

# Caracterización agronómica, botánica y molecular de clones de cacao tipo criollo y mejorado de la zona sur de Guatemala

Andrés Avalos<sup>1</sup>, Manuel Antonio Porres<sup>2</sup>, Elfriede Pöhl<sup>3</sup>, Elena Dardón<sup>1</sup>, Luis Andrés Arévalo<sup>2</sup> & Julio Armando Rosales<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Protección Vegetal, <sup>2</sup>Laboratorio de Entomología Aplicada, Centro de Estudios Agrícolas y Forestales (CEAF)

<sup>3</sup>Herbario, Centro de Biodiversidad (CB)

<sup>4</sup>Investigador CEAF, CampusSur

Universidad del Valle de Guatemala

**RESUMEN:** Guatemala no cuenta con una colección de plantas de cacao (*Theobroma cacao* L.) de tipo criollo, por lo que se hace necesario hacerla por medio del establecimiento de un jardín clonal y, de esta forma, disponer de material vegetativo cuando se necesite. Para ello, se hizo una búsqueda, rescate y caracterización agronómica, botánica y molecular de diferentes plantas para observar y describir sus características. El interés en el cacao criollo se fundamenta en el hecho de que se ha encontrado que son los que producen la mejor calidad de chocolate, a pesar de ser más susceptibles a algunas enfermedades como *Phytophthora palmivora* Butl. Visitas a diferentes departamentos de Guatemala para la búsqueda de material vegetativo de cacao criollo resultó en el hallazgo de una colección de 180 árboles de cacao provenientes Centro América y México ubicada en Retalhuleu; de esta colección se identificaron árboles con características de criollos y se tomaron materiales vegetativos con el propósito de injertarlo en el jardín clonal establecido en la UVG del Sur. De estos materiales se fotografiaron las inflorescencias y los frutos para su análisis en el herbario y se tomó material foliar sano para su análisis genético mediante marcadores microsatélites.

**PALABRAS CLAVE:** Cacao criollo, caracterización agronómica, caracterización botánica, caracterización genética, microsatélites.

**Agronomical, botanical and molecular characterization of “criollo” and improved cocoa trees (*Theobroma cacao* L.) in southern Guatemala.**

**ABSTRACT:** The absence of a local core “criollo” cocoa tree collection (*Theobroma cacao* L.) stresses the necessity of establishing a clonal garden from which these materials can be retrieved whenever needed. For this reason, survey and rescue activities followed by agronomical, botanical and genetic characterization were performed, with the aim of observe, describe and register their characteristics. “Criollo” cocoa has been found to produce higher quality chocolate but being more susceptible to pathogens such as *Phytophthora palmivora* Butl substantially lowers its productivity. A collection of 180 cocoa trees with different origins was found at Retalhuleu, and vegetative materials

from several plants with characteristics of “criollo” were grafted on a clonal garden established at UVG Sur. Flowers from these selected materials were photographed on the field, microphotographed at the laboratory and genetically analyzed using microsatellite markers.

**KEYWORDS:** Criollo cocoa, agronomical characterization, botanical characterization, genetic characterization, microsatellites.

## Introducción

El cacao, *Theobroma cacao* L., es una especie de planta que crece en el trópico entre 20° norte y 20° sur del Ecuador (León, 1956). Es producido principalmente por África Occidental, Centro y Sur América y Asia. Los países que poseen mayor producción son: Costa de Marfil, Ghana, Indonesia, Nigeria, Camerún, Brasil, Ecuador y Malasia, los cuales representan alrededor del 90% de la producción mundial. Por otro lado los países mayores consumidores del cacao, son Estados Unidos, Alemania, Francia, Inglaterra, Federación Rusa y Japón (INFOCOMM, 2008). El ingrediente principal producido del grano es el chocolate, pero también pueden producirse el licor del cacao, la manteca de cacao, la torta de cacao y el cacao en polvo. El negocio del chocolate es de alrededor de 8 mil millones de dólares mundialmente (BBCNEWS, 2004).

En Centroamérica, se cultivan alrededor de 22,000 hectáreas de cacao, con una producción de 6,000 toneladas métricas/año y con un valor de \$7 millones de dólares/año (Somarriba et al., 2007). En Guatemala se cultivan alrededor de 2,709 hectáreas (INE, 2003) con una producción de 1,136 toneladas métricas (Mollinedo, 2008). Los departamentos con mayor número de fincas y mayor producción son Alta Verapaz y San Marcos. Si se compara con los mayores productores de cacao del mundo, la producción centroamericana es muy baja, ya que el África tiene cultivadas 4,316,000 hectáreas con una producción de 1,808,000 toneladas métricas (Federation of Cocoa Commerce, 2008).

El valor del cacao para Guatemala no es necesariamente tener, en el futuro, una producción más alta que la de otros países, sino más bien dirigir la producción hacia un cacao de

alta calidad, lo cual podría lograrse con la utilización de los tipos de cacao criollos de los que se obtiene el cacao gourmet (Mora, 1956; InfoGalaxy, 2003). La calidad del chocolate depende de varios factores: del grado de acidez del grano, la fermentación, el tostado y el proceso de refinamiento del producto (Cros, 1997; Bressani, 2008). Como se indicó, los árboles de cacao criollos poseen la capacidad de producir cacao de calidad, pero es necesario un buen proceso de fermentación para que la calidad se manifieste en el producto final.

El objetivo del presente proyecto fue localizar los tipos de cacao criollos de Guatemala, así como su preservación o rescate y su caracterización agronómica, botánica y molecular, con el fin de utilizar estos tipos de cacao como fuente de producción de cacao de calidad para el país en el futuro. Los países europeos están interesados en cacaos que produzcan chocolate de calidad, por lo que se estarían pagando precios especiales por la semilla de los criollos. La caracterización molecular de estos será de utilidad, para la selección subsecuente de cacaos élite para ser producidos en el país.

El objetivo de la caracterización botánica fue obtener información acerca de las flores pues estudios anteriores indicaban que estas difieren en forma, tamaño y en presencia de estructuras especializadas como tricomas glandulares que pueden caracterizar a la variedad (Goltia y Jaffe 1997). De esta manera se determinará si las variedades del tipo criollo son diferentes estructural o morfológicamente a las otras variedades.

Se conoce que los cacaos tipo criollo son valiosos porque poseen características genéticas que determinan la calidad del cacao pero son altamente susceptibles a patógenos como *Phytophthora palmivora* Butl., *witches' broom* y *C. pernicioso* (Marita et al. 2001). Este estudio es importante para poder conocer qué características posee el cacao tipo criollo que se encuentra en Guatemala, y que sirva como referencia para futuros estudios.

## Materiales y métodos

### ESTRATEGIA METODOLÓGICA

La metodología consistió en las siguientes etapas: búsqueda, rescate, caracterización agronómica y botánica de las plantas de cacao criollo y toma de muestras de follaje, para su análisis molecular.

### MÉTODO

• **Método de campo:** Con la colaboración de la Asociación Nacional del Kakaw (ANAKAKAW) y el Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación (MAGA) se identificaron algunas áreas donde se localizaron plantaciones de cacao, para estudiar las posibilidades de encontrar plantas de cacao con características de criollos. Para la localización de tipos de cacao criollos, se usó como criterio la presencia de características de los frutos como: constricción de cuello (cuello de botella), superficie muy rugosa, surcos profundos, cáscara delgada y terminación en punta aguda y curva y coloración blanca de las semillas. La característica más importante para determinar si un árbol de cacao es criollo es el la coloración blanca o blancuzca de las semillas.

• **Búsqueda:** Con información de ANAKAKAW, del MAGA y de algunos productores de cacao se buscaron los cacaos

criollos en 5 departamentos: Huehuetenango, Quiché, Quetzaltenango, Escuintla y Retalhuleu. Se buscaron plantas con características de criollos como se indicó anteriormente.

• **Rescate:** Este proceso consistió en tomar material vegetativo de variedades prometedoras (i. e. de alta productividad), para ser injertado en el campus de la UVG del sur. También se tomó parte del material vegetativo -hojas nuevas de los clones-, para llevarlo al laboratorio de biología molecular y realizar las extracciones del ADN.

• **Caracterización agronómica:** Se tomaron fotografías de los frutos completos, midiendo el largo, ancho y peso; adicionalmente se hizo un corte para tomar datos de las semillas tales como su tamaño, peso, color y número de semillas por fruto. Seguidamente esta información se organizó en un cuadro.

• **Caracterización Botánica:** Este proceso consistió en recolectar en campo flores de los clones criollos, llevarlas al laboratorio y elaborar un registro microfotográfico además de elaborar una descripción morfológica de cada una complementando con diagramas.

• **Caracterización molecular:** Tejido foliar recientemente colectado de las muestras evaluadas agronómica y botánicamente fue procesado inmediatamente y almacenado a -80C hasta su análisis. El ADN de cada muestra fue extraído mediante el método de Doyle and Doyle (1990) utilizando nitrógeno líquido; 10 marcadores microsatélites (SSR) fueron amplificados de cada individuo mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Estos marcadores microsatélites fueron seleccionados por ser altamente polimórficos en estudios recientes (Schnell et al. 2005, Cryer et al. 2006, Sereno et al. 2006); el criterio de selección de los marcadores SSR fue la abundancia de polimorfismos reportada, no así su ubicación cromosómica, puesto que el genoma de *T. cacao* no fue publicado sino hasta tiempo después del análisis (Argout et al. 2011). Los marcadores microsatélites empleados fueron: mTcCIR001, mTcCIR006, mTcCIR010, mTcCIR011, mTcCIR012, mTcCIR017, mTcCIR022, mTcCIR166, mTcCIR248 y mTcCIR235. Los fragmentos amplificados fueron separados mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% y visualizados mediante tinción con nitrato de plata; el tamaño de cada fragmento (i.e. alelo) fue estimado utilizando el paquete de análisis de imágenes TotalLab120DM® –Phoretix1D®– en duplicado.

• **Técnica Estadística:** El ordenamiento en espacio reducido (PCA de las distancias genéticas euclidianas –coeficiente de Dice–) de los datos provenientes de los marcadores de ADN se llevó a cabo utilizando el paquete R-adegenet (Jombart, 2008). El agrupamiento UPGMA se generó utilizando el paquete TotalLab120DM.

## Resultados

• **Caracterización agronómica de las muestras.** Se tomaron muestras de frutos de cacao con características de criollos y se llevaron al laboratorio para su análisis, obteniendo información sobre identificación de la variedad, largo y ancho (cms) y peso del fruto (g), color de semilla, tamaño (cms) y número de semillas por fruto (Tabla 1).

**Tabla 1.** Información de las muestras de cacao recolectadas. Las muestras pertenecen a un jardín clonal ubicado en Santa Cruz Muluá, Retalhuleu (14.5833N, -91.6167W, 397msnm).

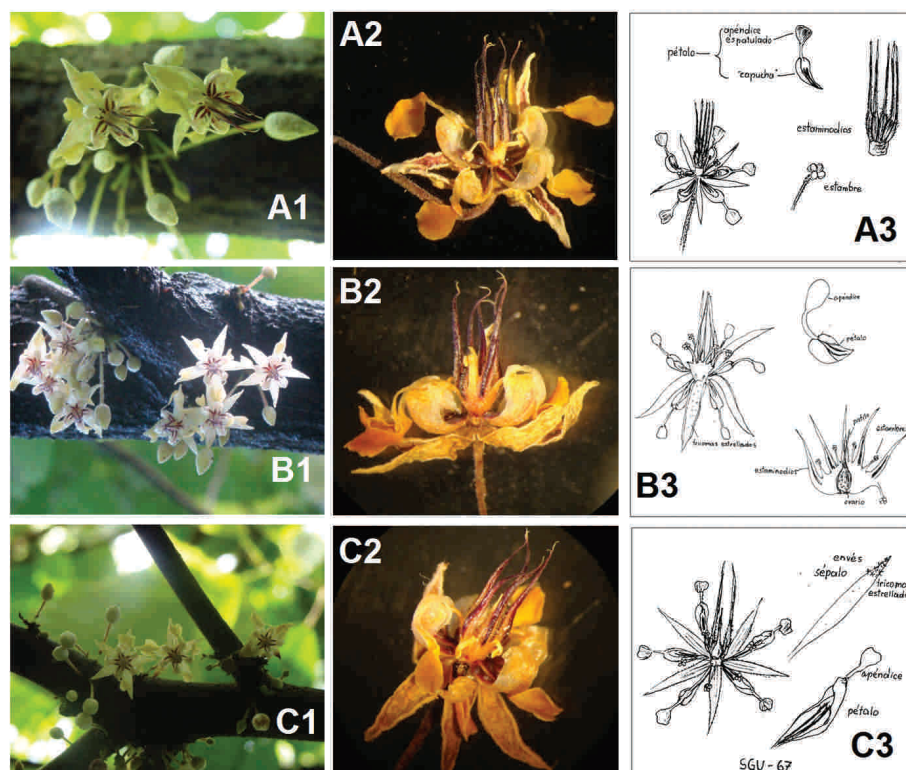
Clon	Largo fruto cm	Ancho fruto cm	Grosor cascara cm	Peso fruto g	Peso semillas g	Color semilla	Tamaño semilla. cm	Número semillas
22P	16	8	0.7	233	21.18	Blancas y violeta	Grande	11
30R	21	7	0.5	289	13.14	Violeta	Grande	22
SGU 2	21	8	0.7	400	20.00	Violeta	Grandes	19
UF221	16	8	0.3	256	9.14	Violeta	Grandes	28
SGU 5	16	8	0.4	236	5.76	Violetas y blancas	Medianas	41
Mezcla	20	10	0.5	553	5.90	blancuzcas	Medianas	40
UF 650	20	9	0.8	505	12.95	Violeta	Grandes	39
San Antonio	22	10	0.5	575	33.82	Violeta blancuzca	Medianas	17
15R	20	8	0.5	432	13.94	Blancuzca y violeta	Grandes	31
8P	17	8	0.7	376	12.96	Blancas	Medianas	29
24R	21	9	1.7	450	15.00	Blancuzcas y violetas	Grandes	30

Todas las muestras analizadas forman parte de un jardín clonal ubicado en Santa Cruz Muluá, departamento de Retalhuleu. Los clones con semilla blanca o blancuzca que tienen característica de criollos son 15R, 22P, 8P y SGU5 y 24R. Además, la mezcla de las variedades que se está reproduciendo para los agricultores en esta finca y que son considerados de buena producción son: 105R, UF667, UF221, SGU88, UF650, 10P, SGU66, SGU50, SGU2, 19R, 30R, 13R, SGU21, y SGU67. Estos árboles han estado sembrados en esta colección por más de 40 años, teniendo diferentes lugares de origen como México y Costa Rica, además de los locales.

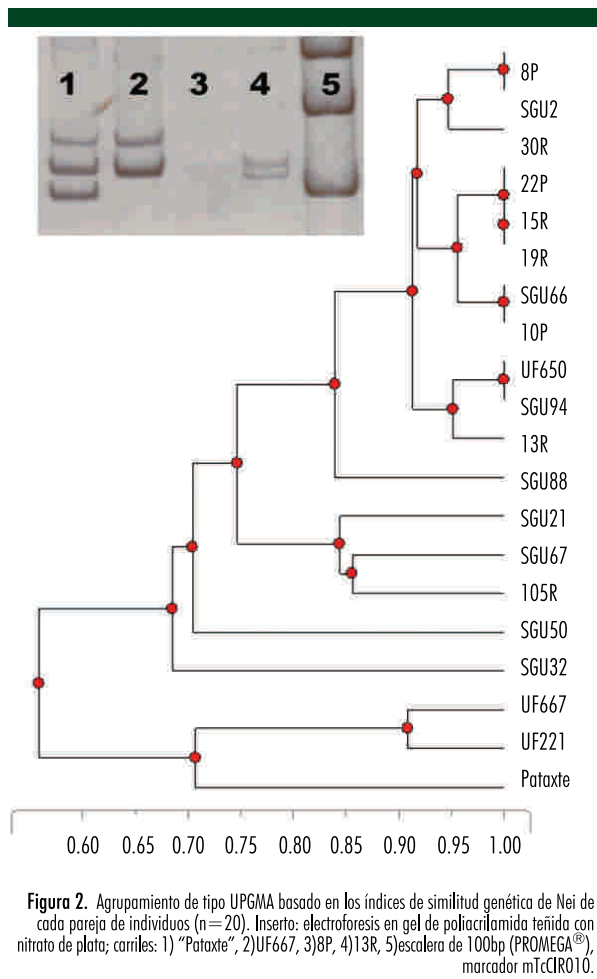
• **Caracterización Botánica.** Se estudió la morfología de las flores. La única diferencia encontrada en las flores del cacao criollo fue su tamaño relativamente menor, sin embargo las

estructuras observadas fueron todas similares. Se cuenta con un registro fotográfico en campo y microfotográfico en el laboratorio, así como un set de dibujos botánicos referencia (Figura 1). Se registraron datos detallados de sépalos, pétalos, estambres, pistilos, ovarios y tricomas, así como dibujos botánicos de los frutos, entre otros (no se muestran).

• **Caracterización Molecular.** Se analizaron tanto los clones criollos recolectados en diferentes localidades, así como los clones que se están distribuyendo como “criollos de alta producción” en finca Los Brillantes, Retalhuleu. En la Figura 2 se representa gráficamente el agrupamiento de los individuos según su similitud genética basada en marcadores microsatélites (SSR).



**Figura 1.** Caracterización botánica. A) Cacao “criollo”, 22P; B) Cacao de alta producción, SGU2 y C) Cacao de alta producción SGU67. 1: fotografía en campo, 2: microfotografía y 3: dibujo botánico.



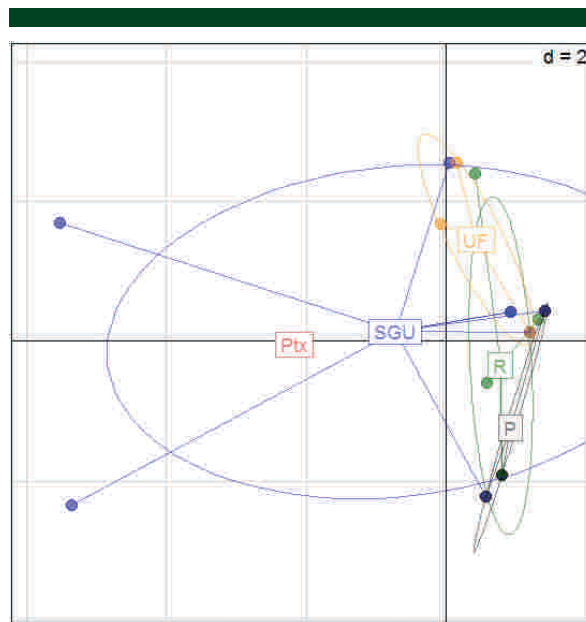
## Discusión de resultados

La caracterización detallada de cualquier cultivo es fundamental para su apropiado y óptimo aprovechamiento. La caracterización de los materiales de *T. cacao* incluidos en el estudio tiene el potencial de acelerar la producción de individuos que posean características deseables de alta calidad y alta productividad. La propagación vegetativa de los materiales de cacao garantiza la estabilidad de sus características, mientras que un programa de mejoramiento genético combinaría características deseables de dos organismos parentales en su descendencia. Con respecto a la búsqueda de materiales criollos de cacao, a priori se conocía que los árboles con estas características eran difíciles de encontrar; adicionalmente, la mayoría de ellos tenían poca producción (uno o dos frutos por árbol). Los frutos o "pochas" de los árboles de cacao criollo encontrados tenían, en su mayoría, semillas de color blanco pero, en algunos casos, una proporción de las semillas del mismo fruto tenían coloración púrpura; esto sugiere que, como resultado de un proceso de polinización cruzada, los óvulos y el polen provenían de distintos clones. Más aún, hubo casos en los que la coloración de la semilla no era blanca, sino blancuzca o casi blanca. Como referencia, se empleó a una especie diferente del género *Theobroma* conocido como "Pataxte" (*Theobroma bicolor*), que no es producido comercialmente a pesar de que sus frutos tienen semillas blancas

y que en algunas regiones es utilizado para hacer una bebida de cacao en polvo que al combinarla con agua produce cacao líquido de excelente calidad.

La información recopilada como resultado de la caracterización botánica de los cacaos en el estudio no mostró diferencias estructurales o morfológicas distintivas de las variedades criollas. Toda la información recopilada forma parte del Herbario del Campus Central.

La caracterización genética de las variedades aporta información complementaria a los datos agronómicos y botánicos. Pese a que la Universidad no cuenta con un sistema de electroforesis capilar con la cual estimar los tamaños de los fragmentos de ADN generados (i.e. alelos) con mayor precisión y exactitud, aún fue posible detectar polimorfismos en geles de poliacrilamida y conducir el análisis. Si se conduce el mismo experimento empleando electroforesis capilar, el aumento en la resolución (alrededor de 10bp) hará que los resultados difieran un poco, pero que la tendencia de los agrupamientos se mantenga. En Guatemala, la utilidad del análisis genético en el laboratorio es siempre cuestionada, pero con ese tipo de análisis es posible generar información valiosa que puede aplicarse en campo. Por ejemplo, con el dendrograma de la Figura 2 podría organizarse un programa de mejoramiento genético de cacao para Guatemala utilizando clones de producción genéticamente cercanos a materiales criollos. Es altamente probable que la descendencia de 8P (criollo) y SGU2 (alta productividad) de origen a un organismo con alta calidad y alta productividad. El grupo de individuos 22P/15R (criollos) y 19R/SGU66/10P (alta productividad) también puede considerarse con potencial para emplearse en mejoramiento genético. Este agrupamiento puede servir de referencia para saber qué clones deben propagarse vegetativamente, apoyando a programas de producción en Guatemala. Los individuos





UF667 y UF221 que comparten la característica de “alta productividad” conforman un grupo con *T. bicolor* (Pataxte), lo que sugiere un evento de hibridación.

La Figura 3 permite visualizar la composición de cada grupo de individuos según su origen y con *T. bicolor* como referencia. Esta figura revela que los individuos de cacao pertenecientes a la denominada “selección guatemalteca” SGU son los más diversos, pues su elipse de inercia abarca a los demás grupos; la ubicación del individuo Ptx (Pataxte) sugiere que los dos individuos fuera de la elipse de SGU (SGU50 y SGU88, no se muestran en la figura) comparten alelos con *T. bicolor*; ambos individuos comparten la característica de “alta productividad”.

Las figuras 2 y 3 difieren principalmente en la forma de agrupar a los individuos, siendo la segunda generada con variables sintéticas en las que está contenida la mayor cantidad de información (Jombart et al., 2009), sin embargo la información de ambas figuras es, nuevamente, complementaria y de gran utilidad.

Es importante aprovechar algunos de los clones de cacao que se tienen en la finca Los Brillantes (Retalhuleu) porque su propagación mediante cultivo de tejidos podría aumentar la distribución de clones de valor a los productores locales.

## Conclusiones

- Los clones de cacao 15R, 8P, SGU5, 22P, 24R y SGU32 tienen semilla de color blanco, por lo que se consideran criollos. Los clones SGU50, 105R, UF667, UF621, SGU88, UF650, 10P, 105R y SGU67 que se distribuyen a los agricultores, tienen semilla de color violeta por lo tanto no son criollos.
- Se localizaron cacaos criollos en Quetzaltenango, habiendo recolectado varias plantas de la especie *Theobroma bicolor* Bunpl. Esta especie tiene los frutos redondeados, rugosos y las semillas grandes de color blanco características de variedades de cacao criollo.
- En Escuintla, Huehuetenango, San Marcos y Quetzaltenango existen plantaciones de cacao, pero éstas son del tipo Forastero. No se encontraron tipos criollos en estos lugares.
- En Retalhuleu se encontraron varios tipos de cacao criollos entre estos el 15R, 22P, 30R y 8P. Se tuvo la oportunidad de inspeccionar y detectar plantas de cacao criollo con semilla blanca y blancuzca en la colección de clones que tiene lo que fue el Centro Experimental Los Brillantes.
- Se recolectó material vegetativo de los clones que el Centro Los Brillantes ha distribuido y distribuye a los agricultores. Los clones recolectados son SGU50, P10, UF667, UF221 y SGU5.
- Con base al análisis molecular, existe similitud entre los tipos de cacao criollos y los que se están repartiendo a los agricultores. El dendrograma (Figura 2) puede ser de utilidad para orientar un programa de mejoramiento genético local de cacao, ya que algunos clones criollos que tienen características genéticas para producir chocolate de alta calidad están cercanamente relacionados con los de alta producción que se distribuyen a los agricultores.

- Los clones SGU50, 105R, Ufco667, Ufco621, SGU88, Ufco650, 10P, 105R y SGU67 que se distribuyen a los agricultores en Brillantes tienen similitud genética los criollos por los que posiblemente tienen material genético para producir cacao de alta calidad, por lo que se recomienda su propagación. La finca Los Brillantes es un lugar donde se tienen colecciones de clones de cacao que pueden ser muy útiles a Guatemala.
- Es importante aprovechar tanto la información genética generada a partir de los clones criollos como la información referente producción. Esta información podría utilizarse para establecer un programa de mejoramiento genético a corto plazo para el cultivo del cacao. Además, si se necesita aumentar las siembras de cacao en el país se podrían propagar los clones que tienen mayor similitud a los criollos, porque posiblemente éstos tienen características genéticas que le confieren el potencial de producir chocolate de alta calidad de cacao que podría volverse homocigótica y expresarse en individuos de subsiguientes generaciones.

## Agradecimientos

La realización de este trabajo, ha sido posible, en parte, al apoyo financiero del Fondo Nacional de Ciencia y tecnología-FONACYT-otorgado por la Secretaria Nacional de Ciencia y Tecnología-SENACYT- del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología -CONCYT- mediante el proyecto FODECYT 50-2008. Se agradece la colaboración prestada por la Asociación Nacional de Productores de Cacao (ANAKAKAW) haciendo factible el contacto con agricultores productores de cacao para la localización de variedades de cacao criollo. Agradecimientos a Marcelo López Barrios y Marlon Reina de ANAKAKAW, San Marcos. También, la colaboración prestada por los ingenieros Jorge Estrada y Walter Gerardo Maldonado Osorio en la propagación de material vegetativo de cacao y por proporcionar contactos con agricultores del sur de Guatemala para la localización de variedades de cacao criollos. Asimismo, la colaboración del comité que dirige la finca los “Brillantes” de Muluá, Retalhuleu por facilitar la obtención de clones de cacao criollo y variedades de alta producción. Principalmente al señor Cornelio Morales Solano y a Aparicio Ardón Yax, Presidente de la Asociación. Al CampusSur-UVG por su colaboración en la siembra y mantenimiento en la colección de clones criollos recolectados.

## Bibliografía

- Argout X, J Salse, JM Aury et al (2011) *The genome of Theobroma cacao*. Nature Genetics **43**: 101-8
- BBC News March 24 (2004) *Fat profits: Choc tactics* disponible en Internet desde: <http://news.bbc.co.uk/1/hi/business/3560857.stm> [con acceso el 18-06-2008]
- Bressani R (2008) *Comunicación personal* Centro de Estudios en Ciencias de Alimentos, Instituto de Investigaciones, Universidad del Valle de Guatemala
- Cros E (1997) *Factores condicionantes de la calidad del cacao*. Presentado en el I Congreso venezolano del cacao y su industria, Maracay Venezuela, disponible en Internet desde: [con acceso el 19-06-2008]
- Cryer NC, MGE Fenn, CJ Turnbull, MJ Wilkinson (2006) *Allelic size standards and reference genotypes to unify international cacao (Theobroma cacao L.) microsatellite data* Genetic Res Crop Evol **53**:1643-1652

- Doyle JJ, JL Doyle (1990) *Isolation of plant DNA from fresh tissue* Focus **12**:13-15
- Federation of Cocoa Commerce *An overview of cocoa production in Côte d'Ivoire and Ghana* Disponible en Internet desde: <http://www.cocoafederation.com/education/produce.jsp> [con acceso el 18-06-2008]
- Goltia W, K Jaffe (1997) *Morfología comparativa de las flores de Theobroma cacao L., T. bicolor Humb. & Bonpl., T. glandiflorum (Willd. ex Spreng.) Schum y Herrania sp.* Acta Científica Venezolana **48**:13-18
- INFOCOMM (2008) *Market information in the commodities area* disponible en Internet desde: <http://r0.unctad.org/infocomm/anglais/cocoa/market.htm> > [con acceso el 24-06-2008]
- Info-Galaxy (2003) *From bean to chocolate* disponible en Internet desde: [http://www.info-galaxy.com/Chocolate/From\\_Bean\\_to\\_Chocolate/from\\_bean\\_to\\_chocolate.html](http://www.info-galaxy.com/Chocolate/From_Bean_to_Chocolate/from_bean_to_chocolate.html) > [con acceso el 24-06-2008]
- Instituto Nacional de Estadística (INE) (2003) *Área cultivada de cacao en Guatemala* Censo, Guatemala
- Jombart T (2008) *Adegenet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers* Bioinformatics **24**: 1403-1405, doi: 10.1093/bioinformatics/btn129
- Jombart T, D Pontier, A-B Dufour (2009) *Genetic markers in the playground of multivariate analysis* Heredity **102**:330-341
- León J (1956) *Taxonomía del género Theobroma (L)* Curso de Cacao, Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas, Turrialba, Costa Rica
- Marita JM, J Nienhuis, JL Pires, WM Aitken (2001) *Analysis of genetic diversity in Theobroma cacao with emphasis on withches' broom disease resistance* Crop Sci **41**:1305-1316
- Mollinedo J (2008) *Comunicación personal* Asociación Nacional del Kakaw, Guatemala
- Mora J (1956) *Origen y Tipos de Cacao* Instituto Interamericano de Ciencia Agrícola, Turrialba, Costa Rica
- R Development Core Team (2011) *R: A language and environment for statistical computing* R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>
- Schnell RJ, CT Olano, JS Brown, AW Meerow, C Cervantez-Martinez, C Nagai, JC Motamayor (2005) *Retrospective determination of the parental population of superior cacao (Theobroma cacao L.) seedlings and association of microsatellite alleles with productivity* J Amer Soc Hort Sci **103**: 181-190
- Sereno M L, PSB Albuquerque, R Vencovsky, A Figueira (2006) *Genetic diversity and natural population structure of cacao (Theobroma cacao L.) from the Brazilian Amazon evaluated by microsatellite markers.* Conservation Genetics **7**:13-24
- Somarrriba E; L Orozco, M Villalobos (2007) *Competitiveness and environment in Cocoa landscapes of Central America (Regional Cocoa Project RCP)* Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), Turrialba, Costa Rica. Disponible en Internet desde: [con acceso el 18-06-2008]