

**UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE AGRONOMÍA
COMISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
POSTGRADO EN AGRONOMÍA**

**ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DEL CACAO (*Theobroma cacao*
L.) VENEZOLANO RESGUARDADO EN LOS BANCOS DE GERMOPLASMA
NACIONAL, CON MIRAS A ESTABLECER PROGRAMAS DE
MEJORAMIENTO GENÉTICO**

Tesista: Ing. Agro. Julio E Salazar G.

Tutora: Dra. Catalina Ramis

Maracay, abril de 2016

Trabajo presentado como requisito final para optar al título de **Magister Scientiarium** en Agronomía, orientación Mejoramiento de plantas y Biotecnología

Prof. Catalina Ramis

TUTORA



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE AGRONOMÍA
COMISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
POSTGRADO EN AGRONOMÍA
VEREDICTO

Comisión de Estudios
de Postgrado

Quienes suscriben, miembros del jurado designado por el Consejo de la Facultad de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela, para examinar el **Trabajo de Grado** presentado por: **JULIO ENRIQUE SALAZAR GONZÁLEZ, C.I. 17.014.086**, bajo el título "**ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DEL CACAO (*Theobroma cacao* L.) VENEZOLANO RESGUARDADO EN LOS BANCOS DE GERMOPLASMA NACIONAL, CON MIRAS A ESTABLECER PROGRAMAS DE MEJORAMIENTO GENÉTICO**", a fin de cumplir con el requisito legal para optar al grado académico de **Magíster Scientiarum en Agronomía**, dejan constancia de lo siguiente:

1.- Leído como fue dicho trabajo por cada uno de los miembros del jurado, se fijó el día 06 de abril de 2016 a las 09:00 am., para que el autor lo defendiera en forma pública, lo que éste hizo en el Salón "D" del Doctorado en Ciencias Agrícolas, mediante un resumen oral de su contenido, luego de lo cual respondió satisfactoriamente a las preguntas que le fueron formuladas por el jurado, todo ello conforme con lo dispuesto en el Reglamento de Estudios de Postgrado.

2.- Finalizada la defensa del trabajo, el jurado decidió **APROBARLO**, por considerar, sin hacerse solidario con la ideas expuestas por el autor, que se ajusta a lo dispuesto y exigido en el Reglamento de Estudios de Postgrado.

Para dar este veredicto, el jurado estimó que el trabajo examinado representa un aporte valioso de integración de información unificada, tanto morfológica como molecular de las colecciones de cacao a nivel nacional que permitirá el desarrollo de un catálogo para Venezuela.

Utiliza distintas técnicas estadísticas para el análisis de la diversidad genética del cacao nacional resguardado en los Bancos de Germoplasma.



Se presenta información básica importante para la conformación de un programa nacional de mejoramiento genético en cacao.

Se detectó un nuevo grupo morfogeográfico de cacao no conocido hasta el presente, denominado "Tuy", por haberse detectado en la cuenca del Río Tuy, edo. Miranda.

El Jurado estimó por toda la información generada, la calidad de manuscrito y la defensa pública, otorgarle la calificación de **EXCELENTE**.

En fe de lo cual se levanta la presente ACTA, a los 06 días del mes de abril del año 2016, conforme a lo dispuesto en el Reglamento de Estudios de Postgrado, actuó como Coordinadora del jurado la Dra. Catalina Ramis.



Dr. LUIS ANGULO
C.I. 10.345.079
AGRONOMÍA-UCV



Dra. MARÍA MARCANO
C.I. 5.311.333
ULA-MÉRIDA



Dra. CATALINA RAMIS
C.I. 5.614.038
AGRONOMÍA-UCV
Tutora

CR/zp
06/04/16

DEDICATORIA

A mi madre Carmen Rosalía, a mi padre Julio, a mis hermanas Ychendry y Ychelyn, a mis esposa Gabriela y mi hija Fabiana por todo el amor y cariño que me han expresado todo este tiempo, los quiero muchísimo y que Dios nos de mucha salud para seguir alcanzando sueños.

AGRADECIMIENTO

Primeramente a Dios por haberme dado la oportunidad de continuar mi desarrollo profesional y personal.

A mis padres Carmen y Julio, por apoyarme en todo mi desarrollo como persona, por sus enseñanzas y orientaciones, los amo mucho.

A mis hermanas Yohendry y Yohelyn por compartir las enseñanzas de vida adquiridas en nuestro hogar.

A mi esposa Gabriela por el amor y comprensión ofrecida en los años de vida junto a mí, siempre estere agradecido por el apoyo incondicional ofrecido, te amo mucho.

A mi hija Fabiana por haberme ofrecido el grandioso privilegio de ser padre. Te amo mucho mi negra.

A la Doctora Catalina Ramis por haber confiado en mí, también por haberme guiado en toda mi vida profesional, gracias por su apoyo incondicional, estaré siempre agradecido por la formación profesional y moral que siempre me inculco la cual está y estará en mis actos.

A mi amiga María Eugenia por haber compartido muchos momentos agradables y difíciles, dándome mucho apoyo.

A mi amigo edgar Marín, su esposa Nereida y mi ahijado Harol, por toda esa amistad expresada a través de los años

A mis amigos Carliz y Luis y toda su familia por su apoyo y buenos momentos compartidos, les expreso mi gran estima.

A mi Tía María y mi Primo Carlucho por todo ese cariño hacia mí, los quiero mucho.

A mi Tía Esther por estar siempre apoyándome.

A la UCV, Facultad de Agronomía **“La Casa que Vence la Sombra”**, por haberme cobijado en sus áreas del saber, siempre estaré conectado con ese campus de estudio.

A el Laboratorio del Centro de Investigaciones en Biotecnología Agrícola (CIBA) y a todos esos colegas (Luis, Katuska, Ángela) por todas sus orientaciones, inmensamente agradecido.

A mis amigos de la Dirección General de Diversidad Biológica por compartir a mi lado un espacio cordial, extendiendo mí saludo a: Yaillet, Manuel, Hernando, Leonardo, Edguar, Wuillian, Gabriela, Yely, José Enrique, Amada, Lorena, Dilia, Richard, Osman, Rafael, Zaida, Luz María, Oswaldo, Argenis, Minerva, Yimmy, Yermi, Lisandro, Francisco, Javier, Liruek, Caril, Yukensy.

Al Proyecto en red “Ruta del Chocolate”, por permitirme conocer las maravillas que engloban al cultivo Cacao.

RESUMEN

Venezuela es reconocida por producir cacaos finos de aroma con excelentes características organolépticas a partir de variedades de tipo Criollo y Trinitarios, muy solicitados en el mercado internacional para la elaboración de chocolates. El objetivo general del trabajo fue analizar la diversidad genética del cacao resguardado en los bancos de germoplasma del país, a fin de realizar recomendaciones para su aprovechamiento en los programas de mejoramiento genético. El trabajo tuvo como base la caracterización morfológica y molecular de 623 genotipos distribuidos en 10 bancos de germoplasma distribuidos en distintas regiones del país, realizada en el subproyecto “Diversidad Genética del Cacao Venezolano”, como parte del proyecto de Investigación en Red “Ruta del Chocolate”. Para la evaluación morfológica se consideraron 28 características cuantitativas y 20 características cualitativas. En cuanto a la caracterización molecular se emplearon datos resultantes de 24 microsátélites. Para determinar la diversidad genética de la especie a nivel morfológico se utilizaron indicadores estadísticos para el estudio poblacional como lo son el índice de diversidad de Nei y el análisis de componentes principales. Para los datos moleculares se empleó el análisis UPGMA basado en el índice de DICE. Tanto para las características morfológicas como moleculares, los estudios se realizaron en una primera etapa para cada banco de germoplasma. Destacando en esa etapa las variables que mejor explicaban la diversidad genética resguardada y los grupos genéticos. Con esa información se seleccionaron genotipos representativos de la diversidad genética y se construyó una matriz para la caracterización a nivel nacional. Con tal matriz se realizó el análisis antes realizado por banco de germoplasma; adicionalmente, la estructura genética de las colecciones se realizó a través del análisis basado en los métodos de estadística Bayesiana, mediante el programa *Structure*. La descripción morfológica que evidenció la mayor variabilidad entre bancos de germoplasma y entre genotipos fue la caracterización cualitativa de los frutos. A nivel morfológico se evidenció la conformación de un grupo no correspondiente a ningún referencial utilizado, estos genotipos en su mayoría corresponden a la colección jardín Clonal Padrón. A través del estudio de la estructura genética poblacional se logró identificar este grupo genético antes evidenciado. En cuanto a la estructura poblacional del resto del país se definió de la siguiente manera, las colecciones 1945, 1995, Barlovento y Margarita son predominantemente del grupo trinitario, la colección de Irapa es la colección con mayor la introgresión genética de los grupos establecidos, las colecciones de la región occidental fueron caracterizadas dentro del grupo criollo. Los resultados indican que existe suficiente variabilidad resguarda en estos bancos de germoplasma disponibles para los programas de mejoramiento genético. Finalmente, se realiza un análisis de las posibilidades para un programa nacional de mejoramiento genético en cacao, comparando con experiencias a nivel mundial.

Palabras claves: *Theobroma cacao* L., banco de germoplasma, diversidad genética.

SUMMARY

Venezuela is renowned for producing fine cocoa aroma with excellent organoleptic characteristics from varieties of Criollo and Trinitarios, much sought after in the international market for the production of chocolates. The overall objective of the study was to analyze the genetic diversity of cacao protected in genebanks of the country, in order to make recommendations for their use in breeding programs. The work was based on morphological and molecular characterization of 623 genotypes distributed in 10 genebanks distributed in different regions of the country, held in the sub-project "Genetic Diversity of Cocoa Venezuelan", as part of the Research Network "Chocolate Route ". For morphological evaluation quantitative characteristics 28 and 20 qualitative characteristics were considered. As for the molecular characterization data resulting from 24 microsatellites were used. To determine the genetic diversity of the species morphologically statistical indicators for the study population as are the Nei diversity index and principal component analysis were used. Molecular data for analysis based on the UPGMA index DICE was used. Both morphological characteristics and molecular, studies were conducted in a first stage for each genebank. Stressing at that stage the variables that best explained the genetic diversity and genetic protected groups. With that information representative of the genetic diversity genotypes they were selected and a matrix for characterization was built nationwide. With such a matrix analysis before by genebank it was conducted; additionally, the genetic structure of the collections was carried through based on Bayesian statistical methods, using the Structure analysis program. The morphological description that showed the greatest variability between genebanks and between genotypes was the qualitative characterization of the fruits. A morphological conformation of a not corresponding to any benchmark used group showed these genotypes mostly correspond to the collection Clonal garden Padrón. Through the study of population genetic structure was identified this genetic group before shown. As for the population structure of the rest of the country was defined as follows, collections 1945, 1995, Barlovento and Margarita are predominantly of trinitarian group, collection Irapa is the collection more genetic introgression of established groups, collections of the western region were characterized in the Creole group. The results indicate that there is enough variability shelters in these genebanks available for breeding programs. Finally, an analysis of the possibilities for a national breeding program in cocoa, compared with experiences worldwide is performed.

Keywords: *Theobroma cacao* L., genebanks, genetic diversity.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
Portada	i
Resumen	ii
Tabla de Contenido	iii
Índice de Cuadros	vi
Índice de Figuras	ix
Índice de Anexos	x
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	5
General	5
Específicos	5
ANTECEDENTES	6
Identificación del cultivo	6
Teorías sobre el origen del cacao	7
Estudio de la diversidad genética	8
Estructura genética de poblaciones	9
Análisis de la diversidad del cacao	10
La domesticación y la dispersión del cacao	12
Origen del cacao cultivado en Venezuela	15
Aplicación de marcadores moleculares en el mejoramiento del cacao experiencia nacional y global	16
Proyecto de investigación en red “Ruta del chocolate”	19
Bancos de germoplasma	20
Análisis multivariado en estudios de diversidad genética	24
Análisis de componentes principales	25
Estadística bayesiana	26

MATERIALES Y METODOS	28
Material vegetal	28
Verificación de la información morfológica	29
Verificación de la información molecular	29
Análisis Estadístico	32
Caracterización Morfológica	32
Selección de características morfológicas por banco de germoplasma	32
Selección de genotipos por banco de germoplasma	33
Análisis de la diversidad genética a partir de datos morfológicos	34
Caracterización Molecular	35
Cuantificación de la variabilidad genética de cada banco de germoplasma y a nivel nacional	35
Selección de genotipos a partir de datos moleculares	35
Similitud genética	35
Estructura Genética de las colecciones de Cacao en Venezuela	36
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
1. VERIFICACIÓN DE LA INFORMACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE CADA BANCO DE GERMOPLASMAS, A FIN DE CONSOLIDAR LA INFORMACIÓN APROVECHABLE PARA EL ANÁLISIS DE DIVERSIDAD GENÉTICA	38
2. ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA NACIONAL CON BASE EN VARIABLES MORFOLÓGICAS Y MOLECULARES	41
2.1. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LOS BANCOS DE GERMOPLASMA A NIVEL NACIONAL	42
2.1.1. Características cualitativas por órgano	42
2.1.2. Características cuantitativas por órgano	52
2.1.3. Selección de características morfológicas por banco de germoplasma	63
2.1.4. Selección de genotipos por banco de germoplasma	72

2.1.5. Análisis de la diversidad genética nacional del cacao Venezolano con base en la Caracterización Morfológica	74
2.1.6. Estudio de Diversidad Genética Nacional basado en la caracterización morfológica de accesiones de cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.) seleccionados representativos de los banco de germoplasma	75
2.1.7. Análisis de componentes principales de los genotipos de cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.) seleccionados por banco de germoplasma	85
2.2. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LOS BANCOS DE GERMOPLASMA DEL PAÍS	88
2.2.1. Verificación de información molecular	88
2.2.2. Caracterización molecular de la región central del País	89
2.2.3. Caracterización molecular de región occidental del país	94
2.2.4. Caracterización molecular de la región oriental del País	96
2.2.5. Selección de genotipos de cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.) representativos de la diversidad genética resguardada en cada banco de germoplasma, con base en la caracterización molecular por microsatélites.	97
2.2.6. Estudio de Agrupamiento de los genotipos de cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.) representativos de la diversidad genética de cada banco de germoplasma, a partir de datos moleculares.	100
2.2.7. Estructura genética poblacional de las colecciones de cacao en Venezuela, mediante el análisis molecular por microsatélites.	104
3. ESTRATEGIAS PARA LA FORMACIÓN DE POBLACIONES BÁSICAS Y CRITERIOS DE SELECCIÓN PARA LOS PROGRAMAS DE MEJORAMIENTO GENÉTICO.	116
CONCLUSIONES	127
RECOMENDACIONES	130
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	131
ANEXOS	143

INDICE DE CUADROS

Cuadro N°		Pag.
1.	Introducción del cultivo de cacao por parte de los colonizadores europeos.	14
2.	Localización geográfica de los Bancos de Germoplasma de cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.).	23
3.	Número de accesiones de cacao conservadas y caracterizadas a nivel morfológico y molecular de los distintos bancos de germoplasma nacional de cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.).	28
4.	Número de características morfológicas consideradas en la caracterización de las accesiones de los Bancos de Germoplasma nacional de cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.), según los descriptores cualitativos y cuantitativos para las distintas partes de la planta.	29
5.	Microsatélites utilizados para el estudio de la diversidad Genética del cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.) en Venezuela	30
6.	Características morfológicas, cualitativas y cuantitativas, incluidas en el estudio de diversidad genética de los bancos de germoplasma nacional de cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.)	39
7.	Número de accesiones caracterizadas y número de microsatélites incluidos en el estudio de diversidad genética basado en el análisis molecular con microsatélites de los bancos de germoplasma nacional de cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.)	40
8.	Frecuencia de cada categoría en número absolutos (FC) y relativos (%) de las características cualitativas de las hojas de cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.) e índices de diversidad (Nei) para cada Banco de Germoplasma.	44
9.	Frecuencia de cada categoría en número absolutos (FC) y relativos (%) de las características cualitativas de las flores de cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.) e índices de diversidad (Nei) para cada Banco de Germoplasma.	46
10.	Frecuencia de cada categoría en número absolutos (FC) y relativos (%) de las características cualitativas de los frutos de cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.) e índices de diversidad (Nei) para cada Banco de Germoplasma.	47
11.	Frecuencia de cada categoría en número absolutos (FC) y relativos (%) de las características cualitativas de las semillas de cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.) e índices de	51

diversidad (Nei) para cada Banco de Germoplasma.

12.	Estadística Descriptiva y los Componentes Principales de mayor peso por banco de germoplasma para las características cuantitativas de hojas de cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.).	53
13.	Estadística Descriptiva por banco de germoplasma para las características cuantitativas de flores de cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.).	56
14.	Estadística Descriptiva por banco de germoplasma para las características cuantitativas de frutos de cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.).	58
15.	Estadística Descriptiva por banco de germoplasma para las características cuantitativas de semillas de cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.).	61
16.	Valores propios, varianza absoluta y acumulada explicada en los componentes principales 1 y 2 para las características que definen las hojas de cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.).	64
17.	Valores propios para los componentes 1 y 2 que evalúan las características de las hojas de cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.).	65
18.	Valores propios, varianza absoluta y acumulada explicada en los componentes principales 1 y 2 para las características que definen las flores de cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.).	66
19.	Valores propios para los componentes 1 y 2 que evalúan las características de las flores de cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.).	67
20.	Valores propios, varianza absoluta y acumulada explicada en los componentes principales 1 y 2 para las características que definen los frutos de cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.).	68
21.	Valores propios para los componentes 1 y 2 que evalúan las características de los frutos de cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.).	68
22.	Valores propios, varianza absoluta y acumulada explicada en los componentes principales 1 y 2 para las características que definen las semillas de cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.).	69
23.	Valores propios para los componentes 1 y 2 que evalúan las características de las semillas de cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.).	70
24.	Características cuantitativas y cualitativas seleccionadas por	71

	banco de germoplasma.	
25.	Genotipos representativos de cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.) para cada banco de germoplasma.	73
26.	Referenciales Internacionales de cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.) utilizados en análisis de diversidad nacional.	74
27.	Características cuantitativas y cualitativas seleccionadas para el análisis de diversidad genética nacional.	75
28.	Descripción de las características cuantitativas de los grupos formados en el análisis de agrupamiento UPGMA basado en distancia euclidiana.	83
29.	Descripción de las características cualitativas de los grupos formados en el análisis de agrupamiento UPGMA basado en distancia euclidiana.	84
30.	Caracterización molecular mediante marcadores tipo microsatélites de 11 bancos de germoplasma de cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.) a nivel nacional. Se muestran: el Índice de Información Polimórfica (PIC), el % de loci heterocigotas observado, y el número de alelos por locus.	93
31.	Genotipos representativos de cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.) para cada banco de germoplasma, a partir de datos moleculares.	99
32.	Proporción genética (Probabilidad posterior) de las colecciones nacionales con respecto a los referenciales morfogeográficos calculadas con el programa STRUCTURE.	113
33.	Clones recomendados como referenciales puros de los grupos morfogeográficos de cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.) presentes en el germoplasma nacional.	118
34.	Caracterización genética, criterios productivos y asociados a calidad de algunos clones de cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.) de interés conservados en distintos bancos de germoplasma a nivel nacional	121

INDICE DE FIGURAS

Fig. Nº		Pag.
1.	Diferenciación genética y geográfica de los 10 grupos de cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.) en centro y sur América.	12
2.	Países de domesticación y establecimiento del cultivo de cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.)	13
3.	Dendograma (UPGMA) basado en la distancia Euclidiana de los 91 genotipos seleccionados y 14 referenciales internacionales de cacao <i>Theobroma cacao</i> L.).	76
4.	Análisis por componentes principales para 91 genotipos seleccionados y 14 referenciales internacionales de cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.), con base en la caracterización morfológica.	87
5.	Dendograma (UPGMA) a partir de los datos moleculares de 115 genotipos seleccionados y 10 referenciales internacionales de cacao <i>Theobroma cacao</i> L.) Utilizando un coeficiente de similitud de DICE.	103
6.	Distribución de los valores de probabilidad Delta K para los conformación desde 1 hasta 10 poblaciones ancestrales, para 115 genotipos de cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.) representativos de la diversidad genética conservada en 11 bancos de germoplasma a nivel nacional.	105
7.	Clúster inferidos para 10 colecciones de cacao nacional (<i>Theobroma cacao</i> L.) usando el Programa STRUCTURE, considerando dos, tres o cinco poblaciones ancestrales (K).	106
8.	Clúster K5 para 115 genotipos de cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.) representativos de la diversidad genética resguardada en los bancos de germoplasma nacional, usando el Programa STRUCTURE.	107
9.	Zonas de colecta de la colección Jardín Clonal Padrón	111
10.	Árbol Neighbor joining a partir de proporciones genéticas (probabilidad posterior) de referenciales morfogeográficos calculado con el Programa STRUCTURE.	115

INDICE DE ANEXOS

Anexo N°

1. Análisis UGPMA a partir de distancia euclidiana entre 10 variables cuantitativas y 9 variable cualitativo de la Colección 1945.
2. Análisis UGPMA a partir de distancia euclidiana entre 13 variables cuantitativas y 9 variable cualitativo de la Colección 1995.
3. Análisis UGPMA a partir de distancia euclidiana entre 11 variables cuantitativas y 7 variable cualitativo de la Colección CORPOZULIA.
4. Análisis UGPMA a partir de distancia euclidiana entre 12 variables cuantitativas y 8 variable cualitativo de la Colección BARLOVENTO.
5. Análisis UGPMA a partir de distancia euclidiana entre 12 variables cuantitativas y 9 variable cualitativo de la Colección IRAPA.
6. Análisis UGPMA a partir de distancia euclidiana entre 13 variables cuantitativas y 5 variable cualitativas de la Colección MÉRIDA.
7. Análisis UGPMA a partir de distancia euclidiana entre 12 variables cuantitativas y 4 variable cualitativo de la Colección UNESUR.
8. Análisis UGPMA a partir de distancia euclidiana entre 12 variables cuantitativas y 7 variable cualitativo de la Colección UNESUR.
9. Análisis UGPMA a partir de datos moleculares utilizando 19 marcadores tipo SSR en individuos de la Colección 1945 (Índice de similitud de DICE).
10. Gráfica de distribución de genotipos de la colección 1945 utilizando el Análisis de Correspondencia.
11. Análisis UGPMA a partir de datos moleculares utilizando 17 marcadores tipo SSR en individuos de la Colección 1995 (Índice de similitud de DICE).
12. Gráfica de distribución de genotipos de la Colección 1995 utilizando el Análisis de Correspondencia.

13. Análisis UGPMA a partir de datos moleculares utilizando 15 marcadores tipo SSR en individuos de la Colección BARLOVENTO (Índice de similitud de DICE).
14. Gráfica de distribución de genotipos de la Colección BARLOVENTO utilizando el Análisis de Correspondencia.
15. Análisis UGPMA a partir de datos moleculares utilizando 7 marcadores tipo SSR en individuos de la Colección CORPUZULIA (Índice de similitud de DICE).
16. Gráfica de distribución de genotipos de la Colección CORPUZULIA utilizando el Análisis de Correspondencia.
17. Análisis UGPMA a partir de datos moleculares utilizando 7 marcadores tipo SSR en individuos de la Colección IRAPA (Índice de similitud de DICE).
18. Gráfica de distribución de genotipos de la Colección IRAPA utilizando el Análisis de Correspondencia.
19. Análisis UGPMA a partir de datos moleculares utilizando 14 marcadores tipo SSR en individuos de la Colección MARGARITA (Índice de similitud de DICE).
20. Gráfica de distribución de genotipos de la Colección MARGARITA utilizando el Análisis de Correspondencia.
21. Análisis UGPMA a partir de datos moleculares utilizando 16 marcadores tipo SSR en individuos de la Colección MÉRIDA (Índice de similitud de DICE).
22. Distribución de genotipos de la Colección MÉRIDA utilizando el Análisis de Correspondencia.
23. Análisis UGPMA a partir de datos moleculares utilizando 16 marcadores tipo SSR en individuos de la Colección UNESUR (Índice de similitud de DICE).
24. Distribución de genotipos de la Colección UNESUR utilizando el Análisis de Correspondencia.

INTRODUCCIÓN

Venezuela es reconocida por producir cacaos finos de aroma con excelentes características organolépticas a partir de variedades de tipo Criollo y Trinitarios, muy solicitados en el mercado internacional para la elaboración de chocolates. Sin embargo, la situación de la producción venezolana no es la más adecuada: predominan plantaciones viejas con una productividad promedio baja y ha ocurrido una grave erosión genética debido al progresivo reemplazo de los materiales Criollos por híbridos más productores y resistentes a plagas y enfermedades pero con calidades inferiores (MCT, 2005).

La producción mundial de cacao en grano en el año 2013 fue de 4.187.587 Ton, con una superficie de 9.541.698 de hectáreas y un rendimiento promedio de 440 Kg/ha (FAO, 2015). Para el mismo año, Venezuela obtuvo una producción de 29.689 ton, en un área cultivada de 63.023 ha y con un rendimiento promedio de 471 Kg/ha. Dentro del ámbito de las estadísticas podemos reseñar que, para el año 2014, el volumen de producción fue de 19.373 ton, con un área cultivada de 57.774 y un rendimiento de 335 kg/ha (Fedeagro, 2015).

Tal como señala el periódico digital Marco TradeNews, la demanda mundial de cacao está en pleno incremento por la afluencia de nuevos consumidores principalmente de los países asiáticos. El consumo mundial de cacao en 2013 alcanzó por primera vez más de cuatro millones de toneladas, lo que representó un incremento de 32% más que hace diez años. En diciembre de 2013, la organización internacional ICCO (International Cocoa Organization) alertó sobre un déficit de producción en 2013/14 mayor que la observada para el 2012/2013, debido al aumento de la demanda.

Este incremento de la demanda ha estimulado la inversión en el rubro. Ecuador lanzó su “Plan Nacional de Cacao” en el año 2013, obteniendo un incremento de su producción a razón de un 8% anual, hoy día está consolidado como el primer exportador de cacao en América Latina, superando a Brasil. En 2013 la producción cacaotera ecuatoriana alcanzó un récord y registró las 220 mil toneladas. Este cambio tuvo su fundamento en la incorporación de 80.000ha y

el desarrollo de clones de tipos forasteros más productivos como el 'CCN-51' y el 'Nacional', ideal para la industria de cacao ordinarios por sus buenos rendimientos y alto contenido de grasa (Granja, 2014).

Sin embargo, paralelo a este mercado, se desarrolla el de cacao fino de aroma, cubiertos por cacao de tipo criollo y trinitario, utilizados para la preparación de chocolates finos. Aunque corresponde a un mercado mundial reducido, cerca del 5%, sus altos precios recompensan a sus productores. El cacao fino de aroma se considera como exclusivo, altamente especializado y separado del ordinario con sus propias características de oferta y demanda, es un nicho de mercado muy evidente, que Venezuela debe aprovechar (González, 1999).

A pesar de tan baja producción, nuestros cacao finos de aroma son altamente demandados por la industria chocolatera gracias a sus atributos particulares de sabor y aroma.

Las variedades tradicionales de cacao han sido normalmente clasificadas en tres grupos morfogeográficos: Forastero y Criollo quienes se distinguen básicamente por características de las mazorcas, almendras y calidad del chocolate producido (Cheesman, 1944; Cuatrecasas, 1964) y su forma híbrida denominada Trinitario. Los cacao finos en particular aquellos que corresponden a los cacao de tipo Criollo presentan especificidades aromáticas que los hacen muy diferentes a aquellos de tipo Forastero. Estos cacao son considerados por Venezuela como un elemento estratégico para su desarrollo económico.

Sin embargo, existen evidencias de que estos cultivares representan sólo una pequeña parte de la diversidad genética presente en la especie *Theobroma cacao* L., y que esta clasificación en grupos morfogeográficos no permite describir toda la variabilidad y las relaciones entre poblaciones que existen en la especie. Motamayor *et al.*, (2003) a través de marcadores moleculares revelaron por ejemplo, que los Criollo antiguos domesticados por las civilizaciones mesoamericanas se originaron, probablemente de un reducido número de individuos que fueron transportado por los indígenas desde Sur hasta Centroamérica donde fueron establecidas las primeras plantaciones de

cacao. Estos criollos antiguos son altamente homocigotas y poco polimórficos contrarios a los Criollos que se mantienen en colecciones de germoplasma o en las plantaciones. De hecho, la mayor parte de los Criollos presentes en las plantaciones establecidas parecen ser en realidad Criollos antiguos con introgresiones más o menos fuertes de Forastero en particular de Forasteros provenientes de la Baja Amazonía (Motamayor *et al.*, 2002, 2003). De tal manera que estos materiales denominados por Motamayor *et al.* (2003) como Criollos modernos son en realidad formas híbridas comparables a los Trinitarios y que la variabilidad morfológica observada podría ser el resultado de formas híbridas diferentes con porciones cromosómicas provenientes sólo de Forastero, de Criollo o híbridos dependiendo de la región.

A partir de la década de los 90's y gracias al esfuerzo de un gran número de investigadores, se han seleccionado genotipos en las unidades de producción de las distintas regiones productoras del país, con características de interés relacionadas principalmente a alta productividad, y la resistencia a las principales plagas y enfermedades. Tales materiales genéticos de cada región productora fueron propagados asexualmente por injerto, y actualmente se encuentran conservados en bancos de germoplasma y constituyen un reservorio genético de importancia singular para el país (Ramos *et al.*, 2004).

En los últimos años en nuestro país se han realizado una cantidad de investigaciones relacionadas con el estudio de la diversidad genética del cacao a través del uso de herramientas moleculares, entre ellos se encuentra la implementación de los marcadores microsatélites, los cuales han sido de utilidad para verificar el grado de heterocigosidad de los materiales seleccionados en un banco de germoplasma. Dicho trabajo fue impulsado a través del sub-proyecto "Diversidad Genética del Cacao Venezolano", como parte del proyecto de Investigación en Red "Ruta del Chocolate", que buscaba hacer un estudio extenso, con todas las accesiones incluidas en estos sitios de conservación *ex situ*, mediante una metodología única de análisis realizada por un grupo multidisciplinario que incluía profesionales e infraestructura de universidades nacionales e instituciones de investigación del estado venezolano (MTC, 2005).

Para el inicio del proyecto, en octubre 2006, se contaba con la caracterización morfológica y molecular del Jardín Clonal ubicado en INIA-Miranda (Jiménez, 2006) y del Centro Nacional de los Recursos Genéticos del Ministerio del Ambiente (Moreno, 2007), tal trabajo debía extenderse a todos los Bancos de Germoplasma de cacao a nivel nacional.

Como resultado del sub-proyecto “Diversidad Genética del Cacao Venezolano”, se obtuvieron resultados preliminares que relacionaban características morfológicas y moleculares que evidenciaban la gran diversidad genética conservada en cada Banco de Germoplasma.

La información recabada por el mencionado sub-proyecto incluye características morfológicas y moleculares para los clones resguardados en los bancos de germoplasma que necesita ser analizada y estudiada. Paralelamente, se requiere integrar toda esa amplia información a fin de realizar el análisis de la diversidad genética del cacao en Venezuela.

Esa información será la base para identificar genotipos superiores que podrían ser utilizados como clones promisorios; así como también en posibles progenitores a utilizarse en futuros programas de mejoramiento genético.

OBJETIVOS

GENERAL

Analizar la Diversidad Genética del Cacao (*Theobroma cacao* L.) resguardado en los Bancos de Germoplasma Nacional.

ESPECIFICOS

- Verificar la información morfológica y molecular de cada banco de germoplasmas, a fin de consolidar la información aprovechable para el análisis de diversidad genética.
- Realizar el análisis de la diversidad genética nacional con base en el estudio de variables morfológicas y moleculares.
- Establecer estrategias para la formación de poblaciones básicas y criterios de selección para los programas de mejoramiento genético.

ANTECEDENTES

IDENTIFICACIÓN DEL CULTIVO

De acuerdo a (Bayer *et al.*, 1998), la clasificación taxonómica del cacao o cacaotero (*Theobroma cacao* L., es la siguiente:

Clase: Angiosperma.

Subclase: Dicotiledónea.

Orden: Malvales.

Familia: Malvaceae.

Género: *Theobroma*.

Especie: *Theobroma cacao* L.

Nombre común: Cacao arisco; Cacao común; Cacao criollo; Cacao dulce; Cacao silvestre; Cacahua (pano); Cacao muyo (Ecuador); Cacahua caspi (quechua); Cacahuillo; Canga (piro); Cocoa y Chocolate (inglés); Turanqui; Bana torampi (shipibo-conibo); Turanti (conibo); Bakau (aguaruna-huambisa); Cacao y Cacahueiro (portugués); Kakaw (Surinam).

El número básico de cromosomas en *Theobroma cacao* L., es 10, es una especie diploide, su carga genética es ($2n = 2X = 20$ cromosomas) (Muñoz, 1948 citado por Hardy, 1961). Entre todas las especies del género, *Theobroma cacao* es la única aprovechada económicamente por el hombre. Algunas especies relacionadas, como el *T. grandiflorum*, *T. glaucum*, *T. angustifolium* (Brasil) y *T. bicolor* (México a Colombia), tienen una importancia local (Nosti, 1961; Braudeau, 1970).

Los caracteres morfológicos de la especie *T. cacao* L. han permitido establecer sistemas de clasificación, especialmente dirigidos a los tipos cultivados de cacao (Cuatrecasas, 1964). Morris (1882) fue el primero en agrupar estos cacaos en Criollos y Forasteros.

El término “Criollo”, que significa “indígena o autóctono”, fue empleado por los españoles en Venezuela para distinguir a este tipo de cacao cultivado, el cual es un producto de óptima calidad. Los cacaos Forasteros o extranjeros, son un

producto de menor calidad, pero que muestran alto vigor, precocidad y rendimiento. Los Trinitarios son un grupo que presentan caracteres intermedios entre los cacaos criollos y forasteros. (González, 2001; Braudeau, 1970).

Los dos tipos básicos de cacaos cultivados han sido también reconocidos como grupos morfogeográficos, debido a que, los Forasteros provienen de la cuenca del Amazonas, mientras que los Criollos han sido sólo encontrados desde Colombia hasta México, lo que ha dado origen a las diversas hipótesis que se han formulado en relación al origen de esta especie (Cheesman, 1944).

TEORÍAS SOBRE EL ORIGEN DEL CACAO

Cheesman (1944) planteó que todos los cacaos cultivados están incluidos en una sola especie que comprende un gran número de tipos y formas locales con variados nombres y que el estudio de todos estos materiales debe conducir al descubrimiento de la especie primitiva que, diversificada al máximo en su centro genético primario del Alto Amazonas, ha llevado, por acción antropógena y por adaptación al medio, a la aparición de los tipos actuales. Según Cheesman (1944), a partir de la cuenca alta del Amazonas, el cacao fue llevado por los Andes hacia el sur de Colombia y de este modo los cacaos cultivados desarrollaron muchos de sus caracteres actuales en asociación con el hombre.

Cuatrecasas (1964) al respecto indicó que en tiempos remotos, una población natural de *T. cacao* se expandió hacia Amazonia y Guayana y otra hacia al norte, al sur de México y que estas poblaciones se convirtieron en dos diferentes formas geográficamente separadas por el Istmo de Panamá. Estas formas originales, una vez aisladas, se diferenciaron lo suficiente en sus caracteres para ser reconocidas como subespecies, afirmando que no se puede hablar de especies distintas porque éstas se pueden cruzar naturalmente, originando híbridos fértiles.

Schultes (1984), respalda la teoría de Cheesman, al sostener que el cacao disperso en el valle amazónico pudo haberse diseminado hacia el norte y hacia el este mediante dos rutas, de modo que la domesticación del cacao ocurriría

en Sudamérica, desde donde sería luego llevado por los indígenas a Centroamérica y al sur de México.

Motamayor *et al.* (2002) han propuesto la “Teoría de Refugios” para explicar el aislamiento que daría origen a poblaciones más uniformes de cacao, incluyendo la de los Criollos. Según esta teoría, ello sería consecuencia de ciclos de contracción y expansión de los bosques de galería a lo largo de ríos dispersos, ocasionados por transformaciones geológicas y climas extremos durante el Cuaternario. Posteriormente, la domesticación y la selección darían lugar a “cuellos de botella” poblacionales adicionales y a la fijación de algunos caracteres.

ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA

Para medir la diversidad genética de una colección se utilizan, básicamente, las evaluaciones morfoagronómicas, la caracterización mediante marcadores basados en proteínas o isoenzimas y fragmentos de ADN y en el número o la riqueza de cultivares (variedades locales, mejoradas e introducidas) en una localidad (Chávez, 2003).

La medición de los caracteres cualitativos y cuantitativos de alta heredabilidad, o que se transmiten a la descendencia del germoplasma en cualquier ambiente, se conoce como caracterización y permite determinar el grado de similitud entre las accesiones por medio de su apariencia morfológica o fenotípica y de variabilidad en la colección. Esta variabilidad se mide con pocas o muchas variables o descriptores cuyos datos conforman una dispersión de puntos con una dirección o vector e interrelacionan para conformar las distancias genéticas entre las accesiones. Estas distancias, a su vez, se pueden graficar de diferentes formas, siendo los dendrogramas y la dispersión de puntos en un plano cartesiano las de más fácil interpretación (Ligarreto, 2003).

Ronning y Schnell (1994) estimaron la diversidad genética en cacao para estudiar la variación dentro de la especie a partir de datos de aloenzimas. La población fue subdividida en dos subpoblaciones: por orígenes geográficos y por morfológicos. La diversidad genética encontrada fue similar a la encontrada

en otras especies tropicales alogámas. La mayoría de esta diversidad fue encontrada dentro, más que entre subpoblaciones; la diferencia fue más alta tipos que entre orígenes. Los clones de la América central y del caribe están más estrechamente relacionados que los demás y son distintos de los clones de Sudamérica. Dos grupos se formaron cuando se agrupó por tipo: Trinitario/Criollo y Forastero/Hibrido Intergrupar.

Motamayor (1995) estudió la variabilidad de los cacaoteros criollos de Venezuela junto con otros grupos morfogeográficos mediante el uso de marcadores moleculares tipo RFLP, aplicó la técnica multivariada análisis factorial de correspondencia. Encontró una estrecha variabilidad genética así como idénticos perfiles moleculares entre morfotipos criollos y la filogenia entre las diferentes variedades de cacao criollo pareciera señalar un tronco común de las mismas y de evolución reciente.

Aplicando marcadores moleculares tipo microsatélites, se pudo identificar importantes niveles de diversidad en accesiones presentes en la región amazónica del Brasil, por medio de la utilización de marcadores polimórficos, se identificaron una gran cantidad de alelos raros en comparación con otros estudios aplicando los mismos marcadores tipo microsatélites, así como RFLP e Isoenzimas. También se presentó una elevada heterocigosis, principalmente en las poblaciones alto amazónico, así como se identificó la homogeneidad en las poblaciones bajo amazónicas, caracterizándose por genotipos de tipo Amelonados. Por lo antes mencionado se mantiene la hipótesis que en la región alta de la amazonia brasileña se encuentra el centro de origen de la especie (Serenó *et al.*, 2006)

ESTRUCTURA GENÉTICA DE POBLACIONES

La estructura genética de la población es el resultado de la interacción de factores de selección, mutación génica, migración y recombinación que pueden reducir o aumentar los niveles de variación en ella. La reducción de la diversidad genética de una especie produce pérdida de la variación necesaria para el mejoramiento, por consiguiente, con el mantenimiento del germoplasma

se persigue evitar las alteraciones de la estructura genética de las accesiones (Ligarreto, 2003).

ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD DEL CACAO

Durante más de dos mil años el cacao ha sido cultivado, seleccionado natural y artificialmente y sometido a numerosos cruzamientos naturales. Existe una amplia diversidad en los cacaos cultivados, tanto en los considerados Forasteros como en los Criollos, la cual se magnifica en sus híbridos (Marcano, 2009).

Según Lanaud *et al.* (1999) la diversidad del cacao ha sido evaluada en numerosos estudios, en los que se han utilizado desde descriptores morfológicos, hasta distintos tipos de marcadores moleculares. Se reconoce que los marcadores moleculares determinan con mayor precisión la estructura de la diversidad y definen las relaciones genéticas entre cacaos silvestres y cultivados, a su vez estos estudios aportan variada información que caracteriza de manera acertada la genética de grupos de cacao, los tipos de marcadores empleados son RAPDs, Microsatélites, Isoenzimas, o RFLPs con sondas de ADN genómico, ADN complementario, mitocondrial, o cloroplástico. De acuerdo a lo planteado la diversidad del cacao puede esquematizarse en 4 grupos: Criollos Antiguos, Nacional de Ecuador, Forasteros de Guayana y Forasteros del Orinoco y del Amazonas, incluyendo el último grupo, poblaciones distintas de acuerdo a su origen geográfico.

En relación a los cacaos Criollos, que fueron los tipos cultivados en tiempos precolombinos e inicialmente diseminados por los colonos españoles, Motamayor *et al.* (2002) encontraron similitud genética entre los cacaos catalogados como Criollos Antiguos, muestreados en Centroamérica y México, en terrenos asociados con los indígenas precolombinos y en Sudamérica (oeste de Venezuela y Colombia), en viejas plantaciones y en sitios aislados, donde el cruzamiento con híbridos era poco probable, lo que sugiere el origen común de los mismos.

Las relaciones filogenéticas encontradas entre Criollos Antiguos y Forasteros de Ecuador y de Colombia, ubican el origen del cacao cultivado en la época

precolombina, en Sudamérica, probablemente entre Colombia y Ecuador (Motamayor *et al.* 2002).

A través de estudios de diversidad genética se pudo evidenciar la cercanía genética que comparten los genotipos cultivados y silvestres del denominado “Cacao Nacional Boliviano” (CNB), sembrados en la amazonia boliviana. Tal estudio comparó 164 genotipos de CNB con referenciales internacionales, utilizando 15 marcadores de tipo microsatélites (SSR). Los resultados arrojados en el análisis de coordenadas principales se concatenan con similares niveles de diversidad genética presentados entre los genotipos silvestres y cultivados del CNB (Zhang *et al.*, 2011).

En el año 2008 a través del estudio de la estructura genética del cacao, se pudo analizar una cantidad de genotipos silvestres y cultivados en América, logrando diferenciar sus orígenes en centro y sur América. Dicho estudio aplicó el análisis de inferencia estadística bayesiana, logrando la diferenciación genética y geográfica de poblaciones de cacao en centro y sur América. Los resultados de este estudio proponen una nueva clasificación del germoplasma de cacao compuesta por 10 grupos principales: Marañon, Curaray, Criollo, Iquitos, Nanay, Contamina, Amelonado, Purús, Nacional y Guiana (Fig. 1) (Motamayor *et al.*, 2008).

Esta nueva clasificación amplía la teoría antes propuesta que abarcaba tres grandes grupos morfogeográficos: Criollo, Forasteros y trinitarios. De esta manera se amplían los horizontes en el mejoramiento genético debido a las altas diferenciaciones entre las poblaciones establecidas, generando nuevas combinaciones genéticas que originarían germoplasmas diferenciados disponibles para su conservación y aprovechamiento (Motamayor *et al.*, 2008).

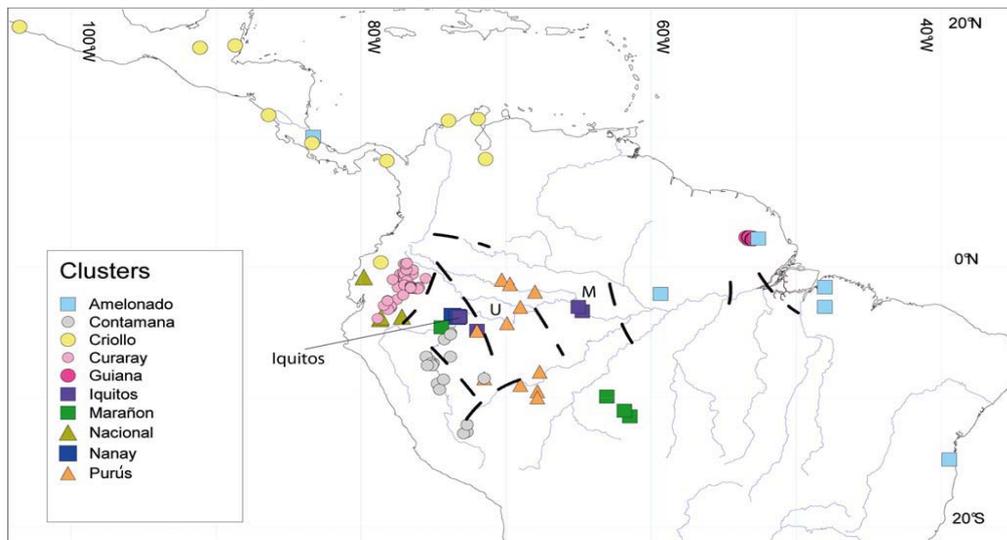


Figura.1. Diferenciación genética y geográfica de los 10 grupos de cacao (*Theobroma cacao* L.) en centro y sur América (Motamayor *et al.*, 2008).

LA DOMESTICACIÓN Y LA DISPERSIÓN DEL CACAO

Las primeras evidencias sobre la utilización del cacao, se han encontrado en Mesoamérica, en tierras que ocuparan los Toltecas, Chichimecas y Mayas, que comprendían, desde el Istmo de Tehuantepec, en México, hasta el Darién, provincia de Panamá, frontera con Colombia (Braudeau, 1970), hace 2000 a 3000 años (Fig. 2) (Paradis, 1979). Cuando llegaron los españoles a México en 1519, encontraron pequeñas plantaciones de cacao en la península de Yucatán al sudeste de México.

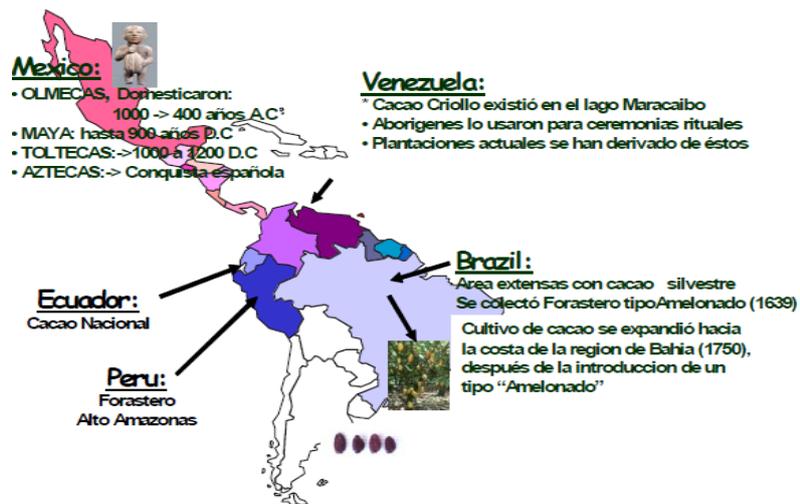


Figura. 2. Países de domesticación y establecimiento del cultivo de cacao (*Theobroma cacao* L.) (Laurent *et al.*, 1993).

La comunicación y el comercio existentes entre los pobladores americanos en épocas prehispánicas, explicarían la existencia de cacao cultivado en tierras mexicanas a la llegada de los conquistadores. Las condiciones ecológicas naturales del cacaotero, definieron su dispersión en las selvas tropicales húmedas de Centro y Sudamérica, entre 18° N y 15° S (Marcano, 2009).

La colonización española desarrolló ampliamente el cultivo del cacao en sus áreas naturales, estableciendo plantaciones en los actuales México, Guatemala, Nicaragua, Honduras, El Salvador y Costa Rica. La primera introducción de sembradíos de cacao fuera de estas regiones debió haber ocurrido hacia 1525, cuando los españoles lo llevan a Trinidad y a La Española y luego a otras islas del Caribe. En el siglo XVI existían plantaciones en Panamá, Jamaica y; en Venezuela, se comercializaba desde 1560 cacao de la zona del sur del Lago de Maracaibo (Leal, 1996). En el resto del mundo, la extensión del cultivo se resume en el cuadro 1, según Nosti (1961), Braudeau (1970) y Lanaud *et al.*, (1999), Marcano (2009).

Cuadro 1. Introducción del cultivo de cacao por parte de los colonizadores europeos.

Continente	País (año)	Procedencia	Colonos
Sudamérica y El Caribe	Martinica (1660), Haití (1750) Brasil (1740)	Venezuela	Franceses Portugueses
Asia	Indonesia (1560) Filipinas (1614) Ceilán (1700s), Madagascar (1800s), Fiji (1880), Samoa (1883), Malasia (1778), Hawaii (1831), este de India (1887)	Venezuela Venezuela Trinidad Ceilán	Holandeses Españoles Ingleses
África	Fernando Poo, Sto. Tomé y Príncipe (1788) Ghana, Nigeria, Camerún, Costa de Marfil (1830)	Brasil	Portugueses y españoles
Australia	(1886)	Ceilán	Ingleses

Fuente: Marcano (2009) a partir de Nosti (1961), Braudeau (1970) y Lanaud *et al.*, (1999).

ORIGEN DEL CACAO CULTIVADO EN VENEZUELA

Venezuela cuenta con una amplia gama de tipos de cacao, que incluye desde Forasteros, que pueden encontrarse silvestres en la Orinoquía venezolana, hasta Criollos de alta pureza genética, que pueden localizarse en zonas aisladas, especialmente en la región occidental, donde probablemente hayan existido desde antes de la colonia. La mayor variabilidad se expresa en los híbridos entre éstos, con distintos niveles de introgresión, tanto con Forasteros, como ocurre en las zonas cacaoteras del oriente del país, como con Criollos, más perceptible en el occidente. Toda esta diversidad es explicada por la mezcla de materiales autóctonos y adicionalmente con foráneos, que ha ocurrido a lo largo de la historia del cultivo en el país Pittier (1935), Marcano (2009).

Las introducciones de cacao a nuestro país son reportadas desde el siglo XVII, cuando se establecen las primeras plantaciones de cacao de las costas centrales, con cacao Criollo procedente probablemente de Nicaragua (Soria, 1962) y de Costa Rica (Pittier, 1935).

En 1825 se reporta la introducción de cacaos de tipo “Trinitario” en las costas del estado Miranda (Pittier, 1935). Dadas las ventajas en productividad de los cacaos Trinitarios, hubo un progresivo avance de estos genotipos en las áreas ocupadas originalmente por los Criollos “Antiguos”. En 1913, Pittier observa en Barlovento una predominancia de formas de cacao “Calabacillo”, cacao de tipo Forastero y en 1933 advierte sobre las consecuencias negativas que, para la calidad del grano de cacao producido en nuestro país, tendría la hibridación que ya era evidente en la época, por lo que recomienda que sea abandonado el cultivo de cacaos híbridos (Marcano, 2009).

En los años 40's, tal como ocurrió en otros países productores de cacao, se introducen en Venezuela algunos de los clones colectados por Pound durante sus expediciones por la cuenca del Amazonas, entre éstos los IMC (Iquitos Maraón Collection), SCA (Escavina), EET (Estación Experimental Pichilingue,

Ecuador) entre otros, además de los ICS (Imperial College Selection) siendo éstos híbridos y Forasteros (Pound, 1935).

En esta época fue seleccionada la primera colección nacional, la “Colección del 45”, bajo el auspicio del Ministerio de Agricultura y Cría. Esta incluía árboles sobresalientes escogidos en zonas cacaoteras del estado Aragua, que fueron también cruzados con los clones distribuidos por Pound, para valorar sus descendencias. Estas mostraron características agronómicas interesantes, destacándose algunos por su resistencia a enfermedades, siendo empleadas casi exclusivamente en el establecimiento de nuevas plantaciones en todo el país. Los árboles eran producidos en el centro de propagación establecido en Ocumare, Estado Aragua y distribuidos a través de los viveros administrados por el antiguo Fondo Nacional del Cacao. La Colección del 45’, así como los clones seleccionados por Pound y sus descendencias aún son propagados, los cruces entre éstos han originado generaciones sucesivas, que se han distribuido por amplias extensiones en todas las regiones productoras de cacao de Venezuela (Reyes y Reyes, 2000).

En los últimos 15 años, nuevas colectas de árboles con características interesantes, con énfasis en aquellas propias de los cacaos Criollos, han sido distribuidos en todo el territorio nacional. Los árboles seleccionados han sido utilizados como fuente de semillas para el establecimiento de nuevas plantaciones y están siendo valorados para su aprovechamiento en estrategias de selección y mejora del cultivo (González *et al.*, 2004).

APLICACIÓN DE MARCADORES MOLECULARES EN EL MEJORAMIENTO DEL CACAO. EXPERIENCIA NACIONAL Y GLOBAL

Los estudios de caracterización molecular de individuos de una especie, conducen a la identificación precisa de estos individuos, a la vez de definir las relaciones genéticas entre ellos. Si se emplean marcadores codominantes se facilita la determinación de heterocigosis y asimismo, pueden definirse los alelos de los parentales de los individuos analizados. Paralelamente, los estudios de diversidad detectan la estructura de la diversidad, definiéndose

grupos de individuos más homogéneos e individuos ubicados en los extremos de esa diversidad.

El primer estudio de diversidad del cacao fue realizado con isoenzimas (Lanaud 1987). A inicios de los 90s, se publicaron una serie de trabajos empleando RAPDs (Wilde *et al.*, 1992. Figueira *et al.*, 1992) y RFLPs desarrollados con sondas de diversa procedencia (ADN genómico, ADN de cloroplasto, mitocondrial y ribosomal); los individuos evaluados provenían de colecciones de germoplasma y de plantaciones comerciales (Laurent *et al.*, 1994).

El trabajo de diversidad en el que mejor se representaron los tipos Criollos venezolanos y de otros países, fue reportado en 1998 por Motamayor, en el que se demostró mediante RFLPs, que el cacao venezolano considerado Criollo en anteriores estudios, era realmente híbrido y que algunos de nuestros cacaos Criollos muestreados en viejas plantaciones y zonas de difícil acceso, eran homocigotas, por lo que fueron denominados “Ancestrales” o “Antiguos”, para diferenciarlos de los Criollos híbridos que se llamaron “Modernos”. En este estudio se determinó que árboles Criollos de otros países, incluyendo México, Colombia, Nicaragua y Belice, eran muy similares a nivel molecular, sugiriendo un origen común. En estudios posteriores se dilucidó la base genética más frecuente de nuestros cacaos cultivados, constituida principalmente por un ancestro Criollo y un cacao Forastero del Bajo Amazonas (Motamayor *et al.*, 2002 y 2003).

En Venezuela se ha efectuado el análisis molecular de colecciones de cacao desde 1997; los primeros marcadores empleados fueron RAPDs, con los cuales se estableció una metodología que permitió complementar el Catálogo de Descriptores para la “Colección 2000”, con información de distancia genética entre individuos de esta colección y en relación a algunos clones referenciales que contemplaban, desde Criollos ancestrales a Forasteros (Ramos *et al.*, 2002). La caracterización de la Colección 95 mediante RAPDs también ha sido reportada (Osorio *et al.*, 2003).

A partir del año 2005, la implementación de los marcadores codominantes como son los microsatélites, ha sido de gran utilidad para el estudio de

diversidad genética del cacao en Venezuela. En un primer trabajo se realizó el análisis de la diversidad genética del Jardín Clonal ubicado en la Estación experimental Padrón del INIA (Jiménez, 2006). Tal trabajo se convirtió en la base de un estudio extenso, considerando las accesiones de los Bancos de Germoplasma de cacao a nivel nacional, mediante una metodología única de análisis, mediante el Proyecto Investigación en Red Ruta del Chocolate, específicamente del subproyecto 1 “Diversidad Genética del Cacao Venezolano”, financiado por el Ministerio para el poder popular para la Ciencia, Tecnología e Innovación (MCT) (Ramis *et al.*, 2009).

Para ese momento se contó con la caracterización con 24 microsatélites del Jardín Clonal ubicado en INIA-Miranda (Jiménez, 2006), del Centro Nacional de los Recursos Genéticos del Ministerio del Ambiente, este último con 10 microsatélites (Moreno, 2007), y del Banco de Germoplasma de la UNESUR (Polo, 2009).

El continuo desarrollo de marcadores tipo microsatélites permitió la conformación de mapas de ligamiento genético para el cacao y el marcaje de caracteres importantes se comenzó a reportar desde 1996 (Lanaud *et al.*, Crouzillat *et al.*, 2006). Dos poblaciones de mapeo fueron empleadas para ello de forma separada. De éstas se incrementó la saturación con un mayor número de marcadores el mapa obtenido a partir de la población UF676 x UPA472, considerada referencia internacional, ubicada en Camerún, la cual tiene más de 500 marcadores incluidos (Pugh *et al.*, 2004). Más recientemente se ensambló un mapa consenso a partir de las poblaciones de 3 cruces de clones comerciales con marcadores en común (Brown *et al.*, 2007).

En un programa internacional, en el que participaron Francia, Ecuador, Brasil, Trinidad, Camerún, Costa Rica y Estados Unidos, se desarrolló el secuenciamiento de 180.000 genes, provenientes de unas 45 genotecas obtenidas a partir de distintas estructuras de la planta de cacao, principalmente de los clones ICS1 y SCA6, algunas de las cuales se obtuvieron mediante el uso de técnicas sustractivas, luego de someter las estructuras a distintos tipos de “stress” bióticos, entre los cuales *Phytophthora megakarya* y *palmivora*,

Crinipellis perniciosa, *Ceratocystis fimbriata*, *Moniliophthora roreri*, bacterias PGPR y móridos y abióticos, como la resistencia a la sequía (Movil, 2008)..

Al respecto, a nivel nacional se evaluaron dos poblaciones resultado de cruces triples donde uno de los progenitores es el clon SCA-6, el cual ha mostrado resistencia a la enfermedad ‘escoba de bruja’ causada por *Moniliophthora perniciosa*. Los estudios moleculares permitieron identificar los individuos de cada población portadores de las regiones de resistencia identificados en el progenitor resistente (Movil, 2008).

IBM, el Servicio de Investigación del Departamento de Agricultura de Estados Unidos (United States Department of Agriculture-Agricultural Research Service (USDA-ARS) y la compañía de alimentación Mars Incorporated están colaborando en un trabajo de investigación para secuenciar el genoma del cacao (Motamayor *et al.*, 2013).

Los programas para el mejoramiento genético del cacao han comenzado a integrar la nueva información que proveen los estudios del genoma del cacao (INGENIC, 2000). Conjuntamente con la creciente cooperación técnico-científica entre países productores y consumidores de cacao en programas internacionales, se incrementa a buen ritmo el conocimiento sobre el determinismo genético de caracteres importantes, que servirá de base para generar nuevas estrategias de mayor utilidad práctica con las cuales puedan desarrollarse genotipos mejorados de cacao, en menor tiempo (Marcano, 2009).

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN EN RED “RUTA DEL CHOCOLATE”

Para el año 2005 el MCT¹, desarrolla el programa, *Innovación Para el Desarrollo Endógeno* dentro del cual se inscribe la Ruta del Chocolate, proyecto que coloca la ciencia, la tecnología y la innovación al servicio del desarrollo endógeno, en el marco de la *Misión Vuelvan Caras*. La Ruta del Chocolate tuvo como objetivo rescatar las actividades productivas y los valores culturales ancestrales relacionados con el cacao, así como la elaboración de

¹ Ministerio del Poder Popular para la Ciencia, Tecnología e Innovación.

sus derivados, con el fin de mejorar el modelo de explotación asociado a este cultivo el cual posee un sabor y un aroma privilegiado. Dentro de este proyecto se enmarca el sub-proyecto N° 1, titulado: “**Evaluación de la Diversidad Genética del cacao Venezolano**”, dicho trabajo tuvo como objetivo caracterizar las distintas accesiones de cacao pertenecientes a los diferentes bancos de germoplasma, evaluándose así la diversidad genética existente en nuestro país con respecto a este rubro. Dichos resultados son la fuente de información que servirán como base para la formulación de estrategias de mejoramiento y selección de cultivares adaptables a las distintas condiciones agroclimáticas del país (MCT, 2005), y corresponden a la información del presente trabajo.

BANCOS DE GERMOPLASMA

Los recursos fitogenéticos de interés para el hombre, pueden ser conservados bien sea en su hábitat natural (conservación *in situ*), o fuera del mismo, en los denominados bancos de germoplasma (conservación *ex situ*). Los bancos de germoplasma son centros orientados a la caracterización y conservación de una parte representativa de la variabilidad genética correspondiente a una especie determinada (Pérez *et al.*, 1998).

Dentro de esta categoría podemos distinguir los bancos de semilla, los bancos de cultivo *in vitro*, los bancos de polen, los bancos de genes o bancos de ADN (Pérez, 2004) y los jardines clonales. Estos últimos pueden ser definidos como un conjunto de individuos seleccionados de acuerdo al criterio del mejorador, propagados asexualmente, con la finalidad de detectar aquéllos que posean características de interés para ser utilizadas en los programas de mejoramiento, una vez que se han evaluado, estos individuos élite son llevados al banco de germoplasma (Ipinza, 1997).

Las actividades de conservación y uso de germoplasma se iniciaron en nuestro país en el año 1940, vinculadas a los proyectos de mejoramiento genético de cultivos de importancia agrícola (San Vicente *et al.*, 1995).

Ramos (1997) refiere que Venezuela cuenta con un total 9 bancos de germoplasma y 2 parcelas demostrativas, los cuales se distribuyen de la siguiente manera, en la región occidental se encuentran en los estados Mérida (INIA), Zulia (INIA, CORPOZULIA, UNESUR) y Táchira (UNET), en la región centro-oriental se encuentran en los estados Aragua (INIA-CENIAP, CNCRG), Miranda (INIA) y Sucre (INIA).

Región Occidental.

Banco de Germoplasma Chama Edo. Zulia.

Responsable: CORPOZULIA-INIA-Zulia.

Este banco de germoplasma se inició durante 1984, cuenta con 6 Ha y esta conformado por cacao "Porcelana" de los tipo verde, rojo y blanco, generándose esta denominada por el color externo de las mazorcas.

Parcela Demostrativa de cacao: San Juan de Lagunillas.

Responsable: INIA-Mérida. Plan coordinado por la Gobernación de Mérida.

Los materiales que integran esta plantación constituyen una población generativa procedente de la región del Guasare, en las estribaciones de la Sierra de Perijá en el estado Zulia (Ramos, 1997).

Parcela demostrativa UNESUR Santa Bárbara del Zulia.

Responsable: UNESUR- Fac. Agronomía.

Esta parcela está conformada por materiales de cacao seleccionados de la zona del Sur del Lago (Ramos, 1997).

Banco de Germoplasma: La Morisca Edo. Táchira.

Responsable: UNET-Edo. Táchira.

Los materiales de cacao colectados y establecidos en esta área experimental, presentan características de criollos y fueron colectados en las inmediaciones del río Táchira (Novillero), verde y rojo, Guasare, proveniente de San Juan de Lagunillas, Criollo de Zea (rojo y verde), materiales de la Bancada El Limón, Sur del Lago y criollos de Hernández, edo. Mérida (Ramos, 1997).

Región central

Banco de Germoplasma: *Padrón*-Edo Miranda.

Responsable: INIA-Miranda.

Este banco posee clones forasteros provenientes de Brasil, Costa Rica, Indonesia, México, Colombia, Grenada, Trinidad y Venezuela. Asimismo, cuenta con otras especies de *Theobroma* como *T. grandiflorum*, *T. bicolor*, y *Herrania* sp. (FONAIAP-Miranda, 1997).

Banco de Germoplasma: Ocumare de la Costa-Edo Aragua.

Responsable: INIA-CENIAP.

Se tienen resguardados los materiales de la Colección 1945 y la Colección 1995, los cuales representan el germoplasma de cacao de alta calidad en los valles del litoral aragüeño (Ramos, 1997).

Banco de Germoplasma: Centro Nacional de Conservación de los Recursos Genéticos.

Responsable: Ministerio del Poder Popular para el Ecosocialismo y Aguas.

Este Centro presenta una réplica parcial de la Colección 1945, también materiales provenientes de ZEA, estado Mérida, y Pedregal, al sur del Lago de Maracaibo. A su vez, se tiene el establecimiento de plantas descendientes de los materiales previamente evaluados, tales como OC-60, OC-61, OC-67, OC-77 y Cho-42 (Moreno, 2007).

Región Oriental.

Banco de Germoplasma: Irapa-Edo. Sucre.

Responsable: INIA-Sucre.

Se presentan materiales seleccionados en la Península de Paria y de la región del Delta (Tucupita), los cuales se propagaron por injerto usando como patrón el IMC-67. (FONAIAP-Sucre, 1997).

En el cuadro siguiente se presentan las localizaciones geográficas de los bancos de germoplasma en estudio, se presentan 3 puntos geo-referenciales que triangulan la ubicación exacta de dichos Centros.

Cuadro 2. Localización geográfica de los Bancos de Germoplasma de cacao (*Theobroma cacao* L.).

COLECCIONES	LOCALIZACIÓN	NORTE	OESTE
INIA-MERIDA	Est. San Juan de Lagunillas. Edo. Mérida	N 8° 30' 46"	W 7° 20' 40"
		N 8° 30' 46.9"	W 71° 20' 08.3"
		N 8° 31' 13.4"	W 71° 20' 25.3"
CORPOZULIA	Km. 41, vía Santa Bárbara del Vigía.	N 8° 42' 31"	W 71° 42' 20.8"
		N 8° 42' 30"	W 71° 41' 50.1"
		N8° 42' 58.5"	W 71° 42' 05.8"
INIA - ZULIA	Estación Chama, El Vigía	N 8° 42' 31.0"	W 71° 42' 20.8"
		N 8° 42' 30"	W 71° 41' 50.1"
		N8° 42' 58.5"	W 71° 42' 05.8"
UNESUR	Hacienda La Glorieta. Santa Bárbara del Zulia	N8° 59' 37.4"	W 71° 55' 34.0"
		N 8° 59' 38.7"	W 71° 55' 02.9"
		N 9° 00' 04.0"	W 71° 55' 19.3"
UNET	Estación "La Morusca". Edo. Táchira	N 8° 12' 15.6"	W 72° 18' 35.7"
		N 8° 12' 14.6"	W 72° 18' 03.0"
		N 8° 12' 46.7"	W 72° 18' 21.0"
INIA-CENIAP	Campo CENIAP, Maracay	N 10° 16' 31.6"	W 67° 37' 02.5"
		N 10° 16' 34.0"	W 67° 36' 33.7"
		N 10° 16' 58"	W 67° 36' 48.6"
INIA - Sucre	Estación Irapa	N 10° 35' 24.9"	W 62° 37' 22.3"
		N 10° 35' 25.6"	W 62° 36' 54"
		N 10° 35' 55"	W 62° 37' 06.0"
INIA – Miranda	Campo Experimental "Padrón", Tapipa. Edo	N10° 12' 59.0"	W 66° 18' 11.0"
		N10° 12' 59.7"	W 66° 17' 40.1"

En el ámbito internacional existen de acuerdo con Motilal y Butler, (2002) unas 52 colecciones de germoplasma para cacao ubicadas en África, Brasil, Costa Rica, Ecuador, Puerto Rico, USA, Costa de Marfil, Ecuador, India, Indonesia, Guatemala, Nigeria, Filipinas, Sri Lanka, México, Ghana, Malasia, Trinidad y Tobago entre otros, destacándose por el número de accesiones el Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, Turrialba (CATIE) en Costa Rica con 939, el Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC), en Brasil con 1766 y el International Cocoa Genebank, (ICGT) en Trinidad, con 2506 accesiones.

ANÁLISIS MULTIVARIADO EN ESTUDIOS DE DIVERSIDAD GENÉTICA

Según Rojas (2003) la información generada en la caracterización y evaluación de las colecciones de germoplasma proporciona una idea del tipo de material genético que se conserva en las colecciones y su utilización es más importante cuando se estudia su variabilidad. La diversidad y la variabilidad genética son términos alternativos para representar la variación genética. Se sugiere que diversidad sea utilizada para indicar la sumatoria de la información genética potencial conocida y desconocida, y la variabilidad para indicar una porción de la diversidad capturada y disponible.

Con la información que se genera de la caracterización y evaluación de las colecciones de germoplasma es posible conocer que tan variables son las accesiones que lo conforman, a través de la similitud o diferenciación de los rasgos que caracterizan a cada una de ellas. En este sentido, cuando se agrupan accesiones de un germoplasma de acuerdo con su similitud morfológica o fenotípica, es de suponer que gran parte de ésta es genética (Morales y Candeira ,1996; Rojas, 2003).

Las técnicas estadísticas multivariadas son herramientas muy útiles para caracterizar germoplasma, debido a que básicamente permiten describir o agrupar un conjunto de accesiones, tomando en cuenta simultáneamente varias características, sin dejar de considerar la relación existente entre todos los caracteres en estudio (Rojas, 2003).

Los análisis multivariados más comúnmente utilizados, de orden decreciente son las siguientes: análisis de componentes principales (ACP), análisis de funciones discriminantes (AD), análisis de agrupamientos (conglomerados o clusters), regresión múltiple (RM), análisis multivariado de la varianza (MANOVA), análisis de correspondencia (AC), análisis de coordenadas principales (ACOO), análisis factorial (AF), correlación canónica (CC), modelos logarítmicos lineales (LOGL), escalamiento multidimensional (EMD) y la regresión logística múltiple (RL) (Olmos *et al.*, 2010).

ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES

El Análisis de Componentes Principales (ACP) es una técnica estadística de síntesis de la información, o reducción de la dimensión (número de variables). Es decir, ante un banco de datos con muchas variables, el objetivo será reducirlas a un menor número perdiendo la menor cantidad de información posible.

Los nuevos componentes principales o factores serán una combinación lineal de las variables originales, y además serán independientes entre sí.

Un aspecto clave en ACP es la interpretación de los factores, ya que ésta no viene dada a priori, sino que será deducida tras observar la relación de los factores con las variables iniciales (habrá, pues, que estudiar tanto el signo como la magnitud de las correlaciones). Esto no siempre es fácil, y será de vital importancia el conocimiento que el experto tenga sobre la materia de investigación.

Origen

En los diferentes textos e investigaciones realizados por Mardia *et al.* (1979) y Pla (1986), coinciden en señalar que el trabajo original de Kart Pearson en 1901 fue donde se entrevió por primera vez esta técnica, consistía en el ajuste de un sistema de puntos en un multi espacio a una línea o a un plano. Luego, Hotelling en 1933 desarrolló la técnica y formuló el análisis por componentes principales tal como se utiliza actualmente.

Objetivo

Rao (1964) señala que el objetivo del análisis por componentes principales es derivar un pequeño número de combinaciones lineales (componentes principales) de un conjunto de variables que tienen tanta información como las contenidas en las variables originales. Pla (1986) agrega dos objetivos más: a. reducir la dimensión del problema que se está estudiando, como paso previo para futuros análisis y b. eliminar cuando sea posible, algunas de las variables originales si aportan poca información.

ESTADÍSTICA BAYESIANA

Los recursos para hacer inferencia estadística bayesiana se conocen desde hace más de 200 años. El Reverendo Thomas Bayes inició la solución cuantitativa al problema de determinar cuál de varias hipótesis es más probable sobre la base de los datos. Su descubrimiento básico se conoce como el Teorema de Bayes. Su artículo más emblemático se titulaba Ensayo hacia la solución de un problema en la doctrina del azar (Essay towards solving a problem in the doctrine of chances) y fue publicado póstumamente (Beaumont y Rannala. 2004).

El teorema de bayes permite calcular la probabilidad posterior a partir de la verosimilitud y probabilidad anterior de los datos; la probabilidad o información anterior puede estar basada en datos experimentales previos, en consideraciones teóricas o de otra índole, esta información previa es combinada con la información de los datos analizados para generar la distribución. La probabilidad condicional de los datos hasta no hace mucho era imposible poder calcularla con los ordenadores de poco procesamiento para el momento, al aparecer poderosos ordenadores este método tomó mayor impulso abarcando una extensa área de investigación (López, 2010).

El método bayesiano, basado en Cadenas de Markov de Monte Carlo (MCMC) estima la distribución a posteriori de coeficientes asociados a cada individuo que se corresponden a los distintos subgrupos en los que este puede clasificarse. El valor esperado de la distribución a posterior, provee una estimación de la proporción genética de un individuo y la similitud que comparte

con los distintos subgrupos. Para este tipo de análisis se utiliza una gran cantidad de software existentes en el mercado, dentro de ellos tenemos el software STRUCTURE 2.2.3 (Pritchard *et al.*, 2007).

La metodología bayesiana es considerada una herramienta importante en la evaluación genética, ya que lleva en consideración la variabilidad existente en todos los parámetros del modelo, en el sentido de que es posible caracterizarlos a través de la moda, mediana o el promedio de la distribución a posteriori de dicho parámetro, así como la obtención de intervalos de confianza (llamadas de regiones de credibilidad en el caso bayesiano) tanto para los parámetros como para la predicción de los efectos genéticos (Villegas, 2005).

MATERIALES Y MÉTODOS

Esta investigación tomará como base los datos morfológicos y moleculares generados del subproyecto N° 1: “Evaluación de la Diversidad Genética del cacao Venezolano”, enmarcado en el Proyecto de Investigación en Red en el Marco de la Ruta de Chocolate, de las accesiones de *Theobroma cacao* L. conservadas en los bancos de germoplasma del país (Ramis *et al.*, 2009).

Material vegetal

En el cuadro 2 se presenta el número de accesiones incluidas en los distintos Bancos de Germoplasma Nacional y caracterizadas a nivel morfológico y molecular en el mencionado proyecto, para un total de 623 genotipos. Las accesiones en ellos incluidas son representativas de cada zona de producción de cacao en Venezuela.

Cuadro 3. Número de accesiones de cacao conservadas y caracterizadas a nivel morfológico y molecular de los distintos Bancos de Germoplasma Nacional de cacao (*T. cacao* L.).

Colecciones	Localización	Nº de accesiones caracterizadas
INIA-CENIAP (colección 1945)	Campo del CENIAP, Maracay, estado Aragua	19
INIA-CENIAP (colección 1995)	Campo del CENIAP, Maracay, estado Aragua	37
CORPOZULIA	Km. 41, vía Santa Bárbara del Vigía, parroquia el Moralito, Municipio Colón – Estado Zulia	89
INIA-Miranda (Colección Barlovento)	Campo Experimental “Padrón”, Tapipa, estado Miranda	20
INIA-Miranda (Colección de Genotipos Internacionales)	Campo Experimental “Padrón”, Tapipa, estado Miranda	86
INIA-Miranda (Colección Jardín Clonal Caucaagua)	Campo Experimental “Padrón”, Tapipa, estado Miranda	137
UNESUR	Hacienda “La Glorieta”. Santa Bárbara del Zulia, Municipio Colón, estado Zulia	60
INIA-Mérida	Estación “San Juan de Lagunillas”, estado Mérida	65
INIA-Sucre	Estación Irapa, estado Sucre	20
MINAMB-CNRG	El Limón, municipio Mario Briceño Irragory, estado Aragua	90
TOTAL		623

Fuente: Ramis *et al.* (2009)

Verificación de la información morfológica

Para cada banco de germoplasma del país se realizó la caracterización morfológica según el “Manual Práctico para la Caracterización Morfológica de Cacao” basado en los descriptores establecidos por Engels *et al.* (1980) (Jiménez, 2006; Ramis *et al.*, 2009), generando la información para cada una de las 805 accesiones, según se presentan en el cuadro 3.

Cuadro 4. Número de características morfológicas consideradas en la caracterización de las accesiones de los Bancos de Germoplasma nacional de cacao, según los descriptores cualitativos y cuantitativos para las distintas partes de la planta.

Característica	Repeticiones/accesión	Cuantitativas	Cualitativas
Hoja	30	5	5
Flor	10	3	5
Fruto	10	8	8
Semilla	10	12	2

Existen datos crudos que deben terminar de procesarse a nivel de estadísticos simples, así como organizar en una base de datos las características morfológicas bien sea cualitativas y cuantitativas de cada material de cacao perteneciente a cada banco de germoplasma del país (Hidalgo, 2003).

Toda la información de caracterización morfológica se verificó y preparó en matrices bajo archivos creados con el programa Microsoft Office Excel, ubicándose genotipos en filas y características cuantitativas y cualitativas en columnas para su posterior análisis.

Verificación de la información Molecular

La caracterización molecular se realizó con base en 24 marcadores codominantes tipo microsatélites (SSR), distribuidos a lo largo del genoma de cacao (Cuadro 4), siguiendo el procedimiento de extracción de ADN, amplificación vía PCR y visualización de productos de PCR en geles de poliacrilamida descritos por Jiménez (2006).

Cuadro 5. Microsatélites utilizados para el estudio de la diversidad Genética del cacao (*Teobroma cacao* L.) en Venezuela.

mTcCIR	EMBL Nº de Accesoión	LG Localización	Tamaño (bp)	Motifs	Nº de alelos (alelos raros)
182	AJ566510	6	148	(TG) ₉	3 (0)
82	AJ566428	3	174	(AG) ₆ AA (AG) ₇	4 (2)
100	AJ56644	2	244	(AG) ₆ C (AG) ₄	6 (3)
79	AJ566425	9	108	(TC) ₈	5 (2)
189	AJ566517	8	150	(GT) ₁₂	7 (5)
91	AJ566435	10	186	(CT) ₁₀	3 (1)
265	AJ566585	5	246	(AG) ₁₈	8 (5)
73	AJ566420	2	112	(CT) ₄ TT (CT) ₂ G (TC) ₈	4 (2)
7	Y16981	7	160	(GA) ₁₁	6 (3)
266	AJ566586	9	192	(CT) ₁₅	7 (4)
167	AJ566496	3	254	(GA) ₁₆	8 (5)
84	AJ566429	1	136	(GA) ₁₁	5 (3)
63	-	9	161	(CGT)-	3 (0)
163	AJ566492	8	194	(AG) ₉	2 (0)
221	AJ566542	4	273	(TC) ₉	4 (2)
121	AJ566462	1	138	(TG) ₁₂	6 (3)
291	AJ566609	6	218	(CT) ₁₂	7 (4)
109	AJ566452	5	162	(CT) ₁₂	4 (1)
229	AJ566550	10	307	(TC) ₈	6 (4)
184	AJ566512	1	139	(CA) ₈ (CT) ₁₃	5 (1)
222	AJ566543	4	220	(GA) ₉	6 (3)
190	AJ566518	7	166	(TG) ₁₂	7 (5)
268	AJ566588		316	(GA) ₁₇	6 (2)

Fuente: Pugh *et al.* (2004), Jiménez (2006)

Los datos moleculares generados por el subproyecto N° 1 “Estudio de la Diversidad Genética del Cacao Venezolano”, fueron procesados en tres centros de investigación del país. Las muestras de hojas de cacao del occidente del país fueron procesadas en el Laboratorio de Genética y Química Celular de la Universidad de los Andes (Ramis *et al.*, 2009), dicho procesamiento fue realizado con el fin de procesar material de los distintos bancos de germoplasma que conforman la región occidental del país (Mérida, Zulia, Táchira, parte de Barinas y Apure)(Portillo, 2000), la cual presenta características agro-climáticas parecidas, con ello se evitó la transferencia de material vegetal que pudiera presentar en su composición enfermedades asociadas al cultivo, así como hongos y bacterias que pudieran propagarse en las zonas productoras de la región central y oriental del país (Ramis *et al.*, 2009).

Los materiales vegetales de los bancos de germoplasmas de la región central y parte de la región oriental fueron procesados en el Laboratorio de Genética Molecular del Centro de Investigaciones en Biotecnología Agrícola (CIBA), de la Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela. Y parte de los materiales de la región oriental específicamente los materiales del banco de germoplasma de Irapa pertenecientes al INIA-Sucre, fueron analizados en el Laboratorio del Centro de Tecnología del Instituto de Estudios Avanzados (IDEA), adjunto al Ministerio del Poder Popular para la Ciencia, Tecnología e Innovación.

Para el análisis de los datos moleculares se realizó previamente dos actividades de organización y estandarización de criterios de descripción molecular. En ese último caso, se estableció la correspondencia de alelos obtenidos para cada SSR, para los tres laboratorios de investigación, con el fin de obtener el genotipado uniforme de cada accesión y SSR.

Para ello, dentro de las actividades del proyecto en Red “Ruta del Chocolate”, previamente al inicio de los análisis moleculares realizados en cada laboratorio, se seleccionaron genotipos referenciales representativos de los grupos

morfogeográficos criollos, trinitarios, bajo amazónico y alto amazónico. Tales referenciales fueron incluidos en cada PCR y gel de electroforesis en poliacrilamida (PAGE). De esta manera, por comparación de las imágenes de los geles y las matrices de genotipado realizados en cada laboratorio se establecieron las correspondencias de alelos y se construyeron matrices consolidadas de alelos y genotipos para el posterior análisis estadístico.

Análisis Estadístico

Caracterización Morfológica:

Para cada banco de germoplasma se procedió a caracterizar la variabilidad morfológica a través de la estadística descriptiva (promedio, mínimo, máximo, desviación estándar y coeficiente de variación) para las variables cuantitativas y para las variables cualitativas se aplicó el índice de diversidad de Nei (Jiménez, 2006).

Selección de Características Morfológicas por Banco de Germoplasma

Características cualitativas

Con el objeto de disminuir la cantidad de variables cualitativas por banco de germoplasma, se procedió a aplicar el índice de diversidad de Nei, el cual presenta un rango que va de 0 a 1, indicando de manera creciente la variabilidad de una accesión con respecto a una característica específica. Este índice nos permitió seleccionar las características más representativas del universo de 20 variables cualitativas evaluadas (Jiménez, 2006).

Características cuantitativas

Definiendo el análisis de componentes principales (ACP) se puede decir que es un método que transforma un conjunto de variables cuantitativas originales en otro conjunto de variables independientes no correlacionadas, llamadas componentes principales. El objeto de esta metodología es reducir al máximo las características evaluadas para cada órgano de la planta, lo cual nos permitirá seleccionar las variables cuantitativas más discriminatorias para limitar el número de características a evaluar en el proceso de selección de

genotipos representativos (Hidalgo, 2003). Para la construcción del ACP se utilizó el Software estadístico Paleontológico para Educación y el Análisis de datos (PAST) versión 1.42. En este análisis se evaluaron 28 características cuantitativas para 623 árboles que conforman las 10 colecciones representativas de cacao del país. Con el objeto de reducir el número de características cuantitativas que serán utilizadas para definir los genotipos representativos de cada banco de germoplasma, se procedió a seleccionar el componente principal 1 de cada banco de germoplasma, el cual explica en todos los bancos de germoplasma un porcentaje de la varianza absoluta mayor o igual a 30 %. La selección del número de componentes que se deben tomar para el análisis de diversidad es un tema de discusión entre especialistas, ya que no existen pruebas estadísticas inferenciales que permitan probar la significancia de dichos valores (Hidalgo 2003), por ello se tomó el criterio de selección establecido por Cliff (1987) en el que se considera aceptable los componentes cuyos valores propios explican un 70 % o más de la varianza total de una colección.

Selección de Genotipos por Banco de Germoplasma

Mediante la aplicación de un análisis de agrupamiento a las características cualitativas y cuantitativas para cada banco de germoplasma utilizando el programa PAST versión 1.42, utilizando un índice de distancia euclidiana, se pudieron seleccionar los genotipos representativos para cada banco de germoplasma de cacao, el criterio de selección se basó en el conocimiento aportado por cada curador de las colecciones y siguiendo una estrategia similar para establecer una colección núcleo, la idea fué principal disminuir el número de accesiones manteniendo la diversidad genética contenida en una colección, para ello se consideran dos aspectos básicos, el tamaño óptimo de la muestra y la estrategia para seleccionar las accesiones contenidas en esa colección núcleo. Con respecto al tamaño de la Muestra yonezawa *et al.* (1995) menciona lo propuesto por Brown (1989), quien formuló que un tamaño de un 10% era apropiado; mientras que estos autores proponen un tamaño de muestra del 20-30% dependiendo del grado de redundancia de las accesiones

de la colección, el periodo de conservación y los recursos disponibles para su conservación.

Por otra parte con respecto a la decisión de cuales genotipos se deben incluir, Yonezawa *et al.* (1995) señalan a la estrategia de estratificación, considerando que la selección de genotipos es recomendable cuando no se conoce la diversidad genética absoluta dentro de los grupos, como es el caso de la mayoría de las colecciones.

Siguiendo estos criterios se decidió seleccionar el 10% de los genotipos incluidos en los distintos grupos formados en cada colección.

Análisis de la Diversidad Genética a partir de datos morfológicos

Características cualitativas y cuantitativas

Para el análisis de diversidad genética nacional se realizó una nueva selección de las características cuantitativas y cualitativas, aplicando componentes principales a los datos cuantitativos de solo los genotipos seleccionados (Ramos *et al.*, 2004). En cuanto a la selección de las características cualitativas se seleccionaron las que presentaban mayor índice de diversidad, todo ello con base a los datos aportados por los genotipos seleccionados.

Con base en los genotipos seleccionados y las características cuantitativas y cualitativas representativas, se procedió a construir una matriz de datos, a la cual se le agregaron genotipos utilizados a nivel internacional para definir las estructuras morfológicas del cacao hasta ahora estudiadas (Motamayor *et al.*, 2008). Los datos de estos genotipos fueron suministrados por la Investigadora del INIA- Miranda Olga Móvil, encargada de la conservación y estudio del banco de germoplasma internacional, ubicado en la estación Padrón (INIA-Miranda).

A partir de la matriz se obtuvo un dendrograma UPGMA (ligamiento promedio no ponderado), mediante el programa PAST (Versión 1.42).

Con esta matriz de datos se realizó el ACP y se construyó un gráfico de distribución de genotipos con base a la relación de los componentes 1 y 2. Lo

cual corroboró las relaciones entre individuos de bancos de germoplasma y entre genotipos de cada banco de germoplasma.

Caracterización molecular:

Cuantificación de la Variabilidad Genética de cada Banco de Germoplasma y a nivel nacional

Se realizó la verificación de la información molecular de cada banco de germoplasma, evaluándose el número de alelos por locus, % heterocigotas y el contenido de información polimórfica (PIC) para un máximo de 22 microsatélites (Jiménez, 2006).

Selección de genotipos a partir de datos moleculares.

Se realizó un análisis de agrupamiento UPGMA utilizando el índice de similitud de DICE para cada colección, también un gráfico de distribución de los genotipos a partir de un análisis de correspondencia para ayudar a la selección de los mismos.

Similitud genética

A fin de establecer las relaciones genéticas entre los materiales incluidos en cada banco de germoplasma, a partir de las matrices de genotipaje de cada marcador molecular y accesión, se procedió a realizar una matriz de presencia/ausencia de bandas, a partir del cual se calculará el Índice de similitud de DICE para cada par de individuos a través de la fórmula:

$$Sd = \frac{2a}{2a + b + c}$$

Donde "a" corresponde al número de bandas comunes entre dos genotipos; y "b" y "c" representaran el número de bandas presentes en un genotipo y ausente en el otro (Jiménez, 2006).

La selección se realizó escogiendo los genotipos de los grupos emparentados observados en las gráficas del análisis de UPGMA y del análisis de

correspondencia, siguiendo el criterio de selección propuesto por Yonezawa *et al.* (1995).

Estructura Genética de las colecciones de Cacao en Venezuela

Preparación de matrices consolidadas.

Con base en los genotipos seleccionados por banco de germoplasma, se procedió a definir y a unificar criterios relacionados con los alelos existentes en cada banco de germoplasma, para ello se utilizaron como referenciales morfogeográficos al genotipo BEN02 de la colección de San Juan de Lagunillas (Mérida) y el genotipo CHIAPAS (colección MINAMB) como referenciales poseedores del alelo criollo, por consiguiente tomando de la colección de clones internacionales en la Estación Experimental Padrón (INIA-Miranda) se tomó al referencial bajo amazónicos al clon SIAL-407, y el clon C1 aportado por el Laboratorio de Genética de la ULA. También los referenciales alto amazónicos (SCA-6, P-12) y trinitarios (TSH-1075, ICS-60) fueron aportados por la Estación Experimental Padrón.

En la matriz se procuró incorporar dos materiales que son frecuentes en las regiones productoras del país, los mismos son el material CHO-42 (Colección 1945) y el IMC-67 (Clon Internacional), dichos materiales han sido utilizados en programas de cruces. Se llegó a una matriz consenso compuesta por 125 individuos

Para el estudio de la estructura genética de las poblaciones, se utilizó el análisis basado en los métodos de estadística Bayesiana incluido en el programa *Structure*, versión 2.2 (Pritchard *et al.*, 2007).

Para este análisis se realizaron corridas previas para establecer los parámetros que asumirá el programa en las inferencias poblacionales con el fin de establecer relaciones genéticas entre los genotipos y los referenciales morfogeográficos. Como resultado de estas pre-corridas se estableció un periodo de 200.000 repeticiones burn-in (quemado), luego para aproximar la probabilidad posterior de los individuos se utilizó un periodo de 500.000 MCMC

(Cadenas Markovianas de Monte Carlo). Dichos valores de corrida se implementaron para los 125 datos, estableciendo un parámetro de corrida denominado lambda (0.22), tomando un modelo admixture con frecuencias correlacionadas, a su vez, se infirieron 10 poblaciones ancestrales (clúster = K) con 10 repeticiones por K.

Aplicando la matriz de selección de poblaciones ancestrales propuesta por Evanno *et al.* (2005) se procedió a elegir la estructura poblacional dependiendo del mayor valor de delta K (diferencial poblacional). Después de seleccionada la estructura poblacional que definen a las distintas colecciones, se procedió a utilizar el programa CLUMPP versión 1.1.2 (Jakobsson y Rosenberg, 2009) que permitió obtener una salida consensuada a partir de las 10 repeticiones de cada K seleccionada. Luego con el programa DISTRUCT (Rosenberg, 2007) se pudo graficar la salida obtenida por el anterior programa.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. VERIFICACIÓN DE LA INFORMACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE CADA BANCO DE GERMOPLASMA, A FIN DE CONSOLIDAR LA INFORMACIÓN APROVECHABLE PARA EL ANÁLISIS DE DIVERSIDAD GENÉTICA

En el cuadro 6 se presentan el origen de la data recopilada de los distintos trabajos de caracterización morfológica realizada en el marco del Subproyecto 1 de la “Ruta del Chocolate”, indicándose para cada Banco de Germoplasma el número de accesiones caracterizadas, el número de características morfológicas cualitativas y cuantitativas consideradas y si corresponden a algún trabajo publicado, en el marco del mencionado proyecto o no.

En términos generales, se obtuvieron matrices consolidadas con data verificada en cuanto a la metodología de las caracterizaciones; en todos los casos se utilizó el Manual Práctico desarrollado por Jiménez *et al.* (En revisión), basado en Engels *et al.*, (1980), para un total nacional de 623 accesiones de cacao.

Es importante señalar que para el caso de la colección de la UNET (La Morusca) no se contó con caracterización morfológica debido a que, aunque estaba previsto en el Subproyecto1, no se pudo realizar debido a una vaguada que daño significativamente las plantas ahí establecidas.

Por otra parte, en algunos casos no se cuenta con la caracterización de frutos y semillas debido al joven establecimiento de las colecciones que para la fecha no habían entrado en fructificación. De esta manera, para un mismo banco de germoplasma hay accesiones con la descripción de todos los órganos, mientras que otras no. Esta realidad limitó el trabajo de análisis al momento de realizar la selección de clones para el estudio nacional de diversidad genética, pues se incluyeron aquellos representativos de los grupos formados en los análisis de agrupamiento y que además tuvieran la data de caracterización completa.

Una de las variables importantes como criterio de productividad para los programas de mejoramiento genético son el índice de almendra y el índice de

mazorca, ambos se basan en el peso de semilla seca. En algunos bancos de germoplasma donde en sus instalaciones no se contaba, para la fecha, con una estufa para el secado de las semillas, no se incluyeron tales variables.

Todas estas observaciones evidencia la necesidad de continuar con la caracterización de todos los clones resguardados en cada banco de germoplasma.

Cuadro 6. Características morfológicas, cualitativas y cuantitativas, incluidas en el estudio de diversidad genética de los bancos de germoplasma nacional de cacao (*Theobroma cacao* L.)

Colecciones	Localización	Nº de accesiones caracterizadas	Características cualitativas evaluadas	Características cuantitativas evaluadas	Fuente
Colección de 1945. INIA-CENIAP	Campo del CENIAP, Maracay, estado Aragua	19	18	28	(Vidal y Coelho, 2001)
Colección de 1995. INIA-CENIAP	Campo del CENIAP, Maracay, estado Aragua	37	20	27	(datos proyecto Ruta del Chocolate)
CORPOZULIA	Km. 41, vía Santa Bárbara del Vigía, parroquia el Moralito, Municipio Colón – Estado Zulia	89	20	29	(Chacón <i>et al.</i> , 2011); (datos proyecto Ruta del Chocolate)
Colección Barlovento. INIA-Miranda	Campo Experimental "Padrón", Tapipa, estado Miranda	20	16	18	(Jiménez, 2006)
Colección de Clones Internacionales. INIA-Miranda	Campo Experimental "Padrón", Tapipa, estado Miranda	86	20	28	(datos proyecto Ruta del Chocolate)
Colección Jardín Clonal Padrón. INIA-Miranda	Campo Experimental "Padrón", Tapipa, estado Miranda	137	20	27	(Jiménez, 2006)
UNESUR	Hacienda "La Glorieta". Santa Bárbara del Zulia, Municipio Colón, estado Zulia	60	12	27	(Barrientos, 2008); (Parra y Rosales, 2007). (datos proyecto Ruta del Chocolate)
INIA-Mérida	Estación Experimental "San Juan de Lagunillas", estado Mérida	65	13	27	(Ramos, 2004)
INIA-Sucre	Estación Irapa, estado Sucre	20	17	19	(Villalba y Zamora, 2007). (datos proyecto Ruta del Chocolate)
UNET	Estación Experimental "La Morusca", UNET, estado Tachira.	-	-	-	Márquez (2012). (datos proyecto Ruta del Chocolate)
MINAMB-CNRG	El Limón, municipio Mario Briceño Irragory, estado Aragua	90	18	19	(Moreno, 2008). (datos proyecto Ruta del Chocolate)
TOTAL		623			

En lo que se refiere a la caracterización molecular en el Cuadro 7 se presentan para cada banco de germoplasma el número de accesiones caracterizadas así como el número de microsatélites incluidos y tal como en el Cuadro 6, si tales estudios fueron previamente publicados como producto del subproyecto 1 de la Ruta del Chocolate.

Cuadro 7. Número de accesiones caracterizadas y número de microsatélites incluidos en el estudio de diversidad genética basado en el análisis molecular con microsatélites de los bancos de germoplasma nacionales de cacao (*Theobroma cacao* L.)

Colecciones	Número de accesiones caracterizadas	Número de microsatélites analizados	Fuente
Colección de 1945. INIA-CENIAP	19	20	(datos proyecto Ruta del Chocolate)
Colección de 1995. INIA-CENIAP	28	20	(datos proyecto Ruta del Chocolate)
CORPOZULIA	111	7	(datos proyecto Ruta del Chocolate)
Colección Barlovento. INIA-Miranda	20	20	(datos proyecto Ruta del Chocolate)
Colección de Clones Internacionales. INIA-Miranda	10	20	(datos proyecto Ruta del Chocolate)
Colección Jardín Clonal Padrón. INIA-Miranda	140	21	(Jiménez, 2006)
UNESUR	28	12	(Polo, 2009)
INIA-Mérida	44	16	(datos proyecto Ruta del Chocolate)
INIA-Sucre	29	7	(datos proyecto Ruta del Chocolate)
UNET	8	14	(datos proyecto Ruta del Chocolate)
MINAMB-CNRRG	47	14	(Márquez, 2012)
MINAMB-CNRRG	91	9	(Moreno, 2008)
TOTAL	575		

Es importante señalar la ventaja del análisis molecular con respecto a la disponibilidad de tejido vegetal para la extracción de ADN, ya que la muestra puede conservarse en frío por mucho más tiempo. Caso contrario al morfológico que depende del estado fenológico de las accesiones y su conservación en campo. Sin embargo, en vista de la disponibilidad de recursos para los laboratorios, la caracterización molecular se vio limitada, por lo que no se obtuvo el genotipaje para todos los 24 microsatélites seleccionados en un principio. Esta situación obligó a la selección de microsatélites incluidos en la mayoría de los bancos de germoplasma y genotipos dentro de cada grupo representativo de los grupos formados en los análisis de agrupamiento por banco y que además tuvieran la data de caracterización completa.

De esta manera, se cuenta con la caracterización de 565 accesiones a nivel nacional con un mínimo de siete microsatélites, por lo que ese trabajo debe continuar.

2. ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA NACIONAL CON BASE EN VARIABLES MORFOLÓGICAS Y MOLECULARES

A fin de organizar el análisis de la vasta información generada por el subproyecto 1 de la “Ruta del Chocolate”, se decidió presentar los resultados iniciando con la caracterización morfológica, y dentro de ésta, las características cualitativas por órgano (hojas, flores, frutos y semillas), seguidas por las cuantitativas por órgano. Este primer análisis permitió describir la variabilidad presente en cada banco de germoplasma.

Seguidamente se presentarán los resultados para la selección de las variables morfológicas que mejor expliquen la variabilidad de cada banco para así realizar los análisis de diversidad y agrupamiento. Tales análisis permitieron la selección de genotipos representativos de la diversidad genética de cada banco y con ese grupo de accesiones se realizó el análisis de la diversidad genética nacional.

Para los datos moleculares se siguió una secuencia similar, se presentan los análisis por banco de germoplasma, que permitió seleccionar los individuos

representativos de la variabilidad presente en cada banco para, finalmente, realizar el análisis nacional de la diversidad genética de cacao.

2.1. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LOS BANCOS DE GERMOPLASMA A NIVEL NACIONAL

2.1.1. Características cualitativas por órgano.

La diversidad genética puede cuantificarse considerando la riqueza alélica y la uniformidad de frecuencia de tal riqueza alélica. Cuando el estudio se basa en la caracterización morfológica se consideran para cada variable analizada el número de categoría presentes en una población dada y la frecuencia relativa de cada una de las categorías (Ligarreto, 2003). De esta manera, se puede calcular un índice de diversidad biológica mediante diversos índices como el índice de diversidad genética (Nei, 1978) donde son considerados ambos criterios.

El análisis de la diversidad genética morfológica considerando variables cualitativas se realizó mediante la observación de categorías presentes para cada característica en cada banco de germoplasma, y a través del cálculo del índice de Nei. Este análisis permitió evidenciar las características más variables y los bancos de germoplasma contentivos de un mayor rango de diversidad genética, recurso indispensable para el desarrollo de programas de mejoramiento genético.

HOJAS

En el análisis de este órgano se evaluaron 5 características para la diferenciación de las accesiones utilizando un índice de diversidad genética (Nei, 1987), como se muestra en el Cuadro 8.

Base de la hoja.

Para la característica de base de la hoja, el banco con mayor variabilidad fue la colección de CORPOZULIA (0,66), la cual se caracteriza por tener accesiones que presentan hojas que van desde agudas hasta redondeadas, el banco que posee una variabilidad representativa es la colección 1945 con (0,50), y sus

accesiones presentan hojas con base aguda hasta redondeada. Cabe destacar que no se evaluó accesión alguna en los bancos de germoplasma que presentaran hojas con base codiforme.

Ápice de la hoja.

En cuanto al ápice de la hoja se encontró que la colección de 1945 presentó la mayor variabilidad con un índice de 0,53 seguido del Jardín Clonal de *Padrón* con 0,52, ambas colecciones presentaron accesiones con todas las categorías de esta característica, las cuales van de hojas con ápice agudo, hojas con ápice acuminado largo y acuminado corto, las accesiones de ambos banco se caracterizaron por presentar hojas en su mayoría acuminado largo y corto.

Textura de la hoja.

Otra de las características evaluadas para la hoja fue la textura, la cual en términos generales no presenta variabilidad alguna en los bancos de germoplasma, todas las hojas se caracterizaron por ser cartáceas, cabe destacar que no se presentaron datos para la colección Jardín Clonal de *Padrón* y la UNESUR.

Color del brote.

El color del brote en las hojas presentó su mayor diversidad en la colección de 1995 (0,33), donde la colección se caracterizó por tener plantas con brotes con ausencia de antocianinas y un número reducido de plantas con brotes con antocianina, esta tendencia se repitió en todos los bancos pero en mayor proporción haciéndolos más uniformes para esta categoría.

Pubescencia de la hoja.

Seguidamente la característica de pubescencia en las hojas se encuentra en mayor variabilidad en la colección de 1995 (0,73), donde se encuentran plantas con todas las categorías que van desde la ausencia de pubescencia hasta hojas con intensa pubescencia, le sigue la colección 1945 (0,56), presentando todas las formas de categoría en la colección. Cabe destacar que para esta característica las accesiones representativas de la región cacaotera aragüeña

presentan la mayor variabilidad de plantas que van desde la ausencia de pubescencia hasta hojas con una intensa pubescencia.

Cuadro 8. Frecuencia de cada categoría en número absolutos (FC) y relativos (%) de las características cualitativas de las hojas de cacao (*Theobroma cacao* L.) e índices de diversidad (Nei) para cada Banco de Germoplasma.

Características	Categoría	1945		1995		Barlovento		CORPOZULIA		Irapa		Merida		Minamb		JCP		UNESUR	
		F.C.	%																
Base de la Hoja	1	12	0,63	32	0,84	14	0,82	48	0,40	17	0,85	0	0,00	58	0,64	90	0,88	45	0,90
	2	6	0,32	6	0,16	3	0,18	36	0,30	3	0,15	65	1,00	32	0,36	47	0,34	5	0,10
	3	1	0,05	0	0,00	0	0,00	35	0,29	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
	4	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
	Nei	0,50		0,27		0,29		0,66		0,26		0,00		0,46		0,45		0,18	
Apice de la Hoja	1	1	0,05	0	0,00	0	0,00	2	0,02	0	0,00	0	0,00	0	0,00	6	0,04	1	0,02
	2	11	0,58	27	0,71	11	0,65	46	0,39	6	0,30	0	0,00	65	0,72	80	0,58	0	0,00
	3	7	0,37	11	0,29	6	0,35	71	0,60	14	0,70	65	1,00	25	0,28	51	0,37	48	0,98
	Nei	0,53		0,41		0,46		0,49		0,42		0,00		0,40		0,52		0,04	
Textura de la Hoja	1	19	1,00	38	1,00	17	1,00	117	0,98	20	1,00	0	0,00	90	1,00				
	2	0	0,00	0	0,00	0	0,00	3	0,03	0	0,00	67	1,00	0	0,00				
	3	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00				
	Nei	0,00		0,00		0,00		0,05		0,00		0,00		0,00					
Color del Brote	1	1	0,05	7	0,21			5	0,08			4	0,06	2	0,03				
	3	18	0,95	27	0,79			60	0,92			62	0,94	59	0,97				
	Nei	0,10		0,33				0,14				0,11		0,06					
Pubescencia	0	1	0,05	5	0,14			0	0,00					0	0,00				
	1	11	0,58	10	0,29			8	0,07					57	1,00				
	2	6	0,32	11	0,31			73	0,61					0	0,00				
	3	1	0,05	9	0,26			39	0,33					0	0,00				
	Nei	0,56		0,73				0,52				0,00							

FLORES.

Antocianinas en el sépalo de la flor.

Para el estudio de la variabilidad en plantas tomando en cuenta su sistema reproductivo sexual, se seleccionaron como referencia 4 características representativas, dichos valores se observan en el Cuadro 9. Dentro de ellas se tiene la presencia de antocianina en el sépalo de la flor, de la cual la colección de 1945 presenta la mayor variabilidad (0,71), ya que se encuentran genotipos con ausencia de antocianina hasta sépalos con intensidad de este pigmento natural. Seguido a esta colección se encuentran los genotipos de la colección de 1995 donde se encuentra un índice de 0,63, resaltando que en esta colección no se registraron genotipos con intensidad de antocianina en sus sépalos. Es importante resaltar que para esta característica de la flor en específico la mayor diversidad se observa en los genotipos de la región cacaotera aragüeña.

Antocianina en el limbo del pétalo.

Seguidamente se presenta la característica de antocianina en el limbo del pétalo, aquí las colecciones de Barlovento e Irapa presentaron los índices más altos y similares entre sí (0,49) y (0,50) respectivamente. Las demás colecciones no reflejaron mayor diversidad para esta característica, ya que predomina la ausencia de antocianina en el sépalo. Se puede inferir que la presencia de antocianina en esta parte del sépalo es muy característica en los genotipos conservados en la región central hasta llegar al oriente del país.

Antocianina en el filamento de la flor

Para la característica de antocianina en el filamento de la flor, los resultados arrojan que la colección de Irapa presenta una mayor proporción de genotipos con ausencia y presencia de antocianina en el filamento de la flor, el índice para esta colección es de 0,38. Cabe resaltar, que sin embargo el dato anterior no es tan significativo y refleja una característica que podría caracterizar los genotipos de la zona oriental, ya que esta diversidad no se refleja en las demás colecciones del país.

Antocianina en el estaminodio de la flor

En cuanto a la antocianina en el estaminodio de la flor, la colección MINAMB presenta la mayor variabilidad para esta característica (0,56) seguido de la colección de 1995 (0,49). Es importante resaltar que colección MINAMB está conformada por réplicas de la colección 1945, 1995 y colectas en plantaciones adyacentes al antiguo pueblo de Turiamo (Edo. Aragua) y la población de ZEA (Edo. Mérida), así como también descendientes de estas colecciones. Estos resultados demostrarían que los genotipos de la región aragüeña presentan la mayor variabilidad con respecto a la antocianina en esta parte de la flor.

Antocianina en la parte inferior del estilo

Por último en la discusión de este cuadro, se presenta la característica de antocianina presente en la parte inferior del estilo, donde predominó la ausencia de este pigmento en la casi todas las colecciones del país, resaltando la colección de 1995 con un índice de diversidad de 0,36, por lo que se puede observar que esta colección mantiene dentro de sus genotipos cierta variabilidad para esta característica.

Cuadro 9. Frecuencia de cada categoría en número absolutos (FC) y relativos (%) de las características cualitativas de las flores de cacao (*Theobroma cacao* L.) e índices de diversidad de Nei para cada Banco de Germoplasma.

Características	categoria	1945		1995		Barlovento		CORPOZULIA		Irapa		Minamb		ICP	
		F.C	%												
Antocianina sepalo	0	7	0,37	16	0,42	16	1,00	6	0,16	9	0,45	15	0,29	94	0,70
	3	5	0,26	15	0,39	0	0,00	14	0,37	10	0,50	27	0,53	34	0,25
	5	5	0,26	7	0,18	0	0,00	18	0,47	1	0,05	8	0,16	5	0,04
	7	2	0,11	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	7	0,14	1	0,01
	Nei	0,71		0,63		0,00		0,61		0,55		0,59		0,44	
Antocianina Limbo	0	19	1,00	31	0,82	9	0,56	38	1,00	11	0,55			129	0,96
	1	0	0,00	7	0,18	7	0,44	0	0,00	9	0,45			5	0,04
	Nei	0,00		0,30		0,49		0,00		0,50				0,07	
Antocianina Filamento	0	19	1,00	36	0,95	13	0,81	38	1,00	15	0,75	48	0,94	123	0,92
	3	0	0,00	2	0,05	3	0,19	0	0,00	5	0,25	3	0,06	11	0,08
	Nei	0,00		0,10		0,30		0,00		0,38		0,11		0,15	
Antocianina Estaminodio	0	0	0,00	3	0,08	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,01
	3	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	4	0,08	0	0,00
	5	0	0,00	25	0,66	2	0,13	0	0,00	0	0,00	26	0,51	26	0,19
	7	19	1,00	10	0,26	14	0,88	38	1,00	20	1,00	21	0,41	107	0,80
	Nei	0,00		0,49		0,22		0,00		0,00		0,56		0,32	
Antocianina Parte Inferior del Estilo	0	17	0,89	29	0,76	16	1,00	38	1,00	19	0,95	47	0,92	133	0,99
	3	2	0,11	9	0,24	0	0,00	0	0,00	1	0,05	4	0,08	1	0,01
	Nei	0,19		0,36		0,00		0,00		0,10		0,14		0,01	

FRUTOS

En el Cuadro 10 se presentan los resultados del análisis de las características cualitativas de los frutos por colección de germoplasma.

Color del fruto.

La primera característica a discutir es el color del fruto, presentando la colección de 1945 presenta la mayor diversidad dentro de sus accesiones con un índice de 0,65, dicha colección en su mayoría se presentan genotipos con una intensidad de antocianina intermedia, destacando la presencia de genotipos con todos los colores característicos y sus intensidades. Seguida a esta colección se presenta el banco de germoplasma de CORPOZULIA (0,59), caracterizada por presentar frutos principalmente claros amarillos, coincidiendo con Chacón *et al.* (2011), quienes consiguieron la mayoría de los frutos claros mencionados como blancos, pero coincidentes con el color que aquí se reporta como amarillo claro según tabla de colores para tejidos vegetales de Munsell (2,5 GY 8/2 a 8/6) .

Cuadro 10. Frecuencia de cada categoría en número absolutos (FC) y relativos (%) de las características cualitativas de los frutos de cacao (*Theobroma cacao* L.) e índices de diversidad (Nei) para cada Banco de Germoplasma.

Características	categoría	1945		1995		Barlovento		CORPOZULIA		Irapa		Merida		Minamb		JCC		UNESUR	
		F.C	%	F.C	%														
Color del fruto	0	1	0,05	0	0,00	0	0,00	15	0,17	0	0,00	57	0,85	0	0,00	0	0,00	4	0,31
	3	3	0,16	16	0,55	4	0,33	53	0,60	14	0,70	0	0,00	5	1,00	22	0,69	9	0,69
	5	9	0,47	13	0,45	1	0,08	7	0,08	0	0,00	0	0,00	0	0,00	5	0,16	0	0,00
	7	6	0,32	0	0,00	7	0,58	14	0,16	6	0,30	10	0,15	0	0,00	5	0,16	0	0,00
	Nei	0,65		0,49		0,54		0,59		0,42		0,25		0,00		0,48		0,43	
Intensidad de Antocianina Lomos Frutos Inmaduros	0			15	0,52					12	0,60	17	0,26	4	0,80			13	1,00
	3			14	0,48					1	0,05	35	0,54	1	0,20			0	0,00
	5			0	0,00					0	0,00	3	0,05	0	0,00			0	0,00
	7			0	0,00					7	0,35	10	0,15	0	0,00			0	0,00
	Nei			0,50						0,52		0,62		0,32				0,00	
Intensidad de Antocianina en Surcos Primarios en Frutos Inmaduros	0			28	0,97					13	0,65			5	1,00			13	1,00
	3			1	0,03					0	0,00			0	0,00			0	0,00
	5			0	0,00					0	0,00			0	0,00			0	0,00
	7			0	0,00					7	0,35			0	0,00			0	0,00
	Nei			0,07						0,46				0,00				0,00	
Forma del fruto	1	2	0,11	13	0,43	1	0,08	65	0,73	4	0,20	65	1,00	2	0,40	4	0,13	33	0,77
	2	10	0,53	17	0,57	4	0,33	23	0,26	15	0,75	0	0,00	2	0,40	15	0,47	9	0,21
	3	6	0,32	0	0,00	6	0,50	1	0,01	1	0,05	0	0,00	0	0,00	13	0,41	1	0,02
	4	1	0,05	0	0,00	1	0,08	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,20	0	0,00	0	0,00
	5	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
	Nei	0,61		0,49		0,63		0,40		0,40		0,00		0,64		0,60		0,37	
Constricción Basal del fruto	0	5	0,26	20	0,67	0	0,00	64	0,72	8	0,40	48	0,74	4	0,80	19	0,59	36	0,84
	3	10	0,53	10	0,33	2	0,17	22	0,25	12	0,60	10	0,15	1	0,20	11	0,34	7	0,16
	5	1	0,05	0	0,00	3	0,25	3	0,03	0	0,00	3	0,05	0	0,00	1	0,03	0	0,00
	7	3	0,16	0	0,00	7	0,58	0	0,00	0	0,00	4	0,06	0	0,00	1	0,03	0	0,00
	Nei	0,63		0,44		0,57		0,42		0,48		0,43		0,32		0,53		0,27	
Apice del fruto	1	6	0,32	13	0,43	1	0,08	64	0,72	4	0,20	46	0,71	3	0,60	4	0,13	24	0,56
	2	8	0,42	5	0,17	3	0,25	16	0,18	9	0,45	18	0,28	0	0,00	7	0,22	15	0,35
	3	5	0,26	9	0,30	8	0,67	7	0,08	6	0,30	1	0,02	2	0,40	17	0,53	1	0,02
	4	0	0,00	1	0,03	0	0,00	1	0,01	1	0,05	0	0,00	0	0,00	1	0,03	0	0,00
	5	0	0,00	1	0,03	0	0,00	1	0,01	0	0,00	0	0,00	0	0,00	3	0,09	3	0,07
	6	0	0,00	1	0,03	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
Nei	0,65		0,69		0,49		0,44		0,67		0,42		0,48		0,65		0,57		
Rugosidad del fruto	0	0	0,00	1	0,03	0	0,00	9	0,10	0	0,00	5	0,08	0	0,00	0	0,00	14	0,33
	3	12	0,63	8	0,27	4	0,33	58	0,65	7	0,35	28	0,43	0	0,00	17	0,53	27	0,63
	5	5	0,26	9	0,30	8	0,67	18	0,20	8	0,40	28	0,43	3	0,60	8	0,25	1	0,02
	7	2	0,11	12	0,40	0	0,00	4	0,04	5	0,25	4	0,06	2	0,40	7	0,22	1	0,02
	Nei	0,52		0,68		0,44		0,52		0,66		0,62		0,48		0,61		0,50	
Apariencia en Pares Lomos del fruto	0	0	0,00	1	0,03	0	0,00	49	0,55	1	0,05			0	0,00	3	0,09	3	0,23
	3	9	0,47	19	0,63	6	0,50	24	0,27	8	0,40			2	0,40	6	0,19	10	0,77
	5	7	0,37	1	0,03	1	0,08	13	0,15	9	0,45			3	0,60	10	0,31	0	0,00
	7	3	0,16	0	0,00	1	0,08	1	0,01	2	0,10			0	0,00	3	0,09	0	0,00
	9	0	0,00	9	0,30	4	0,33	2	0,02	0	0,00			0	0,00	10	0,31	0	0,00
	Nei	0,61		0,51		0,63		0,60		0,63				0,48		0,75		0,36	

Intensidad de Antocianina Lomos Frutos Inmaduros.

Las características de intensidad de antocianina en lomos y surcos primarios en frutos inmaduros, fueran las características que no pudieron ser evaluadas en las colecciones de 1945, Barlovento, CORPOZULIA y Jardín Clonal Padrón. En cuanto al análisis de la intensidad en lomos de frutos se puede destacar la colección de Mérida con un índice de 0,62 presentando genotipos con todas las intensidades de antocianina en los lomos de los frutos, destacándose en esta colección genotipos con ligeras intensidades de antocianina. La colección de Irapa representa una de las colecciones de mayor variabilidad para esta característica con 0,52, cabe resaltar que en esta colección no se presentaron genotipos con intensidades intermedias.

Intensidad de Antocianina en surcos primarios de frutos inmaduros.

Los resultados para la intensidad de antocianina en los surcos primarios reflejaron que la colección de Irapa presentó la mayor diversidad con un índice de 0,46 resaltando genotipos con ausencia y presencia intensa de este pigmento natural, los genotipos intermedios para esta característica no se registraron. En las demás colecciones la variabilidad de esta característica fue inexistente.

Forma del fruto.

Para la forma del fruto los resultados arrojaron que la colección MINAMB presenta los índices mas altos con 0,64, sin embargo para esta colección sólo fueron registrados datos de 5 accesiones, por lo que representa un número muy bajo de genotipos para estimar la variabilidad de esa colección. La colecciones con mayor diversidad para esta característica son Barlovento (0,63), 1945 (0,61) y JCP (0,60). La colección Barlovento está conformada por genotipos que presentan frutos de forma oblonga hasta redondeados, no se observaron frutos esferoides, la misma descripción aplica en la colección de 1945. Para la colección JCP solo se observaron frutos oblongos, elípticos y ovalados.

Constricción basal del fruto.

En cuanto a la constricción basal del fruto se tiene que la colección 1945 presenta la mayor variabilidad con un índice de 0,63, presentando frutos con ausencia y pronunciada constricción, sin embargo la mayor proporción de genotipos presentan frutos con ligera constricción basal. También la colección Barlovento representa una de las más variables para esta característica con 0,57 resaltando frutos con constricciones ligeras, intermedias y pronunciadas, los frutos con ausencia de constricción no se observaron en esta colección. La colección JCP le sigue como una de las más variables con 0,53, destacando en su mayoría frutos con ausencia de constricción basal.

Ápice del fruto.

Analizando el ápice del fruto se observa relativa variabilidad en cada banco de germoplasma del país. Destacando principalmente a la colección de 1995 con un índice de 0,69, presentando frutos con todas las categorías evaluadas, le sigue la colección de Irapa con 0,67 donde no se observaron frutos con ápices mamiformes y con ápices atenuados en curva, seguidamente se presentan las colecciones 1945 y JCP con similares índices (0,65). Se destaca que la colección JCP presenta la mayor variabilidad en cuanto a la forma del ápice.

Rugosidad del fruto.

En cuanto a la rugosidad del fruto es destacable que existe mucha variabilidad en cada banco de germoplasma. Resaltando principalmente la colección 1995 (0,68), dicha colección se caracteriza por presentar frutos con ausencia de rugosidad hasta frutos con una intensa rugosidad, ésta es la categoría que predomina en esta colección. Seguidamente se presenta la colección Irapa (0,66) y la colección JCP (0,61) como las colecciones más variables para esta característica, se resalta que para ambas colecciones no se presentaron frutos con ausencia de rugosidad, los frutos se establecieron en su mayoría con rugosidad de ligera a intermedia.

Apariencia en los pares de lomos del fruto.

Por último se observa igual mucha variabilidad en cada banco de germoplasma para la característica de apariencia en pares de lomos, destacando así a la colección JCP que presenta un índice de diversidad de 0,75, dicha colección presenta frutos con lomos fusionados hasta frutos con lomos equidistantes en proporciones representativas para los caracteres intermedios y equidistantes. Las colecciones que le siguen al JCP son Barlovento e Irapa con similar índice (0,63); sin embargo, resalta que para la colección Barlovento no se presentaron frutos con lomos fusionados a diferencia de la colección de Irapa donde no se presentaron frutos con lomos equidistantes.

Analizando las características de los frutos podemos destacar que la mayor variabilidad en frutos puede observarse en las regiones centrales hasta las regiones orientales, se presentan distintos colores y diferentes intensidades de antocianina en las partes del fruto, así como distintas formas y apariencias del fruto, resaltando una riqueza morfológica para esta parte representativa de la planta de cacao.

SEMILLAS

En el Cuadro 11 se presentan las características cualitativas que describen a las semillas, dichas descripciones muestran principalmente las formas de semillas existentes y la variedad de colores para los cotiledones.

Forma de la semilla.

Para la característica forma de la semilla se puede resaltar la ausencia de datos en las siguientes colecciones: Barlovento, Irapa, MINAMB y JCP. Como se explicó al inicio de la discusión, para la fecha de la caracterización morfológica, los árboles no habían llegado a su etapa de fructificación. Por lo que se requiere completar dicha labor.

En cuanto a la variabilidad por forma de semilla, la colección UNESUR presenta un índice de diversidad de 0,66, donde se presenta una distribución más o menos uniforme en cuanto a semillas elípticas y ovoides y en menos

proporción las semillas con forma oblonga. Seguidamente se presenta la colección CORPOZULIA con 0,50 y la distribución de las formas de semillas se enfocan hacia formas oblongas y elípticas.

Color del cotiledón.

Para el color del cotiledón la colección con mayor diversidad fue la colección de 1945 con 0,79 donde se observa una proporción uniforme en todas las categorías de colores, a esta colección le siguen la de 1995 (0,62) donde se caracteriza por tener en su mayoría almendras de color violeta oscuro, muy de cerca se encuentra la colección JCP (0,61) y en la misma la proporción de almendras en su mayoría tabulan en violeta claro y violeta oscuro. En síntesis se observa que la variabilidad en el color de almendras se encuentra en los genotipos de la región central Aragua y de Miranda.

Cuadro 11. Frecuencia de cada categoría en número absolutos (FC) y relativos (%) de las características cualitativas de las semillas de cacao (*Theobroma cacao* L.) e índices de diversidad (Nei) para cada Banco de Germoplasma.

Características	Categoría	1945		1995		Barlovento		CORPOZULIA		Irapa		Merída		Minamb		JCP		UNESUR	
		F.C	%																
Forma de la semilla	1	0	0,00	0	0,00			50	0,56			0	0,00					7	0,20
	3	19	1,00	22	0,79			38	0,43			65	1,00					14	0,40
	5	0	0,00	6	0,21			1	0,01			0	0,00					13	0,37
	Nei	0,00		0,34				0,50				0,00						0,66	
Color de Cotiledon	1	5	0,26	3	0,11	0	0,00	69	0,78	1	0,05	50	0,75	0	0,00	0	0,00	10	0,77
	3	3	0,16	3	0,11	0	0,00	13	0,15	0	0,00	17	0,25	0	0,00	4	0,14	2	0,15
	5	3	0,16	1	0,04		0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
	7	5	0,26	5	0,18	4	0,40	5	0,06	7	0,35	0	0,00	1	0,20	12	0,41	0	0,00
	9	3	0,16	16	0,57	6	0,60	2	0,02	12	0,60	0	0,00	4	0,80	13	0,45	1	0,08
	Nei	0,79		0,62		0,48		0,37		0,52		0,38		0,32		0,61		0,38	

2.1.2. Características cuantitativas por órgano.

Para la discusión de la diversidad morfológica considerando características cuantitativas se calcularon los valores de estadísticos descriptivos como promedio, mínimo, máximo, desviación estándar y coeficiente de variación para cada variable por órgano de la planta.

Hojas

En el Cuadro 12 se presentan los valores para las características de hojas por cada banco de germoplasma.

Largo de Hoja

Para la característica largo de la hoja se puede observar que la mayor variabilidad se presenta en la colección 1945 con un coeficiente de variación de 19,24%, en dicha colección se presenta una variedad de longitudes con respecto a las hojas, encontrándose hojas con un mínimo de 22,20 cm. a un máximo de 43,33 cm. Es este banco le sigue la colección de 1995 con un coeficiente de variación de 15,52%, cabe destacar que dicho banco presenta registros de hojas con longitud máxima de 53,39 cm., dicho dato no encontrado en ningún otro banco de germoplasma del país. Esto implica que esta característica expone su mayor variabilidad en la región productora aragüesa. Según los datos el banco de germoplasma con menos variación para esta característica es el de Barlovento con CV de 7,98% y sus genotipos presentan hojas con un tamaño promedio de aproximadamente 30 cm.

Cuadro 12. Estadística Descriptiva por banco de germoplasma para las características cuantitativas de hojas de cacao (*Theobroma cacao* L.).

Colecciones	Estadísticos	Largo (cm)	Ancho (cm)	Relación L/A	LBA (cm)	Relación L/LBA
	Nº			19		
COLECCIÓN DEL 45	X	29,41	11,74	2,53	15,37	1,93
	Mín.	22,20	9,30	2,03	11,80	1,40
	Máx.	43,33	16,03	3,29	16,70	2,58
	DST	5,66	1,84	0,28	2,46	0,31
	% CV	19,24	15,63	11,03	16,03	16,01
	Nº			37		
COLECCIÓN DEL 95	X	32,09	12,44	2,58	16,75	1,91
	Mín.	26,13	8,75	2,08	13,55	1,71
	Máx.	53,39	20,01	3,06	25,28	3,13
	DST	4,98	1,96	0,22	1,96	0,22
	% CV	15,52	15,77	8,44	11,71	11,47
	Nº			89		
CORPOZULIA	X	25,14	10,17	2,52	13,23	1,95
	Mín.	19,56	8,08	2,16	10,01	1,29
	Máx.	35,60	16,65	3,17	21,67	2,51
	DST	2,54	1,30	0,20	1,91	0,13
	% CV	10,09	12,77	8,04	14,41	6,68
	Nº			17		
BARLOVENTO	X	29,85	11,01	2,74	15,58	1,95
	Mín.	25,85	9,05	2,54	13,83	1,71
	Máx.	33,72	13,14	3,08	18,08	2,15
	DST	2,38	1,12	0,14	1,24	0,11
	% CV	7,98	10,13	5,09	7,97	5,58
	Nº			20		
IRAPA	X	29,75	11,04	2,72	15,71	1,98
	Mín.	26,04	9,01	2,12	12,03	1,77
	Máx.	36,53	12,29	3,34	18,59	2,65
	DST	3,06	0,81	0,29	1,55	0,20
	% CV	10,29	7,37	10,80	9,85	10,30
	Nº			65		
MÉRIDA	X	24,68	10,35	2,38	12,80	10,35
	Mín.	17,64	8,58	2,06	9,56	8,58
	Máx.	29,90	12,49	2,72	16,62	12,49
	DST	2,89	0,91	0,17	1,66	0,91
	% CV	11,73	8,81	6,93	12,97	8,81
	Nº			90		
MINAMB	X	25,70	10,08	2,60	14,52	1,80
	Mín.	16,79	6,51	1,93	8,64	1,29
	Máx.	36,47	18,59	3,50	20,04	2,90
	DST	3,47	1,61	0,26	2,25	0,22
	% CV	13,49	16,00	9,93	15,51	12,05
	Nº			60		
UNESUR	X	27,28	11,43	2,40	13,66	2,02
	Mín.	23,58	9,61	2,20	11,20	1,87
	Máx.	33,23	13,47	2,65	17,41	2,28
	DST	2,37	0,86	0,10	1,46	0,08
	% CV	8,70	7,52	4,14	10,70	3,85
	Nº			137		
Jardín Clonal Padrón	X	31,33	11,60	2,74	15,45	2,06
	Mín.	22,91	7,80	2,19	10,90	1,81
	Máx.	47,32	17,58	4,01	21,13	2,69
	DST	3,73	1,39	0,28	1,94	0,12
	% CV	11,91	11,98	10,04	12,56	5,82

Ancho de la hoja.

Para esta característica los bancos de germoplasma con mayor variabilidad son la colección MINAMB (16%), colección de 1995 (15,77%) y colección de 1945 (15,63%). Se sigue comprobando que en la región aragüeña se encuentra la mayor variabilidad de genotipos con distintas dimensiones de hojas. El banco de germoplasma con menor variación para esta característica es el de Irapa con un CV de 7,37%, dicha colección presenta un promedio en el ancho de sus hojas de 11,04 cm. Estos datos son un poco superior a las hojas mas angostas reportadas en el banco Minamb, donde se reporta un promedio de 10,08 cm. de ancho.

Relación Largo/Ancho de la hoja.

Dentro de las colecciones que presentan mayor variabilidad con respecto a su índice foliar se encuentra Irapa (CV 10,80%) y JCP (CV 10,04%), comparando los dos bancos de germoplasma podemos decir que ambas colecciones presentan similares promedios y sus genotipos presentan desviaciones $\pm 0,29$, lo cuales son mínimas, sin embargo el JCP presenta una relación L/A máxima de 4,01, que es un índice foliar encontrado solamente en este banco de germoplasma. La colección con menor variabilidad es la UNESUR con un CV 4,04%, además presenta una de las relaciones L/A mas bajas del país con un promedio de 2,4.

Largo desde la base hasta el punto mas ancho de la hoja (LBA).

Las colecciones con la mayor variabilidad de hojas con distintas distancias desde la base a su parte mas ancha son la colección 1945 (CV 16,03%), presenta un promedio de 15,37 cm. y la distribución de genotipos varia en un rango $\pm 2,46$ cm. Las hojas con mayor longitud se observan en la colección de 1995 con un LBA en hojas de hasta 25,28 cm. No se presentó mayor variabilidad para esta característica fue en la colección barlovento (CV 7,97%), lo cual indica que sus accesiones presentan similares LBA en sus hojas.

Relación L/LBA.

La misma tendencia presentada en la característica anterior se conserva en esta observación, la mayor variabilidad se presenta en la colección de 1945 (CV 16,01%), dentro de esta colección encontramos variedad de genotipos con hojas ovoides, elípticas y ovabadas. En contraste a esta observación tenemos a la colección UNESUR en la cual sus genotipos en gran mayoría presentan hojas ovoides. Su variabilidad para esta característica es de CV 3,85%.

Características Cuantitativas para flores.

Largo del ovario.

En el Cuadro 13 se presentan los valores de la característica, largo del ovario para la cual la mayor variabilidad se presenta en la colección UNESUR con CV 28,12%, dicha colección presenta un promedio de 1,36 mm en sus flores y una desviación $\pm 0,38$ mm. La colección de 1995 le sigue a la anterior con un CV 16,58%, además presenta las flores con el ovario más largo con un promedio de 1,77 mm. El banco de germoplasma más homogéneo para esta característica es la colección de 1945 con un CV 7,98%, donde el promedio constante de esta característica es de 1,37 mm.

Largo del Estilo.

Para esta característica la mayor variabilidad la sigue preservando la colección UNESUR con un CV de 33,24%, además presenta un largo del estilo máximo de 3,47 mm., el cual se encuentra dentro de los más largos en todas las colecciones del país, solo superado por la colección JCP en la que muestra un largo de estilo de 4,54 mm. La colección de Mérida es la más homogénea para esta característica con CV 4,81%.

Número de óvulos por ovario.

El banco de germoplasma que presenta la mayor variación en cuanto al número de óvulos por ovario es la colección MINAMB con CV de 13,76%. Cabe destacar que las colecciones hacia el occidente del país no superan el techo de los 40 óvulos/ovario, en donde tenemos a las colecciones de Mérida (38,90

óvulos), UNESUR (36,57 óvulos) y CORPOZULIA (35,73 óvulos). Si seguimos hacia el centro del país tenemos a la colección de 1945 y de 1995 que rondan el promedio de los 40 óvulos, continuando hacia el oriente del país este techo es superado en todos los bancos de germoplasma donde Barlovento presenta 42,25 óvulos, JCP (41,18 óvulos) e Irapa 47,85 óvulos/ovario.

Cuadro 13. Estadística Descriptiva por banco de germoplasma para las características cuantitativas de flores de cacao (*Theobroma cacao* L.).

Colecciones	Estadísticos	L. Ovario	L. Estilo	N° óvulos/ovario
1945	N°		19	
	X	1,37	2,27	39,26
	Mín.	1,17	1,80	33,20
	Máx.	1,60	2,86	47,40
	DST	0,11	0,25	3,83
	% CV	7,98	11,06	9,77
1995	N°		37	
	X	1,77	2,02	38,92
	Mín.	1,21	1,66	31,80
	Máx.	2,37	2,45	47,40
	DST	0,29	0,18	4,60
	% CV	16,58	8,75	11,81
CORPOZULIA	N°		45	
	X	1,27	2,10	35,73
	Mín.	1,00	1,62	30,60
	Máx.	1,49	2,55	41,00
	DST	0,14	0,17	2,44
	% CV	11,21	8,11	6,83
Barlovento	N°		17	
	X	1,62	2,29	42,25
	Mín.	1,37	2,05	37,60
	Máx.	1,78	2,54	50,40
	DST	0,14	0,11	3,89
	% CV	8,60	5,02	9,20
Irapa	N°		20	
	X	1,49	2,19	47,85
	Mín.	1,20	0,20	39,80
	Máx.	1,87	2,91	58,00
	DST	0,18	0,54	5,05
	% CV	12,39	24,58	10,55
Mérida	N°		67	
	X	1,35	1,96	38,90
	Mín.	1,10	1,80	33,00
	Máx.	2,10	2,50	47,80
	DST	0,16	0,09	2,47
	% CV	11,85	4,81	6,34
MINAMB	N°		14	
	X	1,76	2,06	31,57
	Mín.	1,11	1,32	20,10
	Máx.	2,05	2,44	37,40
	DST	0,22	0,29	4,34
	% CV	12,51	13,96	13,76
UNESUR	N°		60	
	X	1,36	2,12	36,57
	Mín.	0,93	1,10	34,20
	Máx.	2,40	3,47	40,00
	DST	0,38	0,70	1,72
	% CV	28,12	33,24	4,70
Jardín Clonal Padrón	N°		134	
	X	1,75	2,36	42,18
	Mín.	1,11	0,70	29,80
	Máx.	2,66	4,54	53,80
	DST	0,24	0,37	4,13
	% CV	13,67	15,58	9,78

Características Cuantitativas para frutos.

Se presenta el Cuadro 14 donde se definen las características medibles de los frutos, cabe resaltar que existen bancos de germoplasma donde no se tomaron los datos que cuantifican las dimensiones de profundidad de surcos primarios y secundarios, así como grosor de surcos primarios y secundarios de dichos frutos, tales bancos son los siguientes: de 1945, Barlovento, Irapa y MINAMB. Estos datos faltantes no proporcionarán una buena discusión con respecto a las formas de las distintas mazorcas, sin embargo existen bancos de germoplasma representativos de todas las regiones productoras que relacionarán la variabilidad de frutos en el país.

Peso del fruto.

En cuanto al peso del fruto la colección JCP presenta la mayor variabilidad del país con CV 27,50%, en este banco de germoplasma existen genotipos con mazorcas de peso cercanas a los 600 gramos, así como mazorcas de un peso aproximado a los 200 gramos. En la colección menos variable se presenta a Barlovento con CV 13,41% y las mazorcas presentan un peso promedio de 500 gramos. Es de interés el caso de la colección UNESUR donde se observa un valor máximo de 909g por fruto, indicando la potencialidad de esta colección para el mejoramiento hacia productividad.

Largo del fruto.

En cuanto al largo del fruto en ningún banco de germoplasma se presenta una gran variabilidad para esta característica, ya que no se supera un CV de 20%, el banco JCP más representativo con un CV 16,43%, para esta colección se presentan mazorcas con una longitud máxima de 25 cm y mínimas de 10 cm. La colección que tiene las mazorcas más largas es la UNESUR en la cual la longitud promedio es de 18 cm.

Cuadro 14. Estadística Descriptiva por banco de germoplasma para las características cuantitativas de frutos de cacao (*Theobroma cacao* L.).

Colecciones	Estadísticos	Peso	Largo	Ancho	Rel. L/A	Profundidad Surco Primario	Profundidad Surco Secundario	Longitud Surco primario	Longitud Surco Secundario
	Nº	19							
1945	X	435,56	17,58	7,92	2,26	2,77			
	Mín.	286,00	15,61	6,29	1,48	1,57			
	Máx.	595,00	22,20	12,01	2,85	4,10			
	DST	95,36	1,74	1,18	0,33	0,81			
	% CV	21,89	9,89	14,87	14,85	29,06			
	Nº	30							
1995	X	521,40	17,48	8,00	2,22	3,06	2,70	11,58	9,67
	Mín.	325,14	13,91	6,52	1,62	1,25	0,45	6,57	4,12
	Máx.	790,51	22,86	9,49	3,13	7,89	8,26	16,15	12,62
	DST	122,03	2,37	0,68	0,34	1,31	1,35	2,60	1,84
	% CV	23,40	13,58	8,54	15,32	42,84	50,14	22,42	19,01
	Nº	60							
CORPOZULIA	X	461,82	15,51	8,22	1,91	1,35	0,94	11,76	13,12
	Mín.	326,99	12,58	6,91	1,48	0,30	0,00	8,50	8,63
	Máx.	633,58	18,99	9,96	2,66	2,14	1,65	14,78	16,49
	DST	72,16	1,34	0,61	0,18	0,43	0,38	1,46	1,57
	% CV	15,62	8,61	7,37	9,34	32,18	40,32	12,36	11,99
	Nº	12							
Barlovento	X	502,67	16,64	8,27	2,01				
	Mín.	424,24	13,24	7,74	1,71				
	Máx.	646,82	21,01	8,86	2,53				
	DST	67,42	2,02	0,36	0,22				
	% CV	13,41	12,12	4,31	10,75				
	Nº	20							
Irapa	X	532,66	17,32	8,18	2,13				
	Mín.	414,53	14,00	7,28	1,59				
	Máx.	757,09	19,68	9,14	2,49				
	DST	88,75	1,34	0,57	0,22				
	% CV	16,66	7,71	6,96	10,44				
	Nº	65							
Mérida	X	478,97	17,44	8,03	2,18	2,65	1,80	8,74	9,90
	Mín.	228,90	12,47	6,41	1,61	0,70	0,20	4,80	6,50
	Máx.	706,30	22,70	9,21	2,98	5,50	4,50	13,10	19,70
	DST	99,21	2,15	0,49	0,27	1,13	0,85	1,37	1,93
	% CV	20,71	12,33	6,16	12,47	42,71	47,30	15,68	19,50
	Nº	21							
MINAMB	X	466,70	17,67	8,02	12,84				
	Mín.	287,55	12,50	6,50	10,13				
	Máx.	618,60	22,20	12,01	15,03				
	DST	103,03	2,16	1,08	1,22				
	% CV	22,08	12,23	13,42	9,48				
	Nº	30							
UNESUR	X	631,44	18,06	9,45	1,91	0,67	0,25	9,87	10,93
	Mín.	356,59	14,05	7,60	1,65	0,10	0,10	6,00	5,00
	Máx.	909,97	21,30	10,60	2,19	2,00	1,00	13,00	15,00
	DST	146,17	1,98	0,76	0,16	0,66	0,29	1,63	2,16
	% CV	23,15	10,96	8,08	8,19	98,74	115,91	16,56	19,80
	Nº	32							
Jardín Clonal Padrón	X	381,73	15,66	7,41	2,14	1,14	0,78		
	Mín.	198,90	10,95	6,30	1,54	0,50	0,33		
	Máx.	595,00	25,00	9,13	3,91	1,90	1,53		
	DST	104,97	2,57	0,78	0,45	0,39	0,31		
	% CV	27,50	16,43	10,54	20,91	34,47	39,48		

Ancho del fruto.

Para esta característica la colección de 1945 presenta la mayor variabilidad con CV 14,87%, dicha colección presenta un ancho promedio de 7,92 cm y sus genotipos se distribuyen en base a este promedio en $\pm 1,18$ cm en sus mazorcas. Los genotipos de la colección UNESUR presenta las mazorcas mas anchas con un promedio de 9,45 cm.

Relación Largo/Ancho del fruto.

La colección JCP presenta la mayor variabilidad para este índice con un CV de 20,91%, lo cual indica que presenta una diversidad de dimensiones con respecto a las mazorcas, los bancos de germoplasma que presentan una diversidad representativa para esta característica son las colecciones 1995 (CV 15,32%) y la 1945 (CV 14,85%). Dado este resultado en la región central del país se encuentra la mayor diversidad de genotipos que presentan una amplia variedad de dimensiones en las mazorcas.

Profundidad del surco primario en fruto.

La colección con la mayor variabilidad para la profundidad de los surcos primarios lo tiene la UNESUR con un CV 98,74%, cabe destacar que los frutos en esta colección casi no presentan profundidad en los surcos, pues se presenta un promedio general de 0,67 mm., sin embargo los frutos con mayor profundidad de los surcos sólo llegan a 2 mm., lo cual genera elevados porcentajes de variación. Esta característica refleja el fenotipo de los frutos de la variedad Porcelana donde se encuentran frutos lisos, con poca diferenciación de los surcos primarios y secundarios. El patrón de poca profundidad se repite en las colecciones del occidente, CORPOZULIA (1,35 mm.) y Mérida (2,65 mm.).

Profundidad del surco secundario en fruto.

Para esta característica la colección UNESUR mantiene la mayor variabilidad con un CV de 115,91%, y posee los frutos con menor profundidad con un promedio de 0,25 mm., dicha variabilidad se debe a que existen ciertos genotipos que presentan frutos con surcos muy pronunciados, sin embargo no

es la mayoría en la colección. Cabe destacar que la colección de 1995 tiene genotipos que presentan frutos con una diversidad para esta característica, donde se tienen valores mínimos de 0,45 mm hasta máximos de 8,26 mm., el CV para esta colección es de 50,14%.

Grosor de surcos primarios en frutos.

La mayor variabilidad en cuanto al grosor en surcos primarios lo presenta la colección de 1995 con un CV de 22,42%, dicha colección presenta espesores que van desde los 6,57 mm hasta 16,15 mm de grosor. La colección CORPOZULIA es la menos variable para esta característica con un CV 12,36%.

Grosor de surcos secundarios en frutos.

En esta característica la mayor variabilidad la posee la colección de Mérida con un CV de 19,50%, muy seguida esta colección le sigue la 1995 con un CV de 19,01%, dichas colecciones presentan grosores similares que rondan los 10 mm.

Características Cuantitativas para semillas.

Peso total de semilla con mucílago.

En el cuadro N° 15 se puede observar que la colección con mayor variabilidad la presenta el MINAMB con un CV de 38,50%, en dicha colección se encuentran los reportes por masa de semillas por fruto más pesadas del país con un máximo de 251,25 gramos, así como también se pueden reportar genotipos que presentan pesos promedios mínimos de 55,75 gramos. Lo cual indica que se encuentra una variabilidad en el peso de semillas disponible para los programas de mejoramiento genético a fin de incrementar la productividad. La colección con mayor homogeneidad la presenta la colección de Mérida con CV 19,10%, dicho banco de germoplasma presenta un peso promedio de semillas de 96,17 gramos por fruto.

Cuadro 15. Estadística Descriptiva por banco de germoplasma características cuantitativas de semillas de cacao (*Theobroma cacao* L.).

Colecciones	Estadísticos	Peso total	Nº de Semillas	Nº de Semillas Vanas	Largo 5 Semillas	Ancho 5 Semillas	Espesor 5 Semillas	Peso fresco (5 semillas)	Peso Seco (5 semillas)	Peso Seco sin Testa (5 semillas)	Peso de la Testa	Índice de Almendra	Índice de Mazorca
	Nº	19											
1945	X	31,62	2,41	24,05	13,99	9,58						1,60	22,40
	Mín.	25,90	0,30	20,90	12,10	8,10						1,15	14,83
	Máx.	39,40	10,30	27,20	16,00	10,50						2,13	30,90
	DST	3,55	2,45	1,78	1,25	0,75						0,33	4,87
	% CV	11,21	101,67	7,39	8,93	7,83						20,76	21,72
	Nº	31											
1995	X	99,59	27,61	23,93	14,11	9,84	7,42	20,02	6,58	0,78	1,48	26,07	
	Mín.	62,00	17,50	20,51	11,58	8,02	5,45	13,47	4,71	0,53	1,09	14,32	
	Máx.	153,78	35,20	28,39	16,25	11,42	12,12	56,13	11,15	1,02	2,42	41,36	
	DST	26,16	4,83	1,95	1,02	0,85	1,43	8,14	1,35	0,14	0,29	6,93	
	% CV	26,27	17,50	8,15	7,25	8,60	19,22	40,65	20,50	17,65	19,22	26,59	
	Nº	60											
CORPOZULIA	X	93,94	24,55	1,51	26,72	15,55	10,82	14,14	6,70	6,10	0,62	1,34	31,67
	Mín.	58,68	18,70	0,00	22,93	12,66	8,56	5,22	4,01	3,52	0,25	0,80	20,92
	Máx.	181,80	40,30	5,30	30,06	17,70	12,48	19,92	8,98	8,20	0,95	1,80	55,99
	DST	19,36	3,67	1,10	1,56	1,03	0,88	2,97	1,04	0,95	0,15	0,21	6,40
	% CV	20,61	14,93	73,15	5,85	6,60	8,15	21,02	15,50	15,52	23,92	15,50	20,20
	Nº	12											
Barlovento	X	115,66	33,17	1,24	24,31	14,21	9,42						
	Mín.	80,64	17,53	0,20	21,85	13,52	8,52						
	Máx.	189,11	40,00	2,40	26,16	15,90	10,48						
	DST	27,20	6,49	0,80	1,24	0,79	0,61						
	% CV	23,52	19,56	64,63	5,11	5,53	6,45						
	Nº	20											
Irapa	X	134,75	42,06	2,34	25,74	13,50	9,18	11,12	134,75				
	Mín.	71,24	28,70	0,40	22,61	11,38	7,49	8,05	71,24				
	Máx.	236,14	54,30	5,20	28,99	17,06	10,32	28,41	236,14				
	DST	38,90	6,28	1,36	1,88	1,29	0,74	4,41	38,90				
	% CV	28,87	14,93	58,26	7,30	9,56	8,08	39,67	28,87				
	Nº	65											
Mérida	X	96,17	25,69	26,43	15,85	11,57	15,80	7,67	7,09	0,58	1,53	25,99	
	Mín.	42,15	19,23	22,40	13,50	8,40	10,86	6,00	5,63	0,30	1,20	17,99	
	Máx.	128,90	31,69	29,40	17,30	13,40	20,27	10,90	10,10	0,85	2,18	37,56	
	DST	18,36	3,00	1,43	0,67	1,05	2,21	0,88	0,80	0,12	0,18	3,96	
	% CV	19,10	11,70	5,41	4,26	9,08	13,95	11,42	11,29	20,77	11,42	15,24	
	Nº	21											
MINAMB	X	120,66	30,90	2,62	23,86	14,12	9,41	12,94					
	Mín.	55,75	20,00	1,00	20,20	10,60	6,50	9,79					
	Máx.	251,25	39,00	15,00	28,00	16,10	12,20	17,63					
	DST	46,46	5,01	3,28	2,06	1,51	1,51	2,37					
	% CV	38,50	16,21	125,17	8,64	10,70	16,02	18,28					
	Nº	30											
UNESUR	X	120,26	33,63	22,27	11,13	5,70	17,27	7,28	6,45	0,84	1,46	21,56	
	Mín.	70,36	22,00	18,00	8,00	3,00	10,53	4,74	4,13	0,36	0,95	12,45	
	Máx.	218,23	46,00	27,00	17,00	8,00	28,81	11,16	9,90	1,26	2,23	29,30	
	DST	26,97	6,64	2,52	1,93	1,21	4,34	1,41	1,25	0,22	0,28	3,98	
	% CV	22,42	19,75	11,31	17,29	21,19	25,12	19,37	19,39	26,23	19,37	18,45	
	Nº	32											
Jardín Clonal caucagua	X	83,68	38,30	0,91	21,97	12,21	8,16	40,84	14,11			2,73	13,33
	Mín.	47,00	25,00	0,00	17,80	9,85	6,27	11,00	3,00			0,60	4,09
	Máx.	125,12	56,00	5,00	25,60	14,78	11,60	158,50	40,00			5,78	29,76
	DST	22,11	6,73	1,16	2,31	1,22	1,09	32,02	8,62			1,48	7,59
	% CV	26,42	17,58	127,90	10,50	9,95	13,34	78,40	61,06			54,30	56,89

Número de semillas por fruto

La colección UNESUR presenta la mayor variabilidad en el número de semillas con un CV de 19,75%, en dicha banco se encuentran genotipos con promedios máximos de 46 semillas hasta genotipos con 22 semillas en promedio. La colección Barlovento presenta una variabilidad similar de CV 19,56%. Los bancos con los promedios de semillas por mazorca más altas se observan en el JCP con 38,30 semillas e Irapa con un promedio de 42 semillas por genotipo.

Número de semillas vanas.

Es importante destacar que los bancos de germoplasma de Mérida, UNESUR y la colección de 1995 no presentaron datos para esta característica. Los bancos de germoplasma que registraron mayor número de semillas vanas son MINAMB con promedio de 2,62 semillas vanas por genotipo y la colección 1945 con 2,41 semillas vanas. El banco con menor número de semillas vanas es el JCP con 0,91 semillas vanas.

Largo, ancho y espesor de las semillas.

Los bancos de germoplasma que presentan las semillas con mayores dimensiones son Mérida con largo (26,43 mm), ancho (15,85 mm) y espesor (11,57 mm) y CORPOZULIA con (26,72 mm), ancho (15,55 mm) y espesor (10,82 mm). Esto nos indica que los genotipos occidentales presentan semillas que reflejan características de semillas del tipo criollo, semillas con grandes dimensiones. El banco de germoplasma con semillas de menor dimensión las presenta el JCP con un largo (21,97mm), ancho (12,21 mm) y espesor (8,16mm).

Índice de Almendra (I.A.)

Para esta característica no se presentaron datos para las siguientes colecciones: Barlovento, Irapa y MINAMB. Para esta característica la mayor variabilidad la presenta el JCP con un CV de 54,30%, en este banco de germoplasma se presentan genotipos que llegan a tener granos con un IA de 2,73. Esta característica representa el peso promedio de una almendra seca para esta colección y es un criterio muy utilizado a nivel mundial en los

programas de mejoramiento genético (Lopes, *et al.*, 2011). Se aprecian valores mínimos de 0,60g y máximos alrededor de 2,42g evidenciando el potencial genético. Lopes *et al.* (2011) indican valores máximos de 2,1 para el clon CCN-16, producto de los programas de mejoramiento genético.

Índice de Mazorca (I.M).

Para esta característica la mayor variabilidad sigue presente en el JCP con CV de 56,89%, dicha colección presenta genotipos que requieren de un promedio de 4,09 mazorcas para lograr 1 kg de cacao seco, así como genotipos que requieren de 29 mazorcas para lograr dicho peso. Esta colección presenta la mayor productividad con I.M de 13,33, la colección con menos productividad es CORPOZULIA con un I.M de 31,67, a pesar de poseer almendras con una de las dimensiones más grandes del país, presenta pesos secos muy inferiores a las demás colecciones con un promedio de 6,10 gramos por cada 5 almendras, a esto se le suma la cantidad de almendras por mazorcas más baja (24,55 semillas). Esta descripción es muy característica en genotipos del tipo "Criollo".

2.1.3. Selección de Características Morfológicas por Banco de Germoplasma.

En vista de la basta información, para realizar un análisis de la diversidad genética se requieren de datos robustos correspondientes a aquellas variables que mejor expliquen la variabilidad observada. En el caso de las características cualitativas se seleccionaron aquellas con mayores valores de índice de diversidad (Nei, 1978).

En el caso de las variables cuantitativas se siguió una estrategia, mediante un análisis por componentes principales. En el Cuadro 16 se presentan para los componentes principales 1 y 2 los valores propios, la proporción (%) de la varianza explicada por cada componente, absoluta y acumulada, para las características de las hojas. En general se observa que con el segundo componente se alcanza en promedio una varianza total acumulada para todos los bancos de germoplasma de 83,852 % para las características de hojas de cacao.

Cuadro 16. Valores propios, varianza absoluta y acumulada explicada en los componentes principales 1 y 2 para las características que definen las hojas de cacao (*Theobroma cacao* L.)

Colecciones	Componente principales	Valores propios	% varianza absoluta	Varianza acumulada
1945	1	2,41062	67,193	67,193
	2	0,624169	17,398	84,591
1995	1	1,30955	29,718	29,718
	2	1,0605	24,067	53,785
Corpozulia	1	2,41215	57,452	57,452
	2	1,02875	24,503	81,955
Barlovento	1	2,07893	64,496	64,496
	2	0,817443	25,36	89,856
Irapa	1	2,2261	58,94	58,94
	2	1,0324	27,335	86,275
Merida	1	3,63706	79,634	79,634
	2	0,829667	18,166	97,800
Minamb	1	2,07244	47,735	47,735
	2	1,40047	32,257	79,992
UNESUR	1	2,83045	79,882	79,882
	2	0,501242	14,146	94,028
Jardin Clonal Padrón	1	2,60422	59,642	59,642
	2	1,16787	26,747	86,389
Promedio de la varianza acumulada (%)				83,852

Para el análisis de los bancos de germoplasmas con el objeto de seleccionar las características que presentan mayor varianza y, por consiguiente, la mayor capacidad de explicación de los datos, se seleccionaran las características de hojas que presentan los valores propios de mayor peso para el componente principal 1 en todos los bancos de germoplasma.

En el Cuadro 17 se observa que en todos los bancos de germoplasma la característica largo y LBA de la hoja presenta coeficientes altos, independientemente de su signo, los cuales serán mas eficientes en la discriminación de las accesiones (Rojas, 2003). Algo similar ocurre en la característica largo de la hoja a excepción de las colecciones de Irapa y MINAMB donde los mayores valores propios se encuentran en la relación L/A de la hoja. Por consiguiente sólo 3 características de hojas serán utilizadas en

el análisis para la selección de los mejores genotipos por banco de germoplasma.

Cuadro 17. Vectores de las variables cuantitativas de las hojas de cacao (*Theobroma cacao* L.) para los componentes principales 1 y 2.

Colecciones	Estadísticos	Largo (cm)	Ancho (cm)	Relación L/A	LBA (cm)	Relación LBA
1945	Vector para el CP1	-0,9445	-0,8399	-0,4115	-0,8708	0,4192
	Vector para el CP2	0,0537	-0,5354	0,7929	0,2000	-0,4626
1995	Vector para el CP1	0,6943	0,5374	0,3225	0,7355	-0,0018
	Vector para el CP2	0,0889	-0,5493	0,8129	0,1189	-0,1244
Corpozulia	Vector para el CP1	-0,6085	-0,5068	-0,173	-0,5719	0,1258
	Vector para el CP2	0,1197	-0,6969	0,8532	0,08826	-0,1682
Barlovento	Vector para el CP1	0,9394	0,9468	-0,4292	0,5845	0,3841
	Vector para el CP2	-0,2237	-0,2544	0,08764	0,8098	-0,6731
Irapa	Vector para el CP1	-0,9634	-0,2682	-0,7275	-0,9464	0,1795
	Vector para el CP2	-0,0785	-0,9598	0,6643	-0,0326	-0,0363
Merida	Vector para el CP1	0,9643	0,9287	0,4800	0,9508	0,9287
	Vector para el CP2	0,2398	-0,3650	0,8704	0,1551	-0,365
Minamb	Vector para el CP1	-0,9085	-0,4153	-0,4869	-0,9368	0,3277
	Vector para el CP2	-0,2652	-0,8654	0,6984	0,2077	-0,6282
UNESUR	Vector para el CP1	-0,5827	-0,5397	-0,1176	-0,5836	0,1215
	Vector para el CP2	-0,2214	0,4432	-0,8469	-0,05665	-0,1845
Jardin clonal Padrón	Vector para el CP1	-0,969	-0,8214	-0,1909	-0,974	0,1989
	Vector para el CP2	-0,1604	0,5415	-0,9741	-0,1279	-0,0509

Continuando con la selección de características representativas para posterior análisis de genotipos, se presenta el Cuadro 18, donde se observa la proporción de las varianzas acumuladas para cada banco de germoplasma estudiando las características de la flor. Se puede observar que mayormente los primeros dos componentes explican casi toda la información de las variables expuestas para las características de las flores de cacao, el promedio nacional de la varianza acumulada es de 84,506%, es importante resaltar que la colección UNESUR prácticamente la totalidad de la información es aportada por los componente 1 y 2, ya que se obtuvo una varianza acumulada de 97,390%. En el Cuadro 19, se presentan los vectores de los componentes principales 1 y 2, solo se seleccionaran los valores del componente 1 donde las características de mayor peso serán seleccionadas para el análisis posterior. Cabe destacar que en todas las colecciones se seleccionó la característica,

largo del ovario y en la mayoría de éstas la característica largo del estilo, a diferencia de la colección 1995, Barlovento y MINAMB donde la mayor significancia recae en el número de óvulos por ovario.

Cuadro 18. Valores propios, varianza absoluta y acumulada explicada en los componentes principales 1 y 2 para las características que definen las flores de cacao (*Theobroma cacao* L.)

Colecciones	Componente principales	Valores propios	% varianza absoluta	Varianza acumulada
1945	1	1,40461	48,241	48,241
	2	1,14444	39,305	87,546
1995	1	1,50669	53,842	53,842
	2	0,714725	25,541	79,383
Corpozulia	1	1,54621	53,351	53,351
	2	1,00837	34,793	88,144
Barlovento	1	1,25422	48,032	48,032
	2	0,940362	36,012	84,044
Irapa	1	1,2014	40,498	40,498
	2	1,09062	36,764	77,262
Merida	1	1,25488	45,06	45,06
	2	1,00615	36,128	81,188
Minamb	1	2,28301	80,701	80,701
	2	0,340499	12,036	92,737
UNESUR	1	2,70135	90,557	90,557
	2	0,203851	6,833	97,390
Jardin Clonal Padrón	1	1,20622	40,386	40,386
	2	0,97005	32,479	72,865
Promedio de la varianza acumulada (%)				84,506

Cuadro 19. Vectores de las variables cuantitativas de las flores de cacao (*Theobroma cacao* L.) para los componentes principales 1 y 2.

Colecciones	Estadísticos	L. Ovario	L. Estilo	Nº ovulos/ov
1945	Vector para el CP1	-0,7495	-0,8907	-0,3449
	Vector para el CP2	-0,5683	0,1441	0,8963
1995	Vector para el CP1	0,6678	0,4178	0,6160
	Vector para el CP2	0,2467	0,6566	-0,7127
Corpozulia	Vector para el CP1	-0,7386	-0,6647	0,1126
	Vector para el CP2	0,02133	-0,1900	-0,9816
Barlovento	Vector para el CP1	-0,666	-0,6903	-0,7207
	Vector para el CP2	0,7181	-0,02052	-0,6515
Irapa	Vector para el CP1	0,8452	0,6766	0,2101
	Vector para el CP2	-0,1788	0,5176	-0,8946
Merida	Vector para el CP1	-0,902	-0,6945	0,2499
	Vector para el CP2	0,06654	0,3288	0,9577
Minamb	Vector para el CP1	0,9341	0,8575	0,8950
	Vector para el CP2	0,03871	0,4586	-0,4057
UNESUR	Vector para el CP1	0,9588	0,9674	0,9283
	Vector para el CP2	0,2178	0,1404	-0,3709
Jardín clonal Padrón	Vector para el CP1	0,5801	0,7381	0,5763
	Vector para el CP2	0,6936	0,0008	-0,6993

Siguiendo con la selección de características por su capacidad de aportar información al estudio de diversidad, se presenta el Cuadro 20 donde se observa los valores propios, el porcentaje de la varianza y la varianza acumulada de los componentes 1 y 2 de las características evaluadas en los frutos de cacao en los 9 bancos de germoplasma. En dicho cuadro se observa un promedio de la varianza acumulada de 76,568%, los porcentajes de la varianza mas bajos para las características del fruto las presentan la colección 1945 (37,051%) y el Jardín Clonal Padrón (37,965%). En el Cuadro 21 se exponen los valores propios que aportan al porcentaje de la varianza expresada en el componente principal 1 de cada banco de germoplasma, en dicho cuadro se observa que existen colecciones donde no se pudieron registrar en su totalidad las características establecidas en el Manual Práctico para la Caracterización Morfológica de Cacao (Jiménez, 2006), por lo que limitó el estudio y selección de características por banco de germoplasma. Se destacan las colecciones de 1945, Barlovento, Irapa, MINAMB y Jardín Clonal

Padrón donde se presentaron ausencias en el registro de los datos medidos, en negrita se presentan las variables seleccionadas por banco de germoplasma para las características del fruto de cacao.

Cuadro 20. Valores propios, varianza absoluta y acumulada explicada en los componentes principales 1 y 2 para las características que definen los frutos de cacao (*Theobroma cacao* L.).

Colecciones	Componente principales	Valores propios	% varianza	Varianza acumulada
1945	1	1,4245	37,051	37,051
	2	1,16605	30,329	67,38
1995	1	3,05504	42,736	42,736
	2	2,03952	28,53	71,266
Corpozulia	1	3,24868	45,207	45,207
	2	1,63117	22,699	67,906
Barlovento	1	1,69841	79,286	79,286
	2	0,276369	12,902	92,188
Irapa	1	1,82939	71,305	71,305
	2	0,66983	26,108	97,413
Merida	1	3,1093	43,170	43,170
	2	1,91084	26,530	69,700
Minamb	1	1,90679	57,453	57,453
	2	0,870895	26,241	83,694
UNESUR	1	2,11203	40,266	40,266
	2	1,41741	27,023	67,289
Jardin Clonal Padrón	1	1,96864	37,965	37,965
	2	1,77957	34,319	72,284
Promedio de la varianza acumulada (%)				76,568

Cuadro 21. Vectores de las variables cuantitativas de los frutos de cacao (*Theobroma cacao* L.) para los componentes principales 1 y 2.

Colecciones	Valores propios	Peso	Largo	Ancho	Rel. L/A	Profundidad Surco.Prim	Profundidad Surco.Sec.	Longitud Surco primario	Longitud Surco Secundario
1945	CP1	-0.4748	-0.01188	-0.9355	0.8068	-0.1121			
	CP2	-0.5514	0.2325	0.2254	0.05447	0.9075			
1995	CP1	0.8013	0.8878	0.427	0.7245	0.06056	0.03141	0.8566	0.8135
	CP2	-0.01202	0.2109	0.0166	0.2185	0.9875	0.9789	-0.1667	-0.212
Corpozulia	CP1	0.794	0.5051	0.6703	-0.01896	0.5054	0.5298	0.8837	0.873
	CP2	-0.389	0.02827	-0.4549	0.3527	0.7673	0.7841	-0.04044	-0.1756
Barlovento	CP1	0.9604	0.9473	0.509	0.879				
	CP2	0.0574	-0.07038	0.8128	-0.4000				
Irapa	CP1	-0.9143	0.1366	-0.9749	0.7366				
	CP2	-0.379	-0.9733	0.03114	-0.6737				
Merida	CP1	0.6532	0.3526	0.406	0.1503	0.8931	0.8984	0.372	0.8922
	CP2	0.664	0.8657	0.4045	0.6665	-0.3375	-0.3536	0.07792	-0.3707
Minamb	CP1	0.7250	0.8142	0.4924	0.941				
	CP2	-0.4666	-0.2941	0.8255	0.1033				
UNESUR	CP1	0.972	0.8969	0.8591	0.3492	0.4401	0.3277	-0.0187	0.1731
	CP2	0.02483	-0.03863	0.2534	-0.2999	-0.1048	-0.2223	-0.8793	-0.8125
Jardin Clonal Padrón	CP1	-0.136	-0.7841	0.9987	-0.8415	0.6301	0.694		
	CP2	0.9506	0.3176	0.8846	-0.1688	-0.3396	0.1012		

Por último se presenta el Cuadro 22 donde que registran las varianzas acumuladas para cada banco de germoplasma con respecto a las características de las semillas, en el mismo se observa el promedio de la varianza acumulada para el segundo componente de todo el país con un 78,273%. Dentro de los bancos de germoplasma, la colección MINAMB fue la que menos información aportó sobre las variables con un valor de 33,742%. La colección Barlovento expresó en su componente 1 el mayor porcentaje de la varianza para las semillas de cacao con un valor de 91,449%. En el cuadro N° 21 se muestran las colecciones Barlovento, Irapa y MINAMB, las cuales no presentan las características de productividad como son el Índice de semilla e Índice de mazorca, los cual es una limitante al tratar de definir los bancos de germoplasma con respecto a la productividad de los genotipos.

Cuadro N° 22. Valores propios, varianza absoluta y acumulada explicada en los componentes principales 1 y 2 para las características que definen las semillas de cacao (*Theobroma cacao* L.).

Colecciones	Componente principales	Valores propios	% varianza	Varianza acumulada
1945	1	2,256	46,617	46,617
	2	1,303	26,922	73,539
1995	1	5,69336	57,680	57,680
	2	2,15596	21,842	79,522
Corpozulia	1	6,34816	56,120	56,120
	2	2,10549	18,613	74,733
Barlovento	1	5,14044	91,449	91,449
	2	0,330399	5,877	97,326
Irapa	1	3,15891	47,841	47,841
	2	1,47336	22,314	70,155
Merida	1	5,5744	61,434	61,434
	2	2,1102	23,256	84,690
Minamb	1	1,78002	33,742	33,742
	2	1,62654	30,832	64,574
UNESUR	1	5,53664	62,849	62,849
	2	2,01698	22,896	85,745
Jardin Clonal Padrón	1	5,07238	52,732	52,732
	2	2,06261	21,443	74,175
Promedio de la varianza acumulada (%)				78,273

Cuadro 23. Vectores para los componentes principales 1 y 2 de las variables cuantitativas de las semillas de cacao (*Theobroma cacao* L.).

Colecciones	Estadísticos	Peso total	Nº de Semillas	Nº de Semillas Vanas	Largo 5 Semillas (promedio)	Ancho 5 Semillas (promedio)	Espesor 5 Semillas (promedio)	Peso fresco (5 semillas)	Peso Seco (5 semillas)	Peso Seco sin Testa (5 semillas)	Peso de la Testa	Indice de Almendra	Indice de Mazorca
1945	Vector para el CP1		-0,3915	-0,1081	-0,8847	-0,7170	-0,7082					-0,8245	0,9635
	Vector para el CP2		0,7656	-0,5706	0,1224	0,4336	-0,4732					-0,4973	-0,1176
1995	Vector para el CP1	-0,7472	-0,1906		-0,8883	-0,7877	-0,6948	-0,3718	-0,9487	-0,9405	-0,6316	-0,9520	0,7545
	Vector para el CP2	0,5876	0,9410		0,0589	-0,2831	-0,5508	-0,3552	-0,1458	-0,1112	-0,3996	-0,1343	-0,6075
Corpozulia	Vector para el CP1	-0,3704	0,2169	0,01489	-0,8404	-0,8831	-0,8011	-0,9133	-0,9728	-0,9575	-0,4068	-0,9664	0,6917
	Vector para el CP2	0,6777	0,9243	-0,4882	-0,184	-0,08604	-0,239	-0,1031	0,01461	0,02364	-0,2204	-0,001343	-0,6701
Barlovento	Vector para el CP1	-0,4291	0,3242	-0,4011	0,4363	0,428	0,4199						
	Vector para el CP2	0,1942	0,5687	-0,0781	-0,0456	-0,0934	-0,128						
Irapa	Vector para el CP1	0,9243	0,2594	0,02949	0,8337	0,7845	0,51	0,8661	0,9243				
	Vector para el CP2	0,3377	0,8306	-0,2467	0,2155	-0,3022	-0,7507	-0,1427	0,3377				
Merida	Vector para el CP1	-0,5416	0,1480		-0,7042	-0,8183	-0,8106	-0,9503	-0,9647	-0,9430	-0,7520	-0,9460	0,6195
	Vector para el CP2	0,6748	0,9671		0,0661	0,0361	-0,3968	-0,1678	-0,0713	-0,0454	-0,1928	-0,0964	-0,7375
Minamb	Vector para el CP1	0,8368	0,5748	-0,4409	0,4962	0,5084	0,328	0,5788					
	Vector para el CP2	0,3265	0,6207	-0,325	-0,448	-0,4713	-0,8149	-0,6786					
UNESUR	Vector para el CP1	-0,7048	0,5602		-0,6719	-0,7147	-0,6314	-0,9711	-0,9830	-0,9673	-0,8121	-0,9718	0,3301
	Vector para el CP2	0,5859	0,8001		-0,4022	-0,2942	-0,2963	-0,1312	0,0749	0,1160	-0,1794	0,0787	-0,9170
Jardín Clonal Padrón	Vector para el CP1	-0,7624	0,3348	-0,359	-0,7296	-0,7943	-0,6277	-0,8644	-0,874			-0,874	0,7515
	Vector para el CP2	0,1209	0,7685	-0,4104	-0,4557	-0,467	-0,5654	0,3986	0,4072			0,4072	-0,366

Finalmente, en el Cuadro 24 se muestran las variables seleccionadas por cada banco de germoplasma, para las características cuantitativas como antes se mencionó se seleccionaron las características con los valores propios mas altos de cada colección, en cuanto a las características cualitativas se seleccionaron las variables con mayor índice de diversidad (Nei).

Con la aplicación de los componentes principales se pudieron seleccionar en promedio 12 características, lo cual es un poco menos de la mitad de las 28 características cuantitativas evaluadas originalmente. En cuanto a las características cualitativas se seleccionaron menos de 10 características de las 20 originalmente evaluadas.

Cuadro 24. Características cuantitativas y cualitativas seleccionadas por banco de germoplasma que mejor explican la diversidad morfológica observada.

Colecciones	Características Cuantitativas	Características Cualitativas
1945	10	9
	Hoja (Largo, Ancho, LBA), Flor (Largo del Ovario, N° Óvulos/Ovario), Fruto (Ancho, Rel.L/A), Semilla (Largo, Índice de almendra, Índice de mazorca)	Hoja (Base, Ápice, Pusbecencia), Flor (Antocianina en el sepalo), Fruto (Color, Constricción basal, Ápice, Apariencia en pares de lomos), Semilla (Color de cotiledón,)
1995	13	9
	Hoja (Largo, Ancho, LBA), Flor (Largo del Ovario, N° Óvulos/Ovario), Fruto (Peso, Largo, Surco primario, Surco secundario), Semilla (Largo, Peso seco, Peso seco sin testa, Índice de almendra)	Hoja (Ápice, Pusbecencia), Flor (Antocianina en el sepalo, Antocianina en el estaminodio, Antocianina en la parte inferior del estilo), Fruto (Ápice, Rugosidad, Apariencia en pares de lomos), Semilla (Color de cotiledón).
Corpozulia	11	7
	Hoja (Largo, Ancho, LBA), Fruto (Peso, Ancho, Surco primario, Surco secundario), Semilla (Peso fresco, Peso seco, Peso seco sin testa, Índice de almendra)	Hoja (Base, Ápice, Pusbecencia), Fruto (Color, Rugosidad, Apariencia en pares de lomos), Semilla (Forma).
Barlovento	12	8
	Hoja (Largo, Ancho, LBA), Flor (Largo del estilo, N° Óvulos/Ovario), Fruto (Peso, Largo, Rel. L/A), Semilla (Peso total, Largo, Ancho, Espesor)	Hoja (Ápice), Flor (Antocianina en el limbo del pétalo, Antocianina en el filamento), Fruto (Color, Forma, Constricción basal, Apariencia en pares de lomos), Semilla (Color de cotiledón).
Irapa	12	9
	Hoja (Largo, Rel. L/A, LBA), Flor (Largo del ovario, Largo del estilo), Fruto (Peso, Ancho, Rel. L/A), Semilla (Peso total, Largo, Ancho, Peso fresco)	Hoja (Ápice), Flor (Antocianina en el sépalo, Antocianina en el limbo del pétalo, Antocianina en el filamento), Fruto (Intensidad de Antocianina en lomos, Ápice, Rugosidad, Apariencia en pares de lomos), Semilla (Color de cotiledón).
Mérida	13	5
	Hoja (Largo, Ancho, LBA), Flor (Largo del ovario, Largo del estilo), Fruto (Peso, Profundidad de surco primario, Profundidad de surco secundario, Surco secundario), Semilla (Peso fresco, Peso seco, Peso seco sin testa, Índice de almendra)	Hoja (Color del brote), Fruto (Intensidad de Antocianina en lomos, Constricción basal, Rugosidad), Semilla (Color de cotiledón).
MINAMB	3	4
	Hoja (Largo, Rel. L/A, LBA),	Hoja (Base, Ápice), Flor (Antocianina en el sépalo, Antocianina en el estaminodio)
UNESUR	12	4
	Hoja (Largo, Ancho, LBA), Flor (Largo del ovario, Largo del estilo), Fruto (Peso, Largo, Ancho), Semilla (Peso fresco, Peso seco, Peso seco sin testa, Índice de almendra)	Hoja (Base), Fruto (Ápice, Rugosidad), Semilla (Forma).
Jardín Clonal Padrón	12	7
	Hoja (Largo, Ancho, LBA), Flor (Largo del ovario, Largo del estilo), Fruto (Largo, Rel. L/A, Surco primario, Surco secundario) Semilla (Peso fresco, Peso seco, Índice de almendra)	Hoja (Ápice), Flor (Antocianina en el sépalo) Fruto (Forma, Ápice, Rugosidad, Apariencia en pares de lomos), Semilla (Color de cotiledón).

2.1.4. Selección de Genotipos por Banco de Germoplasma.

Mediante la aplicación de un análisis de agrupamiento UPGMA basado en distancia euclidiana y factorial de correspondencia a las características cualitativas y cuantitativas para cada banco de germoplasma, se identificaron grupos genéticos de cada colección y se seleccionaron sus genotipos representativos. Los análisis de agrupamiento realizados para cada colección se presentan en los Anexos 1 al 24.

En el Cuadro 25 se pueden observar los genotipos representativos de cada colección, estos fueron seleccionados de forma estratificada siguiendo la estrategia propuesta por Yonezawa *et al.* (1995) para la conformación de colecciones núcleo. En cuanto a la colección 1945 se seleccionó un 68% de los genotipos que conforman la colección, debido a su importancia y su distribución en todas las regiones productivas del país, también por ser muy utilizados en programas de investigación a nivel nacional e internacional. En la conformación del análisis de agrupamiento se formaron 4 grupos, donde el OC-67 se representó en un grupo aparte. Para la colección 1995 se formaron 3 grandes grupos definidos, donde en el grupo 1 se seleccionaron la mayor cantidad de genotipos, 6 de los 10 seleccionados, debido a su representatividad en las regiones productoras del estado Aragua. Para la colección de CORPOZULIA se seleccionaron 20 genotipos distribuidos en 4 grandes grupos. En la colección de Barlovento se seleccionaron 8 genotipos distribuidos en 3 grupos.

La colección de Irapa se caracterizó por presentar grupos bien distanciados, donde se seleccionaron 8 genotipos. Aquí se puede destacar el genotipo Santa Isabel-101, que se conformó como un grupo aparte de los demás genotipos agrupados. La colección de Mérida tiene una limitada distribución de los genotipos, en esta colección se escogieron 20 genotipos en solo 2 grupos formados. El grupo 1 está conformado únicamente por HER-04 y BEN-24, y en el segundo grupo se seleccionaron los demás 18 genotipos representativos.

Para la colección del MINAMB solo se seleccionó como genotipo representativo al material mexicano CHIAPAS. En la colección UNESUR se formaron 2 grupos, el grupo 1 solo está compuesto por el genotipo USL-111 y en grupo 2

se agruparon los 8 materiales de los 9 seleccionados. En cuanto a la colección Jardín Clonal Padrón se formaron 4 grupos bien diferenciados donde se seleccionaron 13 genotipos, seleccionados en su mayoría en los grupos 2 y 3.

Cuadro 25. Genotipos representativos de la variabilidad morfológica resguardados en los bancos de germoplasma nacional de cacao (*Theobroma cacao* L.)

Colecciones	Grupos Formados	Genotipos por Grupo	Genotipos Seleccionados
1945	1	1	OC-67
	2	3	OC-60, CHO-94
	3	6	CHU-120, CHO-36, CHU-130, CHU-2
	4	9	CHO-42, OC-77, OC-63, OC-61, CHO-28, CHO-174
1995	1	12	CP-8, AT-1, LV-12, CRP-1, CPC-2, SA-8
	2	3	CATA-16,
	3	7	SCLV-6, TA-1, CP-6
Corpozulia	1	5	CPZ-022, CPZ-008
	2	19	CPZ-035, CPZ-062, CPZ-052, CPZ-007, CPZ-016, CPZ-033
	3	27	CPZ-046, CPZ-017, CPZ-002, CHA-005, CPZ-047, CPZ-080, CPZ-032, SP-010, CPZ-040, CPZ-003
	4	4	CPZ-060, CPZ-027
Barlovento	1	3	CUI-32, LC-164
	2	11	MM-177, CUMBO-177, SC-10, SC-12, TORNO-3
	3	1	PROV-63
Irapa	1	2	KUPATA-101, Chaguarama-102
	2	1	Santalsabel-101
	3	8	Maria-103, Matacongo-102, Puchery-102
	4	6	P.Alta-103, Rioseco-103
Mérida	1	2	HER-04, Ben-23
	2	60	Ben-13, BOC-11, HER-03, BOC-15, SJU-14, BOC-13, BOC-07, SJU-16, SJU-07, BOC-10, SJU-03, SJU-06, BEN-04, BEN-27, BEN-06, SJU-11, BEN-24, BOC-01
MINAMB	1	1	Chiapas
UNESUR	1	1	UCL-111
	2	11	USL-457, USL-319, USL-449, USL-511, USL-515, USL-392, USL-391
Jardín Clonal Padrón	1	8	CSF-3, CPR-5, CLV-3
	2	6	PSB-31, CSF-19, CPGA-9, CPGA-25
	3	7	QMA-13, CPGA-14, SRLIA-1, YEC-9
	4	5	CSF-14, LMP-13

2.1.5. Análisis de la Diversidad Genética Nacional del Cacao venezolano con base en la Caracterización Morfológica.

Para el análisis de diversidad nacional se seleccionaron 91 genotipos representativos de todos los bancos de germoplasma, a esta matriz se agregaron los genotipos referenciales utilizados a nivel internacional, los datos de estos genotipos fueron suministrados por la Investigadora del INIA- Miranda Olga Móvil, encargada de la conservación y estudio del banco de germoplasma internacional, ubicado en la estación Padrón (INIA-Miranda). A continuación se presentan los genotipos conservados en esta estación, los cuales se han desarrollado bajo las condiciones climáticas de nuestro país, y nos permitirá comparar de forma mas estrecha estos genotipos con los genotipos seleccionados. Dichos referenciales fueron seleccionados en el marco de los grupos morfogeográficos establecidos en investigaciones a nivel internacional, con el fin de ubicar y agrupar los genotipos seleccionados a nivel nacional en base a los grupos ya definidos (Cuadro N° 25). A través de la investigación realizada por Motamayor *et al.* (2008), dentro de los genotipos seleccionados de la colección de Mérida, se encuentran como genotipos referenciales criollos a los originarios de San Juan de Lagunillas y los Benavides, específicamente SJU03, SJU06 y BEN01, por lo que fueron seleccionados como referenciales criollos en nuestro estudio (Cuadro N° 26).

Cuadro 26. Referenciales Internacionales de cacao (*Theobroma cacao* L.) utilizados en análisis de diversidad nacional.

Referenciales Internacionales (Banco Internacional, INIA-Miranda)	Grupos morfogeograficos (Lanaud et al, 1999) y (Motamayor et al, 2002)	Nueva clasificacion del germoplasma centro y sur América (Motamayor, et al, 2008)
SJU03	Criollo	Criollo
SJU06		
BEN01		
GS-36	Trinitario	Guiana
ICS-60		Iquitos
ICS-6		
SIAL-325	Forastero bajo amazónico	Amelonado
SIC-801		
SIAL-70		
SCA-6	Forastero alto amazónico	Contamana
EET-400		Purús
IMC-60		Iquitos
P- 8		Nanay
PA-1		Marañon

En el Cuadro 27 se puede observar la selección de 12 características cuantitativas y 7 características cualitativas, las cuales aportan la mayor información para el análisis de diversidad genética nacional, utilizadas para el análisis de diversidad nacional

Cuadro 27. Características morfológicas Cuantitativas y Cualitativas Seleccionadas para el análisis de diversidad genética nacional.

Características seleccionadas	Características Cuantitativas	Características Cualitativas
Hoja	Largo, Ancho, LBA.	Base, Ápice,
Flor	Largo del Ovario, Largo del estilo, N° Óvulos/Ovario.	-
Fruto	Ancho, Relacion Largo/Ancho.	Forma, Constricción basal, Ápice, Rugosidad.
Semilla	Numero de semillas, Largo, Ancho, Espesor.	Color de cotiledón.

2.1.6. Estudio de Diversidad Genética Nacional basado en la caracterización morfológica de accesiones de cacao (*Theobroma cacao* L.) seleccionados representativos de los banco de germoplasma

Se realizó un análisis de agrupamiento UPGMA con base en la distancia Euclidiana, considerando 91 genotipos seleccionados de los bancos de germoplasma a nivel nacional, e incluyendo 14 referenciales internacionales de los distintos grupos morfogeográficos. El dendrograma resultante se aprecia en la Figura 3.

Los más resaltante en el dendrograma es la formación de dos grandes grupos a una distancia euclidiana de 2,75 unidades, donde se observa un primer conjunto conformado por 60 genotipos relacionados con los grupos morfogeográficos trinitarios, bajo amazónicos y alto amazónicos, y un segundo conjunto conformado 41 genotipos donde se ubicaron únicamente los referenciales para cacao criollo.

Estudiando la figura 3, se puede observar que a una distancia de 2,1, ya en el primer conjunto se observa la diferenciación de tres subgrupos, en el segundo conjunto no hay diferenciación.

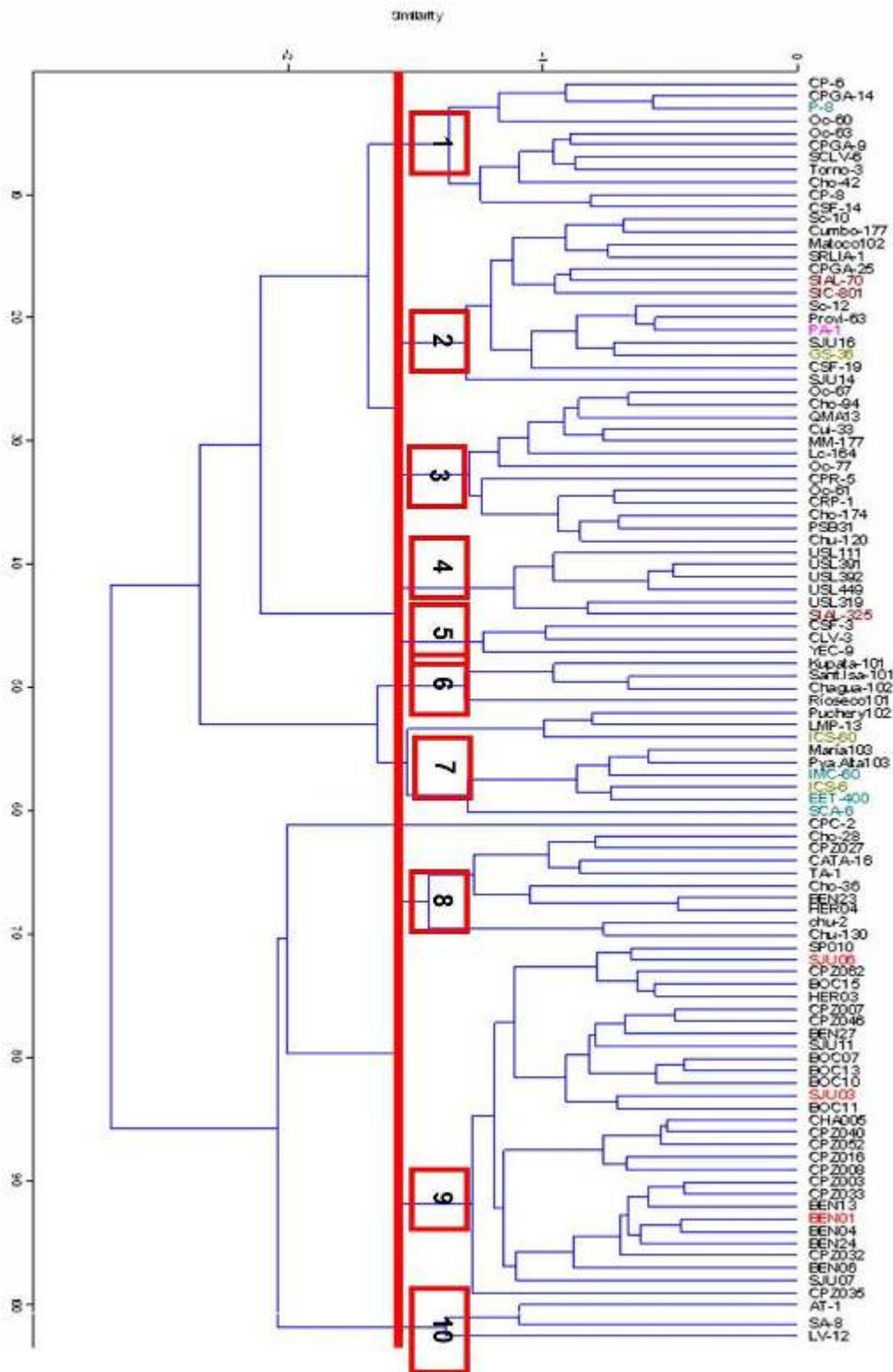


Figura 3. Dendrograma (UPGMA) basado en la distancia Euclidiana de 91 genotipos seleccionados de los bancos de germoplasma nacional y 14 referenciales internacionales de cacao (*Theobroma cacao* L.).

A una distancia de 1,5 para el primer conjunto se forman 7 subgrupos, mientras que para el segundo subgrupo se observa únicamente la diferencia del clon CPC-2 del resto del conjunto y de un segundo grupo conformado por tres genotipos.

Estos resultados evidencian la mayor diversidad genética para el primer grupo donde se ubican los forasteros y trinitarios, en contraste al segundo grupo donde se observan solo los genotipos criollos. Resultados similares fueron encontrados por Motamayor *et al.* (2002), los autores afirman que a través de los procesos asociados a la domesticación, los cacaos criollos perdieron una gran parte de su diversidad genética natural. Este efecto ocasionado por las preferencias humana por semillas blancas que requieren menor fermentación, siendo así un carácter bajo selección por más 1500 años de su cultivo.

La mayor diversidad observada para los cacaos tipo forastero le permitió a Motamayor *et al.* (2008) establecer una nueva clasificación que es conformado por 9 grupos.

Finalmente se decidió considerar la formación de 10 grupos y 1 genotipo único a una distancia de similitud euclidiana de 1,4. El genotipo único definido en el análisis de agrupamiento es el CPC-2 perteneciente a la colección 1995, este árbol presenta en promedio hojas con 31,25 cm. de longitud, la forma de la hoja en su base es aguda y en su ápice es de forma acuminado largo, sus flores presentan en promedio 33,20 óvulos/ovario. En cuanto a los frutos presentan una relación L/A de 1,79, los cuales son relativamente frutos con dimensiones pequeñas y presentan formas oblongas con constricción basal ligera, ápices atenuados en curva y rugosidad intensa. Estas últimas dos características definen distintivamente a este material de los demás genotipos evaluados a nivel nacional, ya que no se han observado mazorcas con ápices pronunciados y predominantemente rugosos. Este árbol presenta en promedio la cantidad de 27,6 semillas por fruto con unas dimensiones de 26,86 mm (largo), 15,05 mm (ancho) y 11,42 mm (espesor), el color de cotiledón de este genotipo se caracteriza por ser de color violeta oscuro. Estas características tienden a relacionarse con el genotipo ICS-39 de las poblaciones trinitarias (ICS), por su

forma de angoleta, sin embargo los frutos de esta población son moderadamente rugosos y el CPC-2 presenta una intensa rugosidad (Carrión, 2007).

Para la descripción de los 10 grupos se utilizó el promedio y la desviación estándar de los caracteres cuantitativos (cuadro N° 25); las características cualitativas fueron definidas aplicando las frecuencias por categoría y su consiguiente porcentaje de frecuencia, definiendo así la categoría mas relevante por grupo (cuadro N° 26).

- **Grupo 1.** Esta compuesto por árboles con hojas de longitudes promedios de 33,28 cm., con base aguda y ápice acuminado largo, sus flores presentan en promedio 45,51 óvulos/ovarios con una distribución de genotipos $\pm 2,38$ óvulos/ovarios, se puede decir que este grupo presenta el mayor número de óvulos por flor registrado en los grupos evaluados. En cuanto a los frutos presenta una relación L/A de 2,21, esta dimensión promedio es la mas alta en los grupos analizados, a su vez, sus frutos son mayormente elípticos con constricción basal ausente, ápices agudos y rugosidad ligera. Los genotipos de este grupo poseen en promedio 34,20 semillas/fruto, las cuales tienen las siguientes dimensiones: 25,20 mm (largo), 13,90 mm (ancho) y 9,29 mm (espesor), las semillas de este grupo tienden a tener un color de cotiledón que va desde violeta oscuro a violeta claro. Estas características relacionan a este grupo con poblaciones forasteras alto amazónicas, las cuales son definidas por presentar frutos grandes, con semillas generalmente pequeñas y cotiledones violeta oscuro (Zhang *et al.*, 2009).

- **Grupo 2.** Los genotipos de este grupo presentan hojas con 26,57 cm., de longitud, con base aguda y ápices acuminado largo hasta acuminado corto, las flores presentan en promedio 43,16 óvulos/ovarios con una distribución de genotipos $\pm 2,50$ óvulos/ovarios, los frutos de este grupo presentan una relación L/A de 1,99 con una forma del fruto mayormente ovabada y con constricción basal ligera, así como ápices agudos y obtusos, la rugosidad de los mismos es ligera. Los frutos contienen en promedio 32,90 semillas y presentan las siguientes dimensiones 24,94 mm (largo), 13,61 mm (ancho) y

espesor mm (espesor), el color del cotiledón de las semillas son predominantemente violeta oscuro. Dentro de este grupo se encuentran incluidos un referencial definido como trinitario (GS-36) y un genotipo aún no definido dentro de los grupos morfogeográficos, llamado PA-1 (Parinari) originario del Perú (Motamayor *et al.*, 2008).

- **Grupo 3.** Los árboles de este grupo presentan hojas con una longitud de 30,93 cm, con base aguda y ápice acuminado corto, las flores poseen 37,96 óvulos/ovarios, los frutos presentan una relación L/A de 2,09 con formas elípticas y ovabadas, con constricciones basales que van desde ligeras a ausentes, los ápices de estos frutos se encuentran distribuidos mayormente en atenuados y obtusos. En cuanto a la rugosidad estos frutos son catalogados en su mayoría como de ligera rugosidad. Definiendo las semillas de este grupo podemos de decir que en promedio se presentan 32,56 semillas por mazorca, las dimensiones promedios de estas semillas son 24,36 mm (largo), 14,12 mm (ancho) y 9,46 mm (espesor), el color del cotiledón de las semillas de este grupo se distribuyen de forma homogénea en la gama de pigmentación establecida que va desde el blanco pasando por el violeta claro hasta el violeta oscuro.

- **Grupo 4.** Los árboles de este grupo presentan hojas con una longitud de 28,86 cm, con base aguda y ápice acuminado corto, las flores poseen 40 óvulos/ovario con una distribución de genotipos $\pm 0,74$ óvulos/ovario, los frutos presentan una relación L/A de 1,87 con forma predominantemente oblonga, con constricción basal ausente, ápice atenuado y rugosidad ligera. Este grupo se caracteriza por tener los frutos más pequeños de los 10 grupos analizados. Definiendo las semillas de este grupo podemos de decir que en promedio se presentan 38 semillas por mazorca, las dimensiones promedios de estas semillas son 20,79 mm (largo), 10,78 mm (ancho) y 5,74 mm (espesor), el cotiledón de las semillas de este grupo son de color blanco en su mayoría y de blanco segregado en menor porcentaje.

▪ **Grupo 5.** Los genotipos de este grupo presentan hojas con 30,47 cm. de longitud, con base aguda y ápice acuminado largo, las flores presentan en promedio 40,40 óvulos/ovario con una distribución de genotipos $\pm 2,84$ óvulos/ovarios, los frutos de este grupo presentan una relación L/A de 2,11 con una forma del fruto mayormente elíptica y con constricción basal ausente, así como ápices obtusos y agudos, la rugosidad de los mismos en mayoría es ligera, pero se tiene un porcentaje considerable de rugosidad intensa. Los frutos contienen en promedio 43 semillas y presentan las siguientes dimensiones 19,33 mm (largo), 10,81 mm (ancho) y 6,79 mm (espesor), el color del cotiledón de las semillas son mayormente violeta claro.

▪ **Grupo 6.** Los genotipos de este grupo presentan hojas con 33,10 cm. de longitud, con base obtusa y ápice acuminado largo, las flores presentan en promedio 47,10 óvulos/ovarios con una distribución de genotipos $\pm 1,04$ óvulos/ovarios, los frutos de este grupo presentan una relación L/A de 2,03 con una forma del fruto mayormente elíptica y con constricción basal ligera, así como ápices agudos, la rugosidad de los mismos en mayoría es ligera. Los frutos contienen en promedio 46,08 semillas y presentan las siguientes dimensiones 27,42 mm (largo), 14,56 mm (ancho) y 9,38 mm (espesor), el color del cotiledón de las semillas son mayormente violeta oscuro. Este grupo se caracteriza por tener la mayor cantidad de semillas por fruto y de ser el segundo grupo con las semillas de mayor dimensión.

▪ **Grupo 7.** Los árboles de este grupo presentan hojas con una longitud de 27,92 cm., con base aguda y ápice acuminado corto, las flores poseen 50,27 óvulos/ovarios con una distribución de genotipos $\pm 3,98$ óvulos/ovarios, lo cual define una amplia variabilidad de genotipos en cuanto a este carácter, este grupo contiene los genotipos con la mayor cantidad de óvulos por flor de los 10 grupos analizados. Los frutos presentan una relación L/A de 2,12 con forma ovabada, con constricción basal ligera, ápice obtuso y rugosidad ligera. En promedio se presentan 42,34 semillas por mazorca, las dimensiones promedios de estas semillas son 24,17 mm (largo), 13,21 mm (ancho) y 8,77 mm (espesor), el cotiledón de las semillas de este grupo son de color violeta oscuro. Este grupo presenta características de los cacaos forasteros, tales

como frutos amelonados con rugosidad ligera y gran cantidad de semillas por mazorca, así como cotiledones de color púrpura. Dentro de este grupo se incluyen la mayoría de los referenciales alto amazónicos y 2 trinitarios, también se encuentran en su mayoría genotipos de la región productora oriental, representados por el banco de germoplasma de Irapa (Motamayor *et al.*, 2008).

- **Grupo 8.** Los árboles de este grupo presentan hojas con una longitud de 25,60 cm., con base obtusa y ápice entre acuminado corto y acuminado largo, las flores poseen 36,22 óvulos/ovarios con una distribución de genotipos $\pm 2,74$ óvulos/ovarios. Los frutos presentan una relación L/A de 2,20 con forma elíptica, con constricción basal ligera, ápice atenuado y rugosidad intermedia. En promedio estos genotipos presentan 26,53 semillas por mazorca, las dimensiones de estas semillas son 22,27 mm (largo), 13,09 mm (ancho) y 9,21 mm (espesor), el cotiledón de las semillas de este grupo son de color blanco y rosado. Este grupo presenta frutos grandes con rugosidad intermedia y poca cantidad de semillas, las mismas de grandes dimensiones, dichos genotipos son catalogados como cultivares trinitarios con gran introgresión de genes criollos, este grupo está comprendido en su mayoría por genotipos de la región aragüeña y de las zonas productoras del estado Mérida (Motamayor *et al.*, 2003).

- **Grupo 9.** Corresponde al grupo con mayor número de clones con 29 genotipos, es un grupo muy uniforme, corresponde a los materiales de Mérida y Zulia. Este grupo presentan las hojas con la menor longitud en cuanto a los grupos analizados, presenta una longitud de 24,02 cm., en su base presentan una forma obtusa y un ápice acuminado. Sus flores poseen 37,21 óvulos/ovarios con una distribución de genotipos $\pm 2,23$ óvulos/ovarios. Los frutos presentan una relación L/A de 2,15 con una forma oblonga, con constricción basal ausente, ápice atenuado y rugosidad ligera. En promedio estos genotipos presentan 24,74 semillas por mazorca, las dimensiones de estas semillas son 27,37 mm (largo), 16,16 mm (ancho) y 11,72 mm (espesor), el cotiledón de las semillas de este grupo son predominantemente color blanco. En cuanto a las características presentadas, se puede definir a este grupo dentro de los cacaos criollos tipo porcelana, debido a esa forma oblonga similar

a un calabacillo con cierta variación hacia el tipo angoleta, contricción basal ausente y ápice atenuado, así como poca rugosidad. También los cacaos tipo porcelana presentan semillas grandes con 27,10 mm de largo, 15,93 mm de ancho y 10,94 mm de espesor, dimensiones muy similares a las de este grupo (Chacón *et al.*, 2011). Ramos *et al.* (2004) analizando únicamente clones de san juan de lagunillas en Mérida, observaron la conformación de dos grupos, uno correspondiente a los cacaos tipo Guasare (SJU-3, SJU-6 y SJU-7) y los de pie de monte andino (SJU-11, SJU-14, SJU-16).

En el actual estudio se pudo corroborar las diferencias establecidas por Ramos *et al.* (2004) donde los cacaos pie de monte andino SJU-14, SJU-16 se ubicaron en el primer grupo, específicamente cerca de materiales tipo trinitarios, y los cacaos tipo Guasare (SJU-3, SJU-6 y SJU-7) se ubicaron en el grupo de los criollos.

▪ **Grupo 10.** Los genotipos de este grupo presentan hojas con 31,93 cm. de longitud, con base aguda y ápice acuminado corto, las flores presentan en promedio 42,27 óvulos/ovario, los frutos de este grupo presentan una relación L/A de 1,98, con una forma del fruto mayormente oblonga y con una constricción basal que va desde ligera hasta ausente, así como ápices totalmente atenuados y de rugosidad ligera. Este grupo presenta los genotipos con los frutos más pequeños y tiende a presentar la forma tipo calabacillo (Chacón *et al.*, 2011). Los frutos contienen en promedio 21,07 semillas y presentan las siguientes dimensiones 24,13 mm (largo), 14,49 mm (ancho) y 10,20 mm (espesor), el color del cotiledón de las semillas son mayormente blanco segregado con un porcentaje menor de violeta oscuro. Estos genotipos presentan características que los relacionan a los cultivares tipo criollos pero con introgresión de genotipos tipo amelonados bajo amazónicos (Motamayor *et al.*, 2003).

En los Cuadros 28 y 29 se resumen las características cuantitativas y cualitativas representativas de cada grupo originado por el análisis de agrupamiento UPGMA.

Cuadro 28. Descripción de las características cuantitativas de cacao de los grupos formados en el análisis de agrupamiento UPGMA basado en distancia euclidiana.

Grupos	Estadísticos	Hojas			Flores			Frutos		Semillas			
		Largo	Ancho	LBA	Largo Ovario	Largo Estilo	Nº ovulos/ov	Ancho	Rel. L/A	Nº de Semillas	Largo Semillas	Ancho Semillas	Espesor Semillas
1	Nº	11											
	Promedio	33,28	12,57	17,36	1,54	2,24	45,51	7,68	2,21	34,20	25,20	13,90	9,29
	DESVEST	1,75	1,36	0,97	0,31	0,32	2,38	0,74	0,35	3,16	1,94	1,59	1,06
2	Nº	14											
	Promedio	26,57	10,32	13,65	1,53	2,29	43,16	8,16	1,99	32,90	24,94	13,61	8,97
	DESVEST	1,93	0,81	1,02	0,18	0,27	2,50	0,56	0,32	2,20	2,04	1,43	0,81
3	Nº	13											
	Promedio	30,93	11,57	16,78	1,61	2,33	37,96	8,19	2,09	32,56	24,36	14,12	9,46
	DESVEST	2,29	0,97	1,50	0,27	0,26	1,59	1,31	0,30	2,96	1,57	0,99	0,95
4	Nº	6											
	Promedio	28,86	11,55	14,80	1,77	2,84	39,60	9,55	1,87	37,83	20,79	10,78	5,74
	DESVEST	2,10	1,21	1,26	0,20	0,29	0,55	1,11	0,14	0,41	1,66	1,42	1,59
5	Nº	3											
	Promedio	30,47	10,31	15,40	1,73	2,24	40,40	7,00	2,11	46,00	19,33	10,81	6,79
	DESVEST	1,60	1,31	1,83	0,12	0,11	2,84	0,50	0,14	2,65	1,34	0,70	0,45
6	Nº	4											
	Promedio	33,10	11,30	16,84	1,46	2,35	47,10	8,63	2,03	46,08	27,42	14,56	9,38
	DESVEST	1,88	0,68	1,37	0,12	0,42	1,04	0,36	0,31	2,63	2,23	1,83	0,82
7	Nº	9											
	Promedio	27,92	10,49	14,95	1,54	2,49	50,27	8,27	2,12	42,34	24,17	13,21	8,77
	DESVEST	1,83	0,97	1,14	0,22	0,25	3,98	0,77	0,20	2,03	1,78	1,55	0,74
8	Nº	9											
	Promedio	25,60	10,69	13,54	1,38	1,98	36,22	7,63	2,20	26,53	22,27	13,09	9,21
	DESVEST	2,10	1,05	1,00	0,21	0,27	2,74	0,75	0,46	3,65	0,91	0,70	0,88
9	Nº	29											
	Promedio	24,02	10,12	12,91	1,31	2,03	37,21	8,15	2,15	24,74	27,37	16,16	11,72
	DESVEST	2,43	0,93	1,78	0,13	0,13	2,23	0,63	0,34	2,52	1,29	0,66	0,91
10	Nº	3											
	Promedio	31,93	12,72	15,88	1,86	2,04	42,27	8,65	1,98	21,07	24,13	14,49	10,20
	DESVEST	1,55	0,76	0,60	0,24	0,03	1,36	0,35	0,42	3,30	2,84	2,54	1,10

Cuadro 29. Descripción de las características cualitativas de los grupos de cacao formados en el análisis de agrupamiento UPGMA basado en distancia euclidiana.

Grupos	Hojas				Frutos								Semillas		
	Base de la hoja		Apice de la hoja		Forma del fruto		Constricción basal del fruto		Apice del fruto		Rugosidad del fruto		Color de cotiledon de la semilla		
1	Aguda (82%)	Obtusa (18%)	Acuminado largo (73%)	Acuminado corto (27%)	Elíptica (36%)	Ovabada (27%)	Ausente (55%)	Ligera (36%)	Obtuso (55%)	Agudo (18%)	Ligera (64%)	Intermedia (18%)	Violeta oscuro (55%)	Violeta claro (45%)	
2	Aguda (64%)	Obtusa (36%)	Acuminado largo (57%)	Acuminado corto (43%)	Ovabada (36%)	Elíptica (29%)	Ligera (50%)	Ausente (36%)	Agudo (36%)	Obtuso (36%)	Ligera (43%)	Intermedia (36%)	Violeta oscuro (64%)	Violeta claro (14%)	
3	Aguda (85%)	Obtusa (15%)	Acuminado corto (54%)	Acuminado largo (46%)	Elíptica (46%)	Ovabada (46%)	Ligera (46%)	Ausente (31%)	Atenuado (38%)	Obtuso (38%)	Ligera (69%)	Intensa (23%)	Blanco (31%)	Violeta claro (31%)	Violeta oscuro (31%)
4	Aguda (83%)	Obtusa (17%)	Acuminado corto (100%)		Oblonga (83%)	Ovabada (17%)	Ausente (67%)	Ligera (33%)	Atenuado (67%)	Obtuso (17%)	ligera (83%)	Ausente (17%)	Blanco (50%)	blanco segregado (33%)	
5	Aguda (67%)	Obtusa (33%)	Acuminado largo (100%)		Elíptica (67%)	Ovabada (33%)	Ausente (100%)		Obtuso (67%)	Agudo (33%)	Ligera (67%)	Intensa (33%)	Violeta claro (67%)	Violeta oscuro (33%)	
6	Obtusa (75%)	Aguda (25%)	Acuminado largo (75%)	Acuminado corto (25%)	Elíptica (50%)	Ovabada (25%)	Ligera (100%)		Agudo (75%)	Redondeado (25%)	Ligera (50%)	Intermedia (25%)	Violeta oscuro (75%)	Violeta claro (25%)	
7	Aguda (78%)	Obtusa (22%)	Acuminado corto (67%)	Acuminado largo (33%)	Ovabada (56%)	Elíptica (33%)	Ligera (56%)	Ausente (33%)	Obtuso (56%)	Agudo (22%)	Ligera (56%)	Intermedia (33%)	Violeta oscuro (67%)	Violeta claro (33%)	
8	Obtusa (44%)	Aguda (33%)	Acuminado largo (44%)	Acuminado corto (44%)	Elíptica (67%)	Oblonga (33%)	Ausente (56%)	Ligera (33%)	Atenuado (56%)	Obtuso (33%)	Intermedia (44%)	Ligera (33%)	Blanco (33%)	Rosado (33%)	Violeta claro (22%)
9	Obtusa (59%)	Redondeada (31%)	Acuminado corto (69%)	Acuminado largo (24%)	Oblonga (100%)		Ausente (69%)	Ligera (17%)	Atenuado (79%)	Agudo (14%)	Ligera (55%)	Intermedia (31%)	Blanco (83%)	blanco segregado (14%)	
10	Aguda (100%)		Acuminado corto (67%)	Acuminado largo (33%)	Oblonga (67%)	Elíptica (33%)	Ligera (67%)	Ausente (33%)	Atenuado (100%)		Ligera (33%)	Intermedia (33%)	blanco segregado (67%)	Violeta oscuro (33%)	

2.1.7. Análisis de componentes principales de los genotipos de cacao (*Theobroma cacao* L.) seleccionados por banco de germoplasma.

En la Figura 4 se puede corroborar lo observado en el dendrograma antes discutido, en esta gráfica se observa la conformación de dos grandes grupos, los genotipos agrupados a la izquierda de la misma conforman a los cacaos tipo “criollos”, y a la derecha se observa una gran variabilidad de genotipos, los cuales agrupados en base a sus referenciales morfogeográficos: trinitarios, forasteros bajo amazónicos, forasteros alto amazónicos (Motamayor *et al.*, 2002).

Definiendo los cacaos tipo criollos, podemos decir que la mayoría de los genotipos están relacionados a los cacaos criollos tipo Guasare, incluyendo a los referenciales SJU-3 y SJU-6. En la gráfica se observa la separación distanciada del genotipo SJU-16, el cual es definido como un cacao del pie de monte andino, el cual presenta las siguientes características: mazorcas alargadas, con textura lisa, almendras ligeramente planas y pigmentadas con un elevado peso, este genotipo presenta características que tienden a relacionarse con los grupos trinitarios (Ramos *et al.*, 2004).

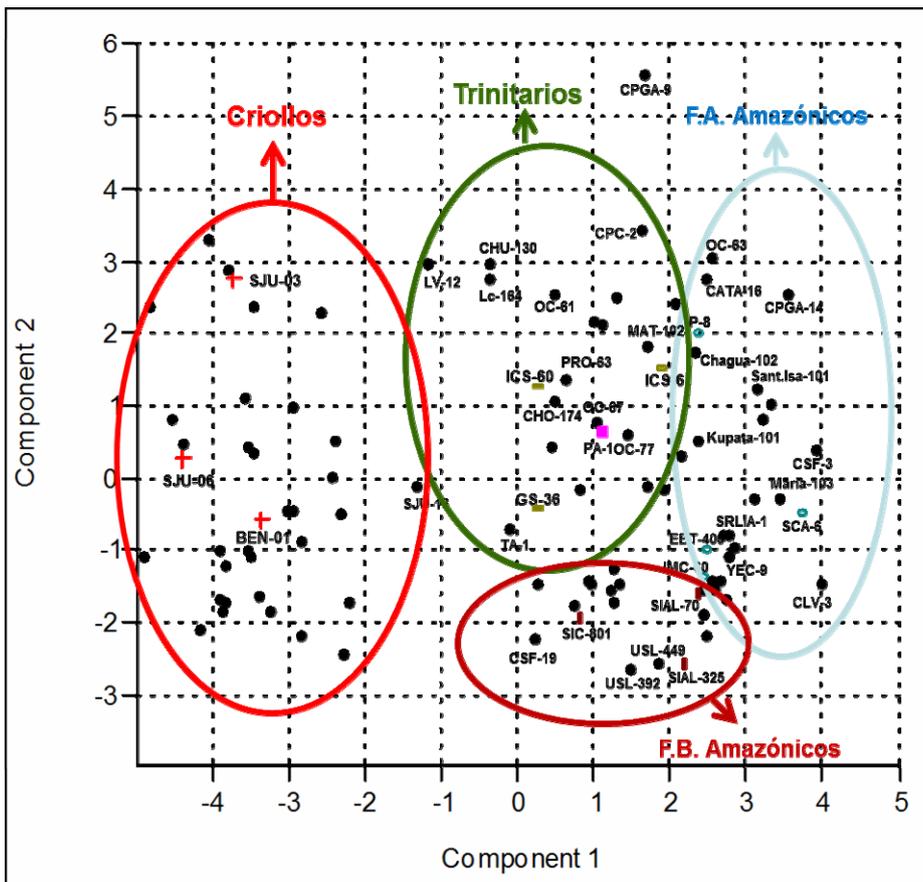
Dentro de los genotipos definidos como trinitarios, se presentan genotipos relevantes como el LV-12 de la colección 1995, el cual se encuentra muy próximo al genotipo del pie de monte andino (SJU-16). Tomando en cuenta la nueva clasificación de Motamayor *et al.* (2008) se puede observar que los genotipos Prov-63 y CHO-174 los cuales están próximos al referencial ICS-60, así como el genotipo Matacongo-102 próximo al referencial ICS-6, pueden ser definidos dentro de los grupos Iquitos.

Motamayor *et al.* (2008) describe al genotipo PA-1 (Parinari) proveniente de la región productora del Perú (alto amazónicos), este grupo no se encuentra definido en la nueva clasificación, es de resaltar que en la gráfica se observa la cercanía de los genotipos OC-67 y OC-77 de la colección 1945. Estos materiales definidos como trinitarios por Motamayor *et al.* (2003) poseen cercanía a este grupo referencial aún no definido.

En la misma figura se puede observar la distribución de un genotipo fuera de los grupos conformados, dicho genotipo pertenece a la colección del Jardín Clonal *Padrón* y es el clon CPGA-9, este material se diferencia de los grupos trinitarios por presentar frutos con ápices redondeados, lo cual es un atributo único en los genotipos analizados. En cuanto al CPC-2 observado como genotipo único en el dendrograma, se puede observar en el grupo de los trinitarios orientándose en dirección sentido hacia el fuera de tipo CPGA-9.

Hacia al lado derecho de la figura se agrupan los genotipos forasteros alto amazónicos, en la parte de arriba del grupo delimitado se puede observar al referencial P-8, definido dentro del grupo Nanay, y muy cerca a este referencial el clon Chagua-102 y Sant.Isa-101 provenientes del banco de germoplasma de Irapa. En la parte baja del grupo delimitado se observa a SCA-6 (Grupo: Contamana) y muy cerca se encuentra Maria-103, los otros dos referenciales utilizados el EET-400 (Grupo: Purús) y el IMC-60 (Grupo: Iquitos) ubicados muy cerca se encuentran relacionados con genotipos provenientes del Jardín Clonal Padrón.

Existe una gran variabilidad de genotipos en la región central del país, específicamente en Barlovento, donde los genotipos guardan mucha relación con los grupos Purús e Iquitos. A su vez se puede observar que los genotipos de la región oriental del país presentan una gran diversidad que guarda relación con los grupos Nanay y Contamana.



Referenciales Internacionales (Banco Internacional, INIA-Miranda)	Grupos morfogeográficos (Lanaud et al, 1999) y (Motamayor et al, 2002)	Nueva clasificación del gemoplasma centro y sur América (Motamayor, et al, 2008)
SJU03	Criollo	Criollo
SJU06		
BEN01		
G&S-36	Trinitario	Guiana
ICS-60		Iquitos
ICS-6		
SIAL-325	Forastero bajo amazónico	Amelonado
SIC-801		
SIAL-70		
SCA-6	Forastero alto amazónico	Contamana
EET-400		Purus
INC-60		Iquitos
P-8		Nana
PA-1		Marañón

Figura. 4. Análisis por componentes principales para 91 genotipos seleccionados y 14 referenciales internacionales de cacao (*Theobroma cacao* L.), con base en la caracterización morfológica.

2.2. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LOS BANCOS DE GERMOPLASMA DEL PAÍS.

2.2.1. Verificación de información molecular.

La caracterización de colecciones de germoplasma de cacao a nivel nacional con el uso de microsatélites se inició con el Trabajo de Grado de Jiménez (2006) quien presentó los resultados para 21 microsatélites evaluando el Jardín Clonal de Padrón, en la Estación Experimental Padrón perteneciente al INIA-Miranda. Más adelante, como actividades del sub-proyecto “Estudio de la Diversidad Genética del Cacao Venezolano”, se incluyeron Trabajos de Grado enfocadas en el estudio molecular de los distintos bancos de germoplasma del país; dentro de ellos, Moreno (2008), empleó 9 microsatélites para la evaluación de los genotipos resguardados en el Banco de Germoplasma del, para esa fecha, Ministerio del Ambiente, actualmente, Ministerio del Poder Popular para el Ecosocialismo y Aguas.

Paralelamente, Polo (2009) realizó la caracterización de la plantación de la Unidad de Investigación “La Glorieta” (UNESUR), Municipio Colon del Estado Zulia, donde existe una población de cacaos tipo Criollo “Porcelana” y el híbrido por morfología “Santa Bárbara”; en dicha investigación se emplearon 12 microsatélites. Por último, en el año 2012, se expusieron los resultados de la caracterización del banco de germoplasma de cacao tipo Criollo establecido en la Unidad Académica “La Morusca”, de la Universidad Nacional Experimental del Táchira (UNET), donde se emplearon 14 microsatélites (Márquez, 2012).

Otros datos moleculares, producto del mencionado proyecto, no se realizaron en el formato de Trabajo de Grado y su análisis es incluido en el presente estudio.

Estos trabajos, en el marco del Sub-proyecto Diversidad Genética del cacao venezolano, son producto del trabajo en conjunto realizado por los siguientes laboratorios: 1- Laboratorio de Biotecnología Agrícola del Centro de Investigaciones y Biotecnología Agrícolas (CIBA) de la Facultad de Agronomía (UCV). 2- Laboratorio de Genética y Química Celular de la Universidad de Los

Andes (ULA). 3- Laboratorio de Biotecnología de plantas del Instituto de Estudios Avanzados (IDEA).

En el laboratorio del CIBA se realizaron los trabajos de las colecciones 1945, 1995, Barlovento, Margarita, MINAMB, Jardín Clonal Padrón y parte de la colección de Irapa. En el Laboratorio de Biotecnología de Plantas del IDEA se realizó la caracterización de la otra parte de la colección de Irapa, y en el Laboratorio de Genética y Química Celular de la ULA se caracterizaron las colecciones de la UNESUR, CORPOZULIA, INIA-Mérida y la UNET. Por ello, el primer paso del presente trabajo fue revisar la asignación de alelos y genotipos para cada microsatélite, tal como se explicó anteriormente, a fin de obtener una matriz de datos en consenso.

Los resultados aportados por estos investigadores, y el total de las colecciones producto del mencionado proyecto serán insumos para la actual investigación. En el Cuadro 30 se presenta la información molecular de los bancos de germoplasma de cacao del país, donde se expone el número de alelos por locus, % heterocigotas y el contenido de información polimórfica (PIC) para un máximo de 22 microsatélites. A fin de facilitar el análisis, la discusión se realizará por región productora a nivel nacional.

2.2.2. Caracterización Molecular de la Región Central del País.

Para la colección 1945 se obtuvieron resultados para 20 microsatélites, donde se logró identificar la presencia de hasta cuatro alelos, y se obtuvo un promedio de alelo/locus de 2,2. Para esta colección los mTc 291, mTc167 y mTc 265 presentaron tres alelos/locus; sin embargo, ese tercer alelo para cada microsatélite, presentan frecuencias menores a 0,05, por lo que son considerados alelos raros, tal como encontró Jiménez (2006) en el Jardín Clonal Padrón.

Para el marcador mTc 190 se lograron identificar 4 alelos, el alelo 3 se observó una baja frecuencia menos a 0,04. Para este marcador las estimaciones de diversidad genética realizadas permiten diferenciar los clones evaluados, por lo que proporciona un mayor poder discriminatorio (Murillo *et al.*, 2010). Para esta

colección el marcador mTc 184 se observó solo un alelo en los genotipos evaluados, resultando este marcador monomórfico.

Los resultados de la colección 1945 en cuanto al promedio de alelos/locus derivan en la similitud genética que estos genotipos pudieran tener con respecto a los criollos modernos (2,37) y trinitarios (2,19) (Motamayor *et al.*, 2002; Márquez, 2012).

Resultados similares fueron encontrados en el Departamento de Rivas en Nicaragua en donde las muestras referenciales de la población presentan un promedio de alelo/locus de 2,60 (García, 2011).

En la colección 1945 se reporta un porcentaje de heterocigotas de 54,86% (Cuadro 30), este resultado mantiene concordancia con los cacaos de la Región costera Ecuatoriana, lo cual evidencia una población con altos niveles de heterocigisidad (Loor *et al.*, 2009).

Los marcadores más discriminantes en esta colección para el % de heterocigotas fueron el mTc 7 (100%), mTc 167 (94,74%) y mTc 189 (81,25%). Morillo *et al.* (2010) expone al marcador mTc 7 como de los más discriminatorios en el análisis de diversidad genética de poblaciones colombianas. Sin embargo, otro autor (Erazo *et al.*, 2015) para la región de El Valle del Cauca, Colombia, contrasta este resultado afirmando en su investigación la poca información aportada por este marcador.

En cuanto al PIC la colección presenta valores de 0,423, los cuales son similares a los pertenecientes al grupo de cacao Marañón (0,470) ubicado en el río Amazonas (Brasil), dicho grupo se encuentra caracterizado dentro de los 10 grupos de cacao definidos por Motamayor *et al.* (2008); Thomas *et al.* (2012).

En cuanto a la colección 1995 se observa en el Cuadro 30, que presentan resultados para 20 microsatelites, donde se obtiene un promedio de alelo/locus de 2,2, similar al obtenido en la colección 1945, en la colección 1995 se pudieron observar hasta un máximo de 4 alelos, los microsatélites donde se obtuvieron tal número de alelos fueron el mTc 190 y el mTc 182; sin embargo, en el microsatelites mTc182 todos los genotipos evaluados fueron homocigotas

a diferencia del mTc190 donde se expone al más alto porcentaje de heterocigotas de la colección (92, 86%). De forma antagónica a la discusión anterior se procede a mencionar los marcadores mTc 121 y mTc 184 los cuales no lograron discriminación alguna en cuanto a los genotipos evaluados.

En esta colección se presenta un porcentaje de heterocigotas de 51,60% y un PIC de 0,447, cabe destacar que estos resultados guardan relación con los genotipos de la costa Ecuatoriana resguardados en la Estación experimental Tropical Pichilingue (EET-P) y el Centro de Cacao Aroma Tenguel (CCAT), donde se obtuvo un 56,75% (% Het.) y un PIC de 0,423 (Loor *et al.*, 2009).

Para la colección Barlovento se presentan resultados para 20 microsatélites donde se obtiene un promedio de 2,4 alelo/locus, un porcentaje de heterocigotas de 54,28 % y un PIC promedio de 0,459. Se observó un máximo de 4 alelos/locus reportado en el mTc 190, a su vez el microsatelite que identifico la mayor discrepancia entre genotipos fue el mTc 182 (100% heterocigotas).

Los resultados de la colección Barlovento guardan relación con los genotipos pertenecientes al bajo amazonas, tales como el SIAL-70, SIC-806, CATONGO son característicos de dicha población, a su vez se pueden catalogar como amelonados dentro de la nueva clasificación (Motamayor *et al.*, 2008). La población a la cual representan estos genotipos amelonados presentan PIC-promedios de 0,421 y N^o alelos/locus de 2,4, similares a los de Barlovento, estos resultados fueron obtenidos en el Banco de Germoplasma de Trinidad y Tobago (Jhonson *et al.*, 2009).

Para la colección MINAMB caracterizada por Moreno (2008), expone resultados para 9 microsatelites, obteniéndose un promedio de alelo/locus de 2,9, se pudo observar un máximo de 4 alelos/locus para el mTc 266, este cuarto alelo presenta una frecuencia de 0,02, dicha frecuencia lo cataloga como un alelo raro de poca significancia en la definición genética de una población (Jiménez, 2006). La colección se caracteriza por presentar un alto porcentaje de heterocigotas (58,25%), lo cual Moreno (2008) atribuye a una población hibrida obtenida por libre polinización a partir de los genotipos de la

colección 1945 y colección 1995, a su vez la presencia de genotipos multiplicados por semillas provenientes de la población de Turiamo (Edo, Aragua) y la Población de Zea (Edo, Mérida). El PIC para esta colección es de 0,528, lo cual indica la variabilidad de los genotipos descendientes de la colección 1945 y 1995 (Moreno, 2008).

Para la colección del Jardín Clonal Padrón se tomaron los datos suministrados por Jiménez (2006), donde se obtuvieron resultados para 21 microsatelites, en dicho banco de germoplasma se obtuvo un promedio de 3,7 alelos/locus, observándose hasta un máximo de 5 alelos/locus. Este banco se caracteriza por presentar un alto porcentaje de genotipos heterocigotos (52,40 %), y un PIC de 0,591. Estos resultados indican la variabilidad de genotipos con alelos distintos presentes en esta colección. Los genotipos del Jardín Clonal Padrón pueden tener relación con los genotipos de los Valles de Hulla y Ucayali en Perú, donde se reportó porcentaje de heterocigotas superiores al 50%, 3,68 alelos/locus y PIC cercanos al 0,600 (Zhang *et al.*, 2006).

En general para la región central del país, se obtuvo en promedio 2,7 alelos/locus, 54,30% de heterocigotas y un PIC de 0,489, esto indica que la región central está caracterizada por una población bastante heterogénea con fuentes alélicas provenientes de criollos posiblemente del occidente del país y fuentes referentes a genotipos amelonados del bajo amazonas, los cuales tuvieron su encuentro en las zonas del estado Aragua y Miranda principalmente conformado una gama amplia de genotipos híbridos con introgresiones que van desde los criollos modernos y los trinitarios propiamente (Motamayor *et al.*, 2002), pasando por los cacaos tipo amelonados hasta los cacaos tipo Marañón (Motamayor *et al.* (2008); Thomas *et al.* (2012).

Cuadro 30. Caracterización molecular mediante marcadores tipo microsatélites de 11 bancos de germoplasma de cacao (*Teobroma cacao* L.) a nivel nacional. Se muestran: el Índice de Información Polimórfica (PIC), el % de loci heterocigotas observado, y el número de alelos por locus.

Microsatélite	1945	1995	Barlovento	MINAMB (Moreno, 2008)	JCP (Jimenez, 2008)	UNET (Marquez, 2012)	Mérida	UNESUR (Porcelana)	Corpozulia	Irapa	Margarita	
mTc 182	0,468	0,698	0,500	-	0,498	-	-	-	-	-	-	
	25,00	0,00	100,00		30,510							
	2	4	2		2							
mTc 82	0,498	0,473	0,438	-	0,551	0,082	0,219	0,00	-	-	0,469	
	68,75	46,15	52,94		32,520	5,71	25,00	0,00			75,00	
	2	2	2		3	2	2	1			2	
mTc 100	0,469	0,536	0,490	-	0,296	0,072	0,146	0,068	-	-	0,278	
	50,00	62,50	42,86		18,330	7,46	15,91	0,00			33,33	
	2	3	2		3	2	2	2			3	
mTc 79	0,498	0,484	0,495	-	0,568	0,044	0,184	0,150	-	-	0,469	
	70,58	60,71	70,00		61,980	1,52	20,45	12,61			50,00	
	2	2	2		3	2	2	3			2	
mTc 189	0,482	0,483	0,494	-	0,701	0,091	0,165	-	-	-	0,375	
	81,25	74,07	89,47		63,450	9,52	18,18	-			50,00	
	2	2	2		4	2	2	-			2	
mTc 91	0,457	0,440	0,500	-	0,498	0,111	0,236	0,000	0,044	-	0,375	
	47,06	34,62	33,33		13,270	2,94	22,73	0,00	4,50		50,00	
	2	2	2		2	2	2	1	3		2	
mTc 265	0,512	0,375	0,551	-	0,667	-	-	-	-	-	0,469	
	66,67	42,31	83,33		56,470	-	-	-	-		50,00	
	3	2	3		5	-	-	-	-		2	
mTc 73	0,464	0,497	0,432	0,491	0,639	-	-	-	-	-	0,500	
	60,00	68,00	63,16	63,83	62,830	-	-	-	-	-	42,86	
	2	2	2	3	4	-	-	-	-	-	2	
mTc 7	0,500	0,499	0,514	0,630	0,590	0,111	0,236	0,000	-	-	0,663	
	100,00	82,14	47,37	75,61	39,920	11,76	27,27	0,00	-	-	71,43	
	2	2	4	3	4	2	2	1	-	-	3	
mTc 266	0,465	0,489	0,517	0,531	0,611	0,087	-	0,000	-	0,486	0,492	
	52,63	42,31	73,68	50,88	42,860	6,06	-	0,00	-	66,67	62,50	
	2	2	3	4	3	2	-	1	-	2	2	
mTc 167	0,543	0,494	0,444	0,519	0,627	-	0,184	0,000	0,251	0,411	0,420	
	94,74	88,89	55,55	52,46	72,810	-	20,45	0,00	28,83	28,57	20,00	
	3	2	2	3	5	-	2	1	3	4	2	
mTc 84	0,498	0,500	0,490	-	0,493	-	0,146	0,000	0,118	0,439	-	
	81,25	53,85	57,14	-	61,910	-	15,91	0,00	5,41	55,00	-	
	2	2	2	-	2	-	2	1	2	2	-	
mTc 163	0,124	0,330	0,434	0,480	0,480	-	-	0,414	-	-	0,430	
	13,33	33,33	63,64	38,46	54,880	-	-	58,62	-	-	62,50	
	2	2	2	2	2	-	-	2	-	-	2	
mTc 121	0,198	0,000	0,332	0,499	0,674	0,140	0,268	0,440	0,111	-	-	
	11,11	0,00	0,00	64,62	65,810	8,96	31,82	65,51	11,71	-	-	
	2	1	2	3	5	3	2	2	3	-	-	
mTc 291	0,536	0,500	0,500	0,506	0,628	0,056	0,201	0,000	-	-	0,398	
	76,92	100,00	46,67	46,38	51,330	5,71	22,73	0,00	-	-	37,50	
	3,00	2,00	2,00	3,00	5	2,00	2,00	1	-	-	3	
mTc 109	0,495	0,607	0,439	0,500	0,618	0,555	0,219	0,333	0,171	-	-	
	50,00	73,08	57,14	66,67	58,620	10,00	25,00	19,23	15,32	-	-	
	2	3	3	2	5	3	2	2	2	-	-	
mTc 229	0,153	0,430	0,245	0,591	0,659	0,108	0,219	-	-	-	-	
	16,67	45,83	28,57	65,38	63,250	0,00	25,00	-	-	-	-	
	2	2	2	3	4	2	2	-	-	-	-	
mTc 184	0,00	0,000	0,180	-	0,650	-	-	-	-	0,774	-	
	0,00	0,00	0,00	-	56,670	-	-	-	-	38,10	-	
	1	1	2	-	4	-	-	-	-	5	-	
mTc 222	0,469	0,444	0,525	-	0,618	0,086	0,298	0,000	0,018	0,493	0,508	
	37,50	33,33	26,32	-	23,530	5,97	31,82	0,00	0,00	17,65	42,86	
	2	2	3	-	3	2	2	1	2	2	3	
mTc 190	0,635	0,654	0,653	-	0,656	0,044	0,201	-	-	0,578	0,680	
	93,75	92,86	94,44	-	79,090	4,55	22,73	-	-	42,11	85,71	
	4	4	4	-	5	2	2	-	-	5	3	
mTc 268	-	-	-	-	0,683	0,056	0,219	-	-	0,486	-	
	-	-	-	-	90,430	2,90	20,45	-	-	23,53	-	
	-	-	-	-	4	2,00	2,00	-	-	4,00	-	
PIC	0,423	0,447	0,459	0,528	0,591	0,117	0,209	0,105	0,123	0,524	0,466	
%Het	54,86	51,70	54,28	58,25	52,40	5,93	23,03	11,947	11,20	38,80	52,41	
ALELOS/LOCUS	2,2	2,2	2,4	2,9	3,7	2,1	2,0	1,333	2,6	3,4	2,4	
PIC	0,489					0,139					0,495	
% Het Obs	54,30					13,03					45,60	
ALELOS/LOCUS	2,7					2,0					2,9	
	REGIÓN CENTRAL					REGIÓN OCCIDENTAL					REGIÓN ORIENTAL	

2.2.3. Caracterización Molecular de la Región Occidental del País.

La región occidental del país cuenta con 4 bancos de germoplasma que resguardan los genotipos caracterizados por ser materiales criollos propiamente y la variedad de criollo llamado “Porcelana” (Polo, 2009).

Con respecto, al banco de germoplasma de la Unidad Académica “La Morusca”, ubicada al norte del Estado Táchira, Márquez (2012) procesó 70 genotipos de esta colección utilizando 14 microsatelites, de los cuales obtuvo un promedio de 2,1 alelos/locus con un 5,93% de heterocigotas y un PIC 0,117, estos resultados indican la baja frecuencia alélica de la colección y el alto porcentaje de genotipos homocigotas. Con base en sus resultados, Márquez (2012) concuerda con Motamayor *et al.* (2003) en que estos genotipos homogéneos cuentan con un alelo muy relacionado con los criollos ancestrales con una baja introgresión de alelos forasteros.

Márquez (2012) concluye que la baja variabilidad genética de la colección “La Morusca” fue revelada por una alta uniformidad molecular. La mayoría de estas plantas las clasificó como “Criollos Antiguos” debido a la baja o nula heterocigosis encontrada en las plantas de cacao estudiadas.

Continuando con la caracterización de los genotipos occidentales del país, se realizó la caracterización molecular del banco de germoplasma de San Juan de Lagunillas del Estado Mérida, en el mismo se resguardan los criollos Tipo Guasare (Población de Guasare, Edo Zulia) y los cacaos provenientes del piedemonte andino (Ramos *et al.*, 2004). En ese estudio se aplicaron 15 microsatélites obteniéndose un promedio de 2 alelos/locus, con un 23,03% de heterocigotas y un PIC de 0,203. Estos resultados exponen la presencia de tan solo dos alelos en esta colección, además se pudo observar la alta frecuencia de un alelo en todos los genotipos, lo cual afianza lo establecido por Motamayor *et al.* (2003) y Márquez (2012) sobre la imponente frecuencia del alelo referente al criollo ancestral presente en las colecciones del occidente del país.

Polo (2009) realizó la caracterización de la parcela demostrativa de la Unidad de Investigación La Glorieta (UNESUR) Estado Zulia, utilizando 12 microsatélites para la colección “Porcelana”, cacao de renombre en la región occidental, donde obtuvo en promedio de 1,33 alelos/locus y un PIC de 0,105, a su vez se presentó un 11,97% de heterocigotas, lo cual es un porcentaje acorde a lo establecido en los materiales occidentales. La población de cacaos criollos tipo “Porcelana”, fue definida por Polo (2009) como una población altamente homocigota. El alelo criollo se encontró en un porcentaje de frecuencia alto (97%), lo cual reflejó la alta pureza genética de estos individuos.

En dicha colección también se encuentra resguardada los genotipos denominados cacaos “Santa Bárbara”, donde se obtuvo un PIC de 0,500, también se presentó un 0,5257 de frecuencia para el alelo 1 (Criollo) y un 0,4666 de frecuencia para el alelo 2 (Forastero), a su vez un 98,92% de heterocigotas. Esta colección proviene de mazorcas cosechadas en las riberas del río Chama del municipio Francisco Javier Pulgar, estado Zulia, y establecidas por semilla en la UNESUR (Dr. Álvaro Gómez, comunicación personal, en fecha 5 de febrero 2016). Polo (2009) definió a los genotipos de “Santa Bárbara” como una población híbrida de primera generación (F1), provenientes del cruce entre un individuo Criollo y uno Forastero del Bajo Amazonas; ésta es la misma estrecha base genética encontrada en la mayoría de los cacaos cultivados venezolanos (Motamayor *et al.*, 2003; Marcano 2007).

Siguiendo con la caracterización molecular de los cacaos occidentales, se realizó el análisis de los genotipos del Banco de germoplasma de CORPOZULIA (Sur del Lago, Estado Zulia), donde se emplearon 7 microsatélites, y se obtuvo un promedio de 2,6 alelos/locus y un PIC de 0,123, observándose un máximo de 3 alelos por locus, los microsatélites más discriminantes fueron el mTc 121, mTc 167, mTc 79 y mTc 91. Esta colección presentó un porcentaje de frecuencia para el alelo 1 (definido como alelo criollo) de 93,24 % seguido del alelo 2 (forastero) con un porcentaje de 6%, por último un alelo 3 con un 0,5% de frecuencia (Márquez, 2012). La colección

presentó 11,20% de heterocigotas, estos resultados indican que esta población es en su gran mayoría homocigota, con una alta pureza genética con poca introgresión de alelos forasteros. Estos resultados podrían coincidir con lo establecido por Márquez (2012) donde se estaría en la presencia de una población de criollos antiguos.

Para la región occidental del país, se obtuvo en promedio 2 alelos/locus con un PIC 0,139 y un porcentaje de heterocigotas de 13,03%, los datos guardan relación con los genotipos definidos por Motamayor *et al.* (2008) como el grupo de los Criollos distribuidos por América central y el grupo genético denominado “Cacao Nacional de Ecuador”.

Existe la excepción de la colección “Santa Bárbara” donde se reportó un promedio de 2 alelo/locus y un 93% de heterocigotas (Polo, 2009).

2.2.4. Caracterización Molecular de la Región Oriental del País.

En la región oriental se presenta el banco de germoplasma de Irapa, Estado Sucre, se procesaron 22 materiales utilizando tan solo 7 microsatelites, donde se pudo obtener 3,4 alelos/locus para toda la colección, los microsatélites mTc 190 y mTc 184 fueron los que aportaron mayor información de la población con la presencia de hasta 5 alelos/locus. Esta riqueza alélica es corroborada al presentar un PIC de 0,524 y un 38,80% de heterocigotas. Estos resultados se relacionan con los obtenidos por Sereno *et al.* (2006) para la población bajo amazónica del Brasil.

Continuando con la región oriental, se procesaron 8 muestras procedentes de la isla de Margarita (Estado Nueva Esparta) aplicándose 14 microsatelites, donde se obtuvo un promedio de 2,4 alelos/locus con un PIC de 0,495 y 52,41% de heterocigotas. Con base en estos resultados los genotipos de la isla de Margarita guardan mucha relación con los trinitarios ancestrales, originarios del programa de mejoramiento genético hecho por Pound (1939-1945) en búsqueda de resistencia a escoba de bruja, creando los Híbridos Seleccionados de Trinitarios (TSH) (Jhonson *et al.* 2009). Además esta población trinitaria a través de procesos de introducción de criollos venezolanos en búsqueda de calidad y subsecuentes selecciones, originaron que estos

materiales presenten genealogía común con los criollos venezolanos. Sin hacer mucha inferencia por la poca cantidad de genotipos evaluados, se puede relacionar estos materiales con los trinitarios ancestrales (Jhonson *et al.* 2009).

Los resultados de la región oriental arrojaron un promedio de 2,9 alelo/locus con un PIC de 0,495 y un 45,60% de heterocigotas. Esto indica una alta variabilidad de genotipos.

2.2.5. Selección de genotipos de cacao (*Theobroma cacao* L.) representativos de la diversidad genética resguardada en cada banco de germoplasma, con base en la caracterización molecular por microsatélites.

Aplicando lo establecido por Yonezawa *et al.* (1995) se procedió a seleccionar los genotipos representativos de cada colección con base a sus datos moleculares. Se realizó un análisis de agrupamiento UPGMA utilizando el índice de similitud de DICE para cada colección, también un gráfico de distribución de los genotipos a partir de un análisis de correspondencia para ayudar a la selección de los mismos (ANEXOS). La selección se realizó escogiendo los genotipos de los grupos emparentados observados en las gráficas del análisis de UPGMA y del análisis de correspondencia.

En el Cuadro 31 se presentan los genotipos por banco de germoplasma. Para la colección 1945 se formaron tres grupos y dos genotipos únicos, donde se escogieron 9 genotipos. Para la colección 1995 se formaron 5 grupos con 2 genotipos únicos, se seleccionaron 10 genotipos representativos. En la colección de CORPOZULIA se observaron 9 grupos con 2 genotipos únicos, se seleccionaron 19 genotipos, se observaron muchos genotipos agrupados en un mismo grupo, por lo que se seleccionaron pocos individuos debido a las similitudes genéticas de la mayoría de los genotipos.

Para la colección Barlovento se observaron 5 grupos y un genotipo único, aquí se seleccionaron 8 genotipos representativos. En cuanto a la colección Irapa se formaron 4 grupos y un genotipo único, de los cuales se seleccionaron 8 genotipos. En la colección de San Juan de Lagunillas en Mérida se observaron 7 grupos y un genotipo único, donde se seleccionaron 12 genotipos

representativos. Para la colección de UNESUR se pudo observar en la gráfica de dos grandes grupos los cuales fueron divididos en 5 subgrupos y 3 genotipos únicos, de los cuales se seleccionaron 15 genotipos. En cuanto al Jardín Clonal Padrón se observaron 9 grupos y se seleccionaron 37 genotipos.

Para la colección Margarita se formaron 2 grupos y 2 genotipos únicos, de los cuales se seleccionaron 4 genotipos. Para la colección UNET se formaron 4 grupos y un genotipo único, de ellos se seleccionó un total de 7 genotipos.

Cuadro 31. Genotipos representativos para cada banco de germoplasma de cacao (*Theobroma cacao* L.), a partir de datos moleculares.

Colecciones	Grupos Formados	Genotipos por Grupo	Genotipos Seleccionados
1945	1	2	CHO-94
	2	3	OC-77
	3	Único	CHU-120
	4	Único	CHO-41
	5	12	CHO-174, OC-67, CHU-130, OC-61, OC-60
1995	1	Único	SA-8
	2	Único	AT-5
	3	3	PAS-4
	4	2	SCLV-6
	5	8	TA-1, CP-8
	6	4	AT-1, CATA-16
	7	7	LV-12, CATA-8
Corpozulia	1	Único	UMQ-03
	2	3	LOB-03
	3	Único	UMQ-02
	4	5	SSN-04
	5	3	LOB-17
	6	2	CPZ-007
	7	2	CPZ-003
	8	9	CPZ-040
	9	20	CPZ-062
	10	12	CPZ-004, CPZ-037
	11	48	CHA-005, SP-10, CPZ-006, CPZ-033, RNACHVIVA, KM41, HP24
Barlovento	1	Único	LEG-4
	2	3	SC-10
	3	5	MM-177, MCC-4
	4	3	CUIRA-33
	5	3	SC-12
	6	4	PROV-63, CUMBO-177
Irapa	1	Único	Oriente-16
	2	3	Rio seco-102
	3	5	Matacongo-102, P.alta-103
	4	8	Santa.Isa-101, P.alta-101, Marabal-101
	5	5	Chagu-101, Puchery-101
Mérida	1	2	SJU-04
	2	9	SJU-16
	3	2	SJU-11
	4	4	SJU-09, BEN-21
	5	Único	SJU-15
	6	18	SJU-03, SJU-06, BEN-21
	7	8	BEN-23, BOC-15, BOC-01
UNESUR	1	Único	SB-263
	2	Único	SB-30
	3	15	SB-111, SB-391
	4	8	SB-511, SB-392
	5	3	SB-319
	6	5	POR-274
	7	7	POR-457
	8	Único	POR-175
	9	6	POR-244, POR-183
	10	8	POR-497, POR-216, POR-310
Jardín Clonal Padrón	1	2	CPGA-22
	2	2	ASM-8
	3	11	CPGA-14, CPGA-9, LMP-13
	4	19	PSB-32, QMA-14, PSB-33
	5	7	CHG-1, CPF-5
	6	2	CPGA-8
	7	65	PSB-5, YEC-9, ASM-13, CPR-2, LBS-9, MFN-1, ASM-2
	8	28	SRLIA-5, CPR-13, CLV-1, SRLIA-3
Margarita	1	2	MPR-6
	2	Único	MPR-9
	3	4	MPR-13
	4	Único	MPR-1
UNET	1	9	6-8-45
	2	13	3-8-20, 4-1-10
	3	10	4-5-2
	4	Único	2-7-10
	5	11	3-10-49, 1-4-15

2.2.6. Estudio de Agrupamiento de los genotipos de cacao (*Theobroma cacao* L.) representativos de la diversidad genética de cada banco de germoplasma, a partir de datos moleculares.

Para este análisis se utilizaron los datos moleculares de los genotipos antes seleccionados por cada banco de germoplasma; así mismo se emplearon para este estudio los datos moleculares de los genotipos referenciales que representan los distintos grupos morfogeográficos propuestos en estudios internacionales de diversidad genética en cacao (Motamayor *et al.*, 2002). Para este análisis se utilizaron como referenciales criollos al genotipo CHIAPAS originario de México, el cual es un referencial denominado como criollo antiguo por Motamayor (2012), seguidamente se empleó el genotipo Benavides (BEN-02) por su alta homocigosis en los marcadores utilizados en esta investigación (Márquez, 2012).

En cuanto a los referenciales alto amazónicos fueron empleados los individuos SCA-6 y P-12, como referenciales bajo amazónicos los individuos C-1 y SIAL-407, a su vez, los para los trinitarios fueron utilizados el genotipos TSH-1075 y ICS-60 (Motamayor *et al.*, 2002). Estos árboles están presentes en las colecciones nacionales, de manera que se tuvo acceso a tales materiales para su análisis molecular. Se consideró importante incorporar en el análisis dos genotipos ampliamente utilizados en programas de multiplicación de germoplasma a nivel nacional, uno de ellos es el genotipo CHO-42 de la colección 1945, ampliamente utilizado en las zonas productoras del país, y el clon IMC-67 utilizado en programas de cruzamiento para generar patrones empleados para la injertación de materiales.

De esta manera se procedió a realizar el análisis UPGMA basado en la distancia de DICE: Tal como se muestra en el dendrograma obtenido (Figura 5), a una distancia de similitud de DICE de 0,19 se realiza una separación marcada de los 2 genotipos referenciales alto amazónicos, con base a este resultado podemos indicar la poca relación genética que guardan los genotipos nacionales con los genotipos de las cuencas altas del río Amazonas. Continuando con la diferenciación molecular de los genotipos en estudio a una distancia de 0,43 se diferencian los genotipos CPGA-22, IMC-67 (referencial

del interés), ASM-2 y ASM-8 del resto de los genotipos en estudio, cabe destacar que estos genotipos que son todos pertenecientes a la colección del Jardín de Padrón (JCP) guardan relación genética con el genotipo IMC-67, referencial originario del alto Amazonas (Motamayor *et al.*, 2008). Seguidamente a una distancia de 0,47 se separan dos genotipos con respecto a los demás individuos, estos son Oriente-16 (colección Irapa) y UMQ-03 (JCP), los mismos son idénticos genéticamente.

Continuando con la descripción de las similitudes genéticas que guardan los genotipos nacionales, podemos mencionar que a una distancia de 0,53 se diferencian dos grandes grupos de genotipos, un grupo que contempla a los referenciales criollos y la gran mayoría de genotipos pertenecientes a la región occidental del país, lo cual comprueba la teoría que establece que el resguardo y la multiplicación de materiales criollos se concentra a la región occidental del país, específicamente los estados Mérida, Táchira y la región del Sur del lago de Maracaibo (Zulia) (Ramos *et al.*, 2004). A su vez, el otro grupo observado a esta distancia de similitud agrupa a los genotipos relacionados con los referenciales amelonados bajo amazónicos y trinitarios.

Para una mejor diferenciación de este grupo diverso, el cual es distinto a los criollos, podemos observar que a una distancia de 0,58 se diferencian 4 genotipos del resto, ellos son Playa alta-103, Puchery-101 (ambos de la colección Irapa) y los genotipos 2-7-10 y 4-5-2 de la colección de la UNET. Cabe destacar que los materiales de la UNET son definidos por Márquez (2012) como materiales híbridos no concordantes con la mayoría de los genotipos representativos de la colección "La Morusca", estado Táchira. Luego ya a una distancia de 0,62 se subdividen dos grupos, uno de esos grupos está conformado por los referenciales amelonados y los genotipos MPR-13 y MPR-1 originarios de Margarita, también los genotipos Matocongo-102 y MCC-4 ambos idénticos genéticamente. Este otro gran grupo se puede desglosar a una distancia de 0,63 donde se observan genotipos de la colección 1945, 1995, Barlovento y parte del JCP relacionados con los referenciales trinitarios, a su vez, se observa un grupo que no guarda relación genética alguna con un referencial en particular, y cabe resaltar que este grupo está conformado en su

mayoría por materiales del JCP. Este grupo en particular se ha caracterizado por observarse una gran cantidad de alelos y en distintas combinaciones, lo cual lo hace un grupo único y variable donde converge un pool de genes aún no descrito. Por ello esta investigación plantea un análisis más exhaustivo a nivel molecular para poder diferenciar las distintas poblaciones de cacao en el país. Con este resultado se buscó avanzar un paso más en la búsqueda de la definición de las poblaciones morfogeográficas existentes en el país, por cuanto se emplearon los estudios basados en estadística bayesiana con el fin de observar relaciones genéticas entre poblaciones.

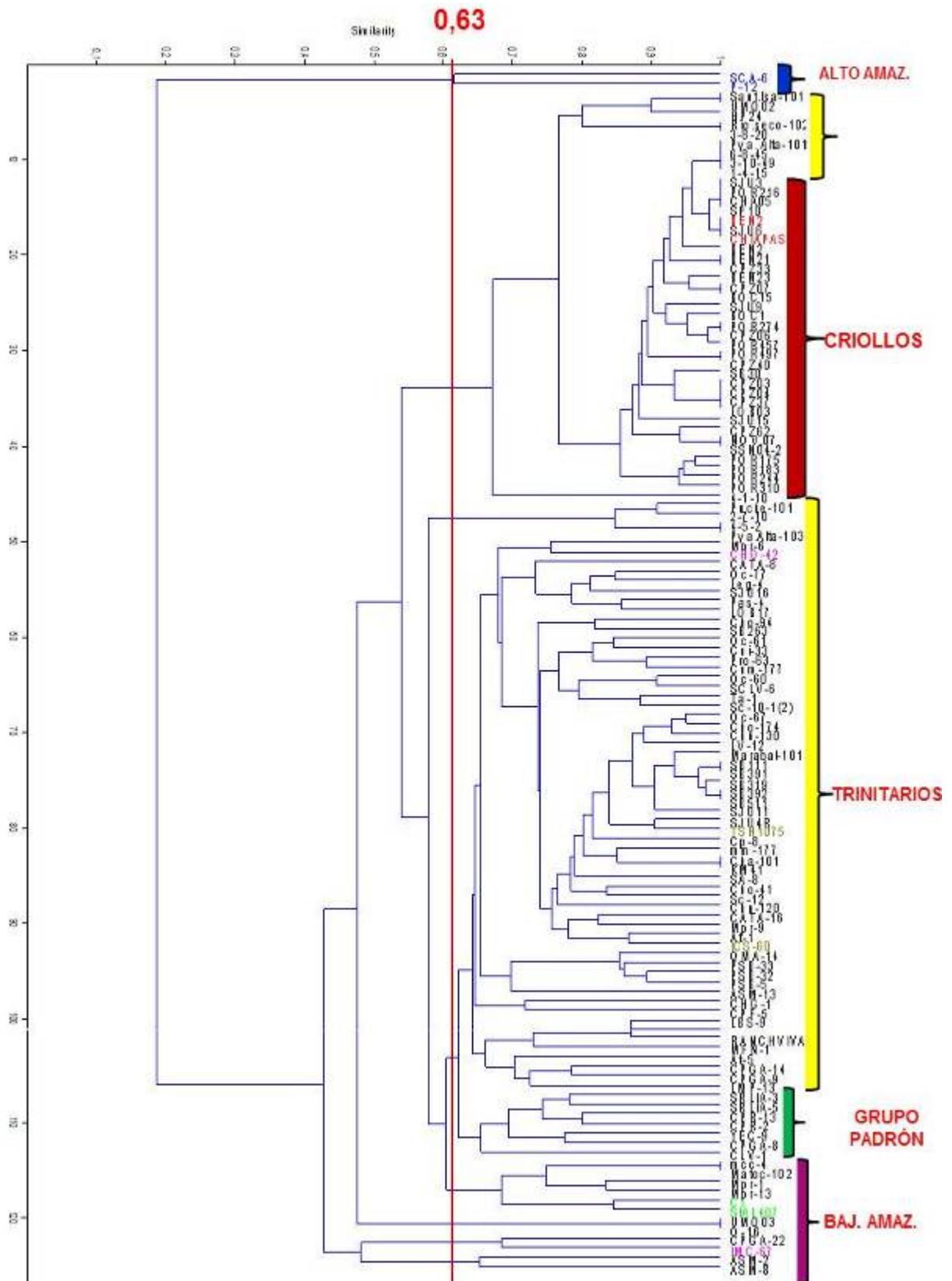


Figura. 5. Dendrograma (UPGMA) a partir de los datos moleculares de 115 genotipos seleccionados y 10 referencias internacionales de cacao (*Theobroma cacao* L.), utilizando el coeficiente de similitud de DICE.

2.2.7. Estructura genética poblacional de las colecciones de cacao en Venezuela, mediante el análisis molecular por microsatélites.

Con la finalidad de profundizar en el conocimiento de la diversidad genética y las relaciones entre los individuos y las poblaciones de cacao nacional, se decidió realizar un método bayesiano. El método de análisis basado en el modelo Bayesiano asume que cada genotipo de cacao en la amplia muestra puede resultar de la mezcla de un desconocido número de poblaciones ancestrales diferenciadas, representados por las accesiones referenciales, con coeficientes de aporte que totalizan el valor de 1.

Las poblaciones ancestrales pudieran estar predeterminadas por el investigador (Efmognagn *et al.*, 2008), o se pueden conformar los sobre la base de la probabilidad de la asignación de aportes. El programa Structure estima la proporción del genoma que cada individuo tiene de cada subgrupo ancestral y aplica *a posteriori* la probabilidad de los datos ($Pr X/K$) donde X representa el dato seleccionado para este estudio (Efmognagn *et al.*, 2008). En este sentido este método asume que cada genotipo de cacao puede resultar de la mezcla de un número de desconocido grupo ancestral diferenciado.

El primer paso en el presente estudio fue definir el número de grupos o poblaciones ancestrales que mejor explicarían la diversidad observada. Para ello, se implementó la metodología propuesta por Evanno *et al.* (2005), la cual consiste en calcular para las 10 poblaciones asumidas y sus 10 repeticiones, su diferencial poblacional (Delta K) que consiste en la probabilidad de distribución real de dos poblaciones ($K1-K2$) con respecto a la desviación estándar de la población ($K2$). Con estos resultados se obtuvo la Figura 6 que expresa la distribución de Delta K como indicativo de aporte de información con respecto a las 10 poblaciones asumidas en este estudio. En la misma se observa que los valores de Delta K que mayor información aportaron fueron las poblaciones K2, K3 y K5.

Ya con los resultados obtenidos por el programa STRUCTURE, se procedió a seleccionar la estructura poblacional que mayor información aportaba con respecto a los individuos y referenciales representativos empleados en el actual estudio.

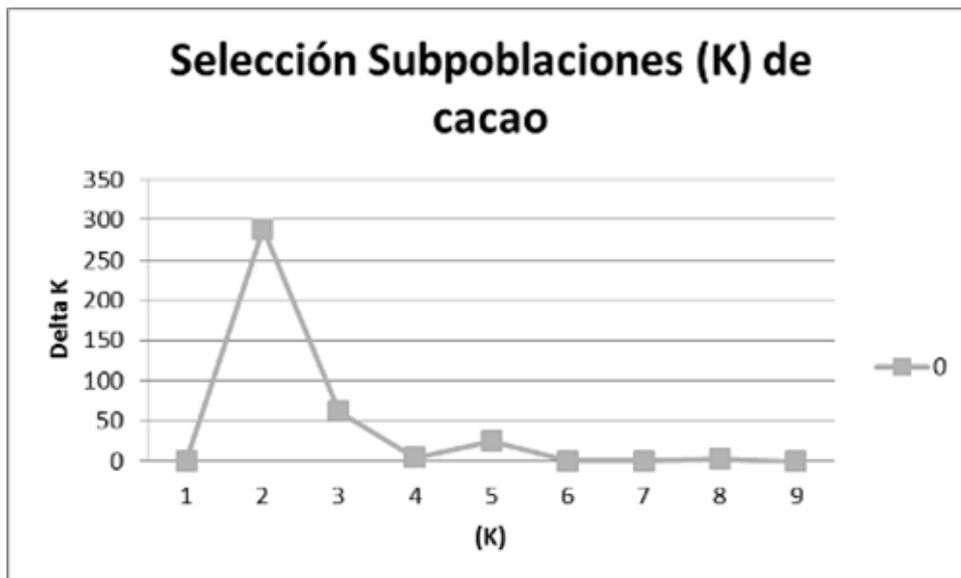


Figura 6. Distribución de los valores de probabilidad Delta K para los conformación desde 1 hasta 10 poblaciones ancestrales, para 115 genotipos de cacao (*Theobroma cacao* L.) representativos de la diversidad genética conservada en 11 bancos de germoplasma a nivel nacional.

En la figura 7 se observa la contribución de cada grupo para cada genotipo, en ella se observa la proporción del genoma con respecto a los referenciales morfogeográficos. Para K2 se asumen dos grupos genéticamente distintos, donde se aprecian los materiales criollos y un gran grupo con características genéticas distintas. Siguiendo con la interpretación de la figura, al enfocarnos en K3 podemos observar una diferenciación de ese grupo distinto a los criollos, donde ocurre una subdivisión en dos grupos genéticos dentro de ese gran grupo que pudiera definirse como el ancestro forastero. Sin embargo la interpretación de la estructura poblacional de K3 no complementa la información observada en los estudios genéticos previos (Motamayor *et al.*, 2003); para K=3 se logran separar los genotipos considerados criollos, los trinitarios y los forasteros, pero no logra separar los alto y bajo amazónicos. Un K=4, el cual define la estructura poblacional conformada por 4 grandes grupos genéticos, no aportó información alguna.

De esta manera, se consideró la información aportada por el clúster K5, la cual conforma la diferenciación de 5 grandes grupos genéticos, el análisis de estructura poblacional tomó como información a priori lo establecido por Motamayor *et al.* (2003) quien definió 4 grandes grupos genéticos (Criollos,

Trinitarios, Bajo Amazónicos y Alto Amazónicos) primordiales a la estructuración poblacional de la especie.

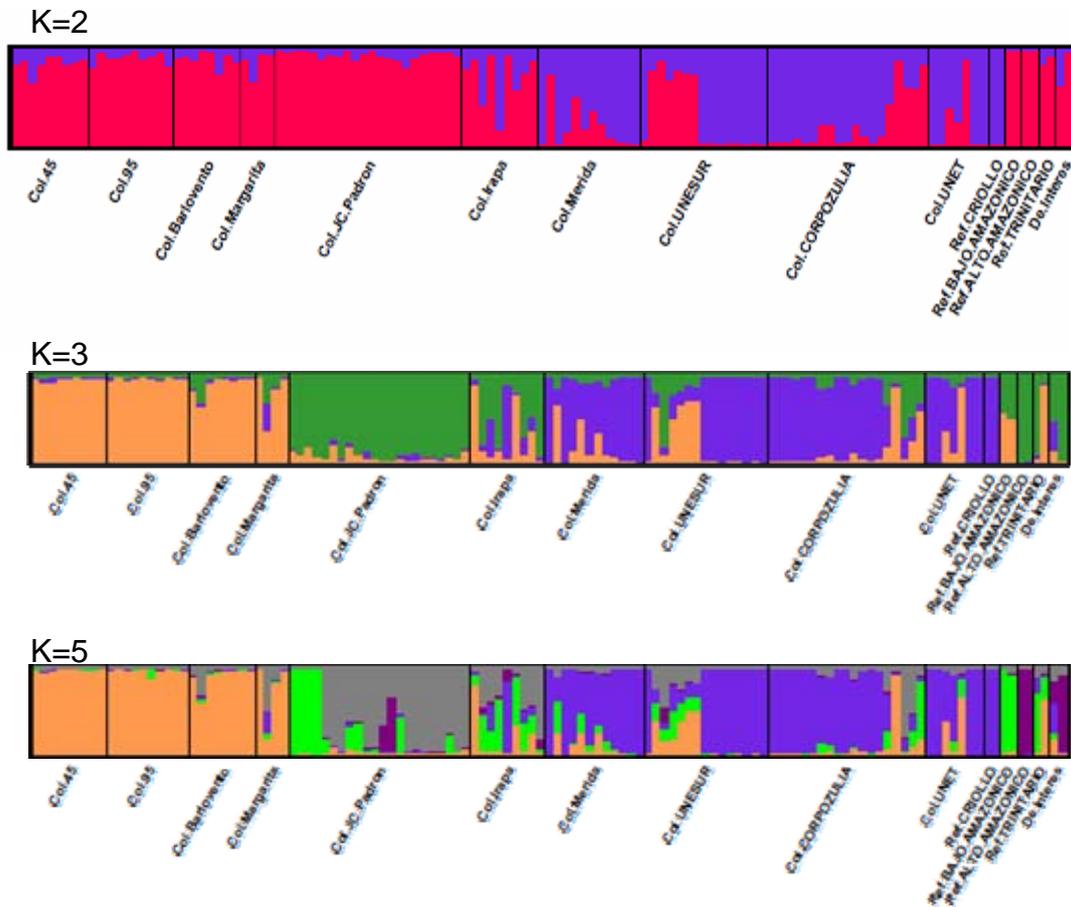


Figura 7. Grupos inferidos para 10 colecciones de cacao nacional (*Theobroma cacao* L.) usando el Programa STRUCTURE, considerando dos, tres o cinco poblaciones ancestrales (K).

Definido así el número de poblaciones ancestrales a considerar, se procedió a caracterizar los genotipos seleccionados como referenciales con base en el trabajo de Motamayor *et al.* (2008). Tal como se observa en mayor detalle en la Figura 8, los referenciales criollo (BEN-2 y CHIAPAS) se identifican con barras color azul; los referenciales cacao amelonado bajo amazónico (C1 y SIAL 407) con color verde; los alto amazónico (SCA-6 y P-12) con color morado y, los

trinitarios (TSH1075 e ICS60) con color anaranjado, aunque presentan alguna proporción de colores azul y verde, corroborando lo encontrado por Motamayor *et al.* (2003), quienes señalan el origen del cacao tipo criollo como el cruzamiento entre criollo y un forastero tipo amelonado.

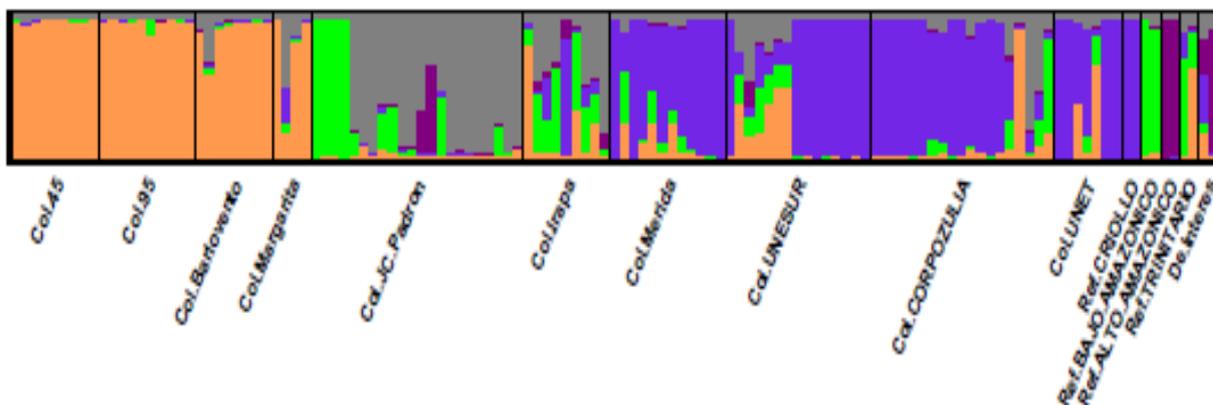


Figura 8. Clúster K5 para 115 genotipos de cacao (*Theobroma cacao* L.) representativos de la diversidad genética resguardada en los bancos de germoplasma nacional, usando el Programa STRUCTURE.

En cuanto a las colecciones de Mérida, UNESUR específicamente los genotipos de la colección Porcelana, los genotipos de la colección de CORPOZULIA y la UNET, son colecciones que presentan en la mayoría de sus individuos un marcado porcentaje de su genoma asociado con el grupo ancestral criollo. Este grupo es claramente divergente de los materiales forasteros representados por los referenciales SCA-6 y P-12, donde se puede destacar que la presencia de este grupo ancestral no es muy marcada en las colecciones venezolanas, resaltando su presencia en las regiones productoras de Barlovento y hacia el oriente del país específicamente el estado Sucre. Debido a la incorporación de estos materiales en programas de investigación a partir de los años 70 en la región centro-oriental llevada por el INIA (INIA-2006).

En cuanto a las colecciones 1945, 1995, Barlovento y Margarita se encuentran diferenciadas con predominancia del color naranja, los cuales representan una divergencia genética distinta a la establecida con respecto a los ancestros criollos y forasteros, dichos materiales se encuentran caracterizados en su

mayoría con referenciales trinitarios, las zonas productoras de Aragua, Miranda y Nueva Esparta se reporta la presencia de materiales criollos a principio del siglo XVII y ya para el año 1825 comienza la introducción de semillas de tipo trinitarios, iniciándose entonces un progresivo proceso de hibridación natural (Rodríguez,1992). Este proceso de hibridación pudo dar paso a la conformación temprana de un grupo genético relacionado con los materiales trinitarios, dicho proceso es corroborado por la establecido por Motamayor *et al.* (2003), quienes aplicando un análisis de coordenadas principales, observó la distribución de genotipos entre los referenciales criollos y amelonados en posiciones extremadas, estos genotipos distribuidos son definidos como genotipos de tipo trinitarios por contener combinaciones alélicas asociadas a los referenciales criollos y amelonados. En las colecciones 1945, 1995, Barlovento y Margarita se presentan genotipos con porcentajes alto del genoma asociado con este grupo trinitario, que tiene divergencia genética marcada con respectos a los ancestros criollos y amelonados de quien se establece el origen de los trinitarios.

Se realizó especial énfasis en la colección Padrón donde se observa un marcado grupo representado por el color gris, dicho grupo no guarda relación alguna con los referenciales establecidos a nivel internacional. Es de destacar que para esta colección se presentan genotipos con genomas completos asociados a este grupo en particular, es de notar que la colección Jardín Clonal Padrón fue una iniciativa impulsada por el INIA-Miranda en el año 1998 con el fin de evitar la erosión genética del cacao en la zona.

Para ello se procedió a contactar productores de cacao de las distintas áreas cacaoteras en la región que manejasen la suficiente información de su unidad de producción como para señalar aquellas plantas que de acuerdo a su criterio presentasen las características más favorables dentro de su plantación, y con disposición a colaborar en el proyecto. Estas plantas fueron marcadas por los mismos productores con etiquetas de plástico y fueron posteriormente visitadas, elaborándose un registro detallado incluyendo el nombre de la finca y el sector en que estaba ubicada. Igualmente, se marcaron otras plantas que el productor no había tomado en cuenta pero que se presumía podían presentar

características interesantes (Jiménez, 2006). La colección anterior denominada de Barlovento de la década de los '50, corresponde a una pequeña muestra de la localidad con 20 clones, de las zonas con mayor influencia de la Estación Experimental *Padrón* del actual INIA-Miranda.

Dicha colección *Padrón* no presenta relación alguna con los grupos ancestrales criollos, forasteros y sus condiciones híbridas llámese trinitario. Este resultado presenta relación con la reexaminación de la clasificación del cacao llevado a cabo por Figueira *et al.* (1994) usando marcadores moleculares, los cuales establecieron los cuatro grupos establecidos y un quinto grupo sin relación evidente a los grupos ya definidos. Este resultado concuerda con lo concluido por Jiménez (2006) quien evidenció que el grueso de los genotipos que conforman la colección *Padrón* no concuerda con referenciales trinitarios y alto amazónicos, dicha conclusión necesitaba en ese momento ser sustentada por la incorporación de un referencial criollo; sin embargo, se pudo evidenciar la condición genética única de la colección, la cual es una muestra representativa de las zonas productoras de Barlovento.

Un análisis similar se realizó en las zonas productoras de cacao en Camerún. Las introducciones de cacao en este país se remontan al año 1892 con la entrada de materiales tipo amelonados por los españoles, luego comienza la introducción de materiales tipo trinitarios provenientes de trinidad y Centro América, ya para los años 50 y 60 se realiza la incorporación de materiales alto amazónicos con el objetivo de establecer jardines de semillas con el fin de obtener materiales híbridos con alto rendimiento y precocidad. En ese contexto Efombagn, *et al.* (2008) realizaron un análisis de estructura poblacional con árboles representativos de las zonas productoras de Camerún y con genotipos representativos de los bancos de germoplasma de Camerún. En este estudio se aplicaron modelos bayesianos para identificar las relaciones genéticas entre los genotipos resguardados en los bancos de germoplasma y los apostados en zonas productoras, la probabilidad *a priori* guardó mucha relación con este trabajo, ya que se tomaron referenciales amelonados, alto amazónicos, criollos y trinitarios. La proporción del genoma de cada individuo analizado (probabilidad posterior) guarda una alta relación con los referenciales tipo

amelonado, lo cual corrobora el origen del germoplasma de las zonas productoras de Camerún (Efombagn, *et al.*, 2008).

En este estudio se observó que los genotipos de los bancos de germoplasma presentaban 48% de su genoma asociado con los referenciales tipo amelonados, 24% a los referenciales alto amazónicos, 14% a los criollos y otro 14% asociado a un grupo no identificado (Efombagn *et al.*, 2008). Este resultado comprueba la presencia de fuente de germoplasma distinto a los grupos morfogeográficos definidos.

Martínez (2007) estudiando el origen del Cacao Nacional Boliviano (CNB) comparó tales cacaos cultivados con los silvestres de las riberas del Rio Beni, dividiéndolos en dos grupos; alto y bajo Beni. Utilizando como herramienta marcadores tipo microsatélites, la autora encontró el cacao silvestre boliviano es molecularmente diferente a los grupos genéticos forasteros y trinitarios estudiados; con lo que se conforma un acervo genético nuevo dentro de los cacaos forasteros.

Resultados similares fueron hallados en la Amazonía Peruana por Zhang *et al.* (2006), quienes con el uso de marcadores tipo microsatélites encontraron alta diversidad genética con patrones de distribución espacial y temporal, indicando la influencia de las introducción de materiales mejorados genéticamente que cambiaron tales patrones genéticos, de ahí mencionan la necesidad de ampliar las colectas y caracterización de los cacao silvestre y semi-domesticados, así como políticas de conservación.

Finalmente, Motamayor *et al.* (2008) realizando un estudio de las poblaciones de cacao para centro y sur américa, encontraron la mayor diversidad para la región del alto amazonas, donde propone la conformación de nuevo grupos en al amazonas, con una distribución espacial alrededor de distintos ríos.

En el caso de la colección Padrón, la colecta realizada por Girón y Castillo (2002), correspondió a las zonas de producción como se aprecia en la Figura 9. En las zonas de colecta corresponden a bosque húmedo tropical, de la cuenca del rio Tuy, lo que pudiera dar origen a un grupo genético nuevo y diferente a los referenciales utilizados en el presente estudio.

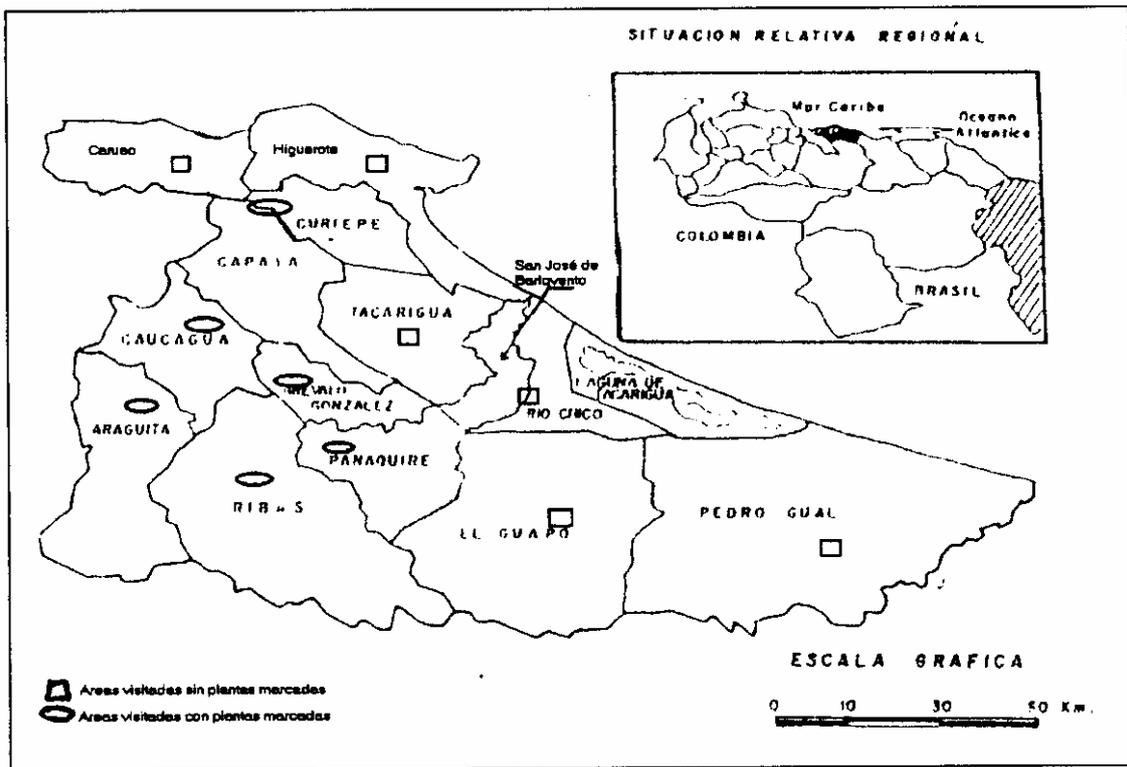


Figura 9. Zonas de colecta de la colección Jardín Clonal Padrón (Fuente: Girón y Castillo 2002)

En cuanto a la colección Irapa se observa una gran variabilidad dentro de sus genotipos, es la colección que presenta composiciones genéticas de todos los grupos genéticos, en la región Oriental previo a la colonización existía cacao, posiblemente introducido por los indígenas en sus viajes por el caribe desde las plantaciones en el sur de lago de Maracaibo. Luego con el establecimiento de fincas por los españoles se introdujeron cacaos criollos en esta zona (Rio Caribe y Carúpano), simultáneamente se hacía en los valles de Aragua (Chuo) y Trinidad (para aquel entonces posesión española) todo en el siglo XVII. Hacia 1830 se introduce el cacao “Forastero” por Paria, según José Vicente Franchesci (comunicación personal) por información escrita de sus antecesores “El cacao, principal producto de este departamento era antiguamente exclusivamente de Criollo, pero el General Arismendi introdujo semillas llamadas Forastero y Calabacitas, que se injertó con el criollo desmejorando la calidad de los criollos nativos” (Jiménez, 1997). A partir de allí comienza un proceso de recombinación de genotipos que originó un pool de

genes hasta ahora corroborado, porque a través de los años muchos investigadores y productores habrían expresado el potencial genético de la zona. Es de resaltar que esta colección presenta pocos genotipos evaluados, así como pocos marcadores moleculares aplicados para esta colección, lo cual limitó la exposición completa del potencial genético en cuanto a la variabilidad existente en esta región del país. Por ello se recomienda establecer investigaciones de este tipo enfocadas en esta región de mucha importancia para el rubro.

El estudio de la estructura poblacional donde se seleccionan a priori los grupos ancestrales, es posible cuantificar la proporción del genoma de cada grupo que poseen los individuos y las distintas colecciones. Así, en el cuadro 31 se presentan las distintas proporciones de cada grupo ancestral que caracteriza a cada colección.

En tal cuadro se observa como la colección 1945 presenta un 96,3% de su genoma asociado al grupo ancestral trinitario, para la colección 1995 se obtuvo un 96% y en Barlovento un 89,3% del genoma asociado con el grupo trinitario. Estos resultados comprueban la composición genética asociada al cacao criollo ya establecido en la región central antes de los españoles, y su sucesiva recombinación con la introducción de híbridos trinitarios producidos en la isla de Trinidad después de la devastación de las plantaciones de criollo en el año 1727 (Jiménez, 1997). Similar composición se observa en Margarita, estos genotipos conforman un 73,3% asociada al grupo trinitario, también esta colección presenta un 16,1% de su genoma asociado al grupo indeterminado, al cual a partir de esta discusión definiremos como el “Grupo Genético Tuy”, debido a que los genotipos que representan este grupo genético se encuentran distribuidos de forma geográfica a la cuenca del río Tuy en la región de Barlovento, estado Miranda. Cabe resaltar que se analizaron pocos genotipos de la colección Margarita, y su estudio se enfocó solo en datos moleculares. Para esta colección se hace necesario ampliar el número de genotipos y realizar descripciones morfológicas.

Cuadro Nº 32. Proporción genética (Probabilidad posterior) de las colecciones nacionales con respecto a los referenciales morfogeográficos calculadas con el programa STRUCTURE.

Colecciones Nacionales	Referenciales Morfogeográficos					Total
	Tuy	Trinitario	Alto Amazónico	Criollo	Bajo amazónico	
	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5	
Colección 45	0,010	0,963	0,004	0,011	0,012	1
Colección 95	0,009	0,960	0,005	0,007	0,019	1
BARLOVENTO	0,060	0,893	0,010	0,013	0,024	1
MARGARITA	0,161	0,733	0,008	0,065	0,036	1
JC PADRÓN	0,671	0,020	0,049	0,013	0,247	1
IRAPA	0,332	0,178	0,049	0,163	0,277	1
MÉRIDA	0,031	0,081	0,005	0,805	0,079	1
UNESUR (Santa Bárbara)	0,208	0,307	0,035	0,281	0,169	1
UNESUR (Porcelana)	0,005	0,005	0,003	0,984	0,003	1
CORPOZULIA 1	0,035	0,018	0,010	0,911	0,027	1
CORPOZULIA 2	0,221	0,163	0,018	0,455	0,142	1
UNET	0,025	0,159	0,006	0,764	0,046	1

En cuanto a la colección Jardín Clonal Padrón se observa un alto porcentaje de genoma de los individuos de la colección asociados con el grupo ancestral Tuy (67,1%), también se observa un 24,7% de genoma asociado con los referenciales bajo amazónicos (amelonados). Estos resultados corroboran lo propuesto por Jiménez (2006) quien expone una variabilidad genética distinta a los referenciales empleados en su estudio, en donde se utilizaron SCA-6, P-12 (alto amazónicos), SC-10 (trinitario) y MPR-8 (referencial Margarita). En esta colección JC Padrón, se observa la introgresión del grupo ancestral bajo amazónico en las zonas productoras del estado Miranda, esto posiblemente por la introducción de materiales trinitarios que poseen caracteres genéticos asociados a este grupo, ya para los años 1825 (González, 2008).

En la colección Irapa se puede observar un 16,3% de genoma asociado con los criollos, 27,7% asociado con los amelonados, un 17,8% asociado con los trinitarios, pero su mayor porcentaje se asocia al grupo Tuy con 33,2%. Es de resaltar que esta colección presenta una gran variabilidad de genotipos asociados con 4 grandes grupos, a excepción del grupo ancestral alto amazónico el cual solo cuenta con un 0,49%.

En cuanto a la región occidental se pudo corroborar el marcado establecimiento de los genotipos criollos, en la colección de San Juan de Lagunillas (Mérida) se obtuvo un 80,5% del genoma asociado con el ancestro criollo, también la colección de la UNESUR específicamente la colección de “Cacao tipo Porcelana” se obtuvo un 98,4%, para la colección original de CORPOZULIA se observó un 91,1% del genoma de los genotipos asociado al grupo criollo.

Dentro de las colecciones evaluadas en la región occidental se observaron particularidades distintas a la predominancia de genotipos criollos, dentro de esas excepciones se encuentra la colección Santa Bárbara resguardada en el campo experimental de la UNESUR, donde se encuentran genotipos híbridos que están muy relacionados en cuanto a estructura genética con los materiales de la colección de Irapa. Estos individuos presentan proporciones genéticas asociadas con el grupo Padrón de 20,8%, para el grupo trinitario 30,7%, para el grupo criollo 28,1% y 16,9% referente a los bajo amazónicos. Esta condición híbrida y diversa de los genotipos de esta colección es atípica en esta región, estas plantas son a partir de semillas de mazorcas colectadas en la ribera del río Chama, por ello el origen de esta colección no está bien definido.

En cuanto a la colección CORPOZULIA 2, que está compuesta por genotipos muestreados de reciente data, se puede observar un 45,5% del genoma asociado con los criollos, 22,1% asociado con el grupo Tuy, 16,3% comprendido con los trinitarios y 14,2% asociado a los bajo amazónicos. Estas nuevas colectas reflejan que la región occidental también presenta una variabilidad genética distinta al grupo genético criollo, la cual debe ser estudiada a fondo.

En la colección de la UNET la tendencia de los genotipos de la zona se asocia con el grupo criollo (76,4%), pero es de mucha importancia tomar en cuenta un porcentaje considerable asociado con el grupo trinitario (15,6%), lo cual evidencia una introgresión genética distinta que pudiera ser explotada en futuros programas de mejoramiento.

A partir de las proporciones genóticas (Probabilidad posterior) del sugrupo K5, donde se asumen 5 grandes grupos morfogeográficos de cacao, se elaboró un árbol Neighbor joining (Figura 10) donde se puede concluir que el grupo ancestral criollo es un grupo divergente a los materiales denominados forasteros, este grupo ancestral criollo de divergencia temprana se encuentra representado por las colecciones (Mérida, UNESUR (Porcelana), CORPOZULIA 1 y UNET). Luego se observa en la otra rama del árbol como ocurre una subdivisión, donde se separa el grupo ancestral denominado Trinitario compuesto en su mayoría por las colecciones 1945, 1995, Barlovento y Margarita. Estos materiales no presentan rasgos genéticos asociados con los demás grupos morfogeográficos. Continuando con la descripción del árbol ocurre una segunda subdivisión donde se define un grupo distinto a los 4 grupos previamente definidos, este grupo ancestral está compuesto en su totalidad por los genotipos de la colección Jardín Clonal Padrón, englobados en el grupo genético Tuy, materiales que presentan composiciones alélicas distintas y diversas a las composiciones alélicas comprendidas por los referenciales alto amazónicos y bajo amazónicas, asociadas en una misma rama genealógica.

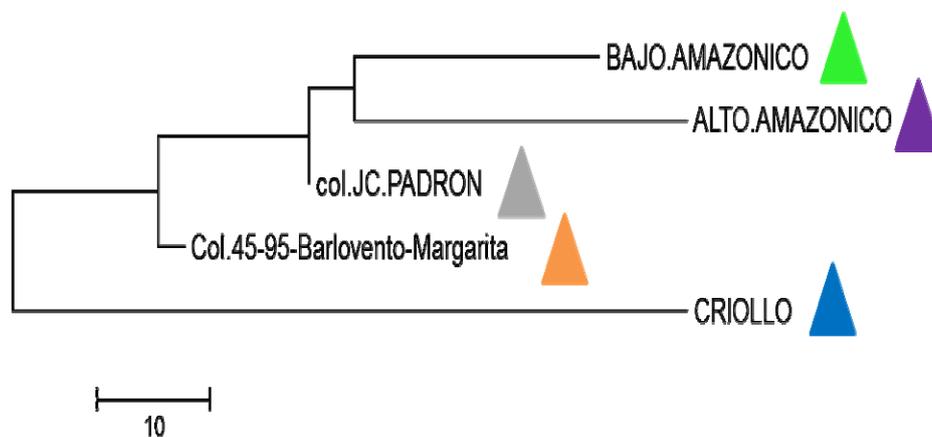


Figura 10. Árbol Neighbor joining a partir de proporciones genéticas (probabilidad posterior) de referenciales morfogeográficos calculado con el Programa STRUCTURE.

Finalmente, se evidencia la separación del grupo bajo y alto amazónico, siendo este último el más ancestral. Este resultado coincide con los encontrados en Bolivia (Martínez, 2007) y Perú (Zhang *et al.*, 2006), donde la región del alto amazonas conserva la mayor diversidad.

3. ESTRATEGIAS PARA LA FORMACIÓN DE POBLACIONES BÁSICAS Y CRITERIOS DE SELECCIÓN PARA LOS PROGRAMAS DE MEJORAMIENTO GENÉTICO.

Ante las perspectivas del incremento de la demanda de cacao a nivel mundial, se presentan grandes oportunidades y retos para Venezuela, país reconocido por su producción cacaotera de alta calidad. A fin de aprovechar las oportunidades presentes y futuras se requiere de un programa nacional de mejora de la producción que debe comprender distintos aspectos, por un lado el incremento de la superficie de siembra, unas mejores condiciones socio-económicas para los productores bien formados para el manejo sustentable de las siembras y, árboles de potencial genético nuevo y mejor.

En ese último punto se requiere de un programa nacional de mejoramiento genético para el desarrollo de esos nuevos genotipos más rendidores y de alta calidad, estableciendo en cuanto a calidad dos tipos de mercado, uno de cacao fino de aroma que, aunque de menor demanda, obtiene mejores precios, y otro tipo de cacao de calidad pero dirigido a las grandes agroindustrias del chocolate que no precisan de un cacao fino de aroma pero si de grandes cantidades de producto. Para ambos mercados, Venezuela tiene un gran potencial.

Esta estrategia ya ha sido abordada por otros países, como Ecuador. En este país, el estado, en el año 2013, lanzó El “Plan Nacional de Cacao”, con el objetivo de incrementar la productividad de los pequeños agricultores, y así influenciar positivamente el crecimiento de la producción en los próximos años. Para ello, han aumentado la oferta de variedades resistentes a enfermedades como el CCN-51 o los nuevos clones de cacao NACIONAL del INIAP, incentivando la siembra de miles de nuevas hectáreas de cacao o la rehabilitación de existentes (Granja, 2014).

Dicho eso, un programa de mejoramiento genético debe considerar los siguientes aspectos: Recursos genéticos, criterios de selección bien identificados, tipo de cultivar a desarrollar y finalmente una metodología eficiente y eficaz.

Recursos Genéticos

Los recursos genéticos disponibles para cacao son un elemento esencial para el desarrollo de nuevos y mejores cultivares que reúnan una producción sustentable de cacao unido a una mejor relación costo-beneficio (CacaoNet, 2012).

El estudio realizado en el presente trabajo evidencia las distintas posibilidades de recursos genéticos disponibles. Venezuela posee los principales grupos genéticos como criollos (región occidental), trinitarios (región central), bajo amazónicos (Irapa, Padrón), un grupo sin aparente relación con los otros (Padrón), y germoplasma híbrido (Irapa) que por sí sólo conforma una población que reúne los distintos grupos genéticos, inclusive del genoma de alto amazónico importante en cuanto a genes de resistencia a enfermedades de importancia económica (Efombagn, *et al.*, 2008). Más aún, este estudio permitió identificar árboles puros para tales genomas, que pudieran ser referenciales para los patrones nacionales, tal como se presentan en el cuadro 32. En el mismo se observa la ausencia de clones con un alto porcentaje del grupo alto amazónico, de ahí la importancia de la introducción de este tipo de material realizada al país desde la década de los '60, y que actualmente se encuentra establecido en la estación Padrón del INIA-Miranda, como banco de Germoplasma Internacional (Moreno, 1997)

Sin embargo, a pesar de todos los esfuerzos realizados tanto para el establecimiento de estos bancos de germoplasma, su conservación en el tiempo, su caracterización morfológica y molecular, es indispensable la evaluación de características de interés agronómico, como es la resistencia a plagas, la productividad y, además, la calidad. Tradicionalmente, los bancos de germoplasma caracterizan sus accesiones considerando variables que si bien permite la diferenciación e identificación de genotipos, en la mayoría de los casos son variables con poca importancia para la productividad. Actualmente, se desarrolla para muchos cultivos el denominado premejoramiento genético que pretende facilitar el uso del germoplasma resguardado en bancos de germoplasma; para ello, se dirige hacia la valorización del germoplasma más que a la caracterización (Pritsch, 2001). Tal valorización incluye la evaluación de caracteres de interés agrícola, como producción, resistencia a plagas y, en

el caso particular de cacao, su calidad. Estos aspectos han sido muy poco abordados a nivel nacional por lo que un estudio en este particular debe ser incluido en el muy corto tiempo como un gran esfuerzo nacional. Siendo un trabajo permanente que pudiera realizarse por etapas.

Cuadro 33. Clones recomendados como referenciales puros de los grupos morfogeográficos de cacao (*Theobroma cacao* L.) presentes en el germoplasma nacional.

Colección	Clon	Grupo Morfogeográfico				
		Tuy	Trinitario	Alto Amazónico	Criollo	Bajo amazónico
1945	Oc61	0,006	0,974	0,008	0,006	0,006
	Cho174	0,007	0,971	0,003	0,007	0,012
Padrón	CPGA22	0,961	0,008	0,009	0,008	0,015
	CLV1	0,969	0,01	0,005	0,007	0,009
	QMA14	0,007	0,006	0,003	0,003	0,981
	PSB5	0,005	0,005	0,003	0,004	0,983
Mérida	SJU3	0,003	0,003	0,002	0,99	0,002
	SJU6	0,003	0,003	0,002	0,99	0,002
	BEN2	0,003	0,003	0,002	0,99	0,002

Lopes (2011) menciona que a pesar de la existencia de distintos bancos de germoplasma a nivel mundial con miles de accesiones resguardadas (13000 en Ecuador, 2000 en Brasil, 1150 en el CATIE, Costa Rica, 2300 en para caracteres de interés agronómico. Con un gran impacto CRU, Trinidad, 1300 en CEPEC) la mayoría de ellas han sido poco evaluadas y, en consecuencia, poco aprovechadas en los programas de mejoramiento genético.

Otro punto importante constituye la sistematización de la información como única manera de que esté disponible para los programas de mejoramiento genético. Se requiere una base de datos nacional donde los resultados de todas las caracterización realizadas estén organizadas, esto permitiría identificar vacíos en ese gran catálogo nacional. La información reunida en el presente trabajo constituye la base de un trabajo de esa índole. También debería realizarse en el corto tiempo, pues se detectó la dispersión de mucha información, con el riesgo de perderse; como por ejemplo se desconoce en detalle el pasaporte de la mayoría de las accesiones de los distintos bancos de germoplasma, esto es la procedencia original del material vegetal que dio

origen a la colección, tal es el caso de la colección Santa Bárbara, ubicada en la UNESUR.

Criterios de selección bien identificados

A nivel mundial, los programas de mejoramiento genético actuales consideran como criterios de importancia además de la productividad, la calidad, la resistencia a enfermedades e insectos plagas de importancia para los distintos países (CacaoNet, 2012).

La resistencia a la enfermedad ‘escoba de bruja’ (agente causal *Moniliophthora perniciosa*) ha sido un ejemplo exitoso en cuanto al aprovechamiento de los recursos genéticos para el mejoramiento del cacao. Se identificaron dos accesiones resistentes del alto amazonas, los clones peruanos SCA-6 y SCA-12. Estos han sido utilizados por diversos programas de mejoramiento debido a la alta productividad de sus progenies y su resistencia a ‘escoba de bruja’ (CacaoNet, 2012). En el caso de Venezuela el clon SCA-6 ha sido utilizado para el desarrollo de dos poblaciones híbridas, presentes en la estación Padrón del INIA-Miranda, en cuyas progenies se identificaron árboles resistentes (Movil, 2009).

El germoplasma es evaluado según las necesidades y problemáticas del cultivo a nivel local. Así, en el estado Miranda se les evalúa para resistencia a *Phytophthora palmivora*, *Moniliophthora perniciosa* y se les hace seguimiento para incidencia de perforadores del fruto *Carmenta theobromae* y del tallo “Gota” *Steirastoma breve*. En el estado Aragua se les evalúa para resistencia a *Phytophthora palmivora* y se les hace seguimiento para incidencia de *Lassiodiplodia*, *Ceratocystis fimbriata*, y perforadores del fruto *Carmenta foraseminaea*. En el estado Zulia se les evalúa para resistencia a *Moniliophthora roreri* y *Phytophthora megasperma* (González, 2009).

Otro aspecto de importancia se refiere a las variables asociadas a la calidad como aroma y sabor. Estos criterios son considerados en la mayoría de los programas de mejoramiento genético a nivel mundial (CacaoNet, 2012); sin embargo, en Venezuela ha sido poco considerado.

En este sentido González (2009) presenta como criterios de selección apropiados para los programas de mejoramiento nacional, los siguientes:

- Árboles de porte y vigor mediano.
- Ramas con ángulo de inserción menor a 90°.
- Productividad expresada en: a) kg/ha de cacao seco o b) Índice de eficiencia productiva (kg de cacao seco por cm² del área del corte transversal del tallo a una altura específica).
- Número de frutos/ha y por árbol
- Índice de Mazorca, IM = N° de mazorcas por kg de cacao seco.
- Índice de semilla o almendra, IS o IA = Peso promedio de una semilla.
- Baja incidencia o resistencia a *Phytophthora palmivora* en frutos y tronco.
- Baja incidencia o resistencia a *Moniliophthora perniciosa*, en frutos, en su forma de escobas vegetativas en ramas y en cojín floral. Aplicable a zonas con presencia del patógeno.
- Baja incidencia o resistencia a *Moniliophthora roreri*. Aplicable a zonas con presencia del patógeno.
- Resultado favorable en pruebas de degustación u organolépticas. Aplicable a fase final de selección.

En el presente trabajo, se aporta información del índice de mazorca e índice de almendra para la mayoría de los genotipos caracterizados, de estos, en el Cuadro 33 se presentan algunos de las distintas colecciones a nivel nacional, con características de productividad y asociado a la calidad como el color del cotiledón, que deberían incluirse en estudios que permitan corroborar su superioridad y aprovechamiento como clon a multiplicar.

Los trabajos de evaluación de las accesiones del Banco Internacional de Germoplasma de cacao, en Trinidad, permitieron recomendar algunos clones por criterios de productividad, como número de semilla por mazorca, índice de mazorca e índice de almendra. Al respecto recomendaron clones como JA1/17

por su mayor índice de almendra de 1,24g; el clon EET400 por su mejor índice de mazorca (19,8), y otros como el IMC-67 (20,0). Otro criterio considerado fue la resistencia a *Phytophthora* sp. (Iwaro *et al.*, 2003). La comparación de tales resultados con la caracterización de clones venezolanos, encontramos valores de mejor comportamiento como un índice de almendra de 2,03g para LV-12, clon Trinitario, con cotiledones blanco segregado, y hasta 3,77g para el clon CPGA-14, tipo Padrón, con cotiledones violeta claro. De manera, que se evidencia las posibilidades para el mejoramiento genético para tales criterios de selección asociados a la productividad.

Cuadro 34. Caracterización genética, criterios productivos y asociados a calidad de algunos clones de cacao (*Theobroma cacao* L.) de interés conservados en distintos bancos de germoplasma a nivel nacional

Accesiones	Proporción de Grupo Morfogeográfico					%loci homocigota	IA	IM	Color del cotiledón
	Tuy	Trinitario	Alto Amazónico	Criollo	Bajo amazónico				
Colección de 1945									
Oc-77	0,01	0,96	0,00	0,03	0,00	66,67	1,92	22,22	Blanco
Chu-130	0,01	0,97	0,00	0,01	0,01	31,25	1,84	19,84	Blanco
Cho-41	0,01	0,97	0,00	0,01	0,02	44,44	1,60	20,70	Blanco. Segr
Oc-67	0,01	0,97	0,00	0,01	0,01	35,00	1,36	22,86	Blanco
Oc-61	0,01	0,97	0,01	0,01	0,01	31,25	1,2	25,20	Rosado
Colección de 1995									
LV-12	0,01	0,97	0,00	0,01	0,01	12,50	2,03	27,73	Blanco. Segr
CATA-8	0,01	0,97	0,01	0,01	0,01	43,75	1,66	18,25	Viol. Osc
SCLV-6	0,01	0,97	0,01	0,00	0,01	52,94	1,50	20,17	Viol. Osc
At-5	0,02	0,95	0,01	0,01	0,01	54,55	1,34	22,96	Viol. Osc
Pas-4	0,01	0,97	0,00	0,01	0,01	68,75	1,20	34,72	Blanco
Colección Jardín Clonal Padrón									
CPGA-14	0,81	0,01	0,01	0,00	0,17	52,38	3,77	7,02	Viol. Claro
PSB-5	0,01	0,01	0,00	0,00	0,98	52,38	2,74	9,05	Viol. Osc
CPGA-9	0,88	0,07	0,00	0,02	0,02	47,62	2,66	11,06	Viol. Claro
PSB-33	0,01	0,01	0,00	0,01	0,97	45,00	1,83	14,43	Viol. Osc
Colección Mérida									
BEN-2	0,00	0,00	0,00	0,99	0,00	100,00	1,83	20,57	Blanco. Segr
SJU-6	0,00	0,00	0,00	0,99	0,00	100,00	1,73	27,59	Blanco
SJU-3	0,00	0,00	0,00	0,99	0,00	100,00	1,71	23,21	Blanco. Segr
BOC-1	0,01	0,01	0,00	0,97	0,01	87,50	1,71	27,85	Blanco
BOC-15	0,01	0,01	0,00	0,98	0,01	93,75	1,45	29,94	Blanco
Colección UNESUR									
POR-457	0,00	0,01	0,00	0,98	0,00	91,67	1,56	24,65	Blanco
SB-319	0,19	0,19	0,01	0,30	0,31	18,18	1,54	16,19	Blanco. Segr
SB-511	0,16	0,50	0,01	0,17	0,16	10,00	1,28	19,03	Blanco. Segr
SB-392	0,16	0,51	0,01	0,16	0,16	8,33	1,27	19,62	Blanco. Segr
SB-391	0,25	0,40	0,01	0,15	0,19	0,00	1,24	20,13	Blanco
Colección CORPOZULIA									
CPZ-40	0,07	0,03	0,03	0,75	0,11	100,00	1,74	25,15	Blanco
CHA-05	0,01	0,01	0,00	0,98	0,01	100,00	1,70	26,91	Blanco
CPZ-33	0,01	0,01	0,00	0,98	0,01	100,00	1,69	22,79	Blanco
CPZ-06	0,01	0,01	0,01	0,97	0,01	85,71	1,56	26,60	Blanco
CPZ-03	0,01	0,01	0,01	0,97	0,01	85,71	1,49	25,94	Blanco. Segr
Colección UNET									
4-1-10	0,03	0,40	0,02	0,56	0,00	100,00	1,62	31,94	Blanco
6-8-45	0,00	0,00	0,00	0,99	0,00	100,00	1,62	32,49	Blanco. Segr
1-4-15	0,00	0,00	0,00	0,99	0,00	100,00	1,58	24,91	Blanco
3-10-49	0,00	0,00	0,00	0,99	0,00	100,00	1,56	21,40	Blanco
4-5-2	0,07	0,04	0,01	0,77	0,11	85,71	1,48	30,78	Blanco

Tipo de cultivar

En vista de las posibilidades de reproducción sexual y asexual del cacao, se tiene la ventaja de obtener distintos tipos de cultivares como clones, variedades de libre polinización e híbridos. En vista de la variabilidad genética encontrada en el presente trabajo es posible aprovechar y desarrollar distintos tipos de cultivares.

Clones: se presentan las principales características morfológicas para las accesiones incluidas en el trabajo, que permitirá una primera selección con base en índice de almendra y mazorca. Estos árboles deben ser propagados de forma asexual, por lo que se requiere de un programa local y/o nacional que incluya infraestructura, personal entrenado, equipos y materiales para su desarrollo.

Variedades de libre polinización: este tipo de cultivar constituye la forma tradicional de propagación del cultivo. Las semillas de plantas con buen comportamiento se utilizan directamente para la siembra de renovación de las parcelas o para la ampliación de superficies de siembra. Sin embargo, en vista del modo de reproducción de la especie, con la ocurrencia de sistema de autoincompatibilidad, no se puede asegurar la procedencia del polen, de manera que el comportamiento de la descendencia obtenida por libre polinización es incierto. Sin embargo, en vista de la facilidad de propagación y los menores requerimientos de recursos, esta opción sigue siendo válida. A fin de obtener variedades de libre polinización se pueden diseñar campos para semilla con la incorporación de genotipos de buen comportamiento productivo, de calidad y adaptados a condiciones locales, en lotes aislados.

Híbridos: a fin de optimizar la heterosis o vigor híbrido, se requiere de parentales con mayor grado de homocigosis y divergentes entre sí. La información molecular aportada permitirá escoger dentro de cada grupo genotipos que evidencia una mayor homocigosis, que pudieran ser cruzados con genotipos de otro grupo también con alto mayor de homocigosis, para así asegurar un alto vigor híbrido.

Métodos de mejoramiento genético

Los estudios de diversidad genética y de estructura de las poblaciones constituyen la base de todo programa de mejoramiento genético. A nivel mundial, en cacao los programas de mejoramiento genético han seguido distintas etapas. En una primera fase, se realizaron grandes colectas en campos de producción y áreas naturales para el establecimiento de bancos de germoplasma *ex situ*, conformando colecciones clonales por injertación. Generalmente, los árboles de comportamiento superior en cuanto a productividad fueron seleccionados para conformar distintas colecciones clonales. En una siguiente etapa se realizó la introducción de materiales genéticos foráneos para su uso en cruzamiento con genotipos locales, considerándose como criterio alto potencial productivo. Las poblaciones producto de cruzamientos dirigidos se establecieron en campo, y en muchos casos con la participación de los productores locales, los árboles de mayor potencial eran propagados por injerto o por semilla. Igualmente, se consideraban criterios como resistencia a enfermedades o a insectos plaga. Actualmente, se está considerando características de calidad, para darle un valor agregado al producto (Efombagn *et al.* (2008).

El estudio realizado permite evidenciar la alta variabilidad genética presente en Venezuela para este rubro, encontrándose accesiones representativas de los principales grupos morfogeográficos conocidos. Hacia el occidente del país de tipo criollo, hacia la costa aragüeña y margarita trinitarios, con poca presencia del genoma de alto amazónico. Se identificaron colecciones híbridas como por una parte genotipos con características morfológicas y/o moleculares particulares

Los programas de mejoramiento genético del cacao a nivel mundial se iniciaron a principios del siglo XX con la evaluación de germoplasma y selección de árboles con mejores características, en distintos países productores. Por ejemplo, para la década de 1920 se conformó la colección identificada como “Imperial College Selections” (ICS) de los campos de producción en Trinidad.

Durante las décadas de 1930 y 1940, germoplasma silvestre fue colectado en el alto amazonas del Ecuador y Perú, ampliando así la base genética del cultivo

disponible para el mejoramiento genético Para 1950 se demostró el alto potencial para producción del cruce entre altos amazónicos y Trinitario ó con genotipos bajo amazónicos. Estos cruces formaron la base de los programas de mejoramiento genético alrededor del mundo entre 1950 y 1970. Las semillas producto de esos cruzamientos, en su mayoría biparentales, constituyeron jardines de semilla en la búsqueda de genotipos que reunieran alta calidad y productividad, adaptación local y tolerancia a insectos plaga y enfermedades de importancia local (CacoNet, 2012).

Para la década de 1990 y 2000, en algunos países (Brasil, Costa Rica, Costa de Marfil, Ghana Papua Nueva Guinea) se iniciaron programas de selección. Este tipo de programa requiere la disponibilidad de una amplia variabilidad genética en el germoplasma local y en las fincas de producción.

En el caso particular de Brasil, los programas de mejoramiento genético han tenido como criterios de selección el índice de mazorca y de almendra, número de mazorcas por árbol o área, por año. Otro aspecto considerando es la eliminación de plantas autoincompatibles de las poblaciones, en particular para el desarrollo de clones. En esos casos, al inicio de los programas de mejoramiento genético en Brasil, se seleccionaban plantas dentro de las parcelas de los agricultores por su productividad y luego, eran multiplicadas para su distribución como clones o como familias de libre polinización. Más adelante, en la década del '50, los programas de mejoramiento se orientaron a los cruces interclonales, asumiendo la estrategia de una sola generación F1. Para la década de los '90, los programas de mejoramiento adoptaron la estrategia de selección recurrente para producir nuevas variedades y clones. Así para el periodo 1993 al 2010, se obtuvieron 3 híbridos y 39 clones liberados.

En Venezuela, el mejoramiento genético del cacao siguió una evolución similar aunque más tardía. Para las décadas de 1940 -1950 se organizaron las primeras colecciones provenientes de los bancos de producción de Aragua, Miranda y Sucre. Ese trabajo continua hasta el día de hoy. Se han ido caracterizando los materiales a nivel morfológico, molecular, para algunas

características de interés agronómico así como la resistencia a las principales enfermedades e insectos plaga (Moreno, 1996).

Para las décadas del 60 y 70, destacados especialistas de otros países que prestaron su asesoramiento como: Basil Bartley y Jorge Soria. Se logró el establecimiento de ensayos comparativos de híbridos provenientes de cruces de clones nacionales promisorios con clones introducidos de otros países con alto potencial de rendimiento y tolerancia. Estas hibridaciones continuaron hasta 1997. Los ensayos de progenies híbridas entre padres de diferentes orígenes demostraron que los cruces entre clones de tipos Criollos x Amazónicos y tipos Trinitarios x Amazónicos resultaban ser más precoces y productivos que los cruces entre Criollos x Trinitarios y Criollos x Criollos (Moreno, 1997).

Motamayor *et al.* (1996), sugieren el desarrollo de programas de mejoramiento para Venezuela enfocados hacia la calidad e incrementando la productividad. Para ello, aprovechando el alto nivel de homocigosis de individuos tipo cacao criollo y su alta divergencia con los cacaos forasteros, realizar cruzamientos entre estos tipos de cacao y así obtener un mayor nivel de heterocigosis para aprovechar el vigor híbrido. Los autores proponen desarrollar los progenitores tipo forasteros que previamente hayan sido objeto de un programa de introgresión de genes asociados a la calidad. Para ello, realizar un primer cruzamiento entre criollo y forasteros, e iniciar un programa de retrocruza por tres generaciones hacia forastero pero seleccionando por semilla blanca y sabor típico de criollo árboles en cada generación de retrocruza. Finalmente, obtener los híbridos criollo x forasteros con introgresión de criollo, y en su descendencia, seleccionar individuos para su propagación clonal o identificar cruces superiores para el establecimiento de bancos de semilla.

Para 2009, González reporta la evaluación de las doce mejores familias híbridas establecidas en INIA-Miranda en cuanto a características de productividad y resistencia a plagas. Trabajos para establecer un programa de selección recurrente en cacao no se ha iniciado a nivel nacional.

El presente trabajo apoya lo afirmado por otros investigadores, poseemos una amplia variabilidad genética para nuestros programas de mejoramiento, aunado

a las colecciones de clones internacionales establecido en la estación Padrón del INIA-Miranda, que pudieran aportar variabilidad distinta y genes para resistencia a enfermedades e insectos plagas.

Dicho todo esto, el presente trabajo permite esbozar algunas estrategias como son las siguientes:

1. Profundizar el estudio de los distintos germoplasma, haciendo énfasis en características de productividad, resistencia a enfermedades e insectos plagas y calidad.
2. Identificación de clones superiores por región y nacional que pasarían a una etapa de multiplicación clonal para sucesivas evaluaciones en campos de producción. Tales genotipos deberían ser evaluados en cuanto a productividad, resistencia a enfermedades y calidad.
3. Diseño de cruzamientos biparentales para la obtención de híbridos. En este aspecto se incluiría el desarrollo de parentales tal como proponen Motamayor *et al.* (1996), y cruzamiento de genotipos tipo criollo por alto amazónicos. En vista de los resultados de este trabajo, se recomiendan además los cruces de criollos por accesiones de tipo Tuy, en vista de su distancia genética y las buenas características de estos materiales.
4. Diseño de poblaciones básicas de amplia base genética para la conformación de un programa nacional de selección recurrente.

CONCLUSIONES

- En general, se logró recopilar la información morfológica de 623 accesiones de los distintos bancos de germoplasma a nivel nacional, incluyendo un máximo de 29 caracteres cuantitativos y 20 cualitativos.
- La descripción morfológica que evidenció la mayor variabilidad entre bancos de germoplasma y entre genotipos fue la caracterización cualitativa de los frutos, ya que pudo destacar que la mayor variabilidad en frutos se observó en la región central y oriental del país, observándose distintos colores y diferentes intensidades de antocianina en las partes del fruto, así como distintas formas y apariencias del fruto, resaltando una riqueza morfológica para esta parte representativa de la planta de cacao.
- Una de las características morfológicas de tipo cuantitativo que evidenció diferencias marcadas entre los bancos de germoplasma fue la medición del número de óvulos por ovario. Para esta característica se planteó que para las colecciones hacia el occidente del país, el número de óvulos por ovario no superan el techo de los 40 Óvulos/ovario, para la región central del país esta medición rondan el promedio de los 40 óvulos (específicamente Aragua), y para la región oriental es superior.
- Con base en las características morfológicas más resaltantes y los 91 genotipos seleccionados y representativos de la diversidad genética resguardada en los bancos de germoplasma nacional, los resultados obtenidos del análisis UPGMA reflejaron en un primer plano la diferenciación de dos grandes grupos, un grupo caracterizado por materiales criollos y otro grupo que engloba materiales del tipo trinitarios, bajo amazónicos y alto amazónicos. Estos resultados evidencian que la mayor diversidad morfológica se ubica hacia el grupo de los forasteros y trinitarios, en contraste al segundo grupo donde se observan sólo los genotipos criollos.

- A nivel morfológico se evidenció una conformación de un grupo no correspondiente a ningún referencial utilizado en el presente estudio, lo que pudiera representar una diversidad genética distinta, estos genotipos en su mayoría corresponden al Jardín Clonal Padrón.
- Se logró recopilar la información molecular obtenida por un máximo de 21 microsatélites para un total de 575 accesiones de los distintos bancos de germoplasma a nivel nacional.
- En cuanto a la caracterización molecular se obtuvo una media nacional de 2,53 alelos por locus, un valor de PIC de 0,374 y un porcentaje de heterocigotas de 37,64, con fuertes diferencias entre las tres principales regiones del país.
- En la región central del país, se obtuvieron poblaciones bastante heterogéneas con fuentes alélicas provenientes de criollos posiblemente del occidente del país y fuentes referentes a genotipos amelonados del bajo amazonas, los cuales tuvieron su encuentro en las zonas del estado Aragua y Miranda principalmente conformado por una amplia gama de genotipos híbridos con introgresiones que van desde los criollos modernos y los trinitarios propiamente.
- En cuanto a la caracterización molecular de la región occidental del país, se observaron poblaciones bastante homogéneas, a excepción de la colección "Santa Bárbara" donde se obtuvo un 93% de heterocigotas, lo cual sale del patrón molecular de la región.
- En cuanto a la caracterización molecular de la región oriental del país, con la limitante de la poca información molecular, se pudo evidenciar el mayor número de alelo por locus de país (2,9 alelos/locus), así como un alto porcentaje de heterocigotas.

- A través de un análisis de agrupamiento y la incorporación de los referenciales morfogeográficos definidos a nivel internacional, se pudo evidenciar la poca relación genética de los genotipos nacionales con los referenciales altos amazónicos. A su vez se pudo corroborar a nivel molecular las diferencias entre los criollos y los materiales forasteros y trinitarios.
- En el análisis de agrupamiento se evidenció la particularidad de la colección del Jardín Clonal de Padrón. Este grupo en particular se ha caracterizado por presentar una gran cantidad de alelos y en distintas combinaciones, lo cual lo hace un grupo único y variable donde converge un pool de genes aun no descrito.
- A través del estudio de la estructura genética poblacional se logró identificar un grupo genético distinto a los 4 grupos genéticos establecidos. Este quinto grupo lo definimos como el grupo "Tuy", esta colección presenta genotipos puros para este grupo en particular.
- En cuanto a la estructura poblacional del resto del país se definió de la siguiente manera, las colecciones 1945, 1995, Barlovento y Margarita son predominantemente del grupo trinitario, la colección de Irapa es la colección con mayor la introgresión genética de los grupos establecidos, por ende se observó la mayor variabilidad genética.
- Para las colecciones de la región occidental se observó el carácter homocigoto y homogéneo que caracteriza al grupo criollo. A excepción de la colección "Santa Bárbara" la cual con base en este estudio es catalogada como una colección híbrida con introgresión de todos los grupos exceptuando a los altos amazónicos.
- Considerando la caracterización morfológica y molecular, el presente trabajo esboza los principales lineamientos para un programa de mejoramiento genético nacional, tomando en cuenta los recursos

genéticos disponibles, los criterios de selección, el tipo de cultivar a desarrollar y las estrategias metodológicas.

RECOMENDACIONES

- La data, tanto morfológica y molecular, recabada debería ser objeto de la preparación de un catálogo nacional en formato digital que permita su aprovechamiento por parte de los fitomejoradores e interesados en el tema.
- Acompañar la caracterización con la valorización del germoplasma hacia caracteres de interés como la productividad, resistencia a enfermedades e insecto plaga y calidad.
- En vista de la importancia de la región oriental en la producción nacional de cacao, aunado a la evidencia de una gran diversidad genética, realizar un mayor esfuerzo en la revisión de la variabilidad en las unidades de producción de esa región.
- En vista de la importancia de mantener los cánones de calidad del cacao venezolano, es urgente conformar una red de laboratorios para la valoración de caracteres físico-químicos y, pánenes de catación sensorial.

REVISIÓN BIBLIOGRAFICA

Barrientos, N. 2008. Caracterización morfológica de hojas y flores de cacao (*Theobroma cacao* L.) de las colecciones Porcelana y la denominada “Santa Bárbara” en la Unidad de Investigación “La Glorieta” UNESUR. Tutora: Nelly Morales. Santa Bárbara del Zulia. Enero 2008

Boza, E., Irish, B., Meerow, Tondo, C., Rodríguez, O., López, M., Gómez, J., Moore, J., Zhang, D., Motamayor, J., Schnell, R. (2013). Genetic diversity, conservation, and utilization of *Theobroma cacao* L.: genetic resources in the Dominican Republic. *Genet Resour Crop Evol* (2013) 60:605–619.

Beaumont, A., Rannala, B. (2004). The bayesian revolution in genetics. *Revista: genetics*. Volumen 5. Documento en línea. Disponible en: [www.nature.com/reviews/genetics].

Braudeau, J. (1970). *El Cacao*. Técnicas Agrícolas y Producciones Tropicales”. Dirigida por René Costé. Colección Agricultura Tropical. Editorial Blume, Barcelona, España.

CacaoNet. 2012. A Global Strategy for the Conservation and Use of Cacao Genetic Resources, as the Foundation for a Sustainable Cocoa Economy (B. Laliberté, compiler). Bioversity International, Montpellier, France.

Carrión, L. (2007). Identificación de cultivares de cacao. Documento didáctico 1^{ra} edición. Universidad Nacional Agraria de la Selva. Tingo Maria. Perú. 15p.

Chacón, I., Ramis, C., Gómez, C. (2011). Descripción morfológica de frutos y semillas del cacao Criollo Porcelana (*Theobroma cacao* L.) en el Sur del Lago de Maracaibo. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*. 2011, 28 Supl. 1: 1-13

Cheesman, E. E. (1944). Notes on the Nomenclature, classification and possible relationship of cacao populations. *Tropical Agriculture*, 21:144–159.

Cuatrecasas, J. (1964). Cacao and its allies: A Taxonomic revision of the Genus *Theobroma*. Smithsonian Institute Bulletin of the United States. National Museum Contributions from the U.S. National Herbarium. Vol. 3, Part 6, 614 p.

Díaz, A. (2005). Marcadores Moleculares. Universidad Central de Venezuela, Facultad de Agronomía, Instituto y Departamento de Genética. Maracay, Estado Aragua. 101 p.

Delgado, O. (2004). Variabilidad isoenzimática de tres especies de *Diaphania* (Lepidoptera en Venezuela. Tesis pre-grado. Maracay, Venezuela; Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela. 48 p.

Engels, M., Bartley, B., Enríquez, G. (1980). Cacao Descriptors, Their State and Modus Operandi. Turrialba 30: p 209 – 218.

Efombagn, I., Motamayor, J., Sounigo, O., Eskes, A., Nyassé, S., Cilas, C., Schnell, R., Manzanares, M., Allen, M. (2008). Genetic diversity and structure of farm and GenBank accessions of cacao (*Theobroma cacao* L.) in Cameroon revealed by microsatellite markers. Tree Genetics & Genomes 4:821–831.

FAOSTAT. 2015. Estadísticas Disponible en http://faostat3.fao.org/browse/Q/*/S Consulta 13/11/2015.

FEDEAGRO. 2015. Estadísticas Agropecuarias. Producción Agrícola <http://www.fedeagro.org/produccion/> Consulta: 13/11/15.

FONAIAP-Miranda. 1997. Informe anual 1996. *Padrón*.

FONAIAP-Sucre. 1997. Banco de Germoplasma de Cacao. Irapa-Edo Sucre.

González, M. (2001). Caracterización de Genotipos de Cacao (*Theobroma cacao* L.) mediante el uso de Isoenzimas. Tesis Maestría. Maracay, Venezuela; Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela. 77 p.

González, V., Ramos, G., Girón, C., Vidal, R., Chacón, I. y D. Salazar. (2004). Recursos genéticos del cacao. Conservación y mejoramiento de los cacaoteros Criollos de Venezuela. II Jornadas Técnicas del Cacao. Maracay, Edo. Aragua, Venezuela.

González, V. (2009). Programa nacional de mejoramiento genético del cacao (Tema 14). Guía de curso de mejoramiento de cacao. Proyecto de Investigación en Red en el marco de la Ruta del Chocolate. Maracay, Edo. Aragua.

Granja, R. 2014. Situación y Perspectivas del Mercado Mundial de Cacao – Enfoque Américas. Grupo TransMar. Presentación en el Seminario en Red: Desarrollo del Sector Cacaotero en América Latina y el Caribe: Retos, Riesgos y Roles de los Actores Públicos y Privados. Disponible en línea: <https://www.agriskmanagementforum.org/content/webinar-desarrollo-del-sector-cacaotero-en-am%C3%A9rica-latina-y-el-caribe-retos-riesgos-y-roles->

Haffer, J. (1982). General aspects of the refuge theory. In: *Biological Diversification in the Tropics*. Prance G.T. (ed) Columbia University Press, New York, EUA, pp 6-24.

Hidalgo, R. (2003). Variabilidad Genética y Caracterización de Especies Vegetales: Análisis estadístico de datos de caracterización morfológica de recursos filogenéticos. Boletín técnico IPGRI N° 8. Cali, Colombia.

Hussey, R. (1934). *La Compañía de Caracas 1728-1784*. Banco Central de Venezuela. Colección histórico - económica venezolana. Vol. VIII. Caracas 1962. 384 p.

Ipinza, R. (1997). Glosario de Genética Forestal. Curso Mejora Genética Forestal Operativa. Universidad Austral de Chile. Disponible On line en. www.genfys.slu.se/staff/dagl/glossaries/glosario.doc.

Iwano, A., Bekele, F., Butler, D. (2003). Evaluation and utilization of cacao (*Theobroma cacao* L.) germplasm at the Internacional Cocoa Genebank, Trinidad. *Euphytica* 130:207-221.

Jakobsson, M., Rosenberg, N. (2009). CLUMPP1: Cluster Matching and Permutation Program. Version 1.1.2. Center for Computational Medicine and Biology Department of Human Genetics University of Michigan. USA.

Jiménez, J. (2006). Caracterización morfológica y molecular del Jardín Clonal de cacao (*Theobroma cacao* L.) ubicado en la estación INIA-Miranda. Trabajo de Grado. Facultad de Agronomía. Universidad Central de Venezuela.

Jiménez, J., Ramis, C., Castillo, A., Gómez, A., Chacón, I., Moya, A., Vidal, R., Albornoz, L., Gutiérrez, B., Vivas, A., Morales, N. (2007). Manual práctico para la caracterización morfológica de cacao (*Theobroma cacao* L.) en Venezuela. Basado en Engels *et al.* (1980). (Publicación en Revisión)

Jhonson, E., Bekele, F., Brown, S., Song, Q., Zhang, D., Meinhardt, L., Schnell, R. (2009). Population Structure and Genetic Diversity of the Trinitario Cacao (*Theobroma cacao* L.) from Trinidad and Tobago. *Crop science*, vol. 49. P 566-567.

Lanaud, C., Motamayor, J.C., O. Sounigo. (1999). Cacao. In: *Genetic Diversity of Cultivated Tropical Plants*. J. C. Glaszmann (Ed). CIRAD. Montpellier, France. P 125 – 151.

Laurent, V., Risterucci, A., Lanaud, C. (1993). Genetic diversity in cocoa revealed by cDNA probes. *Theoretical and Applied Genetics*, 88: 193-198.

Leal, F. (1996). Historia y Origen del Cacao. Primer Congreso del Cacao y su Industria. Maracay, Edo. Aragua, Venezuela.

Ligarreto, G. (2003). Caracterización de Germoplasma: Análisis estadístico de datos de caracterización morfológica de recursos filogenéticos. Boletín técnico IPGRI N° 8. Cali, Colombia. P 40-49.

Loor, R., Risterucci, A., Courtois, B., Fouet, O., Jeanneasu, 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 and Genomes Vol.5. Pp. 421-433.

Lopes, U.,Monteiro, W., Pires, J., Clement, D., Yamada M., Gramacho, K. (2011). Cacao breeding in Bahia, Brasil – strategies and results. Crop breeding and Applied Biotechnology S1:73-81.

López, A. (2010). Introducción al análisis bayesiano computacional: MCMC (WinBUGS). Monografía Curso-seminario de aplicaciones bayesianas en economía de la Salud. Universidad de Valencia. España. Disponible [www.personales.ulpgc.es/mnegrin.dmc].

Marcano, M. (2007), Cartografía Genética de factores del rendimiento y caracteres morfológicos, en una población cultivada de cacao Criollo “Moderno” (*Theobroma cacao* L), mediante un análisis de asociación. Tesis de Doctorado. Postgrado en Ciencias Médicas Fundamentales, Universidad de Los Andes, Mérida, Edo. Mérida.

Marcano, M. (2009). Aplicación de la tecnología de marcadores moleculares en el mejoramiento genético del cacao. Experiencia nacional y global I (tema 10). Guía de curso de mejoramiento de cacao. Proyecto de Investigación en Red en el marco de la Ruta del Chocolate. Maracay, Edo. Aragua.

Marcano, M. (2009). Origen, diversidad, domesticación y dispersión del cacao (tema 1 y 2). Guía de curso de mejoramiento de cacao. Proyecto de Investigación en Red en el marco de la Ruta del Chocolate. Maracay, Edo. Aragua.

Marco Trade News. 06/03/2014. Demanda de cacao superaría la producción mundial. Disponible en <http://marcotradenews.com/> . Revisado el 14/05/2015

Ministerio de Ciencia y Tecnología (2005). Programa de Innovación para el Desarrollo Local Endógeno Proyecto de Investigación en Red en el marco de la Ruta del Chocolate. Documento Anexo al Punto de Cuenta N° 115 – 094. Vice ministerio de Investigación e Innovación. Programa de Innovación Para el Desarrollo Endógeno. Proyecto Ruta del Chocolate. Caracas, Venezuela.

Miranda, F. (1962). Wild cacao in the Lacandona Forest, Chiapas, México. Cacao (Turrialba) 7: 7. CATIE, Costa Rica.

Morris, D. (1882). Cacao: How to grow and how to cure it. Jamaica, pp 1-45.

Morales, E., Candeira, A. (1996). Principios genéticos para recursos genéticos. Curso sobre conservación de germoplasma vegetal. Brasilia, Brasil. 19-30 septiembre de 1994. Montevideo: diálogo XLV – IICA-Procisur. P 35-48.

Moreno, M. (2007). Caracterización morfológica y molecular de cacao (*Theobroma cacao* L.) del Banco de Germoplasma del Centro Nacional de Recursos Genéticos del Ministerio del Ambiente y los Recursos Naturales. El Limón, estado Aragua. Trabajo de Grado. Facultad de Agronomía. Universidad Central de Venezuela. Diciembre 2007. P 70-72.

Moreno, A. (1996). La investigación venezolana en cacao: Situación actual del mejoramiento genético. En: Memorias del I Congreso del Cacao y su Industria. Maracay. CONICIT, Caracas, Venezuela 2000.

Motamayor, J.C. (1995). Estudio de la variabilidad genética de los cacaoteros Criollo de Venezuela (*Theobroma cacao* L), mediante el uso de marcadores moleculares tipo RFLP. Tesis de grado, Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela.

Motamayor, J., Risterucci, A., Laurent, V., Moreno, A., Lanaud, C. 1996. The Genetics diversity of criollo cacao and its consequence in quality breeding. Primer Congreso del Cacao y su Industria. Maracay, Edo. Aragua, Venezuela.

Motamayor, J., Risterucci, A., López, P., Ortiz, C., Moreno, A., Lanaud, C. (2002). Cacao domestication I: The origin of the cacao cultivated by the Mayas. *Heredity*, 89: 380-386.

Motamayor, J., Risterucci, A., Heath, M., Lanaud, C. (2003). Cacao domestication II: progenitor germplasm of the Trinitario cacao cultivar. *Heredity*, 91: 322-330.

Motamayor, J., Lachenaud, P., Mota, J., Loor, R., Kuhn, D., Brown, S., Schnell, R. (2008). Geographic and Genetic Population Differentiation of the Amazonian Chocolate Tree (*Theobroma cacao* L.). *Revista Plos one*.

Motamayor, J., Mockaitis, K., Schmutz, J., Haiminen, N., Livingstone, D., Cornejo, O., Findley, S., Zheng, P., Utró, F., Royaert, S., Sasaki, C., Jenkins, J. (2013). The genome sequence of the most widely cultivated cacao type and its use to identify candidate genes regulating pod color. *Genome Biology*. Disponible en: <http://genomebiology.com/2013/14/6/r53>.

Movil, O. 2009. Evaluación de la Resistencia a escoba de bruja (*Moniliophthera perniciosa*), en dos poblaciones de cacao (*Theobroma cacao* L.) y su asociación con marcadores moleculares microsatélites. Trabajo de Grado. Postgrado en Agronomía. Universidad Central de Venezuela. Maracay. 155p.

Murillo, J., Villa, D., Marín, S., Páez, F., López, G. (2010). Caracterización molecular de clones de *Theobroma cacao* L., por medio de marcadores moleculares microsatélites. *Revista LUAZ*. P 16-17.

Nei, M. (1977). F statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations *Ann. Hum. Genet.* 41: 225-233.

Motilal, L., D. Butler. (2002). Verification of identities in global cacao germoplasm collections. *Genetic Resources and crop evolution* 50: p 799-807.

Nosti, J. (1961). *Café, Cacao y Té*. 2ª Edición Colección Agrícola SALVAT. Barcelona, España.

Olmos, S., Renzo, M., Ibañez, M., Winzer, N. (2010). Análisis de Experimentos Biológicos: Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II. Publicación del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Argentina. P 270-280.

Paradis, L. (1979). Le cacao précolombien: monnaie d'échange et breuvage des dieux. *Journal d'agriculture traditionnelle et de botanique appliquée*, 26:3-4.

Parra, K. Rosales, L. 2007. Caracterización Morfológica de frutos de cacao (*Theobroma cacao L.*) de las colecciones Porcelana y la denominada "Santa Bárbara" en la Unidad de Investigación "La Glorieta" UNESUR. Tesis de Grado. Universidad Nacional Experimental Sur Del Lago "Jesús María Semprum". Santa Bárbara del Zulia, mayo 2007.

Perez, D., M. Gutierrez., E. Mazzani., T. Barreto., V. Segovia., C. Marin. (1998). Recursos Fitogenéticos de Venezuela. Maracay, Estado Aragua, Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias. Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias. (Serie C No 42) p 41-47.

Pérez, M. (2004). Caracterización Morfológica y Bioquímica para la Sistematización del Banco de Germoplasma del Genero Canavalia. Tesis Pregrado. Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela. 123 p.

Pittier, H. (1935). Degeneration of cacao through natural hybridization. *Journal of Heredity* 26 (10): 385–390.

Pritchard, F., Xiaoquan, W., Falush, D. (2007). Documentation for *structure* software: Versión 2.2. Department of Statistics University of Oxford. Documento disponible: <http://pritch.bsd.uchicago.edu/software>.

Pritsch, C. (2001). El pre-mejoramiento y la utilización de los recursos fitogenéticos. En: Estrategia en recursos fitogenéticos para los países del Cono Sur. PROCISUR.

Polo, G. (2009). Caracterización molecular del cacao (*Theobroma cacao* L.) porcelana y el denominado Santa Bárbara. Trabajo de Grado. Ingeniería de la Producción Agropecuaria. Universidad Nacional Experimental Sur del Lago “Jesús María Semprum” (UNESUR). Santa Bárbara del Zulia, noviembre 2009.

Pound, F.J. (1935). The completion of selection. Report on Cacao Research for 1935. Regional Research Center UWI. pp 7-16.

Portillo, E. (2000). Influencia de la Fermentación en la calidad del Cacao Criollo Porcelana (*Theobroma cacao* L.) en el Sur del Lago de Maracaibo. Tesis de Postgrado. Postgrado en Agronomía. Facultad de Agronomía. Universidad Central de Venezuela. 7 p.

Pugh, T., Fouet, O., Risterucci, M., Brottier, P., Abouladze, M., Deletrez, C., Courtois, B., Clement, D., Larmande, P., N’Goran, J., Lanaud, C. (2004). A new cacao linkage map based on codominant markers: development and integration of 201 new microsatellite markers. *Theor Appl Genet* 108:1151–1161.

Ramis, C., Vidal, R., Castillo, A., Ramos, G., Moya, A., Chacón, I., Morales, N., Marcano, M., Gutiérrez, B., Albornoz, L., Vivas, A., Gómez, A., Molina, S., Tezara, W. (2009). III Informe de avance del subproyecto: “Evaluación de la Diversidad Genética del cacao Venezolano”, enmarcado en el Proyecto de Investigación en Red en el marco de la Ruta del Chocolate. Maracay, Edo. Aragua.

Ramos, G. (1997). Situación actual de la investigación venezolana en germoplasma de cacao. En: I Congreso Venezolano del Cacao y su Industria, Maracay Estado Aragua. Memorias. Pág. 155-163.

Ramos, G., Gomez, A., De Ascencao. (2004). Caracteres morfológicos determinantes en dos poblaciones de cacao criollo del occidente de Venezuela. *Agronomía Trop.* Vol.54 n.1 Maracay. Edo. Aragua.

Ramírez, M. (2014). Caracterización Morfológica y Molecular de Genotipos de Cacao (*Theobroma cacao* L.) en plantaciones de Tabasco, México. Trabajo de grado para la obtención del título: Maestro en Ciencias. Instituto de Enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas. Tabasco, México.

Reyes, L., Reyes, H. (2000). *El cacao en Venezuela. Moderna tecnología para su cultivo.* Chocolates El Rey. Caracas, Venezuela 270 p.

Romero, C., Bonilla, J., Santos, E., Peralta, E. (2010). Identificación Varietal de 41 Plantas Seleccionadas de Cacao (*Theobroma cacao* L.) Provenientes de Cuatro Cultivares Distintos de la Región Amazónica Ecuatoriana, Mediante el Uso de Marcadores Microsatélites. *Revista Tecnológica ESPOL – RTE*, Vol. 23, N. 1, 121-128.

Rojas, W. (2003). Análisis multivariado en estudios de variabilidad genética: Análisis estadístico de datos de caracterización morfológica de recursos Fitogenéticos. Boletín técnico IPGRI N° 8. Cali, Colombia. P 85.

Rodríguez, N. (1992). Guías de Estudio Cátedra de Manejo Agronómico de Cultivos Tropicales II; U.C.V. Facultad de Agronomía, p 1-55.

Rosenberg, N. (2007). DISTRUCT: a program for the graphical display of population structure. Center for Computational Medicine and Biology Department of Human Genetics University of Michigan. USA.

San Vicente, F., D. Pérez., Y. Alfaro., V. Segovia. (1995). Programa Nacional de Investigación en recursos Fitogenéticos. En: Encuentro Interinstitucional de Recursos Fitogenéticos. (1994, Maracay, Venezuela). Memorias. Compilado

por Delis Pérez. Maracay, Venezuela. Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias, Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias. p 12-27.

Schultes, R. (1984). Amazonian cultigens and their northward and westward migrations in Pre-Columbian times. In: Pre-Columbian plant migration, Papers of the Peabody Museum of Archaeology and Ethnology. Stone, D. (Ed) vol 76. Mass. Harvard University Press. Cambridge, pp 69-83.

Sereno, M., Albuquerque, P., Vencovsky, R., Figueira, A. (2006). Genetic diversity and natural population structure of cacao (*Theobroma cacao* L.) from the Brazilian Amazon evaluated by microsatellite markers. *Revista Conservation Genetics* 7:13–24.

Segura, S. (2003). Divergencias morfológicas interespecíficas del subgénero *Tacsonia* (Passiflora): Análisis estadístico de datos de caracterización morfológica de recursos filogenéticos. Boletín técnico IPGRI N° 8. Cali, Colombia.

Soria, J. (1960). El mejoramiento del cacao, en Manual del Cacao F. Ardí. Instituto Interamericano de Ciencias agrícolas (IICA) Costa Rica. p 358-380.

Thondaima, V., Rajamani, K., Senthil, N., Shoba, N., Joel, J. (2013). Genetic diversity in cocoa (*Theobroma cacao* L.) plus trees in Tamil Nadu by simple sequence repeat (SSR) markers. *African Journal of Biotechnology*. Vol. 12(30), Pp. 4747-4753.

Thomas, E., Zonneveld, M., Loo, J., Hodgkin, T., Galluzzi, G., Etten, J. (2012). Present Spatial Diversity Patterns of *Theobroma cacao* L. in the Neotropics Reflect Genetic Differentiation in Pleistocene Refugia Followed by Human-Influenced Dispersal. *Revista PLoS ONE* 7(10): e47676. doi:10.1371/journal.pone.0047676.

Trognitz, B., Scheldeman, X., Hansel-Hohl, K., Kuant, A., Grebe, H., Hermann, M. (2011). Genetic Population Structure of Cacao Plantings within a Young Production Area in Nicaragua. *Revista Plos One*. 06 (01): 11-12.

Ventura, R. (2008). : Programa nacional de mejoramiento genético del cacao. Guia Curso Mejoramiento de Cacao. Universidad Central de Venezuela. Maracay. Venezuela.

Villalba, J. Zamora, F. 2007. Caracterización Morfológica de 20 Accesiones de cacao (*Theobroma cacao L.*) del Banco de Germoplasma del Campo Experimental Irapa, INIA-Sucre. Tesis de Grado. Instituto Universitario de Tecnología Cumaná. Cumaná, Julio 2007.

Villegas, M. (2005) Inferencia Estadística. Universidad de Madrid. Madrid. España.

Vidal, R., Coelho, T. (2001). Catálogo de clones de cacao (*Theobroma cacao L.*) pertenecientes a la colección 45. INIA.CENIAP. Convenio FONAIAP-CONICIT-Fundacite Aragua, Programa Agenda Cacao. 73p

Whitlock, B., Bayer C., Baum D. (2001). Phylogenetic relationships and floral evolution of the Byttherioideae ("Sterculiaceae" or Malvaceae s.l.) based on sequences of the chloroplast gene *ndhF*. *Sys. Botany* 26:420-437.

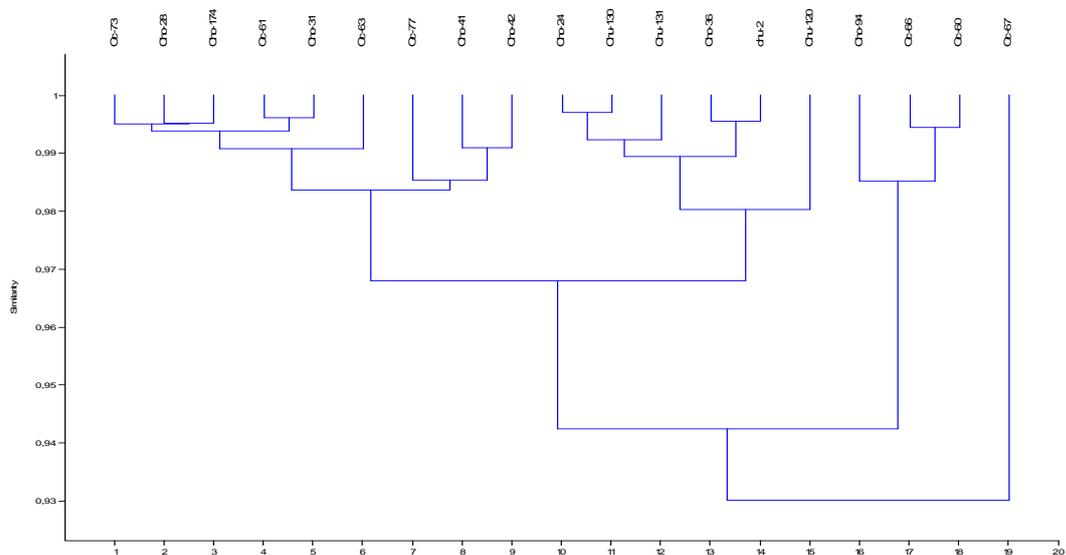
Yonezawa, K., Nomura, T. Morishima, H. (1995). Samples Strategies for use stratified germplasm collections. En: Core collections of plants genetic resources. Ed: Hodgkin, Brown, Van Hintum, Morales. International plants genetics resources institute (IPGRI). Roma, Italia. Pp 35-53.

Zhang, D., Martinez, J., Johnson, E., Somarriba, E., Phillips-Mora, W., Astorga, C., Mischke, S., Meinhardt, L. (2011). Genetic diversity and spatial structure in a new distinct *Theobroma cacao L.* population in Bolivia. *Genet*

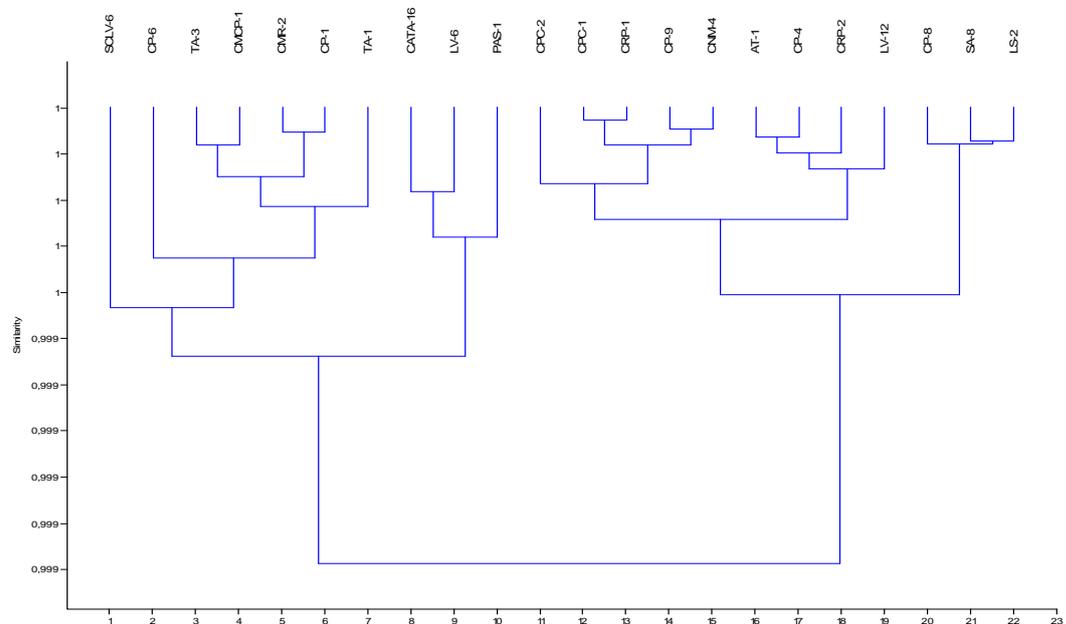
Resour Crop Evol. Springer Science+Business Media B.V. DOI
10.1007/s10722-011-9680-y.

Zhang, D., Gardini, E., Milschk, S., Cernades, L., Chavez, A., Aguila, J.
(2006). Genetic Diversity and Structure of Managed and Semi-natural
Populations of Cocoa (*Theobroma cacao*) in the Huallaga and Ucayali Valleys
of Peru. *Annals of Botany* 98: 647–655.

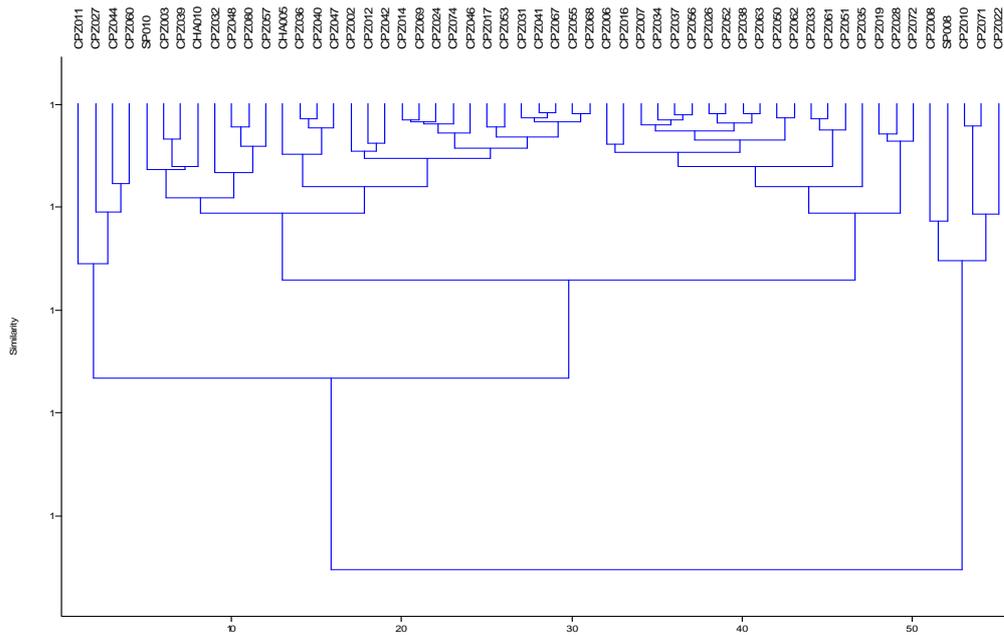
ANEXOS



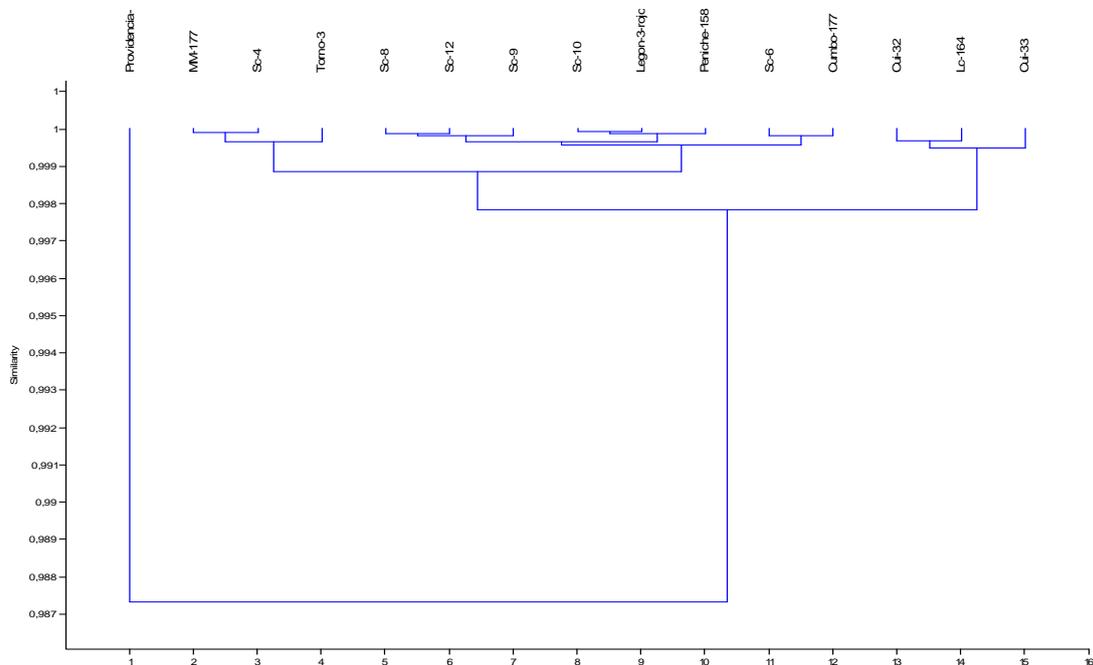
Anexo 1: Análisis UGPMA a partir de distancia euclidiana entre 10 variables cuantitativas y 9 variable cualitativas de la Colección 1945.



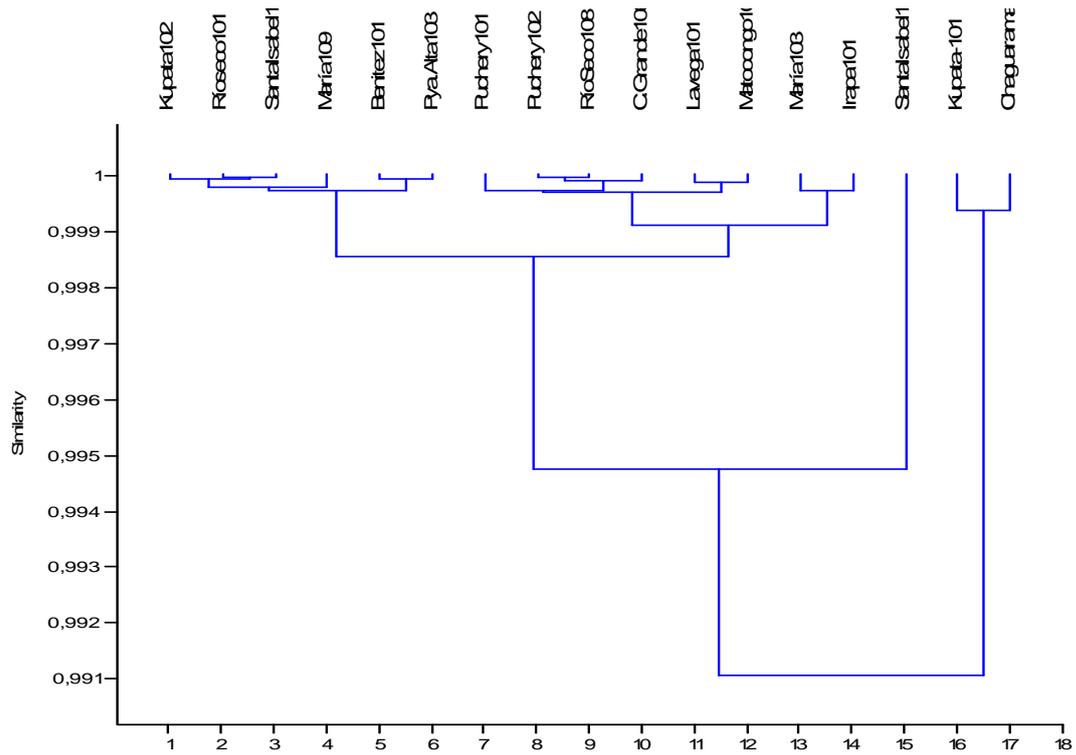
Anexo 2: Análisis UGPMA a partir de distancia euclidiana entre 13 variables cuantitativas y 9 variable cualitativas de la Colección 1995.



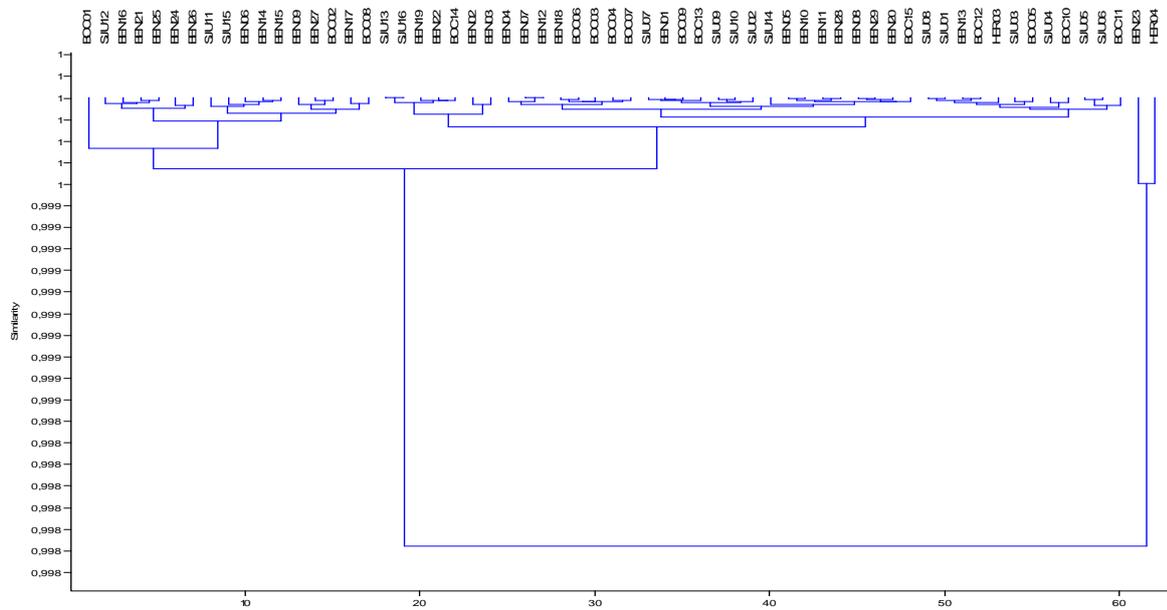
Anexo 3: Análisis UGPMa a partir de distancia euclidiana entre 11 variables cuantitativas y 7 variable cualitativas de la Colección CORPOZULIA.



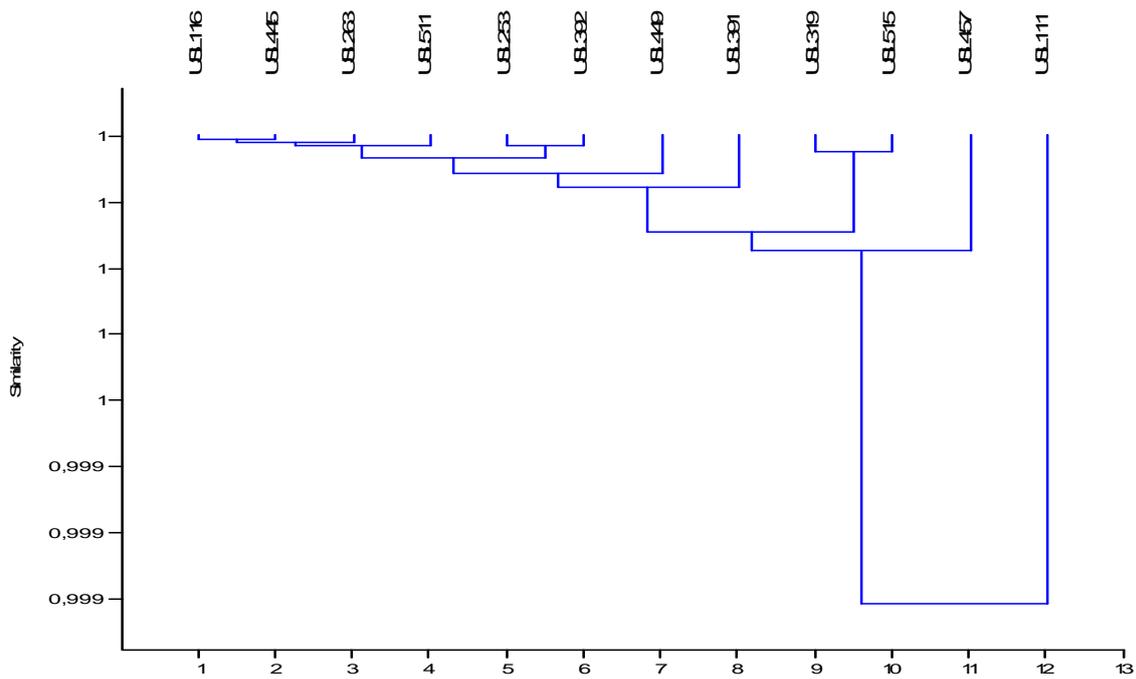
Anexo 4: Análisis UGPMa a partir de distancia euclidiana entre 12 variables cuantitativas y 8 variable cualitativas de la Colección BARLOVENTO.



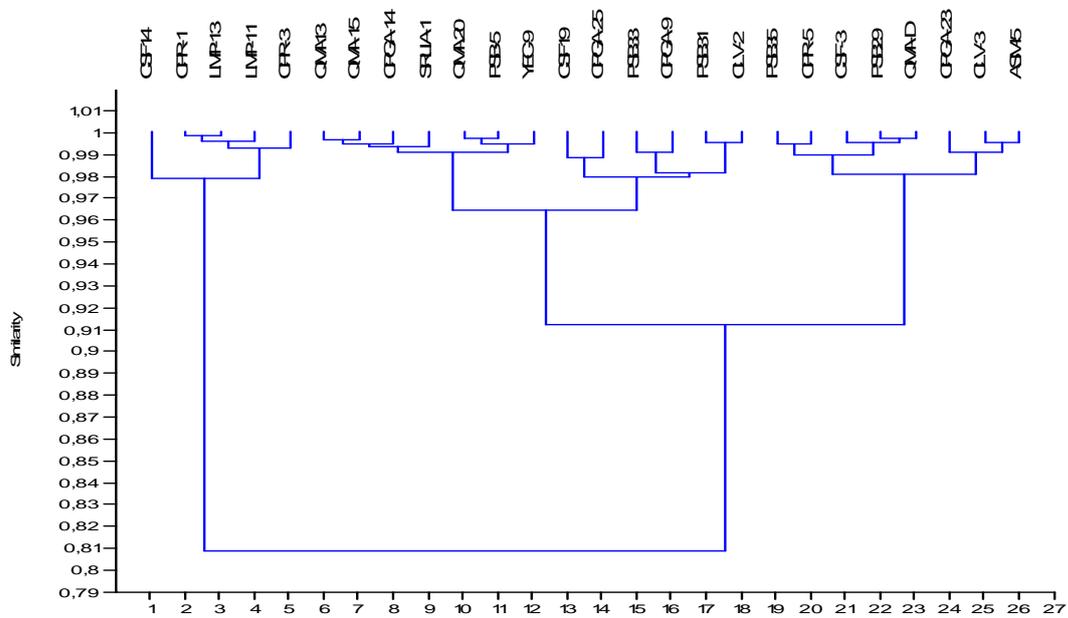
Anexo 5: Análisis UGPMa a partir de distancia euclidiana entre 12 variables cuantitativas y 9 variable cualitativas de la Colección IRAPA.



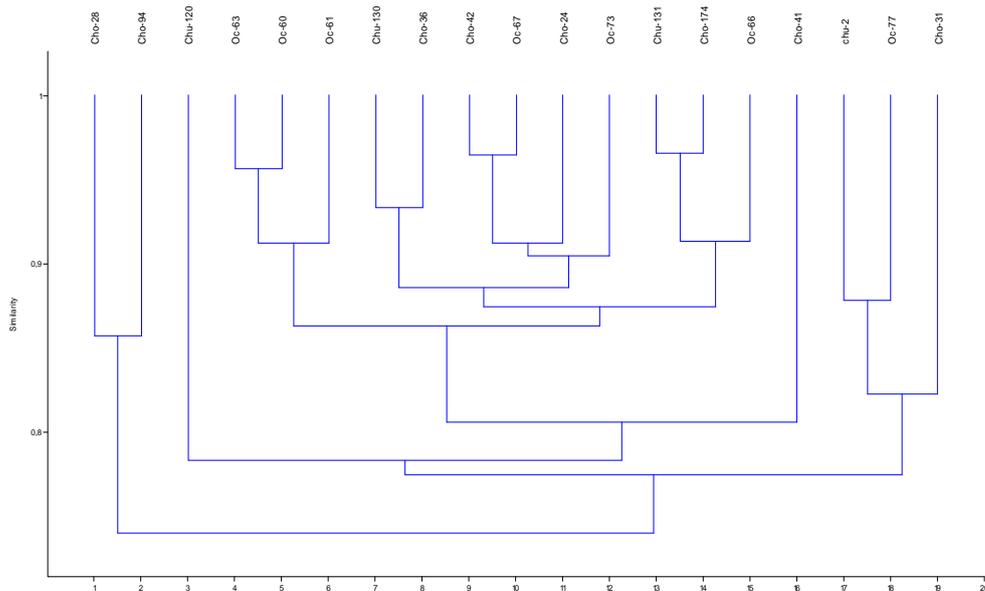
Anexo 6: Análisis UGPMa a partir de distancia euclidiana entre 13 variables cuantitativas y 5 variable cualitativas de la Colección MÉRIDA.



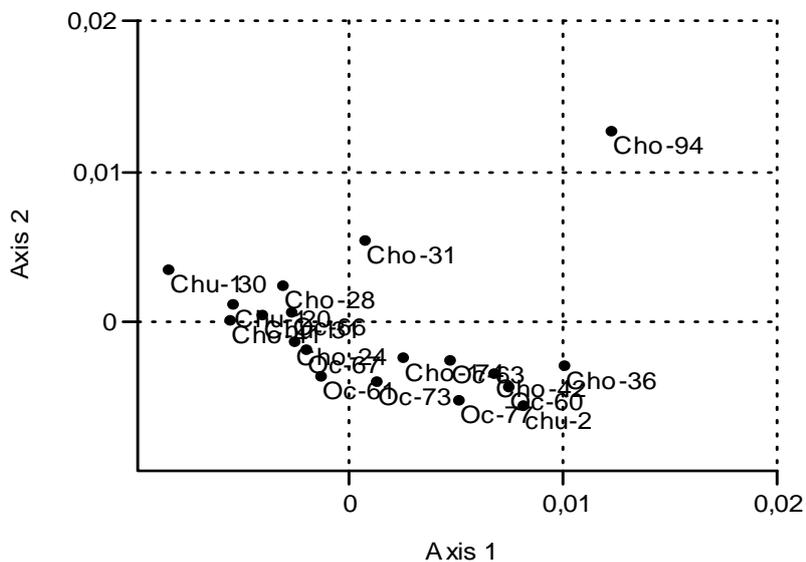
Anexo 7: Análisis UGPMa a partir de distancia euclidiana entre 12 variables cuantitativas y 4 variable cualitativas de la Colección UNESUR.



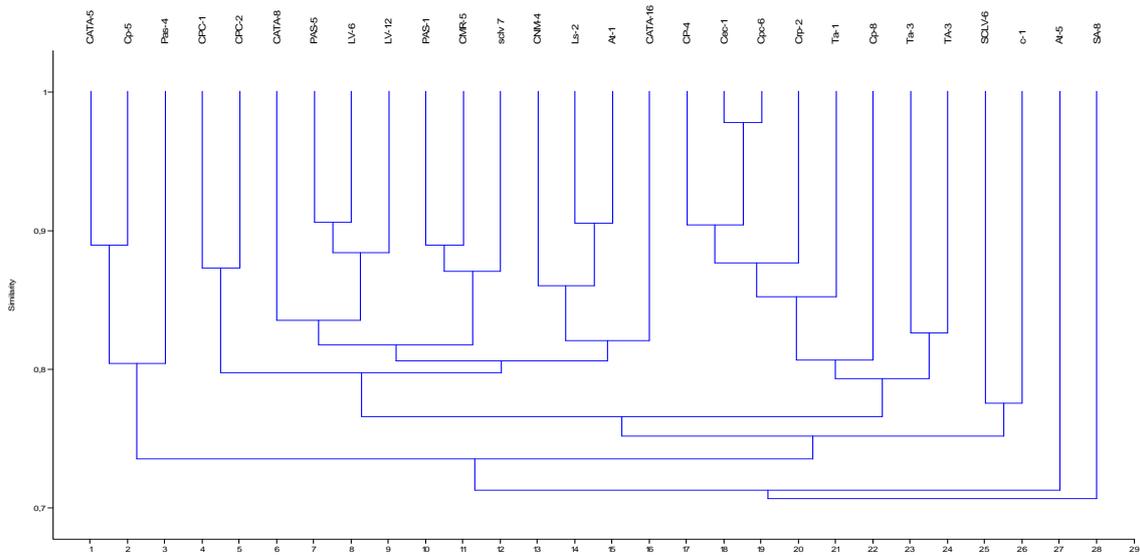
Anexo 8: Análisis UGPMa a partir de distancia euclidiana entre 12 variables cuantitativas y 7 variable cualitativas de la Colección UNESUR.



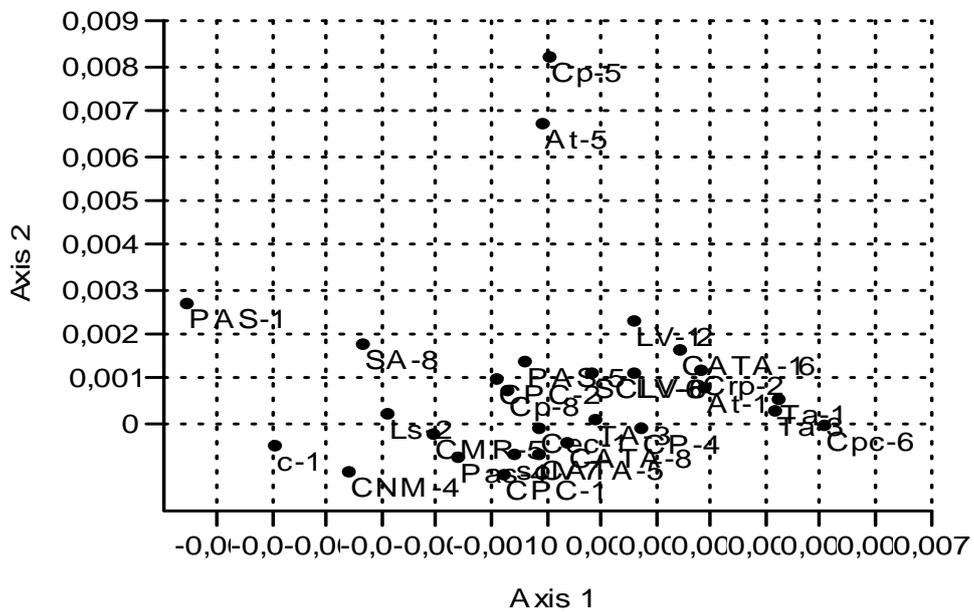
Anexo 9: Análisis UGPMa a partir de datos moleculares utilizando 19 marcadores tipo SSR en individuos de la Colección 1945 (Índice de similitud de DICE).



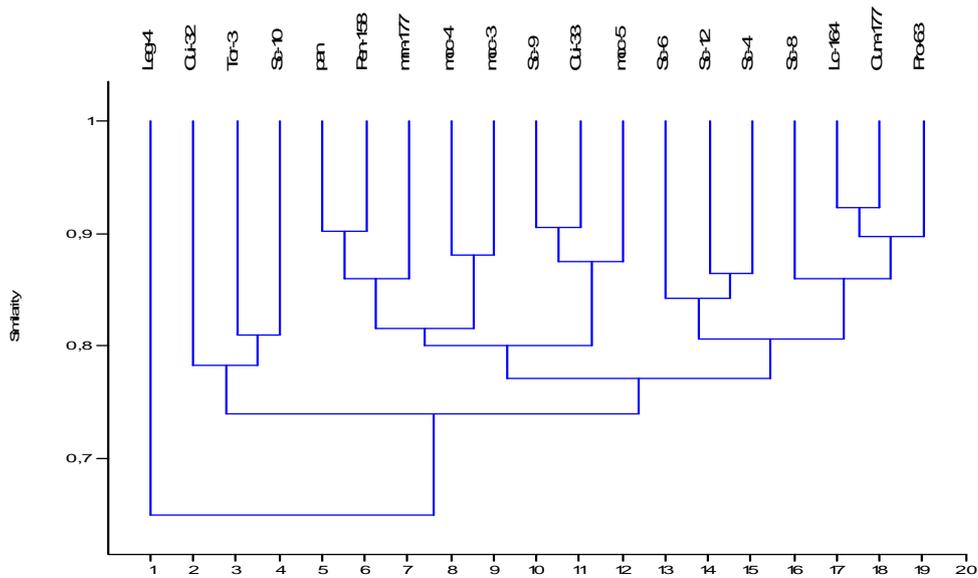
Anexo 10: Grafica de distribución de genotipos de la colección 1945 utilizando el Análisis de Correspondencia.



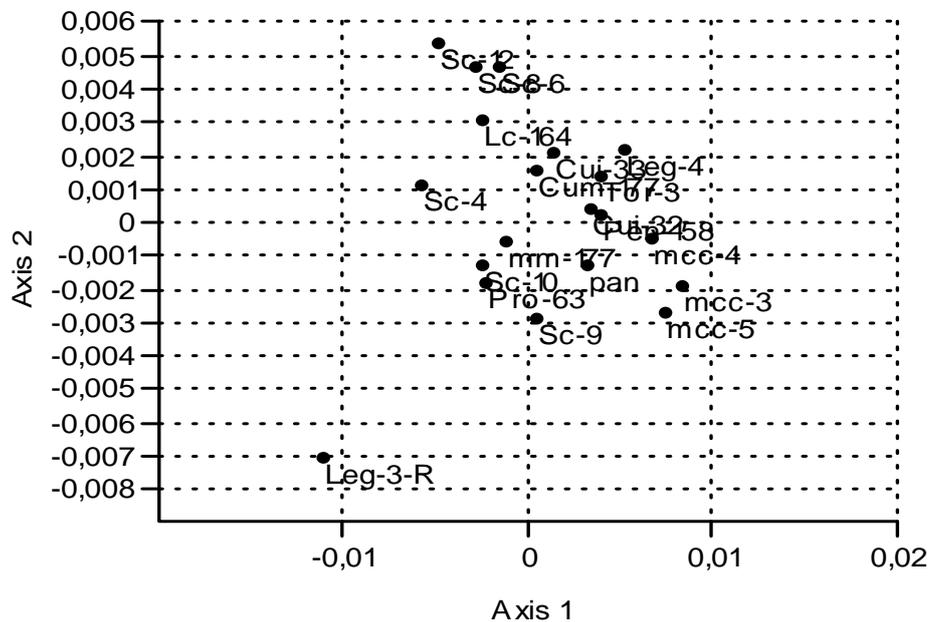
Anexo 11: Análisis UGPMA a partir de datos moleculares utilizando 17 marcadores tipo SSR en individuos de la Colección 1995 (Índice de similitud de DICE).



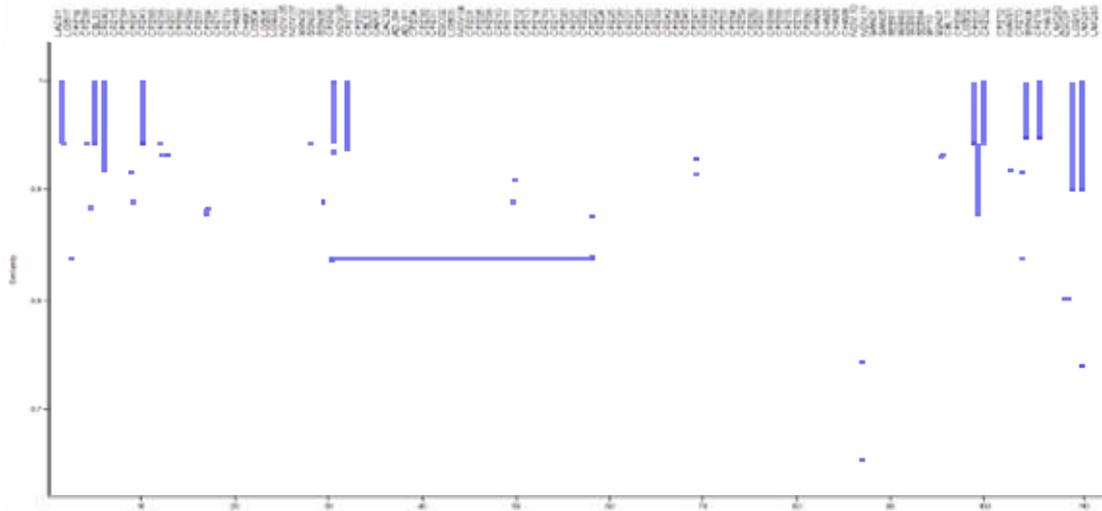
Anexo 12: Grafica de distribución de genotipos de la Colección 1995 utilizando el Análisis de Correspondencia.



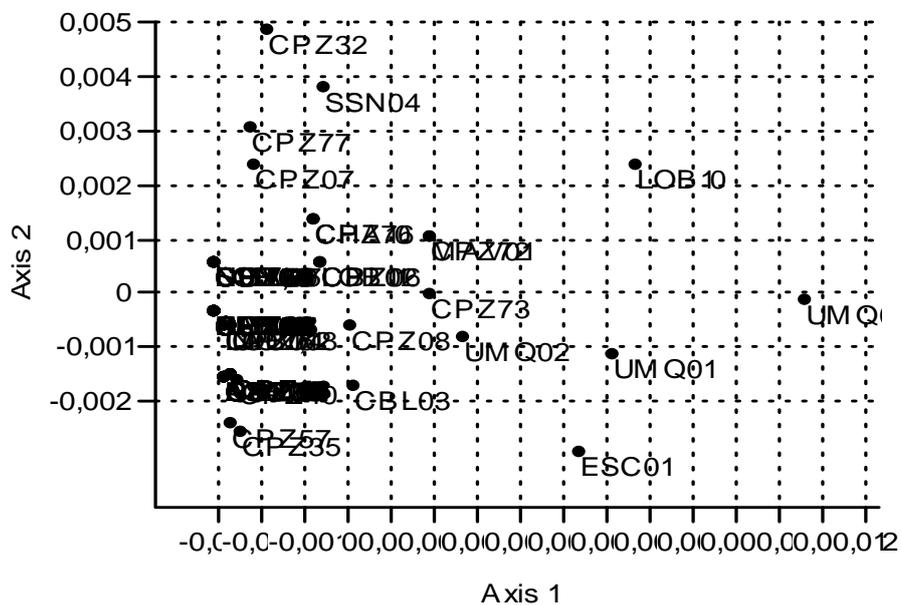
Anexo 13: Análisis UGPMa a partir de datos moleculares utilizando 15 marcadores tipo SSR en individuos de la Colección BARLOVENTO (Índice de similitud de DICE).



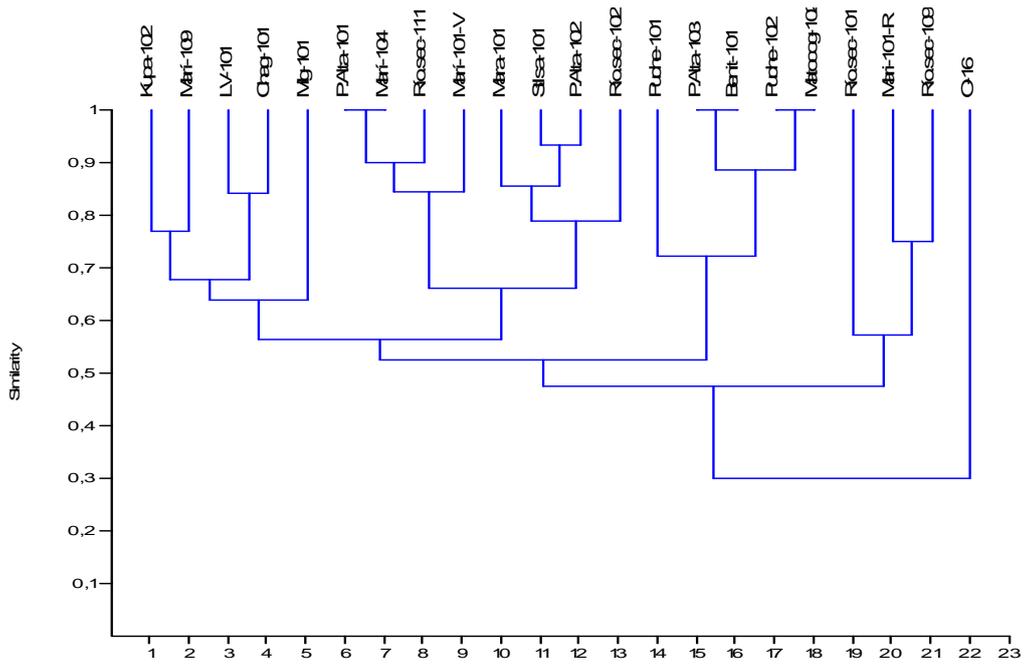
Anexo 14: Grafica de distribución de genotipos de la Colección BARLOVENTO utilizando el Análisis de Correspondencia.



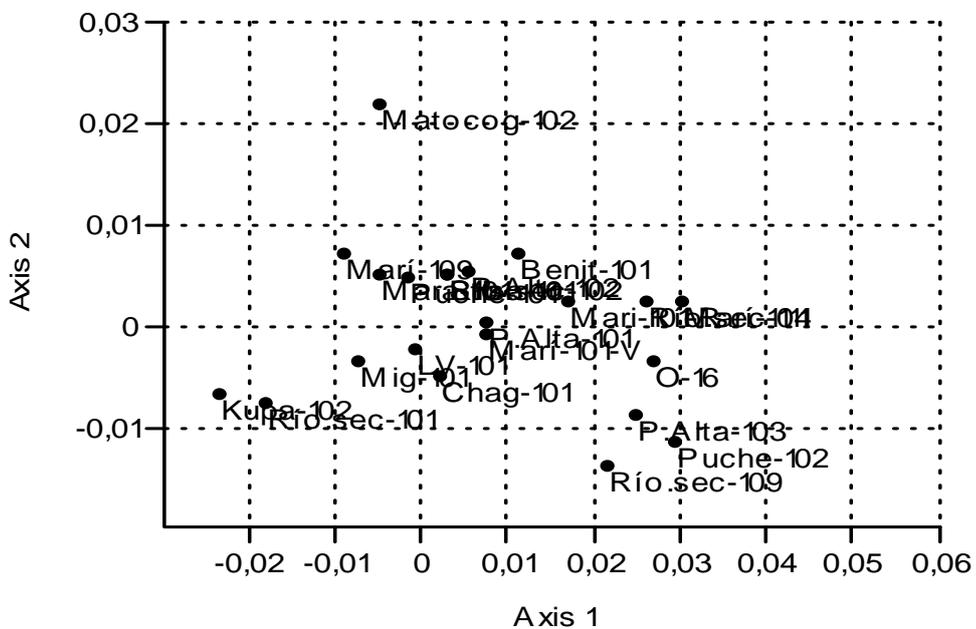
Anexo 15: Análisis UGMA a partir de datos moleculares utilizando 7 marcadores tipo SSR en individuos de la Colección CORPUZULIA (Índice de similitud de DICE).



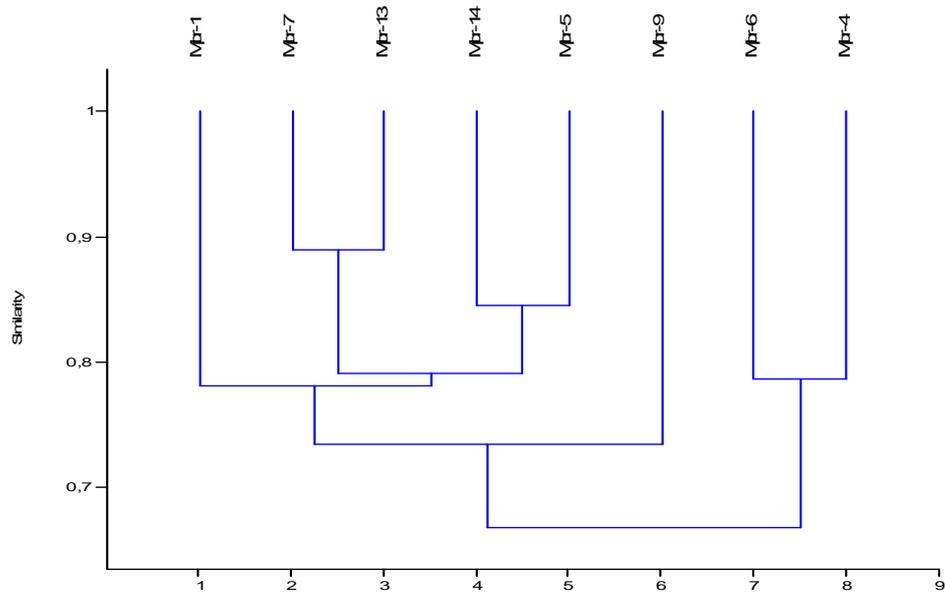
Anexo 16: Grafica de distribución de genotipos de la Colección CORPUZULIA utilizando el Análisis de Correspondencia.



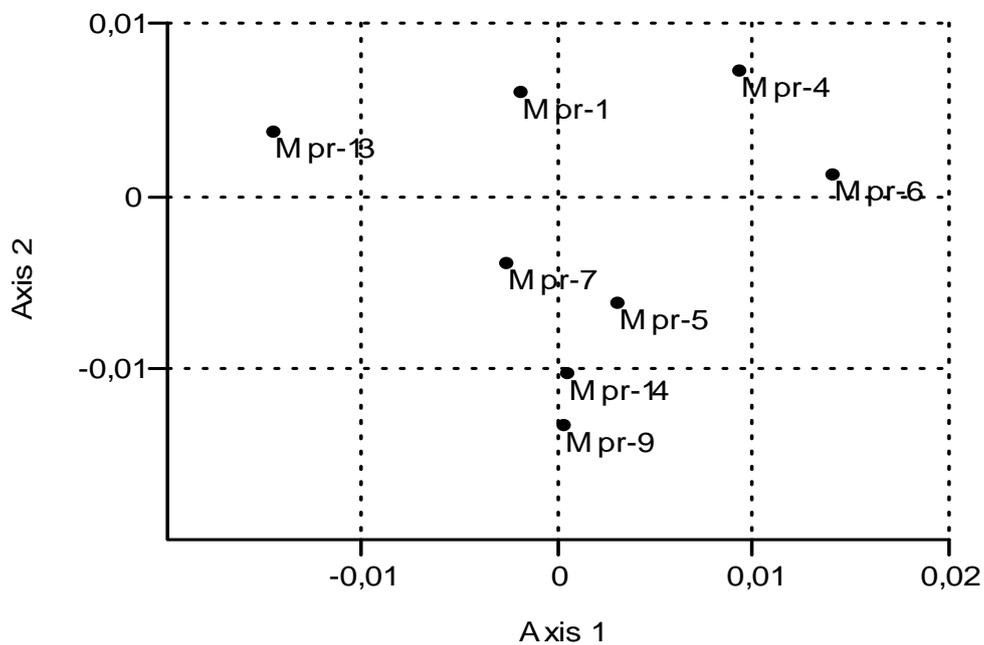
Anexo 17: Análisis UGPMa a partir de datos moleculares utilizando 7 marcadores tipo SSR en individuos de la Colección IRAPA (Índice de similitud de DICE).



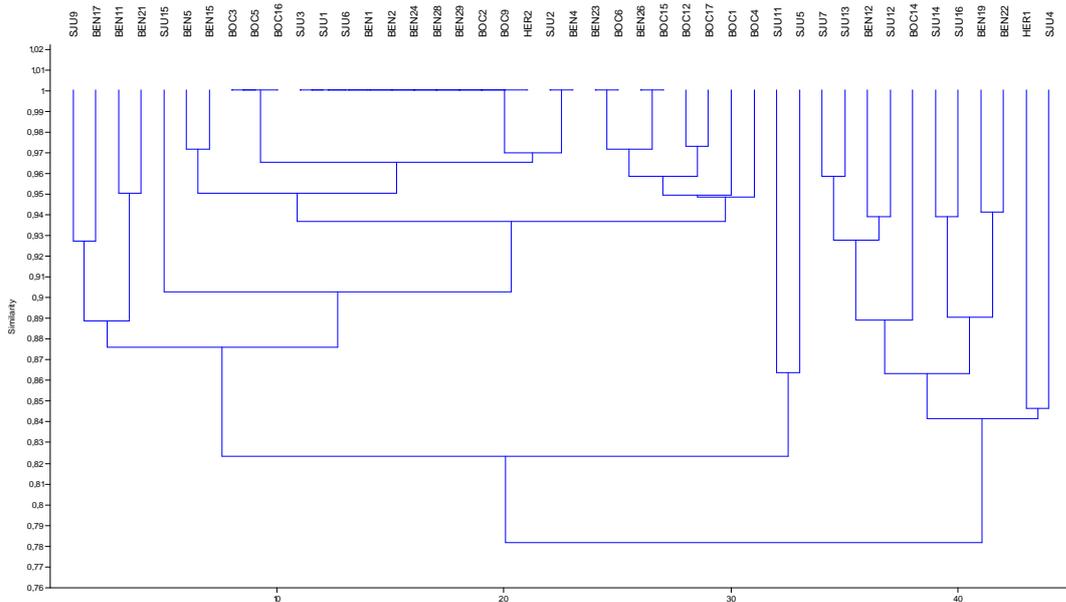
Anexo 18: Grafica de distribución de genotipos de la Colección IRAPA utilizando el Análisis de Correspondencia.



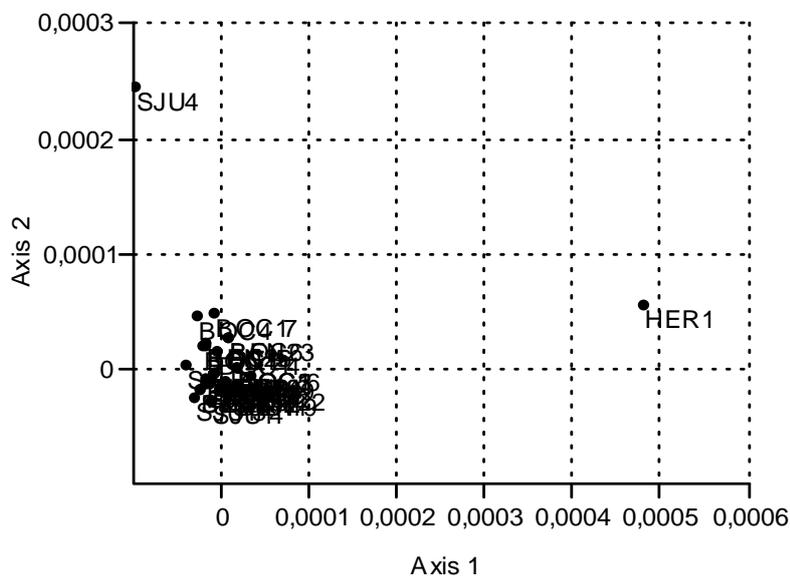
Anexo 19: Análisis UGPMA a partir de datos moleculares utilizando 14 marcadores tipo SSR en individuos de la Colección MARGARITA (Índice de similitud de DICE).



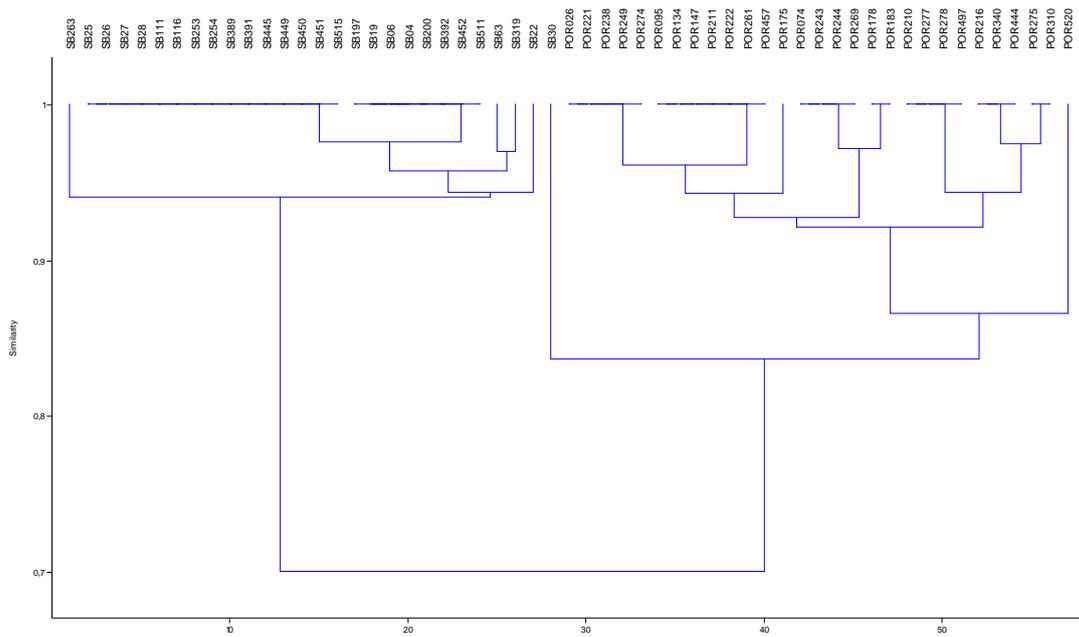
Anexo 20: Grafica de distribución de genotipos de la Colección MARGARITA utilizando el Análisis de Correspondencia.



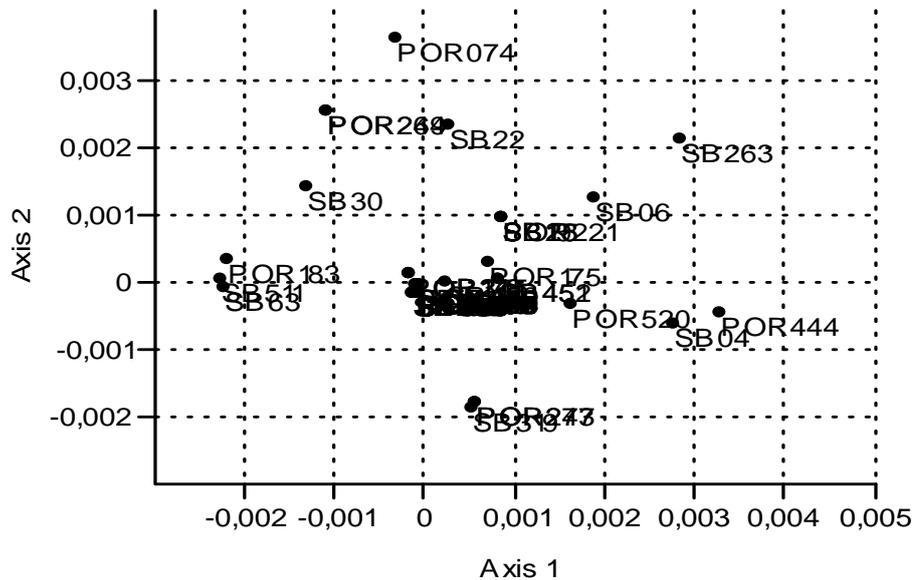
Anexo 21: Análisis UGPMa a partir de datos moleculares utilizando 16 marcadores tipo SSR en individuos de la Colección MÉRIDA (Índice de similitud de DICE).



Anexo 22: Grafica de distribución de genotipos de la Colección MÉRIDA utilizando el Análisis de Correspondencia.



Anexo 23: Análisis UGPMa a partir de datos moleculares utilizando 16 marcadores tipo SSR en individuos de la Colección UNESUR (Índice de similitud de DICE).



Anexo 24: Grafica de distribución de genotipos de la Colección UNESUR utilizando el Análisis de Correspondencia.