



CIENCIAS AGRARIAS Y DE LA PESCA

Premio Anual de la Academia de Ciencias de Cuba, 2020

Diversidad morfológica, genética y fitopatología del cacao (*Theobroma cacao* L.) tradicional cubano

Igor Bidot Martínez ^{1*} <https://orcid.org/0000-0002-1262-7674>

Yurelkys Fernández Maura ¹ <https://orcid.org/0000-0001-8803-6267>

Pierre Bertin ² <https://orcid.org/0000-0001-6452-088X>

Heide Marie Daniel ² <https://orcid.org/0000-0003-3057-7970>

Manuel Conrado Riera Nelson ¹ <https://orcid.org/0000-0001-6417-3646>

Marlyn Valdés de la Cruz ³ <https://orcid.org/0000-0001-8153-348X>

Stephan Declerck ² <https://orcid.org/0000-0002-0459-5975>

Cony Decock ² <https://orcid.org/0000-0002-1908-385X>

¹Universidad de Guantánamo. Guantánamo, Cuba

²Universidad Católica de Lovaina. Louvain-la-Neuve, Bélgica

³Universidad de La Habana. La Habana, Cuba

*Autor para la correspondencia: ibidot@cug.co.cu

Palabras clave

cacao tradicional cubano; caracterización; *Phytophthora*; *Theobroma cacao*

RESUMEN

Introducción: Los objetivos del trabajo fueron: Caracterizar la variabilidad morfológica y genética del cacao tradicional cubano para clasificarlo en los grupos tradicionales y genéticos del cultivo, Caracterizar morfológica y molecularmente las especies de *Phytophthora*, causantes de la podredumbre oscura de la mazorca en Cuba. **Métodos:** El cacao tradicional cubano se caracterizó con 33 descriptores morfológicos cualitativos y se amplificó el ADN con los 15 microsatélites estándares del cacao para su caracterización genética. Con el programa *structure* se determinó la estructura poblacional y se clasificó en los 10 grupos genéticos del cacao. Con estos resultados se seleccionaron las plantas para la colección núcleo mediante el algoritmo de máxima diversidad genética. Se estudiaron cepas de *Phytophthora* aisladas de frutos enfermos, se caracterizaron morfológicamente al microscopio y se extrajo el ADN para su análisis filogenético al amplificar la β -tubulina, TEF1- α e ITS. **Resultados:** Se observó que las plantas cubanas tienen una alta variabilidad morfológica y una baja variabilidad genética. Se clasificaron en siete grupos genéticos, pero la mayoría constituyen una mezcla entre Criollo y Amelonado, lo que indica que pertenecen al grupo tradicional Trinitario. Basado en estos resultados se seleccionó una colección núcleo. Además, se estudiaron un grupo de cepas de *Phytophthora* aisladas de frutos enfermos de Cuba, combinando aspectos morfológicos y moleculares para identificar las especies involucradas. Conclusiones: El cacao tradicional cubano se clasificó como Trinitario, con potencialidades para el mejoramiento genético y las especies de *Phytophthora* que afectan fundamentalmente los frutos del cacao son *P. palmivora* y *P. tropicalis*.



Morphological and genetic diversity, and phytopathology of traditional Cuban cacao (*Theobroma cacao* L.)

ABSTRACT

Keywords

traditional Cuban cacao; characterization; Phytophthora; Theobroma cacao

Introduction: The objectives of the work were to characterize the morphological and genetic variability of traditional Cuban cacao to classify it in the traditional and genetic groups of the crop, To characterize morphologically and molecularly the species of Phytophthora, causing the black pod disease in Cuba. **Methods:** Traditional Cuban cacao was characterized with 33 qualitative morphological descriptors and DNA was amplified with the 15 cacao microsatellites standard for its genetic characterization. With the structure program, the population structure was determined and classified into the 10 genetic groups of cocoa. With these results, the plants were selected for the core collection by means of the algorithm of maximum genetic diversity. Phytophthora strains isolated from diseased fruits were studied, morphologically characterized under the microscope and DNA was extracted for phylogenetic analysis by amplifying β -tubulin, TEF1- α and ITS. **Results:** It was observed that Cuban plants have high morphological variability and low genetic variability. They were classified into seven genetic groups, but most constitute a mix between Criollo and Amelonado, which indicates that they belong to the traditional Trinitario group. Based on these results a core collection was selected. In addition, a group of Phytophthora strains isolated from diseased pods of Cuba were studied, combining morphological and molecular aspects to identify the species involved. **Conclusions:** Traditional Cuban cacao was classified as Trinitarian, with potential for genetic improvement, and the Phytophthora species that mainly affect cacao fruits are *P. palmivora* and *P. tropicalis*.

INTRODUCCIÓN

El cacao tradicional, es un recurso genético local con características morfológicas y genéticas poco conocidas. Su presencia en zonas aisladas con pocas atenciones culturales, indican que puede ser resistente a factores bióticos y abióticos del ambiente y las semillas blancas de algunas plantas son muy apreciadas en el mercado internacional. Estas son potencialidades para el mejoramiento genético de la calidad y la adaptación a las condiciones de Cuba. Las potencialidades genéticas del cultivo pueden constituir una vía para combatir la podredumbre oscura de la mazorca, pero se requiere conocer las especies que causan esta enfermedad.

Basados en lo anterior nos planteamos los objetivos: Caracterizar la variabilidad morfológica y genética del cacao tradicional cubano para clasificarlo en los grupos tradicionales y genéticos del cultivo, Caracterizar morfológica y molecularmente las especies de *Phytophthora*, causantes de la podredumbre oscura de la mazorca en Cuba.

MÉTODOS

Análisis morfológico del cacao tradicional cubano

En 537 plantas de cacao tradicional cubano y 105 plantas de referencia se calculó la frecuencia de 33 descriptores

morfológicos cualitativos ⁽¹⁻³⁾ y se clasificaron en los grupos tradicionales mediante un análisis de conglomerados con la varianza mínima de Ward.

Análisis genético mediante microsatélites

El ADN genómico de las plantas de cacao se extrajo y amplificó con los 15 pares de cebadores microsatélites ^(4, 5) según se describió previamente. ⁽⁶⁾ Se calculó la frecuencia y el número de alelos, alelos raros, alelos privados, ⁽⁷⁾ intervalo de tamaño de los alelos, heterocigosidad observada y esperada, contenido de información polimórfica, ⁽⁸⁾ índice de *Garza-Williamson* ⁽⁹⁾ y la desviación del equilibrio de *Hardy-Weinberg*. ⁽¹⁰⁾

Con el programa *structure* versión 2.3.4 ⁽¹¹⁾ se determinó la estructura poblacional del cacao tradicional cubano y se clasificó en los grupos genéticos al analizarlo con plantas de referencia, ⁽¹²⁾ según los parámetros previamente descritos. ⁽⁶⁾

Selección de las plantas que integrarán la colección núcleo

Se seleccionó la colección núcleo de cacao tradicional cubano con el algoritmo de máxima diversidad genética ^(13, 14) implementado en el lenguaje de programación estadística R versión 3.01. ⁽¹⁵⁾

Caracterización morfológica de las cepas de *Phytophthora*

Se tomaron 90 aislados de *Phytophthora* de frutos enfermos y se mantuvieron en medio agar V8 a 24-29 °C. Las características morfológicas se observaron al microscopio óptico Olympus BX50 y se fotografiaron con el programa *Ulead Photo explorer SE* versión 7.0.

Análisis filogenéticos de las cepas de *Phytophthora*

El ADN se extrajo de micelio fresco crecido en extracto de malta líquido a 25 °C en la oscuridad y se amplificó la β -tubulina, TEF1- α e ITS con el par de cebadores TUBUR1-TUBUF2, ⁽¹⁶⁾ ELONGF1-ELONGR1 ^(16,17) y NS7-ITS4, ⁽¹⁸⁾ respectivamente, según se describió previamente. ⁽¹⁹⁾

El análisis filogenético se realizó por el método de máxima parsimonia de PAUP* versión 4.0b10. ⁽²⁰⁾ Se identificó el árbol de mayor parsimonia con búsquedas heurísticas con adición al azar de secuencia (1000), un conjunto máximo de árboles de 100, evaluado posteriormente mediante *bootstrap*, se retuvieron los clados compatibles con la regla de mayoría del 50 % en el árbol *bootstrap* consenso.

Los ITS de las secuencias de β -tubulin y TEF1- α se compararon con la base de datos de Genbank.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis morfológico del cacao tradicional cubano

Se observaron 98 de las 104 clases fenotípicas de los 33 descriptores morfológicos evaluados, lo que indica una alta variabilidad morfológica del cacao tradicional cubano. Las clases fenotípicas más representativas, con frecuencia superior a 0,5, fueron:

- Del brote de la hoja: ausencia de verde.
- En la flor: flor cerrada blanca, pedúnculo violeta claro, sépalos separados, con orientación horizontal y blanco, pétalos con limbo pendiente, amarillo intenso y con ausencia de rojo, filamento mayor que la concha y el limbo, presencia de líneas de guía, estaminoides divergentes y violeta intenso y filamentos de los estambres blancos.
- Del fruto: LA relación largo por ancho mayor que dos, forma general angoleta, superficie rugosa en grado intermedio, profundidad del surco mediana, presencia de cinco grupos de dos lomos cada uno, fruto maduro amarillo, ausencia de antocianinas en el lomo y el surco del fruto inmaduro y en el lomo y el surco del fruto maduro y mesocarpio duro.
- En la semilla: pulpa blanca, sabor levemente ácido, sección transversal aplastada y violeta intenso.

La variabilidad morfológica de las plantas de cacao tradicional cubano fue similar o superior a los clones del proyecto CFC/ICCO/IPGRI, ⁽²¹⁾ accesiones del banco de germoplasma internacional de cacao, Trinidad, ⁽²²⁾ fincas y el banco de germoplasma de Camerún. ⁽²³⁾

Las 68 plantas con semillas de cotiledón blanco son de interés para elaborar un chocolate fino y de excelente calidad, ^(24, 25) con bajas concentraciones de antocianinas y flavonoides ⁽²⁶⁾ y altas concentraciones de teobromina. ⁽²⁷⁾

La caracterización morfológica por primera vez del cacao tradicional cubano es de gran importancia, más cuando se estudia fundamentalmente la variabilidad genética, y hay pocos estudios de variabilidad morfológica. ^(28, 29)

En el dendrograma se clasificaron 111 plantas de cacao tradicional cubano como trinitarias, 212 como forasteras y 102 como criollas, resultado relacionado con la variabilidad morfológica de los grupos tradicionales Trinitario y Forastero ⁽³⁰⁾ (Fig. 1).

Las semillas blancas son típicas del grupo genético Criollo, pero el cacao tradicional cubano con esta característica no se clasificó como Criollo. Sin embargo, los cultivares tradicionales finos de aroma, con antecedentes Criollo y Forastero producen un chocolate fino ⁽³¹⁾ para mercados especializados, ^(31, 32) con altos precios. ^(33, 34)

Análisis genético mediante microsatélites

La suma de las frecuencias de dos alelos en todos los microsatélites fue superior a 0,8. Esta característica es típica de plantas trinitarias, ^(35, 36) por las hibridaciones e introgresiones en Trinidad de Criollo antiguo y Amelonado homocigóticas, ^(37, 38) lo que indica que el cacao tradicional cubano es Trinitario.

Se observaron 139 alelos por microsatélite, con media de 9,267 alelos por *locus*. Los alelos raros fueron 104, con una media por *locus* de 6,933 (Tabla 1).

El número de alelos del cacao tradicional cubano fue superior al observado en Bolivia, ⁽³⁹⁾ Ecuador, ⁽⁴⁰⁾ Nicaragua ⁽³³⁾ y República Dominicana ⁽⁴¹⁾ e inferior a bancos de germoplasma como la colección alto amazónica, ⁽⁴²⁾ África Occidental ⁽⁴³⁾ y CATIE ⁽⁴⁴⁾. Además, los alelos privados y raros indican información genética típica o exclusiva, potencialmente útil para el mejoramiento genético. ⁽⁴⁵⁾

La heterocigosidad observada varió entre 0,181 y 0,660 y la esperada entre 0,182 y 0,644. Estos resultados fueron superiores a plantaciones de Criollo en México (0,28), ⁽⁴⁶⁾ pero inferiores a plantaciones de la costa ecuatoriana, República Dominicana y bancos de germoplasma en Costa Rica, Perú, Puerto Rico y Ghana (0,460-0,717). ⁽⁴⁷⁻⁵⁰⁾

La media de la heterocigosidad esperada en el cacao tradicional cubano fue inferior a la observada en plantaciones de la costa ecuatoriana, Amazonas, Perú, República Dominicana, Nicaragua y Criollo en México (0,476 y 0,74). ^(33, 41, 46, 51-53)

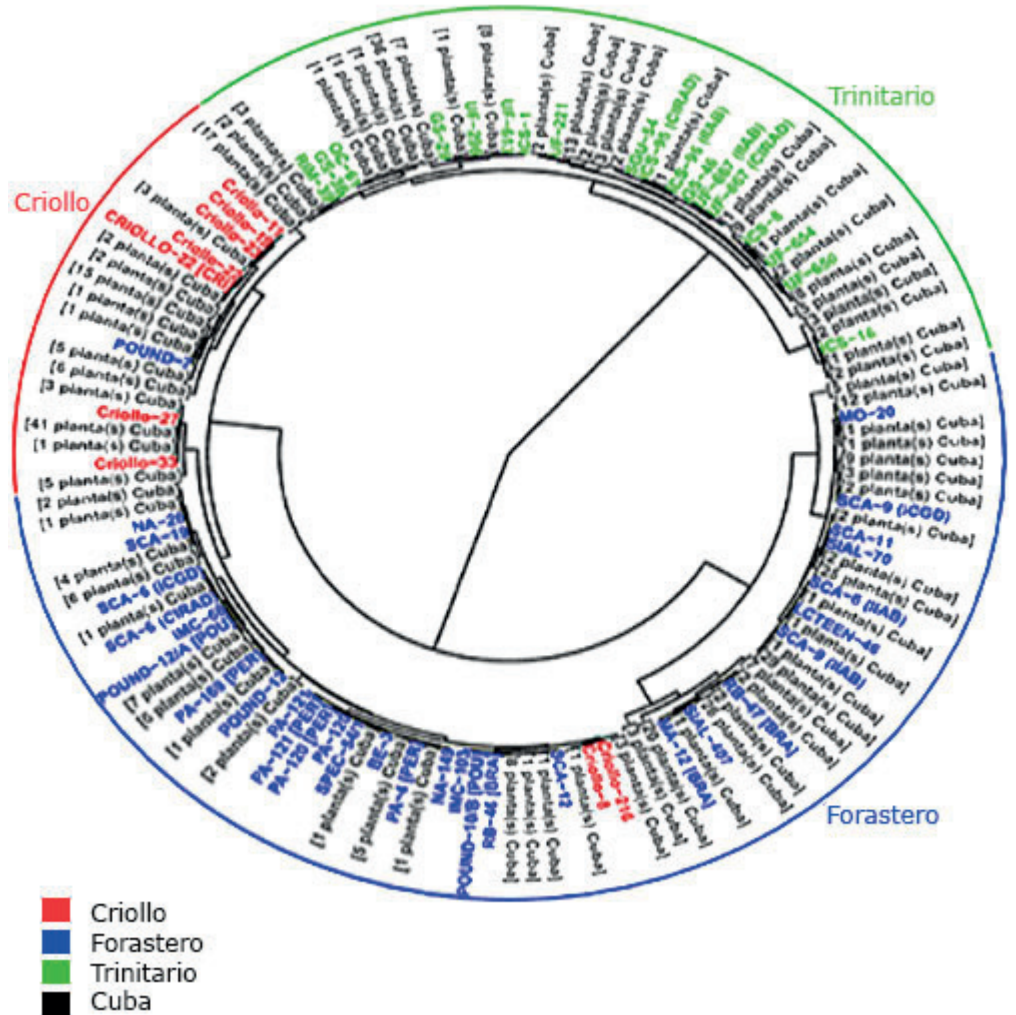


Fig. 1. Dendrograma del cacao tradicional cubano y las plantas de referencia de los grupos tradicionales. Elaboración propia.

Ocho de los microsatélites no estaban en equilibrio de Hardy-Weinberg, con déficit de heterocigotos. Resultados similares se observaron en cacao Criollo en México, (46) Refractario en Ecuador, (40) en el Amazonas brasileño, (52) Ecuador (40) y el cacao Nacional boliviano. (53)

El bajo valor de la heterocigosidad observada, esperada y el déficit de heterocigóticos indican baja variabilidad genética, debida a la alta frecuencia de dos alelos por *locus* y la endogamia, favorecida por sus poblaciones reducidas y aisladas. (54, 55)

El Índice de *Garza-Williamson* fue inferior a 0,68; límite por debajo del cual se considera una reducción reciente en el tamaño poblacional. (9) Este resultado confirma la historia del cultivo en Cuba, introducido por Cabaiguán (1540) y expandido por la zona central que concentró el 90 % del cacao durante el siglo XVIII. Posteriormente (1791-1803) se introdujo por Ti Arriba desde Haití, se expandió por la región oriental y disminuyó en el centro. (56)

Se observaron dos grupos en el cacao tradicional cubano. La media del coeficiente de pertenencia de cada planta a su

grupo fue de 0,952. En el grupo 1 se observaron 419 plantas y 118 en el grupo 2. (Fig. 2a).

Los grupos genéticos más frecuentes del cacao tradicional cubano fueron Amelonado (61,64 %) y Criollo (27,37 %). Las plantas restantes se clasificaron en los grupos Marañón (5,40 %), Iquitos (2,23 %), Contamana (1,49 %), Nanay (1,12 %) y Nacional (0,75 %) (Fig. 2b).

En el grupo 1 (asociado con la región oriental), el 96,90 % de las plantas se clasificaron en los grupos genéticos Amelonado y Criollo, lo que indique que son Trinitarias. Esta puede ser una evidencia de la introducción a Cuba en 1791-1803, cuando se cultivaba el Forastero y Trinitario. El 3,10 % restante pertenece al grupo Marañón.

En el grupo 2 (asociado con la región central) las plantas se clasificaron en siete grupos genéticos: Criollo (35,59 %), Amelonado (25,42 %), Marañón (13,56 %), Iquitos (10,17 %), Contamana (6,78 %), Nanay (5,09 %) y Nacional (3,39 %), lo que indica una mayor variabilidad genética. El 35,59 % de las plantas del grupo 2 se clasificaron en el grupo Criollo, evidencia de la introducción en 1540, cuando se cultivaba cacao Criollo. (38, 56)

Tabla 1. Variabilidad genética de los 15 microsatélites evaluados en el cacao tradicional cubano. Elaboración propia

Microsatélite	Alelos	Alelos raros	Alelos privados	Intervalo de tamaño (pb)	Ho	He	Equilibrio de Hardy-Weinberg (p)	PIC	Índice de Garza-Williamson (M)
mTcCIR1	6	4	2	129-141	0,404	0,418	0,031	0,337	0,500
mTcCIR6	9	7	2	227-251	0,335	0,363	0,369	0,341	0,375
mTcCIR7	6	3	1	149-161	0,238	0,300	0,076	0,279	0,500
mTcCIR8	11	9	4	284-306	0,270	0,292	0,096	0,263	0,500
mTcCIR11	8	6	0	290-316	0,364	0,399	0,000	0,361	0,346
mTcCIR12	10	8	2	177-252	0,440	0,425	1,000	0,375	0,133
mTcCIR15	10	8	1	234-258	0,449	0,526	0,003	0,463	0,417
mTcCIR18	7	5	0	332-356	0,387	0,441	0,015	0,392	0,292
mTcCIR22	9	7	4	275-296	0,318	0,376	0,017	0,330	0,429
mTcCIR24	6	4	0	186-202	0,181	0,182	1,000	0,169	0,375
mTcCIR26	7	5	2	285-305	0,248	0,346	0,003	0,319	0,400
mTcCIR33	17	14	5	273-345	0,380	0,486	0,001	0,467	0,250
mTcCIR37	12	9	0	135-175	0,394	0,495	0,045	0,470	0,325
mTcCIR40	11	8	1	262-286	0,481	0,644	0,283	0,578	0,500
mTcCIR60	10	7	2	188-214	0,660	0,597	0,194	0,535	0,423
Total	139	104	26	-	-	-	-	-	-
Media	9,267	6,933	1,733	-	0,370	0,419	-	0,379	0,384
Desv. est.	2,816	2,620	1,526	-	0,113	0,116	-	0,105	0,101

pb: pares de bases, Ho: Heterocigosidad observada, He: Heterocigosidad esperada, PIC: Contenido de Información Polimórfica, Desv. est. Desviación estándar

Los grupos genéticos del cacao tradicional cubano coincidieron con los de República Dominicana: Amelonado (61,64 % y 72,10 %), Criollo (27,37 % y 9,50 %), y los grupos Marañón, Iquitos, Contamana, Nanay y Nacional con menos del 20 %.⁽⁴¹⁾ Como el origen del cacao en República Dominicana y Haití es el mismo, es evidencia de la introducción a Cuba desde Haití.⁽³⁸⁾

Selección de las plantas que integrarán la colección núcleo

Se seleccionaron 185 plantas para la colección núcleo, que se está constituyendo en Baracoa. Esta colección núcleo se utilizará en el mejoramiento genético del cacao, en especial para incrementar la calidad. Las colecciones núcleo disminuyen los costos de conservación y facilitan el mejoramiento genético.^(57, 58)

Caracterización morfológica de las cepas de *Phytophthora*

En el medio V8, 88 cepas cubanas presentaron un patrón de crecimiento petaloide. La producción de esporangios fue abundante, con formas ovoides a elipsoidal, pedicelio

menor o igual a 4 µm de longitud, 38 µm-60 µm de longitud y 27 µm-40 µm de ancho. El radio L/A (largo/ancho) varió de 1,25 a 1,92. Se observaron las clamidosporas, con diámetro de 32,5 µm -43,5 µm. Estas características morfológicas corresponden a las observadas en *Phytophthora palmivora*.^(59, 60)

En dos aislados cubanos (CU58 y PHYTO40) y en los aislados de la Guyana Francesa, los esporangios midieron 37 µm-50 µm de longitud y 22 µm -32 µm de ancho, con un radio L/A de 1,8 a 2,4. Se observó una larga hifa de 50 µm. Según estas características las cepas pertenecen al complejo *Phytophthora capsici-Phytophthora tropicalis*⁽⁶¹⁾.

Análisis filogenéticos de las cepas de *Phytophthora*

Se identificaron dos especies de *Phytophthora* en Cuba: *P. palmivora* y *P. tropicalis*, dos en la Guyana Francesa: *P. tropicalis* / *capsici* complex y una potencial nueva *Phytophthora* sp. En Cuba *P. palmivora* fue la especie dominante y en la Guyana francesa fue *P. tropicalis* / *capsici* complex.

Las cepas de *P. palmivora* tuvieron un alto grado de similitud (Figura 3).

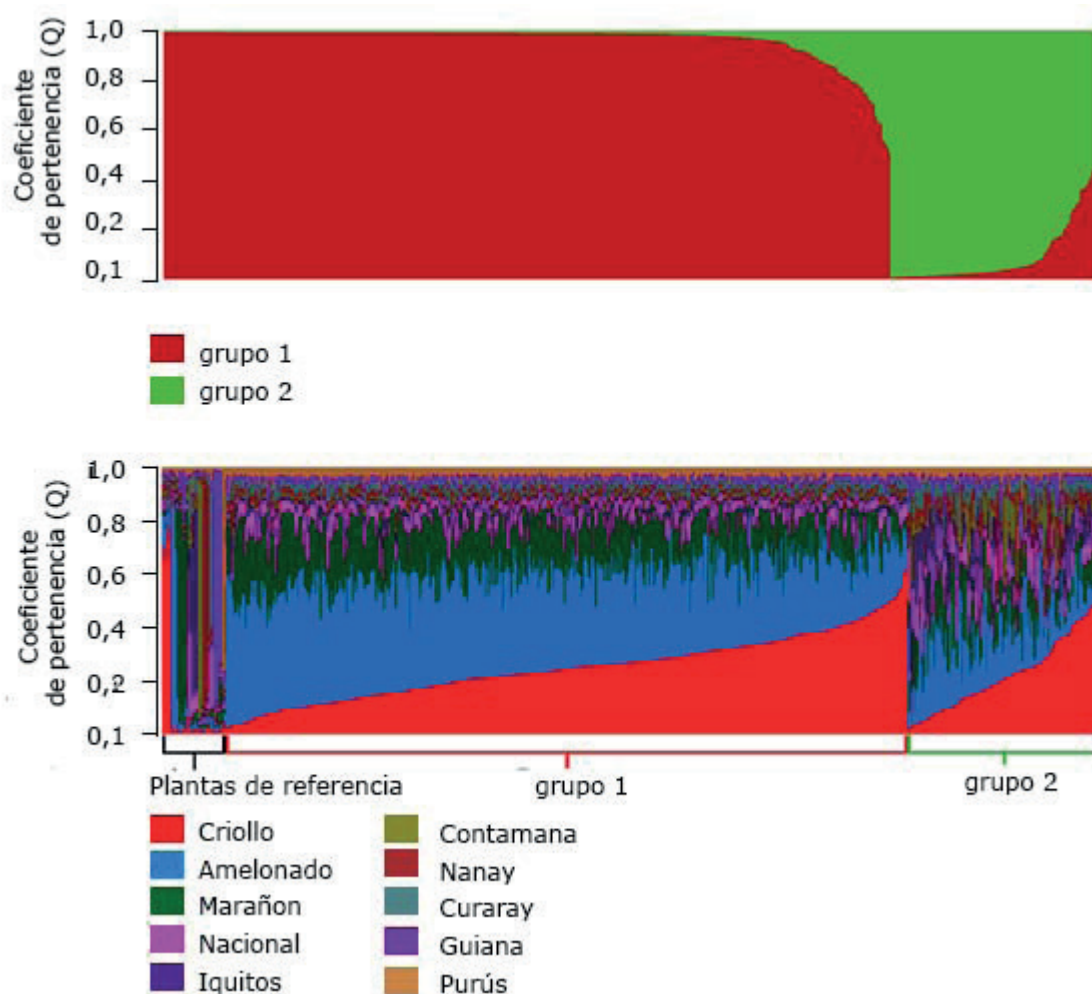


Fig. 2. Análisis basado en los 15 microsatélites del cacao tradicional cubano con el programa structure, modelo ancestral admixture. a. Estructura poblacional. b. Clasificación genética comparando con controles. Elaboración propia.

En los árboles filogenéticos de la región ITS y el gen TEF1- α se observó un máximo de 5 bp entre los 700 pares de bases de longitud de la región ITS, lo que corresponde a una proporción de sitios variables de alrededor de 0,01. La región TEF1- α de 1000 pares de bases de longitud fue más variable, con un máximo de 20 bp diferentes y una proporción de sitios variables de 0,02 bp.

Para el complejo *Phytophthora tropicalis / capsici* se contó con 865 bp, de los cuales 67 fueron informativos para la parsimonia. El análisis resultó en 981 árboles más parsimoniosos (MPT) (140 *steps in length*, CI = 0,771; RI = 0,904), de las 1000 búsquedas heurísticas. Se seleccionaron dos topologías concurrentes para las cepas de la Guyana Francesa (Fig. 4) que forman un clado bien soportado.

En los árboles filogenéticos y en todas las secuencias utilizadas (ITS, β -tubulina), los aislados de Cuba (CU58, PHYTO40) tentativamente identificados como complejo *P. tropicalis / capsici* se agruparon en el clado *P. tropicalis* s.s. Este clado contiene a la cepa tipo de *P. tropicalis* (CBS434.91), cepas de varios orígenes y varios hospederos. Las cepas cubanas difieren de *P. tropicalis* (*type*) en 4 bp a 5 bp, 6 bp a 7 bp, 3 bp a 5 bp, en ITS y β -tubulina, respectivamente.

Los aislados de la Guyana Francesa tentativamente identificados como *P. capsici*⁽⁶²⁾ se ubicaron en dos diferentes linajes según sus diferencias morfológicas.

El primer clado comprende 7 cepas mientras el segundo clado contiene una cepa (Reg 2-4). El linaje Reg 2-4 fue en

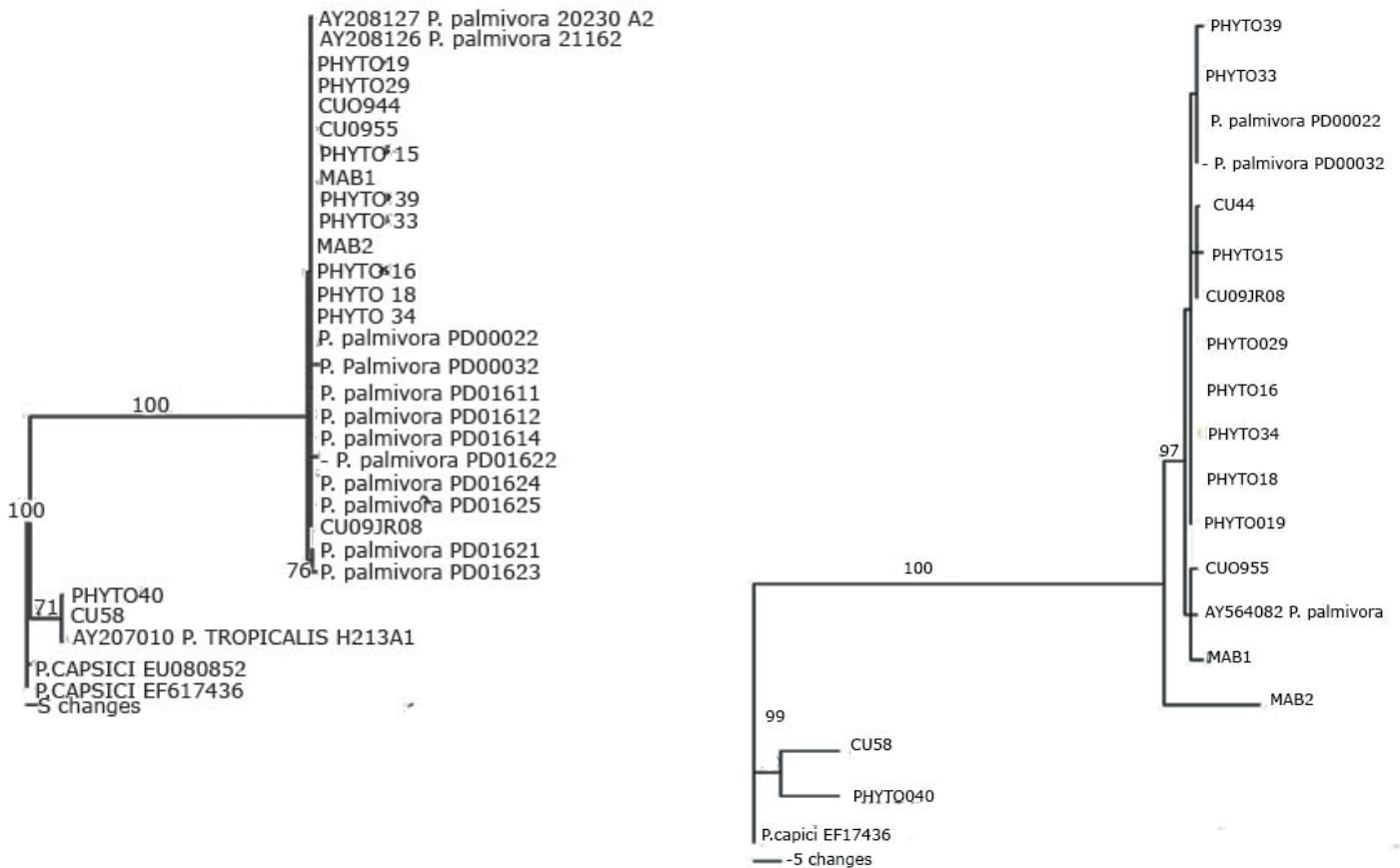


Fig. 3. Árbol filogenético de las cepas cubanas de *Phytophthora* inferido por análisis de máxima parsimonia. a. basado en las secuencias de la región ITS, b. basado en las secuencias del factor de elongación 1- α . Elaboración propia.

todas las filogenias, distantemente relacionado con *P. tropicalis* y *P. capsici*. Las otras 7 cepas forman un clado bien soportado en los tres análisis filogenéticos (linaje Guyana).

En las inferencias filogenéticas basadas en β -tubulina, el linaje de Guyana formó un clado bien soportado (Bootstrap 100) que se ubicó en una posición aislada, pero sus afinidades no están resueltas. Se observaron topologías concurrentes del análisis individual de cada gen. En su topología dominante (Figura 4a), el clado de Guyana se asoció al clado de *P. tropicalis* (type). En la topología menos frecuente (Figura 4b), este clado se asoció a *P. capsici*.

Conclusiones

La alta variabilidad morfológica y la baja variabilidad genética del cacao tradicional cubano es el resultado de su evolución a partir de plantas introducidas en Cuba con antecedentes de siete grupos genéticos y sus híbridos, con una estrecha base genética como resultado de un cuello de botella.

La clasificación del cacao tradicional cubano en el grupo Trinitario basado en su variabilidad morfológica y genética, le atribuye potencialidades para su empleo en el mejoramiento genético del cacao comercial presente en Cuba.

El algoritmo de máxima diversidad genética permitió seleccionar las plantas más representativas de la variabilidad morfológica y genética del cacao tradicional cubano, las que se proponen como colección núcleo para su conservación *ex situ*.

Dos especies de *Phytophthora* afectan los frutos de cacao en Cuba: *Phytophthora palmivora*, predominante en las muestras, y *Phytophthora tropicalis*, la cual se observó en una frecuencia muy baja.

Agradecimientos

A los investigadores y técnicos del Instituto de Investigaciones Agroforestales UCTB Baracoa, en especial a Pablo Clapé Borges, Yannolis Matos Cueto y Wilfredo Lambert Lobaina.

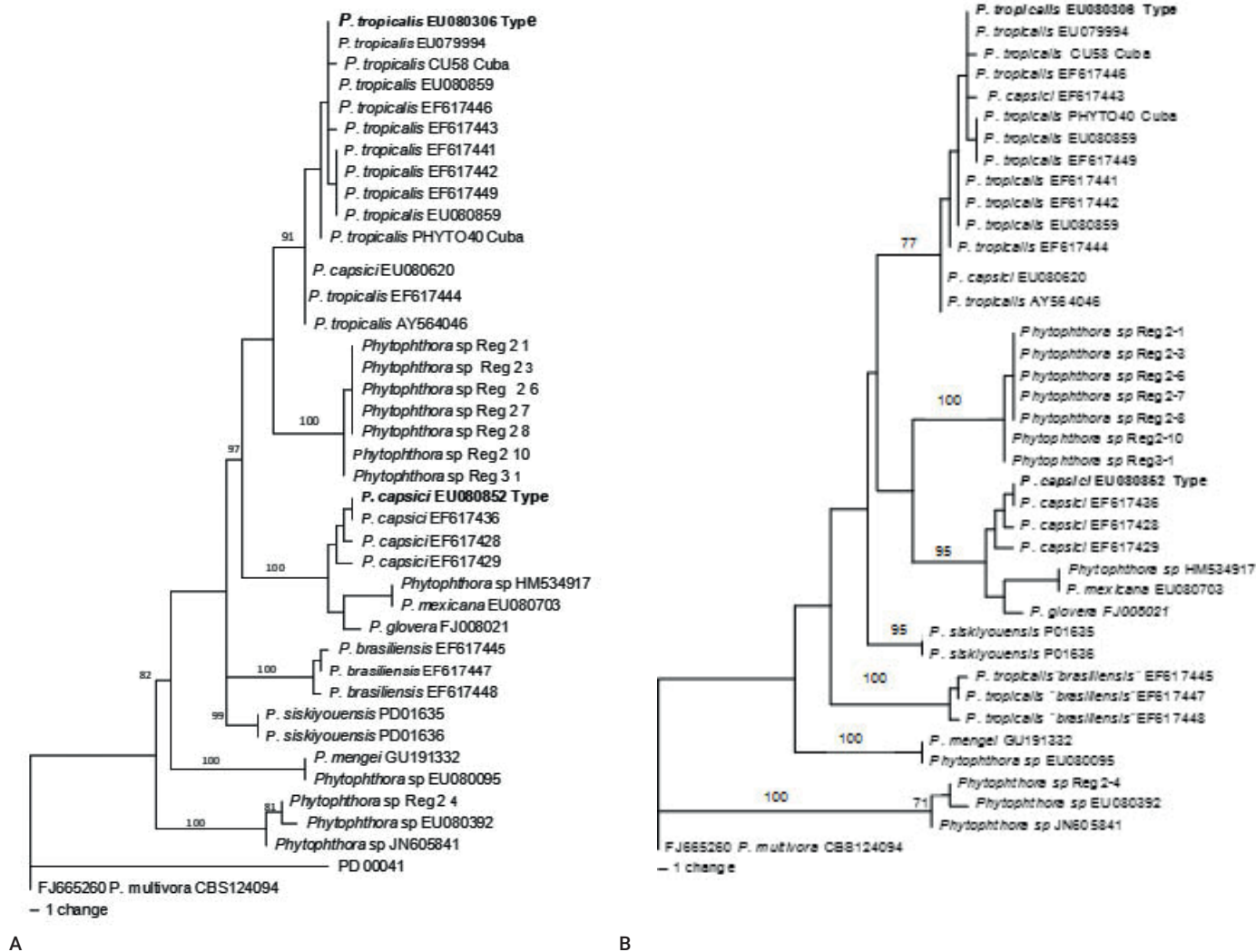


Fig. 4. Árbol filogenético que muestra las cepas cubanas de *Phytophthora* basado en las secuencias del gen β -tubulina, inferido por análisis de máxima parsimonia. A) Topología más frecuente. B) Topología menos frecuente. Elaboración propia.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Anon. Genetic resources of cocoa. IBPGR Working Group on genetics resources of cocoa, editor. Rome, Italy: IBPGR Secretariat. 1981;17-20 February 1981:25 p.
2. Bekele F, Butler DR. Proposed short list of cocoa descriptors for characterisation. In: Eskes AB, Engels JMM, Lass RA, editors. Proceedings of the CFC/ICCO/IPGRI Project Workshop; February 1-6, 1998; Montpellier, France: IPGRI; 2000:41-8p.
3. Bidot Martínez I, Valdés de la Cruz M, Riera Nelson M, Bertin P. Morphological characterization of traditional cacao (*Theobroma cacao* L.) plants in Cuba. *Genet Resour Crop Evol.* 2017;64(1):73-99.
4. Lanaud C, Risterucci AM, Pieretti I, Falque M, Bouet A. Isolation and characterization of microsatellites in *Theobroma cacao* L. *Mol Ecol.* 1999;8:2141-5.
5. Saunders JA, Mischke S, Leamy EA, Hemeida AA. Selection of international molecular standards for DNA fingerprinting of *Theobroma cacao*. *Theor Appl Genet.* 2004;110:41-7.
6. Bidot Martínez I, Riera Nelson M, Flamand M-C, Bertin P. Genetic diversity and population structure of anciently introduced Cuban cacao *Theobroma cacao* plants. *Genet Resour Crop Evol.* 2015;62(1):67-84.
7. Maguire TL, Peakall R, Saenger P. Comparative analysis of genetic diversity in the mangrove species *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. (*Avicenniaceae*) detected by AFLPs and SSRs. *Theor Appl Genet.* 2002;104(2-3):388-98.
8. Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet.* 1980;32(3):314-31.
9. Garza JC, Williamson EG. Detection of reduction in population size using data from microsatellite loci. *Mol Ecol.* 2001;10:305-18.
10. Guo SW, Thompson EA. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportions for multiple alleles. *Biometrics.* 1992;48:361-72.
11. Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics.* 2000;155:945-59.

12. Hubisz MJ, Falush D, Stephens M, Pritchard JK. Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. *Mol Ecol Resour.* 2009;9:1322-32.
13. Marita JM, Rodríguez JM, Nienhuis J. Development of an algorithm identifying maximally diverse core collections. *Genet Resour Crop Evol.* 2000;47:515-26.
14. Bidot Martínez I, Valdés de la Cruz M, Riera Nelson M, Bertin P. Establishment of a core collection of traditional cuban *Theobroma cacao* plants for conservation and utilization purposes. *Plant Mol Biol Rep.* 2017;35(1):47-60.
15. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. 3.01 ed. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2013.
16. Kroon LPNM, Bakker FT, Van Den Bosch GBM, Bonants PJM, Flier WG. Phylogenetic analysis of *Phytophthora* species based on mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Fungal Genetics and Biology.* 2004;41:766-82.
17. Martin FN, Blair JE, Coffey MD. A combined mitochondrial and nuclear multilocus phylogeny of the genus *Phytophthora*. *Fungal Genetics and Biology.* 2014;66:19-32.
18. White TJ, Bruns T, Lee S, W. TJ. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, editors. *PCR Protocols: A guide to methods and applications.* New York, USA: Academic Press; 1990:315-22p.
19. Fernández Maura Y. Fungal diversity of cocoa (*Theobroma cacao*) in Cuba: from field to fermentation. Louvain-la-Neuve: Université catholique de Louvain; 2015.
20. Swofford DL. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates; 2002.
21. Bekele FL, Bidaisee G, Persad N. A comparison of the phenotypic diversity of two samples from the International Cocoa Genebank, Trinidad. In: Cocoa Research Unit, editor. *Annual Report 2003.* St. Augustine, Trinidad and Tobago: Cocoa Research Unit, The University of the West Indies; 2004:27-35p.
22. Bekele FL, Bekele I, Butler DR, Bidaisee GG. Patterns of morphological variation in a sample of cocoa (*Theobroma cacao* L.) germplasm from the International Cocoa Genebank, Trinidad. *Genet Resour Crop Evol.* 2006;53:933-48.
23. Efombagn MIB, Sounigo O, Nyassé S, Manzaneres-Dauleux M, Eskes AB. Phenotypic variation of cocoa (*Theobroma cacao* L.) on farms and in the gene bank in Cameroon. *J Plant Breed Crop Sci.* 2009;1(6):258-64.
24. CRU. Annual Report 2009. St. Augustine, Trinidad and Tobago: Cocoa Research Unit, The University of the West Indies; 2010.
25. González Y, Pérez E, Palomino C. Factores que inciden en la calidad sensorial del chocolate. *Actualización en nutrición.* 2012;13(4):314-31.
26. Cakirer MS. Color as an indicator of flavanol content in the fresh seeds of *Theobroma cacao* L. [Master Thesis]. Pennsylvania The Pennsylvania State University; 2003.
27. Aragon Obando EM. Genetic characterization of *Theobroma cacao* L. in Nicaragua [Master Thesis]. Helsinki: University of Helsinki; 2009.
28. Chacón I, Ramis C, Gómez C. Descripción morfológica de frutos y semillas del cacao Criollo Porcelana (*Theobroma cacao* L.) en el sur del lago de Maracaibo. *Revista de la Facultad de Agronomía (LUZ).* 2011;28(1):1-13.
29. Santos RC, Pires JL, Correa RX. Morphological characterization of leaf, flower, fruit and seed traits among Brazilian *Theobroma* L. species. *Genet Resour Crop Evol.* 2012;59:327-45.
30. Monteiro WR, Lopes UV, Clement D. Genetic improvement in cocoa. In: Jain SM, Priyadarshan PM, editors. *Breeding plantation tree crops: Tropical species.* Springer Science+Business Media; 2009:589-626p.
31. Ji K, Zhang D, Motilal LA, Boccara M, Lachenaud P, Meinhardt LW. Genetic diversity and parentage in farmer varieties of cocoa (*Theobroma cacao* L.) from Honduras and Nicaragua as revealed by single nucleotide polymorphism (SNP) markers. *Genet Resour Crop Evol.* 2013;60(2):441-53.
32. Laliberté B. A global strategy for the conservation and use of cocoa genetic resources, as the foundation for a sustainable cocoa economy. Montpellier, France: Bioversity International; 2012:175p.
33. Trognitz B, Scheldeman X, Hansel-Hohl K, Kuant A, Grebe H, Hermann M. Genetic population structure of cocoa plantings within a young production area in Nicaragua. *PLoS ONE.* 2011;6(1):e16056.
34. Vázquez Ovando A, Molina Freaner F, Nuñez Farfán J, Salvador Figueroa M. Potencial de los marcadores moleculares para el rescate de individuos de *Theobroma cacao* L. de alta calidad. *Biotecnología.* 2012;16(1):36-56.
35. N'Goran JAK, Laurent V, A.M. R, Lanaud C. The genetic structure of cocoa populations (*Theobroma cacao* L.) revealed by RFLP analysis. *Euphytica.* 2000;115:83-90.
36. Clement D, Risterucci AM, Motamayor JC, N'Goran J, Lanaud C. Mapping quantitative trait loci for bean traits and ovule number in *Theobroma cacao* L. *Genome.* 2003;46:103-11.
37. Motamayor JC, Risterucci AM, Heath M, Lanaud C. Cocoa domestication II: progenitor germplasm of the Trinitario cocoa cultivar. *Heredity.* 2003;91:322-30.
38. Bartley BGD. The genetic diversity of cocoa and its utilization. Wallingford: CABI Publishing; 2005:341p.
39. Zhang D, Martínez WJ, Johnson ES, Somarriba E, Phillips-Mora W, Astorga C et al. Genetic diversity and spatial structure in a new distinct *Theobroma cacao* L. population in Bolivia. *Genetic Resources Crop Evolution.* 2012;59(2):239-52.
40. Zhang D, Boccara M, Motilal L, Butler DR, Umaharan P, Mischke S et al. Microsatellite variation and population structure in the "Refractario" cocoa of Ecuador. *Conserv Genet.* 2008;9:327-37.
41. Boza EJ, Irish BM, Meerow AW, Tondo CL, Rodríguez OA, Ventura López M, et al. Genetic diversity, conservation, and utilization of *Theobroma cacao* L: genetic resources in the Dominican Republic. *Genet Resour Crop Evol.* 2013;60:605-19.
42. Zhang D, Boccara M, Motilal L, Mischke S, Johnson ES, Butler DR et al. Molecular characterization of an earliest cocoa (*Theobroma cacao* L.) collection from Upper Amazon using microsatellite DNA markers. *Tree Genet Genomes.* 2009;5:595-607.
43. Aikpokpodion PO, Motamayor JC, Adetimirin VO, Adu-Ampomah Y, Ingelbrecht I, Eskes AB et al. Genetic diversity assessment of sub-samples of cocoa, *Theobroma cacao* L. collections in West Africa using simple sequence repeats marker. *Tree Genet Genomes.* 2009;5:699-711.

44. Efombagn IBM, Motamayor JC, Sounigo O, Eskes AB, Nyasé S, Cilas C et al. Genetic diversity and structure of farm and GenBank accessions of cacao (*Theobroma cacao* L.) in Cameroon revealed by microsatellite markers. *Tree Genet Genomes*. 2008;4:821-31.
45. Aikpokpodion PO. Defining genetic diversity in the chocolate tree, *Theobroma cacao* L. grown in West and Central Africa. In: Caliskan M, editor. Genetic diversity in plants. Croatia: InTech; 2012. 185-212p.
46. Vázquez Ovando JA, Molina Freaner F, Nuñez Farfán J, Ovando Medina I, Salvador Figueroa M. Genetic identification of *Theobroma cacao* L. trees with high Criollo ancestry in Soconusco, Chiapas, Mexico. *Genet Mol Res*. 2014;13(4):10404-14.
47. Zhang D, Mischke S, Johnson ES, Phillips Mora W, Meinhardt L. Molecular characterization of an international cacao collection using microsatellite markers. *Tree Genet Genomes*. 2009;5:1-10.
48. Zhang D, Arevalo Gardini E, Mischke S, Zúñiga Cernades L, Barreto Chavez A, Adriazola J. Genetic diversity and structure of managed and semi-natural populations of cocoa (*Theobroma cacao*) in the Huallaga and Ucayali valleys of Peru. *Ann Bot*. 2006;98(3):647-55.
49. Irish BM, Goenaga R, Zhang D, Schnell R, Brown JS, Motamayor JC. Microsatellite fingerprinting of the USDA-ARS Tropical Agriculture Research Station cacao (*Theobroma cacao* L.) germplasm collection. *Crop Sci*. 2010;50:656-67.
50. Opoku SY, Bhattacharjee R, Kolesnikova-Allen M, Motamayor JC, Schnell R, Ingelbrecht I, et al. Genetic diversity in cocoa (*Theobroma cacao* L.) germplasm collection from Ghana. *J Crop Improv*. 2007;20:73-87.
51. Loor RG, Risterucci AM, Courtois B, Fouet O, Jeanneau M, Rosenquist E, et al. Tracing the native ancestors of the modern *Theobroma cacao* L. population in Ecuador. *Tree Genet Genomes*. 2009;5:421-33.
52. Sereno ML, Albuquerque PSB, Vencovsky R, Figueira A. Genetic diversity and natural population structure of cacao (*Theobroma cacao* L.) from the Brazilian Amazon evaluated by microsatellite markers. *Conserv Genet*. 2006;7:13-24.
53. Zhang D, Martínez WJ, Johnson ES, Somarriba E, Phillips-Mora W, Astorga C, et al. Genetic diversity and spatial structure in a new distinct *Theobroma cacao* L. population in Bolivia. *Genet Resour Crop Evol*. 2012;59:239-52.
54. Fusté MC, editor. *Studies in population genetics*: InTech; 2012.
55. Hamilton MB. *Population genetics*: Wiley-Blackwell; 2009:407p.
56. Núñez González N. *El cacao y el chocolate en Cuba*. 2da ed. La Habana: Fundación Fernando Ortíz; 2010:336p.
57. Engels JMM, Visser L, editors. *A guide to effective management of germplasm collections*. Rome, Italy: International Plant Genetic Resources Institute; 2003.
58. Reeves PA, Panella LW, Richards CM. Retention of agronomically important variation in germplasm core collections: implications for allele mining. *Theor Appl Genet*. 2012;124(6):1155-71.
59. Appiah AA, Flood J, Bridge PD, A. S. Inter- and intraspecific morphometric variation and characterization of *Phytophthora* isolates from cocoa. *Plant Pathol*. 2003;52:168-80.
60. Bush EA, Stromberg EL, Hong C, Richardson PA, Kong P. Illustration of key morphological characteristics of *Phytophthora* species identified in Virginia nursery irrigation water. *Plant Health Progress*. 2006;7(1):41.
61. Aragaki M, Uchida JY. Morphological distinctions between *Phytophthora capsici* and *P. tropicalis* sp. Nov. *Mycologia*. 2001;93:137-45.
62. Lachenaud P, Rossi V, Thevenin JM, Doaré F. The "Guiana" genetic group: A new source of resistance to cacao (*Theobroma cacao* L.) black pod rot caused by *Phytophthora capsici*. *Crop Prot*. 2015;67:91-5.

Recibido: 04/06/2021

Aprobado: 15/08/2021

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no tienen conflicto de intereses relacionados con la investigación.

Contribución de autoría

- **Conceptualización:** Igor Bidot Martínez, Yurelkys Fernández Maura, Pierre Bertin, Heide-Marie Daniel, Manuel Conrado Riera Nelson, Marlyn Valdés de la Cruz, Stephan Declerck, Cony Decock, Pablo Clapé Borges, Yannolis Matos Cueto, Wilfredo Lambert Lobaina
- **Curación de datos:** Igor Bidot Martínez, Yurelkys Fernández Maura
- **Análisis formal:** Igor Bidot Martínez, Yurelkys Fernández Maura, Pierre Bertin, Heide-Marie Daniel, Manuel Conrado Riera Nelson, Marlyn Valdés de la Cruz, Stephan Declerck, Cony Decock
- **Adquisición de fondos:** Igor Bidot Martínez, Yurelkys Fernández Maura, Pierre Bertin, Heide-Marie Daniel, Manuel Conrado Riera Nelson
- **Investigación:** Igor Bidot Martínez, Yurelkys Fernández Maura, Pierre Bertin, Heide-Marie Daniel, Manuel Conrado Riera Nelson, Marlyn Valdés de la Cruz, Stephan Declerck, Cony Decock, Pablo Clapé Borges, Yannolis Matos Cueto, Wilfredo Lambert Lobaina
- **Metodología:** Igor Bidot Martínez, Yurelkys Fernández Maura, Pierre Bertin, Heide-Marie Daniel, Manuel Conrado Riera Nelson, Marlyn Valdés de la Cruz, Stephan Declerck, Cony Decock
- **Administración del proyecto:** Igor Bidot Martínez, Yurelkys Fernández Maura, Pierre Bertin, Manuel Conrado Riera Nelson, Pablo Clapé Borges
- **Recursos:** Igor Bidot Martínez, Yurelkys Fernández Maura, Pierre Bertin, Manuel Conrado Riera Nelson
- **Software:** Igor Bidot Martínez, Yurelkys Fernández Maura
- **Supervisión:** Pierre Bertin, Heide-Marie Daniel, Manuel Conrado Riera Nelson, Marlyn Valdés de la Cruz, Stephan Declerck, Cony Decock
- **Validación:** Igor Bidot Martínez, Yurelkys Fernández Maura, Pierre Bertin, Heide-Marie Daniel, Manuel Conrado Riera Nelson, Marlyn Valdés de la Cruz, Stephan Declerck, Cony Decock

- Visualización: Igor Bidot Martínez, Yurelkys Fernández Maura, Pierre Bertin, Heide-Marie Daniel, Manuel Conrado Riera Nelson, Marlyn Valdés de la Cruz, Stephan Declerck, Cony Decock
- Redacción-borrador original: Igor Bidot Martínez, Yurelkys Fernández Maura, Pierre Bertin, Heide-Marie Daniel, Manuel Conrado Riera Nelson, Marlyn Valdés de la Cruz, Stephan Declerck, Cony Decock, Pablo Clapé Borges, Yannolis Matos Cueto, Wilfredo Lambert Lobaina
- Redacción-revisión y edición: Igor Bidot Martínez, Yurelkys Fernández Maura, Pierre Bertin, Heide-Marie Daniel, Manuel Conrado Riera Nelson, Marlyn Valdés de la Cruz, Stephan Declerck, Cony Decock, Pablo Clapé Borges, Yannolis Matos Cueto, Wilfredo Lambert Lobaina

Financiación

La investigación estuvo financiada por la Cooperación Universitaria para el Desarrollo (CUD), actualmente ARES-CCD.

Cómo citar este artículo

Bidot Martínez I, Fernández Maura Y, Bertin P, Heide Marie D, et al. Diversidad morfológica, genética y fitopatología del cacao (*Theobroma cacao* L.) tradicional cubano. *Anales de la Academia de Ciencias de Cuba* [internet] 2021[citado en día, mes y año];11(3): e1073. Disponible en: <http://www.revistaccuba.cu/index.php/revacc/article/view/1073>

