

# CARACTERIZACIÓN BOTÁNICA Y GENÉTICA DE ÁRBOLES ÉLITE DE CACAO (*Theobroma cacao* L. - MALVACEAE) CULTIVADAS EN ALTA VERAPAZ, GUATEMALA

Ana Lucía Dubón  
aldubon@uvg.edu.gt,

Maria Renée Álvarez<sup>2</sup>  
mralvarez@uvg.edu.gt,

Mariafernanda Alarcón<sup>1</sup>  
malarcon@uvg.edu.gt,

Nina Alejandra Figueroa<sup>1</sup>  
nafigueroa@uvg.edu.gt

<sup>1</sup> Programa de Protección Vegetal - CEAA

<sup>2</sup> Herbario UVAL - CEAB

## RESUMEN

El cacao es parte de la cultura de Guatemala desde la época prehispánica, y actualmente contribuye al desarrollo económico de pequeños y medianos agricultores. Sin embargo, su producción se ha visto afectada por la falta de información sobre la genética de los materiales que se utilizan para propagación. El objetivo de este estudio fue realizar la caracterización botánica y molecular de árboles élites de cacao en tres localidades de Alta Verapaz (Lachuá, Cahabón y Polochic). Se caracterizaron 150 árboles élite morfológicamente mediante 42 caracteres botánicos y genéticamente por la técnica de marcadores microsatélites, utilizando clones de colecciones internacionales como controles. Para los caracteres botánicos se realizó un análisis de correspondencia canónica (CCA) que no demostró la formación de grupos definidos, sugiriendo una alta tasa de hibridación. De acuerdo a las observaciones de campo y la variabilidad en el análisis morfológico y morfométrico, se observa alta variabilidad en las poblaciones de cacao estudiadas. El largo de pedicelo, largo del pétalo y el color de las semillas podrían sugerirse como marcadores morfométricos para variedades trinitarias acriolladas o variedades albinas como Catongo. Para la caracterización genética, se encontró una alta variabilidad genética en las poblaciones de acuerdo al número de alelos reportado para cada marcador. De acuerdo con el análisis de agrupamiento jerárquico realizado, no se encontraron materiales criollos o forasteros, sin embargo, fue posible clasificarlos como trinitarios (híbridos), trinitarios acriollados y trinitarios forasteros. De acuerdo a la localidad, se detectaron dos grupos genéticamente similares, uno en Cahabón y otro en Lachuá, el último se agrupó con controles criollos, por lo que podría tratarse de trinitarios acriollados. De acuerdo a ambos análisis (genético y botánico), ninguno de los materiales es 100% cacao criollo o forastero, todos presentaron características intermedias entre estos dos tipos de cacao, sin embargo, pueden clasificarse como trinitarios, trinitarios acriollados y trinitarios forasteros. Esta información presenta una línea base sobre la genética del cacao en Alta Verapaz y permite generar recomendaciones para el manejo de las plantaciones.

**PALABRAS CLAVE:** *Theobroma cacao* L., caracterización genética y botánica, Alta Verapaz, Guatemala.

## ABSTRACT

### BOTANICAL AND GENETIC CHARACTERIZATION OF ELITE CACAO TREES (*Theobroma cacao* L. - MALVACEAE) GROWN IN ALTA VERAPAZ, GUATEMALA

Cacao has been part of Guatemalan culture since pre-hispanic times, and currently contributes to the economic development of small and medium scale growers. However, its production has been affected by the lack of information on the genetics of the materials used for propagation. The objective of this study was to perform the botanical and molecular characterization of elite cacao trees in three locations in Alta Verapaz (Lachuá, Cahabón and Polochic). One hundred and fifty elite trees were

characterized morphologically by 42 botanical characters and genetically by the microsatellite marker technique, using clones from international collections as controls. A canonical correspondence analysis (CCA) was performed, for botanical characters which did not show the formation of defined groups, suggesting a high rate of hybridization. According to field observations and the variability in the morphological and morphometric analysis, high variability is observed in the cacao populations studied. Pedicel length, petal length and seed color could be suggested as morphometric markers for “Trinitario acriollado” varieties or albino varieties such as Catongo. For the genetic characterization, a high genetic variability was found in the populations based on the number of alleles reported for each marker. No “Criollo” or “Forastero” materials were found, however, it was possible to classify them as “Trinitarios” (hybrids), “Trinitarios acriollados” and “Trinitarios forasteros”. According to the locality, two genetically similar groups were detected, one in Cahabón and another in Lachuá, the latter was grouped with “Criollos” controls, so they could be “Trinitarios acriollados”. Based on both analyzes (genetic and botanical), none of the materials is 100% “Criollo” or “Forastero”, all presented intermediate characteristics between these two types of cacao, however, they can be classified as “Trinitarios”, “Trinitario acriollado” and “Trinitarios forasteros”. This information presents a baseline on the genetics of cacao in Alta Verapaz and made it possible to generate recommendations for the management of plantations.

**KEY WORDS:** *Theobroma cacao* L., botanical and genetic characterization, Alta Verapaz, Guatemala.

## INTRODUCCIÓN

El cacao (*Theobroma cacao* L.) es aprovechado por los humanos desde hace 5,300 años en la región entre Colombia y Ecuador, de acuerdo con estudios arqueológicos (Zarrillo *et al.* 2018). Hace 3,600 años fue traído a Mesoamérica por comerciantes, y la región se convirtió en un centro de diversificación de cacao. La especie tuvo importancia cultural para la civilización maya que la utilizaba como moneda de cambio, y desde ese entonces se cultiva en Guatemala. El nombre cacao ahora usado universalmente se deriva directamente del náhuatl “cacahuatl” o “cacahoatl”, así como el nombre del chocolate, se deriva de “xocoatl” o “chocoatl” (Cuatrecasas 1964). En la actualidad, el cultivo de cacao en un modelo agroforestal tiene un impacto positivo en el ambiente, promueve la fertilidad del suelo y la conservación de la biodiversidad. Además, apoya el desarrollo de pequeños y medianos agricultores y contribuye a reducir la pobreza debido a que las plantaciones suelen encontrarse en regiones remotas cerca de áreas protegidas (Somarriba *et al.* 2008). Toda la región de Centroamérica tiene una baja productividad de cacao en relación con la producción mundial, pero presenta una alta calidad que le permite satisfacer la demanda local y exportar el producto a Estados Unidos y la Unión Europea (Somarriba *et al.* 2008).

Existe una gran variación de las características morfológicas de la especie, que autores como Morris y Hart, han intentado agrupar en Clases y variedades. Siendo la Clase Criollo y la

Clase Forastero una constante en las clasificaciones. Las tres variedades de cacao mayormente reconocidas son: criollo, forastero y trinitario (Cuatrecasas, 1964). La calidad del cacao depende del aroma, sabor, textura y cantidad de alcaloides como la teobromina, estas características conforman el fenotipo de la especie (Arvelo *et al.* 2017). A su vez, el fenotipo depende de la genética de los árboles de cacao (genotipo) y de factores ambientales como la temperatura, humedad, iluminación y características del suelo (Weising *et al.* 2005). Para determinar los grupos genéticos en los que puede clasificarse el cacao y estudiar la variabilidad genética de las poblaciones, se han utilizado técnicas como el uso de marcadores microsatélites (SSRS), que son segmentos cortos de ADN de 1-6 pb repetidos en tándem y de forma aleatoria en el genoma. A pesar de que se identifican tres grupos principales según características botánicas, se han identificado hasta 10 grupos genéticos del cacao latinoamericano utilizando dichas técnicas (Motamayor *et al.*, 2008). También se han realizado estudios de mapeo genético y secuenciación de regiones ricas en QTLs (*quantitative trait loci*) (Lanaud *et al.*, 2004; Lanaud, *et al.*, 2009; Feltus *et al.*, 2011; Barreto *et al.*, 2018) con el objetivo de identificar genes candidatos que puedan estar asociados a características de resistencia a un patógeno específico, tolerancia a estrés ambiental o a alguna característica morfológica u organoléptica en particular.

Por esa razón, uno de los aspectos necesarios para aumentar la calidad del cacao es evaluar la genética para conservar los materiales y desarrollar programas de mejoramiento a partir de genotipos que presenten características deseables de resistencia, productividad y calidad.

Las variedades encontradas en el área de distribución de la especie presentan diferencias importantes en cuanto a sabor, características morfológicas, productividad y resistencia a plagas. Morfológicamente las principales diferencias se encuentran en la forma, textura y color del fruto y las semillas. El reconocimiento de estas variedades es esencial para realizar

cruces efectivos entre árboles y para optimizar los procesos post cosecha que son específicos para cada una.

Existe una clara congruencia entre los rasgos morfométricos y los rasgos genéticos, aclarando así la utilidad de enfoques complementarios para hacer que el análisis de diversidad sea más explicativo y útil para una mejora genética óptima y la conservación efectiva de su variabilidad genotípica (Lattoo *et al.* 2008).

El objetivo de este estudio fue caracterizar botánica y genéticamente los árboles élite de cacao cultivadas en las regiones de Lachuá, Cahabón y Polochic del departamento de Alta Verapaz, Guatemala.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Sitio de estudio

El estudio se realizó en las subregiones de Lachuá, Cahabón y Polochic en el departamento de Alta Verapaz. En Cahabón se incluyó el área de Lanquín y Cahabón y en Polochic se incluyó Panzós y Santa Catarina la Tinta (Figura 1). El muestreo

de árboles se realizó en los meses de Noviembre del 2018 a marzo del 2020 en plantaciones de miembros de las siguientes asociaciones de Fundalachuá: KATBALPOM, ASODIRP y ASOLSEÑOR en Lachuá, ADEMAYACH en Cahabón y APODIP en Polochic. Además estuvieron involucradas APRODERK y APIDIP en Cahabón.

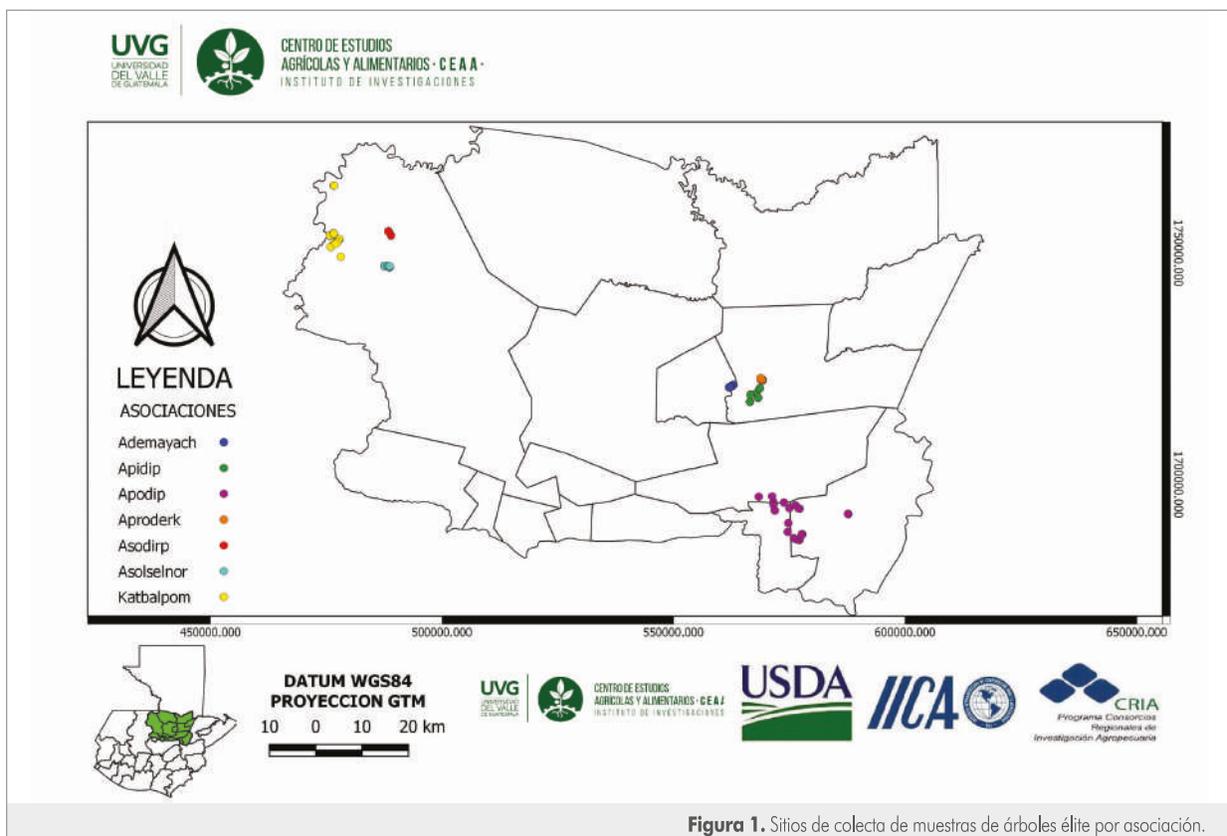


Figura 1. Sitios de colecta de muestras de árboles élite por asociación.

## Selección de árboles

Los árboles élite para realizar la caracterización botánica y molecular se seleccionaron en conjunto con los productores de cacao de las asociaciones y áreas de estudio, con base en los siguientes criterios:

- Índice de grano (peso mayor a 1 g),
- Índice de mazorca: 20 a 25 mazorcas para producir 1 Kg de cacao seco,
- Productividad (60 pochos por árbol),
- Resistencia a enfermedades (según observaciones del productor)
- Condiciones organolépticas deseables (según observaciones del productor).

Cada árbol seleccionado fue marcado, codificado y georreferenciado para mantener la trazabilidad de la muestra. Se seleccionaron un total de 150 árboles: 65 en Lachuá, 55 en Cahabón y 30 en Polochic.

## Caracterización botánica

**Colecta de muestras:** Para la caracterización botánica se colectó una rama con al menos cinco hojas, tres flores y tres frutos para los 150 árboles élite seleccionados. Además se colectaron muestras de 5 árboles de control. Estos fueron: trinitarios (ICS95 y SPA-9), amazónico (Catongo), criollo (Yucatan Greenhouse) y pataxte (*Theobroma bicolor* Humb. & Bonpl), por ser una especie perteneciente al mismo género que el cacao. Los controles fueron colectados en el Centro de Agricultura Tropical Bulbuxyá y en la Granja Zahorí ubicada en Cuyotenango Suchitepéquez, ambas pertenecientes a la Universidad de San Carlos de Guatemala (USAC).

**Análisis de características morfológicas y morfométricas:** En campo se midió el diámetro a la altura del pecho (DAP), la altura del árbol y el número de frutos. Las muestras colectadas se trasladaron al laboratorio del Herbario UVAL de la Universidad del Valle de Guatemala (UVG) para su análisis. Las muestras de hojas se secaron en prensa para su posterior medición, mientras que los frutos y flores se midieron inmediatamente al llegar al laboratorio. En total, se midieron 42 caracteres cuantitativos (24) y cualitativos (18) para la descripción botánica de las variedades; consistiendo en tres características del árbol, ocho de hojas, 16 de flores, 10 de frutos y cinco de semillas (Cuadro 1).

**Cuadro 1.** Caracteres cualitativos y cuantitativos utilizados en la caracterización botánica de los árboles élite de cacao.

Árbol y hojas	Flores	Frutos y semillas
Altura (m)	Largo del pedicelo (mm)	Largo del fruto (mm)
DAP (cm)	Color del pedicelo	Ancho del fruto (mm)
Número de frutos por árbol	Número de sépalos	Forma del fruto
Largo de la hoja (mm)	Largo de los sépalos (mm)	Forma del ápice
Ancho de la hoja (mm)	Forma de los sépalos	Forma de la base
Número de pares de venas	Color de los sépalos	Número de surcos
Largo del peciolo (mm)	Número de pétalos	Textura
Forma del limbo	Largo de los pétalos (mm)	Color del fruto maduro
Forma del ápice	Forma de los pétalos	Color del mesocarpio
Forma de la base	Color de los pétalos	Número de semillas
Tricomas en el envés	Número de estambres	Ancho de la semilla (mm)
	Largo del estambre (mm)	Largo de la semilla (mm)
	Número de estaminodios	Grosor de la semilla (mm)
	Largo de estaminodios (mm)	Color de la semilla
	Color de estaminodio	Forma longitudinal
	Largo del pistilo (mm)	

## Caracterización molecular

**Colecta de muestras:** Se realizó la colecta de muestras foliares de los 150 árboles élite seleccionados. Las mismas se transportaron en frío (4°C) hacia el Laboratorio de Protección Vegetal (LPV) de la UVG para realizar el análisis genético. Se utilizaron materiales caracterizados provenientes de colecciones nacionales e internacionales como controles criollos (Cantón Sis, Mazatenango 4, Criollo, Yucatan Greenhouse 1 y 2), trinitarios (ICS6, ICS95 y SPA9) y amazónicos (Catongo), y se incluyó una muestra de pataxte (*Theobroma bicolor* Humb. & Bonpl). Los controles fueron colectados en el Centro de Agricultura Tropical Bulbuxyá y en la Granja Zahorí ubicada en Cuyotenango Suchitepéquez, ambas propiedad de la Universidad de San Carlos de Guatemala (USAC).

### • Análisis genético:

**Extracción de ADN:** Para la extracción del material genético de las muestras foliares de las tres subregiones de estudio y de los controles colectados en los jardines clonales, se utilizó una versión modificada de los protocolos de Murray y Thompson (1980) y Mathew (2014). Se tomaron 0.3 g de tejido del material vegetal y se maceraron mecánicamente añadiendo previamente un volumen de 150  $\mu$ l de PVP 10%, 100  $\mu$ l de metabisulfito de sodio 5%, 200  $\mu$ l de

$\beta$ -mercaptoetanol y 50  $\mu$ l de agua desmineralizada. Posteriormente se agregó un volumen de buffer CTAB precalentado a 65°C, y se incubó durante 30 minutos. Alcanzada la temperatura ambiente, se agregó un volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), se mezcló en vórtex y se centrifugó a 13,000 rpm por 10 min. Al sobrenadante se le agregó un volumen de isopropanol frío y 1/10 de volumen de acetato de amonio 7.5 M; se mezcló por inversión y se incubó a -20°C por 20 min. Posteriormente se secó el precipitado a 50°C y se resuspendió en aproximadamente 50  $\mu$ l de buffer TE precalentado a 65°C. Se verificó la integridad del ADN en geles de agarosa 1% y se utilizó espectrofotometría para medir la concentración y pureza del ADN. El ADN extraído fue almacenado a 4°C para su posterior análisis (Aragon, 2009; Ávalos *et al.*, 2012; Cryer *et al.*, 2006; Johnson *et al.*, 2009; Lanaud *et al.*, 1999; Loo *et al.*, 2009; Motilal *et al.*, 2009; Saunders *et al.*, 2004; Schnell *et al.*, 2005; Sereno, 2005).

**Amplificación con marcadores microsatélites:** Una vez obtenido el ADN, se procedió a la amplificación usando marcadores microsatélites (SSR's, o *Simple Sequence Repeats*) y la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Inicialmente se realizó un estudio piloto con 30 marcadores (Motamayor *et al.*, 2008) y se seleccionaron los 11 más polimórficos (Cuadro 2) para correr la totalidad de las muestras.

**Cuadro 1.** Marcadores microsatélites seleccionados para la caracterización molecular de los árboles élite de cacao.

Nombre	No. Alelos reportado	Secuencias	Tamaño de fragmentos
mTcCIR1	3-10	GCAGGGCAGGCTCAGTGAAGCA TGGGCAACCAGAAAACGAT	143, 128-146
mTcCIR3	6-15	CATCCAGTATCTCATCC CTGCTCATTTCTTTCATATCA	230, 249
mTcCIR4	3	CGACTAAAACCCAAACCATCAA AATTATTAGGCAACCCGAACTT	259
mTcCIR10	4-18	ACAGATGGCCCTACACACT CAAGCAAGCCTCATACTC	208-274
mTcCIR19	6-10	CACAACCCGTGCTGATTA GTTGTTGAGGTTGTTAGGAG	376
mTcCIR25	11-13	CTTCGTAGTGAATGTAGGAG CTTCGTAGTGAATGTAGGAG	150-185
mTcCIR28	2	GATCAATCAGAAGCAAACACAT TAAAGCAGCCTACCAAGAAAAG	336
mTcCIR37	6-13	CTGGTGCTGATAGATAA AATACCCCTCCACAAAT	133-185, 136-187
mTcCIR40	6-10	AATCCGACAGTCTTTAATC CCTAGGCCAGAGAATTGA	259-284, 262-288
mTcCIR58	6-12	CGCTACTAACAAACATCAAA AGAGCAACCATCACTAATCA	190-218
mTcCIR60	8	CGCTACTAACAAACATCAAA AGAGCAACCATCACTAATCA	190-218

Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) al 20% de 38 x 20 cm, corrido a 160V por una hora. Los fragmentos de ADN se visualizaron por tinción con nitrato de plata y su tamaño fue determinado por análisis de los geles digitalizados utilizando el programa Gel Analyzer. Con los resultados del tamaño de los fragmentos se generó una matriz de datos para ser utilizada en el análisis estadístico.

### Análisis Estadístico

**Caracterización botánica:** Se realizó un análisis de correspondencia canónica (CCA) en el programa estadístico R (versión 3.6.1). Las características se analizaron según las categorías: árboles, hojas, flores, frutos y semillas. Como para todas las categorías se realizaron múltiples mediciones

por muestra, se utilizó la media para variables continuas y la moda para las categóricas. En el caso de las variables categóricas con más de una moda, se seleccionó una al azar. Las variables de cada categoría fueron seleccionadas si: 1) poseen más de un valor distinto, 2) no es multicolineal (para esto se utilizó el factor de inflación de la varianza (VIF) y 3) su efecto es significativo sobre la composición genética.

**Caracterización molecular:** Se utilizó el programa estadístico R (versión 3.6.1). Se realizó un análisis de agrupamiento jerárquico con base en el índice de disimilitud de Bray-Curtis que permite medir la distancia genética entre individuos (árboles de cacao), usando como base la identidad y el número de alelos compartidos. A partir de este análisis se generó un dendrograma para visualizar las diferencias de diversidad entre las muestras.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Caracterización botánica:

De acuerdo al análisis morfológico y morfométrico, todos los árboles élite incluidos en el estudio presentan características intermedias entre cacao criollo y forastero, por lo que pueden clasificarse como materiales trinitarios. Sin embargo, algunos presentaron tendencia hacia alguno de los grupos, pudiendo clasificarlos como trinitarios acriollados o trinitarios forasteros. Por las características físicas presentadas en los árboles se puede observar (1) alta variabilidad fenotípica y (2) altas tasas de hibridación. Por ejemplo, en dos árboles élite tomados en el estudio, se observaron características diversas como la presencia de frutos fusiformes, propios de una variedad acriollada con flores rojizas, más comúnmente asociados a variedades trinitarias o forasteras (Figura 2A). En otros materiales, se observaron frutos amelonados, característicos del cacao forastero, con flores blancas asociadas al tipo criollo (Figura 2 B).

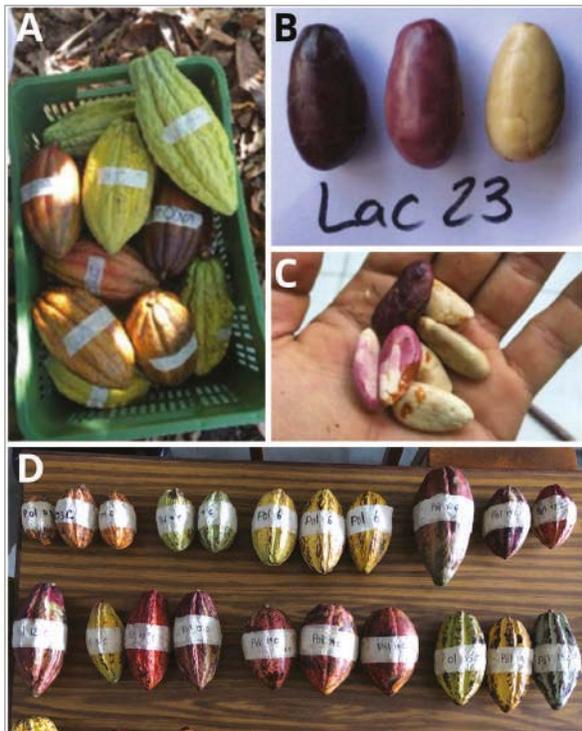
En las parcelas estudiadas, se observó una alta variabilidad fenotípica en frutos y semillas (Figura 3). Sabiendo que muchos árboles son autoincompatibles, es muy probable que los árboles de una misma parcela se estén hibridando. Por lo tanto, si existe una alta variabilidad fenotípica dentro de la misma parcela, y asumiendo que estos árboles se están cruzando, esto da como resultado una mayor mezcla de las características en las semillas resultantes. Esto puede notarse en las semillas, donde para un mismo fruto se observan

semillas de distintas coloraciones (Figura 3), confirmando las altas tasas de hibridación y de variabilidad fenotípica.

El análisis de correspondencia canónica nos muestra que para ninguno de los órganos analizados (árbol, hojas, flores, frutos y semillas) hubo formación de grupos que puedan corresponder a variedades claras. Sin embargo, se pueden observar algunas tendencias. Según las medidas de los árboles y el análisis de correspondencia canónica, existe un

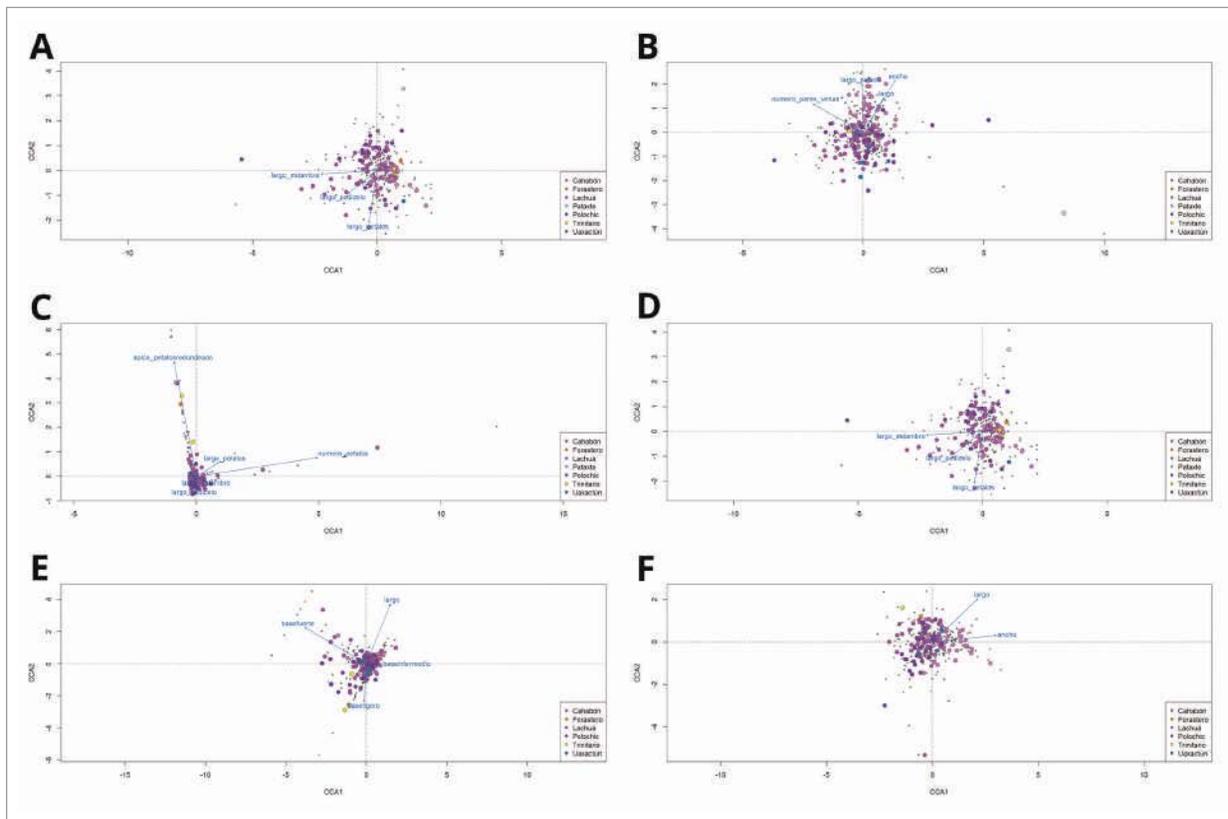


**Figura 2.** Fotografías *in situ* del hábito, flores y frutos de los especímenes Lac24C (A) y Lac42C (B) en la subregión Lachuá.



**Figura 3.** Fotografías de la variabilidad morfológica en frutos de la misma parcela (A), las semillas del mismo fruto (B), la coloración variegada y sólida en semillas (C), y en frutos dentro de la misma subregión Polochic (D).

grupo de muestras de Cahabón que posee árboles de mayor altura que el resto de las muestras (Figura 4A). Esto no puede relacionarse con la genética del árbol, debido a que los árboles de Cahabón son árboles de mayor edad que los árboles de las otras subregiones, por lo que la mayor altura se debe principalmente a la edad de los árboles. De igual manera, unas muestras de Polochic poseen una mayor cantidad de frutos, lo que podría sugerir una mayor productividad. Sin embargo, hay que tomar en cuenta el tamaño del fruto, la cantidad y tamaño de las semillas, para poder evaluar la productividad de cada árbol. En este caso, aunque las medias no son significativamente distintas, sí se observa, que, aunque el número de semillas es igual en las tres subregiones, los frutos de Polochic son un poco más pequeños, al igual que las semillas (Figura 4E y 4F). En las mediciones de las flores (Figura 4C), existe un grupo de muestras de Lachuá con un mayor largo de pedicelo y largo de pétalo. Aunque no es propiamente un grupo, podemos ver que sí existen varias muestras de Lachuá (especialmente Lac10C a Lac15C) que tienen características distintas al resto. Según el análisis molecular, este grupo no forma un grupo distinto, sin embargo, sí se agrupa en un grupo mucho mayor con algunos controles criollos. Esto podría indicar que este grupo tiene una tendencia a una variedad acriollada y que las características de largo de pedicelo y largo del pétalo podrían establecerse como marcadores morfométricos.



**Figura 4.** Análisis de correspondencia canónica de las características morfológicas y morfométricas de árboles (A), hojas (B), flores (C y D), frutos (E) y semillas (F) de árboles élite de cacao.

**Cuadro 3.** Árboles élite con semillas blancas y flores blancas en las tres subregiones.

	Árboles con flores blancas	Árboles con semillas blancas
<b>Lachúa</b>	Lac28C, Lac37C, Lac38C, Lac51C, Lac52C, Lac53C, Lac54C, Lac55C, Lac57C, Lac58C, Lac63C. (11/65) 17%	Lac04C, Lac07C, Lac09C, Lac10C, Lac13C, Lac17C, Lac23C, Lac24C, Lac28C, Lac30C, Lac31C, Lac34C, Lac38C, Lac40C, Lac53C, Lac58C, Lac62C, Lac63C. (18/65) 28%
<b>Cahabón</b>	Cah17C, Cah21C, Cah22C, Cah24C, Cah25C, Cah26C, Cah27C, Cah28C, Cah29C, Cah30C, Cah37C. (11/55) 20%	Cah01C, Cah10C, Cah17C, Cah22C, Cah24C, Cah25C, Cah29C, Cah30C, Cah34C, Cah35C, Cah36C, Cah44C, Cah48C, Cah49C, Cah54C (15/65) 27%
<b>Polochic</b>	Pol10C, Pol26C, Pol28C, Pol29C. (4/30) 13%	Pol04C, Pol07C, Pol08C, Pol18C, Pol21C, Pol 22C, Pol24C, Pol27C, Pol28C, Pol30C. (11/30) 37%
<b>Total</b>	<b>(26/150) 17.3%</b>	<b>(44/150) 29.3%</b>

Sin embargo, es necesario ampliar el estudio para poder verificarlo. La existencia y validez de estos marcadores podría facilitar la identificación en campo de árboles con genética similar a este grupo de Lachúa.

De los 150 árboles estudiados se encontró árboles con flores blancas (17.3%) y árboles con semillas blancas o moteadas con blanco (29.3%). Estas características están típicamente relacionadas con variedades de cacao criollo, por lo que se puede decir que estos árboles (Cuadro 3) podrían clasificarse como trinitarios acriollados. Sin embargo, se observó pocos árboles (12 árboles, que equivalen al 8% del total de árboles élite) con ambas características (individuos marcados con azul en el cuadro 3). En el resto de árboles se observó la presencia de flores blancas pero con semillas moradas o semillas blancas pero con flores rojizas.

### Caracterización genética

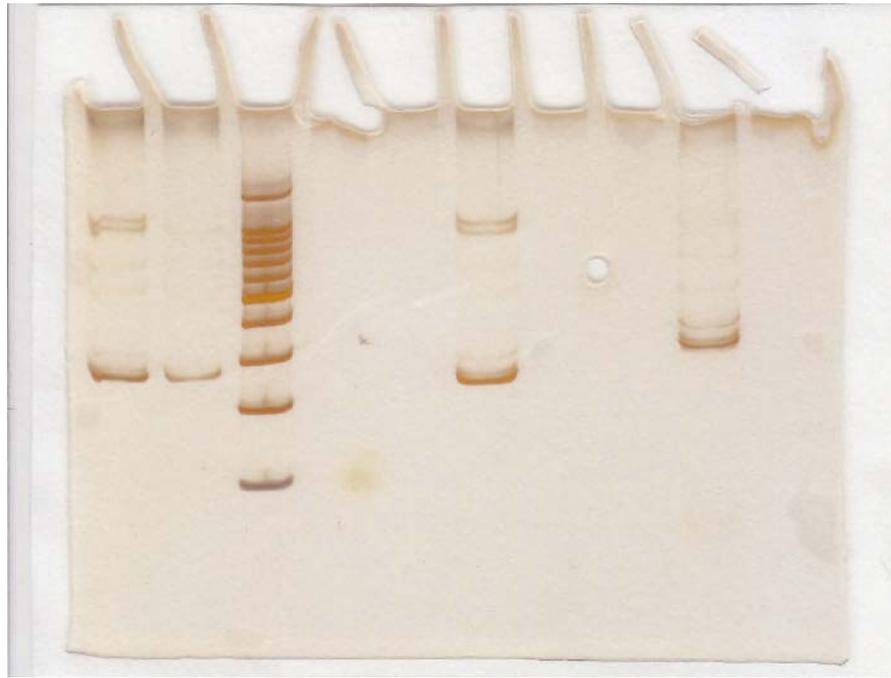
Los resultados del análisis molecular indican que los 11 marcadores utilizados son altamente polimórficos para la población estudiada, presentando un mayor número de alelos que los reportados previamente en la literatura (Cuadro 4). Este alto polimorfismo podría deberse a que en el estudio se incluyeron individuos provenientes de diferentes parcelas y distintas subregiones, sugiriendo que estas parcelas se originaron a partir de una alta variedad de materiales parentales. Cabe destacar los marcadores mTcCIR04, mTcCIR28 y mTcCIR40, los cuales presentaron un número de alelos mayor a 30, indicando una alta variabilidad genética.

De acuerdo al análisis de agrupamiento jerárquico (Figura 6) se distinguen un conjunto de árboles ubicados en Cahabón

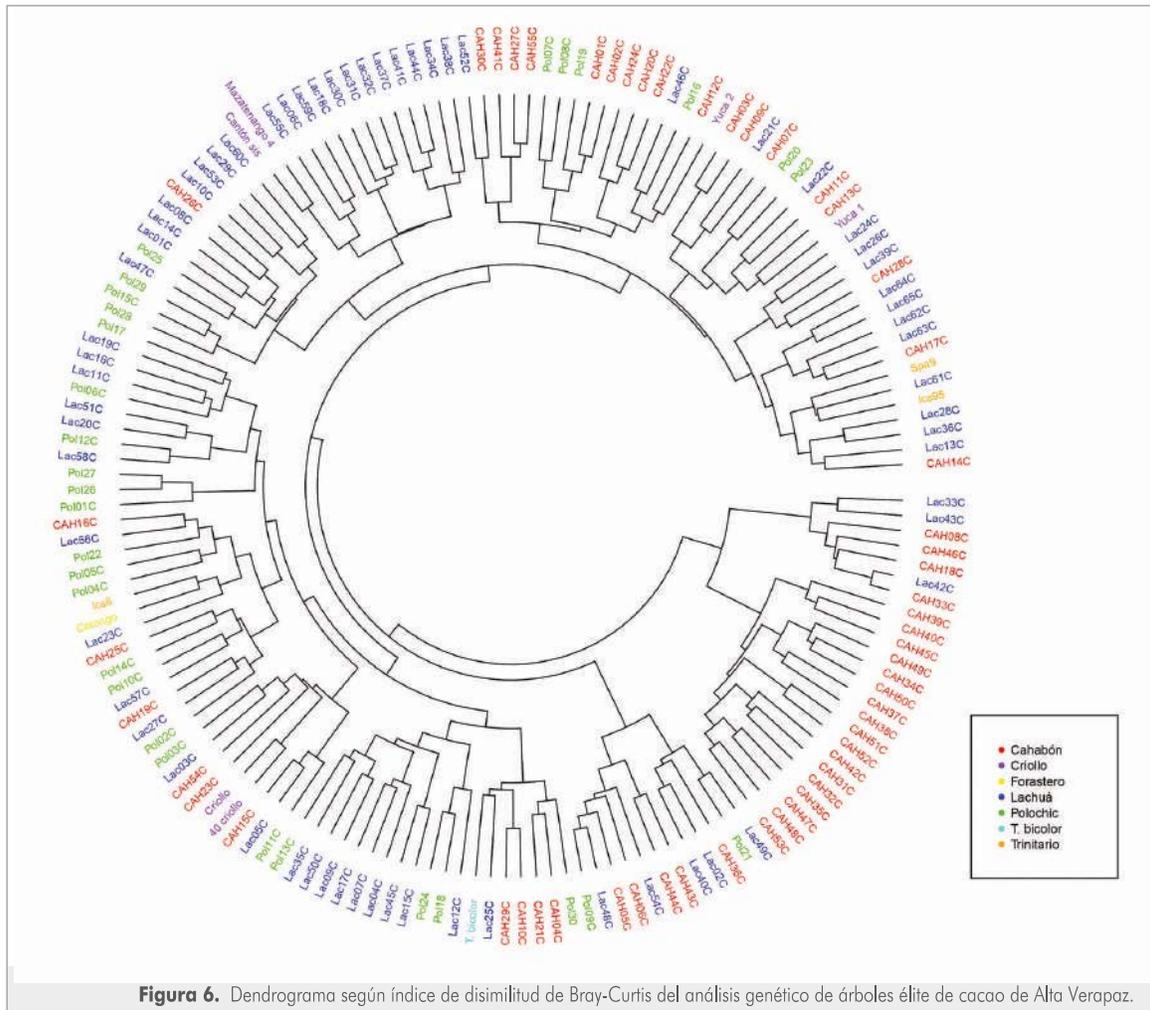
**Cuadro 4.** Comparación del número de alelos reportados en la literatura y el número de alelos obtenidos en la caracterización molecular de los árboles élites de cacao.

Marcador microsatélite	No. Alelos reportados	No. Alelos Observados
mTcCIR01	3-10	12
mTcCIR03	6-15	18
mTcCIR04	3	32
mTcCIR10	4-18	21
mTcCIR19	6-10	28
mTcCIR25	11-13	14
mTcCIR28	2	34
mTcCIR37	6-13	16
mTcCIR40	6-10	31
mTcCIR58	6-12	27
mTcCIR60	8	22

con mayor similitud entre sí, pero que no se agrupan con ninguno de los controles. Estos resultados sugieren que podría tratarse de materiales que provienen de los mismos parentales. Un grupo de cuatro árboles de Lachúa (Lac62C a Lac65C) presentan similitud genética y también se encuentran geográficamente cerca, presentan características intermedias entre cacao criollo y forastero y se encuentran más cercanos a los controles trinitarios. Otro grupo de trece individuos de Lachúa se localiza en una de las ramas del dendrograma



**Figura 5.** Muestras amplificadas con marcadores microsatélites visualizadas en PAGE 10%. MM: Marcador de peso molecular (100 pb).



**Figura 6.** Dendrograma según índice de disimilitud de Bray-Curtis del análisis genético de árboles élite de cacao de Alta Verapaz.

cerca de los controles criollos (Cantón Sis y Mazatenango 4) provenientes de la granja Zahorí de la USAC. De estos materiales, al menos el 40% (Lac18C, Lac30C, Lac31C, Lac34C, Lac38C) presentaban un alto porcentaje de semillas blancas de acuerdo al análisis morfológico y al menos el 50% presentaba coloraciones claras en sus flores. Materiales provenientes de las tres regiones (Lac03C, Lac05C, Cah15, Cah23, Cah54, Pol03, y Pol11) se agruparon con los controles criollos provenientes de la colección de CATIE y morfológicamente presentaron características intermedias entre cacao criollo y trinitario, por lo que se sugiere que se trata de trinitarios acriollados. Nueve materiales de las tres sub-regiones de estudio (Lac21, Lac22, Cah03, Cah07, Cah09, Cah11, Cah13, Pol20 y Pol23) presentaron características morfológicas de cacao trinitario, pero se agruparon con los controles criollos Yucatan greenhouse 1 y 2.

Individuos de las tres subregiones de estudio (Lac23C, Lac56C, Cah16C, Pol04C, Pol05C, Pol22C) se agruparon con los controles Catongo (amazónico) e ICS 6 (trinitario), por lo que podría tratarse de trinitarios forasteros. En cuanto a sus características morfológicas, el 50% (Lac23, Pol04C, Pol22C) presentó algún porcentaje de de semillas blancas y flores de color claro. Estos rasgos corresponden a los expresados por el material Catongo, que a pesar de ser un material amazónico presenta coloración blanca en sus semillas como consecuencia de un gen inhibidor de antocianinas que evita que se exprese el pigmento morado (Bartley, 2005). Un dato importante es que de estos materiales, Lac23C y Pol04C fueron los únicos que presentaron síntomas de enfermedad durante el monitoreo de las plantaciones, observándose el daño exclusivamente en frutos. A pesar de ello continuaron siendo altamente productivos y debido a que los otros individuos no presentaron

síntomas o signos de enfermedades a pesar de encontrarse en plantaciones afectadas, podría tratarse de materiales resistentes o con algún grado de resistencia, característica derivada de la genética del cacao forastero. Sin embargo, es necesario que se compruebe esta hipótesis con ensayos de inoculación. Debido a la similitud que presentaron con el clon ICS-6, que al igual que el Catongo se trata de un material autocompatible, dichos materiales son candidatos para ser utilizados en estudios de auto e intercompatibilidad.

Hay un conjunto de árboles de Cahabón (Cah4C, Cah10C, Cah21C, Cah29C), uno de Polochic (Pol30C) y uno de Lachuá (Lac25C) que se agrupó con el control ICS-95, que igual al ICS-6 es un trinitario auto-compatible, por lo que también se recomienda realizar los estudios de compatibilidad sugeridos para el grupo anterior. De este conjunto de árboles, los frutos de tres individuos (Cah10C, Cah29C y Pol30C) presentaron semillas blancas y las flores de otros tres presentaban coloración clara (Cah21C, Cah29C y Lac25C), sugiriendo que son materiales trinitarios acriollados.

El resto de individuos, en especial los colectados en Polochic, se encuentran de forma más dispersa en el dendrograma, al presentar características botánicas intermedias entre cacao criollo y forastero, por lo que pueden ser clasificados como trinitarios. De esta manera, el análisis de agrupamiento jerárquico sugiere una alta tasa de hibridación del cacao colectado en las subregiones de estudio, siendo la variedad predominante la de cacao trinitario. En cuanto al número de alelos reportado para cada marcador, puede observarse que hay una alta variabilidad genética entre los materiales, característica que se expresa a nivel morfológico y morfométrico.

## CONCLUSIONES

- De acuerdo a las observaciones de campo y la variabilidad en el análisis morfológico y morfométrico, se observa alta variabilidad morfológica y morfométrica en las poblaciones de cacao estudiadas en las subregiones de Lachuá, Cahabón y Polochic en Alta Verapaz.
- De acuerdo al análisis de correspondencia canónica, no hay grupos definidos botánicamente y la localidad no es una variable que explique la variación morfológica, sugiriendo una alta tasa de hibridación.
- Las características de largo de pedicelo y largo del pétalo podrían establecerse como marcadores morfométricos para variedades trinitarias acriolladas. El color de las semillas y de las flores es otra característica que puede tomarse en cuenta para variedades acriolladas o variedades albinas como Catongo.
- Los marcadores microsatélites utilizados en este estudio son polimórficos para las poblaciones de cacao estudiadas en las subregiones de Lachuá, Cahabón y Polochic en Alta Verapaz.
- De acuerdo al análisis de agrupamiento jerárquico, se identificaron dos grupos importantes según la localización: uno en Cahabón que no estaba asociado a uno de los controles y uno de Lachuá que se agrupó con controles criollos y además presenta características morfológicas asociadas a este tipo de cacao.
- De acuerdo al análisis genético y botánico, ninguno de los materiales es 100% cacao criollo o forastero, todos presentaron características intermedias entre estos dos tipos de cacao, sin embargo, pueden clasificarse como trinitarios, trinitarios acriollados y trinitarios forasteros.

## AGRADECIMIENTOS

A los productores y presidentes de las asociaciones KATBALPOM, ASODIRP, ASOLSERNOR, ADEMAYACH, APODIP, APIDIP y APRODERK por darnos acceso para trabajar en sus plantaciones.

A los técnicos de campo Carlos Caal, Dennis Imanol Medina, Luis David Morales, Diana López, Keni Ixim, Alejandro Tec y Yolanda Tzalam por el apoyo durante el monitoreo de las plantaciones y colecta de muestras.

Al Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA, por sus siglas en inglés) por el financiamiento de este estudio

a través del programa Consorcios Regionales de Investigación Agropecuaria (CRIIA) (Contrato IICA-CRIIA-044-2018), ejecutado a través del Convenio de Cooperación Técnica y Administrativa 11-2015 suscrito entre el Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación –MAGA- y el Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura –IICA-. Al Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura por el seguimiento de las actividades, el apoyo para la comunicación con los actores de la agrocadena y la divulgación de resultados.

## BIBLIOGRAFÍA

- Aragon Obando, E.M. (2009). Caracterization of *Theobroma cacao* L. in Nicaragua using SSR. Tesis de maestría. Universidad de Helsinki. 48pp.
- Arvelo, M. A., González D., Delgado T. y. Maroto, S. (2017). Estado actual sobre la producción, el comercio y cultivo del cacao en América / Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA), Fundación Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas. - San José, C.R. : IICA. 280pp.
- Avalos A., Porres M.A., Pöll E., Dardón E., Arévalo L.A. y Rosales A. (2012). Caracterización agronómica, botánica y molecular de clones de cacao tipo criollo y mejorado de la zona sur de Guatemala. *Revista de la Universidad del Valle de Guatemala* 24: 99-104
- Barreto, M.A., Rosa, J.R.B.F., Holanda, I.S.A. Cardoso Silva, C.B, Vildoso, C. I. A., Ahnert, D. Souza, M.M., Corrêa, R. X., Royaert, S., Marelli, J., Santos, E. S. L., Luz, E. D. M. N. Garcia, A. A. F. y Souza, A. P. (2018). QTL mapping and identification of corresponding genomic regions for black pod disease resistance to three *Phytophthora* species in *Theobroma cacao* L.. *Euphytica* 214, 188.
- Bartley, Basil G.D., (2005). The genetic diversity of cacao and its utilization. Cabi.
- Cuatrecasas, J. (1964). Cacao and its allies: A taxonomic revision of the genus *Theobroma*. *Contr. U.S. Natl. Herb.* 35: 379-614.
- Cryer N.C., Fenn M.G.E., Turnbull C.J., Wilkinson M.J. (2006). Allelic size standards and reference genotypes to unify international cocoa (*Theobroma cacao* L.) microsatellite data. *Genetic Resources and Crop Evolution* 53: 1643-1652
- Feltus, F.A., Sasaki, C.A., Mockaitis, K., Haiminen, N., Parida L. Smith, Z, Ford, J., Staton, M.E., Ficklin S. P., Blackmon, B. P., Cheng, C., Schnell, R.J., Kuhn, D. N. and Motamayor, J.C. (2011). Sequencing of a QTL-rich region of the *Theobroma cacao* genome using pooled BACs and the identification of trait specific candidate genes. *BMC Genomics* 12, 379.
- Johnson E.S., Bekele F.L., Brown S.J., Song Q., Zhang D., Meinhardt L.W., Schnell R.J. (2009). Population Structure and Genetic Diversity of the Trinitario Cacao (*Theobroma cacao* L.) from Trinidad and Tobago. *Crop Science* 49: 564-572
- Lanaud C., Risterucci A.M., Pieretti I., Falque M., Bouet A., Lagoda P.J.L. (1999). Isolation and characterization of microsatellites in *Theobroma cacao* L. *Molecular Ecology* 8: 2141-2152.
- Lanaud, C., Risterucci, A., Pieretti, I., N'Goran, J., y Fargeas, D. (2004). Characterisation and genetic mapping of resistance and defence gene analogs in cocoa (*Theobroma cacao* L.). *Mol Breed.* 13. 211-227.
- Lanaud, C., Fouet, O., Clément, D., Boccara, M., Risterucci, A. M., Surujdeo, S., Legavre, T. y Argout, X. (2009). A meta-QTL analysis of disease resistance traits of *Theobroma cacao* L. *Mol Breeding* 24, 361-374.
- Lattoo, S. Dhar, R., Khan, S., Bamotra, S., Bhan, M., Dhar, A. y Gupta, K. (2008). Comparative analysis of genetic diversity using molecular and morphometric markers in *Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees. *Genetic Resources and Crop Evolution* 55: 33-43.
- Lloor R.G., Risterucci A.M., Courtois B., Fouet O., Jeanneau M., Rosenquist E., Amores F., Vasco A., Medina M., Lanaud C. (2009). Tracing the native ancestors of the modern *Theobroma cacao* L. population in Ecuador. *Tree Genetics & Genomes* 5: 421-433.
- Mathew, K. (2014). Optimization of genomic DNA extraction from fresh and dry leaves of large cardamom (*Amomum subulatum* Roxb.) for diversity analysis. *Indian Journal of Biotechnology.* 13: 221-224.
- Motilal L.A., Zhang D., Umaharan P., Mischke S., Mooledhar V., Meinhardt L.W. (2009). The relic Criollo cacao in Belize - genetic diversity and relationship with Trinitario and other cacao clones held in the International Cocoa Genebank, Trinidad. *Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization:* 1-10.

- Motamayor J.C., Lachenaud P., da Silva E.M.J.W., Loo R., Kuhn D.N., Brown J.S., Schnell R.J. (2008). Geographic and genetic population differentiation of the Amazonian chocolate tree (*Theobroma cacao* L). *PLoS One*. 3(10): 3311.
- Murray, M. y Thompson, W. (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*. 8(19): 4321-4325.
- Saunders J.A., Mischke S., Leamy E.A., Hemeida A.A. (2004). Selection of international molecular standards for DNA fingerprinting of *Theobroma cacao*. *Theor Appl Genet* 110: 41-47.
- Schnell R.J., Olano C.T., Brown J.S., Meerow A.W., Cervantes, C. (2005). Retrospective Determination of the Parental Population of Superior Cacao (*Theobroma cacao* L.) Seedlings and Association of Microsatellite Alleles with Productivity. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 130 (2): 181-190
- Sereno, M.L., Albuquerque P.S.B., Vencovsky R., Figueira A. (2005). Genetic diversity and natural population structure of cacao (*Theobroma cacao* L.) from the Brazilian Amazon evaluated by microsatellite markers. *Conservation Genetics*: 1-12
- Somarriba, E., Villalobos M. y Orozco L. (2008). Cocoa in Central America. *Global Research on Cocoa - working with and for farmers*. Issue 14.
- Weising, K., Nybom, H., Pfenninger, M., Wolff, K., y Kahl, G. (2005). *DNA Fingerprinting in Plants: Principles, Methods, and Applications*. 2ª edición. CRC Press, Estados Unidos. 472 pp.
- Zarrillo, S., Gaikwad, N., Lanaud, C., Powis, T., Viot, C., Lesur, I., Fouet, O., Argout, X., Guichoux, E., Salin, F., Solorzano, R. L., Bouchez, O., Vignes, H., Severt, P., Hurtado, J., Yopez, A., Grivetti, L., Blake M., y Valdez, F. (2018). The use and domestication of *Theobroma cacao* during the mid-Holocene in the upper Amazon. *Nature Ecology & Evolution*. (2): 1879-1888.