

## Potencial de los Marcadores Moleculares para el Rescate de Individuos de *Theobroma cacao* L. de Alta Calidad

Alfredo Vázquez-Ovando\*<sup>1,4</sup>, Francisco Molina-Freaner<sup>2</sup>, Juan Nuñez-Farfán<sup>3</sup>, Miguel Salvador-Figueroa<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro de Biociencias, Universidad Autónoma de Chiapas. Carretera a Puerto Madero km. 2. Tapachula, Chiapas 30700. Tel (fax) 52 962 6427972. E-mail: jose.vazquez@unach.mx

<sup>2</sup>Departamento de Ecología de la Biodiversidad, Instituto de Ecología, Unidad Hermosillo. Universidad Nacional Autónoma de México. Hermosillo, Sonora.

<sup>3</sup>Departamento de Ecología Evolutiva, Instituto de Ecología. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad Universitaria, México D.F.

<sup>4</sup>Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad Universitaria, México D.F.

### RESUMEN

Aunque originario de América tropical, en la actualidad el cacao (*Theobroma cacao* L.), planta alógama, se cultiva en muchas regiones del mundo. Originalmente, los programas para obtener variedades "mejoradas" estuvieron basados en marcadores morfológicos los cuales, poco a poco, se han sustituido cada vez más por marcadores moleculares. Se discuten aquí las principales aplicaciones de las herramientas de la biología molecular en la obtención de mapas de ligamiento de este importante cultivo, *loci* de caracteres cuantitativos implicados en mayor rendimiento agronómico y resistencia a enfermedades, así como en la secuenciación del genoma cuya reciente publicación apertura una importante oportunidad de trabajo dirigido. Se hace énfasis en la falta de información y de investigación en el uso de estas herramientas para la búsqueda de marcadores asociados de manera directa con las características de calidad sensorial de las almendras, siendo ésta una de las razones principales que incentivaron su visionaria domesticación hace unos 4 000 años y su amplia distribución alrededor del mundo hace unos 500 años. Conocer a los individuos que muestran estas características resulta importante, ya que su posible extinción por cuestiones sociales o enfermedades, conllevaría pérdida de información científica y tecnológica valiosa que puede ser empleada con fines de conservación y explotación.

**Palabras clave:** calidad sensorial, chocolate, variedad Criollo, Soconusco

### ABSTRACT

Cacao (*Theobroma cacao* L.) is an allogamous plant native to tropical America, but nowadays it is grown in tropical regions across the world. Originally, programs to obtain "improved" cultivars were based on morphological markers. However, there is a trend to use molecular markers. Here we discuss the main applications of molecular biology tools to obtain linkage maps of this important

crop, to identify quantitative trait loci involved in major agronomic performance and disease resistance, as well as genome sequencing whose recent publication opens an important opportunity for specific investigations. We emphasize on the lack of information and research on the use of these tools to find markers associated directly with the sensory quality characteristics of almonds, which is one of the main reasons that encouraged its visionary domestication 4 000 years ago and its wide distribution around the world 500 years ago. Knowledge of the individuals who exhibit these characteristics is important, because it's possible extinction by social or diseases entail loss of valuable scientific and technological information that can be used for conservation and exploitation.

**Key words:** sensory quality, chocolate, Criollo cultivar, Soconusco

## INTRODUCCIÓN

*Theobroma cacao* L. (cacao) es el cultivo de mayor importancia comercial a nivel mundial de las 22 especies que comprenden el género *Theobroma* (Schnell *et al.*, 2005); otras que también se comercializan pero solo a nivel local son *T. bicolor* Humb. y Bonpl. (pataste o pataxte), *T. grandiflorum* Schum. (cupuazú o copuazú) y *T. angustifolium* Moçño y Sessé (cacao de montaña o de mono) (Cervantes-Martínez *et al.*, 2006). Además de la relevancia industrial, el cacao es medular también desde la perspectiva social, pues su cultivo está vinculado, por sus requerimientos edafoclimáticos, a países, básicamente en desarrollo localizados en la franja ecuatorial de América, Asia y África y del que dependen una gran cantidad de agricultores (Efombagn *et al.*, 2007).

La importancia del cacao radica en que, de éste árbol se obtienen frutos (mazorcas) de las cuales, se extraen de 30 a 50 semillas (almendras) por mazorca, que son utilizadas ampliamente en las industrias alimentaria, farmacéutica y cosmética; las cuales demandan manteca de cacao (grasas) y torta de cacao o cocoa (obtenido al extraer las grasas) o bien licor de cacao (pasta de

cacao) para la elaboración de chocolates. Esta industria genera divisas por unos 73 000 millones de dólares (Ploetz, 2007) y de esta actividad dependen unos 60 000 empleos en todo el mundo (Lanaud *et al.*, 2009).

Desafortunadamente su permanencia como sistema de producción, sobretodo en el Neotrópico, se ve amenazada por enfermedades (Brown *et al.*, 2007; Clement *et al.*, 2003a; Queiroz *et al.*, 2003) que están orillando a quienes practican esta actividad a sustituir su cultivo o, en el mejor de los casos establecerlos con nuevos individuos que ofrezcan resistencia a los embates de los antagonistas. Esta característica que parece ser ventajosa desde la perspectiva de la producción, conlleva dos marcados aspectos negativos: 1). la pérdida del ecosistema existente en los cultivos con la consecuente disminución en la diversidad biológica, y aumento en el potencial de erosión de suelos y, 2). demerita la aceptación sensorial en los mercados más exigentes, puesto que los genotipos con mayor tolerancia o resistencia a enfermedades generalmente están limitados en características de calidad sensorial de las almendras. Enfatizando en el segundo aspecto, los criterios de selección

más difundidos en los programas de mejoramiento son, precisamente tolerancia o resistencia a enfermedades (principalmente a moniliasis [*Moniliophthora roreri* Evans, Stalpers, Samson & Benny], mancha negra [*Phytophthora* spp.] y escoba de bruja [*Moniliophthora perniciosa* Stahel]) (Phillips-Mora *et al.*, 2005), el rendimiento agronómico (Irizarry & Goenaga, 2000) y solo en menor medida, la calidad de grano.

Las almendras de cacao de calidad, provienen de la variedad Criollo que, a diferencia del cultivar Forastero y del Trinitario (obtenido por la recombinación de los dos primeros), fue domesticada (Whitkus *et al.*, 1998) y empleada como materia prima en la alimentación de los pueblos precolombinos de Centroamérica hace unos 3 800 años (Powis *et al.*, 2011). El pueblo Olmeca (1800 a.C.-100 a.C), ubicado en lo que hoy es el estado de Veracruz fue el que originalmente cultivo esta planta (Powis *et al.*, 2011), después los Mokayas e Izapeños (1100 a.C.-1200 d.C.) en la región Soconusco (Chiapas) (INAH, 2007) y Mayas en la selva Lacandona, (Chiapas) Tabasco y península de Yucatán (Whitkus *et al.*, 1998). El empleo como moneda de las semillas de cacao da cuenta de la importancia social, religiosa y económica que llegó a tener este cultivo.

El hallazgo de descendientes aislados de cacaos criollos en la región poblada por los pueblos precolombinos, hasta nuestros días (Motamayor *et al.*, 2002; Whitkus *et al.*, 1998) muestra que, pueden haber fungido como reservorio genético, y al recombinarse con

las accesiones introducidas a mediados del siglo pasado, dieron origen a gran parte de la variabilidad presente en los cultivos de Mesoamérica. Lo anterior convierte a las plantaciones asentadas en esta parte del mundo, junto con las características edafoclimáticas, en candidatas a conservar y exhibir individuos con la calidad requerida por los mercados más exigentes. Baste como muestra el reciente interés de la comunidad europea al adquirir parte importante de la cosecha de cacao programada para el año 2012 y reconocerlo como de uno de los mejores cacaos del mundo (Chiapas.gob, 2010).

Como anteriormente se comentó, los programas de mejoramiento del cacao enfocaron su atención en características fenológicas de interés agronómico las cuales, están fuertemente influenciados por el ambiente (Azofeita-Delgado, 2006). A partir de la década de los ochenta del siglo pasado se empezaron a incorporar marcadores moleculares como herramientas auxiliares en los estudios y programas relacionados con esta planta. Se han empleado isoenzimas (Lanaud, 1986), AFLP (Lerceteau *et al.*, 1997; Perry *et al.*, 1998; Queiroz *et al.*, 2003), RAPD (Lerceteau *et al.*, 1997; Moreno *et al.*, 2004; Whitkus *et al.*, 1998), y SSR ó microsatélites (Trognitz *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2006a; 2006b) con el objetivo de asociarlas a características de interés comercial (detallado más adelante) como el rendimiento agronómico y resistencia a enfermedades. Dichos marcadores también se han empleado para reducir la redundancia

y etiquetado erróneo, conocer la estructura de las poblaciones tanto en bancos de germoplasma como *ex situ*, así como para analizar la genealogía de las accesiones.

Pese al gran número de trabajos que emplean marcadores moleculares, muy poco se ha abordado sobre su uso y la asociación de éstos con la calidad que ostentan las almendras de cacao. En este trabajo se hace un repaso sobre la importancia del cacao, los grandes avances para descifrar los secretos guardados en su genoma, se particulariza en los hallazgos con el uso de los marcadores moleculares asociados con diversas características de interés en el cacao y se discute acerca del potencial de éstos para ser correlacionados con las características de calidad.

## SITUACIÓN ACTUAL DEL CULTIVO DE CACAO

Para el año 2009, se produjeron, a nivel mundial, poco más de 4.2 millones de toneladas de grano de *T. cacao*, reporte muy similar al obtenido los dos años anteriores (2007-2008). México ocupó el lugar trece en producción con 22 660 toneladas (en 2009), lo que representó un ingreso de 23.5 millones de dólares, producción por arriba de Venezuela, Malasia, Uganda e India (FAO, 2011), y mostrando un descenso gradual respecto de años anteriores (Tabla 1). En México, el 95% de cacao se obtiene de las plantaciones en los estados sureños de Tabasco y Chiapas; tan solo en la región Soconusco (Chiapas) se cultivan 11 500 ha (Molina & Córdova, 2006) y de donde se han reportado morfotipos del cultivar Criollo.

**Tabla 1.** Producción de almendras de cacao seco en México en la última década.

Año	Producción (Ton)
1999-2001	38 613
2003-2005	43 435
2007	29 910
2008	27 548
2009	22 660

Fuente: FAO, 2011.

De las tres variedades cultivadas, los Trinitarios y Forasteros [de los cuales se hipotetiza que existen dos grupos genéticos (los Forasteros del Alto Amazonas UA y los del bajo Amazonas LA) Efombagn *et al.*, 2009] ocupan cerca del 95% del total

cultivado, en países del Oeste de África, Brasil y Ecuador, y del cual se obtiene igual porcentaje del chocolate que se comercializa. De la variedad Forastero, se obtiene el cacao a granel o “básico” y contribuyó como parental en la generación de los Trinitarios

hace unos 250 años (Motamayor *et al.*, 2003).

La variedad Criollo, clasificada como subespecie cacao (Cuatrecasas, 1964), y del cual se obtiene el cacao “fino” contribuye a la producción mundial con el 5% (Afoakwa *et al.*, 2008); aunque su consumo aún está revalorándose, se encuentra en expansión y es mucho más exigente respecto a la calidad de la materia prima y de los productos derivados de ésta. Este mercado *gourmet* paga sobrepuestos por almendras obtenidas del genotipo Criollo y destina el grano a la elaboración de chocolates “finos” altamente cotizados en Estados Unidos y Europa. Esta situación, sumada a otras características de mercadeo, que premia los productos con denominación de origen y simplifica los requerimientos de comercio, estimula la conservación, cultivo y comercialización de razas o genotipos de calidad “superior”.

Se ha reportado, que los individuos Criollos “nativos” o “antiguos” (Motamayor *et al.*, 2002; Whitkus *et al.*, 1998) estarían asociados con menor rendimiento agronómico, al poseer mazorcas de menor tamaño y menos número de almendras por fruto, además de una marcada susceptibilidad a *Moniliophthora roreri* y *Phytophthora palmivora*. La moniliasis, provocada por *M. roreri*, desde su primer reporte en México (Phillips-Mora *et al.*, 2006) ha provocado el abandono del cultivo de cacao, o la reducción, tanto del área cultivada como de la producción de grano (cerca del 50% en los últimos seis años). De no atenderse esta situación y establecer programas serios de rescate de genotipos de

interés (pero no solo desde la perspectiva del rendimiento), se vislumbra un horizonte poco alentador, ya que los cacaocultores optan por cambiar el sistema a otro que demande menores esfuerzos y mayores rendimientos, siendo muchas veces la elección poco acertada. Los cacaotales, además del beneficio social y económico que representan, contribuyen como la parte soporte de nichos ecológicos para una gran diversidad de especies vegetales y animales, encontrando desde especies maderables, florales y animales como mamíferos, aves y ardillas.

La existencia de individuos criollos en Mesoamérica, es importante por varios motivos, muestra evidencia inequívoca de su cultivo y domesticación, además que ha contribuido con la diversidad genética presente en las plantaciones intensivas del sur de México. Pese a que los individuos de cacao presentan un sistema de entrecruzamiento preferentemente alogamo, se ha documentado una clara distinción entre sistemas de auto-incompatibilidad de los genotipos Forasteros y de auto-compatibilidad de los Criollos (Cheesman, 1944). Sin embargo, existen reportes de segregación hacia los dos sistemas de polinización por parte de los dos genotipos (Bartley & Cope, 1973). Hoy día y dada la fuerte recombinación de parentales por parte de algunos programas y cacaocultores, buscando aumentar el vigor híbrido (heterosis) como la principal responsable de mejoramiento, se pueden hallar plantaciones de cacao en el Soconusco, Chiapas (como en otras partes del mundo) con individuos

que responden a ambos sistemas de entrecruzamiento tal como ha demostrado Efombagn *et al.* (2009) ocurre en la recombinación abierta de poblaciones cultivadas y de invernadero en Camerún donde ha encontrado hasta 28.3% de descendencia proveniente de polinización no controlada. Los individuos que descienden de estos sistemas de entrecruzamiento, se vuelven un importante reservorio de genes que potencialmente pueden exhibir las características de sus parentales, siendo la calidad sensorial (aroma, sabor y textura principalmente) una de éstas (cuando la heterosis y la auto-incompatibilidad en genotipos Criollos coinciden), y que mejora las características agronómicas de rendimiento y tolerancia a enfermedades, como se ha demostrado puede ocurrir en las variedades Trinitario (Johnson *et al.*, 2009).

Por otro lado, Aikpokpodion (2010), llevó a cabo una correlación entre marcadores agro-morfológicos con individuos de interés desde el punto de vista de la calidad. Reporta, que factores ajenos a la genética del cacao, tales como las condiciones edafoclimáticas del lugar (Nigeria), permiten el desarrollo de características únicas de sabor en razas "Amelonadas" nativas de ese país Africano, derivadas de Forasteros del Bajo Amazonas y del Amelonado del Oeste Africano. Este estudio, además de poner en evidencia lo que ya se ha documentado ampliamente, acerca de la influencia del ambiente sobre la expresión de los marcadores morfológicos; apoya la hipótesis de que un microclima específico puede potenciar las características sensoriales de

los productos y, en el caso particular del cacao se comentó antes de la preferencia de los consumidores más exigentes hacia productos obtenidos de las plantaciones de Soconusco (Chiapas).

## **LA UTILIDAD DE LOS MARCADORES MOLECULARES PARA COMPRENDER LOS SECRETOS DEL CACAO**

### ***Marcadores moleculares***

Previamente se enfatizó, que hasta antes de las primeras aplicaciones de los marcadores moleculares en estudios de genética y mejoramiento de organismos, los marcadores por elección, eran aquellos regulados por genes asociados a caracteres morfológicos y de rendimiento, en general fenotipos de fácil cuantificación e identificación visual. Sin embargo, el limitado número de estos marcadores y la interferencia epistática o ambiental acotaron su expansión (Azofeita-Delgado, 2006). La revolución en este ámbito se inició con el descubrimiento y utilización de los marcadores moleculares, los cuales se desarrollaron rápidamente y su número fue ampliado, expandiendo su aplicación a prácticamente a todas las especies de organismos vivos y acelerando los avances en los programas de búsqueda de organismos de interés.

En el caso de *T. cacao*, su empleo ha resultado de gran utilidad en estudios relacionados con diversos aspectos de la biología y genealogía de esta planta tropical. Así, han sido auxiliares en estudios de etiquetado de accesiones en los bancos de germoplasma más importantes del mundo,

donde la clasificación y muchas veces el etiquetado erróneo (Motamayor *et al.*, 2008; Motilal *et al.*, 2011; Takrama *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2009, 2008) se realizó en base a caracteres morfológicos. Otras aplicaciones incluyen el estudio de la diversidad genética tanto en bancos de germoplasma como en campos de cultivo, estudios de la genealogía de individuos y poblaciones y caracterización del germoplasma, básicamente orientado a características agronómicas de interés.

Los primeros marcadores moleculares (no basados en ADN) empleados en cacao fueron las isoenzimas (Lanaud, 1986), pese a las desventajas inherentes a esta herramienta, como son el bajo número tanto de *loci* como en el polimorfismo, en su momento ofrecieron excelentes resultados y encontraron gran aplicación en estudios de diversidad genética, en la identificación de genotipos, así como en la construcción de mapas de ligamiento (Lachenaud *et al.*, 2004; Ronning & Schnell, 1994; Sounigo *et al.*, 2005; Warren, 1994).

Otro tipo de marcadores que más frecuentemente se usan en cacao, son los marcadores de ADN, específicamente, los polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP), polimorfismo de ADN amplificado al azar (RAPD), polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados (AFLP), y secuencias simples repetidas (SSR). Estos marcadores difieren en abundancia genómica, el nivel de polimorfismo detectado, la especificidad hacia el locus, la reproducibilidad, los requerimientos técnicos y el costo (Guiltinan *et al.*, 2008).

Los RFLP, se han empleado dada su alta reproducibilidad y la naturaleza alélica codominante, en la construcción de mapas de ligamiento genético y etiquetado de genes y en la localización de *loci* que afectan a caracteres cuantitativos (QTL) vinculados a fenotipos de importancia agronómica (Lanaud *et al.*, 1995; Risterucci *et al.*, 2000) y la evaluación de la diversidad genética (Motamayor *et al.*, 2002; N'goran *et al.*, 1994). Los principales inconvenientes de estas herramientas son, debido a que las sondas de RFLP son siempre específicas para un número limitado de lugares, RFLP no es una herramienta muy eficaz para la identificación de genotipos de cacao, no se puede automatizar su aplicación y la generación de datos es laboriosa y puede ser costosa (Guiltinan *et al.*, 2008).

Los RAPD's fueron los primeros marcadores basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que se aplicaron para la caracterización genética del cacao (Wilde *et al.*, 1992). Se ha empleado dada la facilidad de su aplicación, para identificación clonal, clasificación de acuerdo al origen geográfico (Russell *et al.*, 1993), así como en estudios de etiquetado incorrecto y la duplicidad (Faleiro *et al.*, 2002; Sounigo *et al.*, 2005). Los RAPD también han sido ampliamente utilizados en los análisis de la diversidad genética (Figueira *et al.*, 1994; Lerceteau *et al.*, 1997; N'goran *et al.*, 1994; Whitkus *et al.*, 1998). Aunque este sistema es técnicamente fácil de realizar, se obtiene una baja reproducibilidad entre experimentos y entre laboratorios. RAPD no mide directamente la heterocigosidad, lo que hace

que sea menos útil para determinar el genotipo en vez de simplemente distinguir entre clones. El número de marcadores variables que pueden ser generados por RAPD es pequeño y no es adecuado para aplicaciones de alto rendimiento (Guiltinan *et al.*, 2008).

Los AFLP ofrecen las ventajas combinadas de los RAPD y RFLP (Vos *et al.*, 1995), como alto polimorfismo y reproducibilidad aceptable entre laboratorios, no requerir datos de la secuencia para la construcción de *primers*. Sin embargo, su uso en cacao ha sido limitado, debido a la dominancia alélica, lo que no permite medir la heterocigosidad, esto debido a la posible falta de homología en la comigración de los fragmentos pertenecientes a diferentes *loci*.

## Los microsatélites

Las secuencias simples repetidas (SSR) por su nombre en inglés, *Simple Sequence Repeat* o microsatélites son segmentos cortos de ADN (de 1 a 10 pb), que se repiten

en serie y de forma aleatoria a través de todo el genoma de los seres vivos. Existen varias clasificaciones, pero la más común es de acuerdo al número de nucleótidos que posee el motivo repetido, sea como: mono, di, tri, tetra, penta o hexanucleótido (Figura 1). Poseen varias ventajas frente a otros marcadores (minisatélites, RFLP, RAPD, AFLP, etc.); sean o no basados en PCR, ya que son muy polimórficos como consecuencia de la alta tasa de mutación en los *loci*. Puesto que, la repetición no codifica para formar ninguna proteína, y debido a que las secuencias de ADN repetitivo pueden recombinarse y expandirse con más frecuencia, estas regiones son a menudo altamente variables y consecuentemente útiles para medir el polimorfismo entre especies o variedades muy relacionadas (Azofeita-Delgado, 2006), característica ampliamente deseable en los estudios poblacionales para evaluar la diversidad genética.



**Fig. 1.** Microsatélite di-nucleótido (CT)<sub>14</sub> mTcCIR1 y cebadores para su amplificación. Número de accesión Y16883. (Lanaud *et al.*, 1999).

Además, estos marcadores son generalmente neutros con relación a los efectos fenotípicos y efecto epistático o pleiotrópico mínimo o nulo; presentan herencia mendeliana simple y revelan codominancia (pudiéndose diferenciar los individuos homocigotos de los heterocigotos),

se encuentran de forma abundante (están uniformemente dispersos a través del genoma, aproximadamente cada 10 Kbp), se requieren solo pequeñas cantidades de ADN, son relativamente fáciles de medir (aunque no de estandarizar) y analizar, pueden automatizarse para el análisis de muchas



muestras en tiempos relativamente cortos. Debido a estas importantes ventajas, los microsatélites han sido el método de elección para conducir investigaciones en cacao en la última década.

## **Principales aplicaciones de los SSR en los estudios del Cacao**

Por las características antes apuntadas, los microsatélites han sido empleados para analizar diversos aspectos del manejo de germoplasma de cacao, entre las que destacan:

1. En la identificación de las accesiones duplicadas y mal etiquetado en colecciones de germoplasma. Debido a las limitantes para discriminar entre accesiones, ya que sus conclusiones tenían poco rigor estadístico (Sounigo *et al.*, 2005), los AFLP's y RAPD's, fueron sustituidos en su totalidad por los SSR. Los avances en este sentido, han permitido establecer mediante la creación de un consorcio internacional, un conjunto de 15 microsatélites estándares para el etiquetado correcto de las accesiones y la identificación inequívoca, los cuales son utilizados en varios de los bancos de germoplasma alrededor del mundo, y han permitido identificar por ejemplo, de entre 105 accesiones, 10 grupos mal etiquetados (Zhang *et al.*, 2006b).

2. En estudios de diversidad genética, relaciones genealógicas y filogeografía. Los estudios buscando explicar la diversidad y estructura poblacional tanto de colecciones como de plantaciones de cacao, han mostrado un incremento pronunciado con la aparición de los microsatélites y más aún con

el apoyo de la estadística Bayesiana. Así por ejemplo Bhattacharjee *et al.* (2004) hallaron baja tasa de adopción de germoplasma mejorado en los campos agrícolas de diferentes zonas agroecológicas en Nigeria. De los pocos estudios conducidos en Mesoamérica, Ruiz *et al.* (2011), empleando diez microsatélites analizaron 70 accesiones de Nicaragua, encontraron deficiencia de heterocigosis, pero un nivel moderado de diversidad genética pese al corto historial de cultivo extensivo en ese país reportado por Trognitz *et al.* (2011) y lo atribuyen a un posible muestreo entre consanguíneos o derivados mayoritariamente de autofecundaciones o, como resultado de diferente frecuencia alélica entre poblaciones.

También con apoyo de los SSR se ha hipotetizado en varios reportes acerca de que la Amazonia Peruana posee alto nivel de diversidad genética, presentando estructura espacial, además de alta diversidad alélica en poblaciones cultivadas (Zhang *et al.*, 2006a). Del mismo modo, Johnson *et al.* (2009), encontraron una estrecha relación genética entre genotipos "Trinitarios selectos" y los posibles parentales, colectados 70 años antes. Además obtuvieron, usando 35 microsatélites una diferenciación espacial de los genotipos Trinitarios y Criollos (agrupados en un *clúster*) al compararlos con poblaciones del Alto y Bajo Amazonas y de Ecuador obtenidos de banco de germoplasma.

Por su capacidad para revelar codominancia, los microsatélites resultan muy adecuados en la búsqueda y

esclarecimiento de relaciones genealógicas y estas investigaciones, a su vez son sumamente útiles para comprender el flujo de genes en las poblaciones naturales, la contribución de los genotipos antiguos en la estructura de las poblaciones actuales así como para rastrear la posible contribución de parentales en los programas de mejoramiento de variedades.

Otros estudios además han abordado la búsqueda de patrones de genealogía asociados con la geografía presente o pasada (filogeografía), en el supuesto de que, al conocer los patrones espaciales de biodiversidad, los procesos de flujo de genes, los efectos históricos y climáticos sobre la distribución de la diversidad genética, se tendrán más herramientas para la conservación sostenible y el uso efectivo de germoplasma de cacao (Guiltinan *et al.*, 2008).

En este sentido, Trognitz *et al.* (2011), evaluaron la composición alélica y la estructura genética a partir de 44 plantaciones y dos accesiones silvestres de Nicaragua, demuestran estructura espacial entre parcelas cultivadas la cual es atribuida por el manejo agronómico, prácticas de selección y condiciones ambientales, además reportan un genotipo único para las accesiones silvestre e hipotetizan acerca de la posible relación genética con individuos cultivados por los Mayas en la precolonia.

Sereno *et al.* (2006) compararon 94 accesiones de cuatro poblaciones naturales de la Amazonia de Brasil. Exceptuando a la población del Alto Amazonas, en las restantes encontraron bajo índice de

heterocigosidad observada, lo que revela alta tasa de homocigotos que coincide con la aseveración de Ruiz *et al.* (2011), en el sentido de estarse presentado altas frecuencias de autopolinización o el muestreo incluye alta consanguinidad. La población del Alto Amazonas exhibió la mayor diversidad genética y por lo tanto, los autores la sugieren en concordancia con otros autores como parte del centro de diversificación de la especie y, posible centro de origen (Cheesman, 1944; Motamayor *et al.*, 2002; Schultes, 1984).

En el trabajo de Motamayor *et al.* (2002) se evaluó la composición alélica en las variedades de América Central (genotipos de Guayana, la Amazonia y el Orinoco). Los resultados apoyan la hipótesis de que el cacao se originó en el Alto Amazonas y sugieren la probable ruta de dispersión mediada por humanos desde el Amazonas hasta América Central y México para establecer el cacao "Criollo" que los Olmecas domesticaron hace casi cuatro mil años. Sin embargo la baja diversidad genética reportada por estos autores para las accesiones de Criollos de Mesoamérica y que, contradice lo antes reportado (De la Cruz *et al.*, 1995; Whitkus *et al.*, 1998), debe ser corroborada y en su caso, podría ser explicada por la gran presión de selección a la que estuvo sometida la planta en los procesos de domesticación buscando características sensoriales agradables y agronómicas que pudieron haber sido de interés para los pueblos precolombinos (como pulpa más dulce, mayor número de semillas) durante varios siglos y que se

promovió fuertemente por las características de auto compatibilidad casi exclusiva reportado para los Criollos y presuntamente observada en otras accesiones (Ruiz *et al.*, 2011; Sereno *et al.*, 2006). Respecto a la dispersión de individuos del Alto Amazonas, para dar origen a los Criollos de Mesoamérica, ésta enfrenta algunas cuestiones por ejemplo, se ha reportado que de manera natural el árbol del cacao tiene una baja o nula capacidad de dispersión, en estado silvestre, los árboles de cacao por lo general se multiplican a través de propagación vegetativa (Lachenaud & Zhang, 2008), los frutos son indehiscentes con un pericarpio espeso y duro (sobre todo los Criollos), y no presenta abscisión, lo cual significa que se mantiene unido indefinidamente al árbol. Las semillas son altamente susceptibles a la desecación (recalcitrantes), sobre todo las de la variedad Criollo (Rangel, 2009), germinan dentro de la fruta y puede perderse fácilmente si las plántulas no tienen una vía de dispersión exógena. Si este papel es realizado por animales (principalmente monos), quienes pueden tragar semillas enteras sin masticarlas y terminan en el suelo en las heces, donde germinan rápidamente (endozoocoria), se han reportado principalmente a *Cebus nigrivittatus* y *C. apella* o *Alouatta seniculus* (Lachenaud & Zhang, 2008), este último género caracterizado como de baja actividad (Muñoz *et al.*, 2002) y que enfrentaría grandes retos por transportar las semillas en distancias considerables.

Si la propagación fue mediada por el hombre, como hipotetizan los estudios, - ¿cuál sería la intención de dispersar una semilla o planta que, en su centro de diversidad (Alto Amazonas) no tenía uso agronómico o social?- o al menos no hay evidencia arqueológica de esto, como si existe de manera abundante en Mesoamérica y; ¿cómo se llevaría a cabo el traslado, con semillas de la naturaleza antes descrita para recorrer los aproximadamente 2000 km de distancia entre el Alto Amazonas y accesiones de Nicaragua empleadas en el reporte (Motamayor *et al.*, 2002) en períodos breves para garantizar la no desecación y pérdida de viabilidad de las semillas?.

3. En la construcción de mapas de ligamiento y búsqueda de *loci* asociados a caracteres cuantitativos (QTL)

Se han desarrollado una gran cantidad de mapas genéticos para detectar QTL para varios rasgos sobre todo de importancia agronómica. Los principales intereses en la búsqueda de estos marcadores han sido: a) resistencia a las tres principales enfermedades causadas por hongos, caracteres de rendimiento, b) vigor de la planta, c) número de óvulos y d) características de mazorca y grano (Tabla 2). Las enfermedades son responsables de pérdidas que pueden llegar a alcanzar 100%, debido a esto, la gran mayoría de los trabajos en este sentido han dedicado esfuerzos a localizar los genes responsables de conferir resistencia a algunos genotipos y como estos pueden ser transferidos (Brown *et al.*, 2007; Cervantes-Martínez *et al.*, 2006; Clement *et al.*, 2003a; Feltus *et al.*, 2011; Lanaud *et al.*,

# Artículos

2009; Pugh *et al.*, 2004; Risterucci *et al.*, 2003). Un porcentaje menor de los trabajos, se enfoca en la búsqueda de genes involucrados en caracteres morfológicos de arboles, frutos y almendras (Cervantes-

Martínez *et al.*, 2006; Clement *et al.*, 2003a, 2003b; Crouzillat *et al.*, 1996; Feltus *et al.*, 2011), lo cual denota hacia donde se orientan las prioridades de la investigación en cacao.

**Tabla 2.** Principales investigaciones en *Theobroma cacao* L. empleando marcadores moleculares en la búsqueda de caracteres de interés agronómico

QTL's asociados con resistencia a <i>Phytophthora palmivora</i>	Brown <i>et al.</i> , 2007; Cervantes-Martínez <i>et al.</i> , 2006; Clement <i>et al.</i> , 2003a; Crouzillat <i>et al.</i> , 2000; Feltus <i>et al.</i> , 2011; Flament <i>et al.</i> , 2001; Lanaud <i>et al.</i> , 1995; Lanaud <i>et al.</i> , 2009; Pugh <i>et al.</i> , 2004; Risterucci <i>et al.</i> , 2000; Risterucci <i>et al.</i> , 2003
QTL's asociado con resistencia a <i>Crinipellis (Moniliophthora) perniciosa</i>	Brown <i>et al.</i> , 2005; Faleiro <i>et al.</i> , 2006; Figueira <i>et al.</i> , 2006; Lanaud <i>et al.</i> , 2009; Queiroz <i>et al.</i> , 2003
QTL's asociados con caracteres morfológicos (vigor, floración, rendimiento, número de óvulos, índice de grano y peso de mazorca)	Cervantes-Martínez <i>et al.</i> , 2006; Clement <i>et al.</i> , 2003a; Clement <i>et al.</i> , 2003b; Crouzillat <i>et al.</i> , 1996; Feltus <i>et al.</i> , 2011
Localización de QTL's asociados a resistencia a <i>Moniliophthora roreri</i>	Brown <i>et al.</i> , 2007; Cervantes-Martínez <i>et al.</i> , 2006; Lanaud <i>et al.</i> , 2009
Marcador asociado a tolerancia al estrés	Borrone <i>et al.</i> , 2004

La reciente publicación de la secuencia genómica del cacao (Argout *et al.*, 2011), ofrece importantes aportaciones a la comprensión de posibles explicaciones en la síntesis de compuestos de interés (algunos implicados en la calidad sensorial) y ofrece una oportunidad única a los investigadores para dirigir estudios buscando explicar las

interrogantes guardadas en el genoma de esta planta. De los hallazgos importantes, se estima de manera más precisa (mediante citometría de flujo) el tamaño del genoma de esta planta (430 Mb del genotipo criollo B97-61/B2), con número cromosómico  $2n=20$ , el cual es considerado como "pequeño" en comparación con individuos de las mismas

características fenotípicas que el árbol del cacao y, que había sido estimado en 390 Mb por reasociación cinética (Couch *et al.*, 1993).

En este estudio, basándose en el conocimiento de los mecanismos moleculares y bioquímicos de plantas modelo y, después de realizar análisis de ortología con genes de *Arabidopsis thaliana*, *Vitis vinifera*, *Populus* sp. y *Glycine max*, muestra asociaciones entre genes posibles candidatos relacionados con la resistencia a enfermedades y, con la calidad de las almendras. Ésta última, entendida como la cantidad genes potencialmente involucrados en las síntesis de macromoléculas (grasa, proteínas, almidón) y metabolitos secundarios como flavonoides, terpenoides y alcaloides, que se sabe desempeñan un papel importante en las características sensoriales del cacao.

### **La calidad sensorial del cacao, su asociación con marcadores**

La calidad en el cacao, como en todo producto o materia prima, está dada por un número amplio de atributos o características, muchos de ellos intrínsecos a la genética del vegetal y otros, atribuibles a las condiciones ambientales donde se desarrolla, así como a las prácticas pre y poscosecha.

Para tratar de homogenizar la terminología y atributos entendibles como “calidad” se ha acordado mediante estándares internacionales, establecer que el cacao de buena calidad comercial debe ser: a) fermentado, completamente seco, libre de almendras vanas, libre de olores anormales o

extraños y libre de cualquier evidencia de adulteración, b) de tamaño bastante uniforme, considerablemente libre de granos fragmentados, fragmentos y piezas de cáscara, y prácticamente exentas de materias extrañas (Dongo *et al.*, 2009).

Aunque esta definición no incluye de manera total, los aspectos importantes del sabor y aroma que determinan la aceptación de algunos mercados *gourmet*, se puede entender que, hay características que dependen del manejo poscosecha, como la uniformidad de las semillas, la presencia de materia extraña y otras; pero también otras en las que se involucran procesos microbianos (fermentación) y de secado que de realizarse de manera inadecuada demeritan la calidad de las almendras (Criollo y Trinitario), ya que no permiten potenciar la transformación o aparición de moléculas implicadas en algunas de las características sensoriales importantes de estos cultivares (Rodríguez-Campos *et al.*, 2011).

Algunos argumentos, atribuyen una carga sumamente importante para conservar la calidad del cacao al tiempo de cosecha y selección de frutos y semillas que deberán fermentarse, así como al mismo proceso de fermentación pues se ha reportado que, emplear frutos (mazorcas) fuera de madurez aumenta el contenido de ácido cítrico (Papalexandratou *et al.*, 2011a), lo cual ejerce efecto indeseable sobre el proceso de fermentación y el posterior secado y tostado, que conllevaría la aparición de metabolitos específicos responsables de aroma no deseados (ácidos carboxílicos), principalmente ácido butírico (Rodríguez-

Campos *et al.*, 2011), ácido propiónico y metilpropiónico (Frauendorfer & Schieberley, 2008) que demeritan la calidad de cacao deficientemente fermentados, secados o tostados.

La fermentación por sí misma, indudablemente tiene un papel crucial en mantener o realzar la calidad de los cacao Criollos o Trinitarios, pero es cuestionable el argumento de que aplicada bajo ciertos estándares, puede mejorar la calidad del grano de aquellos considerados de "calidad inferior" en un estudio conducido con cacao Brasileño (Papalexandratou *et al.* 2011b). Estas conclusiones, son ciertas solo de manera parcial, puesto que se ha documentado de antaño que los genotipos Criollos, independientemente de los procesos poscosecha ofertan características superior u otros con procesado poscosecha similar (Afoakwa *et al.*, 2008; Ciferri & Ciferri, 1957; Clapperton *et al.*, 1994). Siendo más realista, podría pensarse que los factores ambientales y procesos practicados posteriores al corte (fermentación, secado, tostado) influyen en un 50% de la calidad final del producto, mientras que la mitad restante está guardada en la genética de cada individuo.

El otro factor que tampoco es tomado en cuenta en los estándares y que supone la mayor predisposición para obtener calidad superior es el origen genético, ya que, como antes se apuntó de la variedad Forastero se obtiene cacao de calidad inferior, del Trinitario de calidad intermedia y los granos de alta calidad son producidos por los cacao Criollos (Sukha & Butler, 2005). Eskes *et al.* (2007), encontraron correlación entre notas

de aroma y sabor halladas en mazorcas (pulpa) de diferente variedad y la calidad sensorial de las almendras, mostrando la variación asociada con el genotipo pues reportan la presencia de astringencia y poco dulzor en variedades de baja calidad y gustos dulce y notas de sabor afrutado en genotipos de calidad superior, además de poder diferenciar a las accesiones por su origen genético.

En Ecuador, se han empleado algunas características sensoriales para la selección de individuos que forman parte del llamado cacao fino producido en ese país (Eskes *et al.*, 2007), lo que da cuenta una vez más, que la calidad desde este punto de vista podría ser correlacionada con algún tipo de marcador y, los moleculares, se prestan como los candidatos más apropiados en esta encomienda.

La evaluación sensorial es una herramienta ampliamente utilizada en el campo de los alimentos, tanto para el desarrollo de productos, como para los estudios de clasificación y determinación de la calidad de productos de alto valor comercial. Su aplicación como herramienta de medición supone el entrenamiento de un panel de evaluadores quienes fungen como "instrumentos" de medición y emiten su veredicto inequívoco en alguna característica específica. Su correlación con mediciones químicas (acidez, pH) o físicas (viscosidad, textura) resulta útil pero, tediosa puesto que las características sensoriales evaluadas, son la resultante de una suma compleja de atributos fisicoquímicos y, evaluar una sola característica resulta insuficiente.

De manera similar, las pruebas sensoriales pueden ser desde el punto de vista operativo costosas y tardadas, puesto que no siempre se dispone de un panel entrenado en el momento de querer evaluar la calidad de una accesión de cacao en particular.

Establecer marcadores moleculares que puedan estar asociados a regiones no codificantes (SSR) vinculadas a genes que estrían potencialmente involucrados en la calidad como sugieren Argout *et al.*, (2011), pero que permiten al ser detectados, segregar a individuos de diferente calidad sensorial (Smulders *et al.*, 2010), podría ser una realidad que ofrecería ventajas de tiempo y costo a los programas de mejoramiento de variedades cuando esta calidad sea el objeto de interés o, ayudar a proteger accesiones con potencial en este mismo sentido.

## CONCLUSIONES

El mercado del cacao lejos de extinguirse, a pesar de las enfermedades y problemáticas sociales que le aquejan continuará en expansión en los años venideros, como también habrá de aumentar el mercado que exige productos con mayor contenido de chocolate (no cocoa o manteca de cacao) y que éste sea de calidad superior. Esto supone rescatar y aumentar el cultivo e introducción de genotipos que producen semillas de calidad superior. Debido a esto, los estudios moleculares relacionados con *T. cacao*, que cada vez se apoyan o lo harán de herramientas como los SSRs, ISSRs, búsqueda de SNP's, SCARs, deberán

extender su alcance a buscar cada vez más marcadores o QTL con la calidad; el conocimiento del genoma de esta planta resulta una herramienta útil para este propósito. Otro campo de interés que se apertura y que deberá ser explotado en su totalidad, es de la bioinformática, puesto que ahora se cuenta con un código que deberá ser descifrado con más claridad para tratar de comprender los enigmas que esta planta ha guardado por varios milenios.

## REFERENCIAS

- Afoakwa E, Paterson A, Fowler M & Ryan A (2008) Flavor formation and character in cocoa and chocolate: a critical review. *Crit. Rev. Food Sci.* 48: 840-857.
- Aikpokpodion P (2010) Variation in agromorphological characteristics of cacao, *Theobroma cacao* L., in farmers' fields in Nigeria. *New Zeal. J. Crop Hort.* 38(2): 157-170.
- Argout X, Salse J, Aury J, Guiltinan M, Droc G, Gouzy J, Allegre M, Chaparro C, Legavre T, Maximova S, Abrouk M, Murat F, Fouet O, Poulain J, Ruiz M, Roguet Y, Rodier-Goud M, Barbosa-Neto J, Sabot F, Kudrna D, Ammiraju J, Schuster S, Carlson J, Sallet E, Schiex T, Dievart A, Kramer M, Gelley L, Shi Z, Bérard A, Viot C, Boccara M, Risterucci A, Guignon V, Sabau X, Axtell M, Ma Z, Zhang Y, Brown S, Bourge M, Golser W, Song X, Clement D, Rivallan R, Tahi M, Akaza J, Pitollat B, Gramacho K, D'Hont A, Brunel D, Infante D, Kebe I, Costet P, Wing R, McCombie W, Guiderdoni E, Quetier F, Panaud O, Wincker P, Bocs S & Lanaud C (2011)

- The genome of *Theobroma cacao*. *Nat. Genet.* 43(2): 101-109.
- Azofeita-Delgado A (2006) Uso de marcadores moleculares en plantas; Aplicaciones en frutales del trópico. *Agron. Mesoam.* 17(2): 221-242.
- Bartley B & Cope F (1973) Practical aspects of self-incompatibility in *Theobroma cacao* L. *In: Agricultural Genetics - Selected Topics.* Moav R (ed) John Wiley & Sons, Inc. New York. pp 109-134.
- Bhattacharjee R, Aikpokpodion P, Kolesnikova-Allen M, Badaru K & Schnell R (2004) West African Cocoa: A pilot study on DNA fingerprinting the germplasm from Cross River State of Nigeria. *INGENIC News.* 9: 15-20.
- Borrone J, Kuhn D & Schnell R (2004) Isolation, characterization, and development of WRKY genes as useful genetic markers in *Theobroma cacao*. *Theor. Appl. Genet.* 109(3): 495-507.
- Brown J, Phillips-Mora W, Power E, Krol C, Cervantes-Martinez C, Motamayor J & Schnell J (2007) Mapping QTLs for resistance to frosty pod and black pod diseases and horticultural traits in *Theobroma cacao* L. *Crop Sci.* 47: 1851-1858.
- Brown J, Kuhn D, Lopez U & Schnell R (2005) Resistance gene mapping for witches' broom disease in *Theobroma cacao* L. in an F2 population using SSR markers and candidate genes. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 130: 366-373.
- Cervantes-Martinez C, Brown J & Schnell R (2006) Combining ability for disease resistance, yield, and horticultural traits of cacao (*Theobroma cacao* L.) clones. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 131(2): 231-241.
- Cheesman E (1944) Notes on the nomenclature, classification and possible relationships of cocoa populations. *Trop. Agric.* 21: 144-159.
- Chiapas.gob (2010) Cacao del Soconusco, de los mejores del mundo: empresarios franceses. Instituto de Comunicación Social. Diciembre de 2010. Consultado junio de 2011. Disponible: <http://www.cocoso.chiapas.gob.mx/docum ento.php?id=20101212124448>.
- Ciferri R & Ciferri F (1957). The evolution of cultivated cacao. *Evolution* 11: 381-397.
- Clapperton J (1994) A review of research to identify the origins of cocoa flavour characteristics. *Cocoa Growers' Bull.* 48: 7-16.
- Clement D, Risterucci A, Motamayor J, N'Goran J & Lanaud C (2003a) Mapping QTL for yield components, vigor, and resistance to *Phytophthora palmivora* in *Theobroma cacao* L. *Genome* 46: 204-212.
- Clement D, Risterucci A, Motamayor J, N'Goran J & Lanaud C (2003b) Mapping quantitative trait loci for bean traits and ovule number in *Theobroma cacao* L. *Genome* 46: 103-111.
- Couch J, Zintel H & Fritz P (1993) The genome of the tropical *Theobroma cacao* L. *Mol. Gen. Genet.* 237(1-2): 123-128.
- Crouzillat D, Menard B, Mora A, Phillips W & Petiard V (2000) Quantitative trait analysis in *Theobroma cacao* using molecular markers. *Euphytica* 114: 13-23.



- Crouzillat D, Lerceteau E, Petiard V, Morera J, Rodriguez H, Walker D, Phillips W, Ronning C, Schnell R, Osei J & Fritz P (1996) *Theobroma cacao* L.: a genetic linkage map and quantitative trait loci analysis. *Theor. Appl. Genet.* 93:205-214.
- Cuatrecasas J (1964) Cacao and its allies: a taxonomic revision of the genus *Theobroma*. *Contrib. U. S. Natl. Herb.* 35(6): 379-614.
- De la Cruz M, Whitkus R, Gomez-Pompa A & Mota-Bravo L (1995). Origins of cacao cultivation. *Nature* 375: 542-543.
- Dongo L, Aigbekaen E, Jayeola C, Emaku L & Orisajo S (2009) Influence of farmers practices on cocoa bean quality: Nigeria field experience. *Afr. Crop Sci. Conf. Proc.* 9: 299-302.
- Efombagn M, Sounigo O, Eskes A, Motamayor J, Manzanares-Dauleux M, Schnell R & Nyassé S (2009) Parentage analysis and outcrossing patterns in cacao (*Theobroma cacao* L.) farms in Cameroon. *Heredity* 103: 46-53.
- Efombagn M, Nyassé S, Sounigo O, Kolesnikova-Allen M & Eskes A (2007) Participatory cocoa (*Theobroma cacao*) selection in Cameroon: *Phytophthora* pod rot resistant accessions identified in farmers' fields. *Crop Prot.* 26: 1467-1473.
- Eskes A, Guarda D, García L & García P (2007) Is genetic variation for sensory traits of cocoa pulp related to fine flavor cocoa traits?. *INGENIC Newsl.* 11: 22-28.
- Faleiro F, Queiroz V, Lopes U, Guimarães C, Pires J, Yamada M, Araújo I, Pereira M, Schnell R & De Souza G (2006) Mapping QTLs for witches' broom (*Crinipellis pernicioso*) resistance in cacao (*Theobroma cacao* L.). *Euphytica* 149: 227-235.
- Faleiro F, Yamada M, Lopes U, Faleiro A, Siqueira R, Costa L, Santos R & dos Santos R (2002) Genetic similarity of *Theobroma cacao* L. accessions maintained in duplicates in the Cacao Research Center germplasm collection, based on RAPD markers. *Crop Breed. Appl. Biotechnol.* 2(3): 439-444.
- FAO (2011) Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la Alimentación. Anuario Estadístico 2010. Tabla B7.
- Feltus F, Saski C, Mockaitis K, Haiminen N, Parida L, Smith Z, Ford J, Staton M, Ficklin S, Blackmon B, Cheng C, Schnell R, Kuhn D & Motamayor J (2011) Sequencing of a QTL-rich region of the *Theobroma cacao* genome using pooled BACs and the identification of trait specific candidate genes. *BMC Genomics* 12: 379.
- Figueira A, Albuquerque S & Leal G (2006) Genetic mapping and differential gene expression of Brazilian alternative resistance sources to witches' broom (causal agent *Crinipellis pernicioso*). *15th Intern. Cocoa Res. Confer.* p. 166
- Figueira A, Janick J, Levy M & Goldsbrough P (1994) Reexamining the classification of *Theobroma cacao* L. using molecular markers. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 119: 1073-1082.
- Flament M, Kebe I, Clement D, Pieretti I, Risterucci A, N'Goran J, Cilas C, Despréaux D & Lanaud C (2001) Genetic

- mapping of resistance factors to *Phytophthora palmivora* in cocoa. *Genome* 44(1): 79-85.
- Frauendorfer F & Schieberle P (2008). Changes in key aroma compounds of criollo cocoa beans during roasting. *J. Agr. Food Chem.* 56:10244-10251.
- Guiltinan M, Verica J, Zhang D & Figueira A (2008) Genomics of the *Theobroma cacao*, "The Food of the Gods". In: Genomics of Tropical Crop Plants. Moore P & Mings R (eds). Springer Science+Business Media. NY USA. pp. 145-170.
- INAH (2007) Instituto Nacional de Antropología e Historia. Comisión de defensa del patrimonio cultural. Considerations and alternative proposal for the encroachment on the archaeological site by the Tapachula-Talismán highway. Disponible: [www.mesoweb.com/reports/lzapa.pdf](http://www.mesoweb.com/reports/lzapa.pdf).
- Irizarry H & Goenaga R (2000) Clonal selection in cacao base on early yield performance of grafted trees. *J. Agr. Univ. Puert. Rico* 84(3-4): 153-163.
- Johnson 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 Sci.* 49: 564-572.
- Lachenaud P & Zhang D (2008) Genetic diversity and population structure in wild stands of cacao trees (*Theobroma cacao* L.) in French Guiana. *Ann. For. Sci.* 65: 310.
- Lachenaud P, Sounigo O & Oliver G (2004) Genetic structure of Guianan wild cocoa (*Theobroma cacao* L.) described using isozyme electrophoresis. *Plant Genetic Res. Newsl.* 139: 24-30.
- Lanaud C, Fouet O, Clément D, Boccara M, Risterucci A, Surujdeo-Maharaj S, Legavre T & Argout X (2009) A meta-QTL analysis of disease resistance traits of *Theobroma cacao* L. *Mol. Breeding* 24: 361-374.
- Lanaud C, Risterucci A, Pieretti I, Falque M, Bouet A & Lagoda P (1999) Isolation and characterization of microsatellites in *Theobroma cacao* L. *Mol. Ecol.* 8: 2141-2152.
- Lanaud C, Risterucci A, N'Goran A, Clement D, Flament M, Laurent V & Falque M (1995) A genetic linkage map of *Theobroma cacao* L. *Theor. Appl. Genet.* 91(6-7): 987-993.
- Lanaud C (1986) Genetic studies of *Theobroma cacao* L. with the help of enzymatic markers. I: Genetic control and linkage of nine enzymatic markers. *Cafe Cacao The* 30: 259-270.
- Lerceteau E, Robert T, Pétiard V & Crouzillat D (1997) Evaluation of the extent of genetic variability among *Theobroma cacao* accesions using RAPD and RFLP markers. *Theor. Appl. Genet.* 95(1-2): 10-19.
- Molina J & Córdova L (2006) Recursos fitogenéticos de México para la alimentación y la agricultura: Informe Nacional 2006. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación y Sociedad Mexicana de

- Fitogenética, A.C. Chapingo, México. pp. 19-20.
- Moreno Y, Melgarejo L, Hernández M, Quintero L & Vargas G (2004) Caracterización molecular de un banco de germoplasma del género *Theobroma* mediante la técnica de RAPD. *Rev. Colomb. Biotechn.* 6(2): 15-24.
- Motamayor J, Lachneaud P, da Silva e Mota J, Loo R, Kuhn D, Brown J & Schnell R (2008) Geographic and genetic population differentiation of the Amazonian chocolate tree (*Theobroma cacao* L.). *PLoS ONE* 3: e3311.
- 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, Risterucci A, Lopez P, Ortiz C, Moreno A & Lanaud C (2002) Cacao domestication I: the origin of the cacao cultivated by the Mayas. *Heredity* 89: 380-386.
- Motilal L, Zhang D, Pathmanathan U, Mischke S, Pinney S & Meinhardt L (2011) Microsatellite fingerprinting in the International Cocoa Genebank, Trinidad: accession and plot homogeneity information for germplasm management. *Plant Genet. Resour.* 9: 430-438.
- Muñoz D, García del Valle Y, Franco B, Estrada E & Magaña M (2002) Estudio del patrón de actividad general de monos aulladores (*Alouatta palliata*) en el parque Yumká, Tabasco, México. *Neotrop. Primate* 10(1): 11-16.
- N'Goran J, Laurent V, Risterucci A & Lanaud C (1994) Comparative genetic diversity studies of *Theobroma cacao* using RFLP and RAPD markers. *Heredity* 73: 589-597.
- Papalexandratou Z, Camu N, Falony G & De Vuyst L (2011a) Comparison of the bacterial species diversity of spontaneous cocoa bean fermentations carried out at selected farms in Ivory Coast and Brazil. *Food Microb.* 28: 964-973.
- Papalexandratou Z, Vrancken G, De Bruyne K, Vandamme P & De Vuyst L (2011b) Spontaneous organic cocoa bean box fermentations in Brazil are characterized by a restricted species diversity of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria. *Food Microb.* 28: 1326-1338.
- Perry M, Davey M, Power J, Lowe K, Bligh H, Roach P & Jones C (1998) DNA isolation and AFLP genetic fingerprinting of *Theobroma cacao* (L.). *Plant Mol. Biol. Rep.* 16: 49-59.
- Phillips-Mora W, Castillo J, Krauss U, Rodríguez E, & Wilkinson M (2005) Evaluation of cacao (*Theobroma cacao*) clones against seven Colombian isolates of *Moniliophthora roreri* from four pathogen genetic groups. *Plant Pathol.* 54: 483-490.
- Phillips-Mora W, Coutiño A, Ortiz C, López A, Hernández J & Aime M (2006) First report of *Moniliophthora roreri* causing frosty pod rot (moniliasis disease) of cocoa in México. *Plant Pathol.* 55: 584.
- Ploetz R (2007) Cacao diseases: important threats to chocolate production worldwide. *Phytopathol.* 97: 1634-1639.
- Powis T, Cyphers A, Gaikwad N, Grivetti L & Cheong K (2011) Cacao use and the San

# Artículos

- Lorenzo Olmec. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108(21): 8595-8600.
- Pugh T, Fouet O, Risterucci A, 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 (6): 1151-1161.
- Queiroz V, Guimarães C, Anherdt D, Schuster I, Daher T, Pereira M, Miranda V, Loguercio L, Barros E & Moreira M (2003) Identification of a major QTL in cocoa (*Theobroma cacao* L.) associated with resistance to witches' broom disease. *Plant Breeding* 122: 268-272.
- Rangel M (2009) Anatomía y tolerancia a la desecación de semillas de cacao (*Theobroma cacao* L.) Tesis de doctorado en Ciencias. Colegio de Posgraduados. Texcoco, Estado de México. pp.1-49.
- Risterucci A, Paulin D, Ducamp M, N'Goran J & Lanaud C (2003) Identification of QTLs related to cocoa resistance to three species of Phytophthora. *Theor. Appl. Genet.* 108(1): 168-174.
- Risterucci A, Grivet L, N'Goran J, Pieretti I, Flament M & Lanaud C (2000) A high-density linkage map of *Theobroma cacao* L. *Theor. Appl. Genet.* 101: 948-955.
- Rodriguez-Campos J, Escalona-Buendía H, Orozco-Avila I, Lugo-Cervantes E & Jaramillo-Flores M (2011) Dynamics of volatile and non-volatile compounds in cocoa (*Theobroma cacao* L.) during fermentation and drying processes using principal components analysis. *Food Res. Intern.* 44: 250-258.
- Ronning C & Schnell R (1994) Allozyme diversity in a germplasm collection of *Theobroma cacao* L. *J. Heredity* 85(4): 291-295.
- Ruiz J, Roa O & Marin I (2011) Molecular ecology of genetic diversity of cacao cultivated in the south-east region of Nicaragua. *Inter. Res. J. Agric. Sci.* 1(1): 6-13.
- Russell J, Hosein F, Johnson E, Waugh R & Powell W (1993) Genetic differentiation of cocoa (*Theobroma cacao* L.) populations revealed by RAPD analysis. *Mol. Ecol.* 2:89-97.
- Schnell R, Olano C, Brown J, Meerow A & Cervantes-Martínez C (2005). Retrospective determination of the parental population of superior cacao (*Theobroma cacao* L.) seedlings and association of microsatellite alleles with productivity. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 130(2): 181-190.
- 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. Vol 76: Mass. Stone D (ed). 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. *Conser. Genet.* 7: 13-24.

- Smulders M, Esselink D, Amores F, Ramos G, Sukha D, Butler D, Vosman B & Van Loo E (2010) Identification of cocoa (*Theobroma cacao* L.) varieties with different quality attributes and parentage analysis of their beans. *INGENIC Newsl.* 12: 1-13.
- Sounigo O, Umaharan R, Christopher Y, Sankar A & Ramdahin S (2005) Assessing the genetic diversity in the International Cocoa Genebank, Trinidad (ICG,T) using isozyme electrophoresis and RAPD. *Genet. Res. Crop. Evol.* 52: 1111-1120.
- Sukha D & Butler D (2005) The CFC/ICCO/INIAP Cocoa Flavour Project - Investigating the spectrum of fine flavour within genotypes and between origins. *INGENIC Newsl.* 10: 22-25.
- Takrama J, Cervantes-Martínez C, Philips-Mora W, Brown J, Motamayor J & Schnell R (2005) Determination of off-types in a cacao breeding program using microsatellites. *INGENIC Newsl.* 10: 2-7.
- 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. *PLoS ONE* 6(1): e16056.
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, Van de Lee T, Hornes M, Friters A, Pot J, Paleman J, Kuiper M & Zabeau M (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23(21):4407-4414.
- Warren J (1994) Isozyme variation in a number of populations of *Theobroma cacao* obtained through various sampling regimes. *Euphytica* 72: 121-126.
- Whitkus R, de la Cruz M, Mota-Bravo L & Gómez-Pompa A (1998) Genetic diversity and relationships of cacao (*Theobroma cacao* L.) in southern Mexico. *Theor. Appl. Genet.* 96(1-2): 621-627.
- Wilde J, Waugh R & Powell W (1992) Genetic fingerprinting of *Theobroma* clones using randomly amplified polymorphic DNA markers. *Theor. Appl. Genet.* 83: 871-877
- Zhang D, Boccara M, Motilal L, Mischke S, Johnson E, Butler D, Bailey B & Meinhardt L (2009) Molecular characterization of an earliest cacao (*Theobroma cacao* L.) collection from Upper Amazon using microsatellite DNA markers. *Tree Genet. & Genomes* 5: 595-607.
- Zhang D, Boccara M, Motilal L, Butler D, Umaharan P, Mischke S & Meinhardt L (2008) Microsatellite variation and population structure in the 'Refractario' cacao of Ecuador. *Conserv. Genet.* 9: 327-337.
- Zhang D, Arevalo-Gardini E, Mischke S, Zuñiga-Cernades L, Barreto-Chavez A & Adiazola J (2006a) Genetic diversity and structure of managed and semi-natural populations of cocoa (*Theobroma cacao*) in the Huallaga and Ucayali Valleys of Peru. *Ann. Bot.* 98: 647-655.
- Zhang D, Mischke S, Goenaga R, Hemeida A & Saunders J (2006b) Accuracy and reliability of high-throughput microsatellite genotyping for cacao clone identification. *Crop Sci.* 46: 2084-2092.