

ARTÍCULO CIENTÍFICO

Inés Sánchez¹, Luz Angela Zárate¹,
Gerardo Gallego² y Joe Tohme²

ABSTRACT

**Genetic diversity analysis of
Theobroma cacao L. accessions from
germplasm bank of CORPOICA**

The genetic diversity present in the germplasm bank of *Theobroma cacao* L. conserved in the experimental station "La Suiza" of the Colombian Corporation for Agricultural Research –CORPOICA– in Santander Province was studied. To that end, 100 cacao genotypes were characterized using isozymes, RFLPs, RAPDs and SSRs, using 25 microsatellites previously published in GenBank. The percent of amplification obtained was 100% which permitted identifying 168 alleles. Levels of polymorphism ranged from 2 to 14 alleles per locus, with an average of 6.72. Nei-Li's similarity values and genetic distances among the 100 genotypes were obtained using the NTSYS® software version 2.1, and a dendrogram was constructed using the UPGMA algorithm. The values obtained were greater than 0.45, and the dendrogram identified two main genetic groups and several internal subgroups. These results are an important advance in the state of knowledge of the genetic diversity of *Theobroma cacao* accessions preserved on germplasm banks and are very useful for developing and implementing genetic improvement and conservation programs based on genetic information and phenotypic traits favoring better quality, higher crop production and profitability in Colombia.

Key words: germplasm bank, genetic diversity, microsatellites, *Theobroma cacao* L.

Recibido: junio 8 de 2007
Aceptado: diciembre 7 de 2007

1. Investigadoras asociadas, grupo de Recursos Genéticos Vegetales, C.I. Palmira (Palmira, Valle del Cauca), CORPOICA. En la actualidad: respectivamente, investigadora especial del CGIAR (Benin, África) e investigadora del Centro Nacional de Investigaciones de Café –CENICAFÉ–. e-mail: autora para correspondencia: i.sanchez@cgiar.org; LuzAngela.Zarate@cafedecolombia.com
2. Investigadores asociados, Laboratorio de Biodiversidad y Biotecnología, Centro Internacional de Agricultura Tropical –CIAT–, Palmira (Valle del Cauca) e-mail: g.gallego@cgiar.org

Análisis de la diversidad genética de accesiones de
Theobroma cacao L. del banco de conservación a
cargo de CORPOICA

RESUMEN

Se estudió la diversidad genética presente en el banco de germoplasma de *Theobroma cacao* L. que se conserva en la Estación Experimental 'La Suiza' de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria –CORPOICA– en el departamento de Santander. A tal fin se caracterizaron 100 genotipos de cacao mediante isoenzimas, RFLPs, RAPDs y SSR, utilizando 25 microsatélites publicados previamente en el GenBank. El porcentaje de amplificación obtenido fue del 100% lo que permitió identificar 168 alelos. Los niveles de polimorfismo variaron entre 2 y 14 alelos por locus con un promedio de 6,72. Las tasas de similitud y distancia genética de Nei y Li entre los 100 genotipos se obtuvieron mediante el programa NTSYS v2.1® y se construyó un dendrograma con el algoritmo UPGMA. Los valores obtenidos fueron superiores a 0,45 y en el dendrograma se identificaron dos grupos genéticos principales y varios subgrupos internos. Los resultados obtenidos se consideran un avance importante en el conocimiento de la diversidad genética de accesiones de *Theobroma cacao* L. conservadas en bancos de germoplasma y son de gran utilidad para desarrollar e implementar programas de mejoramiento y conservación del cacao basados en información genética relativa a características fenotípicas que favorezcan una mejor calidad, mayor producción y rentabilidad del cultivo en Colombia.

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

INTRODUCCIÓN

EL CACAO (*THEOBROMA CACAO* L., familia Esterculaceae) es nativo del trópico americano (Laurent, Risterucci y Lanaud, 1994). Cuatrecasas (1964) estableció que el género *Theobroma* proviene de la cuenca Amazónica, bordeando zonas del Ecuador y Colombia, desde donde se dispersó a lo largo de la cordillera andina, hasta el Caribe y el Pacífico, a partir de los cual se diferenciaron los grupos criollos y forasteros (Cheesman, 1944).

El cacao es de gran importancia económica (Bennett, 2003) por la versatilidad de usos en confitería y la industria agroalimentaria. En Colombia, el área cultivada es de 99.000 ha que producen cerca de 49.000 toneladas de cacao seco por año; el país dispone de las condiciones agro-ecológicas apropiadas para producir cacao de excelente calidad (Perea *et al.*, 2002; Roldán *et al.*, 2004).

La diversidad genética del cacao se ha abordado desde diferentes técnicas: marcadores morfológicos (Argüello *et al.*, 1999; Engels, 1986), marcadores bioquímicos utilizando isoenzimas (Lanaud, 1987; Warren, 1994) y, más recientemente, marcadores moleculares (Lanaud *et al.*,

1999; Laurent, Risterucci y Lanaud, 1993a, 1993b y 1994; N'Goran *et al.*, 1994, 2000). Sin embargo, aun sigue siendo limitada la información existente sobre la estructura genética de sus poblaciones (Lanaud, 1987; Lanaud *et al.*, 1999; Warren, 1994). El desarrollo de microsatélites para *T. cacao* (Lanaud *et al.*, 1999) ha permitido evaluar la diversidad genética utilizando marcadores codominantes, multialélicos y reproducibles (Schlotterer y Tautz, 1992; Morgante y Olivieri, 1993) con alto grado de diversidad genética (Powell, Machray y Provan, 1996; Taramino y Tingey, 1996) y han proporcionado una poderosa metodología de discriminación entre genotipos (Yang *et al.*, 1994; Russell *et al.*, 1997).

Este trabajo se enfoca en la evaluación de la diversidad genética de una muestra representativa de 100 accesiones de cacaos conservados en el banco de germoplasma colombiano de referencia de *Theobroma cacao*. Utilizando 25 microsatélites, se analizaron grupos de similitud entre las diferentes accesiones y se obtuvo la huella genómica (*fingerprinting*) identificando posibles duplicados. La caracterización molecular se presenta como un complemento a los estudios morfo-agronómicos realizados en trabajos preliminares (Mejía y Argüello, 2000) orientados a la selección

de cacao elite que permitan el desarrollo programas de mejoramiento genético de extensión a los agricultores.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se trabajó con una muestra de 100 clones de cacao pertenecientes al banco de germoplasma de *Theobroma cacao* en la Estación Experimental 'La Suiza' de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria -CORPOICA- ubicada en el departamento de Santander (Tabla 1). A tal fin, se colectaron 3 g de hojas jóvenes las cuales se conservaron en nevera de icopor con hielo y fueron enviadas vía aérea al Centro Internacional de Agricultura Tropical -CIAT- en Palmira (Valle del Cauca). El material se almacenó a -80°C; las hojas de cacao se maceraron en nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino de 0,1g que se conservó en nevera a -80°C hasta su correspondiente empleo en las pruebas moleculares.

Extracción y cuantificación del ADN

La extracción del ADN genómico se realizó mediante el empleo del Dneasy Plant Kit 2003® de Qiagen (ref. 69106) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN se cuantificó mediante la comparación de las muestras con diferentes diluciones y concentraciones conocidas de ADN del bacteriófago Lambda; las muestras fueron observadas en geles de agarosa al 0,8% teñidos con bromuro de etidio a una concentración final de 0,5 mg·mL⁻¹ visualizándose posteriormente bajo una lámpara de luz ultravioleta.

Análisis de microsatélites

El ADN de cada muestra se diluyó a 5 ng en un volumen de 50 mL. Se seleccionaron 25 oligonucleótidos a partir de trabajos realizados por Lanaud *et al.* (1999) publicados en el GenBank (2006), los cuales fueron sintetizados por IDT (Integrate DNA Technologies Inc.). Las pruebas de amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizaron bajo las condiciones siguientes: volumen final 20 mL, que contenía 1 U de Taq-polimerasa, 10 ng ADN, 0,2 mM de cada dNTPs en mezcla, 2 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl con pH 8,3 y 2 pmol de cada oligonucleótido. El ciclo de

Tabla 1. Listado de las 100 accesiones de cacao conservadas en el banco de germoplasma de CORPOICA en el departamento de Santander y empleadas en el estudio de diversidad genética.

Material	Fuente	Material	Fuente	Material	Fuente
EET 8	Ecuador	TSA 641	Trinidad	SPA 10	Colombia
EET 19	Ecuador	TSA 141	Trinidad	SPA 11	Colombia
EET 96	Ecuador	UF 12	Costarica	SPA 13	Colombia
EET 62	Ecuador	UF 29	Costarica	SPA 15	Colombia
EET 59	Ecuador	UF 677	Costarica	SPA 16	Colombia
EET 399	Ecuador	UF 676	Costarica	SPA 17	Colombia
EET 400	Ecuador	P 13	Perú	SPA 18	Colombia
EET 409	Ecuador	P 7	Perú	SPA 20	Colombia
CCN 51	Ecuador	P 18	Perú	PERSEA 1	Colombia
ICS 1	Trinidad	P 16 A	Ecuador	PERSEA 2	Colombia
ICS 6	Trinidad	P 39 A	Ecuador	MON 1	Colombia
ICS 8	Trinidad	PA 35	Perú	SC 1	Colombia
ICS 39	Trinidad	PA 46	Perú	SC 4	Colombia
ICS 40	Trinidad	PA 81	Perú	SC 5	Colombia
ICS 48	Trinidad	PA 121	Perú	SC 6	Colombia
ICS 60	Trinidad	PA 134	Perú	SC 8	Colombia
ICS 78	Trinidad	PA 150	Perú	SC 10	Colombia
ICS 95	Trinidad	PA 169	Perú	SC 14	Colombia
ICS 98	Trinidad	P 12	Perú	SCC 59	Colombia
UF 700	Costarica	IMC 60	Perú	SCC 55	Colombia
TSH 516	Trinidad	IMC 67	Perú	SCC 52	Colombia
TSH 1188	Trinidad	CAP 34	Ecuador	SCC 23	Colombia
TSH 942	Trinidad	CATONGO	Brasil	SCC 76	Colombia
UF 602	Costarica	SCC 61	Colombia	SCC 51	Colombia
UF 613	Costarica	CEPEC 46	Brasil	SCC 69	Colombia
UF 650	Costarica	C 100	Colombia	SCC 70	Colombia
TSA 634	Trinidad	C 96	Colombia	SCC 48	Colombia
TSH 622	Trinidad	C 93	Colombia	SCC 32	Colombia
TSH 660	Trinidad	C 95	Colombia	SCC 74	Colombia
TSH 792	Trinidad	C 58	Colombia	SCC 84	Colombia
TSH 812	Trinidad	SPA 4	Colombia	SCC 19	Colombia
TSH 565	Trinidad	SPA 5	Colombia	SCC 41	Colombia
TSA 654	Trinidad	SPA 9	Colombia	SUI 18	Colombia
				SUI 96	Colombia

amplificación utilizado fue de 94°C por 4 min, 32 ciclos a 94°C por 30 seg, 46°C a 51°C por 1 min de acuerdo con Lanaud *et al.* (1999). Al producto de amplificación se adicionaron 8 mL de buffer carga para geles denaturantes (formamida 98%, EDTA 10 mM, azul de bromofenol 0,05% y xilene cianol) y la mezcla se desnaturó a 94°C por 2 min; se utilizaron 2 mL para la siembra en geles de poliacrilamida 6% (úrea 5M, 0,5X buffer TBE) tomando como patrón de tamaño molecular el Ladder DNA® 10 pb 50 mg de Invitrogen; el tiempo de electroforesis fue de aproximadamente 2 horas a 65 vatios y el gel fue teñido con nitrato de plata, utilizando el protocolo de Promega (2003).

Análisis estadístico

Los geles fueron leídos mediante un patrón de lectura (presencia de bandas: 1, ausencia: 0), resultados que se registraron

en una matriz binaria en Microsoft Excel® para su correspondiente análisis; se utilizó el software NTSYS pc 2.1 (*Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System*) (Rohlf, 2000), empleando el coeficiente de Dice (1945). Los análisis obtenidos a partir del Coeficiente de Similitud de Nei (Nei y Li, 1973; Nei y Roychoudhury, 1974), se fundamentan en la lectura de los patrones electroforéticos y la detección de bandas compartidas y bandas exclusivas de cada individuo. Después de tener el análisis numérico se procedió a la construcción de un dendrograma mediante el algoritmo de UPGMA (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Averages) descrito por Sneath y Sokal (1973) que ordena todas las accesiones en grupos similares de acuerdo con el polimorfismo detectado con los 25 microsatélites; con esta información se obtienen las tasas de similitud y las distancias genéticas de acuerdo con Nei (Nei y Li, 1973; Nei y

Roychoudhury, 1974; Nei, 1978) calculado de acuerdo con la fórmula $S_{ij} = 2a / (2a + b + c)$, donde S_{ij} es la similaridad entre dos individuos, e i y j es el número de bandas presentes en i y ausentes en j .

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis de microsatélites

Se evaluaron 25 microsatélites en una muestra de 100 accesiones (N= 100). El porcentaje de amplificación obtenido fue del 100%, lo que permitió identificar 168 alelos y obtener la huella genómica para la identificación genotípica de cada accesión. El producto del PCR fue visualizado en gel de garosa (Figura 1).

Niveles de polimorfismo

El número de alelos por locus presentes en las muestras analizadas presentó un rango entre 2 (mTcCIR2) y 14 (mTcCIR15) alelos, con un promedio de 6,72 el cual supera el obtenido en trabajos de Lanaud *et al.*, (1999) con valores de 5,6. El número de bandas obtenidas con los 25 microsatélites en las 100 muestras de cacao, en algunos casos superó o fue menor a las reportadas en otros estudios, según se observa en la Tabla 2. Un ejemplo de un mayor número de bandas encontradas en el presente estudio se muestra en la Figura 2, al utilizar el *primer* mTcCIR-9, el cual señala la presencia de 6 alelos con las 100 accesiones de cacao conservadas en el banco de germoplasma de CORPOICA.

El polimorfismo encontrado con los microsatélites es mayor al reportado mediante isoenzimas por Lanaud (1987), RAPDs (*random amplified polymorphic DNAs*) por Lecerteau *et al.* (1997) y RFLPs (*restriction fragment length polymorphisms*) por N'Goran *et al.* (2000).

Distancia genética

Según su origen, el número de accesiones evaluadas se distribuyó así: 43 colombianas, 22 trinitarias, 12 ecuatorianas, 13 peruanas, 8 costarricenses y 2 brasileras. Los genotipos se agruparon en el dendrograma obtenido mediante el algoritmo UPGMA, de acuerdo con el Índice de Similaridad Genética de Nei (Nei, 1978) utilizando el Coeficiente de Dice (Dice, 1945). La Figura 3 muestra los agrupa-

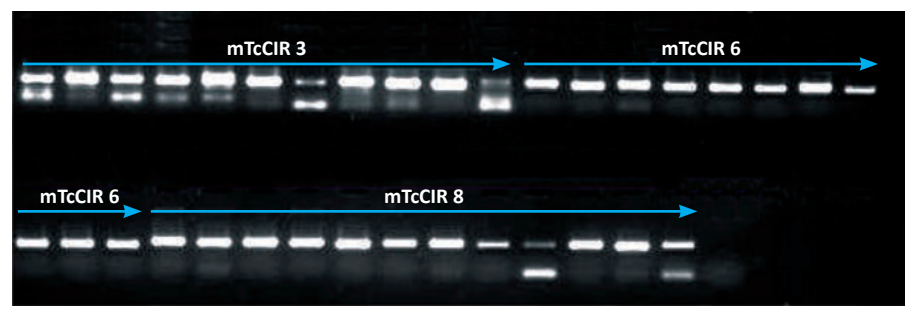


Figura 1. Producto de amplificación usando 34 accesiones con los microsatélites mTcCIR-3, mTcCIR-6 y mTcCIR-8, visualizado en gel de agarosa al 2%.

Tabla 2. Características de los 25 microsatélites evaluados en las 100 accesiones de cacao conservadas en el banco de germoplasma de conservación de la E.E. La Suiza de CORPOICA en el departamento de Santander.

Microsatélite	No. accesión	T° (°C)	Tamaño (pb)	Número de alelos (Lanaud, 1999)	Número de alelos (ABGC, 2004)
mTcCIR 1	Y16883	51	143	3	3
mTcCIR 2	Y16978	51	254	3	2
mTcCIR 3	Y16977	46	249	6	12
mTcCIR 4	Y16979	51	259	3	3
mTcCIR 6	Y16980	46	231	8	6
mTcCIR 7	Y16981	51	160	6	6
mTcCIR 8	Y16982	46	301	5	6
mTcCIR 9	Y16983	51	274	4	6
mTcCIR 10	Y16984	46	208	4	7
mTcCIR 11	Y16985	46	298	9	6
mTcCIR 12	Y16986	46	188	10	7
mTcCIR 13	Y16987	46	258	4	5
mTcCIR 15	Y16988	46	254	10	14
mTcCIR 17	Y16990	51	271	3	6
mTcCIR 18	Y16991	51	345	8	7
mTcCIR 19	Y16992	46	376	6	6
mTcCIR 21	Y16994	46	157	6	9
mTcCIR 22	Y16995	46	289	4	5
mTcCIR 24	Y16996	46	198	4	6
mTcCIR 25	Y16997	46	153	13	11
mTcCIR 26	Y16998	46	298	6	7
mTcCIR 28	Y16999	46	336	2	3
mTcCIR 43	TCA271945	46	282	NRL	8
mTcCIR 46	TCA271948	46	264	NRL	8
mTcCIR 49	TCA271951	46	266	NRL	9

NRL: No reportado en la literatura; T°: temperatura de anillamiento usada; ABGC: accesiones en el banco de germoplasma de CORPOICA.

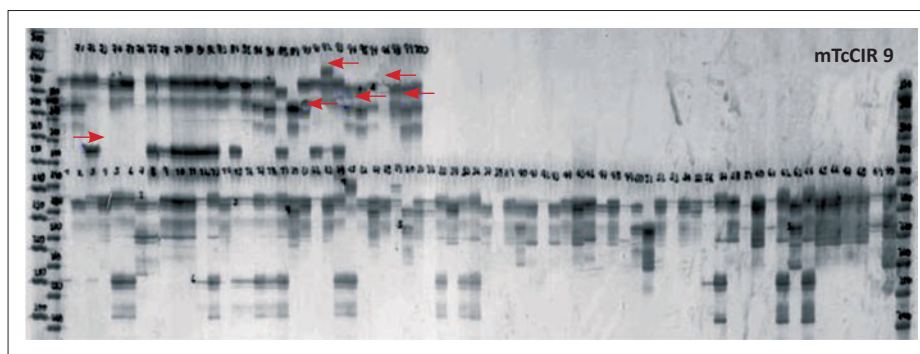


Figura 2. Polimorfismo detectado con el microsatélite mTcCIR-9 con las 100 accesiones de cacao, visualizado en geles de acrilamida 6%.

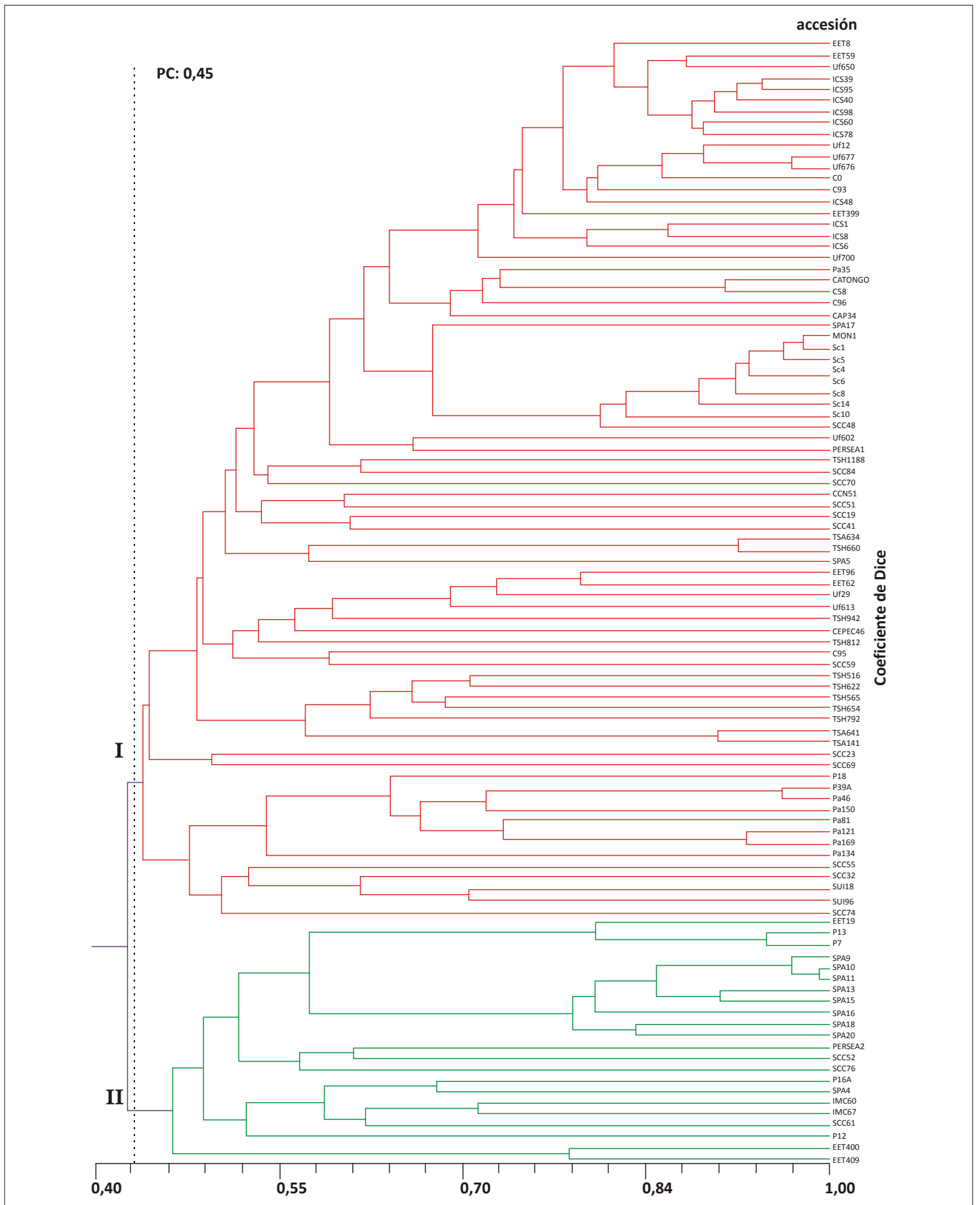


Figura 3. Dendrograma derivado del algoritmo UPGMA para las 100 accesiones de cacao, basado en el Coeficiente de Similaridad de Dice, usando el Índice de Similaridad Genética de Nei (Nei y Li, 1973; Nei, 1978).

mientos obtenidos de las 100 accesiones con Índices de Similitud Genética superiores a 0,45. El punto de corte (PC) señala la presencia de dos grupos (I y II) con varios subgrupos internos que varían en orden de similitud. El grupo I, incluyó accesiones de Colombia, Trinidad, Perú, Costa Rica y Brasil, mientras el grupo II acogió accesiones de Ecuador, Perú y Colombia. Los clones ecuatorianos EET 400 y EET 409 son los genotipos que más se distancian del resto del grupo II mientras que, entre ellos, se determina una similitud del 80%.

Los clones colombianos SC4 y SC6, SPA10 y SPA11 presentaron entre ellos valores de similitud genética del 100%, lo que sugiere la presencia de duplicados; no obstante, dichos materiales se deben evaluar en el campo y en diferentes ambientes para llegar a una conclusión definitiva y tomar decisiones acerca si deben ser mantenidos como clones diferentes en el banco. De igual manera sucede con los clones trinitarios ICS39, ICS95, ICS40, ICS98 y ICS60 que en el campo no presentan diferencias fenotípicas importantes de acuerdo con comunicación personal de investigadores de FEDECACAO (Federación Nacional de Cacaoteros de Colombia) y con los 25 microsatélites; estos materiales muestran una tasa de similitud superior al 80%. Los presentes resultados sugieren la realización de ensayos con estos materiales en ambientes diferentes, con el fin de tomarlos como duplicados o conservarlos para los ambientes más aptos. De acuerdo con lo anterior, se considera necesario evaluar un mayor número de locus para verificar la presencia de posibles duplicados en cada uno de los casos mencionados.

Los 14 clones élite colombianos incluidos en este análisis presentaron una mayor diferenciación con los microsatélites mTcCIR-8, mTcCIR-18, mTcCIR-9 y mTcCIR-12; estos cuatro microsatélites se seleccionaron como candidatos prioritarios para el análisis de huella genómica (*fingerprinting*) cuyo resultado se ve en la Figura 4. Esto es de gran importancia para la certificación de materiales; sin embargo, se debe corroborar esta información probando todos los clones élite colombianos conservados en el banco de germoplasma de CORPOICA, indagando por

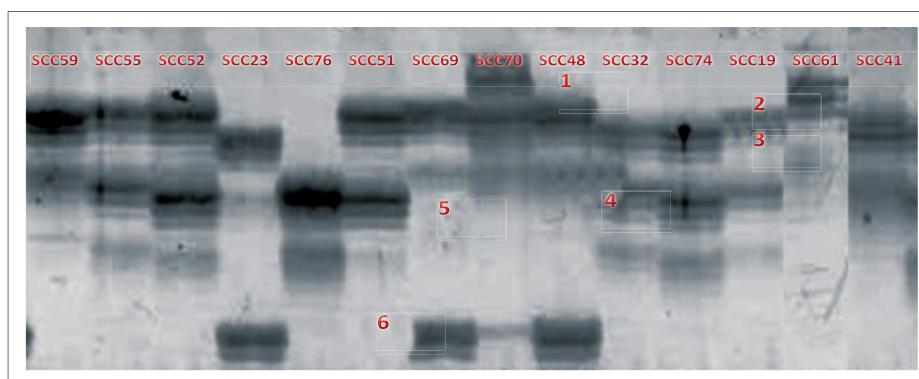


Figura 4. Huella genómica de 14 clones élite evaluados con el marcador microsatélite mTcCIR-9 visualizado en gel de acrilamida 6%.

un mayor número de microsatélites para obtener información estadística sobre las frecuencias de aparición de determinado patrón de DNA en toda la colección y poder establecer un grupo reducido de marcadores que los podrían identificar.

CONCLUSIONES

Este estudio permitió obtener la huella genómica o *fingerprinting* para cada una de las 100 accesiones analizadas con 25 microsatélites, basados en el patrón de bandas de cada una. Los resultados muestran información relevante acerca del polimorfismo y la riqueza en diversidad genética de las accesiones de cacao conservadas en el banco de germoplasma de referencia para Colombia.

La detección y análisis de la diversidad genética de los clones de cacao colombianos es de gran importancia para el mejoramiento genético del cultivo y puede ser aprovechada en programas de selección y mejoramiento de productos basados en su calidad y en el reconocimiento de su procedencia mediante la 'denominación de origen' (DO), lo cual tiene implicaciones de propiedad industrial y comercial para aquellos cacaos nacionales con los que se podrían producir cacaos especiales tipo 'gourmet'; ello posibilita su utilización en forma sostenible, aprovechando la diversidad para la selección de nuevas variedades de interés en cuanto a calidad y resistencia a patógenos. La caracterización y el conocimiento de la diversidad en recursos genéticos nativos da valor agregado, mayor capacidad de negociación y resguarda el patrimonio nacional de la piratería. La utilización de dicha diversi-

dad, exclusiva de materiales colombianos, redundará en mejores ingresos para los productores y para la industria nacional, creando fuentes de trabajo y bienestar para los pequeños agricultores.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue realizado gracias al aporte financiero del Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural de Colombia. Agradecemos a la Unidad de Biotecnología del Centro Internacional de Agricultura Tropical -CIAT- especialmente a Adriana Bohórquez, Eliana Gaitán y a su director el Dr. Joe Tohme, por la valiosa cooperación con CORPOICA. Así mismo, a los Drs. Luis Mejía y Roberto Coronado de la E.E. La Suiza (Santander) por el correcto, oportuno y bien documentado envío de las muestras.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

- Argüello, O.C., L.A. Mejía, N. Contreras y J.A. Toloza. 1999. Manual de caracterización morfo-agronómica de clones elite de cacao (*Theobroma cacao* L) en el nororiente colombiano. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria -CORPOICA-, Bucaramanga. 40 p.
- Bennett, B.A. 2003. Out of the Amazon: *Theobroma cacao* enters the genomic era. Trends Plant. Sci. 8(12): 561-563.
- Cheesman, E.E. 1944. Notes on the nomenclature, classification and possible relationships of cocoa populations. Trop. Agri. 21: 144-159.
- Cuatrecasas, J. 1964. Cacao and its allies: a taxonomic revision of the genus *Theobroma*. Contrib. USA Nat. Herbarium 35(6): 379-614.
- Dice, L.R. 1945. Measures of the amount of ecologic association between species. Ecology 26: 297-302.

- Engels, J.M. 1986. The systematic description of cacao clones and its significance for taxonomy and plant breeding. PhD thesis. Wageningen University, Holanda.
- Lanaud C. 1987. Nouvelles dones sur la biologie du cacaoyer (*Theobroma cacao* L.): diversité des populations, systèmes d'incompatibilité, haploïdes spontanés. Leurs conséquences pour l'amélioration génétique de cette espèce. PhD thesis, Paris IX.
- Lanaud, C., A.M. Risterucci, I. Pieretti, M. Falque, A. Bouet y P.J.L. Lagoda. 1999. Isolation and characterization of microsatellites in *Theobroma cacao* L. Mol Ecol 8: 2141-2143.
- Laurent, V., A.M. Risterucci y C. Lanaud. 1994. Genetic diversity in cocoa revealed by cDNA probes. Theor. Appl. Genet. 88: 193-198.
- Laurent, V., A.M. Risterucci y C. Lanaud. 1993a. Chloroplast and mitochondrial DNA diversity in *Theobroma cacao*. Theor. Appl. Genet. 87:81-88.
- Laurent, V., A.M. Risterucci y C. Lanaud. 1993b. Variability for nuclear ribosomal genes within *Theobroma cacao*. Heredity 71:96-103.
- Lecerteau, E., T. Robert, V. Pétiard y D. Cruzillat. 1997. Evaluation of extent of genetic variability among *Theobroma cacao* accessions using RAPD and RFLP markers. Theor. Appl. Genet. 95: 10-19.
- Morgante, C.W. y A.M. Olivieri. 1993. PCR-amplified microsatellites as makers in plant genetics. Plant J. 3: 175-182.
- Nei, M. y W.H. Li. 1973. Linkage disequilibrium in subdivided populations. Genetics 75: 213-219.
- Nei, M. y A.K. Roychoudhury. 1972. Gene differences between Cacasian, Negro and Japanese population. Science 177:434-436.
- Nei, M. y A.K. Roychoudhury. 1974. Sampling variances of heterozygosity and genetic distance. Genetics 76: 379-390.
- Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from small number individuals. Genetics 89: 583-590.
- N'Goran, J.A.K., V. Laurent, A.M. Risterucci y C. Lanaud. 1994. Comparative genetic diversity studies of *Theobroma cacao* L. Using RFLP and RAPD markers. Heredity 73: 589-597.
- N'Goran, J.A.K., V. Laurent, A.M. Risterucci y C. Lanaud. 2000. The genetic structure of cocoa populations (*Theobroma cacao* L.) revealed by RFLP analysis. Euphytica 115: 83-90.
- GenBank. NCBI. 2005. En: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>; consulta: febrero 2005.
- Perea, J.A., C. Villamizar, A.E. Espinosa y V.G. Otero. 2002. Mejoramiento genético. En: Tecnología para el mejoramiento del sistema de producción de cacao. Mejía, L.A. y O. Argüello. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria –CORPOICA–, Bucaramanga. 160 p.
- Powell, W., G.C. Machray y J. Provan. 1996. Polymorphism revealed by single sequence repeats. Trends Plant Sci. 1: 215-222.
- Promega Corporation. 2003. Technical manual DNA silver staining system. pp. 1-12.
- Roldán, D.L., M.S. Salazar, M.I. Tejada y L.X.H. Ortiz. 2004. Documento de trabajo No. 13, Observatorio Agrocadenas Colombia. Bogotá. 60 p.
- Rohlf, F.J. 2000. NTSYSpc, Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, versión 2.1 para Windows 98. Department of Ecology and Evolution, State University of New York.
- Russell, J., J. Fuller, G. Young, B. Thomas, G. Taramino, M. Macauley, R. Waugh y W. Powell. 1997. Discriminating between barley genotypes using microsatellite makers. Genome 40: 442-450.
- Sneath, P.H.A. y R.R. Sokal. 1973. Numerical taxonomy: The principles and practice of numerical classification. W.H. Freeman & Co. San Francisco (California, EUA). 588 p.
- Taramino, G. y S. Tingey. 1996. Simple sequence repeats for germplasm analysis and mapping in maize. Genome 139: 457-462.
- Schlotterer, C. y D. Tautz. 1992. Slippage synthesis of simple sequence DNA. Nucleic Acids Res. 20:211-215.
- Warren, J.M. 1994. Isozyme variation in a number of populations of *Theobroma cacao* L. obtained through various sampling regime. Euphytica 72: 121-126.
- Yang, G.P., M.A. Saghai-Marooof, C.G. Xu, Qifa Zhang y R.M. Biyashev 1994. Comparative analysis of microsatellite DNA polymorphism in lardrances cultivars of rice. Mol Gen Genet 245: 187-194.