitativas de fruto y semilla.

Descriptor	Categoría	Porcentaje
Forma de la mazorca	Angoleta	63,9
	Amelonado	36,1
Forma del Ápice	Puntiagudo	4,9
	Agudo	47,5
	Obtuso	34,4
	Redondeado	4,9
	Dentado	8,2
Constricción basal	Ausente	19,7
	Escasa	44,3
	Intermedia	19,7
	Bien marcada	11,5
	Muy ancho	4,9
Rugosidad del mesocarpo	Lisa	26,2
	Áspera	31,1
Color de mazorca	Verde	78,7
	Rojo	21,3
Color de la semilla	Púrpura	98,4
	Blanco	1,6

Para una mejor interpretación, se muestra en el Cuadro 12, las características individuales de 61 genotipos selecciones élites de Alto Beni.

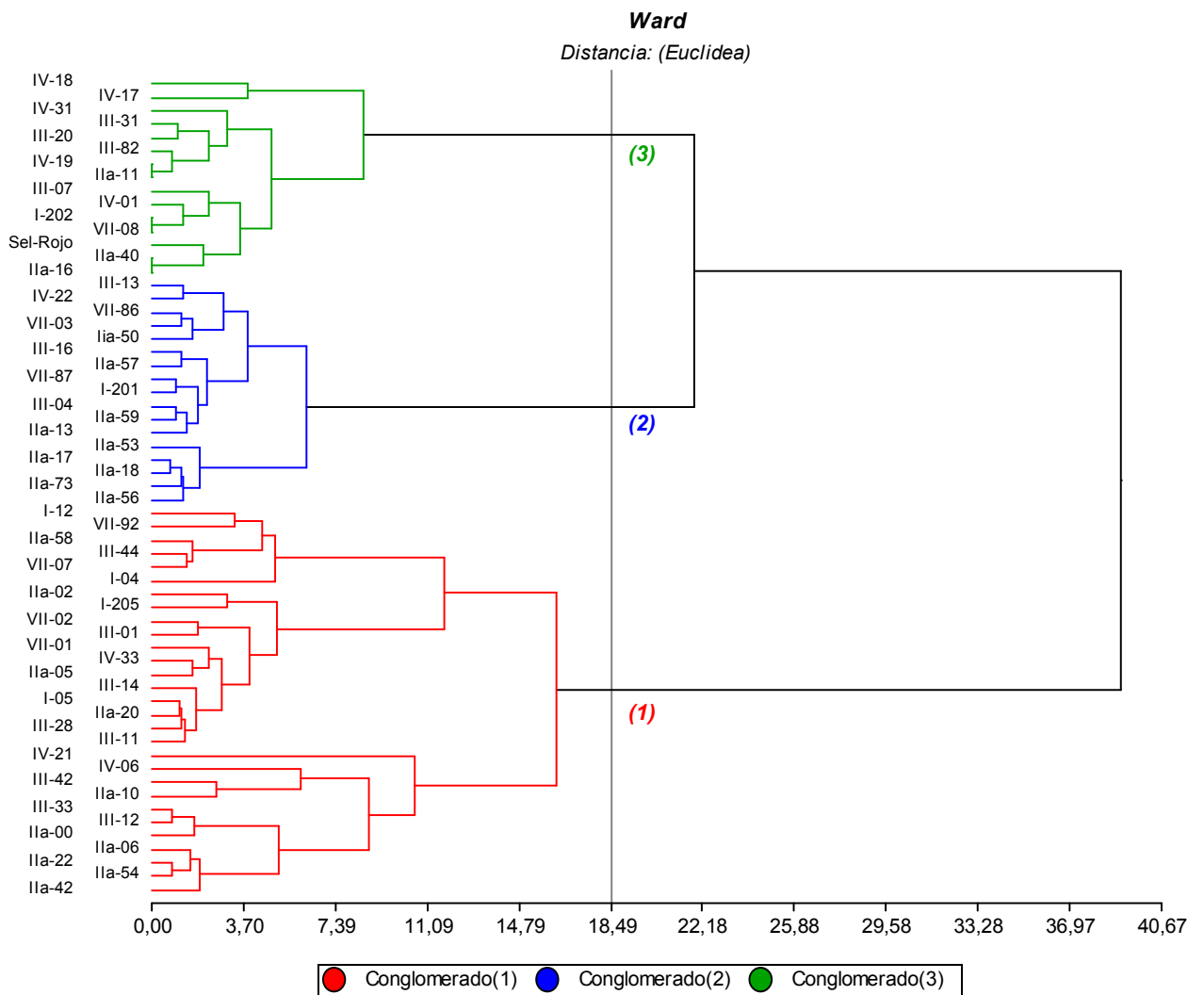
Cuadro 12. Características cualitativas por accesión de cacao selecciones élités.

N°	ID	Nombre local	Constricción Basal	Forma mazorca	Forma del ápice	Color de mazorca	Rugosidad mesocarpio	Color semilla
1	TC-1480	III-33	Intermedia	Angoleta	Obtuso	Verde	Áspera	Púrpura
2	TC-1481	III-44	Ausente	Angoleta	Puntiagudo	Verde	Áspera	Púrpura
3	TC-1482	III-20	Escasa	Angoleta	Dentado	Verde	Lisa	Púrpura
4	TC-1483	III-12	Escasa	Cundeamor	Obtuso	Verde	Intermedia	Púrpura
5	TC-1484	III-16	Escasa	Angoleta	Obtuso	Verde	Intermedia	Púrpura
6	TC-1485	III-04	Escasa	Cundeamor	Agudo	Verde	Áspera	Púrpura
7	TC-1486	I-201	Intermedia	Angoleta	Agudo	Verde	Intermedia	Púrpura
8	TC-1487	I-12	Muy ancho	Angoleta	Agudo	Verde	Áspera	Púrpura
9	TC-1488	I-05	Escasa	Angoleta	Dentado	Verde	Intermedia	Púrpura
10	TC-1489	Ia-11	Bien marcada	Cundeamor	Agudo	Verde	Lisa	Púrpura
11	TC-1490	Ia-56	Escasa	Angoleta	Agudo	Verde	Lisa	Púrpura
12	TC-1491	Ia-06	Intermedia	Cundeamor	Obtuso	Verde	Lisa	Púrpura
13	TC-1492	Ia-10	Escasa	Angoleta	Agudo	Verde	Intermedia	Púrpura
14	TC-1493	III-28	Escasa	Angoleta	Agudo	Verde	Lisa	Púrpura
15	TC-1494	III-42	Ausente	Angoleta	Obtuso	Verde	Áspera	Púrpura
16	TC-1495	III-31	Ausente	Angoleta	Dentado	Verde	Áspera	Púrpura
17	TC-1496	III-82	Escasa	Cundeamor	Agudo	Verde	Áspera	Púrpura
18	TC-1497	III-14	Bien marcada	Angoleta	Obtuso	Verde	Lisa	Púrpura
19	TC-1498	III-13	Escasa	Angoleta	Agudo	Rojo	Intermedia	Púrpura
20	TC-1499	III-11	Ausente	Angoleta	Agudo	Verde	Lisa	Púrpura
21	TC-1500	I-205	Escasa	Angoleta	Redondeado	Verde	Lisa	Púrpura
22	TC-1501	I-202	Intermedia	Cundeamor	Agudo	Rojo	Áspera	Púrpura
23	TC-1502	I-04	Ausente	Cundeamor	Redondeado	Verde	Lisa	Púrpura
24	TC-1503	Ia-00	Intermedia	Angoleta	Agudo	Verde	Lisa	Púrpura
25	TC-1504	Ia-13	Bien marcada	Angoleta	Agudo	Verde	Lisa	Púrpura
26	TC-1505	Ia-17	Escasa	Cundeamor	Obtuso	Verde	Áspera	Púrpura
27	TC-1506	Ia-58	Ausente	Angoleta	Agudo	Verde	Áspera	Púrpura
28	TC-1507	Ia-05	Escasa	Angoleta	Agudo	Verde	Lisa	Púrpura
29	TC-1508	Ia-53	Ausente	Angoleta	Agudo	Verde	Intermedia	Púrpura
30	TC-1509	IV-06	Intermedia	Cundeamor	Dentado	Verde	Áspera	Púrpura
31	TC-1510	IV-22	Bien marcada	Cundeamor	Agudo	Verde	Intermedia	Púrpura
32	TC-1511	IV-17	Ausente	Angoleta	Obtuso	Verde	Áspera	Púrpura
33	TC-1512	IV-19	Ausente	Angoleta	Redondeado	Rojo	Áspera	Púrpura
34	TC-1513	IV-33	Intermedia	Cundeamor	Obtuso	Verde	Intermedia	Púrpura
35	TC-1514	IV-31	Escasa	Cundeamor	Obtuso	Verde	Áspera	Púrpura
36	TC-1515	IV-21	Escasa	Angoleta	Obtuso	Verde	Áspera	Crema
37	TC-1516	IV-18	Intermedia	Angoleta	Obtuso	Verde	Áspera	Púrpura
38	TC-1517	IV-01	Escasa	Angoleta	Agudo	Rojo	Intermedia	Púrpura
39	TC-1518	VII-08	Escasa	Cundeamor	Agudo	Verde	Lisa	Púrpura
40	TC-1519	VII-02	Intermedia	Cundeamor	Obtuso	Rojo	Intermedia	Púrpura
41	TC-1520	VII-03	Escasa	Angoleta	Agudo	Rojo	Intermedia	Púrpura
42	TC-1521	VII-07	Escasa	Cundeamor	Agudo	Verde	Intermedia	Púrpura
43	TC-1522	VII-86	Escasa	Cundeamor	Obtuso	Rojo	Intermedia	Púrpura
44	TC-1523	VII-87	Ausente	Angoleta	Obtuso	Rojo	Intermedia	Púrpura
45	TC-1524	VII-92	Escasa	Angoleta	Obtuso	Verde	Intermedia	Púrpura
46	TC-1525	VII-01	Intermedia	Angoleta	Obtuso	Rojo	Intermedia	Púrpura
47	TC-1526	Ia-22	Bien marcada	Angoleta	Dentado	Rojo	Intermedia	Púrpura
48	TC-1527	Ia-40	Escasa	Cundeamor	Agudo	Rojo	Áspera	Púrpura
49	TC-1528	Ia-73	Ausente	Angoleta	Obtuso	Verde	Intermedia	Púrpura
50	TC-1529	Ia-57	Intermedia	Cundeamor	Agudo	Verde	Intermedia	Púrpura
51	TC-1530	Ia-20	Escasa	Cundeamor	Obtuso	Verde	Intermedia	Púrpura
52	TC-1531	Ia-54	Escasa	Cundeamor	Agudo	Verde	Lisa	Púrpura
53	TC-1532	Ia-50	Escasa	Angoleta	Agudo	Verde	Intermedia	Púrpura
54	TC-1533	Ia-18	Intermedia	Cundeamor	Obtuso	Verde	Intermedia	Púrpura
55	TC-1534	Sel-Rojo	Ausente	Angoleta	Agudo	Rojo	Áspera	Púrpura
56	TC-1535	Ia-59	Escasa	Angoleta	Obtuso	Verde	Intermedia	Púrpura
57	TC-1536	Ia-16	Muy ancho	Angoleta	Agudo	Verde	Lisa	Púrpura
58	TC-1537	Ia-42	Bien marcada	Cundeamor	Puntiagudo	Verde	Lisa	Púrpura
59	TC-1538	III-01	Bien marcada	Angoleta	Puntiagudo	Verde	Intermedia	Púrpura
60	TC-1539	III-07	Muy ancho	Angoleta	Agudo	Verde	Áspera	Púrpura
61	TC-1540	Ia-02	Escasa	Angoleta	Agudo	Rojo	Intermedia	Púrpura

TC: Theobroma cacao; I, Ia, III, IV, VII: Áreas de Alto Beni.

4.6.3 Análisis de conglomerados

Los genotipos se agruparon en tres grupos de acuerdo al método de agrupamiento jerárquico de Ward (1963) y la distancia Euclídea (Figura 9). La separación de los grupos se dio a una distancia de 18,49. El grupo 1 diferenciado por el color rojo, agrupa a 29 genotipos, el grupo 2 diferenciado por el color azul, agrupa a 17 genotipos y un tercer grupo que se distingue por el color verde agrupa a 12 genotipos.



I, IIa, III, IV, VII: Nominación a las Áreas de Alto Beni.

Figura 9. Dendrograma basado en las distancias Euclídea y método Ward para 61 genotipos (selecciones élite) de la región de Alto Beni.

4.6.4 Análisis componentes principales

Los 2 componentes explican 69 % de de la variabilidad en todas las observaciones (Cuadro 13). Los autovectores (e1 y e2) muestran los coeficientes con que cada variable fue ponderada, para conformar los componentes principales CP1 (e1) y CP2 (e2). En el CP1 la variable peso mazorca y diámetro de mazorca reciben el peso positivo más alto (0,5). Sin embargo en el CP2 la variable número de semillas tiene el valor mas alto (0,72) estas variables son las que mas discriminan y tienen peso para separar grupos entre selecciones élites.

Cuadro 13. Resultados del análisis componentes principales cacao selecciones élites.

Autovalores				Autovectores		
Lambda	Valor	Proporción	Prop Acum	Variables	e1	e2
1	3,17	0,45	0,45	Diámetro mazorca	0,5	-0,12
2	1,67	0,24	0,69	Largo mazorca	0,32	0,26
3	1,06	0,15	0,84	Peso mazorca	0,5	0,03
4	0,51	0,07	0,92	Diámetro semilla	0,36	-0,33
5	0,44	0,06	0,98	Largo semilla	0,33	-0,28
6	0,1	0,01	0,99	Peso húmedo	0,39	0,46
7	0,06	0,01	1	Número semillas	-4,40E-03	0,72

4.7 Caracterización molecular

4.7.1 Extracción y cuantificación ADN

Para la extracción de ADN se utilizó el Kit (Q – BIO gene, MP FastDNA Kit) en 164 muestras de cacao silvestre y cultivados, 11 clones testigo representantes de los complejos genéticos Trinitario (ICS-6; ICS-8), forastero (EET-400; PA-121; Catongo blanco; TJ-1; Pound-7; Pound-12; SCA-6; IMC-67) y el clon OC – 77 que se conoce es de origen Venezolano y de padre criollo.

El ADN obtenido fue de buena calidad y pureza, sin embargo, las muestras presentaban una leve presencia de fenoles, debido a la oxidación de las hojas colectadas en condiciones difíciles. La cuantificación de ADN se realizó en tres grupos obteniendo una concentración promedio de ADN extraído de 38,4 ng/μl. (Figura 10).

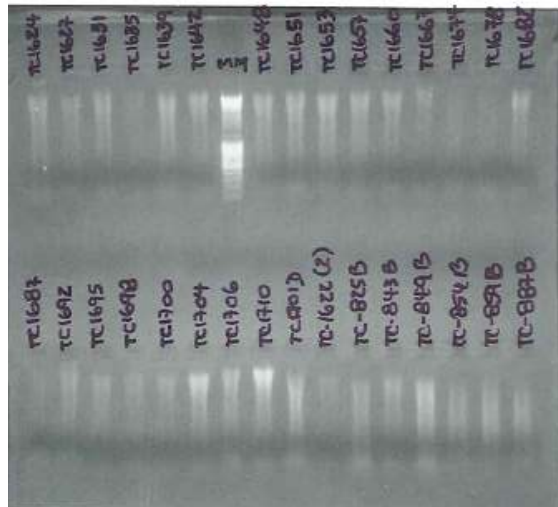


Figura 10. Cuantificación de ADN para 31 muestras de cacao y marcador de peso molecular (MM), electroforesis en gel 1%, 100V- 40minTBE 1X

4.7.2 Análisis Secuencia Simple Repetida (SSRs)

Se utilizaron 14 primers de los 15 seleccionados por el Centro de Investigaciones Agrícolas Beltsville (BACR) (Anexo 9) para analizar diversidad genética entre grupos. El MTcCIR40 se excluyó por que presentó poca información en las muestras estudiadas.

Cuadro 14. Resultado del análisis del los marcadores moleculares SSRs utilizados

Resumen	Datos
Muestras	174
Muestras Duplicadas	1
Bandas (número)	184
Patrón de bandas duplicadas	0
Bandas monomórficas	0
Bandas polimórficas (%)	100
Primers	14

El cuadro que antecede muestra la descripción de los marcadores SSRs para 14 *primers* en 174 genotipos de cacao, el resumen de los resultados obtenidos a partir de tabla de resultados cuyas dimensiones son 175 filas (nombre fila y las muestras) y 115 columnas (111 representan marcadores SSRs y tres los factores de clasificación que indican la procedencia). Se analizó un total de 19,314 datos binarios.

Una de las 174 muestras se encuentra duplicada, todos los marcadores son polimórficos 100 % y son 14 grupos ó *primers* (Cuadro 14). El *primer* que más bandas amplificó fue el CIR37 (22 bandas) con 6,54% de amplificación a través de 174 muestras. Los valores de contenido de información polimórfica (Cuadro 15) fueron obtenidos con los *primers* CIR1, CIR24, CIR7 y CIR18 que es más del 50 % que el rango teórico del contenido de información polimórfica (0,01 a 0,05) el cual es informativo. La menor probabilidad de que dos individuos compartan el mismo alelo por *primer* fue encontrada en el primer CIR1. Esto indica que dicho primer mostró un alto grado de confianza en la identificación de genotipos de cacao comparados simultáneamente. Estos resultados también muestran que los *primers* CIR6, CIR33, CIR37 tienen los menores valores de capacidad discriminatoria y contenido de información polimórfica que el resto de los *primers*.

Cuadro 15. Resumen de resultados moleculares por primers

Primer	BP	BM	BT	PMF(95)	PIC	EE	AMP	PDICMA
CIR1	8	0	8	0,88	0,23	0,03	19,52	9,40E-13
CIR33	15	0	15	0,27	0,1	0,03	8,6	1,10E-04
CIR60	14	0	14	0,43	0,13	0,03	9,93	5,80E-07
CIR11	14	0	14	0,43	0,12	0,03	10,11	3,60E-06
CIR12	19	0	19	0,42	0,12	0,03	8,63	2,70E-07
CIR26	10	0	10	0,3	0,1	0,02	11,95	8,40E-04
CIR15	17	0	17	0,35	0,1	0,03	8,22	3,90E-05
CIR22	10	0	10	0,6	0,17	0,02	13,87	7,10E-09
CIR24	11	0	11	0,73	0,18	0,02	14,42	3,10E-10
CIR7	11	0	11	0,64	0,17	0,02	13,9	1,90E-09
CIR18	9	0	9	0,56	0,18	0,02	14,35	3,70E-09
CIR37	22	0	22	0,27	0,09	0,02	6,54	2,60E-05
CIR6	12	0	12	0,17	0,05	0,01	9,27	1,90E-02
CIR8	12	0	12	0,42	0,12	0,02	10,51	6,40E-06
Total	184	0	184				10,6	9,60E-89

BP: número de bandas polimórficas; BM: número de bandas monomórficas; BT: número de bandas totales; PMF (95): proporción de loci polimórficos; PIC: contenido de información polimórfica; EE: Error estándar del PIC; AMP: porcentaje de amplificación; PDICMA probabilidad de compartir el mismo alelo.

4.7.3 Definición de grupos genéticos

Se agruparon cuatro grupos a una distancia de 1,39 (Figura 3). El grupo más diverso de color verde es el grupo 1. Contiene principalmente genotipos cultivados de la región de Alto Beni: Covendo (18 genotipos), San José de Cogotay (3 genotipos), San Miguel de Huachi (9 genotipos), Remolino (2 genotipos), San Antonio (1 genotipo). Dentro de este grupo se ubican además un genotipo silvestre de Macagua y dos de Tumupasa, ambos colectados en el Norte del departamento de La Paz (Figura 3). Aparentemente el origen genético de estos materiales es el centro del río Beni entre las comunidades de Copacabana y Cachichira genotipos silvestres pertenecientes también a este grupo. Dada la gran distribución genética que tienen los genotipos del grupo 1, incluso en relación a genotipos Forasteros provenientes de Sudamérica, se considera importante realizar una expedición a dichos sitios para rescatar y estudiar la diversidad presente en ellos.

El segundo grupo más diverso es el grupo 4, de color rojo, que está constituido principalmente por genotipos silvestres de la región Norte de La Paz: San Silvestre (4 genotipos), Macagua (4 genotipos), Tumupasa (2 genotipos), Santa Fé (2 genotipos). Posiblemente estos genotipos tienen su origen en el norte del río Beni en las comunidades de Tequeje, Paltal, San Marcos y Cachichira en donde se colectaron también genotipos silvestres de este grupo (Figura 3). Pertenecen al mismo 6 genotipos conservados en la Estación Experimental de Sapecho Alto Beni, los cuales fueron colectados en la Amazonia Boliviana en los años 80.

El grupo 3 de color negro, esta constituido principalmente por genotipos conservados en la Estación Experimental de Sapecho (Alto Beni) y un genotipo cultivado de Mototoy. El origen posible es el norte del río Beni en las comunidades: Isla del oro, Carmen del Emero, San Marcos, Tequeje y Paltal, donde se encuentran genotipos silvestres pertenecientes a este grupo.

El grupo 2 de color azul, contiene los clones de referencia: Trinitarios (ICS-8, ICS-6), Forasteros de Perú (IMC-67, Pound 12, pound7), Ecuador (EET-400, SCA-6), Brasil (TJ-1, PA-121, Catongo Blanco) y un genotipo de Venezuela (OC-77), se incluye genotipos cultivados que probablemente contiene sangre de estos y que fueron obtenidos en: San Antonio, Mototoy, Remolino y San José de Cogotay.

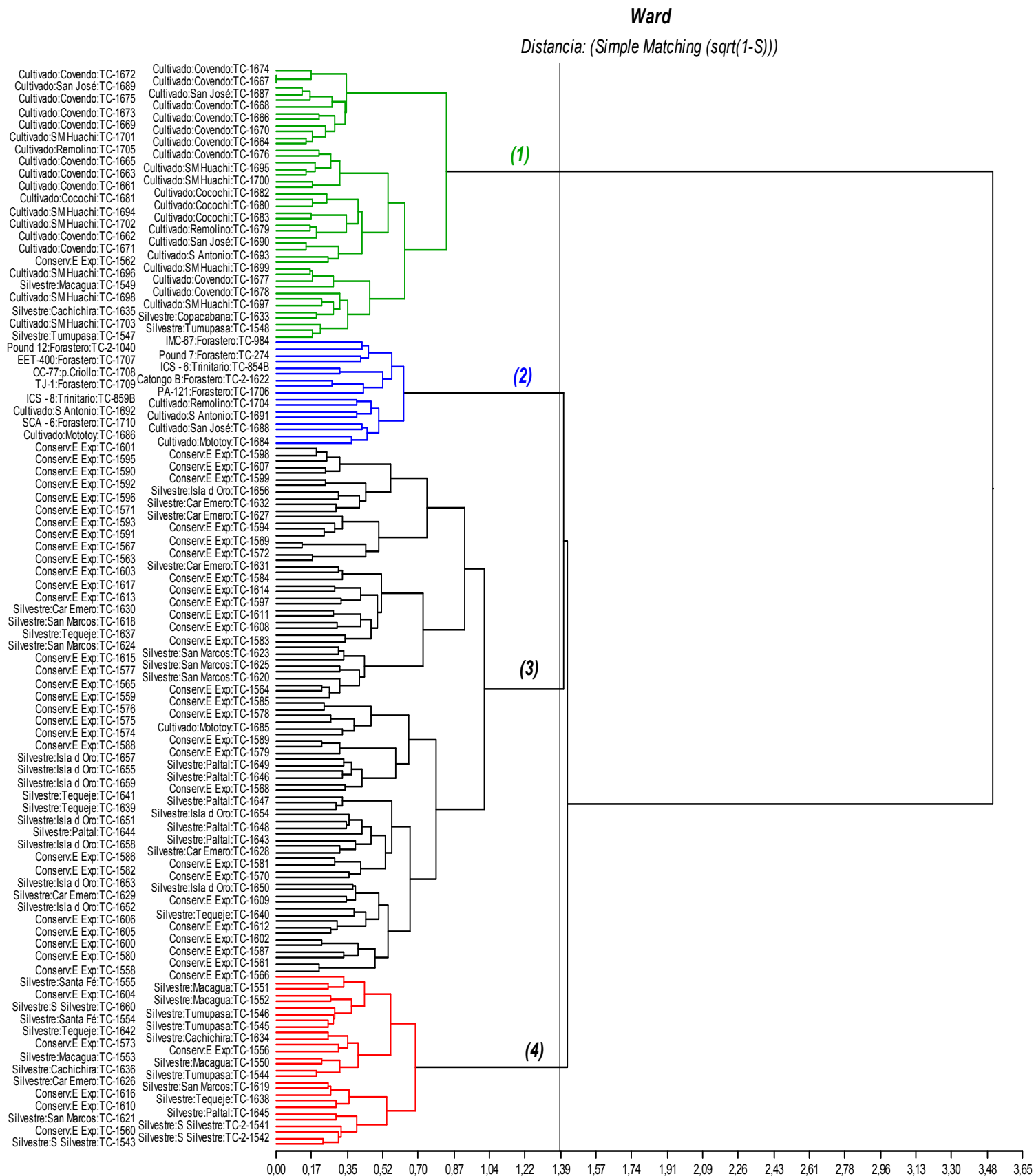


Figura 11. Dendrograma Simple Matching y método Ward basado en 174 muestras y 11 clones testigo *T. cacao* a partir de datos moleculares.

4.6.4 Análisis de consenso entre características moleculares y morfológicas

Los autovalores indican que la variabilidad explicada a través del Eje 1 de la descomposición de la matriz de consenso es 61 %. Con los dos primeros ejes se explica el 100 % (Cuadro 16). El consenso entre la configuración molecular y la morfológica fue de 70,8 %. Los genotipos que tuvieron mayor consenso son los ubicados en Mototoy (0,19), Carmen del Emero (0,16) Tequeje (0,16) y la de menor consenso con 0,01 fueron los genotipos de Macagua.

Cuadro 16. Resultados del análisis Procrustes Generalizado (APG) combinando información morfológica y molecular de 129 genotipos de cacao nacional Boliviano.

Autovalores	Valor	Proporción	Proporción acumulada
1	0,437	0,617	0,617
2	0,271	0,383	1

Cuadro de Análisis de la Varianza			
Sumas de cuadrados dentro por caso			
	Consenso	Residual	Total
San Silvestre:CS	0,094	0,021	0,115
Tumupasa:CS	0,052	0,061	0,113
Macagua:CS	0,011	0,019	0,03
Santa Fé:CS	0,041	0,052	0,093
Estación Exp:CC	0,089	0,061	0,15
San Marcos:CS	0,109	0,012	0,122
Carmen Emero:CS	0,164	0,009	0,173
Cacahichira:CS	0,027	0,103	0,13
Tequeje:CS	0,165	0,009	0,174
Paltal:CS	0,111	0,001	0,112
Isla del Oro:CS	0,081	0,005	0,086
Covendo:CC	0,057	0,013	0,071
Remolino:CC	0,007	0,055	0,062
Cocochi:CC	0,06	0,004	0,064
Mototoy:CC	0,19	0,054	0,245
San José:CC	0,024	0,067	0,091
San Antonio:CC	0,043	0,03	0,074
San Miguel Huachi:CC	0,092	0,006	0,098
Total	1,416	0,584	2

Sumas de cuadrados dentro por grupo			
	Consenso	Residual	Total
Grupo1 (Moleculares)	0,708	0,292	1
Grupo2 (Morfológicos)	0,708	0,292	1
Total	1,416	0,584	2

CC: cacao cultivado; CS: cacao silvestre

5 DISCUSION

El Cacao Nacional Boliviano es un recurso genético autóctono de Bolivia con un gran potencial para desarrollar un cacao diferenciado y de mayor precio en Bolivia. A pesar de este potencial, hasta hace poco se desconocían con precisión aspectos fundamentales del mismo como son características morfológicas más distintivas, su posible origen y ubicación genética dentro del grupo de los forasteros, su relación con los materiales sembrados actualmente por los agricultores en Bolivia, su potencial en términos de calidad, etc. La mayoría de estos aspectos fueron estudiados en esta investigación mediante el análisis morfológico, molecular e industrial de una cantidad significativa de genotipos silvestres y cultivados colectados por el autor en áreas estratégicas del territorio boliviano.

Se encontró en términos generales que el CNB silvestre conforma dos grupos genéticos principales con un grado importante de distinción con respecto a genotipos cultivados de la región de Alto Beni. La mayor diversidad genética del CNB se encontró a lo largo del Río Beni, lo que sugiere que los genotipos originales ingresaron ancestralmente a territorio boliviano desde la amazonía brasileña siguiendo el sentido inverso a la corriente del río, hipótesis que deberá ser estudiada con mayor profundidad en otra investigación. Con relación al potencial de los genotipos estudiados, es importante resaltar que dentro de los materiales silvestres se identificaron genotipos con perfiles organolépticos notables, que junto con las otras ventajas del CNB como son su tolerancia a la escoba de bruja, periodo corto de fermentación, madures temprana, resaltan el gran potencial de este cacao. Se estableció que los materiales cultivados presentan introgresión con otros genotipos que los distancian molecular y morfológicamente de los materiales silvestres. Esta distinción fue máxima en el caso de selecciones élite obtenidas en fincas de productores, debido a la presencia cada vez mayor en las fincas de los productores de genotipos foráneos introducidos a Bolivia a partir de diferentes países en fechas relativamente recientes. Dichos cruces ponen en peligro la pureza de los materiales autóctonos que podría ser eventualmente desplazados e inclusive extinguidos si no se toman medidas extremas para su conservación. Al respecto, Soria (2002) indica que el cacao autóctono corre el riesgo de extinguirse debido a la hibridación ocurrida entre éste y otros genotipos especialmente de tipo Trinitario y Venezolano. En este sentido, uno de los primeros pasos para evitar que este fenómeno alcance niveles alarmantes es conocer en detalle las características morfológicas y moleculares que distinguen al CNB de otros materiales, tras lo cual se debería emprender una colecta minuciosa en todo el país ubicando en colección los materiales más notables.

Otra forma de asegurar la preservación de los materiales autóctonos es maximizar su uso añadiéndoles valor económico. En este sentido, la información colectada en esta investigación será de relevancia para definir las estrategias para explotar en la forma más eficiente este valioso recurso genético, ya sea a través de programas de mejoramiento genético o directamente en plantaciones comerciales. A continuación se discuten en detalle los resultados encontrados.

5.1 Caracterización morfológica del Cacao Nacional Boliviano.

Solamente dos características hicieron una distinción entre los genotipos silvestres. Estas fueron el largo y diámetro de semillas, las cuales se relacionan estrechamente con el tamaño de las semillas. Al respecto, Enríquez y Soria (1968) indican que los descriptores de semilla más importantes son el diámetro, el largo y el espesor de semillas. Por su parte, Fowler (1952) y Quiroz y Soria (1994) señalan que el carácter más discriminante para el cacao nacional es el “diámetro de semillas” que lo diferencia de otros grupos genéticos. Pound (1938) concluyó que el peso de semilla es el carácter más confiable para la descripción e identificación de clones de cacao, pero indica que dado que el tamaño de semilla es un carácter muy variable, se deben usar muestras grandes para su determinación (Pound 1932). Esto no fue posible en todos los casos en esta investigación debido a las condiciones particulares en que se realizó la misma. Un estudio más detallado podría ser realizado colectando muestras más grandes durante la época de máxima producción, la cual podría ser diferente para los genotipos silvestres que para los cultivados. A su vez, esto permitiría planificar mejor una estrategia de fermentación y secado de las semillas que permitiera profundizar el conocimiento sobre la calidad industrial de los materiales.

Los genotipos evaluados en condiciones cultivadas de la región de Alto Beni presentaron una mayor variación en su morfología de fruto y semilla que puede deberse a que estos materiales han estado expuestos a la hibridación con genotipos foráneos, lo cual puede producir un cambio importante en las características originales Petithugenin y Roche (1995).

La comparación de genotipos silvestres y cultivados, permitió identificar las variables morfológicas más discriminantes que fueron el número, diámetro y largo de las semillas, pero particularmente el “peso húmedo” de las mismas.

El análisis de agrupamientos permitió identificar el grado de similitud entre genotipos silvestres y cultivados. Se idéntico similitudes morfológicas entre genotipos silvestres y cultivados, que probablemente se deben al movimiento de material de siembra de un sitio a otro. Así por ejemplo, algunos materiales en cultivo de la región de Alto Beni mostraron una morfología de fruto y semilla similar a la de genotipos silvestres ubicados en sitios muy alejados tales como el Río Beni y el norte del departamento de La Paz. Esto sugiere que los genotipos de CNB en cultivo de la región de Alto Beni, procedan originalmente del norte de La Paz.

Las características morfológicas que más discriminan en la separación de grupos según el análisis de componentes principales fueron el número de semillas, el diámetro y largo de mazorca y el diámetro de semilla. Esto fue corroborado por el análisis discriminante canónico en donde las variables “diámetro de semilla” y “largo de mazorca” fueron las más discriminantes entre genotipos silvestres y cultivados. Se puede inferir entonces que las variables de fruto y semilla tienen asociación con los tipos de cacao y los lugares de procedencia. Así, las variables diámetro de semilla, largo de semilla, largo de mazorca y número de semilla diferencian al cacao silvestre, ubicados al norte de La Paz y causes del río Beni, lo cual concuerda con lo citado por Morales y Rodríguez (1987) que indican que el cacao colectado en los márgenes del río Beni presentan frutos amazónicos típicamente pequeños, con cáscara delgada y semillas pequeñas.

Los resultados del análisis de calidad, muestran que las muestras de cacao silvestre de Isla del oro, Tequeje y Santa Fé, tienen buenos parámetros de calidad buen sabor, medianamente amargo. Enríquez (2004) indica que para que el cacao califique como de primera calidad debe estar bien fermentado y seco esto le dará un sabor medianamente amargo y aroma agradable. En los resultados de este trabajo influyó considerablemente el tipo de beneficiado que se le hizo a las muestras enviadas para el análisis, debido a que se colectaron y beneficiaron en medio de las expediciones, en condiciones no adecuadas. Esto probablemente afectó la calidad de las mismas. Aún así, los resultados son alentadores al identificarse dentro de los cacaos silvestres y en cultivo, genotipos con gran potencial industrial debido a sus características particulares., tal es el caso de los genotipos en cultivo de Cocochi y Santa Fé, con parámetros de calidad similares al cacao Nacional de Ecuador.

5.2 Caracterización morfológica de Selecciones élites de Alto Beni.

La evaluación morfológica de 61 híbridos clonados, seleccionados por los productores y denominados selecciones elite del Alto Beni, permitió tipificar estos materiales. Se documentó parámetros morfológicos desconocidos hasta el momento. Esta información será importante para realizar futuros trabajos de mejoramiento genético local.

La evaluación de las características cuantitativas de fruto y semilla muestran diferencias significativas en todas las variables cuantitativas. Un resultado similar fue obtenido por Arguello y Mejía (2000) en Colombia al analizar selecciones élite, encontrando coeficientes de variación muy altos entre los materiales. Es importante mencionar que algunos de los genotipos estudiados en la presente investigación, presentaron pesos de frutos superiores a 1200 g. Así por ejemplo, el genotipo IV-18 alcanzó 2020 g/fruto. Esto se complementa con lo señalado por Marca (2007), quien encontró que este clon obtuvo el mayor índice de semilla (2,24 g). El peso de semillas secas en todas las selecciones élite estudiadas fue superior a 1,2 g/semilla, y el número de semillas en promedio fue de 43, lo que resalta el potencial de estos materiales para parámetros de rendimiento considerados por Toxopeus y Jacob (1970) como fundamentales.

5.3 Caracterización molecular del Cacao Nacional Boliviano.

La caracterización molecular del CNB y su afinidad con otros genotipos forasteros y trinitarios fue determinada usando la técnica de Secuencias Simple Repetidas SSR, o microsatélites, que resultó ser una herramienta eficiente para alcanzar este objetivo. Se obtuvo un ADN de buena calidad y pureza, aunque algunas muestras presentaban presencia de fenoles, debido a la oxidación de las hojas colectadas en condiciones silvestres difíciles. La concentración promedio de ADN obtenida por muestra fue de 38,4 ng/μl. Se utilizaron 15 microsatélites, eliminado la información obtenida con el microsatélite CIR40, pues no mostró bandas en varias muestras.

El polimorfismo detectado con todos los marcadores fue del 100%. El microsatélite que más bandas amplificó fue el CIR 37 con 22 bandas. En total se obtuvieron 184 bandas (alelos), dando en promedio 13 bandas por microsatélite, lo cual es más alto que lo reportado por Risterucci *et al.* (2000) con un promedio de 9,5 bandas polimórficas, pero menor a lo reportado por Montamayor

(2001), con un promedio de 15 bandas. La mayor información se obtuvo con los *primers* CIR1, CIR24, CIR7 y CIR18. La menor probabilidad de que dos individuos compartan el mismo alelo por *primer* fue encontrada en el primer CIR1, lo que indica que dicho primer mostró un alto grado de confianza en el análisis de diferencias genéticas. Estos resultados también muestran que los *primers* CIR6, CIR33, CIR37 tienen los menores valores de capacidad discriminativa y contenido de información polimórfica.

El análisis de grupos genéticos silvestres permitió identificar dos acervos de cacao silvestre, el primero y menos influenciado está en el norte del río Beni, genotipos de Isla del Oro, Paltal, Tequeje y Carmen del Emero, el segundo acervo conformado por genotipos del sur del río Beni (Cachichira y Copacabana) y del Norte de La Paz (San Silvestre, Tumupasa, Santa Fé, Macagua), (Figura 3) este último acervo con similitudes moleculares a los genotipos cultivados de la Región de Alto Beni (Covendo, San Miguel de Huachi, Cocochi, San José, Remolino, Mototoy y San Antonio) este resultado refuerza la hipótesis de que los ancestros de los genotipos de CNB del Alto Beni, según los resultados encontrados con la caracterización molecular provienen del segundo acervo (Sur del Río Beni y Norte de La Paz).

Los genotipos Bolivianos silvestres de las riveras del río Beni (Isla de Oro, Paltal, Tequeje, Carmen del Emero y San Marcos) son molecularmente similares. Se afilió al mismo grupo los genotipos ubicados en la Estación Experimental de Sapecho. Se deduce que, el cacao de siembra para esta parcela proviene de las causas del río Beni, hipótesis respaldada con lo citado por Morales y Rodríguez (1987) que indican que el cacao colectado para siembra de los bancos de germoplasma en la Estación de Sapecho y Estación la Jotha, proviene de zonas del trópico y sub trópico de La Paz y el Beni, aunque no especifica los lugares exactos de procedencia.

El cacao silvestre Boliviano es molecularmente diferente a los grupos genéticos Forasteros y Trinitarios estudiados. Se concluye que forma un acervo genético nuevo dentro de los cacaos Forasteros. Esto es consistente con el indicado por Enríquez (2004), quien menciona que cada lugar o río en la amazonia ha originado genotipos muy diversos de cacao. Aunque el origen exacto del CNB es desconocido, es posible suponer que procede de la parte sur de la amazonía brasileña, sin embargo, esta hipótesis no se pudo corroborar al no tener dentro del análisis muestras de genotipos de esta área, lo cual queda pendiente para otra investigación. Algunos autores han señalado desde hace más de 400 años la existencia de cacao en la cuenca del Río Beni. Las expediciones realizadas

por el capitán Peranures en los años 1538 - 1539, y de Juan Álvarez entre 1569 y 1570 en los ríos Mamore y Beni, reportan la existencia de mucho cacao en estas cuencas (Patiño, 2002). Este autor denomina a este material silvestre como “extractivo” por encontrarse diseminado en varias cuencas del Amazonas. Menciona también que para el año 1758 ya se tenía noticias de la existencia de cacao en toda la región del alto Orinoco.

El análisis de procrustes generalizado, generó información sobre el consenso entre características moleculares y morfológicas, del CNB, permitió explicar el 100 % de la variabilidad con ambos ejes. El consenso entre la configuración molecular y la morfológica fue de (70,8 %) indica que las variables morfológicas brindan una información similar, lo cual es válida con el uso de descriptores moleculares. Esto sugiere que el aislamiento geográfico ha producido variantes genéticas en Bolivia que se reflejan en fenotipos que se puede diferenciar al menos en algunas pocas características morfológicas. La introducción y mezcla de materiales foráneos ha complicado el panorama al producirse variantes morfológicas producto de la recombinación. Los genotipos que tuvieron mayor consenso son los ubicados en Mototoy (0,19), Carmen del Emero (0,16) Tequeje (0,16) esto significa que dichos lugares tuvieron la mayor coincidencia en el análisis comparativo a caracteres morfológicos y moleculares en cambio el menor consenso fue en Macagua con 0,01 los análisis moleculares y morfológicos manifestaron menores coincidencias. Este análisis fue utilizado por Demey *et al.* (2004) para relacionar información molecular, morfológica y bioquímica en una colección de (*Manihot esculenta*), reportando un consenso de 66,5 % que consideran como una correlación significativa entre la información molecular y morfológica.

6 CONCLUSIONES

Este estudio permitió describir las características morfológicas cuantitativas y cualitativas de fruto y semilla del cacao nacional Boliviano. Además se identificó las variables que mas discriminan entre genotipos silvestres de cultivados. Se valorizó a este tipo de CNB diferenciado, las características particulares.

La variabilidad genética del cacao silvestre es alta con los parámetros evaluados. Se identificó dos acervos el primero al norte del río Beni y el segundo sur del río Beni juntamente con los genotipos del norte de La Paz, con características morfológicas similares pero molecularmente diferentes, las características morfológicas que los distinguen son “diámetro y largo de semilla”, las formas de mazorca cundeamor y angoleta son las que predominan, la forma del ápice obtuso y agudo son las relevantes, la constricción basal 49 % ausente, la rugosidad del mesocarpo el 63 % intermedia, el color de semilla 100% púrpura.

Para el grupo de cacao en cultivo la variabilidad entre los componentes es media, las variables que varían son; peso, diámetro de fruto, largo de semilla y diámetro de semilla las formas angoleta y cundeamor son las que predominan, la forma del ápice obtuso y agudo son las de mayor presencia, la constricción basal escasa en 59,8 %, la rugosidad del mesocarpo 47 % intermedia y 32 % áspera, el color de mazorca 100 % verde y color de semilla 100 % púrpura.

De la comparación morfológica de los genotipos silvestre con los cultivados, seis variables presentan diferencias significativas, solo las variables diámetro y largo de mazorca son similares. Otra variable importante a destacar es el peso húmedo con un 36 % de CV. Las variables más importantes para discriminar los genotipos silvestres de los cultivados son el diámetro de semilla y largo de la mazorca.

Del análisis de agrupamientos morfológicos existen características similares entre genotipos silvestres de las riberas del río Beni con los genotipos cultivados de Remolino de la región de Alto Beni, mientras los demás genotipos cultivados son similares a los genotipos silvestres del Norte de La Paz. Se concluye que los genotipos CBN cultivados de la región de Alto, tienen sus ancestros en la región Norte de La Paz y Sur del río Beni, esto se corroboró con los resultados de la caracterización molecular y se respalda con las observaciones hechas en los sitios de colecta.

El estudio molecular con 14 primer específicos para análisis de diversidad genética y mediante la técnica de SSR microsatélites, permitió ubicar al cacao nacional boliviano silvestre en otro grupo diferente al Forastero y Trinitario, no existe una clasificación descrita para este material diferenciado.

Otra agrupación molecular importante, son los genotipos cultivados más alejados ubicados al extremo Norte del río Beni (Isla de Oro, Paltal, Tequeje, Carmen del Emero y San Marcos), presentan características moleculares similares a los genotipos de Estación Experimental de Sapecho Alto Beni, donde no existe información exacta de la procedencia de semilla de estos materiales.

Todos los marcadores resultaron ser polimórficos 100 % muy informativos para el análisis de diversidad genética, el *primer* que mas alelos identifico fue el CIR37, y los que mas información brindaron fueron el CIR1, CIR24, CIR7, y CIR18, por lo que la técnica SSR microsatélites resulto ser optima.

Los resultados del análisis de calidad realizado por la Compañía Guittard de los Estados Unidos, (Anexo 8) muestran que el cacao silvestre ubicado en; Isla del oro, Tequeje y Santa Fé, presentan buenas características, el sabor es medianamente amargo y aroma agradable tienen un buen perfil de sabor. Las muestras de cacao en cultivo de Cocochi y San José presentaron parámetros de calidad muy buenos, que se asemejan al cacao Nacional del Ecuador.

Se tipifico morfológicamente 61 selecciones élites híbridas promisorias de la zona de Alto Beni, todas las variables estudiadas presentaron diferencia significativas, las características que predominan son; forma de mazorca angoleta, de forma puntiaguda, constricción basal escasa, rugosidad del mesocarpo áspera, el color de mazorca frecuente es verde (78%) el color de semilla en su mayoría son de color púrpura (98,4 %).

7 RECOMENDACIONES

Realizar estudios similares incluyendo mayor número de muestras testigo que representen a los complejos, forasteros silvestres de Brasil e incluir al cacao Nacional del Ecuador, para tener un contexto más amplio, sobre la diversidad genética del cacao Nacional Boliviano.

Estudiar ampliamente el CNB, que abarque las cuencas de Itenes, Ichilo, Mamoré, Baures, sitios reportados donde se conoce la existencia de cacao en condiciones silvestres.

Diseñar un plan de conservación genética de los rodales existentes en el Norte de La Paz y riberas del río Beni, este material silvestre tiene varias particularidades no evaluadas científicamente, las cuales pueden servir para realizar futuros trabajos de mejoramiento, aprovechando características de interés.

Estudiar en el cacao silvestre, las características morfológicas de flor, hoja, semilla (Beneficiado) periodos de fructificación, se observó que en el mes de Abril sigue existiendo cacao silvestre, raro para este tipo de cacao, según literatura.

Evaluar la reacción a la Escoba de bruja (*Moniliophthora perniciosa*) en condiciones de laboratorio, mediante métodos de inoculación artificial, en el cacao nacional cultivado y tener documentado aspectos de tolerancia a esta enfermedad que sirvan para futuros trabajos de investigación.

Realizar estudios de segregación y flujo de genes del cacao en selecciones élites de Alto Beni, este cacao por ser de buenas características productivas puede sufrir modificaciones drásticas en la descendencia por semilla. Es importante ya que en la actualidad se está distribuyendo este material a los productores en la zona de Alto Beni.

Realizar un estudio de caracterización morfológica exhaustivo en las selecciones élites que incluya la evaluación de mayor número de frutos y semilla, para tener la confianza de los índices de mazorca y semilla, para recomendar los genotipos más promisorios a los productores.

8 BIBLIOGRAFÍA

- Allen, J; Lass, R. 1983. London cocoa trade amazon. Project final report. Phase 1. Cocoa Growers Bulletin. England. 59 p.
- Ángel. F. 2000. Marcadores moleculares usos y aplicaciones. *In curso AFLPs no reactivo*. Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas – SINCHI – s/p.
- Arguello, O; Mejia L; Palencia C. 2000. Origen y descripción botánica. *In Tecnología para el mejoramiento de sistemas de producción de cacao*, Corpoica, Bucaramanga, Colombia. p 10 – 12.
- Arguello, O; Mejia L. 2000. Variabilidad morfoagronómica de 59 árboles de cacao (*Theobroma cacao L.*) en Santander. *In Tecnología para el mejoramiento de sistemas de producción de cacao*, Corpoica, Bucaramanga, Colombia. p 50 – 54.
- Bartley, B.G.D. 2005. The genetic Diversity of cacao and its utilization. GABI publishing. US. p. 44 -167
- Bartley, B.G.D. 2000. An Explanation of the Meaning of the Term and its relationship to the Introductions from Ecuador in 1937. *Ingenic Newsletter* (5):10-15
- Butler, D; Umaharan, P. 2004. Working with cocoa germplasm. *In Flood, J; Murphy, R. eds. cocoa futures; a source book of som important issues facing the cocoa industry*. Chinchiná Colombia, CABI-FEDERA CAFÉ, US. p. 55 - 64.
- Braudeau, J. 1970. El cacao. Colección Agricultura Tropical. Editorial Blume. Barcelona ES. 304 p.
- Braudeau, J. 1975. El cacao. Trad. A.M Hernández. Técnicas agrícolas y producciones tropicales. Primera reimpression. Editorial Blume. Barcelona, ES. 283 p.
- Caetano-Anolles, G; Gresshoff, P.M. (eds) 1998. DNA markers: protocols, applications, and overviews. New York, US. p.173-186.
- Cerda, R. 2004. Diagnóstico de enfermedades fungosas en genotipos cultivados de cacao (*Theobroma cacao L.*) en floración y fructificación en localidades productoras de Alto Beni, Bolivia. Tesis de Ingeniero Agrónomo. La Paz, BO. Universidad Mayor de San Andrés. 96 p.
- Cortés, P. 1997. Algunos ejemplos del control gubernamental sobre los jesuitas tras la expulsión. Alincate, Mestre Sanchos, A-Gimenes Lopez, E, crónica Guaraya, Yotau 10 de junio de 1917. Cochabamba, BO. p 155.
- Cornide, M.T. 1998. Uso de marcadores moleculares en la genética y la selección de las plantas. CNIC, La Habana, CU. 86 p.

- Davies, P. 1986. Sistemas alternativos de producción para cacao en la zona norte de colonización: un análisis económico exploratorio. CIAT (Centro de Investigación Agrícola Tropical), documento Trabajo no. 55. Santa Cruz, BO. 42 p.
- Davierwala, A; Ramakrishna, W; Chowdari, V; Ranjercar, P; Gupta, V. 2001. Potencial of (GATA)n microsatellites from rice for inter-variability studies. BMC Evolutionary Biology 1:7.
- Dejean, M. 1984. Floración del cacao. Boletín informativo del cacao, San José CR 1(3): 1-3.
- Demey, J; Zambrano, A; Fuenmayor, F; Segovia, V. 2004. Generalized procrustes analysis (GPA) to study the relationships between biochemical, molecular and morphological characterization in a cassava collection. XXII International Biometric Conference Australia, 11-23 de Julio 2004.
- End, M; Wadsworth, R; Hadley, P 1992 International cocoa germplasm databases. Departments of Botany and Horticulture, University of Reading, UK. 355p.
- Engels, JMM 1983. A systemic description of cacao clones 1. The discriminative value of quantitative characteristics. Euphytica 32:377-385.
- Engels, J; Bartley, B; Enríquez, J. 1980. Cacao descriptors, their status and modus operandi. Revista Interamericana de Cooperación Agrícola. Turrialba, CR. 30 (2): p. 209 – 218.
- Enríquez, G. 2004 Cacao orgánico, guía para productores ecuatorianos. Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias. Manual 54. Quito EC.360p.
- Enríquez, G. 1991 Descripción y evaluación de los recursos genéticos. In Técnicas para el manejo y uso de los recursos genéticos vegetales. Castillo, R. Estrella, J. Tapia, C. eds. Editorial Porvenir. Quito EC. p. 116 – 160.
- Enríquez, G. 1966. Selección y estudio de los caracteres de la flor, la hoja y la mazorca, útiles para la identificación y descripción de cultivares de cacao. IICA (Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas, CR) OEA, CATIE, Turrialba CR. p. 64-71.
- Enriquez, G; Soria, J. 1968. The variability of certain bean characteristics of cacao (*Theobroma cacao* L). Euphytica, 17: 114-120.
- Fowler, R. 1952. Características del cacao Nacional. Turrialba, CR. 2(4): 161-166.
- Hardy, F. 1969. Manual del cacao. IICA (Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas). Turrialba, CR. 362 p.
- Hidalgo, R. 2003. Variabilidad genética y caracterización de especies vegetales. In Análisis estadístico de datos de caracterización morfológica de recursos filogenéticos. (en línea). Franco T, Hidalgo R. eds. Boletín técnico no 8, IPGRI Cali, CO. Consultado 28 ago. 2007. disponible en <http://www.biodiversityinternational.org/publications/pdf/894.pdf> p 2-26.

- IBPGR (Internacional Board for Plant Genetic Resources) 1981. Genetic resources of cocoa Roma, IT. 25.
- Infostat, 2007. Infostat profesional, programa estadístico versión 2007. Córdoba AR. Universidad Nacional de Córdoba.
- IPGRI. (International Plant Genetic Resources Institute) 2000. Working procedures for cocoa germplasm evaluation and selection. Proceedings of the CFC/ICCO/IPGRI project Workshop 1998 Montpellier, FR. Eds Eskes, AB; Engels, JMM; Lass, RA. 176 p.
- July, W. 2002. Comportamiento de estacas de tres variedades de cacao (*Theobroma cacao L.*) a tres tratamientos de fitohormonas en la región de Alto Beni. Tesis Ingeniero Agrónomo. UMSA, La Paz BO 98 p.
- Karp, A; Kresovich, S; Bhat, K; Ayad, W; Hodgkin, T. 1997. Molecular tools in plant genetic resources conservation: a guide to the technologies. IPGRI Technical Bulletin no.2. International Plant Genetic Resources Institute, Rome Italy.
- Lebeda, J; Jendruleck, R. 1987. Herramientas para el análisis multivariado. English ed. Washington D.C. p. 146-152.
- Loor, R; Amores, F. 2003. Comparación de los niveles de homocigosis y heterocigosis entre cacaos (*Theobroma cacao L.*) del genotipo nacional y otros existentes en Ecuador mediante el uso del marcador molecular denominado microsatélite (SSRS). In Copal 14 International Cocoa Research Conference Ghana v.1, p. 179-187.
- López, Y. E. 1999. Caracterización morfológica y molecular de genotipos silvestres de *Quassia amara L.* ex Blom de Centroamérica. Tesis Mag. Sc. Turrialba, CR, CATIE. 13-15.
- Lowe, A.J.; Gillies, A.C.M.; Wilson, J.; Dawson, I.K. 2004. Conservation genetics of bush mango from central/west Africa: implications from random amplified polymorphic DNA analysis. *Molecular Ecology* 9(7):831.
- Marca, J. 2007. Validación de 15 selecciones locales de cacao (*Theobroma cacao L.*) por su alto valor genético en la zona de Alto Beni, Bolivia. Tesis de Técnico Superior. Cochabamba, BO. Universidad Mayor de San Simón.
- Martínez, Wilches O. 1995. Métodos estadísticos multivariados en biología molecular y su aplicación en investigación agrícola. *Agronomía Colombiana*. 12 (1):66-71.
- Milz, J. 1990. Cacao amazónico: posibilidades y perspectivas de producción y comercialización. Servicio de cooperación técnica y social alemana. BO. p. 61-65.

- Miranda, M; Somarriba, E. 2005. Evaluación agronómica de las plantaciones de cacao injertado de productores de la Central de Cooperativas El Ceibo, Alto Beni, Bolivia. *In* Agroforestería en las Américas no.43-44: 62-65.
- Motamayor, JC. 2001. Etude de la diversité génétique et de la domestication des cacaoyers du groupe criollo (*Theobroma cacao* L), á l'aide de marqueurs moléculaires. These Le Grade de Docteur en Sciences de L' Université Paris XI Orsay. p.91-93.
- Motamayor, JC; Risterucci, AM; López, PA; Ortiz, CF; Moreno, A; Lanaud, C. 2002. Cacao domesticación. *In* The origin of the cacao cultivated by the Mayas. *Heredity* 89:380-386.
- Morales, D; Rodriguez, G 1987. Informe del viaje de exploración y colección de recursos genéticos del cacao (*Theobroma cacao*) y frutas silvestres tropicales de Bolivia. Ministerio de Asuntos Campesinos. Instituto Boliviano de Tecnología Agropecuaria IBTA (IBPGR 87/141) La Paz, BO. 9p.
- 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.
- Newton, C; Gram., A. 1995. PCR Bios scientific publishers. Oxford. UK. 161p.
- Ochse, J; Soule, M; Dijkman, M; Wehlburg, C. 1974. Cultivo y mejoramiento de plantas tropicales y subtropicales. Editorial Limusa. Primera ed. MX. 2 v. p. 912 – 956.
- Ostendorf, FW. 1965. Identifying characters for cacao clones crop *In* Reuniao do Comité Técnico Interamericano do Cacau, VI Salvador, Bahía, BR. p. 89 – 110.
- Patiño, M. 2002. Historia y dispersión de los frutales nativos del Neotropico. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, CO. p. 328- 391.
- Pérez, R. 1957. El cacao. La Paz, BO. Ministerio de Agricultura. p. 1 – 5 (Boletín Técnico).
- Pettuguenin, P; Roche,G.1995. Equateur: la filière cacao, bilan et perspectives *In* Plantations, Recherche développement. 2(4): 15-21.
- Phillips, W. 1998. Biología molecular y marcadores moleculares en la agricultura. *In* Memoria II Congreso nacional de estudiantes del sector agropecuario costarricense. IICA-EARTH-CATIE. p 77-87.
- Phillips, W; Enríquez GA. 1988. Catálogo de cultivares de cacao. CATIE, Turrialba, Costa Rica. Programa de Mejoramiento de cultivos tropicales. Oficina Nacional de Semillas. 1988 (Serie Técnica, Boletín Técnico 18-60 p).
- Phillips, W; Rodríguez H; Fritz, P. 1995a. Cacao y marcadores de ADN en el CATIE. *In* Simposio CIRAD/CATIE mejoramiento genético y desarrollo de los cultivos tropicales (CATIE, Turrialba, CR. 20 al 29 nov. 1995) p. 24- 25.

- Phillips, W.; Rodríguez, H.; Fritz P. 1995b. Marcadores de ADN: Teoría, aplicaciones y protocolos de trabajo con ejemplos de investigaciones en cacao (*Theobroma cacao*). Serie técnica. Informe técnico # 252. CATIE. Turrialba, CR. 183 p.
- Pound, FJ. 1932. The genetic constitution of cacao crops 1. Pp 9 -29 *In* Annual report of cacao Research 1931 – 1945. Imperial College of Tropical Agriculture Trinidad, TT.
- Pound, FJ. 1938. Cacao and Witches broom disease (*Marasmius perniciosus*) of South America with notes on other species of *Theobroma*. Yuilles Printery. Port-of-Spain, Trinidad and Tobago. Reprinted 1982 *In* Arch. Cocoa Res. 1:20-27.
- Powell, W. 1992. Plant, genomes, gene marked and linkage maps. *In* Moss, J. P. ed Biotechnology and crop improvement in Asia. Patancheru, India, International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics. p.297-322.
- Quiroz, J; Soria, J. 1994. Caracterización fenotípica del cacao Nacional del Ecuador. Quito EC. INIAP, Estación Experimental Pichilingue. Boletín Técnico no. 74.
- Rao, R; Riley, K. 1994. The use of biotechnology for conservation and utilization of plant genetic resources. *Plant Genetic Resources Newsletter* 97: 3-19
- Risterucci, A.M., Esques, B; Fargeas, D; Montamayor, J,C; Lanaud, C. 2000. Use of microsatellite markers for germplasm identify analysis in cocoa. *In* Proceedings of the international workshop on new technologies and cocoa breeding. INGENIC. Kota Kinabalu, Sabah, MY. p. 12 – 22.
- Sánchez, A. 1983. Cultivos de plantación. Manuales para la producción agropecuaria, área producción vegetal. Editorial Trillas, S.A. Segunda Reimpresión MX. p. 11 – 24.
- Somarriba, E; Trujillo, L. 2005. El Proyecto “Modernización de la cacaocultura orgánica del Alto Beni, Bolivia”. *In* Agroforestería en las Américas no.43-44: 6-13.
- Soria, VJ. 1966. Principales variedades de cacao cultivadas en América Tropical. Turrialba CR v.16 (3): 261-265.
- Soria, VJ. 2002. Breve historia del cultivo de cacao en el Ecuador. Inicios del cultivo. p. 1 – 14.
- Toxopeus, H; Jacob, V. 1970. Studies on the number of beans per pod. *In* Annual Report 1968-1969. Cocoa Research Institute of Nigeria, Ibadan, NG, p 105.
- Valverde, M; Paredes, O. 1996. El uso de marcadores moleculares en el estudio de la biodiversidad. El caso de los hongos. *Ciencia y Desarrollo* 22(128). p 29-37.
- Villegas, R; Astorga, C. 2005. Caracterización morfológica del cacao nacional boliviano, Alto Beni, BO. *In* Agroforestería en las Américas no.43-44: 81-85.

- Villegas, R. P. 2004. Caracterización morfológica del cacao nacional (*Theobroma cacao L.*) cultivado en la zona del Alto Beni, Bolivia. Tesis Ingeniero Agrónomo, Facultad de Agronomía, Universidad Mayor de San Andrés, La Paz, BO. 98 p.
- Ward, J.M. 1963. Hierarchical grouping to optimize an objective function. *Journal of the American Statistical Association* US 58: 236 – 244.
- Wood, G.A.R. 1982. Trad. Ambrosio, A.M., Cacao. Compañía Editorial Continental S.A de C.V. ed. en Español de la 3 ed. en Inglés, MX. 368 p.
- Zeballos, H; Terrazas, E. 1970. El cultivo de cacao en el Alto Beni. Instituto nacional de colonización. Boletín de divulgación técnica no 1. La Paz, BO. 57 p.

ANEXOS

Anexo 1

Ubicación geográfica de los sitios de colecta en Bolivia de cacao silvestre y cultivado

Departamento	Comunidad/Sitio	Código	Tipo	Nombre Local	Coordenadas		Altitud (msnm)
					UTM	19 L	
Beni	San Silvestre	TC-1541	Cacao Silvestre	Chocolate	8446911	625027	185
Beni	San Silvestre	TC-1542	Cacao Silvestre	Chocolate	8446652	625055	187
Beni	San Silvestre	TC-1543	Cacao Silvestre	Chocolate	8446656	625055	185
La Paz	Tumupasa	TC-1544	Cacao Silvestre	Chocolate	8441852	619781	194
La Paz	Tumupasa	TC-1545	Cacao Silvestre	Chocolate	8435894	619793	190
La Paz	Tumupasa	TC-1546	Cacao Silvestre	Chocolate	8441727	619872	193
La Paz	Tumupasa	TC-1547	Cacao Silvestre	Chocolate	8441693	619752	194
La Paz	Tumupasa	TC-1548	Cacao Silvestre	Chocolate	8441647	619891	194
Beni	Macagua	TC-1549	Cacao Silvestre	Chocolate	8468428	591652	350
Beni	Macagua	TC-1550	Cacao Silvestre	Chocolate	8468482	591612	360
Beni	Macagua	TC-1551	Cacao Silvestre	Chocolate	8468406	591532	300
Beni	Macagua	TC-1552	Cacao Silvestre	Chocolate	8468520	591687	346
Beni	Macagua	TC-1553	Cacao Silvestre	Chocolate	8469170	591614	397
La Paz	Santa Fé	TC-1554	Cacao Silvestre	Chocolate	8481662	584917	215
La Paz	Santa Fé	TC-1555	Cacao Silvestre	Chocolate	8481682	584911	238
La Paz	Est. Exp. Sapecho	TC-1556	Cacao en cultivo	Criollo	8278592	680563	414
La Paz	Est. Exp. Sapecho	TC-1557	Cacao en cultivo	Criollo	8278591	680565	413
La Paz	Est. Exp. Sapecho	TC-1558	Cacao en cultivo	Criollo	8278527	680518	421
La Paz	Est. Exp. Sapecho	TC-1559	Cacao en cultivo	Criollo	8278570	680496	391
La Paz	Est. Exp. Sapecho	TC-1560	Cacao en cultivo	Criollo	8278546	680517	431
La Paz	Est. Exp. Sapecho	TC-1561	Cacao en cultivo	Criollo	8278611	680514	411
La Paz	Est. Exp. Sapecho	TC-1562	Cacao en cultivo	Criollo	8278588	680508	384
La Paz	Est. Exp. Sapecho	TC-1563	Cacao en cultivo	Criollo	8278587	680507	398
La Paz	Est. Exp. Sapecho	TC-1564	Cacao en cultivo	Criollo	8278585	680516	408
La Paz	Est. Exp. Sapecho	TC-1565	Cacao en cultivo	Criollo	8278573	680513	412
La Paz	Est. Exp. Sapecho	TC-1566	Cacao en cultivo	Criollo	8278565	680515	413
La Paz	Est. Exp. Sapecho	TC-1567	Cacao en cultivo	Criollo	8278570	680511	413
La Paz	Est. Exp. Sapecho	TC-1568	Cacao en cultivo	Criollo	8278546	680520	411
La Paz	Est. Exp. Sapecho	TC-1569	Cacao en cultivo	Criollo	8278568	680518	412
La Paz	Est. Exp. Sapecho	TC-1570	Cacao en cultivo	Criollo	8278558	680524	415
La Paz	Est. Exp. Sapecho	TC-1571	Cacao en cultivo	Criollo	8278559	680525	414
La Paz	Est. Exp. Sapecho	TC-1572	Cacao en cultivo	Criollo	8278563	680517	422
La Paz	Est. Exp. Sapecho	TC-1573	Cacao en cultivo	Criollo	8278588	680516	417
La Paz	Est. Exp. Sapecho	TC-1574	Cacao en cultivo	Criollo	8278590	680518	414
La Paz	Est. Exp. Sapecho	TC-1575	Cacao en cultivo	Criollo	8278576	680526	419
La Paz	Est. Exp. Sapecho	TC-1576	Cacao en cultivo	Criollo	8278572	680510	420
La Paz	Est. Exp. Sapecho	TC-1577	Cacao en cultivo	Criollo	8278561	680532	412
La Paz	Est. Exp. Sapecho	TC-1578	Cacao en cultivo	Criollo	8278561	680534	413
La Paz	Est. Exp. Sapecho	TC-1579	Cacao en cultivo	Criollo	8278559	680517	414
La Paz	Est. Exp. Sapecho	TC-1580	Cacao en cultivo	Criollo	8278557	680526	407

Continuación...Anexo 1

Departamento	Comunidad/Sitio	Código	Tipo	Nombre Local	Coordenadas		Altitud (msnm)
					UTM	19 L	
La Paz	Est. Exp. Sapecho	TC-1581	Cacao en cultivo	Criollo	8278568	680533	409
La Paz	Est. Exp. Sapecho	TC-1582	Cacao en cultivo	Criollo	8278560	680534	413
La Paz	Est. Exp. Sapecho	TC-1583	Cacao en cultivo	Criollo	8278547	680531	429
La Paz	Est. Exp. Sapecho	TC-1584	Cacao en cultivo	Criollo	8278557	680529	406
La Paz	Est. Exp. Sapecho	TC-1585	Cacao en cultivo	Criollo	8278565	680532	406
La Paz	Est. Exp. Sapecho	TC-1586	Cacao en cultivo	Criollo	8278541	680520	406
La Paz	Est. Exp. Sapecho	TC-1587	Cacao en cultivo	Criollo	8278578	680514	406
La Paz	Est. Exp. Sapecho	TC-1588	Cacao en cultivo	Criollo	8278581	680535	409
La Paz	Est. Exp. Sapecho	TC-1589	Cacao en cultivo	Criollo	8278570	680516	419
La Paz	Est. Exp. Sapecho	TC-1590	Cacao en cultivo	Criollo	8278593	680527	413
La Paz	Est. Exp. Sapecho	TC-1591	Cacao en cultivo	Criollo	8278566	680537	406
La Paz	Est. Exp. Sapecho	TC-1592	Cacao en cultivo	Criollo	8278590	680536	417
La Paz	Est. Exp. Sapecho	TC-1593	Cacao en cultivo	Criollo	8278561	680536	414
La Paz	Est. Exp. Sapecho	TC-1594	Cacao en cultivo	Criollo	8278561	680537	412
La Paz	Est. Exp. Sapecho	TC-1595	Cacao en cultivo	Criollo	8278566	680540	401
La Paz	Est. Exp. Sapecho	TC-1596	Cacao en cultivo	Criollo	8278553	680531	425
La Paz	Est. Exp. Sapecho	TC-1597	Cacao en cultivo	Criollo	8278567	680534	407
La Paz	Est. Exp. Sapecho	TC-1598	Cacao en cultivo	Criollo	8278570	699863	410
La Paz	Est. Exp. Sapecho	TC-1599	Cacao en cultivo	Criollo	8278574	680537	421
La Paz	Est. Exp. Sapecho	TC-1600	Cacao en cultivo	Criollo	8278574	680535	419
La Paz	Est. Exp. Sapecho	TC-1601	Cacao en cultivo	Criollo	8278595	680533	416
La Paz	Est. Exp. Sapecho	TC-1602	Cacao en cultivo	Criollo	8278596	680536	419
La Paz	Est. Exp. Sapecho	TC-1603	Cacao en cultivo	Criollo	8278593	680544	416
La Paz	Est. Exp. Sapecho	TC-1604	Cacao en cultivo	Criollo	8278600	680543	418
La Paz	Est. Exp. Sapecho	TC-1605	Cacao en cultivo	Criollo	8278598	680544	423
La Paz	Est. Exp. Sapecho	TC-1606	Cacao en cultivo	Criollo	8278585	680530	418
La Paz	Est. Exp. Sapecho	TC-1607	Cacao en cultivo	Criollo	8278595	680533	417
La Paz	Est. Exp. Sapecho	TC-1608	Cacao en cultivo	Criollo	8278590	680544	413
La Paz	Est. Exp. Sapecho	TC-1609	Cacao en cultivo	Criollo	8278571	680551	417
La Paz	Est. Exp. Sapecho	TC-1610	Cacao en cultivo	Criollo	8278573	680549	421
La Paz	Est. Exp. Sapecho	TC-1611	Cacao en cultivo	Criollo	8278572	680539	414
La Paz	Est. Exp. Sapecho	TC-1612	Cacao en cultivo	Criollo	8278567	680549	419
La Paz	Est. Exp. Sapecho	TC-1613	Cacao en cultivo	Criollo	8278570	680546	428
La Paz	Est. Exp. Sapecho	TC-1614	Cacao en cultivo	Criollo	8278564	680548	412
La Paz	Est. Exp. Sapecho	TC-1615	Cacao en cultivo	Criollo	8278588	680280	400
La Paz	Est. Exp. Sapecho	TC-1616	Cacao en cultivo	Criollo	8278559	680638	417
La Paz	Est. Exp. Sapecho	TC-1617	Cacao en cultivo	Criollo	8278551	680567	420
Beni	San Marcos	TC-1618	Cacao silvestre	Criollo	8471966	661307	178
Beni	San Marcos	TC-1619	Cacao silvestre	Criollo	8471879	659300	180
Beni	San Marcos	TC-1620	Cacao silvestre	Criollo	8471945	659299	179
Beni	San Marcos	TC-1621	Cacao silvestre	Criollo	8471751	659309	180
Beni	San Marcos	TC-1623	Cacao silvestre	Criollo	8471890	659208	181
Beni	San Marcos	TC-1624	Cacao silvestre	Criollo	8471678	659320	185
Beni	San Marcos	TC-1625	Cacao silvestre	Criollo	8471735	659313	175
La Paz	Carmen Emero	TC-1626	Cacao silvestre	Chocolate	8516708	675539	163
La Paz	Carmen Emero	TC-1627	Cacao silvestre	Chocolate	8516608	675345	163

Continuación Anexo 1

Departamento	Comunidad/Sitio	Código	Tipo	Nombre Local	Coordenadas		Altitud (msnm)
					UTM	19 L	
La Paz	Carmen Emero	TC-1628	Cacao silvestre	Chocolate	8516890	675367	160
La Paz	Carmen Emero	TC-1629	Cacao silvestre	Chocolate	8516670	675548	161
La Paz	Carmen Emero	TC-1630	Cacao silvestre	Chocolate	8516799	675516	164
La Paz	Carmen Emero	TC-1631	Cacao silvestre	Chocolate	8516415	675501	159
La Paz	Carmen Emero	TC-1632	Cacao silvestre	Chocolate	8516567	675524	160
Beni	Copacabana	TC-1633	Cacao silvestre	Chocolate	8440124	656804	184
Beni	Cacahichira	TC-1634	Cacao silvestre	Chocolate	8457286	659227	150
Beni	Cacahichira	TC-1635	Cacao silvestre	Chocolate	8457248	659121	177
Beni	Cacahichira	TC-1636	Cacao silvestre	Chocolate	8457328	659254	187
Beni	Tequeje	TC-1637	Cacao silvestre	Chocolate	8511378	673955	181
Beni	Tequeje	TC-1638	Cacao silvestre	Chocolate	8511332	673929	184
Beni	Tequeje	TC-1639	Cacao silvestre	Chocolate	8511212	673632	174
Beni	Tequeje	TC-1640	Cacao silvestre	Chocolate	8511132	673716	180
Beni	Tequeje	TC-1641	Cacao silvestre	Chocolate	8511132	673719	185
Beni	Tequeje	TC-1642	Cacao silvestre	Chocolate	8511300	673890	179
Beni	Paltal	TC-1643	Cacao silvestre	Chocolate	8527290	682131	163
Beni	Paltal	TC-1644	Cacao silvestre	Chocolate	8527724	681651	148
Beni	Paltal	TC-1645	Cacao silvestre	Chocolate	8527624	681752	124
Beni	Paltal	TC-1646	Cacao silvestre	Chocolate	8527626	681732	170
Beni	Paltal	TC-1647	Cacao silvestre	Chocolate	8527472	681857	148
Beni	Paltal	TC-1648	Cacao silvestre	Chocolate	8527242	681965	156
Beni	Paltal	TC-1649	Cacao silvestre	Chocolate	8521310	676826	139
Beni	Isla del Oro	TC-1650	Cacao silvestre	Chocolate	8521452	678038	122
Beni	Isla del Oro	TC-1651	Cacao silvestre	Chocolate	8520312	677859	161
Beni	Isla del Oro	TC-1652	Cacao silvestre	Chocolate	8520898	676425	168
Beni	Isla del Oro	TC-1653	Cacao silvestre	Chocolate	8520580	677032	159
Beni	Isla del Oro	TC-1654	Cacao silvestre	Chocolate	8522072	678154	146
Beni	Isla del Oro	TC-1655	Cacao silvestre	Chocolate	8522904	678113	150
Beni	Isla del Oro	TC-1656	Cacao silvestre	Chocolate	8523678	676243	155
Beni	Isla del Oro	TC-1657	Cacao silvestre	Chocolate	8516708	675540	163
Beni	Isla del Oro	TC-1658	Cacao silvestre	Chocolate	8524754	675600	164
Beni	Isla del Oro	TC-1659	Cacao silvestre	Chocolate	8524546	676345	164
Beni	San Silvestre	TC-1660	Cacao silvestre	Chocolate	8446648	625112	185
La Paz	Covendo	TC-1661	Cacao en cultivo	Criollo	8254630	715296	524
La Paz	Covendo	TC-1662	Cacao Silvestre	Criollo	8254571	715338	482
La Paz	Covendo	TC-1663	Cacao Silvestre	Criollo	8354566	715342	482
La Paz	Covendo	TC-1664	Cacao Silvestre	Criollo	8254543	715341	489
La Paz	Covendo	TC-1665	Cacao Silvestre	Criollo	8255373	718578	497
La Paz	Covendo	TC-1666	Cacao Silvestre	Criollo	8255360	718572	528
La Paz	Covendo	TC-1667	Cacao Silvestre	Criollo	8255374	718598	539
La Paz	Covendo	TC-1668	Cacao Silvestre	Criollo	8255372	718600	538
La Paz	Covendo	TC-1669	Cacao Silvestre	Criollo	8355489	718590	544
La Paz	Covendo	TC-1670	Cacao Silvestre	Criollo	8255484	718596	542
La Paz	Covendo	TC-1671	Cacao Silvestre	Criollo	8255503	718605	523
La Paz	Covendo	TC-1672	Cacao Silvestre	Criollo	8255471	718582	529

Continuación...Anexo 1

Departamento	Comunidad/Sitio	Código	Tipo	Nombre Local	Coordenadas		Altitud (msnm)
					UTM	19 L	
La Paz	Covendo	TC-1673	Cacao Silvestre	Criollo	8255478	718587	521
La Paz	Covendo	TC-1674	Cacao Silvestre	Criollo	8255475	718609	533
La Paz	Covendo	TC-1675	Cacao Silvestre	Criollo	8255471	718609	543
La Paz	Covendo	TC-1676	Cacao Silvestre	Criollo	8255466	718611	544
La Paz	Covendo	TC-1677	Cacao Silvestre	Criollo	8255476	718629	515
La Paz	Covendo	TC-1678	Cacao Silvestre	Criollo	8254625	715258	376
La Paz	Remolino	TC-1679	Cacao en cultivo	Nacional	8263203	703316	491
La Paz	Cocochi	TC-1680	Cacao en cultivo	Criollo	8258146	710140	483
La Paz	Cocochi	TC-1681	Cacao en cultivo	Criollo	8258127	710090	446
La Paz	Cocochi	TC-1682	Cacao en cultivo	Criollo	8258095	710123	488
La Paz	Cocochi	TC-1683	Cacao en cultivo	Criollo	8258122	710121	488
La Paz	Mototoy	TC-1684	Cacao en cultivo	Criollo	8256880	708640	510
La Paz	Mototoy	TC-1685	Cacao en cultivo	Criollo	8256951	708612	509
La Paz	Mototoy	TC-1686	Cacao en cultivo	Criollo	8256938	708599	494
La Paz	San José	TC-1687	Cacao en cultivo	Criollo	8256096	711416	489
La Paz	San José	TC-1688	Cacao en cultivo	Criollo	8256083	711437	470
La Paz	San José	TC-1689	Cacao en cultivo	Criollo	8256087	711420	500
La Paz	San José	TC-1690	Cacao en cultivo	Criollo	8256109	711422	477
La Paz	San Antonio	TC-1691	Cacao en cultivo	Criollo	8267901	697093	442
La Paz	San Antonio	TC-1692	Cacao en cultivo	Criollo	8267927	697105	422
La Paz	San Antonio	TC-1693	Cacao en cultivo	Criollo	8267466	696663	430
La Paz	San Miguel Huachi	TC-1694	Cacao en cultivo	Nacional	8266354	699723	460
La Paz	San Miguel Huachi	TC-1695	Cacao en cultivo	Nacional	8266690	699846	469
La Paz	San Miguel Huachi	TC-1696	Cacao en cultivo	Nacional	8266578	699967	445
La Paz	San Miguel Huachi	TC-1697	Cacao en cultivo	Nacional	8266396	699974	436
La Paz	San Miguel Huachi	TC-1698	Cacao en cultivo	Nacional	8266424	700025	419
La Paz	San Miguel Huachi	TC-1699	Cacao en cultivo	Nacional	8266485	700035	444
La Paz	San Miguel Huachi	TC-1700	Cacao en cultivo	Nacional	8265880	700045	440
La Paz	San Miguel Huachi	TC-1701	Cacao en cultivo	Nacional	8265879	700052	438
La Paz	San Miguel Huachi	TC-1702	Cacao en cultivo	Nacional	8265916	700063	415
La Paz	San Miguel Huachi	TC-1703	Cacao en cultivo	Nacional	8265958	700058	421
La Paz	Remolino	TC-1704	Cacao en cultivo	Nacional	8263212	703299	496
La Paz	Remolino	TC-1705	Cacao en cultivo	Nacional	8263220	703303	489

Anexo 2

Genotipos selecciones élite de (*Theobroma cacao* L) de Alto Beni, Bolivia

Departamento	Comunidad/Sitio	Código	Tipo	Nombre Local
La Paz	Sapecho, EE-CEIBO	TC-1480	Selección élite	III-33
La Paz	Sapecho, EE-CEIBO	TC-1481	Selección élite	III-44
La Paz	Sapecho, EE-CEIBO	TC-1482	Selección élite	III-20
La Paz	Sapecho, EE-CEIBO	TC-1483	Selección élite	III-12
La Paz	Sapecho, EE-CEIBO	TC-1484	Selección élite	III-16
La Paz	Sapecho, EE-CEIBO	TC-1485	Selección élite	III-04
La Paz	Sapecho, EE-CEIBO	TC-1486	Selección élite	I-201
La Paz	Sapecho, EE-CEIBO	TC-1487	Selección élite	I-12
La Paz	Sapecho, EE-CEIBO	TC-1488	Selección élite	I-05
La Paz	Sapecho, EE-CEIBO	TC-1489	Selección élite	IIa-11
La Paz	Sapecho, EE-CEIBO	TC-1490	Selección élite	IIa-56
La Paz	Sapecho, EE-CEIBO	TC-1491	Selección élite	IIa-06
La Paz	Sapecho, EE-CEIBO	TC-1492	Selección élite	IIa-10
La Paz	Sapecho, EE-CEIBO	TC-1493	Selección élite	III-28
La Paz	Sapecho, EE-CEIBO	TC-1494	Selección élite	III-42
La Paz	Sapecho, EE-CEIBO	TC-1495	Selección élite	III-31
La Paz	Sapecho, EE-CEIBO	TC-1496	Selección élite	III-82
La Paz	Sapecho, EE-CEIBO	TC-1497	Selección élite	III-14
La Paz	Sapecho, EE-CEIBO	TC-1498	Selección élite	III-13
La Paz	Sapecho, EE-CEIBO	TC-1499	Selección élite	III-11
La Paz	Sapecho, EE-CEIBO	TC-1500	Selección élite	I-205
La Paz	Sapecho, EE-CEIBO	TC-1501	Selección élite	I-202
La Paz	Sapecho, EE-CEIBO	TC-1502	Selección élite	I-04
La Paz	Sapecho, EE-CEIBO	TC-1503	Selección élite	IIa-00
La Paz	Sapecho, EE-CEIBO	TC-1504	Selección élite	IIa-13
La Paz	Sapecho, EE-CEIBO	TC-1505	Selección élite	IIa-17
La Paz	Sapecho, EE-CEIBO	TC-1506	Selección élite	IIa-58
La Paz	Sapecho, EE-CEIBO	TC-1507	Selección élite	IIa-05
La Paz	Sapecho, EE-CEIBO	TC-1508	Selección élite	IIa-53
La Paz	Sapecho, EE-CEIBO	TC-1509	Selección élite	IV-06
La Paz	Sapecho, EE-CEIBO	TC-1510	Selección élite	IV-22
La Paz	Sapecho, EE-CEIBO	TC-1511	Selección élite	IV-17
La Paz	Sapecho, EE-CEIBO	TC-1512	Selección élite	IV-19
La Paz	Sapecho, EE-CEIBO	TC-1513	Selección élite	IV-33
La Paz	Sapecho, EE-CEIBO	TC-1514	Selección élite	IV-31
La Paz	Sapecho, EE-CEIBO	TC-1515	Selección élite	IV-21
La Paz	Sapecho, EE-CEIBO	TC-1516	Selección élite	IV-18
La Paz	Sapecho, EE-CEIBO	TC-1517	Selección élite	IV-01

Continuación... Anexo 2

Departamento	Comunidad/Sitio	Código	Tipo	Nombre Local
La Paz	Sapecho, EE-CEIBO	TC-1518	Selección élite	VII-08
La Paz	Sapecho, EE-CEIBO	TC-1519	Selección élite	VII-02
La Paz	Sapecho, EE-CEIBO	TC-1520	Selección élite	VII-03
La Paz	Sapecho, EE-CEIBO	TC-1521	Selección élite	VII-07
La Paz	Sapecho, EE-CEIBO	TC-1522	Selección élite	VII-86
La Paz	Sapecho, EE-CEIBO	TC-1523	Selección élite	VII-87
La Paz	Sapecho, EE-CEIBO	TC-1524	Selección élite	VII-92
La Paz	Sapecho, EE-CEIBO	TC-1525	Selección élite	VII-01
La Paz	Sapecho, EE-CEIBO	TC-1526	Selección élite	IIa-22
La Paz	Sapecho, EE-CEIBO	TC-1527	Selección élite	IIa-40
La Paz	Sapecho, EE-CEIBO	TC-1528	Selección élite	IIa-73
La Paz	Sapecho, EE-CEIBO	TC-1529	Selección élite	IIa-57
La Paz	Sapecho, EE-CEIBO	TC-1530	Selección élite	IIa-20
La Paz	Sapecho, EE-CEIBO	TC-1531	Selección élite	IIa-54
La Paz	Sapecho, EE-CEIBO	TC-1532	Selección élite	IIa.50
La Paz	Sapecho, EE-CEIBO	TC-1533	Selección élite	IIa-18
La Paz	Sapecho, EE-CEIBO	TC-1534	Selección élite	Sel-Rojo
La Paz	Sapecho, EE-CEIBO	TC-1535	Selección élite	IIa-59
La Paz	Sapecho, EE-CEIBO	TC-1536	Selección élite	IIa-16
La Paz	Sapecho, EE-CEIBO	TC-1537	Selección élite	IIa-42
La Paz	Sapecho, EE-CEIBO	TC-1538	Selección élite	III-01
La Paz	Sapecho, EE-CEIBO	TC-1539	Selección élite	III-07
La Paz	Sapecho, EE-CEIBO	TC-1540	Selección élite	IIa-02

Anexo 3

Características morfológicas de fruto y semillas utilizadas para la evaluación in situ de árboles de cacao

Readecuado por: Windson July Martínez

1. El código secuencial de la muestra debe ser único
2. EL TIPO, (Selección élite (SE), Cacao silvestre (CS), Cacao cultivado (CC))
3. CONSTRICCIÓN BASAL



0 = Ausente 1 = Escasa 2 = Intermedia 3 = Bien marcada 4 = Muy ancho

4. FORMA DE LA MAZORCA



1 = Angoleta 2 = Amelonado 3 = Cundeamor 4 = Calabacillo

5. FORMA DEL ÁPICE



1=Puntigudo 2=Agudo 3=Obtuso 4=Redondeado 5=Pezón 6=Dentado

6. COLOR DEL FRUTO, (1= Verde, 2=Rojo)
7. DIAMETRO DE LA MAZORCA, determinado en el ecuador de la mazorca
8. LARGO DE LA MAZORCA, distancia lineal entre los extremos del fruto
9. RUGOSIDAD DEL MESOCARPO, 0=Lisa ó Ausente, 5=Intermedia, 7= Áspera
10. PESO, es el peso promedio de un mínimo de 3 mazorcas expresado en gramos.
11. COLOR DE LA SEMILLA, 1= Púrpura, 2= Crema, 3= Café
12. ANCHO DE LA SEMILLA, se mide la parte más ancha de la semilla
13. LARGO DE LA SEMILLA, se mide desde el embrión al ápice
14. NÚMERO DE SEMILLAS POR MAZORCA, número de semillas integras y vanas por fruto.
15. PESO HÚMEDO DE SEMILLA, Se pesa las semillas con su mucílago pero sin placenta.

Anexo 4

Aislamiento de ADN de cacao usando el "FastPrep" System (Qbiogene)

Based on the "FastDNA Kit", adapted by Allan Meneses and Windson July

Add sample to Lysing Matrix A tube (gamet matrix + ¼ ceramic sphere) as follows:

- Dried flag leaves: between 50 and 150 mg. or
 - Fresh / caf base: between 100 and 250 mg.
1. Before using for the first time, add 2,8 g. of PVP (SIGMA, P-6757) to entire volume of CLS-VF buffer and mix well. Add 800 µl of CLS-VF buffer + 200 µl of PPS and another ¼ ceramic sphere.
 2. Macerate 3 times in the FastPrep Instrument at a speed setting off at 5.0 for 30 sec., incubating tubes on ice for at least 1 min. after each homogenization.
 3. Incubate homogenized sample at room temperature for 15 min and centrifuge for 10 min at 10500 rpm to pellet debris.
 4. Transfer supernatant (\pm 600 µl) to a 2 ml. microcentrifuge tube and add 600 µl of Binding matrix and mix by inversion for 15 min at room temperature. Do not vortex: DNA can be sheared.
 5. Centrifuge for 5 sec. at 8000 rpm and discard the supernatant.
 6. Gently resuspend the binding matrix pelleted by adding 520 µl of SEWS-M buffer and transfer to a SpinTM filter using a wide bore 1 ml pipet tip.
 7. Centrifuge for 1 min at 11500 rpm and discard the liquid in the catch tube.
 8. Centrifuge a second time for 1 min at 11500 rpm to dry the DNA/binding matrix complex.
 9. Transfer the filter to a new catch tube and elute DNA by gently resuspending in 100 µl of DES.
 10. Incubate for 15 min at room temperature, mixing every 5 min.
 11. Centrifuge for 2 min at 11500 rpm, discard the filter and store DNA solution at -20°C. DNA should be completely free of binding matrix particles.

Anexo 5

Análisis de varianza y prueba de Tukey para las variables cuantitativas, comparación entre cacao nacional silvestre y cacao nacional boliviano en cultivo.

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Peso mazorca	164	0,03	0,02	33,17

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	44337,26	1	44337,26	4,59	0,0336 *
Tipo	44337,26	1	44337,26	4,59	0,0336 *
Error	1563444,61	162	9650,89		
Total	1607781,87	163			

Test:Tukey Alfa:=0,05 DMS:=31,23744

Error: 9650,8926 gl: 162

Tipo	Medias	n		
C. Silvestre	273,65	57	A	
C. Cultivo	308,18	107		B

Letras distintas indican diferencias significativas(p<= 0,05)

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Diámetro de mazorca	164	0,02	0,01	11,32

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	2,42	1	2,42	3,33	0,0697 ns
Tipo	2,42	1	2,42	3,33	0,0697 ns
Error	117,34	162	0,72		
Total	119,75	163			

Test:Tukey Alfa:=0,05 DMS:=0,27061

Error: 0,7243 gl: 162

Tipo	Medias	n		
C. Silvestre	7,35	57	A	
C. Cultivo	7,61	107	A	

Letras distintas indican diferencias significativas(p<= 0,05)

Continuación Anexo 5

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Largo mazorca	164	0,01	0	17,57

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	5,51	1	5,51	0,98	0,3245 ns
Tipo	5,51	1	5,51	0,98	0,3245 ns
Error	913,21	162	5,64		
Total	918,71	163			

Test:Tukey Alfa:=0,05 DMS:=0,75495

Error: 5,6371 gl: 162

Tipo	Medias	n		
C. Cultivo	13,38	107	A	
C. Silvestre	13,76	57	A	

Letras distintas indican diferencias significativas(p<= 0,05)

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Número de semillas	164	0,13	0,12	26,32

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	1793,44	1	1793,44	23,93	<0,0001 *
Tipo	1793,44	1	1793,44	23,93	<0,0001 *
Error	12138,59	162	74,93		
Total	13932,02	163			

Test:Tukey Alfa:=0,05 DMS:=2,75244

Error: 74,9295 gl: 162

Tipo	Medias	n		
C. Cultivo	30,48	107	A	
C. Silvestre	37,42	57		B

Letras distintas indican diferencias significativas(p<= 0,05)

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Diámetro de semilla	164	0,44	0,43	9,46

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	1,49	1	1,49	124,78	<0,0001 *
Tipo	1,49	1	1,49	124,78	<0,0001 *
Error	1,94	162	0,01		
Total	3,43	163			

Test:Tukey Alfa:=0,05 DMS:=0,03476

Error: 0,0120 gl: 162

Tipo	Medias	n		
C. Silvestre	1,03	57	A	
C. Cultivo	1,23	107		B

Letras distintas indican diferencias significativas(p<= 0,05)

Continuación Anexo 5.

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Largo Semilla	164	0,02	0,02	10,64

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,22	1	0,22	3,9	0,0501 *
Tipo	0,22	1	0,22	3,9	0,0501 *
Error	9,01	162	0,06		
Total	9,23	163			

Test:Tukey Alfa:=0,05 DMS:=0,07498

Error: 0,0556 gl: 162

Tipo	Medias	n		
C. Silvestre	2,17	57	A	
C. Cultivo	2,24	107		B

Letras distintas indican diferencias significativas(p<= 0,05)

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Peso húmedo	164	0,03	0,03	36,51

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	3495,89	1	3495,89	5,2	0,0239 *
Tipo	3495,89	1	3495,89	5,2	0,0239 *
Error	108962,81	162	672,61		
Total	112458,7	163			

Test:Tukey Alfa:=0,05 DMS:=8,24657

Error: 672,6100 gl: 162

Tipo	Medias	n		
C. Cultivo	67,67	107	A	
C. Silvestre	77,37	57		B

Letras distintas indican diferencias significativas(p<= 0,05)

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Peso seco	164	0,03	0,03	36,48

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	340,38	1	340,38	5,18	0,0241 *
Tipo	340,38	1	340,38	5,18	0,0241 *
Error	10637,53	162	65,66		
Total	10977,91	163			

Test:Tukey Alfa:=0,05 DMS:=2,57665

Error: 65,6638 gl: 162

Tipo	Medias	n		
C. Cultivo	21,16	107	A	
C. Silvestre	24,18	57		B

Letras distintas indican diferencias significativas(p<= 0,05)

Anexo 6.

Análisis de varianza y prueba de Tukey para las variables cuantitativas, comparación entre conglomerados para las selecciones élites de Alto Beni, Bolivia

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Peso de mazorca	61	0,45	0,44	25,26

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	2273816,78	2	1136908,39	24,15	<0,0001*
Conglomerado	2273816,78	2	1136908,39	24,15	<0,0001*
Error	2730874,21	58	47084,04		
Total	5004690,98	60			

Test: Tukey Alfa:=0,05 DMS:=168,03899

Error: 47084,0381 gl: 58

Conglomerado	Medias	n			
3	753,54	24	A		
1	773,2	25	A		
2	1248,75	12		B	

Letras distintas indican diferencias significativas (p ≤ 0,05)

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Diametro de mazorca	61	0,39	0,37	9,28

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	31,68	2	15,84	18,5	<0,0001*
Conglomerado	31,68	2	15,84	18,5	<0,0001*
Error	49,65	58	0,86		
Total	81,33	60			

Test: Tukey Alfa:=0,05 DMS:=0,71653

Error: 0,8561 gl: 58

Conglomerado	Medias	n			
1	9,61	25	A		
3	9,62	24	A		
2	11,43	12		B	

Letras distintas indican diferencias significativas (p ≤ 0,05)

Continuación Anexo 6.

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Largo de mazorca	61	0,2	0,17	12,26

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	100,39	2	50,2	7,16	0,0017*
Conglomerado	100,39	2	50,2	7,16	0,0017*
Error	406,67	58	7,01		
Total	507,06	60			

Test:Tukey Alfa:=0,05 DMS:=2,05059

Error: 7,0115 gl: 58

Conglomerado	Medias	n			
3	20,75	24	A		
1	21,2	25	A		
2	24,17	12		B	

Letras distintas indican diferencias significativas(p<= 0,05)

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Número de semilla	61	0,35	0,33	16,36

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	1585,91	2	792,96	15,67	<0,0001*
Conglomerado	1585,91	2	792,96	15,67	<0,0001*
Error	2935,33	58	50,61		
Total	4521,25	60			

Test:Tukey Alfa:=0,05 DMS:=5,50919

Error: 50,6092 gl: 58

Conglomerado	Medias	n			
1	37,8	25	A		
2	44	12		B	
3	49,17	24		B	

Letras distintas indican diferencias significativas(p<= 0,05)

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Diametro de semilla	61	0,17	0,14	6,11

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,1	2	0,05	5,75	0,0052*
Conglomerado	0,1	2	0,05	5,75	0,0052*
Error	0,53	58	0,01		
Total	0,63	60			

Test:Tukey Alfa:=0,05

DMS:=0,07368

Error: 0,0091 gl: 58

Conglomerado	Medias	n			
1	1,52	25	A		
3	1,56	24	A		
2	1,63	12		B	

Letras distintas indican diferencias significativas(p<= 0,05)

Continuación Anexo 6.

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Largo de semilla	61	0,29	0,27	7,99

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	1,36	2	0,68	12,12	<0,0001*
Conglomerado	1,36	2	0,68	12,12	<0,0001*
Error	3,26	58	0,06		
Total	4,63	60			

Test:Tukey Alfa:=0,05 DMS:=0,18369

Error: 0,0563 gl: 58

Conglomerado	Medias	n			
1	2,83	25	A		
3	2,98	24	A		
2	3,24	12		B	

Letras distintas indican diferencias significativas(p<= 0,05)

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
PeH	61	0,71	0,7	14,25

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	91637,13	2	45818,56	69,64	<0,0001*
Conglomerado	91637,13	2	45818,56	69,64	<0,0001*
Error	38162,88	58	657,98		
Total	129800	60			

Test:Tukey Alfa:=0,05 DMS:=19,86460

Error: 657,9806 gl: 58

Conglomerado	Medias	n			
1	135,6	25	A		
3	200,21	24		B	
2	232,08	12			C

Letras distintas indican diferencias significativas(p<= 0,05)

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Peso semilla	61	0,71	0,7	14,26

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	8061,39	2	4030,7	69,51	<0,0001*
Conglomerado	8061,39	2	4030,7	69,51	<0,0001*
Error	3363,49	58	57,99		
Total	11424,88	60			

Test:Tukey Alfa:=0,05 DMS:=5,89731

Error: 57,9911 gl: 58

Conglomerado	Medias	n			
1	40,24	25	A		
3	59,39	24		B	
2	68,86	12			C

Letras distintas indican diferencias significativas(p<= 0,05)

Anexo 7

Matriz de distancias euclidea por genotipos procedentes de 19 sitios donde se encuentra cacao Nacional Boliviano silvestre y cultivado.

	CC: Coccochi	CC: Covendo	CC: Estación Exp	CC: Mototoy	CC: Remolino	CC: San Antonio	CC: San José	CC: San M. Huachi	CS: Cacahichira	CS: Carmen Emero	CS: Copacabana	CS: Isla del Oro	CS: Macagua	CS: Paltal	CS: San Marcos	CS: San Silvestre	CS: Santa Fé	CS: Tequeje	CS: Tumupasa
CC: Coccochi	0																		
CC: Covendo	2,89	0																	
CC: Estación Exp	3,65	3,55	0																
CC: Mototoy	3,2	4,16	6,2	0															
CC: Remolino	2,73	3,83	3,81	5,51	0														
CC: San Antonio	1,53	2,83	3,31	3,22	3,52	0													
CC: San José	3,32	2,05	2,12	5,15	4,11	2,73	0												
CC: San M. Huachi	2,53	1,16	3,44	4,24	3,34	2,87	2,49	0											
CS: Cacahichira	3,68	4,36	6,1	3,67	4,45	3,71	5,05	4,81	0										
CS: Carmen Emero	3,41	3,71	2,35	6,26	2,33	3,51	2,97	3,68	4,94	0									
CS: Copacabana	4,58	5,13	4,63	7,08	2,77	4,98	4,91	5,17	4,67	2,34	0								
CS: Isla del Oro	3,09	3,86	3,4	5,48	2,4	3,03	3,42	4,03	3,57	1,65	2,12	0							
CS: Macagua	2,53	4,33	3,24	5,55	1,89	3,16	4,02	3,99	4,68	2,02	2,91	2,11	0						
CS: Paltal	3,14	3,49	2,93	5,62	2,68	2,94	2,85	3,74	3,96	1,29	2,47	0,92	2,32	0					
CS: San Marcos	2,82	3,6	3,7	5,21	2,08	3,18	3,53	3,71	3,26	1,88	1,93	1	2,08	1,44	0				
CS: San Silvestre	3,03	4,84	4,18	5,45	3,76	3,49	4,85	4,11	6,32	4,4	5,9	4,74	3,3	4,59	4,82	0			
CS: Santa Fé	2,7	4,45	3,71	5,63	1,48	3,5	4,48	3,99	4,8	2,45	3,02	2,52	0,94	2,83	2,39	3,25	0		
CS: Tequeje	4,08	4,49	5,17	5,15	4,09	3,77	4,39	5,02	2,16	3,79	3,43	2,3	4,11	2,74	2,39	6,43	4,44	0	
CS: Tumupasa	1,08	3,38	3,22	3,98	2,83	1,97	3,3	3,05	4,2	3,03	4,33	2,95	1,99	2,94	2,71	3	2,45	4,24	0

CC: cacao cultivado; CS cacao silvestre

Anexo 8

Resultados del análisis de calidad de 12 muestras de Cacao Nacional Boliviano.

Guittard Reference Code	Labeling	CATIE Code	Bean Count / 100 gm	Bean Weight gm/bean	ESS Liquor Flavor Evaluation (Guittard Chocolate Company)
2158	Bolivia Nacional	1	130	0.77	This has some odd flavor to it. It actually has something of an over fermented type of note, but not quite. It is more like a fermentation that went "slimy". There are some slightly putrid characteristics in this. That said, there also seems to be some dark and dried fruit / raisin notes as well. Cocoa is moderate to low but the astringency is low also as is the bitterness. No acidity.
2159	Bolivia Nacional	2	152	0.66	This is not a good tasting sample. It seems very astringent and dirty tasting. Not good. No acidity, no cocoa, no other flavors.
2160	Bolivia Nacional	3	128	0.78	Early astringency that is mid-level intensity with mild bitterness. There are some green grass notes as well as some mild orange blossom floral (flower) notes. This has a slight Ecuador Nacional type of flavor. Does have some earthy notes but at a lighter (brighter) level than in typical Nacional. Good sample. Cocoa notes are relatively low but are still present. This could be a blending bean in a flavor blend with some good West African.
2161	Bolivia Nacional	4	142	0.71	Striking up front direct astringency. No other flavor. That is it.
2162	Bolivia Nacional	5	114	0.88	Not as good a flavor overall. Strong astringency, very strong with moderate bitterness and little or no cocoa notes. Does not have any aromatics to compensate. There is a slight green note but seems to lack any other interesting floral notes. No fruit notes.
2163	Bolivia Nacional	6	213	0.47	More of a plain flavor with moderate to stronger up front astringency with moderate bitterness and lower cocoa flavor. No aromatics in this sample. Some woody, bark notes but no notable floral notes are present.
2164	Bolivia Nacional	7	169	0.59	Mild, very mild acidity up front that is definitely fruity in character and has a distinct Trinidad type of dried fruit / raisin character. Mild astringency with moderate bitterness. Some central cocoa notes are present at a moderate to slightly more than that level. Good flavor profile. Maybe a fine flavor profile.
2165	Bolivia Nacional	8	140	0.72	Early woody aromatic notes with some bark character in the flavor. Middle taste emerges with more bitterness and some astringency. No floral notes other than these. Mild cocoa notes but not pronounced. I think this sample is OK but lacks potential for fine flavor future.
2166	Bolivia Nacional	9	153	0.65	Has a notable early green floral note that hits up front along with moderate astringency and some bitterness. This is interesting. Middle taste has a slight orange blossom floral character. This is an interesting piece worth pursuing as an interesting sample for flavor. There is a later taste of some browned fruit / raisin note much like a Trinidad sample. Aftertaste has moderate astringency that seems to last a bit but slightly more fermentation would help this.

Continuación Anexo 8

Guittard Reference Code	Labeling	CATIE Code	Bean Count / 100 gm	Bean Weight gm/bean	ESS Liquor Flavor Evaluation (Guittard Chocolate Company)
2167	Bolivia Nacional	10	122	0.82	Strong up front bitterness coupled with astringency. Good browned notes with beginnings of good chocolate flavor in the blend. Some deeper notes. Not as well developed as the 2169 (Bolivia 12) sample but the chocolate flavor emerges and builds towards the end. With a little more fermentation, this would be a really good quality bulk (like Ghana) bean,. There are some mild spicy, peppery notes in this something like some Colombian samples I have tasted. Good potential, needs a bit more fermentation.
2168	Bolivia Nacional	11	105	0.95	Very strong up front astringency. Low, very low fermentation potential in this sample. It has a present flavor profile that is bitter and astringent but no acidity. I do not see any other aromatic flavors in this sample. It is very much like unfermented Dominican Republic beans in this regards. While not possible to conclusively comment on the flavor due to the low fermentation, I do not believe there is fine flavor potential here. By comparison, unfermented Dominican Republic beans (Sanchez) do not generally meet fine flavor potential in the fermented, Hispanola, form.
2169	Bolivia Nacional	12	124	0.80	Some up front astringency (low fermentation) with no acidity and moderate bitterness. Significant chocolate notes up front also that persist. Good earthy intensity with some mild mushroom and herbal notes. Very much like an Ecuador Nacional type of flavor profile. Aftertaste has a long chocolate finish. This has a potential like Ecuador Nacional and could be a replacement for good quality ASS / ASSS type in terms of flavor. Residual astringency is also present in this sample.

Anexo 9

Primers microsatélites (SSRs) usados como estándares internacionales para la caracterización molecular de *Theobroma cacao* L.

N	Microsatelite	EMBL #	Dye Color	5' Forward	3' Reverse	T (°C)	Rango	[MgCl ₂]
1	MTcCIR1	Y16883	Negro	GCAGGGCAGGCT CAGTGAAGCA	TGGGCAACCAG AAAACGAT	51	126-146	2,5mM
2	MTcCIR11	Y16985	Azul	TTTGGTGATTATT AGCAG	GATTCGATTTG ATGTGAG	46	285-321	2,5mM
3	MTcCIR12	Y16986	Negro	TCTGACCCCAAAC CTGTA	ATTCCAGTTAA AGCACAT	46	187-273	2,5mM
4	MTcCIR15	Y16988	Azul	CAGCCGCCTCTTG TTAG	TATTTGGGATT CTTGATG GGTAATTCAAT CATTGAGGAT	46	221-256	2,5mM
5	MTcCIR18	Y16991	Verde	GATAGCTAAGGG GATTGAGGA	A	51	329-354	2,5mM
6	MTcCIR22	Y16995	Verde	ATTCTCGCAAAAA CTTAG	GATGGAAGGA GTGAAAATAG	46	271-295	2,5mM
7	MTcCIR24	Y16996	Negro	TTTGGGGTGATTT CTTCTGA	TCTGTCTCGTC TTTTGGTGA	46	184-208	2,5mM
8	MTcCIR26	Y16998	Verde	GCATTCATCAATA CATTC	GCACTCAAAGT TCATACTAC	46	267-313	2,5mM
9	MTcCIR33	AJ271826	Azul	TGGGTTGAAGATT TGGT	CAACAATGAAA ATAGGCA	51	270-344	2,5mM
10	MTcCIR37	AJ271942	Negro	CTGGGTGCTGATA GATAA	AATACCCTCCA CACAAAT	46	132-184	2,5mM
11	MTcCIR40	AJ271943	Azul	AATCCGACAGTCT TTAATC	CCTAGGCCAGA GAATTGA	51	270-290	2,5mM
12	MTcCIR6	Y16980	Azul	TTCCCTCTAAACT ACCCTAAAT	TAAAGCAAAGC AATCTAACATA	46	218-246	2,5mM
13	MTcCIR60	AJ271958	Verde	CGCTACTAACAAA CATCAAAA	AGAGCAACCAT CACTAATCA	51	187-210	2,5mM
14	MTcCIR7	Y16981	Negro	ATGCGAATGACA ACTGGT	GCTTTCGTCCT TTGCTT	51	148-168	2,5mM
15	MTcCIR8	Y16982	Verde	CTAGTTTCCCATT TACCA	TCCTCAGCATT TTCTTTC	46	276-322	2,5mM