

**ECOLE NATIONALE SUPÉRIEURE AGRONOMIQUE DE MONTPELLIER  
MONTPELLIER SUPAGRO**

**THÈSE**

**Pour l'obtention du grade de**

**DOCTEUR EN SCIENCES AGRONOMIQUES**

**Ecole Doctorale : SIBAGHE – Systèmes Intégrés en Biologie, Agronomie,  
Géosciences, Hydrosiences et Environnement.**

**Spécialité : BIP – Biologie Intégrative des Plantes.**

**Présentée et soutenue publiquement**

**Par**

**Rey Gastón LOOR SOLÓRZANO**

**Le 27 novembre 2007**

**Titre :**

**Contribution à l'étude de la domestication de la variété de  
cacaoyer Nacional d'Équateur : recherche de la variété native  
et de ses ancêtres sauvages.**

**Domestication of the Nacional *Theobroma cacao* L. variety from Ecuador:  
An approach to identify the native Nacional variety and its wild ancestors**

**Jury**

**Dr. A. CHARRIER, Professeur Emérite, SUPAGRO, Montpellier  
Dr. L. GRIVET, Chargé de recherches, SYNGENTA Seeds, Toulouse  
Dr. F. QUETIER, Professeur, Université d'Evry, Dir.adj. CNS, Paris  
Dr. P.H. GOUYON, Professeur, MNHN, INA P-G, Paris  
Dr. C. LANAUD, Directeur de recherches, CIRAD, Montpellier**

**Examineur  
Examineur  
Rapporteur  
Rapporteur  
Directeur de thèse**



**ECOLE NATIONALE SUPÉRIEURE AGRONOMIQUE DE MONTPELLIER  
MONTPELLIER SUPAGRO**

**THÈSE**

**Pour l'obtention du grade de**

**DOCTEUR EN SCIENCES AGRONOMIQUES**

**Ecole Doctorale : SIBAGHE – Systèmes Intégrés en Biologie, Agronomie,  
Géosciences, Hydrosiences et Environnement.**

**Spécialité : BIP – Biologie Intégrative des Plantes.**

**Présentée et soutenue publiquement**

**Par**

**Rey Gastón LOOR SOLÓRZANO**

**Le 27 novembre 2007**

**Titre :**

**Contribution à l'étude de la domestication de la variété de  
cacaoyer Nacional d'Équateur : recherche de la variété native  
et de ses ancêtres sauvages.**

**Domestication of the Nacional *Theobroma cacao* L. variety from Ecuador:  
An approach to identify the native Nacional variety and its wild ancestors**

**Jury**

**Dr. A. CHARRIER, Professeur Emérite, SUPAGRO, Montpellier  
Dr. L. GRIVET, Chargé de recherches, SYNGENTA Seeds, Toulouse  
Dr. F. QUETIER, Professeur, Université d'Evry, Dir.adj. CNS, Paris  
Dr. P.H. GOUYON, Professeur, MNHN, INA P-G, Paris  
Dr. C. LANAUD, Directeur de recherches, CIRAD, Montpellier**

**Examineur  
Examineur  
Rapporteur  
Rapporteur  
Directeur de thèse**



## ***Remerciements,***

Une thèse ne porte qu'un nom, il s'agit bien d'une oeuvre collective, et même si les périodes d'hésitation et de découragement n'ont pas manqué, cette expérience de recherche sera toujours restée stimulante par sa diversité.

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury qui ont accepté de relire ce manuscrit et d'y porter un regard critique, André Charrier, Laurent Grivet, Francis Quetier, Pierre Henri Gouyon et bien sur Claire Lanaud.

A Claire Lanaud, ma directrice de thèse, une passionnée par la recherche cacaoyère, avec qui, aujourd'hui je réitère le plaisir d'avoir travaillé. J'ai la sensation d'avoir beaucoup appris à ses côtés, grâce à son enthousiasme débordant et contagieux, qui ne cesse jamais!!! Merci Claire, de m'avoir accueilli dans votre équipe et de m'avoir témoigné votre confiance tout du long de ce projet.

Plusieurs personnes reconnaîtront certainement dans ce travail le fruit des discussions que nous avons pu avoir au cours de ces trois dernières années. Merci donc :

A Ange Marie Risterucci qui a particulièrement contribué à ma formation pendant le développement de tout mon travail de laboratoire. A Brigitte Courtois qui m'a beaucoup aidé lors des analyses de données et pour les corrections de la partie anglaise de ce manuscrit, merci pour le temps que vous m'avez accordé et d'avoir partagé avec moi votre expérience.

Comment oublier mes amis Olivier Fouet et Mathilde Allègre, un grand merci à vous deux, pour votre aide précieuse pour la correction de ce document, mais surtout par votre amitié. N'oubliez pas qu'en Équateur vous avez un ami et aussi une maison. Merci aussi à Xavier Sabau, pour toutes les discussions sur le linalol.

Merci à Arnaud Lemainque et Sylviana Paveck du CNG à Paris, pour le génotypage des échantillons de cacaoyer.

Cette thèse s'est inscrite dans le cadre d'un projet international entre le CIRAD-France, l'USDA-Etats Unis, et l'INIAP-Équateur. Même si seulement quelques-uns des participants de ce projet sont cités ci-dessous, je tiens à remercier tous les autres pour leur collaboration.

Merci infiniment à Eric Rosenquist en tant que représentant du Département d'Etat Américain (U.S. Foreign Ministry) pour le soutien financier de ce projet, mais aussi pour sa relecture de l'article 1, que résume le chapitre 2 de cette thèse.

En Équateur, merci à Carmen Suarez et Freddy Amores (responsables du projet) ; merci aussi à tous les autres collègues et amis qui ont participé et contribué activement aux travaux réalisés sur le terrain : Alfonso Vasco, Juan Carlos Jiménez, Alejandra Saltos, Mariela Medina, Milton Terán, Grisnel Quijano, Jhonny Zambrano, Gover Peña et Anita Cordova. Je tiens à remercier particulièrement tous les responsables de l'Université de Quevedo qui m'ont donné accès à la collection de cacaoyers de Tenguel, mille mercis.

En France, merci à tous les collègues et amis du CIRAD qui travaillent sur la qualité du cacao (maison de la technologie) ; merci à Emile Cros (chef de l'équipe), Renaud Boulanger, Fabrice Davrieux et son épouse Sophie pour des discussions toujours stimulantes sur la

qualité du cacao. Je voudrais également remercier Monique Costes et Corinne Poitout qui m'ont beaucoup aidé et qui ont accepté mes limites dans la pratique de la langue française.

Je tiens également à remercier le Cocoa Research Unit (CRU) de Trinidad et plus particulièrement Michel Boccara qui nous a fait parvenir les échantillons de cacaoyers sauvages utilisés dans ce travail.

Merci aussi à tous les amis que j'ai connu, au long de ces années : Mathews Breme (USA); Tarcisio Corona, Carolina Camacho (Mexique); Elvis Portillo, Climaco Alvarez, María Marcano (Venezuela); Amadeo Escaramán, José Luis Paredes (République Dominicaine); Jhon Ocampo (Colombie), Djibril SARR (Sénégal), Claudine Soudais (France).

Enfin, j'exprime toute ma reconnaissance aux autres personnes, amis et collègues qui m'ont aidé, mais que je n'ai pas cités ici.

*A ma famille, merci pour votre patience et votre compréhension*





# SOMMAIRE

<b>INTRODUCTION GENERALE</b> .....	1
<b>CHAPITRE I - Synthèse bibliographique</b> .....	4
1. Introduction.....	5
2. Le cacaoyer : La naissance du cacao et du chocolat.....	5
2.1 Origine, histoire évolutive et domestication.....	5
2.2 Découverte du cacao par les espagnols et révélation du chocolat dans le monde...	7
2.3 Caractéristiques générales du cacaoyer.....	10
2.3.1 Le système racinaire.....	10
2.3.2 La tige ou tronc.....	11
2.3.3 La feuille.....	11
2.3.4 La fleur.....	12
2.3.5 Le fruit (cabosses et fèves).....	13
2.4 Biologie reproductive du cacaoyer.....	14
2.4.1 Floraison et pollinisation naturelle.....	14
2.4.2 La fécondation et l'incompatibilité.....	14
2.5 Taxonomie et distribution de la diversité.....	16
2.5.1 Populations traditionnellement cultivées.....	17
2.5.2 Populations à l'état sauvage.....	18
3. Description de la culture du cacaoyer et de sa problématique.....	19
3.1 La culture.....	19
3.2 Problématique de la cacao culture.....	20
3.2.1 Introduction de génotypes étrangers et érosion génétique du cacaoyer équatorien.....	20
3.2.2 Maladies et ravageurs.....	21
3.2.3 État actuel des plantations de cacaoyers équatoriens.....	22
4. Les ressources génétiques et les programmes d'amélioration : cas de l'Équateur.....	23
4.1 La conservation des ressources génétiques.....	23
4.2 Les programmes d'amélioration génétique.....	24
5. Importance économique du marché mondial du cacao.....	26
5.1 La production.....	26
5.2 La consommation et les utilisations du cacao.....	27
5.3 Le commerce international et la classification du cacao.....	27
5.3.1 Les cacaos courants.....	28
5.3.2 Les cacaos fins ou aromatiques.....	28
6. Facteurs influençant la qualité du cacao.....	28
6.1 L'influence de l'origine génétique sur la qualité du cacao.....	29
6.2 L'environnement et son interaction avec le génotype.....	29
6.3 Traitements post-récolte.....	30
6.3.1. La Fermentation.....	30
6.3.2. Le Séchage.....	31

7. Méthodes d'analyse du génome.....	31
7.1 Les marqueurs moléculaires chez les plantes: cas des microsatellites (SSR).....	32
7.2 Étude de la diversité et de la structure génétique: les indices de mesure.....	34
7.3 Étude d'association génétique.....	36
7.4 Le déséquilibre de liaison.....	38
7.4.1 Définition et principe.....	38
7.4.2 Les mesures de déséquilibre de liaison.....	40
<b>CHAPITRE II – Analyse de la diversité et de la structure génétique de la population moderne de cacaoyers du type « Nacional » d'Équateur : recherche et identification de la variété native.....</b>	<b>42</b>
Article: Tracing the native ancestors of the modern <i>Theobroma cacao</i> L. population in Ecuador.....	44
<b>CHAPITRE III – Origine de la domestication de la variété de cacaoyer Nacional et recherche de ses ancêtres sauvages.....</b>	<b>61</b>
Article: Insight about the wild origin, migration and domestication events of the fine Nacional <i>Theobroma cacao</i> L. variety from Ecuador.....	63
<b>CHAPITRE IV – Données historiques sur les civilisations précolombiennes en Équateur et l'histoire de la variété Nacional.....</b>	<b>82</b>
1. Introduction.....	83
2. Données sur l'agriculture et le développement des populations précolombiennes.....	84
3. Brève histoire de l'origine du cacaoyer Nacional et de sa culture.....	86
4. Particularité de l'appellation « ARRIBA ».....	89
4.1 La région « ARRIBA ».....	90
4.2 Le goût aromatique « ARRIBA » de la variété Nacional.....	91
<b>CHAPITRE V – Evaluation du déséquilibre de liaison (DL) chez les populations modernes de cacaoyer Nacional échantillonnées dans la collection de Tenguel, en Équateur.....</b>	<b>93</b>
<b>CHAPITRE VI – Discussion générale, perspectives et conclusion.....</b>	<b>100</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>116</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>134</b>

# INTRODUCTION GENERALE

---

## *Ecuador : Cacao Nacional fino de aroma*





## INTRODUCTION GENERALE

Le cacaoyer et sa culture en Équateur sont intrinsèquement liés à l'histoire de ce pays depuis la colonisation jusqu'à nos jours. Les sources historiques indiquent que, dès 1600, de petites plantations de cacaoyers existaient sur la côte pacifique de l'Équateur au bord du fleuve Guayas. C'est précisément de cette région, et grâce à l'expansion et à la rentabilité que connut la culture du cacaoyer à cette époque, que les plantations se multiplièrent le long des fleuves en direction du Nord. Cet essor donna naissance à l'appellation d'origine « ARRIBA », qui désignait les plantations originelles, composées presque exclusivement de la variété native du pays nommée « Nacional ». La production de cacao a eu une histoire remarquable et un impact important dans l'économie de l'Équateur. Ce produit, également connu comme la fève d'or « *Pepa de Oro* », a fortement contribué pendant plusieurs siècles à la génération de devises en Équateur, donnant naissance aux premiers capitaux et au développement de l'industrie et du commerce. Dans les années 1800, la production de cacao devint la première source d'exportation et de financement de la lutte pour l'indépendance. En quelques années, l'Équateur se plaça alors premier producteur mondial de cacao jusqu'au début du XX<sup>e</sup> siècle. Les revenus issus de cette culture permirent la création des premières banques du pays et cette production influença les décisions politiques et économiques des différents gouvernements.

En termes de commercialisation, les marchés internationaux définissent deux groupes de cacao selon leurs caractéristiques physiques et organoleptiques. Les premiers cacaos appelés « courants » ou de « base », représentent environ 95% de la production mondiale. Les seconds, appelés cacaos « fins ou aromatiques » représentent 5% et sont utilisés pour l'élaboration d'un chocolat de qualité supérieure. Le cacao équatorien a été classé parmi les cacaos fins grâce à la variété Nacional qui se distingue notamment par son arôme floral prononcé et spécifique, baptisé sur les marchés internationaux arôme « ARRIBA ». Cette appellation de qualité est aussi directement liée à la région d'où provient ce cacao.

Même si aujourd'hui encore nous ne connaissons pas son origine exacte, il est très probable que la variété Nacional soit originaire d'Équateur et qu'elle ait été, jusqu'au début du XX<sup>e</sup> siècle, pratiquement la seule variété à être plantée. La culture de cette variété a ensuite progressivement diminué en Équateur pour différentes raisons, parmi lesquelles nous

citerons : l'apparition presque simultanée des champignons *Moniliophthora roreri* (1916) et *Moniliophthora perniciosa* (1919). Ces agents pathogènes sont respectivement responsables de la moniliose et de la maladie du « balai de sorcière », chacune pouvant occasionner jusqu'à 80% de pertes de la production. L'apparition de ces maladies a provoqué l'introduction effrénée de cacaoyers étrangers, provenant principalement de l'île de Trinidad, et considérés comme plus résistants à ces maladies. On peut également souligner des causes économiques et sociales, provoqués par la dépression économique mondiale des années 1920, qui ont contribué au déclin de la variété Nacional dans les plantations actuelles.

Les plantations d'arbres issus de croisements entre ces cacaoyers étrangers et la variété Nacional représentent actuellement environ 97% de la superficie cacaoyère en Équateur. Cette introduction massive de semences de cacaoyers étrangers a fortement contribué au déclin de la variété Nacional, et sa disparition a été évitée de peu. Un tel phénomène aurait eu de graves répercussions économiques et sociales pour le pays. En effet, cette nouvelle population hybride de cacaoyers entraîne une baisse de la qualité et une grande hétérogénéité dans la plupart des plantations existantes le long de la côte équatorienne. En dépit de cette dilution génétique, le goût typique « ARRIBA » des lots de cacao traditionnel a pu se maintenir, bien que son intensité soit actuellement variable et fortement diminuée. L'Organisation Internationale du Cacao (ICCO) a considérablement pénalisé les exportations de l'Équateur en imposant, en Juin 1994, un déclassement partiel de 25 % du volume de cacao équatorien de la catégorie des cacaos fins et aromatiques, avec les risques économiques que cette perte de notoriété comporte. A l'heure actuelle, la variété Nacional traditionnelle commence à être remplacée par un nouveau clone de type Trinitario, le CCN-51, très productif mais ne possédant pas du tout les spécificités du goût « ARRIBA ». Cette substitution pourrait entraîner la perte de la typicité du cacao équatorien, ce qui mettrait le pays en concurrence directe avec les pays producteurs de cacao « courant », dont les volumes de production sont extrêmement supérieurs et les prix très inférieurs à ceux des cacaos fins ou aromatiques.

Le revenu des exportations est actuellement le pilier fondamental soutenant le système de dollarisation de l'économie équatorienne, il est donc indispensable à la compétitivité du pays. La faible disponibilité de cacao fin sur le marché international fait de sa production un enjeu stratégique pour le développement économique équatorien. Il est donc nécessaire d'adopter de nouvelles méthodes afin d'améliorer les plantations actuelles de cacaoyers en Équateur, tant au niveau des rendements par hectare qu'au niveau de la qualité du produit fini,

afin de retrouver l'image d'un pays exclusivement exportateur de cacao fin et aromatique. L'amélioration génétique de la population moderne (hybride) de cacaoyer Nacional en Équateur repose sur l'augmentation des rendements et de la résistance aux maladies, ainsi que sur la maîtrise des composantes de la saveur et de la qualité du cacao. Cette maîtrise passe par une meilleure connaissance des facteurs pouvant interagir sur la saveur, depuis l'origine génétique jusqu'aux traitements post-récolte.

Dans ce cadre, un projet de collaboration internationale a été initié afin de mieux connaître la diversité de cette population actuelle « hybride Nacional » et le déterminisme génétique des caractères de qualité. Une étude d'association entre caractères sensoriels, biochimiques et polymorphisme moléculaire permettra de mieux comprendre la relation et le déterminisme génétique de chaque type de caractère et de créer des outils moléculaires de sélection, pour améliorer la production et la qualité des populations de cacaoyers modernes d'Équateur. Notre travail de recherche s'inscrit dans le cadre de ce projet international et se divise en quatre axes de recherche qui seront successivement développés :

- 1) L'identification des individus les moins introgressés (pouvant représenter la variété native de Nacional) dans la population moderne de Nacional actuellement cultivée en Équateur par l'analyse de la diversité génétique.
- 2) La recherche de l'origine génétique et géographique des ancêtres sauvages de la variété Nacional par une étude des relations génétiques existant entre les individus représentant la variété Nacional actuelle et des cacaoyers sauvages.
- 3) La recherche de données historiques sur l'origine et la domestication de la variété Nacional dans la région côtière d'Équateur, zone actuelle de la culture du cacaoyer, en rapport avec les résultats des analyses moléculaires précédentes.
- 4) L'étude prospective du déséquilibre de liaison (DL) chez la population moderne de cacaoyers équatoriens, afin de déterminer si elle peut servir de base à une étude d'associations entre marqueurs et caractères de qualité du cacaoyer Nacional.





# CHAPITRE I

---

## SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE





# CHAPITRE I.

## SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

### 1. Introduction

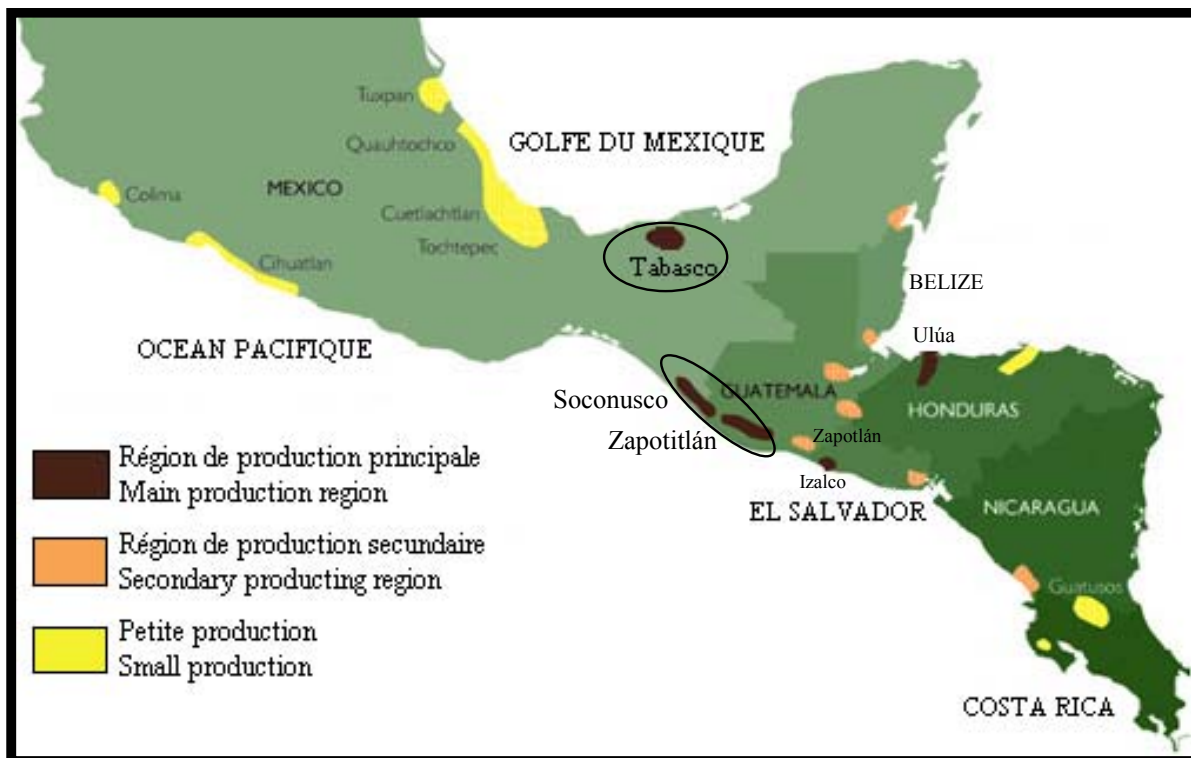
L'histoire du chocolat et de l'arbre dont il provient est très ancienne et remonte à l'ère précolombienne. Des informations historiques associées à l'histoire de la culture du cacao en Amérique centrale avant et après sa découverte par les européens seront apportées dans ce chapitre. Seront aussi présentées les caractéristiques générales du cacao, la problématique globale de sa culture, l'importance économique de la filière cacao au niveau mondial, ainsi que les facteurs influençant la qualité du cacao. Les méthodes statistiques utilisées pour l'analyse des résultats présentés dans ce travail doctoral seront ensuite décrites.

### 2. Le cacao : la naissance du cacao et du chocolat

#### 2.1 Origine, histoire évolutive et domestication

Le cacao (*Theobroma cacao* L.) est un arbre originaire du continent américain. D'après Cheesman (1944) il proviendrait de la Haute Amazonie dans une zone comprise entre les rivières Napo, Putumayo et Caqueta, qui prennent naissance dans les Andes équatoriennes et affluent vers le fleuve Amazone. Toutefois, même si sa dispersion a pu se faire naturellement dans toute la région de la Haute Amazonie, les données récentes indiquent que l'introduction du cacao en Amérique centrale (Mexique) est probablement l'œuvre de l'homme (Motamayor et al, 2002). L'histoire du cacao remonte à celle des Indiens d'Amérique centrale, qui considéraient le cacao comme un élixir divin. Sa culture s'est répandue successivement grâce aux civilisations Olmèques, Mayas et Aztèques.

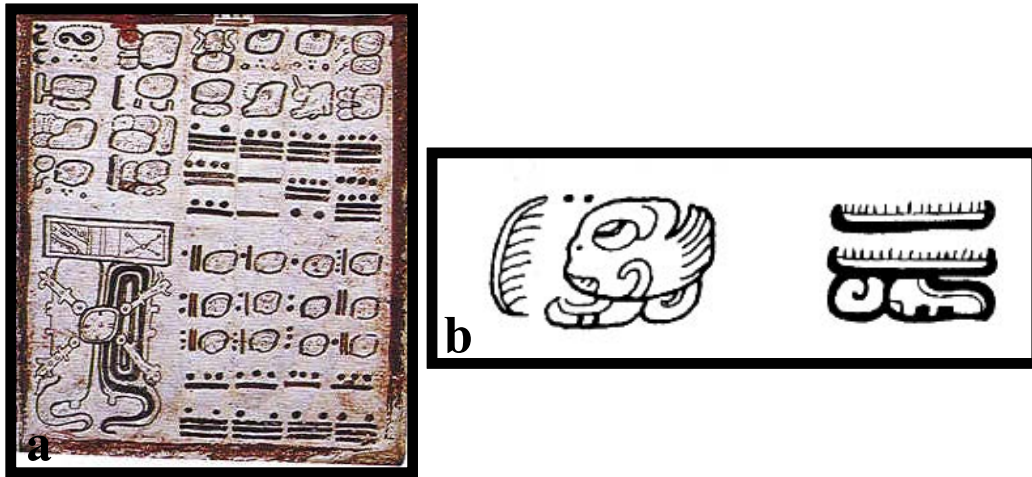
D'après les sources de la linguistique historique, le premier utilisateur du cacao a été le peuple Olmèque. Le mot « cacao », prononcé *kakawa* à l'origine, est un mot emprunté à la famille linguistique mixe-zoque. Les linguistes le situent environ 1000 ans avant Jésus-Christ (J.-C.) en usage à l'apogée de cette civilisation (Justeson et al, 1985). Le peuple Olmèque est considéré comme l'origine de toutes les civilisations apparues en Amérique centrale, incluant les Mayas et les Aztèques. Cependant, son origine et leurs aspects particuliers constituent à



**Figure 1. Illustration montrant les principales régions productrices du cacao pendant la période Maya au sud du Mexique et au Guatemala.**



**Photo 1. Tête colossale retrouvée sur le site de San Lorenzo (Sud du Mexique).**  
Vestiges du peuple Olmèque (1500-400 avant J.-C.) premier utilisateur du cacao en Amérique centrale.



**Figure 2. Exemple de graphisme Maya.**  
 (a) Numération et (b) écriture Maya représentant ici le mot « cacao ».



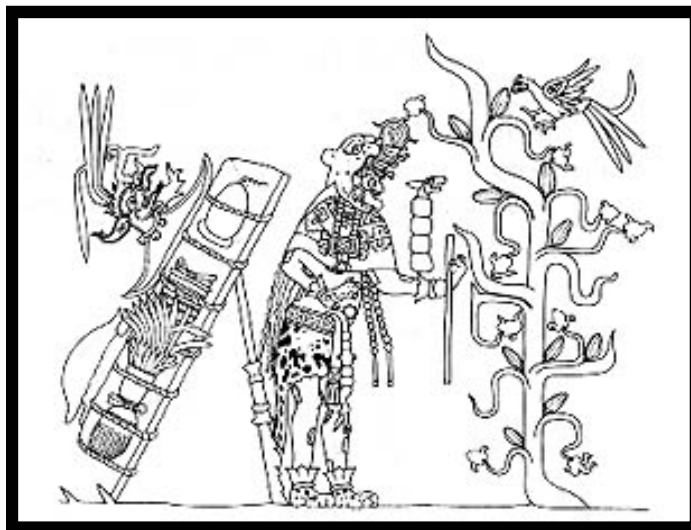
**Figure 3. Illustration Maya (1000 avant J.-C. – 800 après J.-C.) représentant la scène du transfert du chocolat d'un récipient à l'autre pour le faire mousser.**



**Figure 4. Illustrations représentant les rituels Mayas.**  
 Danse lors (a) d'un rituel de guerre et (b) lors de banquets ou de cérémonies au cours desquelles la consommation de la boisson cacao avait une signification particulière.



**Photo 2. Poterie représentant une femme Maya symbolisant l'importance du cacao lors d'une cérémonie de mariage.**  
Musée National d'archéologie à Guatemala.



**Figure 5. Détail de la fresque retrouvée à Tlaxcala (Mexique) représentant le dieu des marchands faisant une halte en face d'un cacaoyer.**

nos jours une énigme. Les Olmèques ont commencé à s'installer au Sud du Mexique (Figure 1), dans la région de « Soconusco » connue aujourd'hui comme l'état de Chiapas, Veracruz et aussi à Tabasco, environ 1500 ans avant J.-C. Les Olmèques disparurent vers 400 avant J.-C. en ne laissant aucun écrit, à l'exception de quelques hiéroglyphes indéchiffrables (Coe et Coe, 1996). Leurs vestiges les plus connus de cette civilisation sont les têtes colossales (Photo 1), sculptures trouvées sur le site de San-Lorenzo (Tenochtitlan).

Les Mayas (1000 ans avant J.-C. – 800 ans après J.-C.), qui ont hérité de leurs prédécesseurs des connaissances sur le cacao, ont développé un système de numération et perfectionné un langage écrit où l'on peut déjà déchiffrer le mot « cacao » (Figure 2, a et b). L'usage et la connaissance du cacao par les Mayas figure sur les vases peints ou sculptés placés dans les tombes des hauts dignitaires. Des « fèves de cacao », façonnées dans de l'argile, ont également été retrouvées dans certaines sépultures.

Dans la haute société Maya, les cérémonies funéraires étaient grandioses et le défunt était gratifié d'offrandes particulières qui l'accompagneraient dans sa vie future (Coe, 1973 ; Reents-Budet, 1996). Des analyses chimiques réalisées dans une tombe Maya découverte à Río Azul (Guatemala), ont démontré qu'elle avait contenu du cacao. Une très belle pièce fut même trouvée représentant le « transfert » du chocolat d'un récipient à l'autre pour le faire mousser (Figure 3).

Un historien spécialiste des Mayas (Tedlock, 1993), remarque que le cacao et les boissons à base de chocolat avaient un usage répandu et une grande importance dans les rituels de guerre, les danses, les banquets (Figure 4, a,b) et pendant les cérémonies de mariage (Photo 2) dans la classe dirigeante des Mayas. Les Mayas préparaient cette boisson en agrégeant divers produits (piment, miel, fleurs, gingembre, vanille, maïs cuit, et herbes) à température froide, tiède ou chaude. Le cacao était la marchandise la plus importante, et les fèves de cacao servaient également de monnaie pour soutenir le vaste commerce existant entre les différentes cités Mayas. A Cacaxtla, actuel état de Tlaxcala (Mexique), se trouve une fresque représentant le dieu des marchands (EK Chuah ou dieu L) faisant une halte sur le chemin, debout en face d'un cacaoyer (Figure 5).

La région Maya se composait de petites communautés en état de guerre permanent pour le contrôle du commerce et des zones productrices de cacao. Les principales régions



**Photo 3. Représentation Aztèque du dieu-roi Quetzacoatl ou « Dieu serpent à plumes ».**



**Figure 6. Illustration montrant le dieu « Serpent-Oiseau » auquel les Aztèques attribuaient l'origine du cacaoyer.**



productrices se situaient sur les basses franges côtières du Pacifique, au sud des territoires du Chiapas (Mexique), du Guatemala et du Salvador, vers le Nord-Ouest dans les forêts chaudes et humides du Tabasco (Figure 1). La région la plus importante du Pacifique était Xoconochco (nom Nahuatl, que les espagnols ont transformé en Soconusco), au pied de la Sierra du Chiapas. Le cacao de cette région était de la plus haute qualité, constituant un enjeu militaire pour les Mayas ainsi que pour les Aztèques par la suite. Plus au sud, se situaient d'autres zones de grande production dans les provinces de Zapotitlán, de Guazacapán et d'Izalco (actuel Guatemala et Salvador).

Succédant aux Maya, les Aztèques (XIII<sup>e</sup> – XVI<sup>e</sup> siècle) ont avancé sur les terres de Soconusco, riches en cacao, par la conquête de peuples voisins. Les produits dérivés du cacao, la préparation du chocolat et ses divers usages dans le commerce et les cérémonies observés chez les Aztèques méso-américains ont été hérités des Mayas. Chez les Aztèques la fève de cacao, en plus d'aliment ou boisson, devint comme un moyen important d'échange, une monnaie acceptée pour les règlements courants de toute l'Amérique centrale. Ainsi, un poisson valait 3 fèves de cacao, un lapin 20 ou 30 fèves, tandis qu'un esclave équivalait à 100 fèves (Oviedo, 1944). Les Aztèques auraient fabriqué deux types de boissons à partir des fèves de cacao : la pulque (l'octli) et le chocolat. La première était une boisson alcoolisée et la deuxième une boisson calorifique utilisée lors des cérémonies et en temps de guerre (Knight 1999).

L'histoire de la domestication du cacaoyer ne peut se dissocier de la légende du dieu-roi « Quetzalcóatl » (« Serpent à plumes » (Photo 3) ou « Serpent-oiseau » (Figure 6)), à qui les Aztèques attribuent l'origine du cacaoyer. La légende raconte qu'après avoir subi la honte d'être tombé dans un piège qui lui avait été tendu, Quetzalcóatl s'expatria volontairement à bord d'un radeau. Il jura de revenir un jour par la mer pour se venger et recouvrer son territoire qu'il avait si difficilement conquis (Hachet et Boistelle, 1993 ; cité par Lerceteau, 1996). Un jour de 1519, les Aztèques virent arriver un grand bateau venant de l'est. Des hommes en descendirent conduits par un chef à la peau blanche, barbu et affublé de plumes, les Aztèques crurent reconnaître leur dieu « Quetzalcóatl ». Mais cet homme qui débarqua au Nouveau Monde n'était autre que l'espagnol Hernan Cortès.

## **2.2 Découverte du cacao par les espagnols et révélation du chocolat dans le monde**



Le premier européen à connaître le cacao fut Christophe Colomb au cours de son quatrième voyage en Amérique espagnole le 30 juillet 1502, en face des côtes du Yucatan. Il fut témoin le 15 août 1502, de l'apparition d'un énorme canoë de bois avec à son bord des rameurs esclaves et au milieu du bateau une cargaison couverte de feuilles de palmier. Ce navire commercial transportait des pièces fines en coton, des métaux précieux fondus et une grande quantité de fèves de cacao qui servaient de monnaie. A cette époque aucun européen ne savait que ces fèves servaient à préparer la boisson au chocolat. Tout ce récit peut être lu dans le manuscrit de Fernando (deuxième fils de Colomb) découvert pour la première fois en 1571 à Venise. Le chocolat, amer et exotique, surprit Colomb qui ne s'y intéressa pas particulièrement, car ce produit n'offrait aucun débouché économique à cette époque (Lang, 1975).

Cependant, en 1519, à son arrivée au port de Veracruz au Mexique, Hernan Cortès fut le premier espagnol à montrer un intérêt pour le cacao et son exploitation. Persuadé que le dieu « Serpent à plumes » était de retour, les Aztèques et son dernier empereur « Moctezuma II » furent envahis sans difficulté jusqu'à leur disparition totale. Une des raisons principales de la chute de l'empire Aztèque fut la varicelle que les espagnols avaient introduite. D'après Durand (1967), à cette époque les Aztèques avaient déjà fait de grands progrès quant à la préparation du cacao : la fermentation, le séchage, la torréfaction, le concassage et le broyage n'avaient plus de secret pour eux.

La première source d'information qui permit aux européens de connaître le « Fruit des Dieux », expression utilisée par les indiens pour nommer le cacao, se trouvait dans les lettres que Cortès écrivit aux Rois d'Espagne, ainsi que dans les récits de Diaz del Castillo (1568). Ce dernier, compagnon de Cortès dans ses voyages, évoque dans son manuscrit « Véritable Histoire de la conquête de la Nouvelle Espagne », les zones cultivées de cacaoyers dans les territoires centre-américains.

Dans sa lettre au roi Charles Quint, Cortès écrit que « la boisson divine rend résistant et élimine la fatigue », ou encore que « un verre de ce breuvage précieux permet à un homme de marcher toute une journée sans avoir besoin de manger ». Cortès remarqua également que les fèves étaient utilisées en tant que monnaie. Dans une des réserves de « Moctezuma », l'existence d'environ 1000 tonnes de grains de cacao put être remarquée (Oviedo, 1944). Cortès fut tellement enthousiasmé par ce nouveau moyen de paiement qu'il créa une



**Photo 4. Instrument préhispanique utilisé par les Aztèques pour moudre les fèves de cacao.**



**Figure 7. Représentation d'un moulin Aztèque utilisé pour faire mousser le chocolat.**

plantation de cacaoyers afin d'accroître les possessions de la couronne espagnole. Cette monnaie bien que peu pratique était la plus répandue, après l'or et l'argent, dans cette contrée.

Diaz del Castillo (1568) remarqua que les grandes plantations se trouvaient dans la région Sud de cet énorme territoire (Guatemala, Nicaragua et Honduras) tandis qu'au nord (au Mexique) il n'en existait presque aucune. Pour lui, comme pour d'autres historiens, les Aztèques furent essentiellement importateurs de cacao, alors que les Mayas en furent producteurs. Pendant le premier siècle de colonisation en Amérique, cette région, connue également comme « Soconusco », demeurera la principale source d'approvisionnement en fèves de cacao.

Cortès se chargea d'apporter des graines dans les différents territoires qu'il visita, y compris Trinidad et Haïti, ce qui permit aux espagnols de conserver leur monopole sur le cacao. Quel que soit l'endroit qu'ils découvraient, ils y semaient du cacao, comme ce fut le cas au Venezuela, en Colombie, en Équateur, au Pérou ainsi qu'aux Philippines (Arosemena, 1991). Le cacao traversa pour la première fois l'Atlantique en 1528, et ce fut Hernan Cortès qui l'introduisit en Espagne, ainsi que les instruments nécessaires à son élaboration (Photo 4; Figure 7). En raison de ses propriétés culinaires, les moines des couvents espagnols réussirent en quelques années à perfectionner la torréfaction et le broyage du cacao en grains. Jusqu'au XVIII<sup>e</sup> siècle, la quasi-totalité du cacao consommé passait sous une forme ou une autre entre les mains des espagnols.

L'Espagne se garda bien de révéler la recette du chocolat, à tel point que pendant de nombreuses années lorsque les pirates, corsaires et flibustiers attaquaient les galions espagnols qui rentraient en Espagne remplis de produits du Nouveau Monde, ils jetaient les chargements de cacao à la mer, car ils n'avaient aucune idée de la valeur de ce dernier. Cependant, les voyageurs qui arrivaient dans les différentes villes espagnoles vinrent à connaître la délicieuse boisson et propagèrent la nouvelle à l'ensemble du continent européen.

En 1606 l'italien Antonio Carletti introduisit le cacao et l'usage du chocolat en Italie, rompant ainsi le monopole qu'avait l'Espagne. En 1615, à l'occasion du mariage de la princesse espagnole Anne d'Autriche avec le roi de France Louis XIII, le chocolat fit son entrée en France sous des formes et des quantités diverses. La seconde alliance entre les royautés espagnole et française, l'union de Marie Thérèse d'Autriche avec le roi Louis XIV,

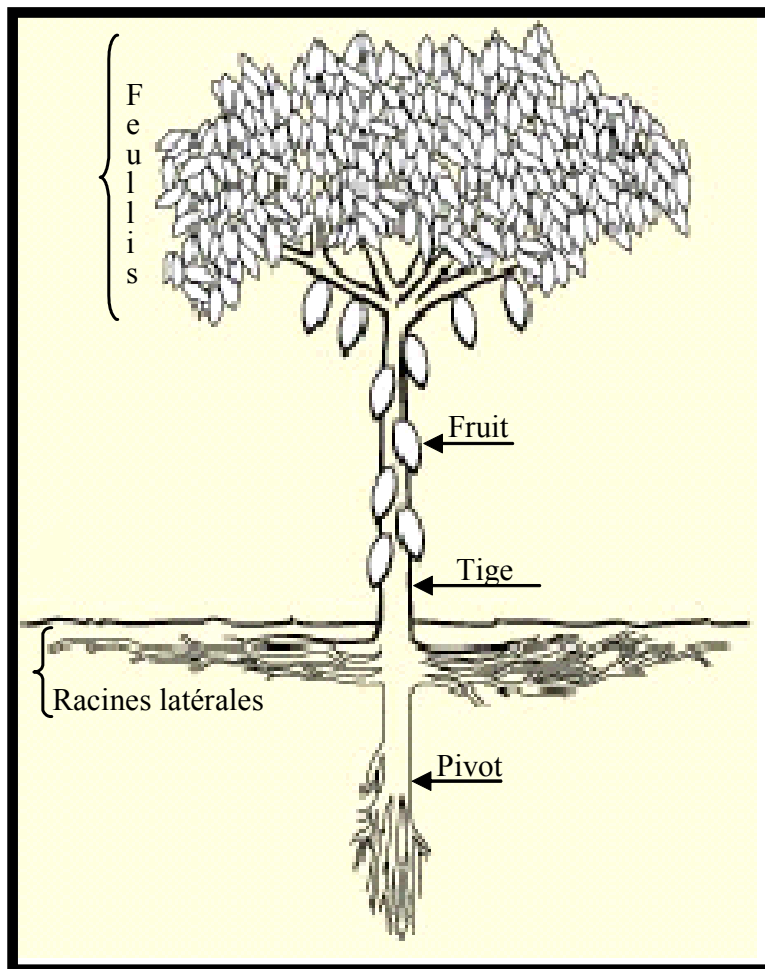


Figure 8. Architecture générale d'un cacaoyer issu de semence. (D'après Demol, 2002).

aurait introduit en France la « chocolamanie » et renforcé encore la consommation de cette boisson (Arosemena, 1991). En 1657, un français traversa le canal de la Manche et ouvrit à Londres la première boutique de vente de chocolat. Aux environs de 1660, les Français aspirèrent à posséder leur propre source d'approvisionnement et commencèrent à planter du cacao sur l'île de la Martinique dans les Caraïbes. En Hollande, l'intérêt pour le chocolat s'éveilla à partir de 1650, mais il faudra attendre 1690 pour qu'il devienne populaire (Young, 1994). C'est à cette époque également que le français Bachot et l'anglais Strubbe, prestigieux médecins, écrivirent des traités sur les qualités médicinales du cacao, tout comme le firent Blankkaart et Dekker, grands médecins hollandais du XVIIe siècle. En raison des impôts excessifs sur les importations de cacao, il fallut attendre des siècles, précisément jusqu'au XIXe siècle, avant que le cacao ne soit consommé massivement en Europe.

Au cours de l'histoire, le cacao et le chocolat sont passés du statut de produits coûteux et luxueux à celui de produits de grande consommation (Othick, 1976). Leur large disponibilité témoigne de changements survenus au sein même de leur nature et de leur composition, du passage de remède empirique au goût amer d'abord, à un aliment délicieux ensuite grâce aux innovations technologiques le rendant plus appréciable. Aujourd'hui, le chocolat se consomme dans de nombreux pays du monde entier. Cependant, il est intéressant de noter que, comme les espagnols au début, les entreprises chocolatières gardent avec le plus grand secret leurs formules et leurs recettes.

### **2.3. Caractéristiques générales du cacaoyer**

Le cacaoyer (Figure 8) se rencontre à l'état naturel dans les étages inférieurs des forêts humides d'Amérique tropicale, entre 20° de latitude Nord et 20° de latitude Sud à une altitude généralement inférieure à 1 250 mètres. Cet arbre mesure 12 à 15 mètres de haut à l'état sauvage, mais lorsqu'il est cultivé, sa taille est maintenue entre 4 et 7 mètres afin de faciliter la récolte (Braudeau, 1970).

#### **2.3.1. Le système racinaire**

Le cacaoyer provenant de semences (Figure 8) est constitué d'une part, d'un pivot pénétrant profondément dans le sol qui atteint jusqu'à deux mètres de profondeur et, d'autre part d'une couronne de racines latérales superficielles. La plus grande partie du système





radiculaire reste néanmoins confinée aux 50 premiers centimètres du sol et dans un rayon de 5 à 6 m autour de l'arbre (Mossu, 1990).

Les cacaoyers produits à partir de boutures n'émettent que des racines latérales. Cependant, une ou plusieurs de ces racines peuvent se développer verticalement et former un ou des petits pivots (Mossu, 1990). L'absence de pivot chez les jeunes cacaoyers provenant de boutures ralentit leur développement végétatif et les rend plus sensibles à la sécheresse (Braudeau, 1970).

### **2.3.2. La tige ou tronc**

Après l'apparition des premières feuilles sur le jeune plant, le bourgeon terminal poursuit son développement et la tige, ou tronc (Figure 8), croît verticalement. L'extrémité de la tige (axe orthotrope) présente alors l'aspect caractéristique d'un massif de 5 bourgeons axillaires disposés en verticille et dont le développement donne naissance à cinq branches plagiotropes qui formeront la couronne (Enriquez, 1985).

Le tronc est généralement droit avec une écorce peu épaisse de couleur brun grisâtre, son diamètre est de l'ordre de 20 cm ou plus. Le tronc de certains vieux cacaoyers de type Nacional d'Équateur atteignent jusqu'à 40 cm de diamètre (*observation personnelle*).

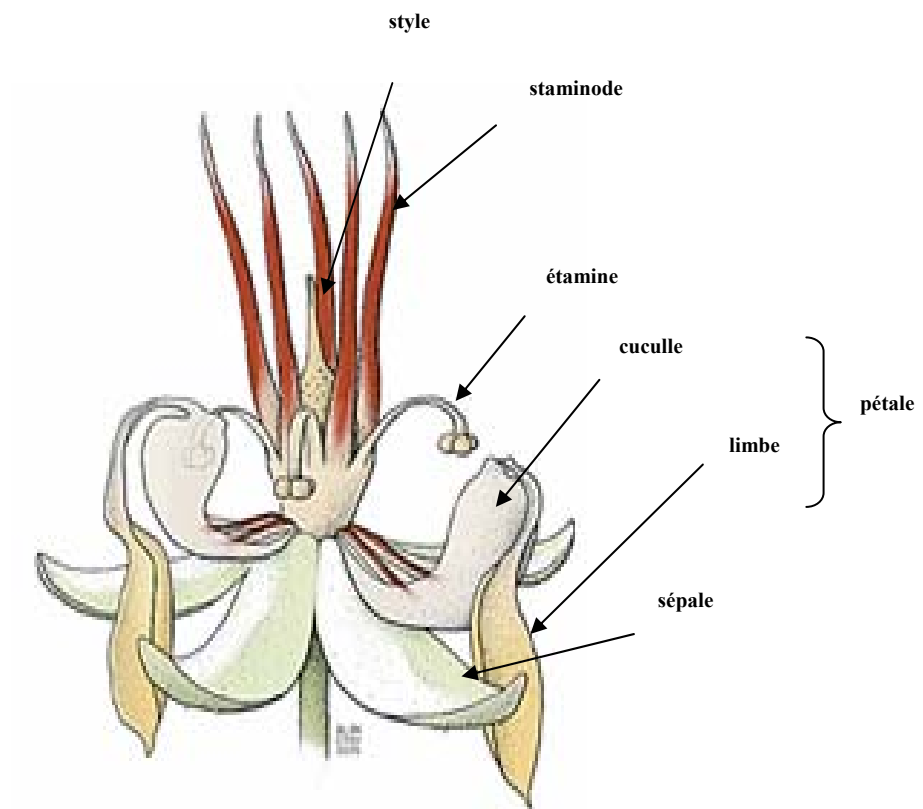
### **2.3.3. La feuille**

Les cacaoyers sont des arbres à feuilles persistantes caractérisées par une grande taille et une forme simple, lancéolée ou oblongue selon le génotype, pointue et penninerve. L'implantation des feuilles se fait selon une phyllotaxie distique sur les axes plagiotropes et rayonnante sur l'axe orthotrope (Charrier, 1969). Les feuilles juvéniles du cacaoyer sont molles et tendres avec une coloration variant du vert très clair à diverses tonalités de rouge selon le génotype et la quantité d'anthocyanes qu'elles contiennent, cependant elles deviennent vertes à l'état adulte (Vera, 1987).

Les feuilles de cacaoyer mesurent de 20 à 30 cm de long pour une largeur de 7 à 12 cm. Les stomates sont répartis sur la face inférieure des feuilles et leur densité est directement liée à l'intensité lumineuse à laquelle est soumise la feuille (Wood, 1973). L'intensité



**Photo 5. Inflorescence de cacaoyer portée sur le tronc.**



<http://www.calacademy.org/calwild/2005summer/stories/chocotree.html>

**Figure 9. Représentation schématique d'une fleur de cacaoyer.**  
Description des différentes pièces florales.

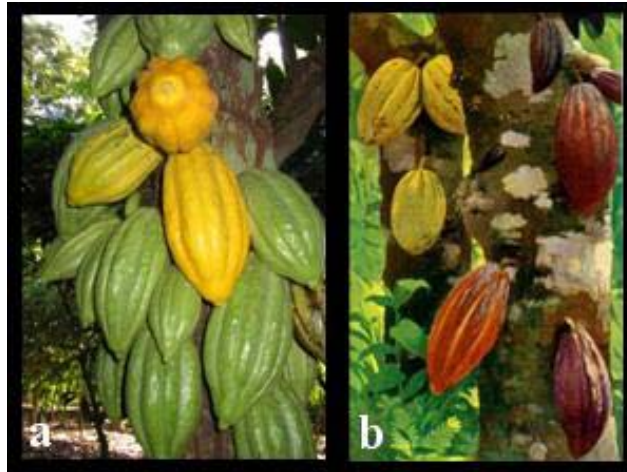
lumineuse affecte également la taille, l'épaisseur des feuilles, et leur teneur en chlorophylle. Ainsi, les feuilles se développant sous ombrage sont plus grandes et plus vertes que celles directement exposées à la lumière.

#### **2.3.4. La fleur**

Les inflorescences sont portées sur le tronc (cauliflorie) ou sur les branches maîtresses (ramiflorie). Les premières fleurs blanches ou rosées apparaissent sur les arbres âgés d'au moins trois ans. Les fleurs sont solitaires ou réunies en petits groupes. Elles se forment à l'aisselle d'anciennes cicatrices foliaires développées en « coussins floraux » (Photo 5) où vont se développer successivement des boutons floraux, des fleurs, et enfin les fruits. Un même coussinet floral peut porter simultanément des boutons, des fleurs, des petits fruits encore verts et des fruits parfaitement mûrs.

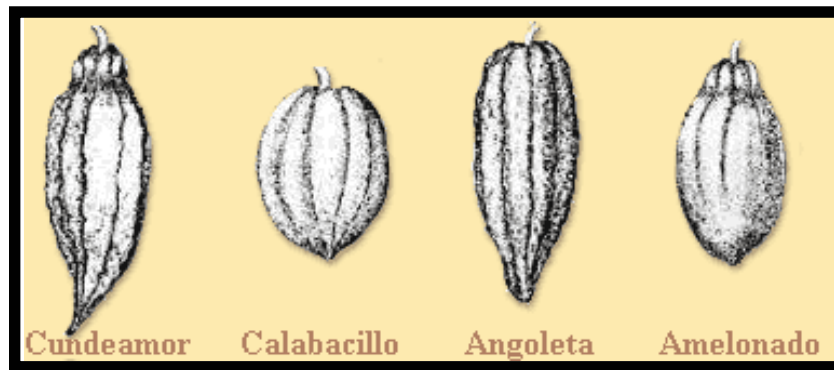
La fleur de cacaoyer est de petite taille (son diamètre varie de 0,5 à 1 cm) et supportée par un pédoncule de 1 à 3 cm. Elle est hermaphrodite, régulière et pentamère. D'après Demol (2002), elle se compose de cinq sépales blancs ou teintés de rose, soudés à leur base formant le calice et de cinq pétales constituant la corolle, alternant avec les sépales (Figure 9). Les pétales ont une forme très particulière : très étroits à la base ils s'élargissent et deviennent concaves pour former un petit capuchon (la cuculle) de couleur blanche, bordé intérieurement de deux nervures violettes dont l'ouverture est orientée vers l'axe de la fleur et dont la partie supérieure, étroite, est prolongée par une ligule relativement large, lancéolée, de couleur jaunâtre, complètement retournée vers l'extérieur de la fleur (Figure 9).

L'ovaire comprend cinq loges contenant chacune de six à dix ovules disposées autour de l'axe central. Le style est tubulaire, terminé par cinq stigmates et l'androcée est composé de cinq étamines (cachées par les pétales) alternant avec cinq staminodes stériles. Etamines et staminodes sont soudés à leur base pour former un tube très court. Tandis que les staminodes de couleur brun violacé sont érigés et entourent le style, les étamines sont recourbées vers l'extérieur, vers les pétales auxquelles elles sont opposées, les anthères se trouvant logées à l'intérieur des cuculles de chacun des pétales correspondants. Chaque étamine est double, provenant en réalité de la fusion de deux étamines, et les anthères comportent quatre sacs polliniques. Le gynécée, non visible ici, se trouve au centre de la structure florale. Chez la



**Photo 6. Cabosses de cacaoyer.**

(a) cabosses de la variété Nacional, (b) cabosses d'autres géotypes illustrant la grande diversité qui caractérise l'espèce *Theobroma cacao* L.



**Figure 10. Différentes formes de cabosses de cacaoyer.**



**Photo 7. Cabosses et fèves fraîches de cacao avec et sans mucilage.**

variété Nacional, la fleur se caractérise par une pigmentation rouge-rosé de l'étamine (Fowler, 1952 ; Soria, 1966).

### 2.3.5. Le fruit (cabosses et fèves)

Le fruit du cacaoyer appelé « cabosse » est relié au tronc ou aux branches maîtresses par un fort et court pédoncule (Photo 6a). Les cabosses présentent une grande diversité de couleurs, formes, textures et tailles, qui dépend de l'origine génétique de l'arbre et de l'état de mûrissement du fruit (Photo 6b). Les caractéristiques morphologiques très diverses des cabosses servaient traditionnellement à classer les populations (Figure 10).

Les cabosses sont généralement de couleur verte ou rouge avant maturité et jaune, rouge ou orangé à maturité. Une cabosse mûre peut mesurer de 15 à 25 cm de long, 10 à 15 cm de large et son poids moyen est de 400 à 500 g avec des extrêmes de 200 g au minimum à 1 kg au maximum. Chaque cabosse est protégée par une enveloppe extérieure dure et épaisse (le cortex de la cabosse) et contient entre 20 et 50 fèves (Photo 7) réparties dans 5 à 8 sillons longitudinaux (León, 1987). Chaque fève est recouverte d'un tégument qui, à maturité, se transforme en une pulpe molle, blanchâtre, sucrée, légèrement acidulée, appelé mucilage. La fève de cacao est blanche à violet foncé suivant le génotype. Une même cabosse peut contenir à la fois des fèves blanches et des fèves violettes en fonction du pollen qui a fécondé la fleur. En général le fruit du cacaoyer, arrive à maturité entre 4 et 6 mois après la floraison.

La quasi-totalité du volume de la fève est occupée par deux cotylédons réunis à leur base par l'embryon de la plante (radicelle et gemmule). Les cotylédons sont très riches en matières grasses (Jeanjean, 1995) qui représentent 50 à 55 % de la masse des fèves séchées. D'après Brerton et al (1994) et Jeanjean (1995) les cotylédons contiennent aussi des polyphénols et des tannins (7 %), de la caféine (1 %), de la théobromine (2 %), des glucides (12 %), des protéines (10 %), des fibres (17 %), des sels minéraux et des oligoéléments (2 %).

Les meilleurs rendements observés peuvent aller jusqu'à 150 cabosses par arbre et par an, mais la production des cacaoyers est très hétérogène. Contrairement à la plupart des fruits, les cabosses sont indéhiscentes et restent accrochées à l'arbre. La propagation du cacaoyer par graine n'est donc possible que lorsque le fruit, cassé par accident, laisse tomber quelques fèves ou lorsque l'homme entreprend de le cultiver. D'après Purseglove (1968) une dispersion

naturelle des fèves de cacao se produit avec des singes, des écureuils, des rongeurs et d'autres animaux qui en cassant la cabosse, trouvent les fèves et sucent leur pulpe sucrée, disséminant ainsi les graines difficiles à digérer.

## **2.4. Biologie reproductive du cacaoyer**

### **2.4.1. Floraison et pollinisation naturelle**

Le cacaoyer commence à fleurir entre deux et cinq ans ; l'intensité de la floraison est influencée par l'origine génétique de l'arbre (Mossu et al, 1981 ; Paulin et al, 1983), mais aussi par l'éclairement et par les régimes thermiques et hydriques (Alvim, 1965 ; Boyer 1970). L'anthèse commence généralement tard dans l'après-midi et est complétée tôt le matin. Le pollen est alors immédiatement fonctionnel.

D'après Demol (2002), les grains de pollen, sphéroïdes, sont de petite dimension (16 à 23 microns). Leur viabilité est de courte durée et ne dépasse pas 48 heures dans les conditions naturelles. L'ovaire renferme une quarantaine d'ovules. Cependant, toutes les fleurs ne donnent pas de cabosses, la plupart sèchent et meurent. Un cacaoyer produit annuellement plusieurs milliers de fleurs et régule naturellement sa production. En effet, moins de 1 % des fleurs produites arrivent à maturité et deviendront des cabosses.

Dans la nature, la plupart des événements de pollinisation ont lieu dans les premières deux ou trois heures suivant l'aube. La pollinisation du cacaoyer est essentiellement entomophile (Paulin et Eskes, 1995). Elle est assurée par de petits moucheron parmi lesquels plusieurs espèces du genre *Forcipomya* ont été identifiées (Posnette, 1950 ; Young, 1982, 1983, 1984, 1985). On pourrait penser qu'une pollinisation plus efficace serait susceptible d'augmenter la production. Pour certains, la pollinisation ne serait pas un facteur limitant de la production et un pourcentage plus élevé de fleurs pollinisées conduirait à une perte plus importante de jeunes fruits, le nombre de fruits viables restant à peu près constant. Pour d'autres, au contraire, il serait possible d'augmenter considérablement la production en effectuant une pollinisation manuelle. L'intérêt de cette méthode dépendrait de la présence d'insectes pollinisateurs en nombre suffisant.

### **2.4.2. La fécondation et l'incompatibilité**

La germination du grain de pollen sur le stigmate, la pénétration dans le style du tube pollinique et son développement jusqu'au sac embryonnaire de l'ovule s'effectuent au plus tard 24 heures après la pollinisation, les tubes polliniques pénétrant à peu près simultanément dans tous les ovules de la fleur. La fusion des gamètes est complète trois jours après la pollinisation. On observe cependant chez le cacaoyer de nombreuses incompatibilités qui se traduisent par une chute de la fleur pollinisée consécutive à une absence de fécondation.

L'auto-compatibilité des arbres est un caractère de sélection important à prendre en compte dans les programmes d'amélioration génétique (Soria, 1961 ; Bartley, 1989 ; Hasenstein et Zavada, 2001). Il existe des génotypes auto-compatibles ou auto-incompatibles. L'auto-incompatibilité est de règle chez la plupart des Forastero « hauts-amazoniens » et fréquente chez les Trinitario. Les variétés traditionnellement cultivées telles que le Criollo, l'Amelonado et le Nacional sont auto-compatibles.

Le phénomène d'incompatibilité va revêtir une très grande importance pour tous les travaux de sélection effectués sur le cacaoyer. Les premiers à observer le problème d'incompatibilité chez le cacaoyer ont été Harland (1925) et Pound (1932). Plus tard, Knight et Rogers (1953, 1955) puis Cope (1958, 1959, 1962) ont étudié le déterminisme génétique du système d'incompatibilité et ont mis en évidence la présence d'un système d'allèles « S » ayant des relations de dominance ou de codominance entre eux et qui pourraient être à l'origine de cette réaction d'incompatibilité chez le cacaoyer. L'étude du fonctionnement de ce système d'incompatibilité (Lanaud, 1987) indique qu'une incompatibilité probablement liée à un autre système génique que le système d'allèles « S » pourrait être aussi en partie responsable des chutes de fruits postérieures à la nouaison.

Les cacaoyers de la variété Nacional d'Équateur sont généralement auto-compatibles, mais cette caractéristique semble avoir été fortement diminuée dans les plantations actuelles par l'introduction des cacaoyers en provenance de Trinidad (Enriquez, 1992). Des problèmes d'incompatibilité affectant la production du cacao ont été par ailleurs rapportés dans la plupart des plantations existant le long de la côte équatorienne (Moreno, 1970), mais avec différents niveaux d'intensité. En particulier ces problèmes d'incompatibilité ont été observés chez des hybrides avec Scavina, génotype originaire de Haute Amazonie (Vera, 1969 ; Enriquez, 1987).

## 2.5. Taxonomie et distribution de la diversité

C'est en souvenir de la légende de Quetzalcoatl, que Carl Von Linné a baptisé le cacaoyer *Theobroma cacao* L., « *theos* » signifiant dieu en grec, « *broma* » breuvage. Le cacaoyer appartenait à la famille des Sterculiacées et a été reclassé récemment dans la famille des Malvacées (Whitlock et al, 2001). C'est une espèce diploïde ( $2n = 2x = 20$ ) qui a un petit génome (0,4pg/1C) (Lanaud et al, 1992). Le genre *Theobroma* comporte une vingtaine d'espèces dont une seule est largement cultivée : *T. cacao*. Une autre espèce, *T. grandiflora* est utilisée au Brésil pour fabriquer des boissons et sorbets à partir de la pulpe de ses fèves (Cupuaçu).

Depuis la découverte de *T. cacao* en Méso-Amérique, et avec l'avènement de sa culture commerciale et de la consommation mondiale de chocolat, l'homme a accéléré la distribution de cette espèce à travers le monde. Les données historiques suggèrent qu'un nombre réduit de cabosses collectées dans certaines zones productrices de l'Amérique latine, seraient à l'origine des populations commerciales des pays producteurs de cacao. Le transfert a été fait principalement vers l'Afrique, l'Asie et Océanie. De cette manière l'homme a créé de vastes étendues homogènes et productrices. Les échanges intercontinentaux ont également joué un rôle dans la révolution mondiale de la production et de la consommation de chocolat.

La classification de la diversité génétique de l'espèce *T. cacao* a été proposée par Morris (1882) et par Cheesman (1944) en référence à trois groupes morpho-géographiques de cacaoyers traditionnellement cultivés dans le monde : Criollo, Forastero et Trinitario. Bien que les groupes Criollo, Forastero et Trinitario aient servi de base à la première classification du cacaoyer, ces groupes ne reflètent plus actuellement la vraie dimension, structuration et diversité génétique de cette espèce (Bartley, 2005). Cependant, cette représentation globale de la diversité génétique chez *T. cacao* a été maintenue et est encore largement utilisée malgré son imprécision et tous les échanges génétiques qui se sont produits et qui rendent difficile cette classification trop rigoureuse (Motamayor, 2001).

La grande diversité de l'espèce *T. cacao* justifie une nouvelle analyse de la classification de sa diversité génétique.



### 2.5.1 Populations traditionnellement cultivées

Les Criollo, signifiant « créole » en espagnol, cultivés à l'origine en Amérique centrale, au Mexique et au Venezuela, représentent la variété la plus anciennement exploitée. Aujourd'hui on les retrouve également aux Antilles, en Colombie et à Madagascar. Ces Criollo « modernes » sont hybrides et plus ou moins introgressés par les Forastero (Motamayor et al, 2002). La structure génétique de cette variété est assez proche de celle des Trinitario, bien que certains individus présentent les mêmes caractéristiques que les anciens Criollo cultivés en Amérique centrale et au Mexique (cotylédons blancs). Certains cacaoyers Criollo représentent les types anciens non introgressés, et bien qu'ils montrent une grande diversité morphologique, ils présentent une diversité génétique très réduite (Motamayor et al, 2002). Les cabosses de cacao Criollo sont de couleur rouge ou verte avant maturité, elles sont généralement allongées, marquées de sillons profonds, leur péricarpe est verruqueux, mince, le mésocarpe est mince et peu lignifié. Les Criollo de type « *Porcelana* », présents au Venezuela présentent, quant à eux, des cabosses lisses pointues et peu allongées. Les fèves sont dodues, de section presque ronde avec des cotylédons blancs ou légèrement pigmentés. Les Criollo fournissent un cacao fin et délicat, très aromatique avec une légère amertume, et sont utilisés en chocolaterie pour la fabrication de produits de luxe. Malgré leurs très grandes qualités, ils sont très peu cultivés aujourd'hui à cause de leur vigueur réduite et de leur sensibilité aux maladies. Ils représentent 1 à 3% de la production mondiale.

Les Forastero, signifiant « étranger » en espagnol, regroupent en fait tous les autres types de cacaoyers « non Criollo ». La plupart sont originaires de Haute Amazonie et sont naturellement dispersés dans tout le bassin de l'Amazone (Dias et al, 2003). Ce groupe est particulièrement diversifié et renferme des génotypes très résistants aux maladies (Pound, 1945) et beaucoup plus productifs que les Criollo. Ils constituent aujourd'hui le support de la production principale de l'Afrique de l'Ouest et sont aussi cultivés dans le nord de l'Amérique du Sud, au Brésil, en Équateur. *In extenso*, ce groupe représente 75 à 80 % de la production mondiale. Il existe de très nombreux cultivars Forastero. C'est sous l'appellation de cacaoyer « amazonien ou haut amazonien », que sont réunies les populations issues du matériel collecté par Pound en Haute Amazonie (essentiellement au Pérou) et mis en collection à Trinidad. Les prospections de Pound ont été entreprises en 1937 et 1938 pour la recherche d'arbres résistants à la maladie du « balai de sorcière » causée par l'agent pathogène *Moniliophthora perniciosa*. Ces cacaoyers ont été très utilisés en sélection dans les cinquante dernières



années, en les hybridant soit entre eux, soit avec d'autres cacaoyers d'origines génétiques différentes. Ces cacaoyers amazoniens présentent un grand intérêt par leurs caractères de vigueur et de précocité qui sont remarquables. D'après Dias (2001) les « hybrides amazoniens » (résultant du croisement entre un clone amazonien et un clone non amazonien) sont plus intéressants encore car ils présentent un hétérosis souvent exceptionnel.

Les Trinitario (provenant de l'île de Trinidad) sont des populations hybrides de cacaoyers, qui ont pour origine un croisement naturel entre les Criollo plantés au XVIIe siècle par les colons espagnols à Trinidad et les cacaoyers importés de la Basse Amazonie (Pound, 1938, 1945). Ils sont aujourd'hui cultivés sur les mêmes terres que le Criollo, et furent rapidement implantés dans les pays d'Amérique centrale, dans certains pays du nord de l'Amérique du Sud (Colombie, Venezuela, Équateur, etc.), ainsi que dans quelques pays d'Afrique et d'Asie du Sud-Est. Hybrides naturels très hétérogènes, ils offrent une bonne résistance aux maladies et représentent actuellement environ 20 à 25% de la production mondiale.

En provenance d'Équateur, la variété de cacaoyer Nacional, possède un arôme rare et unique, très floral, qui caractérise sa fine saveur appelée « ARRIBA ». Au fil du temps, cette variété a été classée de manière différente. Ainsi, Fowler (1952) et Soria (1996) l'ont considéré comme appartenant au type Forastero, tandis que d'autres (Nosti, 1953 ; Enriquez, 1992) l'ont répertoriée comme étant de type Criollo. Selon Wood et Lass (1987), les cacao fins et aromatiques appartiendraient aux types Trinitario et Criollo. Plus récemment, des chercheurs tels que Lecerteau et al (1997a), ont démontré, en s'appuyant sur de nouvelles technologies moléculaires, que le cacao Nacional est génétiquement plus proche des Forastero que des Criollo. D'après Van Hall (1914), Bowman (1950) et Braudeau (1970), les fruits des cacaoyers Nacional montrent des caractéristiques particulières avec une forme intermédiaire, entre les types Amelonado et Cundeamor (voir Figure 10).

### **2.5.2 Populations à l'état sauvage**

Le terme « cacaoyers sauvages » désigne ici les populations naturelles trouvées dans la forêt tropicale d'Amérique du Sud, dans la zone allant de la Colombie et de l'Équateur jusqu'aux Guyanes. C'est dans cette vaste région, composée de la Haute Amazonie (Équateur, Pérou, Colombie, Brésil) la Basse Amazonie et de l'Orénoque (Brésil, Venezuela, Guyane),



**Photo 8. Jeune plantation clonale de cacaoyers de type Nacional en Équateur.**

que se situe la diversité génétique de l'espèce *T. cacao*. Ces cacaoyers, à l'état sauvage, sont très hétérogènes et présentent une importance primordiale pour l'amélioration des cacaoyers cultivés. En effet, c'est au sein des cacaoyers sauvages récoltés par Pound (1938) dans différentes localités de Haute Amazonie que l'on a découvert des individus présentant des caractères de résistance à plusieurs maladies affectant les cacaoyers cultivés, et qui montrent une bonne vigueur hybride quand ils sont croisés avec des cacaoyers Criollo ou Amelonado. Les hybrides obtenus par croisement entre géniteurs sauvages amazoniens et cacaoyers traditionnellement cultivés, sont appelés couramment « hybrides amazoniens ». Ces derniers, sont toujours caractérisés par une vigueur et une précocité exceptionnelles par rapport à tous les cacaoyers anciennement cultivés, aussi bien en Amérique qu'en Afrique. De ce point de vue, les cacaoyers sauvages d'Amazonie constituent une réserve génétique de premier plan.

Une meilleure connaissance des populations sauvages pourrait permettre à l'avenir, de mieux en exploiter la diversité pour l'amélioration générale des cacaoyers. Actuellement, malgré les efforts réalisés par Pound (1938), Chalmers (1968), Allen et Lass (1983), Sallée (1987), Lachenaud et Sallée (1993), la source de gènes que représentent les cacaoyers sauvages reste encore largement sous exploitée et/ou inconnue.

### **3. Description de la culture du cacaoyer et de sa problématique**

#### **3.1 La culture**

Dans la forêt tropicale, où s'épanouit naturellement le cacaoyer, l'ombrage modéré nécessaire à son développement est procuré par les grands arbres. Dans les plantations commerciales, les jeunes cacaoyers nécessitent une ombre dense, ne laissant passer que 25 à 50% de la lumière totale. Cette condition est assurée en plantant les cacaoyers à l'ombre d'arbres qui les protégeront aussi du vent, de la pluie et d'une trop grande évaporation (Photo 8). Pour cela, les planteurs utilisent traditionnellement l'érythrine (*Erythrina glauca*), surnommée "mère du cacao", dont la croissance rapide et le feuillage dense offrent immédiatement une protection efficace.

Le cacaoyer est cultivé de préférence jusqu'à 700 mètres d'altitude, à une température moyenne de 24 à 28° C, sans descendre au dessous d'un minimum de 20° C. La croissance et la production du cacaoyer sont étroitement liées à l'alimentation en eau. En effet, cet arbre est



très sensible au déficit hydrique (Cuatrecasas, 1964) et un minimum annuel de 1500 mm de précipitation, régulièrement répartie au cours de l'année, est nécessaire. Le climat équatorial lui convient bien, mais une courte période sèche favorise toutefois la fructification. Le choix du type du sol est également essentiel à la culture du cacaoyer.

Il existe plusieurs méthodes de propagation du cacaoyer : la plantation de fèves, le bouturage, ou le greffage. La fève est prête à germer avant même la maturité du fruit, mais comme elle perd vite son pouvoir germinatif il faut la semer rapidement après l'avoir extraite de la cabosse. La germination se produit en 4 à 5 jours et les premières feuilles apparaissent une quinzaine de jours après. Les jeunes plantules sont d'abord cultivées pendant 6 mois en pépinière avant d'être replantées en pleine terre (jusqu'à l'âge de deux ans maximum), au début de la saison des pluies, soit sous couvert forestier aménagé soit sous des ombrages artificiels, ou encore à l'abri de végétaux plus grands tels que les bananiers ou les cocotiers (Photo 8). La culture, généralement extensive, est intégrée dans des systèmes de production complexes.

### **3.2 Problématique de la cacao culture**

La difficulté principale que partagent les pays producteurs de cacao fins est la faible productivité des arbres. Cependant, la problématique au niveau mondial est beaucoup plus complexe et peut s'avérer très différente d'un pays ou d'un continent à l'autre. Dans le cas de l'Équateur, la culture du cacaoyer est confrontée à des facteurs naturels tels que l'apparition de maladies, ou à des problèmes sociaux-politiques involontairement engendrés par l'homme. L'introduction de matériels étrangers en Équateur et les ravages de certaines maladies dans les plantations seront plus particulièrement traités dans cette partie.

#### **3.2.1 Introduction de génotypes étrangers et érosion génétique du cacaoyer équatorien**

Les raisons principales de l'introduction de cacaoyers étrangers en Équateur ont été exposées par Goding (1921). Les cacaoyers de type Nacional, plantés à l'origine en bordure des rivières de la côte Pacifique, étaient très vigoureux et d'une grande longévité. Ces sols riches et profonds en favorisaient le développement, garantissant une bonne production de cabosses. Dans ces terrains les racines superficielles s'étendaient jusqu'à 4 mètres autour du tronc. Les planteurs de cacaoyers avaient remarqué que les arbres plantés dans un sol pauvre



**Photo 9. Cabosse infectée par *Phytophthora palmivora*.**



**Photo 10. Cabosses infectées par *Phytophthora megakarya*.**



**Photo 11. Symptômes de la maladie du *Vascular Streak Dieback* (VSD) sur branches.**



ou sablonneux, diminuaient leur productivité et la qualité de leurs fèves. De plus, les cacaoyers de type Nacional requièrent un taux élevé d'hygrométrie, sans lequel, la récolte peut être réduite de 50%. Dans ce sens, seules les bandes situées aux bords des rivières étaient dédiées à la culture de la variété de cacaoyer Nacional. Les zones de terre cultivées pouvaient être très étroites et s'étendaient de 100 à 1600 mètres de large. Les terres riches sélectionnées ne dépassaient jamais 300 mètres d'altitude au dessus du niveau de la mer. La forte exigence culturale de la variété Nacional et la faible disponibilité de terres lui convenant ont amené les propriétaires des grandes «*haciendas*» à chercher une nouvelle variété de cacaoyer mûrissant plus tôt, plus productive et se développant bien sur les terrains plus élevés (Goding, 1921). Autour de 1890, un propriétaire de plantations revenu d'Europe apporta des fèves d'un nouveau type de cacaoyer récolté à Trinidad. Les arbres plantés présentaient une croissance rapide et une très bonne production de fruits. Ce matériel d'origine Trinitario se développa bien sur différents types de sols donnant de bonnes récoltes dans des terrains où la variété Nacional n'était pas productive. Cette découverte eut pour conséquence d'impulser la plantation de cacaoyers issus de semences de cacaoyers provenant de Trinidad. Avant 1900, quelques milliers d'arbres Trinitario furent semés et ces plantations s'étendirent à l'intérieur des terrains montagneux, éloignés des traditionnelles terres riches d'alluvions déposées le long des rivières (Goding, 1921).

L'apparition de maladies entraîna la chute dramatique de la production issue de ces arbres et provoqua par la suite l'introduction de nouvelles variétés provenant du Venezuela et de la Colombie. Ces dernières étaient de manière générale appelées cacaoyers "vénézuéliens" (Bartley, 2005).

### 3.2.2 Maladies et ravageurs

Les maladies les plus fréquentes sont provoquées par des oomycètes du genre *Phytophthora* (*P. palmivora*, *P. megakarya*, *P. capsici* and *P. citrophthora*), répandus dans le monde entier et provoquant d'importantes pertes, essentiellement en Afrique (Photos 9 et 10). D'autres fléaux sévissent comme le «*Vascular Streak Dieback*» (VSD), maladie provoquée par le champignon *Oncobasidium theobromae* dans le Sud-Est de l'Asie et une partie de l'Extrême-Orient (Photo 11). Le virus du gonflement des tiges du cacaoyer (*cacao swollen shoot virus* -CSSV), transmis par des cochenilles, touche essentiellement l'Afrique



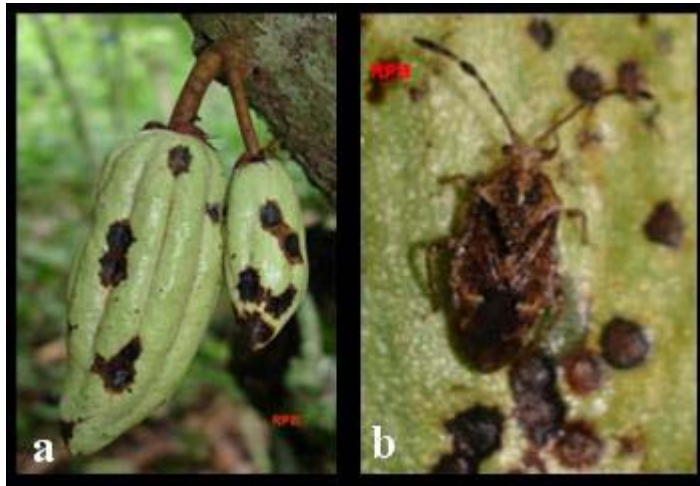
**Photo 12. Jeune plant de cacaoyer montrant les symptômes de la maladie virale du *Swollen Shoot*.**



**Photo 13. Symptôme typique de moniliose (*Moniliophthora roreri*) sur cabosse.**



**Photo 14. Symptômes caractéristiques de la maladie du « balai de sorcière ».** (a) sur des branches, (b) sur coussinets floraux et (c) sur cabosses. L'agent pathogène responsable de cette maladie est *Moniliophthora perniciosa*.



**Photo 15. Dégâts sur les cabosses occasionnés par des mirides.**  
 (a) taches brunes visibles sur jeune fruit et (b) insecte en cause (*Sahlbergella*).



**Photo 16. Dégâts occasionnés par le *cocoa pod borer* (CPB) sur cabosse.**  
 (a) perforation visible sur la cabosse (flèche) et (b) dommage initial visible à l'intérieur du fruit.



**Photo 17. Cabosse endommagée par les rats.**



occidentale (Photo 12) et plus particulièrement le Ghana et le Togo (Falque, 1994). Ces deux dernières maladies représentent des problèmes régionaux très sévères.

En Amérique du Sud et notamment en Équateur, ce sont la moniliose (Photo 13) et la maladie du « balai de sorcière » (Photo 14 a, b, c) qui constituent les atteintes les plus dévastatrices. Les champignons responsables de ces maladies sont, *Moniliophthora roreri* (moniliose) qui atteint les fruits et *Moniliophthora perniciosa* (maladie du « balai de sorcière ») qui entraîne la mort de jeunes plants, des déformations graves des rameaux et de fortes pertes de production.

Par ailleurs, le cacaoyer est la cible de plusieurs insectes nuisibles parmi lesquels se trouvent : les perforateurs du tronc (*Xyleborus ferrugineus*), les acares (*Floracarus theobromae* Keiffer), les thrips (*Selanothrips rubrocintus*), et les perforateurs de fruits (*Carmenta theobromae*, *Anadasmus porinodes*, *Gymnandrosoma aurantium* et *Synanthedon* sp.). D'après Falque (1994), les principaux insectes ravageurs du cacaoyer en Afrique sont des punaises des genres *Sahlbergella*, *Distantiella*, *Helopeltis* et *Menalonion* (*Heteroptera* : *Miridae*), dont les larves piquent les branches, pouvant entraîner la mort de l'arbre. A l'état adulte ces insectes provoquent même de fortes pertes en s'attaquant directement aux fruits (Photo 15 a, b). Dans le Sud-Est de l'Asie, les pertes de récolte dues au « cocoa pod borer » (Photo 16 a, b), dont l'agent responsable est *Conopomorpha cramerella* (*Lepidoptera* : *Lithocolletidae*), peuvent atteindre 80% de la production.

Par ailleurs, dans certains pays la lutte contre les maladies n'est pas le principal problème touchant à la culture du cacao. Ainsi, la République Dominicaine remarque, à travers son institut de recherche agricole (IDIAF), qu'un des problèmes principaux est la prolifération des rats dans les plantations de cacaoyers occasionnant de grosses pertes de cabosses (Photo 17).

### 3.2.3 État actuel des plantations de cacaoyers équatoriens

D'après Loor (2002) et Bartley (2005), la grande variabilité observée dans les zones traditionnellement dédiées à la culture du cacaoyer en Équateur est constituée à plus de 95% par un complexe hybride « Nacional x Trinitario ». Cette population moderne fournit un



**Photo 18. Clone de cacaoyer hybride « CCN-51 ».**  
(a) cultivé sous exposition solaire maximale et (b) à une forte densité d'arbres.

excellent matériel pour étudier la contribution des différentes sources de gènes dans les caractères phénotypiques, et l'héritage des caractères au cours du temps.

Actuellement, la culture du cacaoyer en Équateur peut être divisée en deux systèmes de production très contrastés. D'une part, un système traditionnel et familial majoritairement constitué de petites fermes de cacao (1 à 4 hectares) aux arbres très âgés. Ces cultures ne sont dotées d'aucune nouvelle technologie agricole, engendrant un très bas niveau de production. Cependant, ce sont certaines de ces petites fermes qui abritent les rares cacaoyers proches de la variété native de Nacional. D'autre part, il existe aussi une culture de cacaoyers développée en système intensif de production (grande densité d'arbres, irrigation, fertilisation, contrôles sanitaires, etc.), où le matériel génétique utilisé correspond presque exclusivement à un seul clone, le « CCN-51 » (Photo 18), hybride impliquant des types Trinitario et Forastero Haut Amazonien, dont le rendement par hectare est très supérieur à celui du cacaoyer Nacional. Espinoza et al (2006) remarquent que sous une pleine exposition solaire et une haute densité d'arbres, le CCN51 peut atteindre des rendements supérieurs à 3 000 kg de cacao marchand sec par hectare. Cette productivité a suscité un intérêt certain, se traduisant par la disparition des vieilles plantations de cacaoyers au profit de ce clone. Cependant, ce clone produit un cacao de faible qualité aromatique qui n'est en rien comparable à celle du cacaoyer Nacional.

#### **4. Les ressources génétiques et les programmes d'amélioration : cas de l'Équateur**

##### **4.1 La conservation des ressources génétiques**

Depuis l'essor du développement industriel, la disparition de certaines espèces n'a cessé de s'accélérer. Ainsi, les ressources génétiques sont aujourd'hui un enjeu majeur, impliquant des prises de décision politiques, scientifiques et économiques (O'Brien, 1994). Dans ce contexte, la conservation des ressources génétiques telle que "la variété de cacaoyer Nacional", actuellement menacée d'extinction, est une des priorités de l'état équatorien.

Face à l'érosion génétique de la variété Nacional, les scientifiques équatoriens se sont fixé comme objectifs : (i) de collecter et conserver les génotypes les plus proches de la variété Nacional native, (ii) de rassembler les informations les plus pertinentes relatives au mode de culture et aux caractéristiques particulières qui distinguent cette variété des autres variétés de

cacaoyer et (iii) d'utiliser les géotypes sélectionnés dans les programmes d'amélioration génétique.

Bien que les premières collectes de cacaoyer en Équateur aient été menées à partir de 1937 par Pound dans la région amazonienne, les premiers pas pour la conservation des ressources génétiques de cacaoyer Nacional n'ont été entrepris que dans les années 1930 par le gouvernement équatorien. Ce dernier a ainsi commandé une sélection d'arbres se distinguant par leur productivité et leur résistance aux maladies. Cependant, cet effort de sélection n'a pas porté ses fruits, essentiellement par manque de personnel qualifié. Parallèlement, l'entreprise "United Fruit Company" réalisait également une sélection d'arbres dans les régions côtières de l'équateur (Archive de l'EET-P). Les ressources génétiques rassemblées lors de ces deux initiatives ont été mises en commun et ont donné lieu à la naissance de deux collections de cacaoyer : la collection Tenguel au sud (CCAT) et l'une des anciennes collections de Pichilingue (INIAP), située dans la région côtière centrale.

A l'heure actuelle, la station Pichilingue rassemble dans ses collections des individus récoltés au cours de plusieurs expéditions dont l'objectif était d'une part, de refléter la variabilité existant dans les plantations modernes, et d'autre part, de rassembler des individus phénotypiquement très proches de la variété Nacional originelle. Plus largement, l'ensemble des collections de cacaoyers en Équateur se situe aujourd'hui parmi les plus grandes collections, composée de géotypes cultivés et sauvages.

#### **4.2 Les programmes d'amélioration génétique**

L'amélioration génétique chez le cacaoyer a été initiée à Trinidad par la sélection d'arbres à haut rendement (Pike, 1932). Les principaux critères de sélection ont concerné la production et ses différentes composantes : (i) l'indice de cabosse, correspondant au nombre de cabosses nécessaires pour l'obtention d'un kilo de cacao sec fermenté et, (ii) l'indice de graine, qui reflète le poids unitaire d'une graine sèche fermentée (Cheesman, 1944 ; Pound, 1938, 1945 ; Vera, 1969). Par la suite, chaque pays producteur de cacao a appliqué ces paramètres ainsi que d'autres critères de sélection liés à la nécessité locale. Ces premiers travaux ont permis de sélectionner des arbres productifs dans un grand nombre de pays producteurs (Enriquez, 1980).

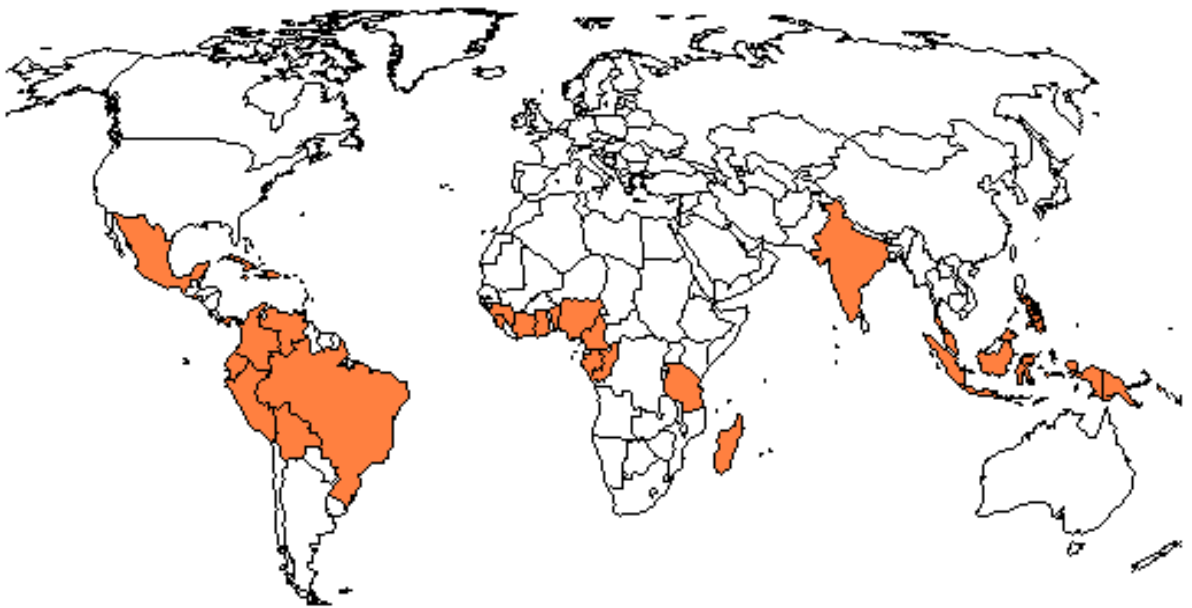


Ce sont généralement des arbres hybrides entre différents groupes génétiques qui ont été le plus souvent sélectionnés. Cependant, chez le cacaoyer, une faible part de la diversité génétique a été exploitée dans les programmes d'amélioration génétique et notamment celle qui existe au sein des populations sauvages. Plus récemment des programmes de sélection récurrente réciproque ont été engagés dans plusieurs pays (Eskes and Efron, 2006) et un projet international (CFC) impliquant 12 pays producteurs permet de coordonner et soutenir les programmes d'amélioration génétique dans ces pays.

En Équateur une première phase d'amélioration génétique a été initiée en 1940 et s'est focalisée sur la résistance aux deux maladies les plus dévastatrices des plantations du cacaoyer équatorien : la moniliose et la maladie du « balai de sorcière ». Cette première phase s'est résumée à la recherche et sélection d'arbres résistants à ces maladies, malheureusement le caractère de résistance a été rapidement contourné. C'est à partir des arbres échantillonnés dans cette première phase que les caractéristiques agronomiques d'intérêt ont été sélectionnées (Vera et al, 1984). Ces arbres ont été codés par les sigles EET en référence au centre pionnier de recherche cacaoyère équatorienne connu actuellement sous le nom d'Estacion Experimental Tropical Pichilingue.

Une deuxième phase d'amélioration génétique a ensuite été entreprise incluant des génotypes de cacaoyer sauvages, comme les « Scavina », échantillonnés en Haute Amazonie pour leur résistance à la maladie du « balai de sorcière ». Des croisements ont ensuite été effectués entre les arbres les plus productifs de la côte, et le génotype Scavina présentant un caractère de résistance.

Une première génération hybride a ainsi été créée, puis testée dans différentes zones du littoral. Ces hybrides ont permis depuis 1960 d'établir des croisements secondaires donnant des arbres productifs. Cependant, la tolérance de ces cacaoyers face à certaines maladies, principalement au « balai de sorcière », n'a pas été substantielle et s'est rapidement perdue. Les hybrides obtenus, bien que n'ayant pas le niveau de résistance espéré, offrent de meilleures performances en comparaison aux arbres des plantations traditionnelles (Vera et al, 1984). Au cours des années d'évaluation, certains de ces hybrides ont montré une haute et constante production. A partir des années 1970, des arbres ont été clonés, comme EET-19, EET-62, EET-95, EET-96, EET-103 pour être commercialisés.



**Figure 11. Répartition mondiale de la culture du cacaoyer.**

Plus récemment, Loor (1998) initia la création d'une nouvelle génération d'hybrides de type Nacional, en incluant le goût aromatique « ARRIBA » comme critère de sélection important pour la création de nouvelles variétés. Ultérieurement, avec le développement des techniques de biologie moléculaire Loor (2002) mis l'accent sur la base génétique réduite du matériel utilisé et sur son implication possible dans le faible gain génétique obtenu dans les derniers programmes d'amélioration développés en Équateur (Pichilingue). À l'heure actuelle, des travaux préliminaires sont initiés pour la mise en place, à court terme, d'un nouveau programme de sélection de variétés aromatiques, s'appuyant sur les nouvelles techniques de sélection assistée par marqueurs moléculaires.

## **5 Importance économique du marché mondial du cacao**

Depuis plus de deux siècles, le cacao marchand s'est imposé comme un secteur de grande importance commerciale au niveau mondial. Il est utilisé comme matière première pour l'obtention de divers produits issus de l'industrie alimentaire (confiserie, boissons), et de l'industrie cosmétique et pharmaceutique. À nos jours, l'importance du cacao est telle qu'il occupe la troisième place, après le sucre et le café, dans le marché mondial des matières premières.

Dans le cas particulier de l'Équateur, sur la base du montant des exportations dans le secteur agricole, le cacao arrive en quatrième position, après la banane, les crevettes et les fleurs ornementales. Cependant, en terme de superficie cultivée, il occupait en 2000 le premier rang avec 243 146 hectares<sup>1</sup>, qui seraient posées à 400 000 hectares selon les dernières estimations (2007). D'après les données chiffrées par le Ministère de l'industrie et du commerce équatorien, les exportations de cacao en 2006 ont représenté pour le pays un revenu de 178 millions de dollars.

### **5.1 La production**

La production de cacao est répartie entre les pays tropicaux d'Afrique de l'Ouest, d'Asie, d'Océanie et d'Amérique Latine (Figure 11). L'Afrique de l'Ouest concentre environ 71% de la production mondiale, les principaux acteurs étant la Côte d'Ivoire, le Ghana, le

---

<sup>1</sup> Données officielles obtenues du dernier recensement agricole réalisé en Équateur l'année 2000.

Tableau 1. Synthèse de la production mondiale de fèves de cacao au cours des trois dernières années.

<b>Production mondiale de fèves de cacao</b> (en milliers de tonnes)						
	<b>2004/5</b>		<b>2005/6</b>		<b>2006/7</b> (Prévisions)	
<b>AFRICA</b>	<b>2380</b>	<b>70,4%</b>	<b>2625</b>	<b>71,4%</b>	<b>2479</b>	<b>71,4%</b>
Cameroun	184		167		175	
Côte d'Ivoire	1286		1408		1300	
Ghana	599		740		720	
Guinée	17		19		15	
Nigeria	200		180		160	
Togo	59		72		70	
Autres	35		39		39	
<b>AMERIQUE</b>	<b>443</b>	<b>13,0%</b>	<b>444</b>	<b>12,1%</b>	<b>447</b>	<b>12,9%</b>
Brésil	171		162		155	
Colombie	37		37		38	
République Dominicaine	31		42		47	
Equateur	116		115		118	
Mexique	36		34		35	
Pérou	18		18		18	
Venezuela	15		16		16	
Autres	19		20		20	
<b>ASIE et OCEANIE</b>	<b>560</b>	<b>16,6%</b>	<b>605</b>	<b>16,5%</b>	<b>546</b>	<b>15,7%</b>
Inde	8		10		11	
Indonésie	460		500		440	
Malaise	29		30		30	
Papouasie Nouv. Guinée	48		50		50	
Philippines	6		6		6	
Iles Salomon	5		4		5	
Autres	4		5		4	
<b>TOTAL MONDIALE</b>	<b>3383</b>	<b>100,0%</b>	<b>3675</b>	<b>100,0%</b>	<b>3472</b>	<b>100,0%</b>

Source : Bulletin trimestriel de l'ICCO sur les statistiques de production de cacao.  
Vol. XXXIII, N° 1, année cacaoyère 2006/07. Affiché : le 3 avril 2007

Nigeria et le Cameroun. En Asie et en Océanie, les principaux producteurs sont l'Indonésie, la Malaisie et la Papouasie Nouvelle Guinée, représentant environ 16% de l'offre mondiale. L'Amérique Latine (Brésil, Équateur, Colombie, Venezuela, Mexique, Bolivie), et les Caraïbes (République Dominicaine Haïti, Jamaïque, Cuba, Grenade, Trinité et Tobago), représentent environ 13% de la production mondiale. Cette production, selon les pays, tend à varier sensiblement en fonction des conditions climatiques et des problèmes sanitaires endommageant les cultures. Les sources chiffrées par l'ICCO (2007) résument la production mondiale des trois dernières années (Tableau 1).

## **5.2 La consommation et les utilisations du cacao**

Tandis que le cacaoyer est largement cultivé dans les pays en voie de développement des régions tropicales, la transformation et la consommation des produits dérivés du cacao s'effectuent principalement dans les pays industrialisés de l'hémisphère nord.

D'après les sources chiffrées par l'ICCO (2006), au cours des périodes 1996-1997 et 2004-2005, la consommation mondiale de cacao a augmenté de 571 000 tonnes (soit une hausse de 21%). Les dernières estimations de la consommation du cacao domestique illustrent les tendances récentes de la consommation modèle de certains pays. En 2004-2005, l'Europe était le premier consommateur mondial de cacao (50%), suivi par les Amériques (34%), l'Asie (13%) et l'Afrique (3%). Il est donc évident que les européens sont les plus grands consommateurs de cacao et de chocolat. Cependant, chaque pays apprécie le cacao ou le chocolat à sa manière, et certains produits sont plus prisés que d'autres selon les cultures. A l'heure actuelle, l'Europe de l'Est et l'Extrême-Orient représentent un nouveau marché à développer pour la consommation de cacao dans les années à venir. Parmi les pays producteurs de cacao, seul le Brésil connaît une hausse de 10% dans sa consommation annuelle par habitant depuis 1993.

## **5.3 Le commerce international et la classification du cacao**

Le commerce et les prix internationaux des fèves de cacao sont déterminés par l'offre et la demande du marché mondial. Les volumes de production des principaux pays producteurs de cacao (la Côte-d'Ivoire, le Ghana, l'Indonésie, le Brésil) représentent donc le paramètre le plus important du marché. Les prix sont cotés dans différentes bourses,

Tableau 2. Pays producteurs exportant exclusivement ou partiellement du cacao fin ou aromatique.

<b>Pays producteurs (exclusive)</b>	<b>Pays producteurs (en partie)</b>
République Dominicaine	Équateur
Jamaïque	Venezuela
Sainte-Lucie	Costa Rica
Grenade	Colombie
Saint Vincent et les Grenadines	Indonésie
Samoa	Papouasie-Nouvelle-Guinée
Suriname	Panama
Trinité-et-Tobago	Sao Tomé et Príncipe
	Sri Lanka

Source : Annexe C de l'accord international de l'ICCO (13 Mars 2001).

établissant le prix de référence pour les différentes transactions. La valeur du cacao dépend aussi de la qualité des fèves, pour laquelle le marché international a défini certains critères qualitatifs basés sur les caractéristiques physiques et organoleptiques, afin de différencier les cacaos « courants » des « cacaos fins ou aromatiques ».

### **5.3.1 Les cacaos courants**

Les cacaos courants, appelés aussi « de base » ou « ordinaires », représentent actuellement environ 95 % de la production mondiale. Cette production est principalement obtenue sur les plantations établies dans les pays africains. La qualité de ce cacao est inférieure à celle du cacao « fin » et une grande fraction est utilisée pour l'obtention de graisse végétale.

### **5.3.2 Les cacaos fins ou aromatiques**

Ils représentent environ 5% de la production mondiale. La faible production de ce type de cacao place dans une position privilégiée les pays qui en sont producteurs. En 2001, l'ICCO a élaboré un accord international, pour identifier les pays producteurs qui exportent partiellement ou exclusivement du cacao fin ou aromatique (Tableau 2). Ces cacaos fins se vendent plus cher, grâce à une qualité excellente et une offre restreinte. Les plus grands chocolatiers du monde utilisent ce type de cacao pour son goût et son arôme fruité ou floral typique.

D'après les données statistiques de l'ICCO, en 2006 le volume total de l'offre mondiale de cacao marchand a atteint 3 472 000 tonnes métriques et la production équatorienne a été de 118 000 tonnes soit 3,4% de l'offre mondiale, tandis que sa contribution au marché des cacaos fins était de 60%. Cette production constitue un net avantage concurrentiel si l'on tient compte de la demande croissante de cacaos fins sur le marché mondial.

## **6 Facteurs influençant la qualité du cacao**

Quelle que soit la forme sous laquelle on consomme le produit dérivé de la fève de cacao, on ignore souvent le processus qui mène du fruit au produit fini. La qualité du chocolat





et celle du cacao marchand (fèves fermentés et séchées) sont étroitement liées, et c'est l'ensemble d'une série de caractéristiques qui conditionnent la vente du cacao à un bon prix. La qualité du produit final dépend en grande partie de l'origine génétique de la matière première utilisée, mais aussi des conditions de culture de la plantation (l'environnement) et des différentes étapes du traitement post-récolte (la fermentation et le séchage) jusqu'à la torréfaction. En résumé, la qualité finale du cacao marchand se manifeste à travers des caractéristiques physiques (la taille, le poids, la couleur et le contenu en graisse) et organoleptiques des fèves (le goût, l'arôme). Cependant, dans le cas particulier de l'Équateur, la qualité n'est pas suffisamment rentabilisée et devrait justifier une prime plus importante pour les producteurs. Sans incitation, ces derniers préfèrent vendre rapidement leur cacao à l'intermédiaire local, sans attendre le délai nécessaire à l'obtention d'un cacao bien fermenté et bien séché (Petithuguenin et Roche, 1995).

### **6.1 L'influence de l'origine génétique sur la qualité du cacao**

L'origine génétique du cacaoyer est très importante, elle joue un rôle déterminant pour la qualité du chocolat fini. Cependant, à ce jour, les bases génétiques impliquées dans la qualité de la fève de cacao sont encore mal connues ; leur connaissance constituerait un progrès significatif pour les programmes d'amélioration de la qualité. Il existe différentes variétés produisant des fèves aux caractéristiques différentes très importantes sur le plan organoleptique.

Concernant les cacaos fins, les type Criollo développent un arôme aux notes spécifiques de caramel, noisette ou miel (Portillo, 2006). Selon Ziegler (1990), le linalol serait un composé clef permettant la classification des cacaos en fonction de leur origine. Les fèves de cacao fin de type Nacional « ARRIBA » provenant d'Équateur et dans une moindre mesure celles du Venezuela contiennent davantage de linalol que les cacaos courants. Cette teneur en linalol, peut être jusqu'à huit fois plus élevée que dans les cacaos courants ; elle contribuerait à marquer l'intensité aromatique et serait responsable de leurs notes florales. Mais le linalol n'est sans doute pas le seul composé impliqué dans cet arôme floral et d'autres composés, terpéniques en particulier pourraient être aussi impliqués.

### **6.2 L'environnement et son interaction avec le génotype**



**Photo 19. L'écabossage des cabosses du cacaoyer.**



**Photo 20. Fermentation des fèves de cacao.**  
(a) en tas et (b) dans des bacs en bois recouverts de feuilles de bananier.

Les caractéristiques physiques et biochimiques de la fève de cacao sont sous contrôle génétique mais sont également affectées par l'environnement (pratiques culturales, récolte, traitements post-récolte, microflore et transformation du produit fini) et par les interactions entre le génotype et l'environnement, avec plus ou moins d'intensité selon les caractères. Cependant, bien que ces interactions soient peu étudiées chez le cacaoyer, la recherche au niveau post-récolte montre qu'elles sont déterminantes pour obtenir un produit fini de haute qualité. D'après Clapperton et al (1993) et Jeanjean (1995), les composés aromatiques et leurs précurseurs contenus dans la fève, dépendent non seulement de la variété mais aussi du terroir qui s'exprime à travers le climat, la richesse du sol, etc.

### **6.3 Traitements post-récolte**

Le traitement post-récolte permet l'expression du potentiel aromatique du cacao, lequel est déterminé par le génotype (Cros et al, 1993 ; Cros, 1994). La conduite des différentes étapes du traitement post-récolte doit être bien menée en vue de l'obtention d'un produit marchand qui obéit aux normes de qualité. Les étapes du traitement post-récolte sont : l'écabossage, la fermentation, le séchage, le conditionnement et le stockage. Cependant, la qualité commerciale du cacao dépend surtout de la maîtrise de deux opérations cruciales que sont la fermentation et le séchage.

#### **6.3.1 La fermentation**

Après la récolte, les cabosses sont ouvertes afin d'en extraire les fèves de cacao : c'est l'écabossage (Photo 19). Par la suite, le rachis, les fèves noires et les débris de cabosse doivent être éliminés. Les fèves sont ensuite séparées les unes des autres, afin de favoriser une bonne fermentation, puis sont mises en fermentation dans des bacs en bois ou en tas recouverts de feuilles de bananier (Photo 20 a, b). D'après Jeanjean (1995), les manipulations lors de la fermentation concernent principalement le contrôle de l'aération du cacao agissant sur les réactions biochimiques qui se déroulent à l'intérieur des fèves. Les conséquences de cette fermentation sont importantes. En effet, les fèves perdent leur faculté germinative et la fermentation provoque le développement des précurseurs de l'arôme cacao.

C'est au cours de la fermentation que les fèves de cacao perdent un peu de leur amertume, ce qui est essentiel pour obtenir un cacao de qualité. La fermentation durera, selon

la variété, de 3 à 7 jours. Pour les cacaos de type fins (Criollo, Nacional) la fermentation sera de l'ordre de 3 à 4 jours, alors qu'elle sera de plus de 5 jours pour les cacaos de type courant. Si la fermentation n'est pas bien conduite, l'arôme typique de chaque variété de cacao ne se développera pas de manière optimale (Portillo, 2006).

### **6.3.2 Le séchage**

Après la fermentation, intervient l'étape de séchage. Cette opération est également extrêmement importante et difficile à mener dans de bonnes conditions. Le séchage permet d'arrêter la fermentation, les fèves sont étalées au soleil afin de ramener la teneur en humidité des fèves fermentées d'environ 60% à 7 ou 7,5%, afin de garantir une bonne conservation du produit (Cros et Jeanjean, 1995). On peut pratiquer également un séchage artificiel au moyen de générateurs d'air chaud. Les fèves de cacao fermentées et séchées sont conditionnées en sacs, puis expédiées vers les usines de transformation dans les pays consommateurs. Le produit obtenu après séchage constitue le cacao marchand, la matière première de l'industrie chocolatière.

## **7 Méthodes d'analyse du génome**

La sélection basée sur l'analyse du phénotype reste la principale source du progrès génétique. L'étude des caractères quantitatifs est fondée sur l'analyse statistique des performances mesurées des individus, l'amélioration génétique est possible dès lors qu'il existe une variabilité génétique, après recombinaison de génotypes supérieurs, et sélection. L'efficacité de la sélection basée sur le phénotype dépend de la variabilité phénotypique, de l'héritabilité du caractère que l'on souhaite améliorer, de l'intensité de sélection appliquée ainsi que du temps nécessaire pour accomplir un cycle de sélection (Falconer, 1989).

La valeur phénotypique mesurable  $P$  peut ainsi se décomposer en une valeur génotypique induite par les facteurs génétiques ( $G$ ) et une valeur environnementale induite par les facteurs du milieu ( $E$ ). Ceci peut se résumer par l'équation :  $P=G+E$ . La modélisation mathématique de la transmission génétique des caractères présentant des variations continues s'est développée au travers de la génétique quantitative née des travaux de Fisher (1918). Le contrôle génétique, la variabilité phénotypique et la liaison entre caractères se traduisent par

des paramètres statistiques tels que l'héritabilité, l'écart-type phénotypique et le coefficient de corrélation génétique.

L'accès au génome permet sans doute une meilleure appréhension de l'hérédité des caractères quantitatifs et contribue à améliorer l'efficacité des programmes de sélection. L'apport des marqueurs moléculaires devient alors très important pour la localisation et la quantification des gènes responsables de la variation des caractères.

### **7.1 Les marqueurs moléculaires chez les plantes : cas des microsatellites (SSR)**

Un marqueur moléculaire (locus) est un petit fragment d'ADN (parfois réduit à 1 base comme dans le cas des SNP, *Single Nucleotide Polymorphism*) avec une position bien définie dans le génome, montrant du polymorphisme entre différents individus d'une même espèce (allèles). Le développement des marqueurs moléculaires au cours des dernières années offre la possibilité d'établir de nouvelles approches pour améliorer les stratégies de sélection en proposant des solutions complémentaires aux problèmes inhérents à l'utilisation des seuls marqueurs phénotypiques traditionnels. Les marqueurs moléculaires liés aux gènes cibles peuvent être utilisés dans les programmes de sélection assistée par marqueurs (SAM) pour repérer les caractères agronomiquement intéressants comme le rendement, la résistance aux maladies ou la qualité et retenir les variétés qui possèdent les caractéristiques recherchées.

La disponibilité d'un nombre important de marqueurs moléculaires neutres, polymorphes et dont la ségrégation peut être suivie à travers les générations permet la construction de cartes génétiques. Des la fin des années 80, les cartes "RFLP" (*Restriction Fragment Length Polymorphism*, polymorphisme de longueur des fragments de restriction de l'ADN, Botstein et al, 1980) d'espèces agronomiques majeures (tomate, pomme de terre, maïs, riz, laitue, blé) ont été établies (Bernatzky et Tanksley, 1986 ; Tanksley et al, 1988 ; Gebhardt et al, 1991 ; Helentjaris et al, 1986 ; Burr et al, 1988 ; McCouch et al, 1988 ; Landry et al, 1987 ; Chao et al, 1989). L'avènement des marqueurs issus de la « PCR » [*Polymerase Chain Reaction* ou réaction en chaîne de l'ADN polymérase (Mullis et Faloona, 1987)], ainsi que le développement de l'analyse informatique des données issues du marquage, a entraîné une véritable explosion dans le domaine de la cartographie génétique.



Les marqueurs moléculaires sont utilisés dans les études de diversité génétique, de phylogénie, et également comme caractères associés au phénotype pour améliorer l'efficacité dans l'identification et la sélection des génotypes supérieurs (Lande et Thompson, 1990). Ce n'est qu'avec le développement des techniques de marquage moléculaire et la réalisation de cartes génétiques denses que l'identification et la localisation de plus en plus précise de caractères qualitatifs ou quantitatifs (QTL, *Quantitative Trait Loci*) d'intérêt agronomique a pu être réalisée chez un grand nombre d'espèces végétales.

Il existe plusieurs types de marqueurs, cependant, un des plus utilisés est le microsatellite ou SSR (répétition de courtes séquences d'ADN mises en évidence par PCR). Les microsatellites sont constitués de répétitions en tandem de motifs mono-, di-, tri- ou tétranucléotidiques (Tautz et Rentz, 1984 ; Tautz, 1989). Les plus courants sont (A)<sub>n</sub>, (TC)<sub>n</sub>, (TAT)<sub>n</sub>, (GATA)<sub>n</sub>, etc. ; la valeur de « n » pouvant aller de quelques unités à plusieurs dizaines. De tels motifs sont très abondants chez les eucaryotes, c'est-à-dire qu'un microsatellite donné peut être présent en milliers d'exemplaires dans le génome d'une espèce. Chez les végétaux supérieurs, on estime qu'il y aurait en moyenne un microsatellite dinucléotidique tous les 30 à 100 kb. Outre leur distribution sur l'ensemble du génome, l'intérêt des microsatellites en cartographie génétique réside dans le polymorphisme extrêmement élevé du nombre de répétitions, leur spécificité de locus et leur caractère codominant (Karp et al, 1997).

Les SSR sont utiles pour beaucoup d'applications (Fahima et al, 2002). En effet, ils sont source d'une variabilité quantitative abondante, basée sur les mutations fréquentes dans des sites spécifiques (Kashi et al, 1997 ; Kashi et Soller, 1999 ; King et Soller, 1999). Les longueurs de ces éléments (SSR) sont extrêmement variables et ils sont idéaux dans les applications génomiques de « *fingerprinting* » (Devey et al, 2002 ; Rahman et Rajora, 2002 ; Testolin et al, 2000), pour cartographier le génome de différentes plantes modèles (Morgante et Olivieri, 1993) et pour suivre l'origine de génotypes (Testolin et al, 2000) et les flux géniques. Cette dernière application sera mise en œuvre dans le cas des plantations modernes du cacaoyer équatorien.

Chez le cacaoyer les premiers SSR ont été isolés par Lanaud et al (1999). Depuis, une production progressive de marqueurs SSR a été menée au CIRAD en collaboration avec le CNS (Centre National de Séquençage). Dans un premier temps, 15 de ces marqueurs ont été

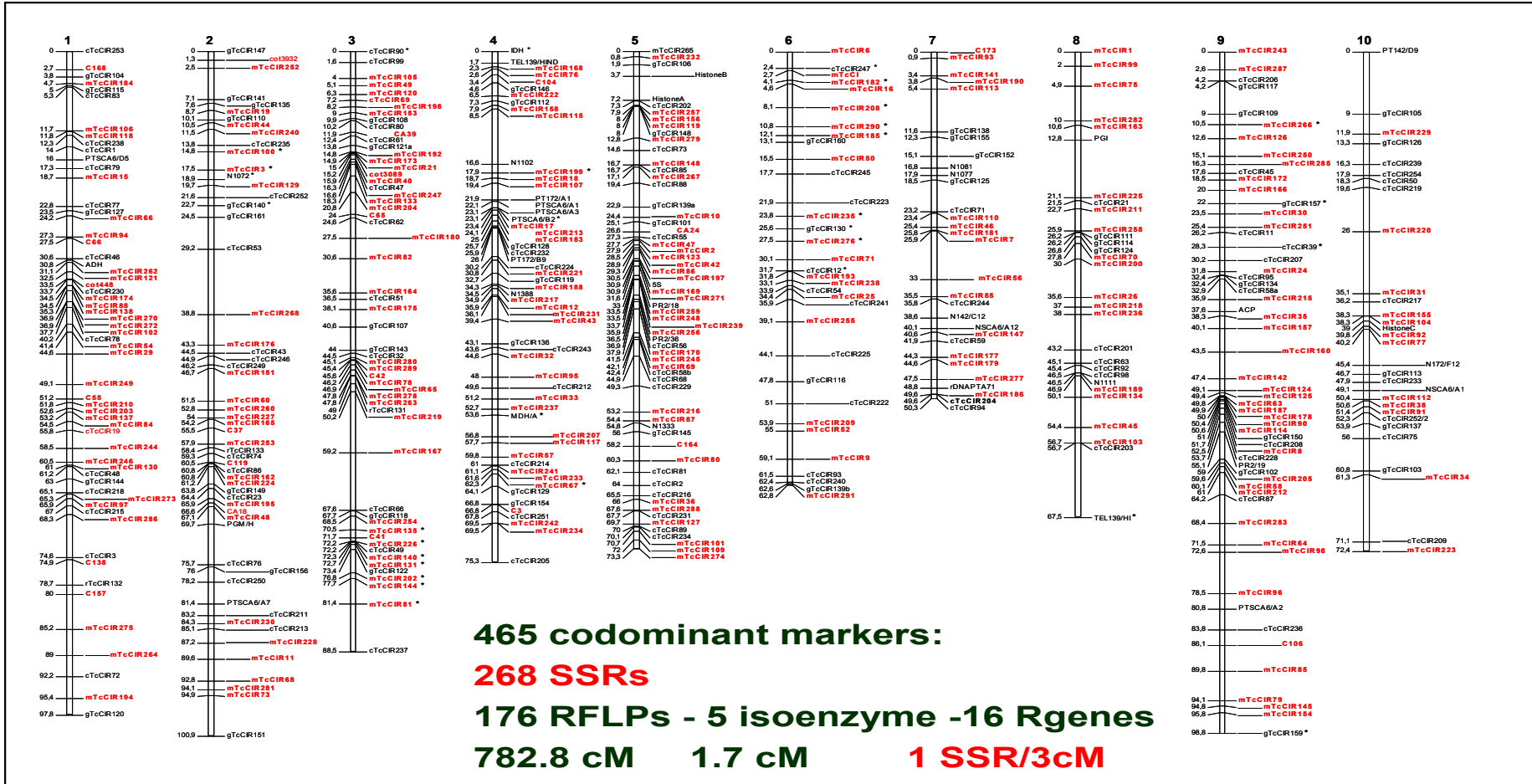


Figure 12. La carte génétique du cacaoyer. (D'après Pugh et al., 2004).



sélectionnés pour la caractérisation moléculaire (*fingerprint*) des collections de cacaoyers internationales ou régionales d'Amérique, ce travail a été entrepris par l'USDA (Garcia, 2001). A l'heure actuelle, la carte génétique du cacaoyer (Figure 12) a été enrichie avec 201 marqueurs SSR (Pugh et al, 2004), à laquelle vient d'être récemment incorporé un set d'environ 120 nouveaux SSR issus d'EST (*Expressed Sequence Tag*).

## 7.2 Etude de la diversité et de la structure génétique : les indices de mesure

Chez le cacaoyer les travaux de marquage moléculaire ont été développés afin d'améliorer la connaissance de sa diversité et de sa structure génétique (Laurent et al, 1993 a et b ; Laurent et al, 1994 ; N'Goran et al, 1994, 2000), ainsi que de sa domestication (Motamayor et al, 2002, 2003) et des bases génétiques des caractères d'intérêt (Clement et al, 2003 ; Queiroz et al, 2003 ; Brown et al, 2005 ; Faleiro et al, 2006). Le développement de différentes approches statistiques permet d'étudier les caractéristiques génétiques des populations. Les différents outils et indices de mesure statistique utilisés pour l'analyse de la diversité et de la structure de la population moderne de cacaoyers équatoriens sont présentés ci-après.

Une analyse factorielle de correspondance ou AFC (Benzecri, 1973) a été réalisée sur l'ensemble des accessions de cacaoyer utilisées dans ce travail de recherche, à l'aide du logiciel Genetix V.4.05 (Belkhir et al, 2004), afin d'avoir une vision globale de la diversité. D'après Escofier et Pagès (1990) l'AFC est un type d'analyse canonique particulièrement bien adapté à la description des associations entre deux variables qualitatives. C'est aussi une méthode de statistique descriptive qui permet de synthétiser des tableaux de données à double entrée par l'extraction d'un nombre réduit de facteurs correspondant à des combinaisons linéaires des variables initiales. Tout tableau contenant des nombres positifs peut être traité par l'AFC. La démarche aboutit à une représentation graphique des points dans un espace de dimension réduit (Fielding, 1992), permettant ainsi de mettre en évidence des structures au sein des données (Jambu, 1989).

D'après Dervin (1992), l'AFC est une technique très proche de l'analyse en composantes principales ou ACP, mais la mesure qui permet de caractériser la ressemblance (ou au contraire la dissemblance) entre individus, est différente. L'ACP utilise implicitement la distance euclidienne sur les données tandis que l'AFC utilise la distance Khi-2 ( $X^2$ ) sur les

profils. Cette distance s'obtient en pondérant les données par les effectifs des lignes et des colonnes, comme le montre la formule :

$$D^2(i,i') = \sum_{J=1}^P (X_{ij} / X_i - X_{i'j} / X_{i'})^2 / X_j$$

Où :  $X_i$  est la somme de la ligne  $i$  sur toutes les colonnes  
 $X_j$  est la somme de la colonne  $j$  sur toutes les lignes

Pour connaître la diversité génétique de la population de cacaoyers équatoriens, quelques paramètres classiques de la génétique des populations ont été évalués, en utilisant le logiciel GENETIX, incluant : (i) hétérozygotie observée  $H_o$  (moyenne des fréquences d'hétérozygotes par locus), (ii) hétérozygotie attendue  $H_e$  (fréquence d'apparition d'individus hétérozygotes), (iii) distances génétiques entre populations (Nei 1972, 1978) et (iv) les indices de fixation  $F$  ( $F_{it}$ ,  $F_{is}$ ,  $F_{st}$ ) de Wright (1969), d'après les formules de Weir et Cockerham (1984). D'autres indices de diversité génétique ont été calculés en utilisant le logiciel POWER MARKER (Liu et Muse, 2005), tels que le contenu de l'information polymorphique, les calculs de nombre d'allèles par locus, des fréquences alléliques et génotypiques.

Afin d'obtenir une information approfondie, une analyse de dissimilarité génétique entre individus a été également réalisé à l'aide du logiciel Darwin5.0 (Perrier et al, 2003), où le modèle de l'analyse de dissimilarité pour données alléliques « *simple matching* » s'écrit alors :

- Simple matching  $d_{ij} = 1 - \frac{1}{L} \sum_{l=1}^L \frac{m_l}{\pi}$

Où :  $d_{ij}$  : dissimilarité entre les unités  $i$  et  $j$   
 $L$  : nombre de loci  
 $\pi$  : ploïdie  
 $m_l$  : nombre d'allèles partagé par locus  $l$

Par ailleurs, afin de connaître plus en détail la structure de la diversité génétique, Pritchard et al (2000) ont développé le logiciel Structure. Cette méthode calcule pour chaque

individu, une probabilité d'appartenance à une population déterminée. Cette information sera aussi un élément déterminant dans les études d'associations génétiques à réaliser.

### 7.3 Etude d'association génétique

La cartographie de QTL chez les végétaux est classiquement basée sur les descendances en ségrégation qui ont permis de générer des cartes génétiques. L'analyse des ségrégations en mélange ou « *Bulk Segregant Analysis* » (BSA) (Arnheim et al, 1985 ; Michelmore et al, 1991) est une autre approche très efficace permettant de détecter une liaison génétique entre un marqueur moléculaire et un gène majeur à pénétrance complète.

Plus récemment, d'autres approches ont été développées pour identifier une liaison génétique entre un marqueur et un locus impliqué dans un caractère qualitatif ou quantitatif. Les études d'association établissent ainsi une corrélation entre un polymorphisme génétique et la variabilité phénotypique d'un caractère au sein d'une population naturelle (Buckler et Thornsberry, 2002). Un problème bien connu dans les études d'association génétique est la présence d'une structure de population non détectée qui peut conduire à de fausses interprétations ou à l'absence de mise en évidence des réelles associations. La structure des populations joue un rôle d'autant plus important que la taille de la population augmente (Hirschhorn et al, 2002). De plus, les méthodes utilisées pour tenir compte de cette structure peuvent perdre en efficacité si un faible nombre de locus est étudié.

D'après Risch et Merikangas (1996) un des avantages des études d'association est qu'elles ne requièrent pas de population de cartographie mais explorent la variation allélique naturelle rencontrée au sein d'une espèce. L'association de méthodes d'analyse statistique et de techniques de marquage moléculaire permet de localiser les portions du génome responsables de variations qualitatives et quantitatives des caractères cibles de la sélection (rendement, qualité, résistance aux pathogènes, aux stress abiotiques, etc.). Dans le monde végétal, les études menées principalement sur les plantes de grande culture montrent que ces caractères sont sous le contrôle principal d'un petit nombre de gènes à effets forts, et donc potentiellement « manipulables » par le sélectionneur. La possibilité de décomposer les caractères quantitatifs en composantes mendéliennes permet de comprendre l'architecture de la variabilité génétique au sein du génome. A moyen terme, l'utilisation de cette information et son intégration dans les programmes de sélection (Lande et Thompson, 1990) pourrait



entraîner des gains génétiques importants surtout pour les caractères peu héritable. A long terme, la localisation précise des gènes qui affectent les caractères quantitatifs devrait permettre de caractériser ces gènes.

Les approches analytiques de la génétique d'association ont été utilisées en génétique humaine depuis longtemps (Lander et Schork, 1994). Cependant, chez les plantes ces études sont plus récentes et les premières études ont concerné le maïs. Thornsberry et al (2001) ont montré pour la première fois l'association entre le cycle semis-floraison et le gène de nanisme *Dwarf8*. Ultérieurement Andersen et al (2005) ont montré le lien entre ce gène et la durée du cycle. Chez le maïs d'autres gènes candidats ont été aussi associés à la variation de la couleur de l'albumen (Palaisa et al, 2003), de la teneur en amidon (Wilson et al, 2004), ainsi que de la qualité du fourrage (Andersen et al, 2007). Par ailleurs, chez le riz les études d'association ont montré le lien entre deux SNPs liés dans le gène *SssIIa* et la température de gélatinisation (Bao et al, 2006 ; Waters et al, 2006).

Dans le cas du cacaoyer, une étude d'association a été réalisée par Marcano et al (2006) dans la collection présente au CATIE (Centre Agronomique Tropical de Recherche et d'Enseignement Supérieur, Costa Rica) et dans une population cultivée au Venezuela, identifiant des associations hautement significatives entre marqueurs et caractères dans 13 régions chromosomiques, pour des caractères de fruit, de fève et de fleur. Huit de ces régions correspondent à des QTL déjà identifiés dans des descendance contrôlées.

Les méthodes d'analyse utilisées pour les études d'association portant sur des caractères quantitatifs sont les mêmes que celles développées pour l'analyse de QTL. Elles font appel à la régression linéaire (Lander et Botstein, 1989) ou à l'analyse de variance pour déterminer s'il existe un lien entre classes génotypiques et phénotypiques (Buckler et al, 2006). Ces méthodes sont particulièrement faciles d'emploi sur les marqueurs bialléliques mais s'utilisent également sur les haplotypes, ce qui permet d'améliorer le pouvoir de détection de la méthode et lui donne une valeur prédictive sur des accessions non phénotypées (Buntjer et al, 2005).

D'après Yu et al (2006) si l'on dispose d'une bonne couverture du génome en marqueurs (bien répartis dans le génome), il est également possible de prendre en compte des relations plus fines entre individus par le biais de « coefficients de parenté ». Ce type d'analyse

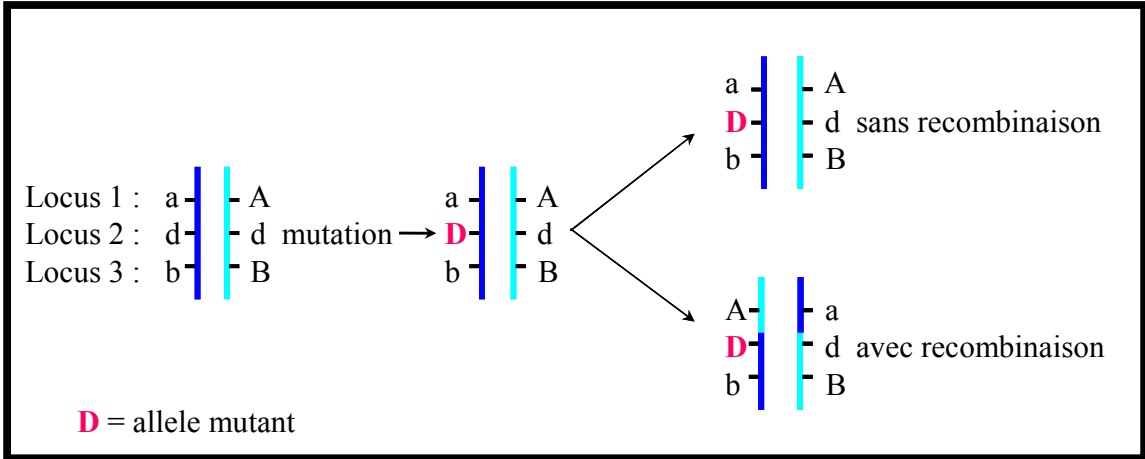


Figure 13. Exemple de mutation avec et sans recombinaison. (D'après Jomphe, 2006).

est réalisable à l'aide du logiciel TASSEL (Buckler, 2001) disponible à <http://maizegenetics.net/>.

## 7.4 Le déséquilibre de liaison

Les approches analytiques des études d'association sont fondées sur le principe de déséquilibre de liaison (DL).

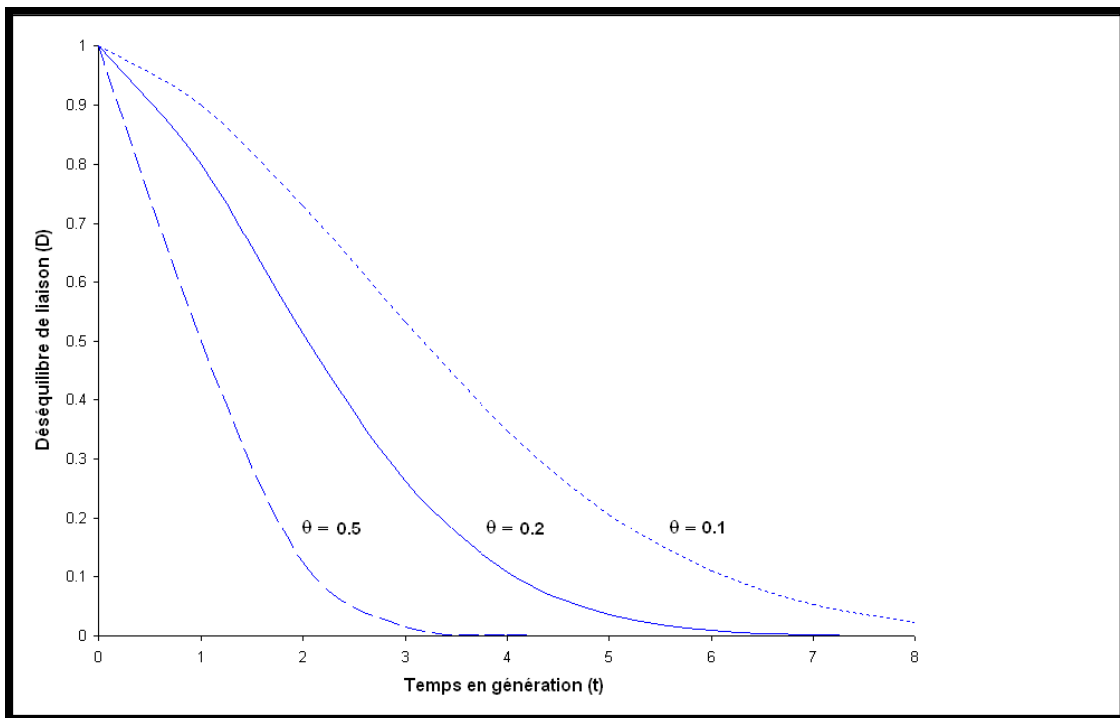
### 7.4.1 Définition et principe

Le modèle du DL est défini comme l'association non aléatoire entre les allèles de deux ou plusieurs loci. Cette association dépend de la distance physique qui sépare ces deux sites. De manière générale, plus cette distance augmente et plus le déséquilibre de liaison diminue. Plus deux loci sont situés proches l'un de l'autre, moins leurs allèles ont de chances d'être transmis de façon indépendante (Remington et al, 2001), on dit alors qu'ils sont en DL.

Des loci très proches l'un de l'autre seront en plus fort DL que des loci plus éloignés. Ce concept est très utile pour la recherche en génétique. Par exemple, une association entre un marqueur et une maladie suggère la présence d'un DL entre les deux. On présume alors que le marqueur est à proximité du locus impliqué dans la maladie, ce qui peut faciliter l'identification du gène. Les mutations sont souvent à l'origine de l'apparition des maladies. D'après Jomphe (2006), quand une nouvelle mutation survient sur un chromosome, elle sera transmise aux générations suivantes avec tous les autres marqueurs de ce même chromosome, à moins qu'il n'y ait recombinaison. La mutation est en DL complet avec les loci adjacents tant qu'il ne se produit pas de recombinaison.

Dans l'exemple de la Figure 13, les allèles a et b sont transmis avec l'allèle mutant D s'il n'y a pas de recombinaison. S'il en survient une, des allèles différents seront hérités avec D selon l'emplacement de la recombinaison. Dans l'exemple, une recombinaison entre les loci 1 et 2 se produit. L'allèle A est alors transmis avec l'allèle mutant plutôt que l'allèle a.

Dans une population isolée dont les croisements sont aléatoires, l'étendue du DL après un effet de mutation, qui crée un déséquilibre avec tout le chromosome, décroît de façon exponentielle en fonction du nombre de générations et de la distance à la mutation. Si la



**Figure 14. Représentation graphique du déséquilibre de liaison (DL) en fonction du temps et du taux de recombinaison. (D'après Jomphe, 2006).**



mutation est assez ancienne, seuls les marqueurs très proches sont en déséquilibre de liaison avec le lieu de la mutation. Ce principe permet d'envisager de localiser plus finement les gènes en cause si l'on dispose d'une carte dense de marqueurs. D'après Seguin et al (2006) le patron de décroissance du DL varie en fonction d'un grand nombre de paramètres caractéristiques de l'espèce ou de la population étudiée, comme l'histoire évolutive (mode de reproduction, goulots d'étranglement, expansion démographique) et les propriétés génomiques de la région considérée (taux de recombinaison local, taux de mutation).

Avec le temps, le DL diminue en raison de ces recombinaisons. Or, plus la distance entre deux marqueurs est petite, moins il y a de chances qu'il y ait recombinaison entre les deux et le DL diminue moins rapidement. On appelle taux de recombinaison ( $\theta$ ), la probabilité qu'il y ait recombinaison entre deux loci. Le DL dépend donc du temps  $t$ , en nombre de générations depuis l'apparition de la mutation, et du taux  $\theta$  de recombinaison :

$$D_t = D_0(1 - \theta)^t.$$

Ici,  $D_0$  représente le DL au moment de la mutation. La variation de  $D_t$  en fonction du temps  $t$  est illustrée à la Figure 14 pour différents choix de taux de recombinaison  $\theta$ .

Dans les populations où le DL décroît rapidement avec la distance physique, seule une approche « gène candidat » pourra être envisagée pour identifier les bases génétiques des caractères quantitatifs, tandis que dans les populations où le DL décroît lentement, une approche « *genome scan* » utilisant des marqueurs sur l'ensemble du génome sera préférable. D'après Flint-Garcia et al (2003) pour les études d'association, un DL limité à des sites physiquement proches (quelques kb) peut permettre une cartographie fine de gènes d'intérêt. À l'inverse si le DL se maintient sur des dizaines de kilobases ou plus, la résolution de l'analyse sera réduite mais un maillage relativement lâche du génome pourra permettre de repérer les régions génomiques qui participent à la variation phénotypique d'un caractère donné (*genome scan*). C'est cette dernière approche qui a été développée dans les travaux de Marcano et al (2006).

Tout DL entre marqueurs et QTL (dû par exemple à la liaison physique, à la sélection pour des interactions épistatiques ou à la dérive génétique) peut être exploité au niveau de la population d'amélioration et la position des QTL n'a pas à être connue. La détection d'une

liaison entre marqueurs et QTL dépend de l'existence d'un DL (par exemple une liaison physique) entre les allèles au locus du marqueur et les allèles au locus du QTL. Différentes approches statistiques permettent de localiser les QTL et de quantifier les effets génétiques créés par ce déséquilibre.

#### 7.4.2 Les mesures de déséquilibre de liaison

Plusieurs indices statistiques permettent de mesurer le DL. La majorité d'entre eux est sensible aux faibles tailles d'échantillon. On mesure la force du DL entre deux marqueurs à l'aide du coefficient de DL,  $D$ . Soit deux marqueurs,  $M_1$  et  $M_2$ , possédant respectivement les allèles  $A$  et  $a$  et les allèles  $B$  et  $b$ . Le coefficient de DL entre  $M_1$  et  $M_2$  correspond à la différence entre la proportion d'haplotypes  $AB$  (ou  $ab$ ) observée et celle espérée sous l'hypothèse d'indépendance. Si les deux marqueurs sont indépendants, on s'attend à ce que la proportion d'haplotypes  $AB$  soit égale au produit des fréquences d'allèles  $A$  et  $B$ , c'est-à-dire :

$$D = P(AB) - P(A)P(B) = P(ab) - P(a)P(b).$$

Ainsi, plus  $D$  est élevé, plus les marqueurs sont en DL. Des standardisations de  $D$  ont été proposées afin d'avoir des coefficients compris entre  $-1$  et  $1$ . Les plus connues sont le coefficient de corrélation  $r$  et le  $D'$  de Lewontin (1964). Ces indices statistiques sont basés sur les différences entre les fréquences observées et les fréquences attendues pour les haplotypes si l'échantillonnage est à l'équilibre de Hardy-Weinberg. Ces indices se calculent respectivement comme suit :

$$r = \frac{D}{\sqrt{P(A)P(a)P(B)P(b)}}, \quad D' = \frac{D}{D_{\max}},$$

où,

$$D_{\max} = \begin{cases} \min \{P(A)P(b), P(a)P(B)\}, & \text{si } D > 0; \\ \min \{P(A)P(B), P(a)P(b)\}, & \text{si } D < 0. \end{cases}$$

Pour des cas où la phase des doubles hétérozygotes ne peut pas être déterminée et où les individus ne se croisent pas au hasard, Weir (1979) et Weir et Cockerham (1979) introduisent le concept du coefficient composé de déséquilibre de liaison.

$$\Delta_{AB} = D_{AB} + D_{A/B} = P_{AB} + P_{A/B} - 2P_{APB}.$$

qui représente

$$\Delta_{AB} = 2P_{AB}^{AB} + 2P_{Ab}^{AB} + 2P_{aB}^{AB} + (P_{aB}^{Ab} + P_{ab}^{AB}) - 2P_{PAPB}$$

la valeur de  $\Delta_{AB}$  est comprise entre -0.5 et 0.5  $\Delta_{AB}$  permet estimer le DL à partir des données génotypiques.

Plusieurs facteurs peuvent affecter l'intensité du DL. D'après Gupta et al (2002), parmi les facteurs qui contribuent au maintien ou à l'augmentation du DL figurent la mutation, le moindre taux de recombinaison, l'autogamie, une population de petite taille, l'isolement génétique entre lignées, la sous-division de populations, le mélange de populations « *admixture* », et la sélection naturelle ou artificielle. Les facteurs qui peuvent réduire ou supprimer le DL sont l'allogamie et un niveau élevé de recombinaison.

Comme ce qui a été précédemment expliqué, le DL observé entre deux marqueurs peut donc résulter de leur proximité physique sur le génome (DL local) comme de l'histoire évolutive de la population étudiée (DL global). La difficulté à distinguer ces deux causes constitue un problème dans le cadre de la génétique d'association. Ainsi, dans une population structurée, les fréquences d'un caractère quelconque vont probablement varier entre les sous-populations. Si la structure de la population n'est pas contrôlée, il est possible de confondre un polymorphisme moléculaire spécifique d'une sous-population avec le polymorphisme fonctionnel que l'on cherche à marquer, et ainsi d'obtenir de nombreux faux positifs. Pritchard et al (2000) ont développé une méthode qui utilise les pourcentages d'admixture comme cofacteurs dans les études d'association, ce qui permet d'éliminer les effets de la structure de la population. Thornsberry et al (2001), en utilisant cette méthode, ont éliminé plus de 80% de faux positifs chez le maïs.

Dans notre étude, une évaluation du DL existant dans la population de Nacional hybride sera faite afin d'évaluer la densité de marqueurs nécessaires pour faire une étude d'association au niveau de l'ensemble du génome.



## CHAPITRE II

---

# ANALYSE DE LA DIVERSITÉ ET DE LA STRUCTURE GÉNÉTIQUE DE LA POPULATION MODERNE DE CACAOYERS DU TYPE « NACIONAL » D'ÉQUATEUR : RECHERCHE ET IDENTIFICATION DE LA VARIÉTÉ NATIVE





**CHAPITRE II.**  
**ANALYSE DE LA DIVERSITÉ ET DE LA STRUCTURE DE LA**  
**POPULATION MODERNE DE CACAOYERS DU TYPE « NACIONAL »**  
**D'ÉQUATEUR : RECHERCHE ET IDENTIFICATION DE LA**  
**VARIÉTÉ NATIVE**

Depuis le début de l'histoire de la culture du cacaoyer en Équateur, beaucoup d'hypothèses ont été avancées sur la spécificité et l'originalité du cacao équatorien, notamment celui produit par la variété Nacional, dont la qualité a baissé au cours des dernières années. Cette dilution de la qualité, dont l'origine remonte à plus d'un siècle a déjà été brièvement présentée dans le chapitre I (synthèse bibliographique). Il n'existe aucun doute sur le fait que l'introduction de génotypes étrangers a provoqué un important brassage génétique avec la variété native. Ce brassage génétique est l'une des causes principales de la diminution de la qualité du cacao équatorien et de son déclassement partiel.

L'identification et la préservation des individus de la variété native du Nacional, sont devenues un objectif primordial pour pouvoir utiliser ce patrimoine génétique qui est à l'heure actuelle considéré en voie d'extinction. En Équateur, ce problème de baisse de qualité du cacao produit, est considéré comme une question d'Etat, et la récupération du déclassement de 25 % de sa production que le pays a perdu dans son statut de producteur de cacao fin, est un objectif majeur.

Dans ce chapitre, nous présenterons les résultats sur l'étude de la diversité et de la structure génétique de la population moderne de cacaoyers équatoriens. Cette étude débouchera sur l'identification d'individus représentant la variété native Nacional, qui existait sur le littoral équatorien avant l'introduction de cacaoyers étrangers. Les travaux réalisés et les résultats obtenus, sont synthétisés dans l'article ci-après soumis à *Tree Genetics & Genomes*.

Tracing the native ancestors of the modern *Theobroma cacao* L. population in Ecuador \*

R.G. Loo<sup>1,2</sup>, A.M. Risterucci<sup>1</sup>, B. Courtois<sup>1</sup>, O. Fouet<sup>1</sup>, M. Jeanneau<sup>1</sup>, E. Rosenquist<sup>3</sup>, F. Amores<sup>2</sup>, A. Vasco<sup>2,4</sup>, M. Medina<sup>4</sup>, C. Lanaud<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>CIRAD- UMR DAP TA A96/03, 34398 Montpellier Cedex 5, France.

<sup>2</sup>INIAP: EET-Pichilingue. CP 24 Km 5 vía Quevedo El Empalme, Ecuador.

<sup>3</sup>USDA-ARS- 5601 Sunnyside Avenue. Beltsville, MD, 20705-5139. USA

<sup>4</sup>UTEQ: Avenida Quito Km 1 vía Santo Domingo, Quevedo, Ecuador

\* Article submitted to Tree Genetics & Genomes



Tracing the native ancestors of the modern *Theobroma cacao* L. population in Ecuador

**Summary:**

The native *Theobroma cacao* L variety from Ecuador, known as Nacional, is famous for its fine cocoa flavour. From the beginning of the 20<sup>th</sup> century, however, it has been subjected to genetic erosion, due principally to successive introductions of foreign germplasm, whose hybrid descendants gradually replaced the native plantations, implying a decrease in cocoa quality. We attempted to trace this native variety within a wide pool of modern Ecuadorian cacao population.

Forty SSR markers were selected to analyse 332 cacao accessions collected from different geographical areas along of the pacific coast of Ecuador and presently maintained in two living collections.

These samples displayed a high diversity and heterozygosity level. A Factorial Analysis of Correspondence (FAC) showed a continuous variation among them, with a few ones, grouped at an extreme side of the FAC cloud, showing higher levels of homozygosity and lower introgression level by foreign cacaos. A paternity analysis revealed that these highly homozygous individuals are the most probable ancestors of the modern Nacional hybrid pool.

These particular accessions could represent the native Nacional variety present in Ecuador before the foreign introductions. Their identification will help to improve cocoa quality in modern Nacional varieties.

**Key words:** *Theobroma cacao*, native Nacional variety, Ecuador, cocoa quality, SSR.

Tracing the native ancestors of the modern *Theobroma cacao* L. population in Ecuador

### Introduction:

*Theobroma cacao* L. is a perennial species member of the Malvaceae family. This species has its putative centre of origin and diversity in the upper basin of the Amazon river tributaries (Napo, Putumayo and Caqueta) at the foot of the Ecuadorian Andes (Cheesman 1944). The greatest wild cacao diversity is located in the Amazonian region. During the course of cacao domestication a small part of this primary cacao diversity has been exported to various destinations to be cultivated, and three main varieties were spread and cultivated around the world before 1950. They have been traditionally described as: Criollo, Forastero and Trinitario.

*Criollo* was originally cultivated by the Mayas in Central America and represents the first domesticated cacao. Its cacao beans have been used in food for more than 2,600 years as shown by archaeological evidence in cacao residues found in Mayan cooking vessels which date back to approximately 600 years BC (Hurst et al. 2002).

*Forastero* was domesticated later than Criollo during the 17<sup>th</sup> century. One variety called “Amelonado”, originated in the Lower Amazon region of Brazil (Lockwood 1976) and was spread around the world; especially in West Africa, which presently accounts for over 80% of the world’s production of cocoa.

*Trinitario* is an hybrid population developed from natural hybridization between Criollo and Lower Amazon Forastero (Pound 1945) that took place in the island of Trinidad, when the Criollo plantations were partly destroyed by a natural disaster in the late eighteenth century (1727). Subsequently, Forastero plants were imported to Trinidad (Chessman 1944) and hybridised with the few surviving Criollo trees giving rise to hybrid forms called Trinitario.

In addition to these three main cacao groups, a primitive cultivated population of *T. cacao* known as “*Nacional*” variety existed in the Pacific Coast Region of Ecuador. Although its exact origin is unknown, it is considered as native of this country. Through the years its classification has varied : it was classified as Forastero by Cheesman (1944) and Soria (1970), placed among Criollo by Enriquez (1992) and more recently considered as a group different from Criollo or Forastero, but genetically closer to the later (Lerceteau et al. 1997a). According to Allen and Lass (1983), the Nacional variety might have been derived from a local wild population which could now have completely disappeared together with the original forest cover of the coast region. Soria (1970) and Vera (1987, 1993) suggested as its

center of origin the oriental declivities of the Andes mountain in the Amazonian area of Ecuador.

According to historical archives of Ecuador, in early 1600s, small plantations of Nacional cacao variety existed along the Guayas river shores that spread in its tributaries, Daule and Babahoyo (upward rivers), which are located in a region called “ARRIBA” (Fig. 1). This variety develops a strong floral aroma known as “ARRIBA” flavour in international markets. This quality is highly appreciated to make fine chocolates. The Nacional variety is exclusively produced in Ecuador and is considered as a strategic crop for its economic development. With exception of the province of Esmeraldas, the Nacional cacao was the only one grown in the western coastal plain of Ecuador until 1890 (Van Hall 1932) when, for the first time, pods of cultivars called “Venezuela” characterised by a high productivity, were introduced from Trinidad. This Trinidad accession probably corresponded to Criollo/Trinitario types. With the appearance in 1916 of *Moniliophthora roreri* (Rorer 1926); and, in 1919 of *Moniliophthora perniciosa* (Pound 1938), fungi that respectively cause the frosty pod and witches’ broom diseases, foreign materials were introduced in larger quantity in Ecuador, and particularly genotypes of the Scavina family from Upper Amazon region. Scavina was used from this time onwards in the breeding programs, because of its known high level of resistance to witches’ broom (Ampuero 1960). Presently, more than 95% of the original area planted with Nacional cacao has been replaced with hybrid material involving foreign clones, especially Trinitario type (Loor 2002). This genetic mixing has led to a dilution of the “ARRIBA” flavour of the traditional Nacional variety.

In an effort to preserve the Nacional cacao genetic resources and to broaden its genetic basis, several expeditions have been made since the 1950’s, and a substantial amount of germplasm has been collected along the Pacific Coast Region of Ecuador. Today, an important fraction of these accessions are maintained as ex-situ collections in the two main cacao germplasm banks of Ecuador (Fig. 1): Estación Experimental Tropical Pichilingue (EET-P) and Centro de Cacao Aroma Tenguel (CCAT). Although the majority of the passport information was lost in the case of CCAT, these gene banks appear attractive to cacao breeders. Very little is known however, about the genetic structure of these collections. The understanding of their patterns of genetic diversity will help to optimize new breeding strategies to produce modern Nacional varieties with a conserved “ARRIBA” flavour.

Recent developments in molecular techniques provide a larger array of genetic tools for studying genetic diversity of populations. Microsatellite markers or simple sequence repeat (SSR) is one of the most powerful molecular-marker types to reveal the genetic diversity of natural populations. For cacao, a large number of microsatellite (SSR) markers was developed by Lanaud et al. (1999); Risterucci et al. (2000); Lanaud et al. (2004) and Pugh et al. (2004). However, few genetic studies have been carried out on the Nacional cacao of Ecuador (Lerceteau et al. 1997b; Quiroz 2002; Loor 2002); and, unfortunately a small number of samples have been used. In the present study, SSR genotyping technology was applied to study the diversity of a large number of samples (a) to assess the genetic structure and diversity present in modern Nacional cacao, (b) to determine the genetic relationships between the different cacao accessions, and (c) to identify individuals that could represent the native Nacional cacao; and, which could be used as source of genes for a new cacao breeding program of aromatic varieties.

## **Materials and methods**

### **Plant material**

Leaves were collected from 322 cacao trees (Table 1) conserved at CCAT and EETP germplasm banks (Fig. 1). The CCAT is presently managed by the UTEQ (Universidad Técnica Estatal Quevedo) and is located in the south coast region of Ecuador. The EET-P is located in the central coast region of Ecuador and it is managed by the Ecuadorian Agricultural Research Center (INIAP). One old cacao tree selected in a traditional farm (B-240) was used as reference for Nacional (Fig. 1). In addition, Moreover, four genotypes representing a typical Trinitario (UF-676) and its two probable ancestors: Lan-28 (Criollo) and Mat-1-6 (Lower Amazon) (Motamayor et al. 2003); and, the resistant clone Scavina 6 (SCA6), a Forastero genotype originated from the Upper Amazon region of Peru, were included in this analysis (Table 1).

### **DNA isolation**

Adult fresh leaves were collected and stored at -20°C until DNA extraction was performed. Genomic DNA was isolated following the method described by Risterucci et al. (2000) with some slight modifications. The DNA was purified by a silica-based anion-exchange resin as

recommended by the supplier (NucleoBond® AX, Macherey-Nagel), and the concentration was estimated using a fluorometer (Fluoroskan Ascent 2.5) according to the manufacturer's instructions. The proper DNA work dilution was established at 0.2ng/μl.

### **PCR amplification and SSR analysis**

PCR amplification and SSR analyses were carried out following the methods described by Risterucci et al. (2000) and Pugh et al. (2004). A total of forty SSR primers pairs (Table 2) were chosen to analyse the genetic diversity, based upon their position in the most recent cacao genetic map (Pugh et al. 2004). Four loci per chromosome were selected. The PCR products were denatured and separated by electrophoresis in 0.5% TBE buffer at 60W for approximately 2h. The gel was dried for 25 min at 80°C and the results were revealed by autoradiography. SSR loci were scored individually and alleles were recorded by the presence of polymorphic DNA fragments (alleles) among the individuals of each population. Only those alleles that showed consistent amplification were considered. Smear and weak alleles were ignored.

### **Data analysis**

The SSR bands were scored as alleles. The genetic diversity was represented using multivariate analysis. A factorial analysis of correspondence (FAC) (Benzecri 1973) was carried out using GENETIX V.4.05 software (Belkhir et al. 2004) and a graphic representation of the variation among individuals was obtained (Dervin 1992; Phillips 1995). POWER MARKER V.4.03 (Liu and Muse 2005) was used to calculate the allelic and genotypic frequencies. Based upon genetic dissimilarity indices and neighbour-joining method, a diversity tree was constructed using the DARWIN-5.0 software (Perrier et al. 2003). The following parameters were also computed: 1) Nei's genetic parameters (Nei 1972, 1978): genetic distance, observed heterozygosity ( $H_o$ ) and gene diversity, often referred to as expected heterozygosity ( $H_e$ ); 2) Genetic polymorphisms (Hartl and Clark 1997) was calculated by the effective number of alleles/locus ( $N_e$ ); 3) F-statistics were measured at different hierarchical levels, according to Weir and Cockerhan (1984): Wright's  $F_{IS}$  (correlation of alleles within individuals of one population),  $F_{ST}$  (correlation of alleles between individuals of a population compared to the whole populations) and  $F_{IT}$  (correlation of alleles within individuals "inbreeding"). In addition, to identify the two most likely parents

of each sample, paternity inference was conducted using CERVUS V.2.0 software (Marshall et al. 1998), a Windows-based maximum likelihood program, designed for use with co-dominant markers. Paternity assignment using likelihood techniques was determined at, 95% statistical confidence level and with 10 000 simulated offspring as suggested by Marshall et al. (1998).

## **Results**

### ***Level of polymorphism revealed in “modern” Nacional genotypes***

Forty SSRs primers were used to reveal polymorphism among a subset of 332 “modern” Nacional cacao accessions. As shown in Table 2, genetic variability was detected for all loci in the natural cacao populations, covering most of the Pacific Coast Province in Ecuador. A total of 169 alleles were scored, ranging from 2 alleles at mtcCIR84 or mtcCIR258 to 7 alleles at mtcCIR136, mtcCIR290 and mtcCIR258. The frequency of the most common allele was also determined per locus and ranged from 0.36 (mtcCIR73) to 0.95 (mtcCIR242). High levels of gene diversity ( $H_e > 0.50$ ) were observed for 28 SSR markers among the 40 SSR studied (Table 2). Indeed, for most SSR loci, gene diversity (Nei's  $H_e$ ) was apparently lower than the observed heterozygosity ( $H_o$ ). As showed in Table 2, the polymorphism information content (PIC) ranged from 0.09 (mtcCIR242) to 0.68 (mtcCIR136); an example of this polymorphism profile can be observed in Fig. 2.

### ***Genetic structure and diversity in modern Ecuadorian cacao population***

Based on polymorphic SSR, eight accessions showed a higher level of homozygosity (> 75%). Among these, four accessions showed 90% of homozygosity: L39-H66, SA16, SNA1001, and SNA1003. Other accessions with high level of homozygosity were SAN409a and SNA604, both with 85% of homozygosity, SNA503 (77.5%) and B-240 with 75% of homozygosity (Table 1). These individuals, characterised by a higher level of homozygosity, will be called HoN in the further results or discussions reported in this paper.

No significant difference was observed (0.031) between the two collections from EETP and CCAT on the basis of Nei's genetic distance (1972). The genetic structure of the studied population was also analyzed in term of  $F$  statistics. A summary of genetic statistics values

measured for each population and the overall sample is shown in Table 3. In each population, Wright's  $F_{IS}$  measured the heterozygous deficiency within each sample, and negative values were obtained in each group collected. Overall negative values were obtained for  $F_{IS}$  (-0.1393) and  $F_{IT}$  (-0.1169), in both cases, reflecting high values of heterozygosity level. The result of  $F_{ST}$  showed low level of differentiation among individuals of each population ( $F_{ST}= 0.0369$ ).

A Factorial Analysis of Correspondence (FAC) gives a visual representation of the relationships and variation among individuals (Fig. 3); and, an analysis of genetic dissimilarity allowed the construction of a Neighbor-joining tree (Fig. 4).

As showed in Fig. 3, the two first axes of FAC explained 15% of the total variation. The modern Ecuadorian cacao accessions present a continuous variation and were widespread in an area delimited by the old Nacional genotype B-240, the Trinitario type UF-676 and the Lower Amazon ancestor MAT-1-6. This pattern of diversity may indicate the gene flow occurred between cultivated Nacional and foreign genotypes introduced at the beginning of the 20<sup>th</sup> century.

The highly homozygous genotypes (HoN) previously identified were found at the extreme side of the hybrid population, and close to the Nacional reference B-240. These genotypes were circled at the left-hand end on axis 1 of FAC (Fig. 3). The diversity between HoN individuals was very low, despite the fact that the trees have been collected from diverse geographic zones along the coast provinces of Ecuador. These HoN genotypes shared the lowest percentage of common alleles with the Trinitario type represented by UF676.

The results obtained in FAC (Fig. 3) and the Neighbor-joining tree (Fig. 4) are quite consistent. Based on both analyses, we found that with exception of the sample L39H66, all HoN genotypes clustered together and with the Nacional reference genotype B240, showing a high genetic similarity among them, and the higher genetic divergence with the three reference genotypes representing the first potential foreign introductions: the Trinitario (UF676) and their two potential ancestors LAN28 and MAT1-6.

From our results, most of the cacao trees in the germplasm banks of EET-Pichilingue and CCA-Tenguel appeared as hybrids that mainly shared alleles with the typical Trinitario type UF-676 and with the HoN individuals. These results suggested that the HoN individuals

identified in this study could represent the few remaining samples from the native Nacional variety cultivated in Ecuador before the foreign cacao introductions and that they could be at the origin of the modern and hybrid Nacional population. To check this hypothesis, a paternity analysis was carried out on all samples studied.

### ***Identification of potential parents of modern hybrid Nacional genotypes***

According to the history of foreign cacao introduction in Ecuador, approximately one century separates the first hybridization events of foreign cacao with the native Nacional variety from the modern Nacional population. Thus, probably no more than 4 generations of recombination occurred during this time. Using paternity inferences from Cervus software, we attempted to identify the potential parents of the genotypes that form the actual Nacional cacao population in Ecuador.

We carried out several preliminary paternity analyses to finally include a total of 77 potential progenitors of the modern Nacional cacao population analysed in this study, represented by:

- the three reference genotypes (Criollo, Lower Amazon Forastero and Trinitario);
- the HoN Nacional genotypes;
- SCA6 and the modern Nacional genotypes close to it, and, as distant from Trinitario as the HoN individuals;
- different hybrid genotypes involving crosses between HoN genotypes only, or crosses between HoN genotypes and Criollo, Trinitario or Lower Amazon Forastero.

Thus, the two most likely parents were identified for each individual. The first most likely parent was identified at 95% of confidence in the 78% of individuals and only for 2 individuals; however, paternity was unresolved.

The identification of two most likely parents allowed to clarify the genetic structure of the cacao population analyzed in this study. Several classes of crosses, probably occurred during the last century of Nacional cocoa history in Ecuador, could be identified according to the two most likely parents assigned for each individual from our paternity analysis:

- crosses between 2 HoN genotypes (22,91%)
- crosses between HoN x Foreign genotypes (3,94%)
- back crosses (HoN x Foreign genotypes) x HoN (11,48%)
- back crosses (HoN x Foreign genotypes) x Foreign genotypes (40,01%)



- crosses (HoN x Foreign genotypes) x (HoN x Foreign genotypes) (13,45%)
- crosses between only foreign genotypes (8,21%)

About 12% of the individuals, widespread in the several classes, involve SCA6 as one of their probable parent.

Our results showed clear evidences of high introgression of foreign alleles, principally from Trinitario type, in the modern Nacional population; and, confirm the hybrid nature of modern Nacional variety. Our results indicated also that the HoN cacao samples: SA16, SNA1001, SNA1003, SNA409a, SNA604, SNA503 and B-240 could be at the origin of more than 67% of the modern Nacional varieties, associated to various levels of introgression of foreign genotypes. They are also at the origin of 23% of the population which result only from crosses between HoN.

These results showed that different hierarchic levels of crosses have occurred during the last century in the Ecuadorian cacao plantation, from direct crosses between foreign genotypes and the native variety, to more advanced generation.

### **Discussion - conclusion**

In this work, we used 40 SSR markers to estimate the genetic structure of modern Nacional cacao, represented by 322 cacao accessions. These cacao trees were originally sampled across their distribution in the Ecuadorian Coast Region and are maintained as living collections at EETP and CCAT germplasm banks. No significant level of genetic differentiation between these two collections was evidenced. As also demonstrated by F-Statistics, the genetic structure of modern Nacional cacao population is characterized by a high level of heterozygosity in agreement with the historical events of introduction of foreign germplasm, since the end of 1890's, and its subsequent gene flow with the native Nacional variety (Van Hall 1932; Fowler and Lopez 1949).

The modern Nacional genotypes presented a wide range of variations. Among them, a few highly homozygous genotypes (HoN) were also identified, in contrast with the hybrid nature of most of them. These HoN genotypes showed the lowest level of introgression of Trinitario alleles, but shared the same alleles, at most loci, between them; and, with the reference

genotype of Nacional (B-240). Such highly homozygous individuals have been also identified by Lerceteau et al. (1997b) and Loor (2002) using RFLP and SSR marker, respectively. Using paternity analyses, these genotypes appeared to be at the origin of more than 90% of the population studied. These HoN genotypes, among which some correspond to trees of more than 80 years old, could represent the native Nacional variety cultivated in Ecuador before foreign introductions, and now nearly lost among a wide hybrid cultivated pool.

Despite to the wide geographical area where the HoN genotypes were collected, they showed a high genetic similarity. This result could indicate a pronounced bottleneck effect of the original Nacional cacao plantations along of the Coast Provinces of Ecuador. In this way, we can suppose that at the origin of Nacional variety the size of the ancestral population was very small. The differentiation of this homozygous group may have occurred through allele fixation (genetic drift). Subsequently, intervention of man, through cultivation may have fixed and maintained some phenotypes, as hypothesized by Motamayor et al. (2002) for the Criollo group. The higher level of homozygosity of these genotypes could be explained by an incompatibility system present in *T. cacao* but variable according to the different genetic origins. The Trinitario are generally self incompatible, but the oldest Nacional genotypes from Ecuador are self-compatible (Quiroz 1990; Pastorelli 1992; Enriquez 1992; Loor 1998). Hybrid forms appear, most likely, to be variable, according to the introgressed part of the Trinitario genome.

Paternity analyses allowed us to refine the genetic structure of modern Nacional varieties. From our results, we estimated that more than 65% of the cacao population analyzed in this study correspond to crosses of a second generation. It is important to indicate that almost the totality of cacao accessions from CCATenguel were collected in 1950's, by its similarity with the Nacional variety. Currently, the majority of traditional cacao plantations are most likely to be established with crosses of fourth or fifth generation.

The course of continuous germplasm introduction has caused considerable genetic erosion within original Ecuadorian Nacional cacao, occasioning changes in its allele frequencies and in its fine cocoa flavour, which has traditionally characterized the Ecuadorian cocoa beans. Nowadays, the number of native trees of Nacional variety has decreased alarmingly and this variety will likely to disappear in the near future (Loor 2002). Subsequently, the "fine flavour" quality of Ecuadorian cocoa, economically important for this country, has also

degraded. Until now Nacional cocoa has been classified as “fine flavour” and benefited from higher, premium prices in the international market.

As consequence of the introduction of foreign germplasm, presently 25% of the Ecuadorian cacao production has been disqualified as fine flavour and considered as “bulk cocoa” with a lower price in the international market. Additionally, to compound these problems, a very limited number of Nacional accessions have been used in traditional cacao breeding programs in Ecuador, due to the utilisation of foreign varieties, providing disease resistance and higher productivity.

The present study provides important information for long-term conservation and management of *T. cacao* in Ecuador with emphasis on the Nacional variety. If the proportion of specific alleles from Nacional variety continues decreasing, the consequences will be very negative for the “fine flavour” quality of Ecuadorian cocoa. The identification of non introgressed Nacional genotypes will facilitate the improvement of “fine flavour” in new varieties.

The large number of diverse hybrid forms between Nacional and Trinitario genotypes currently present in the Ecuadorian germplasm banks, offer a segregation population with continuous variations between them, adapted to carry out association mapping studies to identify the genetic bases of “fine cocoa flavour” of Nacional varieties. This knowledge will facilitate the improvement of new varieties associating Nacional quality traits and disease resistance, provided by some foreign cacao genotypes using a marker assisted strategy.

The origin of Nacional variety cultivated in Ecuador from 1600 is currently unknown. The identification of wild Nacional cacao populations at the origin of still existing Nacional varieties, could allow for the enlargement of the narrow genetic base of non introgressed Nacional genotypes, identified in this study, favouring the breeding strategies for the modern Nacional varieties.

### **Acknowledgments**

We are grateful to the United States Department of State (U.S. Foreign Ministry), the U.S. Embassy, Quito; and the U.S. Department of Agriculture (USDA-ARS), for the financial

support of this research. Thanks also should go to the Centre de Coopération International en recherche agronomique pour le développement (CIRAD), France; and, the Agricultural Research Center of Ecuador (INIAP) for their financial and technical support.

## **References**

- Allen BJ, Lass AR. (1983) London cocoa trade Amazon project. Final report phase 1. Cocoa Growers' Bulletin 34:1-72.
- Ampuero E (1960) Progresos alcanzados en el Ecuador en el estudio de selección para resistencia de la Escoba de Bruja. In: Inter American Cacao Conference. Proceeding. Trinidad, Bowen Press., 166-173.
- Belkhir K, Borsa P, Chikhi L, Raufaste N, Bonhomme F (2004) GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations, Laboratoire Génome, Populations, Interactions; CNRS UMR 5000; Université Montpellier II, France.
- Benzecri JP (1973) L'analyse des données. Tome 2 : L'analyse des correspondances. Dunod (eds), Paris, France.
- Cheesman EE (1944) Notes on the nomenclature, classification and possible relationships of cacao populations. Trop Agric 21:144-159.
- Dervin C (1992) Analyses des Correspondances. Comment interpréter les résultats?. Collection STAT-ITCF. Paris, France.
- Enriquez GA (1992) Characteristics of cacao "Nacional" of Ecuador. In: International workshop on conservation, characterisation and utilisation of cocoa genetic resources in the 21<sup>st</sup> century. Port of Spain, Trinidad 13-17<sup>th</sup> September. The Cocoa Research Unit, The University of the West Indies, pp 269-278.
- Fowler RL, Lopez GH (1949) The Cacao Industry of Ecuador. Foreign Agriculture Report N°34, US Dept of Agriculture, Washington, USA.
- Hartl DL, Clark AG (1997) Principles of Population Genetics, 3<sup>rd</sup> ed. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, USA.
- Hurst WJ, Tarka SM, Powis TG, Valdez F, Hester RT (2002) "Archaeology: cacao usage by the earliest Maya civilization." Nature 418: 289-290.
- Lanaud C, Risterucci AM, Pieretti I, Falque M, Bouet A, Lagoda PJJ (1999) Isolation and characterisation of microsatellites in *Theobroma cacao* L. Molecular Ecology 8: pp 2141 – 2152.

- Lanaud C, Risterucci AM, Pieretti I, N'Goran JAK, Fargeas D (2004) Characterization and genetic mapping of resistance and defence gene analogs in cocoa (*Theobroma cacao* L.). *Molecular Breeding* 13: 211-227.
- Lerceteau E, Robert T, Pétiard V, Crouzillat D (1997a) Evaluation of the extent of genetic variability among *Theobroma cacao* L. accessions using RAPD and RFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics* 95:10-19.
- Lerceteau E, Flipo S, Pétiard V, Crouzillat D (1997b) Genetic differentiation among Ecuadorian *Theobroma cacao* L. accessions using molecular and morphological analyses. *Euphytica* 95: 77-87.
- Liu K, Muse VS (2005) Power Marker: Integrated analysis environment for genetic marker data. *Bioinformatics* 21: 2128-2129.
- Lockwood G (1976) A comparison of the growth and yield during a 20 year period of Amelonado and Upper Amazon hybrid cocoa (*Theobroma cacao*) in Ghana. *Euphytica* 24: 647-658.
- Loor RG (1998) Obtención de híbridos de cacao tipo Nacional provenientes de materiales de alta productividad y resistentes a enfermedades. Tesis de Ingeniero Agrónomo. Universidad Técnica de Manabí, Portoviejo, Ecuador.
- Loor RG (2002) Caracterización morfológica y molecular de 37 clones de cacao (*Theobroma cacao* L.) Nacional de Ecuador. Tesis de Maestro en Ciencias. Colegio de Postgraduados, Montecillo, Texcoco, México.
- Marshall TC, Slate J, Kruuk LEB, Pemberton JM (1998) Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology* 7:639-655.
- Motamayor JC, Risterucci AM, Lopez PA, Ortiz CF, Moreno A, Lanaud C (2002) Cacao domestication I: the origin of the cacao cultivated by the Mayas. *Heredity* 89: 380-386.
- Motamayor JC, Risterucci AM, Heath M, Lanaud C (2003) Cacao domestication II: progenitor germplasm of Trinitario cacao cultivar. *Heredity* 91: 322-330.
- Nei M (1972) Genetic distance between populations. *Am. Nat.* 106: 283-292.
- Nei M (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583-590.
- Pastorelly RD (1992) Evaluación de algunas características del cacao tipo Nacional, en la zona de Tenguel. Tesis Ingeniero Agrónomo. Universidad Agraria del Ecuador. Guayaquil, Ecuador.

- Perrier X, Flori A, Bonnot F (2003) Data analysis methods. In: Hamon P, Seguin M, Perrier X, Glaszmann JC. Ed., Genetic diversity of cultivated tropical plants. Enfield, Science Publishers. Montpellier, France: 43-76.
- Phillips D (1995) Correspondence analysis. Social Research Update. Department of Sociology, University of Surrey, Guildford GU2 7XH, England.
- Pound FJ (1938) Cacao and Witches' broom disease (*Marasmius perniciosus*) of South America, with notes on other species of *Theobroma*. Yuille's Printerie, Port of Spain, Trinidad and Tobago, 9–49. Reprinted 1982, Archives of Cocoa Research 1:21–64.
- Pound FJ (1945) A note about the cacao populations of South America. Report and Proceedings Cocoa Research Conference, London. Colonial 192:95-7. Reprinted 1982, Archives of Cocoa Research 1:93-97.
- Pugh T, Fouet O, Risterucci AM, Brottier P, Abouladze M, Deletrez C, Courtois B, Clement D, Larmande P, N'Goran JAK, Lanaud C (2004) A new cacao linkage map based on codominant markers: development and integration of 201 new microsatellite markers. Theoretical and Applied Genetics 108:1151-1161.
- Quiroz J (1990) Estudio de la compatibilidad en algunos cultivares de cacao (*Theobroma cacao* L.). Tesis de Ing. Agr. Universidad Técnica de Babahoyo, Ecuador.
- Quiroz J (2002) Caracterización molecular y morfológica de genotipo superiores de cacao nacional (*Theobroma cacao* L.) de Ecuador. Tesis Ms.Sc. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. Turrialba, Costa Rica.
- Risterucci AM, Grivet L, N'Goran JAK, Pieretti I, Flament MH, Lanaud C (2000) A high-density linkage map of *Theobroma cacao* L. Theoretical and Applied Genetics 101: 948 – 955.
- Rorer JB (1926) Ecuador cacao. Tropical Agriculture (Trinidad) 3:69-69.
- Soria JV (1970) Principal varieties of cocoa cultivated in tropical America. Cocoa Growers' Bulletin 19:12-21.
- Van Hall CJ (1932) Cocoa. Second edition. MacMillan & Co., Ltd., London. 304-320.
- Vera BJ (1987) Antecedentes históricos. Manual del cultivo de cacao. INIAP, EET-Pichilingue. Quevedo, Ecuador, 6-9.
- Vera BJ (1993). Botánica del cacao. Manual del cultivo de cacao 2da edición. INIAP, EET-Pichilingue. Quevedo, Ecuador, 10-15.
- Weir BS, Cockerhan CC (1984) Estimating *F*-statistics for the analysis of population structure. Evolution 38:1358-1370.

**FIGURES and TABLES:**

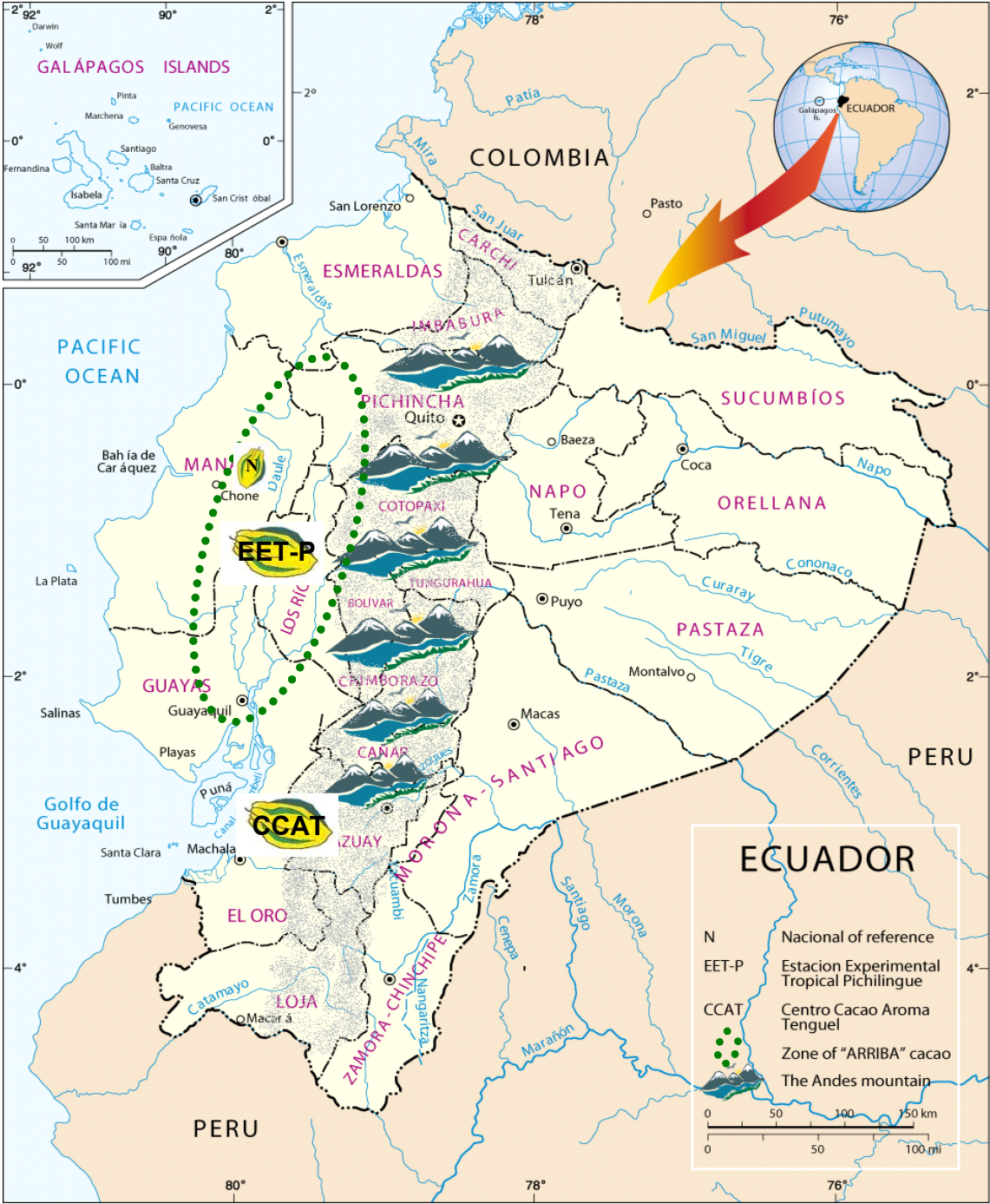


Figure1. Map of Ecuador showing the different ecological zones, the geographic locations of Nacional germplasm banks and the zone called ARRIBA where was cultivated the first *Nacional* cacao population in Ecuador.

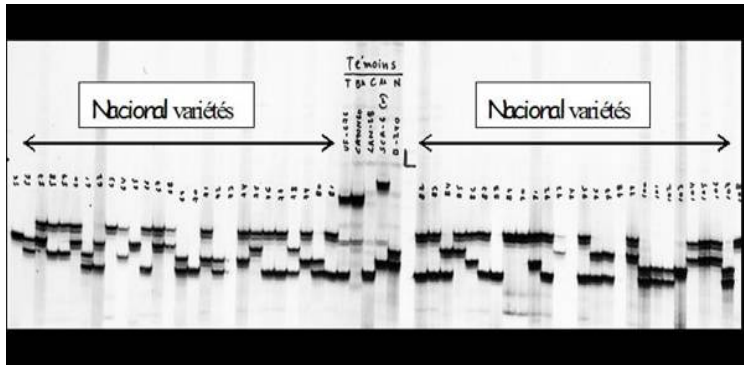
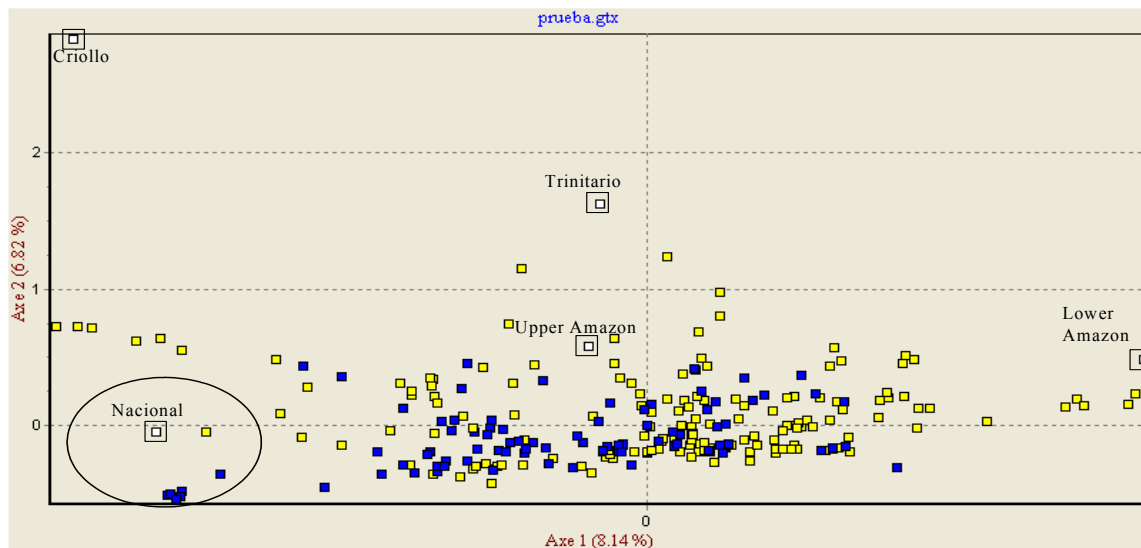


Figure 2. Polymorphism profile of some Ecuadorian samples on chromosome 6 using mtcCIR 136.



Black= EET-Pichilingue      Boxed= Reference Genotype      White= CCATenguel

Figure 3. Multidimensional scaling plot of Factorial Analysis of Correspondence (FAC) showing the genetic diversity among the Ecuadorian cacao samples. The 2 first axe explain 15% of the total variation.







Table 1. List of Ecuadorian cacao accessions used in this study and level of heterozygosity (%) at the forty loci studied. CCAT (1-220), EETP (221-332).

Nº	Name	Origin, region	%heter.	Nº	Name	Origin, region	%heter.
1	L27-H68	CCAT	52.6	51	L48-H73	CCAT	62.0
2	L28-H46	CCAT	87.5	52	L23-H53	CCAT	45.0
3	L29-H47	CCAT	42.5	53	L23-H49	CCAT	55.3
4	L29-H48	CCAT	57.5	54	L23-H48	CCAT	57.9
5	L30-H47	CCAT	80.0	55	L23-H42	CCAT	41.4
6	L28-H48	CCAT	87.5	56	L23-H41	CCAT	52.8
7	L26-H60	CCAT	30.0	57	L21-H61	CCAT	55.0
8	L25-H60	CCAT	72.5	58	L20-H57	CCAT	67.5
9	L25-H62	CCAT	72.5	59	L39-H64	CCAT	38.5
10	L24-H62	CCAT	53.8	60	L39-H70	CCAT	75.0
11	L24-H64	CCAT	30.0	61	L39-H54	CCAT	72.5
12	L25-H57	CCAT	76.3	62	L46-H83	CCAT	77.5
13	L25-H64	CCAT	72.5	63	L29-H59	CCAT	45.0
14	L21-H56	CCAT	57.5	64	L36-H37	CCAT	44.9
15	L31-H48	CCAT	47.5	65	L35-H60	CCAT	45.0
16	L21-H54	CCAT	80.0	66	L36-H53	CCAT	37.5
17	L14-H44	CCAT	45.0	67	L47-H78	CCAT	77.5
18	L30-H01	CCAT	82.5	68	L16-H36	CCAT	55.6
19	L33-H49	CCAT	72.5	69	L16-H26	CCAT	77.5
20	L33-H47	CCAT	72.5	70	L39-H46	CCAT	40.6
21	L33-H27	CCAT	72.5	71	L40-H12	CCAT	85.0
22	L33-H24	CCAT	68.4	72	L23-H38	CCAT	51.5
23	L33-H23	CCAT	72.5	73	L22-H39	CCAT	57.5
24	L34-H57	CCAT	36.0	74	L21-H53	CCAT	77.5
25	L34-H58	CCAT	85.0	75	L30-H20	CCAT	40.0
26	L34-H59	CCAT	37.5	76	L30-H43	CCAT	77.5
27	L34-H61	CCAT	45.0	77	L30-H46	CCAT	77.5
28	L34-H66	CCAT	46.0	78	L23-H63	CCAT	59.3
29	L34-H67	CCAT	50.0	79	L39-H61	CCAT	85.0
30	L31-H54	CCAT	72.5	80	L39-H51	CCAT	74.4
31	L31-H68	CCAT	72.5	81	L48-H99	CCAT	60.0
32	L32-H72	CCAT	67.6	82	L38-H31	CCAT	32.5
33	L32-H69	CCAT	72.5	83	L39-H13	CCAT	40.0
34	L13-H46	CCAT	45.8	84	L37-H31	CCAT	40.0
35	L31-H45	CCAT	42.5	85	L37-H53	CCAT	77.5
36	L30-H06	CCAT	85.0	86	L37-H68	CCAT	57.5
37	L15-H39	CCAT	78.0	87	L36-H28	CCAT	35.0
38	L14-H48	CCAT	82.5	88	L36-H17	CCAT	34.5
39	L33-H10	CCAT	47.5	89	L36-H27	CCAT	67.5
40	L34-H46	CCAT	85.0	90	L35-H46	CCAT	67.5
41	L32-H48	CCAT	72.5	91	L35-H62	CCAT	37.5
42	L33-H65	CCAT	55.0	92	L35-H56	CCAT	52.5
43	L33-H58	CCAT	72.5	93	L45-H76	CCAT	76.9
44	L33-H55	CCAT	72.5	94	L46-H92	CCAT	61.0
45	L20-H43	CCAT	50.0	95	L43-H15	CCAT	42.5
46	L28-H34	CCAT	62.5	96	L46-H63	CCAT	79.5
47	L36-H61	CCAT	47.5	97	L46-H81	CCAT	82.1
48	L20-H07	CCAT	52.5	98	L43-H59	CCAT	50.0
49	L47-H75	CCAT	46.2	99	L19-H27	CCAT	31.6
50	L29-H63	CCAT	53.0	100	L18-H49	CCAT	65.0

Table 1. Continuation.....

N°	Name	Origin, region	%heter.	N°	Name	Origin, region	%heter.
101	L18-H58	CCAT	64.5	153	L23-H44	CCAT	55.0
102	L17-H46	CCAT	29.7	154	L23-H56	CCAT	55.0
103	L17-H42	CCAT	52.5	155	L24-H41	CCAT	35.0
104	L46-H45	CCAT	56.4	156	L24-H60	CCAT	65.0
105	L45-H75	CCAT	80.0	157	L24-H65	CCAT	47.5
106	L45-H78	CCAT	79.0	158	L25-H46	CCAT	42.5
107	L45-H83	CCAT	72.5	159	L25-H61	CCAT	72.5
108	L46-H51	CCAT	47.4	160	L26-H64	CCAT	72.5
109	L45-H85	CCAT	71.8	161	L27-H51	CCAT	32.5
110	L44-H63	CCAT	74.4	162	L27-H53	CCAT	45.0
111	L45-H74	CCAT	73.7	163	L27-H58	CCAT	42.5
112	L44-H88	CCAT	71.8	164	L27-H67	CCAT	65.0
113	L40-H90	CCAT	47.4	165	L28-H47	CCAT	50.0
114	L43-H92	CCAT	65.0	166	L28-H59	CCAT	52.5
115	L43-H71	CCAT	71.0	167	L29-H45	CCAT	52.5
116	L10-H25	CCAT	47.5	168	L30-H54	CCAT	55.0
117	L10-H28	CCAT	47.5	169	L30-H59	CCAT	55.0
118	L10-H29	CCAT	50.0	170	L30-H62	CCAT	52.5
119	L13-H34	CCAT	62.5	171	L31-H47	CCAT	75.0
120	L13-H37	CCAT	77.5	172	L32-H46	CCAT	52.5
121	L13-H41	CCAT	60.0	173	L32-H56	CCAT	60.0
122	L14-H34	CCAT	42.5	174	L32-H58	CCAT	45.0
123	L14-H39	CCAT	45.0	175	L32-H65	CCAT	72.5
124	L14-H40	CCAT	47.5	176	L33-H45	CCAT	85.0
125	L14-H45	CCAT	58.0	177	L33-H68	CCAT	55.0
126	L15-H30	CCAT	80.0	178	L35-H40	CCAT	48.7
127	L15-H31	CCAT	77.5	179	L35-H51	CCAT	32.5
128	L15-H32	CCAT	50.0	180	L36-H42	CCAT	47.5
129	L15-H33	CCAT	80.0	181	L36-H49	CCAT	47.5
130	L15-H38	CCAT	82.5	182	L36-H65	CCAT	47.5
131	L15-H43	CCAT	57.5	183	L37-H41	CCAT	57.5
132	L16-H29	CCAT	77.5	184	L37-H55	CCAT	35.0
133	L16-H43	CCAT	77.5	185	L38-H51	CCAT	47.5
134	L17-H53	CCAT	77.5	186	L39-H52	CCAT	72.5
135	L18-H38	CCAT	65.0	187	L39-H62	CCAT	47.5
136	L18-H46	CCAT	50.0	188	L39-H63	CCAT	45.0
137	L18-H59	CCAT	65.0	189	L39-H66	CCAT	10.0
138	L19-H29	CCAT	52.5	190	L40-H64	CCAT	57.5
139	L19-H32	CCAT	52.5	191	L41-H64	CCAT	62.5
140	L19-H34	CCAT	52.5	192	L41-H75	CCAT	55.0
141	L19-H37	CCAT	52.5	193	L42-H73	CCAT	57.5
142	L20-H35	CCAT	52.5	194	L42-H83	CCAT	65.0
143	L20-H46	CCAT	75.0	195	L42-H87	CCAT	45.0
144	L21-H38	CCAT	75.0	196	L42-H90	CCAT	37.5
145	L21-H44	CCAT	80.0	197	L42-H96	CCAT	57.5
146	L21-H46	CCAT	50.0	198	L42-H97	CCAT	55.0
147	L21-H47	CCAT	80.0	199	L43-H78	CCAT	32.5
148	L21-H48	CCAT	77.5	200	L43-H90	CCAT	35.0
149	L22-H38	CCAT	55.0	201	L43-H96	CCAT	37.5
150	L22-H43	CCAT	42.5	202	L44-H66	CCAT	73.7
151	L22-H58	CCAT	52.5	203	L44-H68	CCAT	72.5
152	L22-H62	CCAT	52.6	204	L44-H72	CCAT	42.5

Table 1. Continuation.....

N°	Name	Origin, region	%heter.	N°	Name	Origin, region	%heter.
205	L44-H84	CCAT	55.0	257	SNA1001	EET-P	10.0
206	L46-H70	CCAT	79.5	258	SNA1003	EET-P	10.0
207	L46-H74	CCAT	80.0	259	L11H19	EET-P	64.0
208	L46-H75	CCAT	79.5	260	L12H01	EET-P	57.5
209	L46-H85	CCAT	80.0	261	L19H16	EET-P	50.0
210	L46-H88	CCAT	80.0	262	L19H28	EET-P	35.0
211	L46-H90	CCAT	80.0	263	L19H30	EET-P	50.0
212	L48-H77	CCAT	53.9	264	L21H43	EET-P	80.0
213	L48-H93	CCAT	45.0	265	L22H40	EET-P	46.7
214	L49-H74	CCAT	46.2	266	L30H50	EET-P	75.7
215	L49-H84	CCAT	70.0	267	L30H61	EET-P	69.7
216	L49-H87	CCAT	50.0	268	L32H60	EET-P	61.9
217	L49-H93	CCAT	80.0	269	L34H07	EET-P	67.5
218	L49-H98	CCAT	80.0	270	L42H60	EET-P	66.7
219	L49-H100	CCAT	41.1	271	L42H65	EET-P	75.0
220	L50-H65	CCAT	35.9	272	L43H64	EET-P	67.5
221	Sa8	Rio Chone	60.0	273	L45H84	EET-P	74.4
222	Sa16	Rio Chone	10.0	274	L50H64	EET-P	52.0
223	SNA101	EET-P	66.7	275	L51H36	EET-P	52.5
224	SNA104	EET-P	47.5	276	L52H06	EET-P	55.0
225	SNA107	EET-P	41.4	277	L52H12	EET-P	55.0
226	SNA203	EET-P	35.7	278	L54H77	EET-P	45.0
227	SNA204	EET-P	57.9	279	EET-19	EET-P	76.9
228	SNA305	EET-P	35.7	280	EET-48	EET-P	75.0
229	SNA403	EET-P	40.0	281	EET-62	EET-P	75.0
230	SNA405	EET-P	50.0	282	EET-62LL	EET-P	76.9
231	SNA407	EET-P	40.0	283	EET-95	EET-P	80.0
232	SNA409	EET-P	50.0	284	EET-96	EET-P	67.5
233	SNA409a	EET-P	15.0	285	EET-103	EET-P	79.5
234	SNA412	EET-P	59.0	286	EB-01-04	Machala, El Oro	35.9
235	SNA418	EET-P	45.7	287	EB-04-01	EET-P	36.9
236	SNA423	EET-P	37.5	288	EB-04-02	Chontillal, El Oro	37.5
237	SNA425	EET-P	38.5	289	EB-05-01	Cone, Guayas	65.0
238	SNA428	EET-P	37.5	290	EB-10-10	Astudillo, Guayas	53.4
239	SNA433	EET-P	59.4	291	EB-10-11	Milagro, Guayas	54.9
240	SNA438	EET-P	77.5	292	EB-10-13	Milagro, Guayas	50.0
241	SNA503	EET-P	22.5	293	EB-12-03	El Triunfo, Guayas	37.5
242	SNA504	EET-P	37.5	294	EB-15-16	P. Viejo, Los Rios	80.0
243	SNA505	EET-P	33.4	295	EB-16-17	EET-P	35.2
244	SNA512	EET-P	48.3	296	EB-19-15	Vinces, Los Rios	42.5
245	SNA602	EET-P	60.5	297	EB-19-22	Vinces, Los Rios	55.0
246	SNA604	EET-P	15.0	298	EB-20-09	Zapotal, Los Rios	43.6
247	SNA608	EET-P	40.0	299	EB-21-02	Mcache, Los Rios	62.5
248	SNA610	EET-P	56.5	300	EB22-22	Camreta, Manabí	60.5
249	SNA613	EET-P	60.9	301	EB-22-33	Calceta, Manabí	45.0
250	SNA614	EET-P	40.7	302	EB-22-36	Canuto, Manabí	42.1
251	SNA701	EET-P	61.3	303	EB-22-37	Canuto, Manabí	42.5
252	SNA707	EET-P	45.0	304	EB-501	Cone, Guayas	42.5
253	SNA718	EET-P	40.0	305	BCH-9	Balao, Guayas	48.7
254	SNA901	EET-P	57.5	306	BCH-14	Balao, Guayas	65.8
255	SNA903	EET-P	48.6	307	FIDENCIO	Zapotal, Los Rios	50.0
256	SNA907	EET-P	47.5	308	EET-34	EET-P	67.0

Table 1. Continuation.....

N°	Name	Origin, region	%heter.
309	EET-38	EET-P	45.3
310	EET-50	EET-P	54.5
311	EET-58	EET-P	78.8
312	EET-59	EET-P	62.0
313	EET-64	EET-P	74.0
314	EET-65	EET-P	48.0
315	EET-67	EET-P	65.0
316	EET-69	EET-P	39.7
317	EET-71	EET-P	67.5
318	EET-73	EET-P	58.6

N°	Name	Origin, region	%heter.
319	EET-117	EET-P	35.0
320	Nac-2	EET-P	43.6
321	Nac-4	EET-P	53.9
322	Espe-2	EET-P	36.4
D1	B-240	Manabí, Ecu	25.0
D2	LAN-28	Mexique	0.0
D3	MAT-1-6	Costa Rica	0.0
D4	SCA-6 ®	Loreto, Peru	43.6
D5	UF-676	Costa Rica	100.0

D1 = Nacional reference (B-240)

D2 = Criollo genotype (LAN-28)

D3 = Forastero from Lower Amazon (MAT-1-6)

D5 = Trinitario genotype (UF-676)

Table 2. Summary of genetic parameters values for the 40 microsatellite loci evaluated on the cacao populations collected in the coast region from Ecuador. Allele parameters, Ne: number of allele per locus; Fa: frequency of most common allele. Genotype parameters, Ng: number of effective genotype; Fg: frequency of most common genotype). Gene diversity, He: Nei's expected heterozygosity; Ho: observed heterozygosity, and PIC: polymorphism information content.

SSRs* Locus	Allele		Genotype		Gene diversity (He)	Ho	PIC
	Ne	Fa	Ng	Fg			
mtcCIR15	6	0.5729	11	0.5186	0.5492	0.6475	0.4678
mtcCIR84	2	0.9476	3	0.9021	0.0994	0.0909	0.0945
mtcCIR275	3	0.5859	6	0.5219	0.5408	0.6768	0.4597
mtcCIR94	5	0.5530	12	0.5166	0.5780	0.7119	0.5052
mtcCIR230	4	0.5932	7	0.6122	0.4960	0.6274	0.3889
mtcCIR268	5	0.3848	12	0.2695	0.6839	0.6680	0.6245
mtcCIR100	5	0.4860	8	0.5979	0.5635	0.7343	0.4671
mtcCIR73	4	0.3639	10	0.3836	0.6887	0.7410	0.6282
mtcCIR82	4	0.9400	6	0.8867	0.1143	0.1067	0.1107
mtcCIR167	4	0.5214	7	0.6335	0.5108	0.6512	0.3925
mtcCIR175	5	0.4966	12	0.5593	0.5613	0.6678	0.4657
mtcCIR204	4	0.8704	7	0.7807	0.2287	0.1827	0.2081
mtcCIR57	3	0.5419	6	0.5940	0.5289	0.6644	0.4241
mtcCIR107	3	0.5201	6	0.4818	0.6040	0.7445	0.5306
mtcCIR32	3	0.4850	6	0.6113	0.5360	0.6545	0.4277
mtcCIR242	3	0.9521	5	0.9175	0.0922	0.0693	0.0901
mtcCIR109	5	0.4946	8	0.6304	0.5342	0.6957	0.4255
mtcCIR267	3	0.8490	4	0.7083	0.2570	0.2813	0.2248
mtcCIR265	6	0.4443	11	0.3716	0.6473	0.7500	0.5766
mtcCIR80	3	0.5261	6	0.5765	0.5450	0.6678	0.4453
mtcCIR238	4	0.5811	9	0.4570	0.5526	0.5894	0.4767
mtcCIR136	7	0.3656	17	0.2143	0.7309	0.7755	0.6839
mtcCIR291	6	0.5286	13	0.5724	0.5398	0.6397	0.4385
mtcCIR290	7	0.4785	12	0.5033	0.6192	0.6490	0.5443
mtcCIR56	5	0.7374	9	0.5863	0.3996	0.3094	0.3381
mtcCIR93	5	0.4710	12	0.4539	0.6391	0.7235	0.5716
mtcCIR110	3	0.5446	6	0.3927	0.5997	0.8152	0.5328
mtcCIR186	3	0.5524	5	0.5804	0.5037	0.5874	0.3870
mtcCIR163	3	0.5409	4	0.6548	0.4983	0.6584	0.3759
mtcCIR189	7	0.4589	15	0.3980	0.6071	0.6020	0.5280
mtcCIR225	4	0.4908	8	0.4890	0.5954	0.7096	0.5142
mtcCIR258	2	0.8221	3	0.6577	0.2924	0.3289	0.2497
mtcCIR30	3	0.5964	6	0.5179	0.5189	0.5964	0.4290
mtcCIR79	4	0.5212	9	0.3497	0.6177	0.6928	0.5519
mtcCIR157	4	0.5470	9	0.6342	0.5160	0.6678	0.4054
mtcCIR58	5	0.5033	13	0.3679	0.6435	0.7124	0.5867
mtcCIR31	3	0.8364	4	0.6909	0.2743	0.2909	0.2377
mtcCIR91	3	0.6071	4	0.5170	0.4861	0.5408	0.3790
mtcCIR220	5	0.8163	9	0.7789	0.3178	0.1020	0.2965
mtcCIR229	6	0.5447	10	0.5704	0.5416	0.6735	0.4452
Σ	169			330			
Mean	4.2256	0.5918		8.25	0.4963	0.5675	0.4232

\* More information on the mapped SSRs markers used in this study can be found in Lanaud et al. (1999), Risterucci et al. (2000) and Pugh et al. (2004).

Table 3. Summary of genetic statistics parameters measured for each population

	CCAT	EETP	Overall
<i>He</i>	0.4853	0.4805	0.4829
<i>Ho</i>	0.5922	0.5255	0.5588
P(0.95)	0.9500	0.9750	0.9625
P(0.99)	1.0000	1.0000	1.0000
Alleles/locus	3.6500	4.2000	3.9250
<i>Fis</i>	-0.2181	-0.0604	-0.1393
<i>Fit</i>	x	x	-0.1169
<i>Fst</i>	x	x	0.0369



## **Conclusions et Perspectives**

Dans ce chapitre, l'étude génétique de 322 cacaoyers échantillonnés en Équateur (Annexe1) et analysés à l'aide de 40 marqueurs moléculaires a été présentée. Les résultats montrent que les introductions successives de cacaoyers étrangers, ont généré des formes hybrides variées avec la variété native et qui constituent maintenant la population moderne de cacaoyers équatoriens.

Cette population moderne reflète les différentes sources d'allèles étrangers. Cet ensemble d'allèles, a principalement pour origine le type Criollo et le type Forastero bas amazonien (dont le Trinitario reflète les formes hybrides entre ces 2 génotypes). Ces résultats corroborent les références historiques, rapportant l'introduction continue de cacaoyers en provenance de l'île de Trinidad et du Venezuela où étaient cultivés ces Trinitario.

Une autre source d'allèles proviendrait de la Haute Amazonie, où ont été collectés les génotypes Scavina "SCA". Depuis la moitié du XXe siècle, ces génotypes sont souvent utilisés dans les programmes d'amélioration génétique, pour leur résistance à la maladie du « balai de sorcière ». Les descendance hybrides entre génotypes Nacional et haut amazonien (SCA), qui donnent de bonnes caractéristiques agronomiques, sont amplement répandues dans les plantations équatoriennes depuis les années 70. Ces événements expliqueraient la présence, en nombre important, d'allèles de type Scavina dans la collection de Pichilingue. Par ailleurs, d'autres sources d'allèles n'ont pas pu être identifiées, par comparaison aux génotypes témoins. Ces résultats laissent entrevoir une grande hétérogénéité génétique de la population analysée qui reflète aussi l'état actuel des plantations modernes de cacaoyers équatoriens.

Les résultats de ce chapitre montrent que la population analysée est majoritairement composée d'individus hybrides correspondant à des générations avancées de recombinaisons génétiques. Malgré ce *pool* globalement hybride, il a été possible de détecter un nombre réduit d'individus plus homozygotes et qui montrent une grande similarité génétique avec le génotype utilisé comme Nacional de référence. Dans toutes les analyses réalisées, ces mêmes individus forment un groupe homogène. Une caractéristique importante de ce groupe d'individus plus homozygotes est la quantité élevée d'allèles communs très spécifiques au groupe Nacional, et le plus faible niveau d'introggression par les représentants des autres groupes analysés (Trinitario).

Une étude de paternité nous a révélé que ces individus hautement homozygotes représentent très probablement les ancêtres natifs de toute la population moderne et hybride des cacaoyers équatoriens, et qu'ils représentent donc probablement la variété Nacional qui était cultivée le long du littoral avant l'introduction de cacaoyers étrangers.

La recherche de paternité nous a permis de révéler la structure de cette population moderne, constituée pour une petite partie de croisements entre des individus ressemblants au type Nacional, et majoritairement par un complexe génétique de générations avancées de recroisements. Cette variabilité génétique sera particulièrement utile pour réaliser des études d'associations génétiques permettant de mieux connaître les bases génétiques des caractères d'intérêt.

L'importante similarité génétique qui existe entre les individus représentant probablement la variété Nacional native, malgré leur collecte dans des points d'échantillonnage très distants, invite à penser qu'ils pourraient avoir une origine génétique et géographique commune. Pour répondre à cette question, et essayer de retrouver l'origine de cette variété Nacional, une deuxième phase d'étude est présentée dans le chapitre suivant.

## CHAPITRE III

# ORIGINE DE LA DOMESTICATION DE LA VARIÉTÉ DE CACAOYER « NACIONAL » ET RECHERCHE DE SES ANCÊTRES SAUVAGES





### **CHAPITRE III.**

## **ORIGINE DE LA DOMESTICATION DE LA VARIÉTÉ DU CACAOYER « NACIONAL » ET RECHERCHE DE SES ANCETRES SAUVAGES**

L'étude réalisée dans le chapitre précédent, a révélé une forte similarité génétique entre des individus hautement homozygotes échantillonnés en différents points géographiques du littoral équatorien. Ces individus ont été identifiés comme représentants de la variété native de cacaoyer Nacional. Malgré plusieurs hypothèses sur l'origine de cette variété, aucune d'entre elles n'a été validée jusqu'à présent.

Ce chapitre propose d'étudier les relations génétiques qui existent entre les individus représentant la variété native Nacional et les populations sauvages des régions amazoniennes avoisinantes. Ce travail de recherche a pu être réalisé grâce aux prospections de cacaoyers sauvages réalisées lors de plusieurs expéditions dans l'Amazonie, d'Équateur, de Pérou, de Venezuela, de Guyane et dans la forêt Mexicaine au cours des dernières décennies.

L'objectif principal de cette étude est d'identifier le centre d'origine génétique et géographique potentiel de la variété native Nacional. Les informations génétiques ajoutées à celles de données historiques et archéologiques, devraient permettre d'expliquer les circonstances les plus probables de la domestication et de la migration de cette variété dans les zones côtières de l'Équateur. Les résultats de cette étude sont présentés dans l'article suivant.

Insight about the wild origin, migration and domestication events of the fine flavour Nacional *Theobroma cacao* L. variety from Ecuador

LOOR R.G., LEMAINQUE, A., FOUET O., PAVEK S., ARGOUT X., WINCKER P., RISTERUCCI A.M., BOCCARA M., AMORES F., COURTOIS B. LANAUD C.

#### **ABSTRACT**

The Ecuador's economic history has been strongly linked to the *Theobroma cacao* L culture, specifically to a native variety known as "Nacional". Due to foreign germplasm introductions the original Nacional cacao trees are presently considered in danger of extinction. In a previous work, a few non-introgressed "Nacional" types were identified as potential founders of the modern Ecuadorian cacao population, but up to now, their origin could not be formally identified. We used 80 microsatellite markers to analyse the relationships between these potential Nacional founders and 13 cocoa groups representing a wide range of wild and cultivated genotypes from South and Central America. The main objectives were to identify the putative centre of origin of Nacional and its wild potential ancestors; and, to trace the domestication history of Nacional cocoa variety.

A high genetic similarity was observed between the Nacional pool and some wild genotypes from the south Amazonian region of Ecuador; this result was confirmed by the proportion of shared alleles and a parentage analysis. The wild genotypes that showed the highest parentage relationships with the Nacional pool were sampled along the Yacuambi, Nangaritza and Zamora in the Province of Zamora Chinchipe.

Based on our results, and on data about pre-Columbian civilization and Spanish colonization history of Ecuador, we traced for the first time the possible centre of origin and migration events of Nacional variety, since the Amazonian area until its arrival to the Coast Provinces. Such anthropological data associated to molecular genetic data on cocoa origins and domestication suggests that the Valdivias, the oldest culture in America, known for its important trade activities through Ecuador regions and until Meso-America, could have spear-headed cocoa domestication not only in South America, but also in Central America where cocoa took an important and strategic place in further mesoamerindian cultures.

The results of this paper could guide us towards precious genetic resources suitable to enlarge the genetic diversity necessary to improve both the flavour and disease resistance in modern Ecuadorian cacao varieties. Large unexplored forest areas still exist at south of Ecuadorian Amazonian region, and must be considered for new cacao collections.

Insight about the wild origin, migration and domestication events of the fine flavour Nacional *Theobroma cacao* L. variety from Ecuador

### **Introduction:**

*Theobroma cacao* L. is the most important economic species of the *Theobroma* genus, with a particularly long history in Ecuador. The cacao cultivation in this country is very ancient and dates back to the pre-Columbian age, before the colonization of its territory by the Spanish. This was evidenced by Pizarro during his first travel in 1526 on the South American coasts that nowadays are Ecuador, finding small plantations of an apparently native cacao (Stevenson 1829; Prescott 1847). Admittedly, the population of Ecuadorian cacao named Nacional must have existed for several centuries prior to the arrival of the Europeans (Bartley, 2005), but its origin in the Ecuadorian littoral has never been known. Two hypotheses have been advanced: according to Allen and Lass (1983) the Nacional cacao variety could have originated from a local wild population, that has nowadays completely disappeared together with the original forest cover of the region; according to Pound (1938), Soria (1970) and Vera (1987) the Nacional could have been introduced to the coast from the Amazonian area of Ecuador where wild cacao is common. There is no evidence that *T. cacao* and its product played any part in the lives of the inhabitants of the Ecuadorian coast during the Chorrera phase of the pre-Columbian Valdivia culture (2000BC), in contrast to extensive information of such use for the Meso American people, most notably the Mayas and Aztecas. In Ecuador, the available information, related to the history of Nacional cacao cultivation, is associated to the Spanish colonization history in this country.

Since the moment when the first Spanish colonists initiated the deforestation of the Ecuadorian coast region, a large number of native cocoa trees have been reported (Crawford 1980, Allen and Lass 1983) principally along the Guayas basin. Apparently, these colonists began to sow seeds of these native trees approximately 100 years after the discovery of America, and when the native meso-American populations started to decline. The cacao cultivated areas expanded, and rapidly the native Nacional variety became worldwide known due to a strong floral aroma called “ARRIBA”, exclusively produced by its cocoa beans. From the beginning, the quality produced by the Nacional cocoa beans has been highly appreciated by chocolate manufacturers to make fine flavour chocolates.

The native “Nacional” variety was the only one planted in Ecuador until the early 1890s, when foreign germplasm began to be introduced in this country. In 1890, due to the quality traits of the Nacional cocoa beans, Ecuador had a privileged position in the markets of Hamburg and London (Preuss, 1901). From 1910’s, foreign germplasm introductions progressively increased due to the appearance of two fungus diseases known as witches’ broom (*Moniliophthora perniciosa*) and frosty pod (*Moniliophthora roreri*) that together devastated the native plantations.

Presently, a large genetic admixture between the native variety and foreign germplasm can be observed within the modern Ecuadorian cacao plantations (Loor *et al*, submitted - 1). The fine flavour cocoa aroma has decreased in this hybrid complex. However, reports of the International Cocoa Organization (ICCO) indicate, that until now, Ecuador continues being the main supplier of the fine flavour cocoa in the world. Its production in the year 2006 reached 60% of the offer in this special quality market (ICCO, 2006). This situation brings a competitive advantage for Ecuador in the international market of the fine flavour cocoa, where the prices for quality are superior to those from the current cocoa. There is nowadays an increasing demand of fine flavour cocoa, which presently, does not exceed 5 % of the world cocoa production.

In a previous work (Loor *et al*, submitted -1) a few non-introgressed “Nacional” types were identified within this hybrid population as potential representatives of the native Nacional variety. Until now, however, the origin of this Nacional variety could not be formally identified. In this paper, we analyze the relationships between the non introgressed Nacional genotypes identified in Loor *et al* (submitted-1) and a wide range of wild cocoa genotypes covering an extensive geographical spectrum from upper and lower Amazonian regions (Pound 1938, 1945; Allen and Lass 1983; Lachenaud and Salle 1993; Lachenaud *et al* 1997): a) to identify Nacional putative centre of origin and wild potential ancestors, and b) to trace the domestication history of Nacional cacao variety. Representative individuals of the native Criollo (Motamayor, 2001), first domesticated variety in Central America by meso Amerindian population, were also included in this work to analyse their relationship with the wild Amazonian cocoa population.



## **Materials and methods**

### **Plant material**

A total of 176 individuals representing 14 cocoa groups were used for SSR analyses in this work (Table 1):

- Seven cacao individuals identified as putative Nacional cacao variety cultivated along the Ecuadorian coast region (Loor *et al*, submitted 1).
- Sixty-five wild genotypes collected by Allen and Lass (1983) at north, centre and south from the upper Amazonian region of Ecuador (Figure 1)
- Sixty-six wild genotypes collected by Pound (1938, 1945) in the upper Amazonian region of Peru (Figure 1)
- Eleven wild cacao samples collected by Lachenaud and Sallée (1993) in the lower Amazonian area from Guyana.
- Three cultivated cacao genotypes from lower Amazonian region of Brazil.
- Twenty-four Criollo variety samples collected by Motamayor (2001) in Central America from Venezuela to Mexico were also used in this study.

The non Ecuadorian cacao samples were selected from genebanks located at Cacao Research Unit (CRU) in Trinidad; and, Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD) in Montpellier, France. The wild cacao accessions from Ecuador were selected from the CRU living collection on the basis of the geographical area sampled by Allen and Lass (1983) along of the Amazonian Provinces (Figure 1). The Nacional genotypes were selected from the living collection bank located at EET-Pichilingue (Ecuador).

### **Molecular markers**

Eighty SSR markers isolated from EST and recently mapped were chosen for these analyses. They are widespread in all the 10 cocoa chromosomes (Table2)

### **DNA isolation and PCR amplification**

DNA samples were isolated from each individual as described by Risterucci *et al* (2000). Eighty microsatellite markers were used for the analysis (Table 2). Forward or reverse primers were labeled at the 5' terminus with a fluorescent dye (Fam, Hex or Dragonfly Orange™). Simplex PCR assays with fluorescently labelled primer pairs were carried out in 10 µl reactions by using one of 2 standard PCR protocols. Briefly, the quantity of each component used in the PCR reaction have been 3,3 pmole of each primer, 25 nmoles of MgCl<sub>2</sub>, 2.5 nmoles of each nucleotide, and 0,225 unit of Taq Polymerase (BioTaq™, Bioline). PCR preparation and pooling steps were set up with a robot pipetting station.

The fluorescent PCR products were then analyzed on MegaBACE™ 1000 Sequencer (Amersham Biosciences). The internal size standard is fluorescently labelled with a fourth dye (ET-ROX™ 400, Amersham Biosciences). The raw data were then analysed by using Genetic Profiler software (version 1.1). PCR conditions were: 95°C for 12min, followed by 10 cycles of 94°C for 15 sec, 50°C for 15 sec, and 72°C for 30 sec; this was completed with 20 cycles of 89°C for 15 sec, 50°C for 15 sec, and 72°C for 30 sec. Finished with 10 min at 72°C.

### **Statistical analysis**

Amplified SSR fragments were scored as alleles. The following genetic parameters were calculated using Power Marker (Liu and Muse 2005) and Genetix (Belkhir *et al.* 2004) software: allele frequencies, expected and observed heterozygosity; and, proportion of polymorphic loci.

In a first approach, a Principal Coordinates Analysis (PCoA) was carried out to assess the pattern of the genetic diversity among groups. The first two axes of the PCoA plot allowed to visualise the relationships among cacao samples. In a subsequent analysis, a dendrogram was constructed using a dissimilarity index (simple matching) and the neighbour-joining (NJ) method. Both, principal coordinate's analysis (PCoA) and neighbour-joining (NJ) cluster analysis were carried out using Darwin software-5.0 (Perrier *et al.*, 2003).

In addition, analysis of genetic distance among pairs of populations (Nei, 1972) and proportion of shared alleles were carried out to determine the genetic similarity between the Nacional pool and the wild and cultivated genotypes. Finally, a paternity analysis was performed using CERVUS software, version 2.0 (Marshall *et al.*, 1998) to identify the most likely ancestral population of the Nacional variety. An 80% confidence threshold was used for paternity assignment.

## **Results**

### ***Patterns of genetic diversity among cocoa accessions.***

A total of 463 alleles were detected at the 80 analysed SSR loci across all 176 individuals sampled (Table 2). A wide range of allele number was generally observed for each locus (from 2 to 15), with an average of 5.78 alleles per locus. In each group, genetic diversity parameters were evaluated. As shown in Table 3, the mean number of observed alleles per locus and per genetic group corresponding to wild accessions ranged from 1.33 (Guy) to 4.45 (LCT-EENa). The most polymorphic wild cocoa accessions were generally found in the north Amazonian region of Ecuador (data not shown).

The Principal Coordinates Analysis (PCoA) produced a two dimensional representation of the genetic relationships between the cacao samples. The first two axes of the PCoA, based on SSR data, accounted for 42.7% of the total variation (Figure 2). As shown in Figure 2, the cacao samples could be separated in three different groups: (i) the representatives of Criollo forming a very compact and isolated group, placed in an extreme position in the upper left corner side of the PCoA plot; (ii) a second cluster formed with the majority of Peruvian accessions on the right quadrants. This second group includes also some accessions from the Upper Amazonian region of Ecuador (LCT-EEN) and all accessions from Lower Amazonian and Orinoco regions (Venezuela, Brazil and Guyana). A last cluster (iii) placed in the left side of the first axis contained the majority of the wild accessions from Ecuador and some wild accessions from Peru (SCAs and Morona river). The representative individuals of the native Nacional variety were also found within this last cluster. Some accessions from the South Amazonian region of Ecuador (LCT-EENc) were found very close to the Nacional pool.

In a subsequent analysis, a neighbour-joining tree (Figure 3a) calculated from simple matching allelic dissimilarity index, clustered the majority of cacao samples according to their geographical origins. Three main clusters could be observed in this analysis (Figure 3a):

- Cluster n°1 is divided into 2 subgroups : one sub group (1a) includes most of the accessions collected in the North and Centre of Amazonian regions from Ecuador; the other subgroup (1b) includes all Criollo accessions.

- Cluster n°2 included most of Peruvian accessions. It is also divided into 2 sub groups: One subgroup (2b) pooled the Scavina accessions; the other group (2a) gathered the remaining Peruvian accessions with wild accessions from French Guyana and Venezuela, and cultivated Lower Amazon Forastero samples from Brazil.
- Cluster n°3 in Figure 3a (amplified in Figure 3b), included the Nacional cocoa accessions, the wild cocoa genotypes from the southern part of Ecuadorian Amazonia and the wild cocoa accessions from Peru collected along the Morona river.

The NJ tree (Figure 3a) confirmed the pattern of relationship previously observed in Figure 2 between the Nacional pool and the wild cocoa genotypes (LCT-EEN) sampled in the Amazonian region C from Ecuador. The accessions sampled in Peru, along the Morona river were also genetically close to the Nacional. The Morona river region is geographically close to region C of Ecuadorian Amazonia. Compared to the genetic diversity revealed by Peruvian populations, a widest genetic diversity was found in the LCT-EEN accessions from Ecuador (Figure 2 and 3).

#### ***Genetic distance between the native Nacional genotypes and wild populations present in the Amazonian regions***

To refine the previous analysis, coefficients of genetic distance were calculated for pair-wise comparisons of the 14 cocoa groups (Nei 1972). A matrix of genetic distance values for all groups is presented in Table 4. The highest genetic distance (2.445) was obtained between the Criollo and Lower Amazon group from Brazil (BA), while the most similar populations were LCT-EENa and LCT-EENb with a genetic distance of 0.039. In the case of the Nacional pool, the lowest genetic distance was evidenced with the groups from LCT-EENc region (0.250) and Morona (0.307).

Subsequent analyses of genetic distance was carried out to identify the genetic distances between the Nacional pool and wild cacaos collected along the neighbouring rivers within each Amazonian region of Ecuador (a, b, c) including also all accessions collected in the upper Amazonian region from Peru (data not shown). This new approach allowed to identify a few LCT-EENc samples collected along the adjacent rivers (Nangaritza, Yacuambi and Zamora) as the wild cocoa trees genetically closer to the Nacional pool cultivated in the coast region. An important characteristic of the wild cocoa trees from these adjacent rivers is their

low level of heterozygosity. Amazonian region C is geographically close to Guayas basin (Figure 1) where the first Nacional cocoa plantations were established.

### ***Potential wild ancestors of the Nacional variety***

The genetic similarity between Nacional individuals and the wild genotypes from Amazonian region was analysed on the basis of proportion of shared alleles and parentage relationship (Table 4). Our results indicated that the wild genotypes coded as LCT-EEN85, LCT-EEN86 and LCT-EEN91 had the strongest parentage relationship with the Nacional variety pool from coast region, suggesting that the individuals representing the native Nacional pool most probably descended from wild cacaos adjacent to rivers Nangaritza, Yacuambi at south of Amazonian region “C”. Thus a clear consistency with our previous results has been obtained. These three LCT-EENc samples could be representatives of the putative wild cacao population at the origin of the Nacional variety pool.

### **Discussion-Conclusion**

In the course of cacao cultivation history in Ecuador, substantial genetic changes, including reproductive behaviour, have occurred as a consequence of foreign germplasm introduction and genetic admixture, associated to natural and human selection. The first study of genetic diversity of modern Ecuadorian cacao accessions was undertaken by Lerceteau *et al* (1997); however, studies aiming at identifying the origin of Nacional cocoa variety and assessment its genetic relationships with wild cocoa trees from Amazonian regions have not been conducted up to now. Patterns of domestication, colonization or geographical distribution, have been reported in many other crop species (White *et al.* 1999; Gaudeul *et al.* 2000; Vijverberg *et al.* 2000; Juan *et al.* 2004). In *T. cacao* Motamayor *et al.* (2002) studied the domestication of Criollo, a cocoa variety originally cultivated by the Mayas in Central America, and concluded at a very narrow genetic basis of the ‘ancient’ Criollo cultivated in Central America before cocoa foreign introductions during the 18<sup>th</sup> century.

In this study, we used molecular markers to try to identify the wild genetic origin and elucidate the domestication events at the origin of the first Nacional plantations established in Ecuador in the Guayas Basin. The Amazonian area from South America was considered as a

potential source of wild material from which the Nacional cocoa population cultivated in the Ecuadorian littoral could have derived.

In this study, the diversity of wild accessions is divided into 3 main groups structured according to their geographic origins.

- One of the groups includes accessions from the north and the central region of Ecuadorian Amazonia. The cultivated Criollo accessions are also included in this group in spite of a high level of differentiation with the other members of this group. All Criollo accessions collected from Mexico to Venezuela clustered together in a very compact group, reflecting its narrow genetic base. In a previous study, Motamayor et al (2002) identified some accessions from Colombia (EBC) as the closest accessions to Criollo. Colombia has been suggested as the centre of origin of Criollo. In our study, we did not have access to Colombian accessions, nevertheless, the genetic similarity observed between Criollo and accessions from the north Amazonian region of Ecuador show the same geographic trend than the results obtained by Motamayor et al. (2002).

- Another group includes some accessions from Ecuador and most of wild Peruvian accessions, mainly those collected in the northern region of Peru, associated to wild accessions collected in French Guyana and in the Orinoco region of Venezuela. The cultivated genotypes from Lower Amazonia in Brazil are also included in the group.

The Upper Amazon region has always been considered as the primary centre of origin and diversity of *T. cacao* L. species. The high genetic similarity observed between some wild cocoa accessions from upper Amazonian region (Parinari or Pound) and the group from Guyana, suggest that during *T. cacao* evolution, the extension of cocoa populations towards the eastern part of South America could have started from these upper Amazonian regions.

- Another group includes most of the accessions of the south Amazonian region of Ecuador, the accessions collected in Peru along the Morona river, close to this south Ecuadorian region, and the Nacional accessions. In this group, a high genetic relationship was found among some wild accessions from Region C and the Nacional pool from the coast region. These results are supported by the evaluation of genetic distance, the proportion of shared alleles, as well as, by a parentage analysis. From our results, we hypothesize that the Amazonian region located in the Province of Zamora Chinchipe could be the centre of origin of the first Nacional cacao plantation observed on the Guayas river banks. Later, from this last place, the expansion of the cacao cultivation along Guayas tributary rivers (upper waters), could have been initiated,

materializing nowadays the producing zone known as “ARRIBA” among the Province of Guayas, Los Ríos and Manabí (Figure 1).

This hypothesis of migration and domestication event is supported by the geographical proximity between the first cocoa plantation established in the Guayas river banks (Preuss, 1901) and the wild cacao collected along of the Nangaritza, Yacuambi and Zamora rivers banks, in the Province of Zamora Chinchipe (Figure 1, region C). The morphological similarity that exists between the Nacional variety and the native populations of the Ecuadorian jungle (fruit and seed) close to the Amazonian cities of Archidona and Macas in the region C, and already observed by Vera (1993) reinforces also this hypothesis.

Most of the representatives of the native Nacional variety have a high level of homozygosity probably associated to their self compatibility (Quiroz, 1990, Pastorelly, 1992; Loor, 1998). The question raised is whether the domestication process has fixed and selected by selfing the highly homozygous genotypes, or whether a natural selection, leading to an increased homozygosity level, was already effective in wild populations before this domestication event. A common feature of domestication is the reduction of genetic diversity in crops relative to wild progenitors. The severity of genetic loss ascribed to bottleneck effects varies greatly among crop species. Tanksley and McCouch (1997) indicated that this reduction resulted from two major forces. First, most domestication events are thought to have involved initial populations of small size (relative to wild ancestors) that contained a narrow levels of genetic diversity. The second factor to have an impact on crop genomes is the selection for the agronomic traits that distinguish crops from their ancestors. A selective pressure on the ancestral gene pool is generally excited by men to select for favourable traits, increasing or fixing the favourable alleles at genes controlling these traits.

In this work, highly homozygous wild genotypes were identified in each region sampled. This last result suggests that self compatible alleles already existed in these wild populations and that natural selection could have already eliminated a part of the genetic burden due to inbreeding, facilitating, by this way, the domestication process from some wild populations.

The particular characteristics of some cacao varieties could have helped the selection and migration of specific cacao materials. From this point of view, the specific aromatic flavour of cocoa beans from the Nacional, detectable on bean pulp, even without a fermentation step,

could have been one of the criteria used by this primitive population to choose the cocoa mother tree for further seed sowing. Indeed, it is possible that the ambulatory merchants transporting cacao pods along the routes, used the fresh pulp only for their own refreshment and alimentation without consuming the cacao beans, and thus, introducing the cacao tree into a new environment (Stone, 1984). An extensive study of flavour aroma of wild cacao genotypes associated to an evolutionary analysis of this trait variation could help to identify candidate genes responsible of flavour in the aromatic Nacional variety.

Many crop species have been domesticated for thousands of years. In cocoa, only one variety (Criollo) is known to have been domesticated for a long time (more than 2000 years) by Maya populations in Central America (Hurst *et al* 2002). Cocoa domestication seems much more recent in most of the other cultivating countries, even if wild cocoa populations exist in their areas. In the case of Ecuador, information about the domestication of its cocoa native plantations dates back for only four centuries.

Before to first cacao plantations planted by the Spanish in the Ecuadorian coast, no evidence existed of human dispersal of this species; therefore, the knowledge of the dispersal mechanism implicated in the long-distance migration process is important to explain our results. There are several hypotheses trying to explain the cocoa migration such as: the transport of fruits or seeds by birds, animals or men, but until now none of them has been formally demonstrated. Vera (1987) suggested that the Nacional cocoa variety was introduced by the old Incas ways and planted by the native people of this time in the coast regions. However, archaeological evidences suggest that these old routes were not built by the Incas but existed a long time before. These ways were already established by the pre-Columbian native people, who inhabited the Coast, Andes and Amazonian regions of Ecuador (Salazar, 1995) thousands of years before the arrival of the Incas to Ecuadorian territories. In the pre-Columbian time, trade, swap or exchange of plant material between adjacent cultures could occur using these rudimentary ways.

Unfortunately, contrary to Maya population who used hieroglyphs and represented cacao, the more primitive people that inhabited Ecuador, did not use writing symbols, limiting by this way, the available proofs about cacao domestication and use before Spanish arrival. However, archaeological evidences about contacts and exchanges of products between pre-Columbian peoples from coast, sierra and Amazonia of Ecuador, dating back 2000 years B.C. (Ayala,



1983) could provide new explanations on the origin of cocoa trees in the Ecuadorian Littoral. The archaeological evidences showed that these exchanges went as far as a place presently known as “La Cueva de los Tayos” located in the province of Morona Santiago, region C, where the ancestors of the Nacional variety were identified.

In addition, there are archaeological evidences showing an interoceanic trade developed by the pre-Columbian civilizations that inhabited along the coast region of Ecuador, especially “the Valdivias” carrying trade exchanges until places as far as Mesoamerica, approximately 2000 years BC (Borhegyi, 1961; Becker-Donner, 1966). These pre-Columbian contacts could help to explain the migration of cacao from its center of origin in the Amazon region to countries as far as Mexico or Guatemala in Central America, hundreds of years before the first pre-Columbian meso-american people (Olmeques, Tolteques). Such a plant migration from the Ecuadorian coast to Meso America has already been suggested by Stone (1984) for other crops, like yuca (*Manihot esculenta* C.). There are a number of sites in South America that have yielded ample evidence of use of yuca by 2000 years B.C. (Reichel-Dolmatoff and Dussan de Reichel, 1956).

In fact, yucca has been an integral part of the culture of south Amazonian peoples from Ecuador, not only as a staple of diet but as a stimulant in the form of beer or “chicha”, being this plant also closely associated with magic and religion. Pottery vessels used for the “chicha” preparation have been also found in Chiapas, Mexico, dating around 1500 B.C., and their forms are closely associated with Ecuadorian ceramic (Green and Lowe, 1967). It is held that sea-going traders from the southern continent could be the responsible of many other precolombian plant migrations (Stone, 1984) as a result of long-range pre-Columbian commerce.

The Valdivia communities, the oldest culture known in Americas, were established along all the Pacific coast of Ecuador and used to have exchange with Amazonian regions up to North of Ecuador and South of Columbia (Ford, 1969; Staller, 2002). The closer similarity between Criollo and the wild cocoa population originated from these regions suggest that the Valdivias, probably already familiar with cocoa trees, could have spear-headed cocoa domestication not only in South America, but also in Central America where cocoa took an important and strategic place in further mesoamerindian cultures.

From our results, future cacao expeditions should be supported to investigate the south Amazonian area from Ecuador as the putative centre of origin of the Nacional variety and to

collect new genetic resources with the same Nacional flavour specificities, suitable for fine flavour cocoa improvement in Ecuador.

### **Acknowledgments**

We are grateful to the United States Department of State (U.S. Foreign Ministry), the U.S. Embassy, Quito; and the U.S. Department of Agriculture (USDA-ARS), for the financial support of this research. To the Centre de Coopération Internationale en recherche agronomique pour le développement (CIRAD), France. To The Cocoa Research Unit (CRU) for provide the genetic material from international cacao collection at Trinidad; and, the Agricultural Research Center of Ecuador (INIAP) for their financial and technical support; and, the Centre National de Genotypage (CNG), Paris, France, for assistance with sequencing.

## References

- Allen BJ, Lass AR (1983). London cocoa trade Amazon project. Final report phase 1. Cocoa Growers' Bulletin 34:1-72.
- Ayala ME (1983). Nueva historia del Ecuador. Editorial Grijalbo Ecuatoriana.
- Bartley BGD (2005). The genetic diversity of cacao and its utilization. CABI Publishing, London, UK.
- Becker-Donner (1966). Algunos nuevos hallazgos arqueológicos de las culturas costeñas del Ecuador y sus posibles paralelos con México y América Central. *In* : 36 Congreso Internacional de Americanistas, España.
- Belkhir K, Borsa P, Chikhi L, Raufaste N, Bonhomme F (2004). GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations, Laboratoire Génome, Populations, Interactions; CNRS UMR 5000; Université Montpellier II, Montpellier (France).
- Borhegyi S F (1961). Pre-Columbian cultural connections between Mesoamerica and Ecuador. Middle American Research Institute. New Orleans. Vol II. 18 : 143-156.
- Crawford LR (1980). El Ecuador en la época cacaotera. Respuestas locales al auge y colapso en el ciclo monoexportador. Editorial universitaria. Universidad Central del Ecuador.
- Ford JA (1969). A comparison of formative cultures in the Americas. *In*: Contribution to Anthropology 11. Smithsonian Institution, Washington D. C.
- Gaudeul M, Taberlet P, Till-Bottraud I (2000). Genetic diversity in an endangered alpine plant, *Eryngium alpinum* L. (*Apiaceae*), inferred from amplified fragment length polymorphism markers. *Molecular Ecology* 9, 1625-1637.
- Green DF and Lowe GW (1967). Altamira and Padre Piedra, Early Preclassic Sites in Chiapas, Mexico. *New Archaeological Foundation* 20:56-57.
- Hurst WJ, Tarka SM, Powis TG, Valdez F and Hester RT (2002). Archaeology: cacao usage by the earliest Maya civilization. *Nature* 418 : 289-290.
- International Cocoa Organization (2006). ICCO Quarterly Bulletin of Cocoa Statistics, Vol. XXXIII, No.1, Cocoa year 2006/07.
- Juan A, Crespo BM, Cowan SR, Lexer C, Fay FM (2004). Patterns of variability and gene flow in *Medicago citrine*, an endangered endemic of islands in the western Mediterranean, as revealed by amplified fragment length polymorphism (AFLP). *Molecular Ecology* 13:2679-2690.

- Lachenaud P and Sallée B (1993). Les cacaoyers spontanés de Guyane. Localisation, écologie et morphologie. *Café cacao thé* (Paris), 37, n°2: 101-114.
- Lachenaud P, Mooleedhar V, Caouturier C (1997). Les cacaoyers spontanés de Guyane : Nouvelles prospections. *Plantations, Recherche, Développement* 4 : 25-32.
- Lerceteau E, Flipo S, Pétiard V, Crouzillat D (1997). Genetic differentiation among Ecuadorian *Theobroma cacao* L. accessions using molecular and morphological analyses. *Euphytica* 95: 77-87.
- Liu K and Muse VS (2005). Power Marker: Integrated analysis environment for genetic marker data. *Bioinformatics* 21 : 2128-2129.
- Loor RG (1998). Obtención de híbridos de cacao tipo Nacional provenientes de materiales de alta productividad y resistentes a enfermedades. Tesis de Ingeniero Agrónomo. Universidad Técnica de Manabí, Portoviejo, Ecuador. 67p.
- Loor RG, Risterucci AM, Courtois B, Fouet O, Jeanneau M, Rosenquist E, Amores F, Vasco A, Medina M, Lanaud C (2007). Tracing the native ancestors of the modern *Theobroma cacao* L. population in Ecuador (submitted to *Tree Genetics & Genomes*).
- Marshall TC, Slate J, Kruuk LEB, Pemberton JM (1998) Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology*, 7 : 639-655.
- Motamayor JC (2001). Etude de la diversité génétique et de la domestication des cacaoyers du groupe Criollo (*Theobroma cacao* L.) à l'aide de marqueurs moléculaires. Thèse de doctorat, Université Paris XI, Orsay, France, 176p.
- Motamayor JC, Risterucci AM, Lopez PA, Ortiz CF, Moreno A, Lanaud C (2002). Cacao domestication I: the origin of the cacao cultivated by the Mayas. *Heredity* 89: 380-386.
- Nei M (1972). Genetic distance between populations. *Am. Nat.* 106: 283-292.
- Pastorelly RD (1992). Evaluación de algunas características del cacao tipo Nacional, en la zona de Tenguel. Tesis Ing. Agr. Universidad Agraria del Ecuador. Guayaquil, Ecuador. P7.
- Perrier X, Flori A, Bonnot F (2003). Data analysis methods. In: Hamon P, Seguin M, Perrier X, Glaszmann JC. Ed., Genetic diversity of cultivated tropical plants. Enfield, Science Publishers. Montpellier, France pp 43 - 76.
- Pound FJ (1938). Cacao and witchbroom disease (*Marasmius perniciosus*) of South America. In: H Toxopeus (ed.) Reprint Archives of cocoa research Vol 1 Amer Cacao Res. Institute.

- Pound FJ (1945). A note about the cacao populations of South America. Report and Proceedings Cocoa Research Conference, London. Colonial 192 : 95-7. (Reprinted 1982 in *Arch. Cocoa Res* 1: 93-97).
- Prescott WH (1847). History of the conquest of Peru with a preliminary view of the civilization of Incas. London.
- Preuss P (1901). Expedition nach Central- und Sudamerika 1899/1900. Kolonial-Wirtschaftlichen Komitees, Berlin, 374 pp.
- Quiroz J (1990) Estudio de la compatibilidad en algunos cultivares de cacao (*Theobroma cacao* L.). Tesis de Ing. Agr. Universidad Técnica de Babahoyo. Babahoyo, Ecuador. 30p
- Reichel-Dolmatoff and Dussan de Reichel A (1956). Momil: Excavaciones en el Sinú". *Revista Colombiana de Antropología* 5:111-333.
- Risterucci AM, Grivet L, N'Goran JAK, Pieretti I, Flament MH, Lanaud C (2000). A high-density linkage map of *Theobroma cacao* L. *Theoretical and Applied Genetics* 101: pp 948 – 955.
- Salazar E (1995). El Ecuador aborigen, Quito, Corporación Editora Nacional.
- Soria JV (1970). Principal varieties of cocoa cultivated in tropical America. *Cocoa Growers' Bulletin* 19:12-21.
- Staller JE (2002). A multidisciplinary approach to understanding the initial appearance of maize into coastal Ecuador. *Journal of Archaeological Science* 29 : 33-50.
- Stevenson WB (1829). Historical and descriptive narrative of twenty year's residence in South America. Vol II Londres.
- Stone D (1984). Pre-Columbian migration of *Theobroma cacao* Linnaeus and *Manihot esculenta* Crantz from Northern South America into Mesoamerica: a partial hypothetical view. Cambridge, MA, Harvard University Press. Pp.67-79, 81-83.
- Tanksley SD and McCouch SR (1997). Seed banks and molecular maps: unlocking genetic potential from the wild. *Science* 277: 1063-1066.
- Vera BJ (1987) Antecedentes históricos. Manual del cultivo de cacao. INIAP, EET-Pichilingue. Quevedo, Ecuador, pp: 6-9.
- Vera BJ (1993). Botánica del cacao. Manual del cultivo de cacao 2da edición. INIAP, EET-Pichilingue. Quevedo, Ecuador, pp: 10-15.
- Vijverberg K, Kuperus P, Breeuwer JAJ, Bachmann K (2000). Incipient adaptive radiation of New Zealand and Australian *Microseris* (Asteraceae), an amplified fragment length polymorphism (AFLP) study. *Journal of Evolutionary Biology* 13:997-1008.

White GM, Boshier DH, Powell W (1999). Genetic variation within a fragmented population of *Swietenia humilis* Zucc. *Molecular Ecology* 8: 1899-1909.

FIGURES

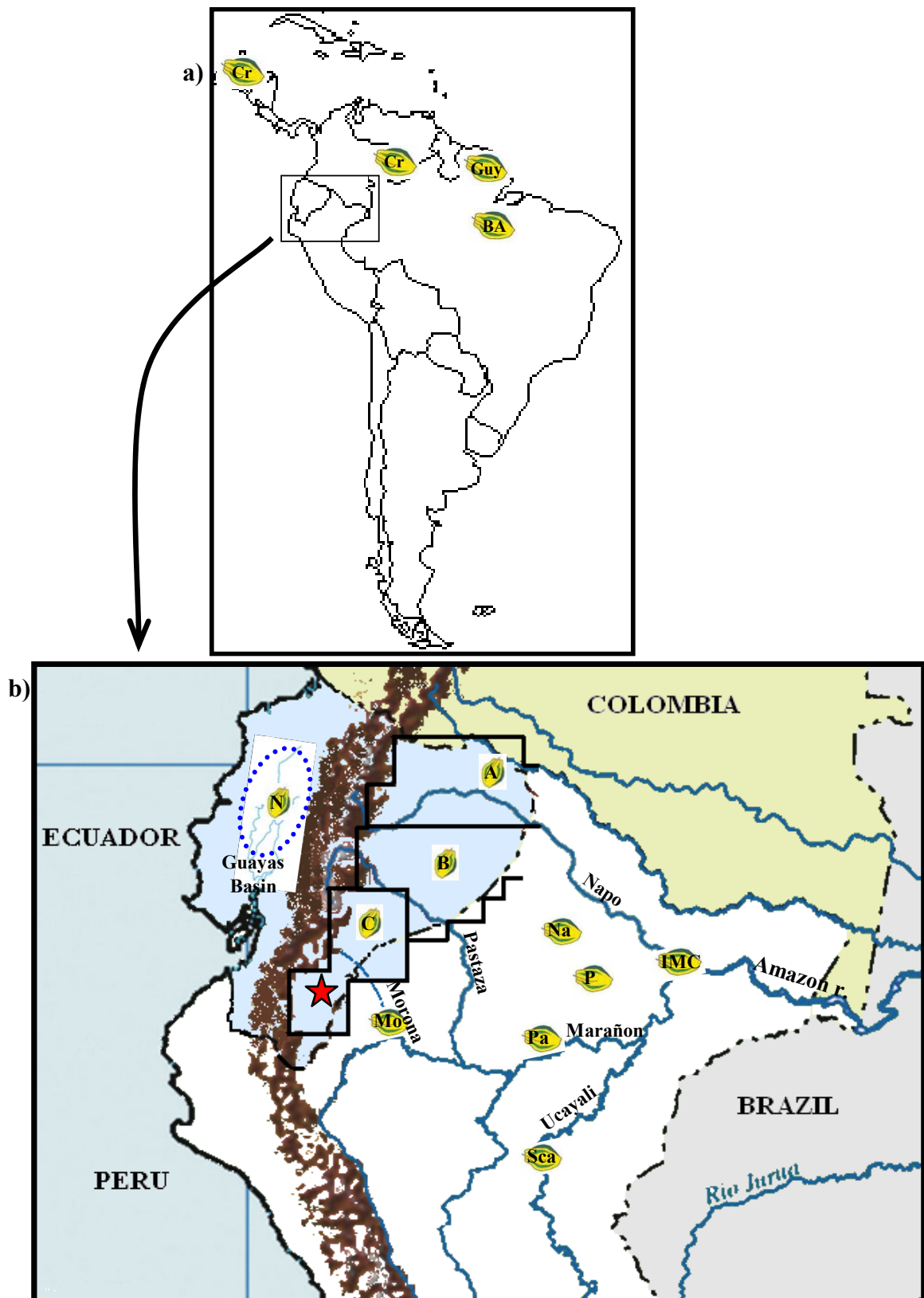


Figure 1. Geographic distribution and localization of the 14 cocoa groups used in this study. (a) Central and South America; and (b) Ecuadorian coast and upper Amazonian region.  $\circ$  = Zone of “ARRIBA” cocoa; and,  $\star$  = localization of Nangaritza and Yacuambi rivers. See Table 1 for explanations of name codes.

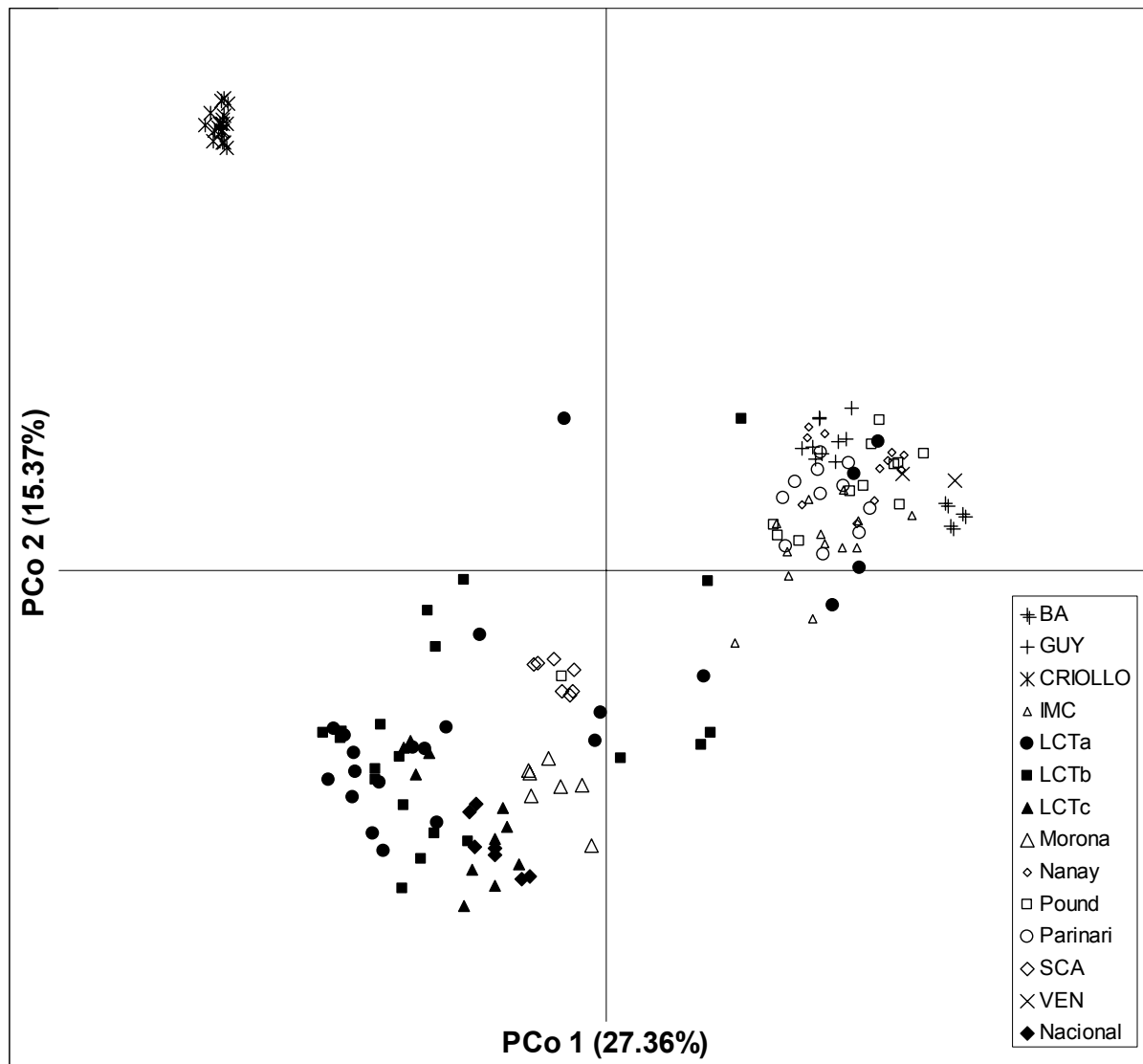


Figure 2. PCoA plot of the first and second axes based on SSRs fingerprinting of *Theobroma cacao* L. populations. The identification for each population code is shown in Table 1.



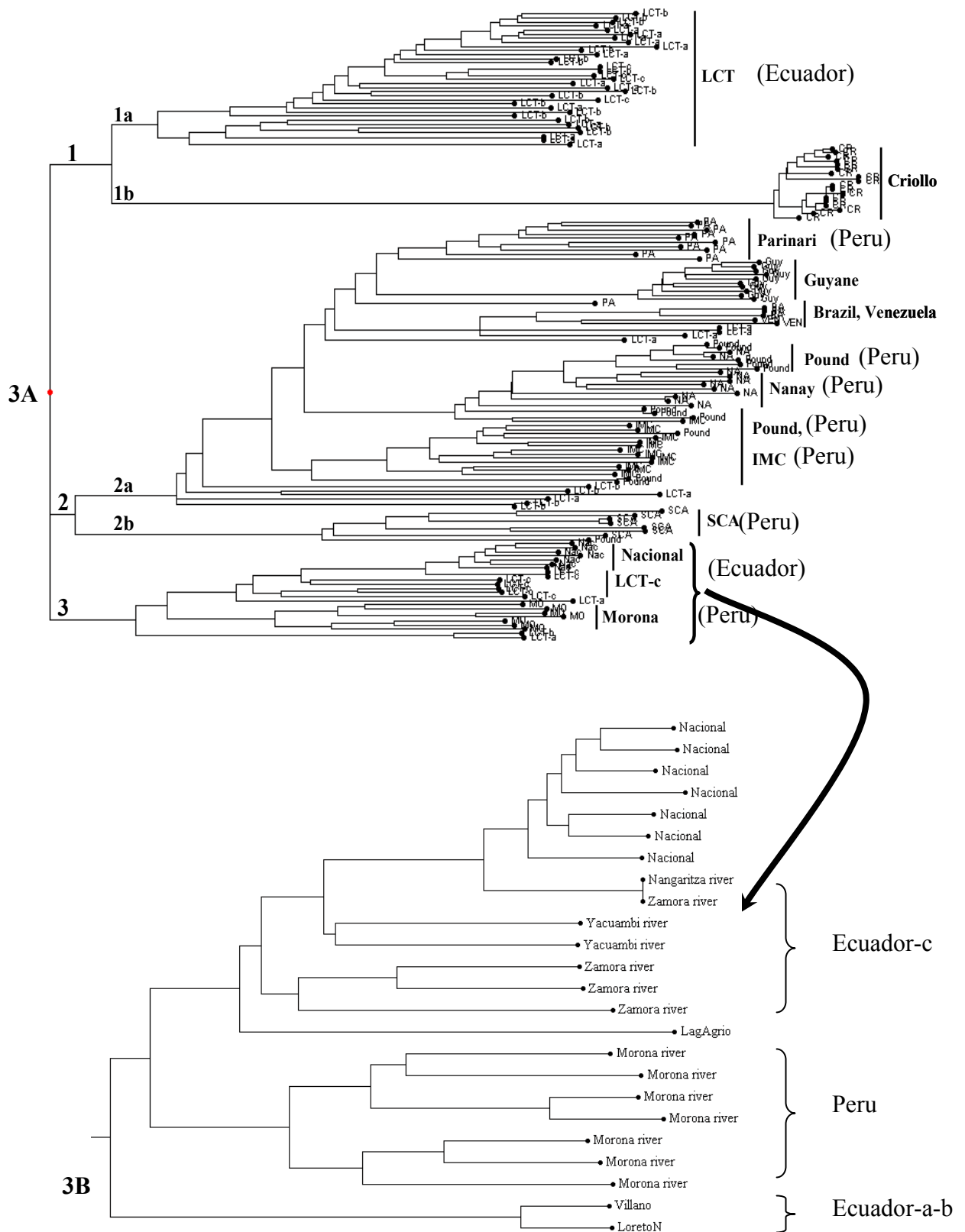


Figure 3. 3A: Neighbour-joining tree from dissimilarity matrix, representing genetic relationship among the wild and cultivated cacao accessions analysed in this study. In Fig 3B: the cluster is amplified and represented with the information about the rivers where were collected the wild genotypes closer to the Nacional. See Table 1 for code identification.

## TABLES

Table 1. Passport information available for the group accessions used in this study

Group Name	Country Origin	Geographical localities (within country)	Sample Size
Nacional	Ecuador	Coast Provinces	7
LCT-EENa	Ecuador	Orient (North region)	30
LCT-EENb	Ecuador	Orient (Center region)	23
LCT-EENc	Ecuador	Orient (South region)	12
IMC	Peru	Iquitos	13
Nanay	Peru	Nanay river	12
Parinari	Peru	Tributaries of Marañon river	13
Morona	Peru	Morona river	8
Guy	Guyana		11
VEN	Venezuela		2
BA	Brazil		3
SCA	Peru	Loreto, Ucayali river	8
Pound	Peru	Nanay river	12
Criollo	Mexico and Venezuela		22
Total samples			176

Table 2. List of microsatellite loci and number of alleles per locus identified in this study.

mTcCIR	N° alleles per locus	mTcCIR	N° alleles per locus
1	7	366	8
6	11	369	8
15	10	373	5
26	10	374	6
37	11	375	4
60	8	376	6
292	4	378	6
293	5	379	5
294	8	380	4
297	2	382	11
298	6	383	6
299	2	387	4
302	13	391	7
304	6	392	8
305	3	393	8
308	5	394	12
309	4	396	3
312	3	397	2
316	7	398	2
322	15	400	6
323	9	402	3
324	2	404	2
325	7	405	3
326	7	411	7
327	3	413	4
329	10	417	4
331	10	418	2
333	3	419	2
336	7	420	4
337	3	422	13
339	3	426	4
341	2	427	4
342	4	429	8
344	10	432	5
348	3	435	5
350	4	436	3
352	13	438	2
356	4	446	6
359	5	447	4
361	6		
364	2	80	463
			Main 5.78

Table 3. Summary of genetic diversity revealed by microsatellite markers within each group analyzed. Hexp.: Expected heterozygosity ; Hn.b.: Unbiased gene diversity (Nei, 1978); Hobs.: Observed heterozygosity; Proportion of polymorphic loci when most frequent allele does not exceed 95% (0.95) and 99% (0.99); and, mean number of alleles per locus (NMA/L).

	Hexp.	H n.b.	Hobs.	P(0.95)	P(0.99)	NMA/locus
BA	0.056	0.068	0.000	0.125	0.125	1.125
Guy	0.108	0.114	0.064	0.287	0.325	1.337
CR	0.049	0.050	0.006	0.150	0.175	1.250
IMC	0.376	0.391	0.479	0.800	0.862	2.700
LCTa	0.523	0.533	0.317	0.950	0.975	4.450
LCTb	0.473	0.485	0.358	0.950	0.962	4.150
LCTc	0.411	0.432	0.271	0.787	0.812	2.637
MO	0.297	0.321	0.314	0.700	0.700	2.000
NA	0.223	0.234	0.242	0.650	0.750	2.150
Pound	0.381	0.399	0.292	0.850	0.900	3.200
PA	0.299	0.312	0.304	0.637	0.750	2.337
SCA	0.319	0.343	0.359	0.750	0.750	2.125
VEN	0.108	0.152	0.056	0.225	0.225	1.237
Nac	0.106	0.114	0.094	0.312	0.312	1.375

Table 4. Coefficients of genetic distance (Nei, 1972) calculated for pair-wise comparisons of the 14 groups of *T. cacao* studied.

BA	0.000														
Guy	0.557	0.000													
CR	2.445	1.611	0.000												
IMC	0.416	0.473	1.435	0.000											
LCT-a	0.724	0.689	0.910	0.468	0.000										
LCT-b	0.861	0.789	0.929	0.534	0.039	0.000									
LCT-c	1.110	0.930	1.079	0.632	0.143	0.144	0.000								
MO	0.928	0.991	1.293	0.571	0.446	0.493	0.431	0.000							
NA	0.412	0.586	1.574	0.269	0.619	0.715	0.792	0.906	0.000						
Pound	0.347	0.475	1.461	0.148	0.493	0.588	0.673	0.718	0.051	0.000					
PA	0.329	0.304	1.468	0.312	0.517	0.618	0.718	0.669	0.422	0.303	0.000				
SCA	1.218	0.955	1.352	0.765	0.631	0.652	0.673	0.615	0.967	0.742	0.775	0.000			
VEN	0.233	0.535	2.141	0.385	0.735	0.892	1.098	0.977	0.380	0.322	0.402	1.172	0.000		
Nac	1.300	1.226	1.395	0.748	0.492	0.582	0.250	0.307	1.017	0.855	0.900	0.779	1.276	0.000	
	BA	Guy	CR	IMC	LCT-a	LCT-b	LCT-c	MO	NA	Pound	PA	SCA	VEN	Nac	

Table 5. The two most likely parents of Nacional cacao individuals. According to Cervus 2.0 software parentage analysis. All putative parents are from the south Amazonian region (c) of Ecuador.

Individual	Prob. Non-exclusion	Parent	
		First	Second
Sa16	$6.937 \times 10^{-7}$	LCT-EEN91	LCT-EEN86
SNA409a	$4.072 \times 10^{-6}$	LCT-EEN86	LCT-EEN91
SNA503	$5.139 \times 10^{-6}$	LCT-EEN91	LCT-EEN85
SNA604	$4.001 \times 10^{-6}$	LCT-EEN91	LCT-EEN85
SNA1001	$1.065 \times 10^{-6}$	LCT-EEN86	LCT-EEN85
SNA1003	$6.188 \times 10^{-7}$	LCT-EEN86	LCT-EEN85
B240	$3.893 \times 10^{-6}$	LCT-EEN91	LCT-EEN86

## **Conclusions et Perspectives**

Plusieurs hypothèses ont été proposées quant à l'origine de la variété de cacaoyer Nacional. Selon Chesman (1944) c'est la région orientale de la cordillère des Andes, située à la frontière amazonienne entre l'Équateur et la Colombie, qui semble le centre d'origine le plus probable. Cependant, aucune étude n'avait été réalisée jusqu'à présent afin de connaître les relations génétiques entre la variété Nacional et les génotypes sauvages de la région amazonienne (voir liste des individus analysés, Annexe 1).

La majorité des échantillons de cacaoyer analysés se structurent en fonction de leur origine géographique. La plus grande diversité génétique a cependant été trouvée chez les génotypes sauvages, originaires de l'Amazonie équatorienne, et dont les représentants se répartissent dans les différents groupes identifiés.

Un petit groupe de cacaoyers sauvages, provenant du Sud de l'Amazonie équatorienne se révèle génétiquement très proche du *pool* de la variété Nacional de par leur forte similarité génétique avec les Nacional. Ces résultats ont été confirmés par une analyse de paternité qui a permis d'identifier ces génotypes sauvages comme les ancêtres les plus vraisemblables de la variété native de cacaoyer Nacional. Ces ancêtres sauvages seraient localisés entre les rivières Nangaritz et Yacuambi dans la province de Zamora Chinchipe.

Afin de tenter d'expliquer les résultats précédents, une recherche historique a été réalisée pour déterminer les origines des premières plantations de cacaoyers en Équateur. D'après les informations recueillies auprès des archives historiques d'Équateur, il apparaît que lors de la première expédition des espagnols en Équateur, des cacaoyers étaient déjà plantés dans différents lieux de la côte équatorienne. Par conséquent, il n'existe aucun doute sur le fait que le cacaoyer était déjà cultivé dans ce pays bien avant l'arrivée des espagnols. La question de l'origine de la variété Nacional et de son introduction sur la côte équatorienne, se pose alors.

Pour répondre à ces dernières questions, notre démarche a consisté à recueillir des données archéologiques disponibles sur les civilisations précolombiennes en Équateur, ainsi que sur les coutumes et la naissance de l'agriculture dans cette région.

Les données archéologiques indiquent une présence humaine en Équateur depuis 12000 ans avant J.-C. Cependant, les premières preuves de l'usage de certaines plantes comme le maïs et le coton, datent de 3500 ans avant J.-C., mais aucune trace de l'usage de cacao dans les civilisations précolombiennes à cette époque n'a été retrouvée. Environ 2000 ans avant J.-C., il existait déjà un échange fluide entre de petits groupes d'habitants de la côte et de l'Amazonie. Ces hommes traversaient les Andes et l'Amazonie équatorienne, à travers des chemins rudimentaires tracés pour la communication et le commerce entre les différentes régions de l'Équateur. Les informations archéologiques confirment les échanges entre les habitants du Sud de l'Amazonie équatorienne. Ces habitants amazoniens ont, à l'évidence, vécu dans un secteur connu sur le nom de "Cueva de los Tayos" actuelle province de Morona Santiago (région C) très proche de la zone où ont été identifiés les ancêtres sauvages potentiels du Nacional.

Notre hypothèse sur une origine génétique et géographique de la variété Nacional, située dans cette région C, est donc cohérente à la fois avec les données génétiques, mais aussi avec les données historiques et archéologiques liées aux populations précolombiennes habitant ces régions.

Il est possible que la région de domestication du Nacional ait été plus étendue et ait pu atteindre des zones d'échanges commerciaux tel que ceux de la « Cueva de los Tayos » favorisant ainsi son transfert vers la côte. Les résultats de cette étude ouvrent un grand nombre de perspectives nouvelles pour l'amélioration du Nacional, en permettant de cibler une région amazonienne particulière où pourront être organisées de nouvelles prospections de matériel sauvage.



## CHAPITRE IV

---

# DONNES HISTORIQUES SUR LES CIVILISATIONS PRECOLOMBIENNES EN ÉQUATEUR ET L'HISTOIRE DE LA VARIETE NACIONAL





## **CHAPITRE IV.**

### **DONNÉES HISTORIQUES SUR LES CIVILISATIONS PRÉCOLOMBIENNES EN ÉQUATEUR ET L'HISTOIRE DE LA VARIÉTÉ NACIONAL**

#### **1. Introduction**

Pendant plus de 400 ans, le destin économique de l'Équateur a été lié à l'activité cacaoyère. On pourrait sans doute assurer que l'histoire de l'Équateur est aussi l'histoire du cacaoyer sud-américain, cependant, jusqu'à présent aucune étude n'a été réalisée pour connaître les origines ancestrales de cette culture. Des données historiques montrent que les conquistadors espagnols ont trouvé de petites cultures de cacaoyer à leur arrivée sur les côtes équatoriennes, cet événement indique que l'origine de cette culture remonterait à des temps beaucoup plus anciens. Il existe de nombreux mythes et légendes jamais vérifiés sur les origines précolombiennes du cacaoyer natif, baptisé Nacional, mais on ignore toujours laquelle de ces hypothèses aurait pu initier les premières cultures de ce type de cacaoyer sur les côtes équatoriennes.

Il existe peu de documents sur les civilisations précolombiennes en Équateur et les références sur la culture précoloniale du cacaoyer Nacional, si elles existent, restent inconnues. En revanche, d'abondantes données ont été rassemblées sur les Aztèques, les Mayas, et les peuples précolombiens prédécesseurs, parmi lesquels les Olmèques, qui ont vécu en Amérique centrale. Ces derniers pourraient bien être les premiers utilisateurs du cacao mexicain et guatémaltèque. Le manque de données sur les cacaoyers en Équateur pourrait être attribué au fait que les espagnols qui arrivèrent sur les côtes équatoriennes connaissaient déjà le cacaoyer et le cacao, découverts dans leurs précédentes explorations des terres centre-américaines.

Des fouilles archéologiques ont révélé l'existence de vestiges humains sur la Côte, les Andes et l'Amazonie équatorienne, datant de milliers d'années avant J.-C. A notre connaissance, il n'existe pas de travaux associant les civilisations précolombiennes à l'origine de la culture du cacaoyer dans la région côtière de l'Équateur.



Ce chapitre présente la synthèse de données historiques portant sur l'origine et la distribution du cacaoyer de type Nacional en Équateur. Ces informations pourraient apporter d'autres arguments que ceux présentés dans les deux chapitres précédents, indiquant que le cacaoyer Nacional est originaire d'Équateur. Des plus, ces données permettront de préciser l'histoire de la culture du cacaoyer en Équateur et celle des civilisations précolombiennes équatoriennes, ayant pu intervenir. La majorité des données présentées dans ce chapitre proviennent des archives historiques de l'Équateur, gardées à l'heure actuelle dans différentes institutions publiques et privées à Quito et à Guayaquil.

Deux aspects seront principalement développés dans ce chapitre : (i) la recherche d'informations archéologiques qui permettraient de faire le lien entre les civilisations précolombiennes équatoriennes et les événements de domestication, de migration des semences du cacaoyer dans et en dehors de l'Équateur ; et (ii) la recherche de données historiques sur l'origine et l'expansion de la culture du cacaoyer Nacional depuis la découverte de l'Amérique jusqu'à notre époque.

## **2. Données sur l'agriculture et le développement des populations précolombiennes**

Les découvertes archéologiques permettent d'affirmer que l'histoire des premiers habitants en Équateur commence environ 12 000 ans avant J.-C. (Ayala, 1988). Les vestiges humains les plus anciens se trouvent dans les vallées des Andes. Les habitants primitifs de cette époque, étaient des chasseurs regroupés en bandes nomades chassant la faune andine, leur source principale d'alimentation. Les forêts des zones basses fournissaient les aliments végétaux et les Andes, à plus de quatre mille mètres, offraient les plantes médicinales.

La dispersion des hommes sur le territoire équatorien fut progressive. Ils peuplèrent graduellement les vallées subtropicales et les versants de montagnes, et plusieurs groupes s'établirent sur les plaines côtières par l'abondance des ressources alimentaires. Ces hommes vécurent dans des grottes ou des constructions rudimentaires à base de branches et de paille. La pêche était la spécialité des habitants côtiers. Cette population grandissante fut à l'origine d'une des plus grande avancée de l'homme à cette époque : l'agriculture (Staller, 2002).

Il existe des vestiges d'une agriculture naissante depuis 9000 ans. L'une des premières cultures pratiquées fut sans doute celle du maïs. On retrouve des traces de cette culture datant



Photo 1. Les « venus Valdiviennes », vestiges de la culture Valdivia (3500 avant J.-C.).  
D'après L'ambassade de l'Équateur en France.

de la même époque dans plusieurs régions comme la Més-Amérique et les Andes (Pearsall et Piperno, 1990 ; Staller, 2002). L'agriculture a facilité le développement des communautés et des tribus, favorisant ainsi la sédentarisation. Cependant, il faut attendre plusieurs milliers d'années pour voir l'établissement des premières communautés clairement intégrées dans une structure sociale.

Il existe des vestiges d'une civilisation avancée déjà 3500 ans avant J.-C. : la Valdivia, l'une des premières civilisations précolombienne avec constructions urbaines organisées en ville. Les Valdivias étaient établis sur la côte Sud de l'Équateur vers 3500 avant J.-C. (Staller, 1994), soit environ 1300 ans avant le premier royaume égyptien. La culture Valdivia est reconnue pour sa céramique. Les Vénus valdiviennes (Photo 1) constituent l'un des héritages artistiques les plus importants de l'humanité.

Les Valdivias ainsi que les cultures ultérieures implantée sur la côte, Machalilla (1500 avant J.-C.) dans la province de Manabí et Chorrera (900 avant J.-C.) au bord des rivières Daule et Babahoyo, présentent des échanges actifs avec les populations d'autres régions d'Équateur. Des communications sont notamment établies avec les habitants de la côte pacifique et avec les peuples des vallées andines (Les cultures : Cañaris, Cotacollao, et autres) ainsi qu'avec les habitants de l'Amazonie équatorienne à Pastaza et les peuples proches du site de la grotte des tayos « *Cueva de los Tayos* » (Salazar, 1995). De nombreux chemins ont été développés pour faciliter ce commerce actif interrégional, et ainsi améliorer les échanges entre la côte et jusqu'à l'Amazonie, notamment dans la vallée du fleuve Guayas et des zones stratégiques de la Sierra (Ayala, 1988).

Mais le plus surprenant est qu'il existe également des preuves archéologiques d'un commerce dynamique développé par les Valdivia et permettant des échanges entre des sites aussi éloignées que le port d'Acapulco au Mexique et le Sud du Pérou (Borhegyi, 1961 ; Becker-Donner, 1966). Un exemple de ce commerce ancestral interocéanique, est fourni par les coquillages. En effet, pour cette société primitive, les coquillages marins constituaient un matériel important et très précieux. Les grands escargots marins servaient de trompettes ou sifflets et étaient utilisés dans les cérémonies religieuses. Ces coquillages de couleur rouge, étaient aussi considérée comme un symbole important de fertilité et servaient notamment d'offrandes aux dieux. Ainsi, cette coquille fût non seulement considérée comme une marchandise commerciale importante mais aussi comme un moyen d'accumulation de

richesse. L'espèce *Spondylus princeps* vit exclusivement dans les eaux chaudes du Pacifique et a été principalement récoltée par les civilisations précolombiennes vivant autour de l'île de l'argent « *Isla de la Plata* » en face de la Province de Manabí (Équateur). Toutefois ces coquillages ont été aussi retrouvés dans la région d'Acapulco.

Tandis qu'en Europe les habitants primitifs méditerranéens s'aventuraient rarement au-delà des côtes de la mer méditerranée, les habitants primitifs des côtes équatoriennes, faisaient front aux dangers des océans. Ces voyages représentaient des milliers de kilomètres, à bord de radeaux en bois. Les Valdiviens furent sans doute les acteurs de ces voyages légendaires, cependant peu étudiés.

L'isolement des différentes populations, due aux conditions géographiques et climatiques de l'Équateur, a facilité le développement autarcique des cultures dans différentes régions. Les échanges pacifiques de produits ont toujours eu lieu entre les nouvelles cultures émergentes, comme les cultures côtières (Bahia, Jambelí, Guangala et Tolita), andines (Cotocollao, Narrío et Tuncahuán) ou les cultures amazoniennes (Pastaza et Cosanga).

À partir de 1400 après J.-C., les différentes ethnies formées eurent à faire front à un peuple guerrier : les Incas. Aux environs de 1460 après J.-C., les Incas réussirent à conquérir les territoires de l'actuel Équateur et à asservir toutes les ethnies de la sierra jusqu'à Quito et Imbabura (Plaza, 1976). Cependant à l'arrivée des Espagnols, sous le commandement de Francisco Pizarro, les Incas passèrent de l'état de « conquistadors » à l'état de peuple soumis (Salomon, 1986).

### **3. Brève histoire de l'origine du cacaoyer Nacional et de sa culture**

L'historien Prescott (1847) rapporte que les hommes de Pizarro découvrirent de « florissantes plantations de cacaoyers » à Bahia de Mateus (actuellement Esmeraldas, en Équateur), lors de leur première expédition sur les côtes Sud-américaines entre 1526 et 1527. Par ailleurs, le chroniqueur Stevenson (1829), assure que les Espagnols firent la découverte du cacaoyer sur l'île de Puná (en face de Guayaquil) entre 1528 et 1531 au cours de la troisième expédition de Pizarro sur les côtes équatoriennes.



Des chercheurs tels que Soria (1970), Allen et Lass (1983), Enriquez (1992), ou Lerceteau et al (1997b) signalent que la variété Nacional provient sans le moindre doute d'Équateur. Si tel n'est pas le cas, cette variété proviendrait de la partie Ouest ou des vallées orientales de la cordillère des Andes. Un grand nombre de cacaoyers de type Nacional furent trouvés et préservés, au moment où les premiers colons défrichèrent les forêts vierges du littoral pour y installer des plantations de cacao (Crawford de Roberts, 1980).

Jusqu'à nos jours, l'origine de la variété Nacional présente sur la côte équatorienne est restée incertaine. Cependant Vera (1987) avance deux hypothèses : (i) la variété Nacional aurait été transportée par les singes, les écureuils ou autres animaux sauvages, qui affectionnent particulièrement la pulpe sucrée enrobant les graines, (ii) cette plante aurait jadis été introduite par les anciennes voies de l'empire Inca, puis semée par les « aborigènes » de la côte occidentale. Le même Vera (1987) indique que ces hypothèses se trouvent confortées par la similitude morphologique de la cabosse et de la fève, entre la variété « Nacional » et les plantations originaires de la forêt amazonienne des actuels cantons de Tena, Archidona et Macas.

Il était également envisageable que le cacaoyer ait poussé naturellement dans la région côtière, zone de culture actuelle, et qu'en s'éloignant du bassin amazonien, en raison du plissement des Andes, les caractéristiques écologiques de l'ouest de la cordillère auraient contribué à donner au cacao Nacional les caractéristiques particulières qu'on lui connaît aujourd'hui (Loor 2002). La seule certitude, c'est qu'en Équateur les premiers groupes d'espagnols qui débarquèrent en Amérique découvrirent des cacaoyers déjà plantés sur les côtes.

La date exacte à laquelle les cacaoyers ont été plantés pour la première fois avant la venue des espagnols, reste cependant inconnue. Les informations qui seront présentées dans les paragraphes suivants proviennent principalement des ouvrages d'historiens nationaux et étrangers qui suivirent de près l'avènement du cacao équatorien. Aujourd'hui, cette source d'information historique se trouve conservée dans diverses institutions publiques et privées d'Équateur dont l'accès reste malheureusement souvent interdit. Le peu d'informations accessibles permet de reconstituer une chronologie de la découverte et de l'évolution de la culture du cacaoyer en Équateur :



Selon Preuss (1901), les plantations découvertes sur le littoral équatorien, furent créées par le débroussaillage autour des arbustes de cacaoyers sauvages. Les seuls très grands arbres à être épargnés furent des arbres au feuillage touffu et à la cime élevée, comme le dense et imposant *Erythrena glauca*, nécessaires pour ombrager les cacaoyers. Cette pratique était fort répandue en 1890.

Il n'existe aucun récit confirmant que les indiens du territoire de l'actuelle province de Guayas, en Équateur, consommaient le fruit du cacaoyer à l'arrivée des espagnols à Guayaquil. Il est fort probable que les colons espagnols ne commencèrent à semer le cacaoyer natif en petites quantités qu'en 1590 et à l'exporter les années qui suivirent, soit presque un siècle après la découverte du cacao mexicain et guatémaltèque.

En 1587, le pirate Canvendish brûla 100 000 charges<sup>1</sup> de cacao stockées au port d'Acapulco, en laissant ainsi le marché démuni. Par ailleurs, la demande croissante et la popularisation du chocolat, cumulée à la baisse de la récolte à Soconusco (Mexique et Guatemala) favorisèrent l'essor des petites cultures de Guayaquil pour répondre à la demande grandissante des consommateurs de chocolat (Archive historique d'Équateur, 1980).

En 1605, les 152 colons, 216 esclaves et près de 400 Indiens et Noirs, qui habitaient Guayaquil se consacrèrent à la construction navale ainsi qu'à l'agriculture, dont la culture du cacaoyer. Cette culture se répartissait sur 32 petites plantations communément appelées « *chacras* ». La première plantation en production a été identifiée à Chongón en 1606. En 1617, il était fréquent que des visiteurs étrangers observent de nombreuses petites plantations sur les rives des fleuves de la province de Guayaquil (aujourd'hui Guayas). En 1689, les jésuites, en tant que détenteurs des grandes propriétés agricoles possédaient 51 000 cacaoyers (Archive historique de Guayaquil).

En 1890, l'Équateur bénéficiait d'une réputation enviable sur tous les grands marchés de Hambourg et de Londres, uniquement grâce à sa variété native de cacao (Preuss, 1901). Les fèves présentaient une qualité nettement supérieure et étaient facilement différenciables de celles provenant des autres pays. Selon Goding (1921), on pouvait trouver quatre types de qualité, mais le cacao de type **Nacional** « **ARRIBA** » produit dans la province de *Los Ríos* le

---

<sup>1</sup> Charges = A cette époque, une charge représentait 60 livres à Guayaquil et 80 livres au Guatemala.



long des fleuves Daule et Babahoyo (affluents du fleuve Guayas), se révélait être le plus fin. Le cacao de type **Balao**, que l'on trouvait à l'extrémité inférieure du fleuve Guayas, à l'est du détroit de Jambeli, présentait une qualité inférieure au Nacional mais avec des rendements plus importants. Le cacao de type **Machala**, cultivé dans la ville du même nom, située au sud du district de Balao, était classé dans les cacaos de qualité inférieure aux deux premiers et, en dernier lieu, le **Bahía de Caráquez**, de qualité moyenne, était exporté depuis la province de Manabí. Cependant, selon Goding (1921), les exportateurs acceptaient tous les types de cacao équatorien mentionnés ci-dessus.

Il est intéressant de noter que, dans les zones où le cacaoyer a été semé initialement, comme Chongon, Daule et Yaguachi (Province de Guayas), les sites de production de fèves de cacao disparurent au fil des siècles. À l'heure actuelle, Chongón n'en produit plus et les autres régions n'en produisent qu'en quantités très faibles.

#### **4. Particularité de l'appellation « ARRIBA »**

Il est fréquent de trouver ou d'entendre de mauvaises interprétations concernant la signification de l'appellation « ARRIBA ». C'est la raison pour laquelle, cette partie tentera d'apporter des informations de base permettant de différencier les deux définitions existantes de l'appellation « ARRIBA » liées au cacao d'Équateur. La première définition fait référence à la région d'origine de la production (Figure 1), tandis que la seconde renvoie aux particularités aromatiques et aux saveurs qu'elle génère.

##### **4.1 La région « ARRIBA »**

Un des historiens de Guayaquil soutient, qu'en 1687, l'attaque du port de Guayaquil par les pirates George d'Hout (anglais) ainsi que Picard et Groniet (français), suivie du pillage de la ville ainsi que les rançons élevées exigées pour la libération des otages, poussèrent cette année-là, les habitants à l'exode le long des fleuves vers la région « ARRIBA », pour y installer leurs cultures (Archive historique d'Équateur, 1980). Peu de temps après, les exportations de cacao augmentèrent considérablement, accréditant par là-même ce récit.

La région appelée « ARRIBA » correspond à la plaine du nord de Guayas, qui se prête parfaitement à l'agriculture tropicale, limitée cependant à l'est, par les flancs des Andes et à

l'ouest par une basse cordillère côtière (Figure 1). Crawford de Roberts (1980), indique que même en 1890, cette plaine ne disposait pas de chemins, il existait cependant un excellent système de communication fluviale. Toute la vie économique et sociale en dépendait. Au nord, de nombreuses rivières restaient tributaires des fleuves Daule et Babahoyo qui confluent dans la ville de Guayaquil au sud pour former le fleuve Guayas. Le Guayas parcourt environ 80 km de distance avant de se jeter dans l'Océan Pacifique. Ce canal est suffisamment grand et profond pour permettre le passage de grands navires transatlantiques. À cette époque-là, les voies fluviales et la mer constituaient les seules véritables axes de communication et de transport. Paul Preuss, directeur du jardin botanique du Cameroun, qui effectua de nombreux voyages dans les pays producteurs de cacao au cours de la dernière décennie du XIXe siècle, soutenait que l'Équateur disposait dans cette région du système fluvial le plus avantageux du monde.

Eilif (1948), indique qu'aucune partie de la région « ARRIBA » ne s'éloigne de plus de 5 degrés de l'Équateur. Cette plaine côtière ne dépasse pas les 100 mètres d'altitude au dessus du niveau de la mer. Les alluvions provenant des montagnes et collines confèrent au sol une couche supérieure riche. Ce dépôt alluvial s'étend sur une longueur de 483 Km et sur une largeur de 32 à 161 Km. Dans la province de Los Rios, au nord du bassin du fleuve Guayas, le sol s'avère être un des plus riches que l'on puisse trouver dans un pays tropical ; il garde une composition et une consistance relativement uniforme dans ses profondeurs.

Le même Eilif (1948), réalisa une étude du sol de la zone entre les villes Saint-Domingue et Bucay (région Arriba) sur les versants des Andes, il en tira les conclusions suivantes : la couche arable du sol contient presque deux fois plus de matière organique que certaines des plus riches prairies noires aux États-Unis. Cette matière organique sert à améliorer la composition organique du sol, si bien que celui-ci est reconnu mondialement comme un des meilleurs pour sa capacité à retenir l'humidité. Près de deux millions d'hectares de terres restent sous une couche de nuages côtiers peu élevée, qui se trouve en contact avec les versants des Andes. L'abondance de soleil, l'absence de vent, des températures diurnes qui oscillent autour de 35 degrés (C°), une moyenne annuelle de précipitations de plus de 1900 mm, et la bruine qui se dépose le matin, même en période sèche, ont permis à cette région de l'Équateur d'accueillir favorablement la culture de cacaoyers. Ces conditions pourraient également avoir contribué au développement ou à l'expression de caractères particuliers au cacaoyer de type Nacional équatorien.

#### **4.2 Le goût aromatique « ARRIBA » de la variété Nacional**

Il est nécessaire de souligner que le goût aromatique typique, connu sur le marché sous le nom « ARRIBA », est sans doute la caractéristique principale qui distingue la variété de cacao Nacional des autres types de cacao. Ce goût aromatique est aussi responsable de la réputation de la qualité du cacao équatorien. Ces caractères sensoriels sont reconnus par les dégustateurs experts dans les entreprises de fabrication de chocolats fins, et par les chercheurs qui travaillent sur la qualité du cacao. Les chercheurs du Projet cacao (2000) indiquent que les fèves de cacao Nacional sont particulièrement grandes, la saveur du mucilage est particulièrement sucrée et celle de la fève présente la caractéristique d'être très douce, c'est-à-dire peu acide et peu amère, développant à sa mastication une saveur florale, comparable à la fleur d'oranger. Cette saveur florale fait la particularité du cacao équatorien, et d'après Enriquez (1992) cet arôme typique semble posséder une origine fortement génétique.

En plus d'être influencé par le génotype, Clapperton et al (1993) indique que l'arôme du chocolat dépend de la technologie post-récolte qui est mise en œuvre. Ainsi Jeanjean (1995) distingue dans les cacaos fins, 3 origines de l'arôme : la première est l'arôme de constitution, déjà présent dans la fève fraîche (telle que la saveur florale « ARRIBA » spécifique du cacao Nacional d'Équateur), la deuxième est l'arôme fermentaire, issu des métabolites développés au cours de la fermentation microbienne et, la troisième correspond à l'arôme thermique qui se développe essentiellement au cours de la torréfaction. D'après Cros et al (1993), le traitement post-récolte permet l'expression du potentiel aromatique du cacao, lequel est déterminé par le génotype, et la phase de fermentation serait le facteur clef de son expression.

Cependant, à l'heure actuelle, il n'existe pas de rapports scientifiques définissant clairement les composants de l'arôme « ARRIBA ». Plusieurs études ont cependant mis en évidence la présence d'un taux de linalol plus élevé dans les fèves du Nacional, et qui pourrait être l'un des composants majeur de l'arôme « fleur d'oranger » avec d'autres terpènes. On sait en effet que les huiles essentielles de fleur d'oranger extraites de l'espèce *Citrus aurantium* contiennent près de 50% de linalol associé à d'autres monoterpénols tels que géraniol et farnésyl. Chez la vigne par exemple, Oswald (2006), a mis en évidence les bases moléculaires de la spécificité des cépages aromatiques, toutes liées à la biosynthèse des terpénols au cours

du développement et de la maturation du fruit. La biosynthèse des terpénols n'a pas encore été étudiée chez le cacaoyer, et permettrait de mieux caractériser les spécificités aromatiques de la variété Nacional.



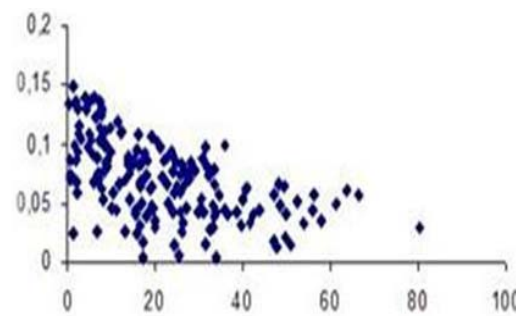
## CHAPITRE V

---

# ETUDE DU DESEQUILIBRE DE LIAISON (DL) CHEZ LA POPULATION MODERNE DE CACAOYERS EQUATORIENS.



```
GGAAACGGTACGATACGATACGATACGAT
GGRACGGTACGATACGATACGATACGAT
GGAAACGGTACGATACGATACGATACGAT
GGAAACGGTAC:::::GATACGATACGAT
GGAAACGGTAC:::::GATACGATACGAT
GGRACGGTAC:::::GATACGAT
```





Evaluation du déséquilibre de liaison (DL) chez les populations modernes de cacaoyer Nacional échantillonnées dans la collection de Tenguel, en Équateur.

### **Introduction :**

Au cours des vingt dernières années, l'avènement des marqueurs moléculaires a facilité la mise en oeuvre de dispositifs expérimentaux pour étudier les facteurs génétiques sous-jacents à l'hérédité de caractères complexes. Pour épauler les programmes d'amélioration variétale et pour cartographier les gènes (QTL) chez les espèces d'intérêt agronomique, une nouvelle approche connue sous le nom de « génétique d'association » a été initiée chez les végétaux avec le travail pionnier de Thornsberry et al (2001), qui a permis de valider l'implication du gène candidat *Dwarf8* dans la variation de la précocité de floraison du maïs. Cette approche consiste à exploiter le déséquilibre de liaison (DL) existant chez des individus issus de populations naturelles ou en sélection, afin d'optimiser la détection de QTL sans faire appel à des structures familiales ou à des descendance en ségrégation. Le concept de DL est relativement ancien (Jenning, 1917) et très connu par les généticiens des populations. Le DL proprement dit, mesure l'association non aléatoire d'allèles pris à des locus différents (Lewontin and Kojima, 1960).

Les méthodes d'association ont été particulièrement importantes pour étudier la base génétique de maladies humaines, pour lesquelles des expériences génétiques ne sont pas faisables. Elles ont aussi un grand potentiel pour trouver des gènes responsables de QTL (Lai et al, 1994 ; Slatkin, 1999). Chez les végétaux et en particulier pour les espèces pérennes, les études d'association entre le polymorphisme de gènes candidats et la variation des caractères devraient permettre des avancées majeures pour l'étude du déterminisme génétique de caractères complexes d'intérêt agronomique. La résolution des études d'association dans un échantillon d'essai dépend de la structure du DL à travers le génome. Le DL, ou la corrélation entre allèles aux sites différents, dépend généralement de l'histoire des recombinaisons entre loci polymorphes.

Chez l'espèce *Theobroma cacao* où les études de QTL sont assez peu nombreuses par manque de grandes populations analysables (Clement et al, 2003 ; Faleiro et al, 2006 ; Brown et al, 2007) la connaissance du DL est un préalable indispensable pour pouvoir développer les nouvelles approches de génétique d'association. Pugh (2005) et Marcano et al (2007) ont



réalisé des études d'associations dans une collection de cacaoyers de type Criollo/Trinitario au CATIE (Costa Rica) et dans une population de cacaoyers cultivés au Venezuela et ont trouvé des associations hautement significatives entre marqueurs et caractères dans 13 régions chromosomiques pour des caractères liés au fruit, à la fève et à la fleur. Huit de ces régions correspondent à des QTL déjà identifiés par Clement et al (2003) et Lanaud et al (2003) dans des descendance contrôlées.

En Équateur, l'histoire de plus d'un siècle d'introductions successives de cacaoyers étrangers (différents du génotype original de la variété native), la forte recombinaison génétique et la ségrégation des caractères qui présentent une grande hétérogénéité dans les plantations actuelles (Loor et al, 2007), font des cacaoyers équatoriens actuellement cultivés une population modèle pour des études d'association. Grâce aux recombinaisons accumulées dans ces ressources génétiques, il est possible de tester l'association entre la variabilité phénotypique des caractères et le polymorphisme de gènes candidats et/ou de marqueurs répartis sur l'ensemble du génome, selon l'étendue et la structure du DL (Thornberry et al 2001, Werner et al 2005, Zhang et al 2005, Breseghello et Sorrells 2006). L'objectif de cette étude était de réaliser un travail exploratoire pour évaluer l'étendue du déséquilibre de liaison sur 137 échantillons représentant la diversité des sources de cacaoyers Nacional modernes de la collection CCATenguel en Equateur. La mesure de ce DL devrait permettre d'évaluer la densité de marqueurs nécessaire à une étude d'association englobant l'ensemble du génome afin d'étudier le déterminisme des caractères de qualité et de production.

## **Matériel et méthodes**

*Matériel végétal* : L'étude a portée sur une population de 137 cacaoyers « Nacional moderne » de la collection CCATenguel, localisée au sud de l'Équateur. Cette collection a été caractérisée pour un grand nombre de caractères agronomiques pendant les vingt dernières années (Pastorelly, 1992 ; Loor 1998) et ces données devraient pouvoir être utilisées dans de futures études d'association

*Données génotypiques de marqueurs SSR* : Nous avons utilisé :

- d'une part les données de 19 loci SSR polymorphes bien repartis sur le chromosome 1, pour connaître l'étendue du DL dans ce chromosome, pris à titre d'exemple.

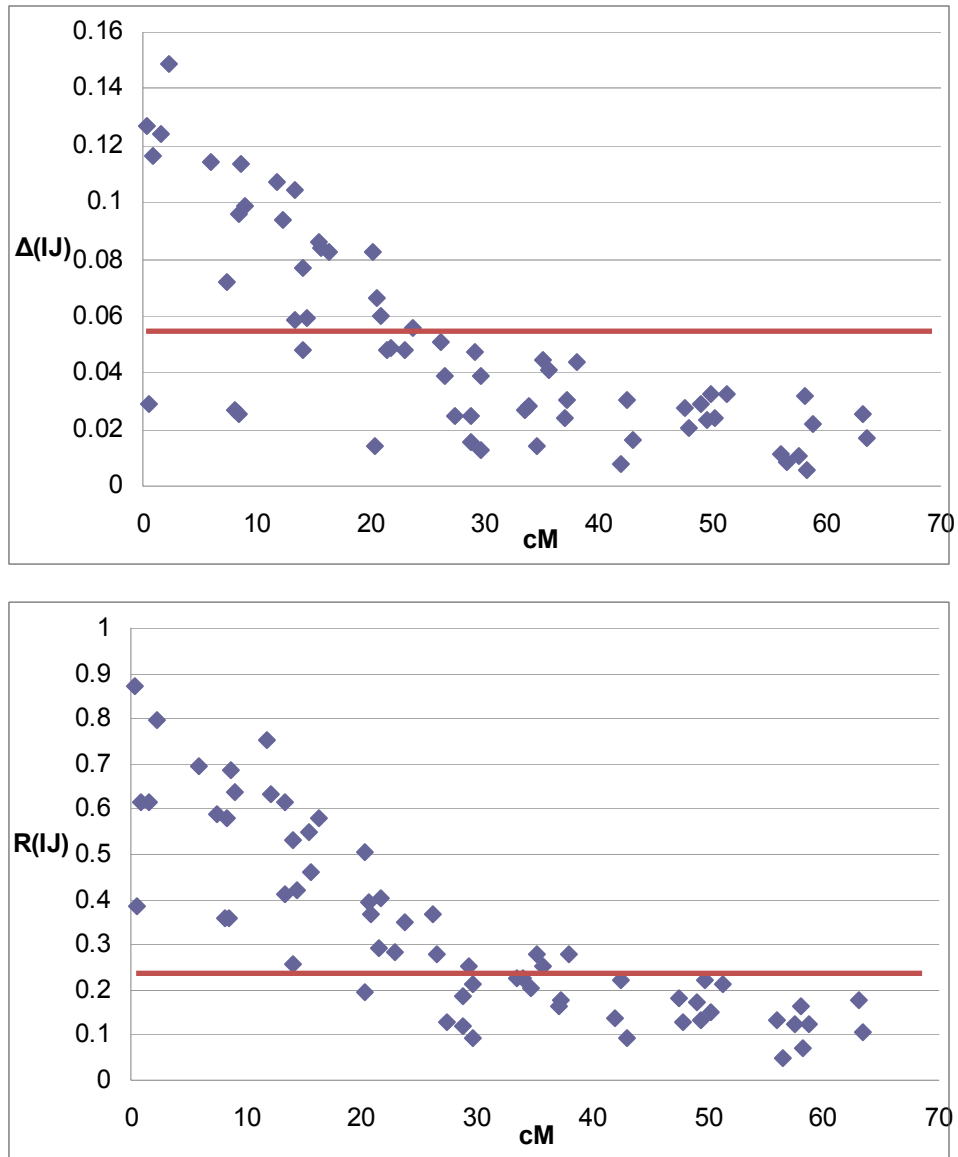


Figure 1. DL en fonction de la distance génétique entre marqueurs situés sur le chromosome 1. Dans nos échantillons le DL disparaît pour une distance génétique entre marqueurs supérieure à environ 25 cM. La ligne (rouge) correspond au seuil de détection du DL.

- d'autre part, 2 loci SSR non liés par chromosome (soit 20 marqueurs non liés au total), pour déterminer la valeur du DL pour laquelle 95% des couples de marqueurs indépendants ont un DL inférieur à cette valeur. Cette valeur sera prise pour seuil pour déterminer l'existence d'un DL entre marqueurs répartis sur un même chromosome.

*Analyses Statistiques* : Le DL entre les paires de loci SSR à l'intérieur du chromosome 1 et entre chromosomes a été évalué par le paramètre  $\Delta_{ij}$  adapté aux plantes hétérozygotes pour lesquelles la phase entre marqueurs est inconnue (Weir and Cockerham, 1979).  $\Delta_{ij}$  a été évalué en utilisant le programme LinKdos (Garnier-Géré and Dillmann, 1992) adapté à partir du programme de Black and Krafur (1985) et intégré dans le logiciel GENETIX 4.02 (Belkhir et al, 2004). Cette procédure permet de calculer les fréquences alléliques, les valeurs des corrélations par paire d'allèles ( $R_{ij}$  ;  $i$  = allèle considéré au locus 1,  $j$  au locus 2) ainsi que les déséquilibres génotypiques ( $\Delta_{ij}$ ), dans le cas de locus multi-alléliques.

Dans l'optique de réaliser des études d'association entre marqueurs et qualités aromatiques spécifiques du Nacional, nous avons ciblé notre étude de DL plus spécifiquement sur des fragments de chromosome conservés issus de l'ancêtre Nacional natif, précédemment identifié, et pour lequel nous avons déterminé des allèles spécifiques pour chaque loci étudié.

## Résultats

Un total de 64 couples de loci SSR ont été analysés sur le chromosome 1, avec une moyenne de 3.32 allèles par site (de 2-16 allèles). L'étendue du DL entre les paires de loci SSR analysés et ciblée sur les allèles « Nacional » est montrée dans la Figure 1. La valeur de  $R$  et  $\Delta$  baisse fortement (0.33 et 0.06 respectivement) jusqu'à 25 cM, distance à laquelle  $R$  et  $\Delta$  atteignent les valeurs seuils qui caractérisent 95% des marqueurs indépendants. D'autre part, la valeur de  $R$  la plus forte est de 0.87 à 0.02 cM, et  $\Delta$  = 0.15 à 2.3 cM (Figure 1). Le degré de DL pour des distances données entre marqueurs est fortement variable.

## Discussion

Chez le cacaoyer, la première étude utilisant les méthodes de génétique d'association à été réalisée par Pugh (2005), qui a étudié le DL et identifier les associations entre des

marqueurs moléculaires et des caractères phénotypiques dans la collection de cacaoyers du CATIE, au Costa Rica.

La mesure de DL détermine le nombre et la densité marqueurs exigés pour des études d'association utilisant une approche « *genome scan* ». Dans une population avec un DL important, un nombre plus réduit de marqueurs sont nécessaires pour détecter des associations. Si le DL s'étend sur des petites distances, une densité de marqueurs plus grande est exigée.

Cette étude prospective, montre que le DL couvre de grandes régions chromosomiques (jusqu'à 25cM), comme attendu pour une population qui a subi un mélange récent (Looor et al, 2007) avec peu de générations (5-6 générations) depuis les premiers croisements entre la variété Nacional et les cacaoyers Trinitario introduits en Équateur. Ce dernier résultat est similaire aux résultats trouvés par Pugh (2005) et Marcano et al (2007). La grande étendue du DL limite le nombre de marqueurs nécessaires pour les études d'association qui seront faites dans cette population, et une densité de 1 marqueur les 10 cM devrait être suffisante pour détecter les associations entre marqueurs et caractères sur l'ensemble du génome. Ces études d'association génétique qui pourront donc être faites à l'échelle du génome sont prometteuses pour pouvoir étudier en particulier les bases génétiques des composants liées à la qualité florale de la variété Nacional d'Équateur, qui sera la suite de ce travail doctoral.

## Références

- Belkhir K, Borsa P, Chikhi L, Raufaste N and Bonhomme F. 2004. GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations, Laboratoire Génome, Populations, Interactions; CNRS UMR 5000; Université Montpellier II, Montpellier (France).
- Black WC, Krafur ES, 1985. A FORTRAN program for the calculation and analysis of two-locus linkage disequilibrium coefficients. *Theor. Appl. Genet.* 70: 491-496.
- Breseghele F, Sorrells ME. 2006. Association analysis as a strategy for improvement of quantitative traits in plants. *Crop Sci* 46: 1323-1330.
- Brown JS, Phillips-Mora W, Power EJ, Krol C, Cervantes MC, Motamayor JC, Schnell R. 2007. Mapping QTLs for Resistance to Frosty Pod and Black Pod Diseases and Horticultural Traits in *Theobroma cacao* L. *Crop Sci* 47: 1851-1858
- Clément D, Risterucci AM, Motamayor JC, N'Goran JAK, Lanaud C. 2003. Mapping QTL for yield components, vigor, and resistance to *Phytophthora palmivora* in *Theobroma cacao* L. *Genome* 46 : 204-212.



- Faleiro F, Queiroz V, Lopes U, Guimarães C, Pires J, Yamada M, Araújo I, Pereira M, Schnell R, Filho G, Ferreira C, Barros E, Moreira M. 2006. Mapping QTLs for Witches' Broom (*Crinipellis Perniciosa*) Resistance in Cacao (*Theobroma Cacao* L.). *Euphytica* 149, 227:235
- Garnier-Géré P., Dillmann C., 1992. A computer program for testing pairwise linkage disequilibria in subdivided populations. *J. Hered.* 83 : 239.
- Jenning HS. 1917. The numerical results of diverse systems of breeding with respect to two pairs of characters, linked or independent with special relation to the effects of linkage. *Genetics* 2:97-154.
- Lai C, Lyman RF, Long AD, Langley CH & Mackay TFC. 1994. Naturally occurring variation in bristle number and DNA polymorphisms at the scabrous locus of *Drosophila melanogaster*. *Science* 266, 1697-1702.
- Lanaud C, Boulton E, Clapperton J, Cros E, Chapelin M, Risterucci AM, Allaway D, Gilmour M, Cattaruzza A, Fouet O, N'goran JAK and Petithuguenin P. 2003. Identification of QTLs related to fat content, seed size and sensorial traits in *Theobroma cacao* L. In: 14<sup>ème</sup> Conférence internationale sur la recherche cacaoyère. Accra, Ghana, 13-17 Octobre 2003.
- Lewontin RC and Kojima K. 1960. The evolutionary dynamics of complex polymorphism. *Evolution* 14:458-472.
- Loor RG. 1998. Obtención de híbridos de cacao tipo Nacional provenientes de materiales de alta productividad y resistentes a enfermedades. Tesis de Ingeniero Agrónomo. Universidad Técnica de Manabí, Portoviejo, Ecuador.
- Marcano M, Pugh T, Cros E, Morales S, Portillo E, Courtois B, Glaszmann JC, Engels J, Phillips W, Astorga C, Risterucci AM, Fouet O, Gonzalez V, Rosenberg K, Vallat I, Dagert M and Lanaud C. 2006. Adding value to cocoa (*Theobroma cacao* L.) germplasm information with domestication history and admixture mapping. *Theor Appl Genet* 114 : 877-884.
- Pastorelly RD. 1992. Evaluación de algunas características del cacao tipo Nacional, en la zona de Tenguel. Tesis Ing. Agr. Universidad Agraria del Ecuador. Guayaquil, Ecuador.
- Pugh T. 2005. Etude des déséquilibres de liaison dans une collection de cacaoyers (*Theobroma cacao* L.) appartenant au groupe criollo/trinitario et application au marquage génétique des caractères d'intérêt. Thèse de Doctorat, sciences agronomiques. Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier, France.
- Slatkin M. 1999. Disequilibrium mapping of a quantitative-trait locus in an expanding population *Am. J. Hum. Genet.* 64, 1765-1773.
- Thornsberry JM, Goodman MM, Doebley J, Kresovich S, Nielsen D and Buckler ES. 2001. *Dwarf8* polymorphisms associate with variation in flowering time. *Nature Genetics* 28 : 286-289.

- Weir BS and Cockerham CC. 1979. Estimation of linkage disequilibrium in randomly mating populations. *Heredity* 42 : 105-111.
- Werner JD, Borevitz JO, Uhlenhaut NH, Ecker JR, Chory J. 2005. FRIGIDA-independent variation in flowering time of natural *A. thaliana* accessions. *Genetics* 170: 1197–1207.
- Zhang B, Yuan Y, Jia Y, Yu X, Xu Q, and Shen Y. 2005. An association study between polymorphisms in five genes in glutamate and GABA pathway and paranoid schizophrenia, *Eur. Psychiatr.* 20 : 45–49.

## CHAPITRE VI

---

### DISCUSSION GÉNÉRALE, PERSPECTIVES ET CONCLUSION





## CHAPITRE VI

### DISCUSSION GÉNÉRALE, PERSPECTIVES ET CONCLUSION

La variété « Nacional » native d'Équateur peut être considérée de nos jours comme l'unique variété de cacaoyer Forastero au goût typique « ARRIBA » floral. Cette dénomination remonte à plus de trois siècles. En effet, les cacaoyers de la variété Nacional étaient initialement cultivés le long du fleuve Guayas, proche de la ville portuaire Guayaquil. Cependant, suite à la colonisation, les plantations furent déplacées en amont du fleuve entre les affluents Daule et Babahoyo, plus au Nord. C'est dans cette région, nommée plus tard « ARRIBA », que le cacaoyer Nacional exprima le mieux l'arôme floral typique qui porte aujourd'hui le nom « ARRIBA ».

Jusqu'au début de 20<sup>e</sup> siècle, la production de cacao représentait la principale source de revenus de l'économie équatorienne. L'apparition de la moniliose et de la maladie "du balai de sorcière" (1916 et 1919) a entraîné une dévastation rapide des plantations de cacaoyer. Les conséquences furent dramatiques, entraînant une forte baisse de la production de cacao que l'on appelait à l'époque la fève d'or "*pepa de oro*" équatorienne. L'introduction effrénée de génotypes étrangers, provenant majoritairement de l'île de Trinidad, bouleversa totalement la culture du cacaoyer si bien qu'à l'heure actuelle, la quasi-totalité des plantations en Équateur correspondent à un complexe hybride hautement variable appelé "Nacional x Trinitario".

L'objectif général de ce travail de recherche était de mieux appréhender la diversité et la structure génétique de ce complexe hybride de cacaoyers équatoriens. Ces études ont débouché d'une part sur l'identification des individus pouvant représenter la variété Nacional native avant l'introduction des génotypes étrangers, d'autre par sur l'identification de ses ancêtres sauvages les plus probables. Ce travail s'est prolongé par une recherche bibliographique sur les populations humaines de l'Amazonie équatorienne pouvant être à l'origine de la domestication du Nacional. Enfin, une étude prospective a été faite sur l'étendue du déséquilibre de liaison (DL) et l'utilisation potentielle de la population analysée du « complexe Nacional » pour développer des études d'association afin d'avoir une meilleure connaissance des bases génétiques associées à la qualité aromatique du cacao Nacional.

## **1. Analyse de la diversité génétique de la population moderne de cacaoyers en Équateur et identification d'individus représentatifs de la variété Nacional**

L'utilisation efficace des ressources génétiques implique au préalable la connaissance de leur diversité génétique. L'étude de la diversité phénotypique globale de la population est, par ailleurs, un pré-requis important. Plusieurs études ont été menées à l'INIAP (Équateur) afin d'évaluer la diversité morphologique des populations de cacaoyers équatoriens selon les critères morphologiques descriptifs définis par Enriquez et Soria (1968), Engels et al (1980), Soria et Enriquez (1981), Engels (1983a et 1983b), Bekele (1992), Bekele et al (1994). Au cours des dix dernières années, différents travaux de caractérisation morpho-agronomique ont été ainsi conduits sur la collection de ressources génétiques de cacaoyer présente en Équateur. Les données issues de ces recherches ont permis d'identifier quelques individus alliant des caractéristiques originales, proches de la variété Nacional et pouvant être utilisés dans les programmes d'amélioration génétique. Cependant, le niveau de fixation génétique de ces individus, ainsi que le déterminisme génétique de leurs caractères morphologiques restent largement inconnus, et les seuls caractères phénotypiques ne donnent pas une vision claire de la structuration génétique de ce complexe hybride Nacional.

Par ailleurs, les plantations actuelles de cacaoyer en Équateur sont très hétérogènes. En effet, elles sont composées de populations d'arbres hybrides à des degrés variables, principalement entre le génotype Nacional et le Trinitario. Face à l'érosion génétique de la variété originelle de Nacional, les marqueurs moléculaires représentent le meilleur outil permettant d'analyser la structure génétique de cette population, ainsi que le niveau de fixation et d'introgression de ces individus. Chez le cacaoyer, les marqueurs moléculaires ont déjà été utilisés pour des études de diversité génétique (Lanaud, 1987 ; Lerceteau, 1996 ; Motamayor, 2001) ou pour des études de cartographie du génome et d'analyses de QTL (Flament, 1998 ; Flament et al, 2001 ; Clément, 2001 ; Pugh, 2005 ; Marcano et al, 2006).

Dans ce travail nous avons analysé, à l'aide de 40 marqueurs microsatellites bien répartis sur l'ensemble du génome, une population de 322 accessions de cacaoyers modernes équatoriens. L'objectif de cette étude était de déterminer la diversité et la structure génétique de cette population et d'identifier les représentants potentiels de la variété native Nacional.

L'étude proprement dite a mis en évidence un degré élevé d'hétérozygotie pour la quasi totalité des individus. Le calcul de différents paramètres génétiques de la diversité a mis en évidence une large gamme de variabilité entre individus qui pourrait s'expliquer par la présence d'allèles provenant des génotypes étrangers, principalement de type Trinitario, introduits au cours du siècle dernier et qui se sont hybridés avec les variétés natives de Nacional. Cette structure hybride des populations actuelles de cacaoyer en Équateur a été précédemment décrite par Lerceteau et al (1997b).

Un faible niveau de différenciation a été observé entre les accessions provenant des collections CCAT et EETP. Dans le cas de la collection de Tenguel, où les arbres sont disposés en lignes parallèles, certains génotypes étudiés se sont révélés identiques ou très proches mais le manque d'information sur leur provenance rend difficile l'explication de ce résultat. Il est intéressant de signaler que plusieurs arbres de cette collection ont été utilisés dans les programmes d'amélioration génétique depuis la seconde moitié du siècle dernier jusqu'à nos jours. L'utilisation d'arbres génétiquement très proches pourrait expliquer le faible gain génétique obtenu dans les derniers programmes d'amélioration. Nos résultats soulignent l'intérêt d'étudier l'ensemble des accessions de la collection de Tenguel afin de connaître la réelle diversité génétique de ces accessions et de l'exploiter au mieux. En effet, la collection de Tenguel a été sous-exploitée, ou mal exploitée du fait d'une méconnaissance de sa diversité et de la (très probable) mauvaise identification de ses individus. Des observations similaires ont déjà été reportées par Saunders et al (2001) dans la collection internationale de cacaoyers de Trinidad, où un travail d'identification des hors types a été engagé à l'aide de marqueurs moléculaires.

D'autre part, l'étude de la diversité génétique révèle, malgré des niveaux d'hétérozygotie généralement élevés, que certains génotypes présentent des taux d'hétérozygotie plus réduits. La majorité de ces arbres ont été identifiés dans la collection « Selection Nacional ARRIBA » plantée à Pichilingue après les dernières collectes de cacaoyers aromatiques Nacional faites sur le littoral équatorien dans le cadre du projet ECU-B7-3010/93/176 (Deheuvels et al, 2004). Ces arbres, possèdent des allèles spécifiques et communs avec le type Nacional de référence, dont ils sont tous très proches. Notre hypothèse est donc qu'ils pourraient représenter la variété native de Nacional anciennement cultivée au bord du fleuve Guayas et de ses affluents Daule et Babahoyo. L'auto-compatibilité caractérisant les variétés natives de Nacional pourrait, en effet, expliquer les faibles taux

d'hétérozygotie de ces individus, ainsi que la fixation d'allèles spécifiques. Ces arbres pourraient donc être à l'origine du complexe hybride Nacional actuel. Pour tester cette hypothèse nous avons engagé des études de paternité sur ce complexe hybride en considérant plusieurs générations possibles de re-croisements après les premières introductions de cacaoyers étrangers.

Cette approche de paternité nous a permis de conforter nos hypothèses sur l'identification de génotypes à l'origine de ce complexe hybride et qui représentent donc très probablement la variété native « Nacional ». De plus, cette approche nous a permis de préciser la structure génétique de cette population moderne et le nombre de générations de recombinaison probable. D'après nos résultats, on estime que plus de 65% de cette population correspond à des croisements de deuxième génération. En tenant compte du fait que la grande majorité des accessions analysées dans ce travail a été échantillonnée au milieu du siècle précédent, on peut penser que les plantations actuelles de cacaoyer traditionnel en Équateur pourraient correspondre à des hybrides de quatrième ou cinquième génération de croisements, depuis les premières introductions de cacaoyers étrangers dans les plantations natives de Nacional.

Une évaluation du DL nous a montré que de larges fragments de chromosome issus de l'ancêtre Nacional, et pouvant aller jusqu'à 25 cM, étaient conservés au sein de ce complexe hybride. Ces résultats nous permettent d'envisager des études d'association faites sur ce complexe hybride avec une étude globale « genome scan » de l'ensemble du génome s'appuyant sur une densité de marqueurs de l'ordre de 1 marqueur / 10 cM.

La similarité génétique élevée qui existe entre les individus les plus homozygotes identifiés comme la variété native de Nacional contraste avec la grande distance géographique qui sépare les sites de la côte équatorienne où ils ont été collectés. Ces données suggèrent que ces individus pourraient partager une même origine génétique. C'est sur cette nouvelle hypothèse que reposent les travaux qui seront discutés par la suite. Cette dernière hypothèse nous a ainsi amenés à rechercher quels pourraient être les ancêtres sauvages et l'origine géographique de cette variété native.

## **2. Structuration de la diversité globale de l'espèce**



Des collectes de cacaoyers sauvages ont été faites au cours des dernières décennies, en particulier dans les régions amazoniennes du Pérou et de l'Équateur, ainsi qu'en Guyane française. A l'aide de 80 SSR, nous avons analysé 176 individus qui représentent 14 populations de cacaoyers sauvages échantillonnées sur une grande échelle géographique au cours de ces expéditions, ainsi que des représentants des 3 variétés anciennes de cacaoyers non introgressées : Criollo, Forastero bas amazoniens et la variété Nacional (native).

L'analyse de l'ensemble des accessions nous a permis d'observer une forte structuration géographique au sein de la majorité des géotypes analysés. La diversité totale est globalement structurée en 3 sous populations. L'une renferme la majorité des géotypes sauvages d'Équateur, principalement ceux des régions A et B situées plus proches de la Colombie, et tous les cacaoyers de type Criollo qui apparaissent cependant très différenciés de ces géotypes. L'autre sous population, plus diversifiée, contient la majorité des géotypes du Pérou (exceptés les Morona), quelques géotypes d'Amazonie équatorienne, ainsi que les géotypes sauvages prospectés en Guyane et le long de l'Orénoque au Venezuela. A ce groupe se rattachent aussi les géotypes cultivés de basse Amazonie. La quasi totalité des géotypes sauvages de cette dernière sous population se structurent en fonction de leur origine géographique. Malgré un éloignement important des cacaoyers de Guyane, on peut remarquer que ceux-ci semblent le plus proches des Parinari, collectés au Pérou. Une troisième sous population regroupe la majorité des géotypes sauvages collectés dans la région sud de l'Amazonie équatorienne (région C) et le long de la rivière Morona au Pérou, ainsi que les géotypes de Nacional.

Dans cette étude le groupe des cacaoyers sauvages (LCT-EEN) collectés en Équateur représente la source la plus importante de diversité, et des représentants de ces populations se retrouvent dans tous les groupes génétiques. La haute Amazonie a toujours été considérée comme le centre d'origine et de diversité primaire de l'espèce, et l'Amazonie équatorienne est sans doute au cœur de ce centre de diversification primaire. Pour compléter notre vision globale de la diversité de l'espèce, il serait cependant nécessaire d'étendre les prospections de cacaoyers sauvages en Amazonie colombienne pour laquelle on dispose de peu d'échantillons collectés, et d'étendre les analyses en incluant également des géotypes sauvages collectés au Brésil. Le forte similarité des accessions sauvages de Guyane avec les géotypes collectés au nord du Pérou (Parinari et Pound), associée à une moindre diversité génétique et à un niveau d'homozygotie plus élevé, laisse penser que la zone des Guyanes représente un centre de

diversification secondaire qui aurait pu se mettre en place à partir de cette région amazonienne du Pérou.

### 3. Recherche du centre d'origine et des ancêtres sauvages de la variété Nacional

Dans le but de connaître les ancêtres sauvages potentiels de la variété Nacional, nous avons analysé la similarité génétique du Nacional avec les individus qui représentent les populations de cacaoyers sauvages échantillonnées. La distance génétique entre le *pool* Nacional et les autres populations sauvages analysées apparaît significativement corrélée à la distance géographique entre la région côtière (où a été établie la première plantation de Nacional) et les régions de l'Amazonie équatorienne, où ont été collectés les différentes populations sauvages. Ces résultats suggèrent que les cacaoyers représentatifs du *pool* Nacional cultivé sur le littoral pourraient être originaires de la région Sud (région C) de l'Amazonie équatorienne dont les individus apparaissent les plus proches du Nacional, suivis par les accessions provenant de la rivière Morona collectés au Pérou, dans une région proche de la région « C » d'Équateur.

Une analyse de paternité a confirmé que les cacaoyers représentatifs de la variété Nacional gardent un lien de parenté phylogénétique, avec les échantillons collectés dans une zone comprise entre les rivières Yacuambi et Nantgaritza. L'ensemble de ces données génétiques convergent en faveur d'un scénario de domestication et de migration à partir de cette région amazonienne.

Le caractère spécifique de ces variétés Nacional est leur arôme floral, proche de l'arôme « fleur d'oranger ». Cet arôme bien connu, qui caractérise en particulier les huiles essentielles issues de « *Citrus aurantium* » est du en partie à la présence de 50% de linalol. Le linalol est aussi un composé présent dans les variétés Nacional à un taux plus élevé que dans les autres génotypes de cacaoyer. Le linalol est aussi présent chez les Criollo, mais à un taux moins élevé. Des analyses biochimiques de composés volatils sont en cours sur les échantillons de cacao fermenté issu des génotypes LCT-EEN des régions A, B et C situées en Amazonie équatorienne, afin de vérifier la présence de ce composé dans les clones sauvages. Un échantillonnage plus étendu des cacaoyers sauvages du Sud de l'Amazonie équatorienne permettrait cependant de confirmer le centre d'origine génétique et géographique de la variété Nacional suggéré ici.

#### **4. Hypothèses sur les événements précolombiens ayant pu être liées à la domestication du cacaoyer Nacional d'Équateur à partir de la zone amazonienne.**

Le lieu et la manière dont est apparue la domestication des plantes restent peu connus. C'est pourquoi dans le cadre de nos études sur la domestication du cacaoyer, une recherche de données historiques et archéologiques a été réalisée, pour essayer de mieux comprendre les événements possibles liés à la migration du cacaoyer depuis le forêt amazonienne jusqu'à la côte pacifique équatorienne où il a été cultivé. Dans de nombreux cas, l'histoire de la domestication des plantes débute à la préhistoire. Il est de ce fait difficile de déterminer avec précision comment s'est fait le passage de l'état sauvage à l'état cultivé. Les données historiques et archéologiques, couplées à la génétique et à la génomique, permettent d'améliorer la compréhension du processus de domestication et de le placer dans un contexte temporel plus précis.

Nous avons recherché les liens qui auraient pu exister entre les événements de domestication du cacaoyer au cours du temps et les données historiques des populations humaines précolombiennes d'Équateur. Nous aborderons successivement (i) les migrations ou communications des civilisations précolombiennes dans les différents régions d'Équateur, en relation avec la migration du cacaoyer depuis l'Amazonie jusqu'à la côte pacifique où il a été ensuite cultivé, et (ii) les événements liés à la culture du cacaoyer à partir de l'arrivée des espagnols sur le territoire équatorien.

Toutes les plantes cultivées descendent à l'origine d'individus sauvages. La domestication et la sélection de types particuliers supposent la présence, au sein du *pool* sauvage, d'une variation d'origine génétique. L'identification par l'homme de plantes présentant des caractéristiques intéressantes a pu favoriser la culture de leur descendance (Jahier et al, 2006). L'occupation humaine précolombienne en Équateur s'étend sur une très longue période millénaire, durant laquelle se succédèrent plusieurs communautés. Les premières traces d'occupation humaine sur le territoire équatorien sont datées aux environs de 12000 ans avant J.-C. Cependant les recherches archéologiques récentes indiquent la présence humaine avant cette date mais cette information nécessite confirmation. Les premières populations permanentes et organisées sont datées de 4000 ans avant J.-C., ce qui correspond, selon les archéologues, à la « période formative ». Le premier peuple agricole fut la

civilisation Valdivia qui s'installa sur la côte équatorienne vers 3500 ans avant J.-C. Les données historiques et archéologiques indiquent qu'à partir de cette civilisation d'autres groupes précolombiens se sont établis dans différentes régions de la Côte, de la Sierra et de l'Amazonie.

Le développement de l'agriculture a induit, chez les peuples précolombiens, l'apparition de la pratique de la « poterie ». Cet artisanat, tant pour un usage domestique que cérémonial, constitua un art important dans les civilisations apparues plus tard sur la côte : Machalilla et Chorrera. Mille ans environ après l'apparition des Valdivia sur la côte sont apparues les civilisations Cerro Narrio et Cotocollao dans les Andes « La Sierra » et les civilisations Pastaza, Upano et Contundo dans l'Amazonie (Ayala, 1983). L'agriculture a ainsi été propagée lors de migrations humaines et/ou à l'occasion d'échanges commerciaux.

La sédentarisation de ces peuples les a sans doute rendus plus attentifs à leur environnement, favorisant ainsi l'observation et la sélection des plantes. La naissance de l'agriculture s'est aussi enrichie par des échanges d'espèces cultivées. L'abondance des ressources naturelles, la fertilité du sol et la capacité des agriculteurs à produire des surplus, ainsi que le développement des échanges accéléreront la spécialisation des fonctions artisanales, la stratification et la hiérarchisation de sociétés plus importantes.

Les plantes sauvages retrouvées naturellement dans les différentes régions présentent une série de caractéristiques, propriétés morphologiques et physiologiques particulières. Celles-ci sont le résultat d'un long processus d'adaptation aux facteurs physiques et biotiques de leur environnement qui est soumis à une modulation constante par le biais du processus de sélection naturelle (Jahier et al, 2006). Cependant, la situation a été fortement modifiée par l'intervention de l'homme qui procéda à une sélection préférentielle des plantes. Par exemple il est reconnu par les ethnobotanistes que la sélection de graines ou fruits de colorations différentes a été pratique courante parmi les premiers agriculteurs précolombiens. Ces opérations ne constituent pas encore à proprement parler une forme d'agriculture, mais le hasard des manipulations a pu conduire à des sélections dont le succès reconnu a incité à une action programmée (Smith, 1996). Dans certains cas, ces choix étaient guidés par des considérations artistiques, nécrologiques, même religieuses ou comme symbole d'affirmation et d'appartenance à un groupe humain. Chez les civilisations agricoles les plus avancées, la couleur des graines servait de signe d'appartenance à certains groupes ou ethnies humaines.

Par exemple, les graines de variétés de haricot commun (*Phaseolus vulgaris*), dont la testa prenait différentes couleurs selon les régions du Mexique, étaient utilisées comme passeports par les messagers et parlementaires envoyés par les tribus locales pour les échanges ou pour négocier avec le pouvoir aztèque central (Harlan, 1992).

S'étendant le long du piémont oriental des Andes et enfermée entre deux cordillères, la vallée de la rivière Upano au sud de l'Amazonie équatorienne (région c) a connu la naissance (environ 2000 ans avant J.-C.) d'un peuple précolombien nommé « civilisation Upano » (Ochoa et al, 1997 ; Rostain, 1999). La vallée Upano constitue une région spécifique où se rencontrent deux écosystèmes, le paysage est typique de la haute forêt humide amazonienne, mais déjà apparaissent des traits montagnards andins. La localisation frontalière montagne/forêt, les fréquents tremblements de terre et les éruptions volcaniques ont vraiment influencé l'histoire humaine de la vallée de l'Upano. La civilisation Upano a tiré bénéfice de sa situation géographique stratégique, en contrôlant les rares voies de communication entre l'Amazonie et les Andes, les plaçant ainsi au centre des relations commerciales entre les deux milieux (Salazar, 1998, 2000). On sait que des poteries fabriquées dans la vallée de l'Upano étaient expédiées vers des territoires éloignés, notamment vers l'Ouest, à travers ces rares voies de communication, jusqu'à la côte. En effet, les données archéologiques confirment ces échanges entre les habitants du Sud de l'Amazonie équatorienne et ceux des autres régions de l'Équateur depuis 2000 ans avant J.-C.

Les différentes communautés amazoniennes ont, à l'évidence, vécu dans les provinces de Zamora Chinchipe où ont été identifiés les ancêtres potentiels de la variété Nacional, et jusqu'au secteur connu sous le nom de "Cueva de los Tayos", actuelle province de Morona Santiago. Cette région est proche de la vallée de l'Upano, mieux connue au niveau ethnologique, et on peut penser que les échanges commerciaux pouvaient aussi concerner les communautés amazoniennes vivant proche des populations de cacaoyers sauvages à l'origine du Nacional. Ces communications entre l'Amazonie et la côte pourraient donc expliquer l'installation de plantations de cacaoyers sur la côte pacifique faite à partir de semences collectées dans les régions amazoniennes que nous avons ciblées.

##### **5. Voyages interocéaniques précolombiens pouvant être liés à la migration et à la domestication du cacaoyer Criollo hors de son centre d'origine**

Au cours de cette recherche bibliographique nous avons aussi trouvé des informations suggérant que des communautés équatoriennes ont pu interagir de façon plus large sur les transferts de cacaoyers et leur domestication hors de leur centre d'origine. En effet, des données archéologiques et historiques ont révélé l'existence de voyages interocéaniques précolombiens qui ont facilité la communication entre l'Amérique du Sud et l'Amérique centrale. Les civilisations précolombiennes d'Équateur, plus particulièrement les Valdivia ont certainement été les acteurs principaux de ces voyages interocéaniques qui pourraient aider à expliquer la migration d'une autre variété de cacao depuis son centre d'origine vers d'autres régions du continent américain : le Criollo.

Les Valdivia ont construit des "radeaux", dans lesquels ils ont voyagé sur de longues distances, allant jusqu'au port d'Acapulco (Mexique) ou d'autres lieux situés entre les côtes méridionales de l'actuel Mexique et le Guatemala. Il est important de souligner que les données archéologiques montrent que ces voyages océaniques ont été initiés bien avant l'apparition de la première civilisation précolombienne Méso-américaine, les Olmèques. Des migrations et des échanges de plusieurs espèces cultivées, faites à cette époque depuis l'Équateur jusqu'en Amérique centrale ont déjà été suggérés, tels que le manioc (Stone, 1984), le maïs (Staller, 2002), *Bixa orellana* (Schultes, 1984) ou *Cucurbita spp* (Piperno et Stothert, 2003).

Stone (1984) en se basant sur des données archéologiques, ethno-historiques et des datations au carbone 14, fait l'hypothèse de la migration d'autres espèces végétales telles que le manioc, depuis l'Amérique du Sud vers le Mexique. Le manioc, ainsi que le cacao ont été associés à la magie et à la religion par les peuples précolombiens et furent considérés comme un cadeau des dieux ou d'êtres surnaturels. Au Sud de l'Amazonie équatorienne, le manioc était traditionnellement utilisé par toutes les communautés habitant cette région. L'amidon contenu dans les racines tubérisées de cette plante est utilisé comme aliment depuis les temps précolombiens et comme base pour préparer la « *chicha* », boisson stimulante et cérémoniale. Cette tradition ancestrale a été maintenue jusqu'à nos jours. Des vestiges archéologiques associés à la préparation de la *chicha*, telle que des plans de cuisson d'argile ont été retrouvés sur le site d'Altamira (Chiapas au Mexique) et datent d'environ 1500 avant J.-C. ; ils sont accompagnés de récipients en poterie, dont les formes sont étroitement associées à la céramique précolombienne équatorienne (Green and Lowe, 1967).

La migration du cacaoyer depuis l'Amérique du Sud vers la Més-Amérique a été également suggérée précédemment par Stone (1984). Cet auteur suggère que la présence du cacaoyer en Més-Amérique serait liée au commerce de longue distance pratiqué par les Mayas ou par les Olmèques plus anciens. Pour appuyer son hypothèse, Stone suppose que les marchands mayas auraient emporté avec eux des cabosses de cacaoyer, dont ils extrayaient la pulpe sucrée qui recouvre les graines, pour se rafraîchir et pour se nourrir durant les longs trajets qu'ils réalisaient lors de ces échanges commerciaux, dispersant ainsi des graines. A l'inverse de la pulpe, les graines n'étaient pas consommées en raison leur amertume. Cependant, bien que le cacaoyer faisait à l'évidence partie intégrante de la vie des peuples Maya et que les marchands voyageurs de cette civilisation existaient réellement, il est possible que la présence du cacaoyer dans la région Més-américaine remonte à des temps bien antérieurs à l'apparition de la civilisation Maya, voire même avant le développement de la civilisation Olmèque.

La domestication et la diversité génétique des cacaoyers de type Criollo trouvés dans la région Més-américaine a été étudiée par Motamayor (2001), qui a réalisé des prospections dans différents pays d'Amérique Latine (Mexique, Guatemala, Costa Rica, Colombie et Venezuela), incluant les sites archéologiques Maya d'où l'on pensait que la variété Criollo était originaire. D'après Motamayor et al (2002) l'ensemble des individus échantillonnés dans les différents pays correspond à une même population dont la base génétique est très étroite au sein d'une espèce comme le cacaoyer qui est très diverse, suggérant que la domestication aurait pu se faire à partir d'un nombre réduit de semences. Étant donné la plus grande proximité génétique des Criollo avec des cacaoyers sauvages de Colombie, ces auteurs suggèrent que l'origine des Criollo pourraient être sud américaine. Cependant, les événements qui ont probablement conduit à l'apparition du cacaoyer en Més-Amérique sont restés énigmatiques jusqu'à nos jours.

Nos résultats, quant aux populations de cacaoyers sauvages les plus proches des Criollo, corroborent ceux de Motamayor et al (2002). En effet, bien que nous n'ayons pas eu d'échantillons de Colombie à notre disposition, les cacaoyers sauvages collectés dans le nord de l'Équateur, proche de la Colombie, apparaissent les plus proches des Criollo. De nombreuses populations de cacaoyers sauvages existent dans la forêt tropicale du nord de l'Équateur et de la Colombie. Un processus de domestication des Criollo aurait pu être amorcé à partir de ces populations : des semences auraient pu être introduites vers la Côte

pacifique depuis le centre de diversité amazonien par les chemins empruntés par les peuples précolombiens de l'Amazonie ou vivant sur la côte. Ce processus de domestication effectué par les peuples précolombiens est aussi un élément essentiel qui a probablement facilité la fixation des caractères et la spécificité très marquée de cette variété de cacaoyer nommée Criollo. Enfin, les échanges commerciaux fluviaux entre côte pacifique équatorienne et Amérique centrale auraient pu être le support de l'introduction de ces cacaoyers au Mexique où ils prirent ensuite l'essor que l'on connaît sous l'impulsion successive des Olmèques, des Maya et des Aztèques.

Bien que la quasi totalité des données archéologiques sur l'usage précolombien du cacao aient été trouvées en Méso-Amérique, un grand nombre de données indiquent que la région amazonienne du Pérou, de l'Équateur et de la Colombie pourrait être la région d'origine de l'espèce *Theobroma cacao* L. C'est aussi à partir de cette zone qu'ont probablement été initiés les premières étapes de migration et de domestication de cette espèce. Les premiers agriculteurs précolombiens ont sélectionné des plantes possédant des caractéristiques attrayantes telles qu'une bonne saveur, une couleur ou une forme particulière des cabosses. C'est ainsi que des variétés de cacaoyer, telles que le Nacional ou le Criollo, ont probablement pu être sélectionnées puis dispersées au cours d'échanges commerciaux et de migration dont les Valdivia, voyageurs précolombiens de la côte Pacifique vers 2000 ans avant J.C. ont pu être les acteurs.

Il est compliqué de nos jours de préciser ces événements. La plupart des grands sites côtiers préhispaniques ont en effet été détruits et recouverts par des architectures coloniales et modernes sans avoir été préalablement décrits. Cependant, les vallées du Sud de l'Amazonie sont encore très riches en sites et vestiges archéologiques. Il apparaît donc primordial d'accéder à ces sites afin d'identifier et de décrire avec plus de précision les liens qui existent entre les différentes sociétés amérindiennes qui pourraient être à l'origine de la migration des cacaoyers sauvages, à partir de leur centre de diversité.

## **6. La découverte du cacaoyer Nacional par les premiers colonisateurs espagnols et l'expansion de sa culture sur le littoral équatorien.**

On peut considérer que les processus de domestication et de migration n'ont jamais cessés. Cependant après la découverte de l'Amérique par Christophe Colomb commence une



deuxième phase de l'histoire du cacaoyer. C'est à partir de cette période que la culture de types particuliers de cacaoyer tels que le Nacional ou le Criollo a pris réellement de l'ampleur. Ces variétés, devenues des symboles de l'agriculture en Équateur et au Venezuela, se sont étendues à la fois vers d'autres régions d'Amérique et en dehors du continent. Actuellement, les variétés cultivées représentent une très faible part de la diversité génétique réelle de l'espèce et en particulier de l'ensemble des populations représentées en collection. Jusqu'en 1938 où Pound, un chercheur de Trinidad, engagea des prospections au Pérou pour récolter du matériel végétal résistant à la maladie du « balai de sorcière », la dissémination du cacaoyer réalisé par l'homme européen conduisit à la diffusion de peu de variétés à travers le monde, essentiellement 3 principales : le Criollo, le Forastero bas Amazonien de type « amelonado » et leurs formes hybrides Trinitario.

La documentation sur l'histoire du cacaoyer Nacional d'Équateur, ne débute que lors de l'arrivée des espagnols. Les premières plantations de la variété Nacional connurent une popularité grandissante à partir du XVII<sup>ème</sup> siècle. Ainsi, les fèves du cacaoyer Nacional ne tardèrent pas à conquérir le continent européen. La recherche des données historiques que nous avons faites en Équateur a permis de retracer l'histoire des populations natives de cacaoyers, répertoriés au bord du fleuve Guayas par les premiers colonisateurs espagnols. Ces données historiques indiquent que c'est à partir de ces arbres natifs que les premiers colons ont commencé à semer le cacaoyer équatorien qui sera plus tard connu comme « Nacional ». De très vieux arbres de cette variété ont été trouvés en groupes appelés « amacigales », plantés aux abords des rivières de la zone du littoral du pays. Ces cacaoyers présentaient des caractéristiques phénotypiques très proches entre eux.

Ceci peut s'expliquer à la fois par un petit nombre de graines à l'origine des cacaoyers initialement plantés sur la côte, et par un certain degré de fixation déjà observé dans les populations de cacaoyers supposés être à l'origine du Nacional. En effet, au cours de cette étude, on a pu observer que les génotypes LCT-EEN de la région C les plus proches du Nacional présentaient un taux d'homozygotie élevée, comme dans le cas de l'échantillon LCT-EEN 91 (84%). Ces résultats laissent supposer que ces génotypes pourraient être autocompatibles tout comme le sont les Nacional, ce qui pourrait avoir fortement limité les flux de gènes à partir de ce *pool* sauvage.

## 7. Conséquences pour l'enrichissement des ressources génétiques et l'amélioration de la variété Nacional en Équateur

Les résultats de cette étude fournissent un ensemble de données importantes pour la conservation de la variété native d'Équateur appelée Nacional et son amélioration. Jusqu'à aujourd'hui l'Équateur a été l'objet d'un grand nombre d'introductions de semences de cacaoyers étrangers. Cela a eu pour effet d'entraîner une érosion génétique importante, qui s'est déjà manifestée avec la disparition presque complète de la variété Nacional, traditionnellement cultivée sur le littoral. En Équateur, une prise de conscience se fait sentir depuis déjà quelques années pour la conservation de cette variété. Cependant, le problème de la gestion des ressources génétiques chez le cacaoyer équatorien reste posé et une stratégie de gestion des ressources génétiques locales devrait être accompagnée par :

- la recherche et la protection des cacaoyers sauvages et domestiqués qui sont liées à la variété Nacional native ;
- la protection des zones géographiques identifiées comme probablement à l'origine de cette variété ;
- l'élargissement de la variabilité génétique par l'organisation de prospections dans la zone d'origine (région C) et l'enrichissement des collections existantes en Équateur.

Dans le passé la recherche de ressources génétiques de la variété de cacaoyer Nacional s'est concentrée surtout dans le littoral équatorien. Cependant, une grande partie de la région Sud de l'Amazonie de ce pays reste à nos jours inexplorée alors qu'elle renferme sans doute un très gros potentiel pour l'amélioration génétique du Nacional. En effet, ces cacaoyers sauvages qui n'ont pas été directement soumises aux pressions de sélection humaines, pourraient constituer un réservoir de gènes important non seulement pour les caractères aromatiques du cacaoyer mais aussi pour les caractères de résistance aux maladies. De nouvelles prospections dans cette région sont donc dorénavant et déjà envisagés.

### Conclusion

L'étude de diversité génétique du complexe hybride Nacional, faite à l'aide de marqueurs moléculaires, nous a permis d'analyser sa structure génétique et de remonter jusqu'aux ancêtres sauvages probables de la variété native que l'on a pu identifier. Ces résultats nous ouvrent de nouvelles perspectives pour l'enrichissement des ressources

génétiques de cacaoyers aromatiques et l'amélioration de la variété Nacional, ainsi que pour l'étude des déterminants génétiques des caractères de qualité qui pourra être un autre élément important pour progresser plus efficacement dans l'amélioration du Nacional en envisageant des stratégies de sélection assistée par marqueurs.



## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

Références bibliographiques

- Allen BJ and Lass AR. 1983. London cocoa trade Amazon project. Final report phase 1. *Cocoa Grower's Bulletin* 34 : 1-72.
- Alvim PT. 1965. Ecophysiology of cacao tree. *In*: International Cocoa Research Conference, Abidjan, Côte d'Ivoire, November 15-20. pp. 23-35.
- Ampuero E. 1960. Progresos alcanzados en el Ecuador en el estudio de selección para resistencia de la Escoba de Bruja. *In* : Inter American Cacao Conference. Proceeding. Trinidad, Bowen Press., 166-173.
- Andersen JR, Schrag T, Melchinger AE, Zein I and Lübberstedt T. 2005. Validation of *Dwarf8* polymorphisms associated with flowering time in elite European inbred lines of maize (*Zea mays* L.) *Theor Appl Genet* 111 : 206-217.
- Andersen JR, Zein I, Wenzel G, Krützfeldt B, Eder J, Ouzunova M and Lübberstedt T. 2007. High levels of linkage disequilibrium and associations with forage quality at a *Phenylalanine Ammonia-Lyase* locus in European maize (*Zea mays* L.) inbreds. *Theor Appl Genet* 114 : 307-319.
- Archive historique d'Équateur. 1980. *Ministerio de Relaciones Exteriores* del Ecuador.
- Archive historique de Guayaquil. *Banco Central del Ecuador*, Guayaquil.
- Archive de l'EET-Pichilingue. Quevedo, Ecuador.
- Arnheim N, Strange C and Erlich H. 1985. Use of pooled DNA samples to detect linkage disequilibrium of polymorphic restriction fragments and human disease : Studies of the HLA class II loci. *Proc Natl Acad Sci USA* 82 : 6970-6974.
- Arosemena G. 1991. El fruto de los dioses. El cacao en el Ecuador, desde la colonia hasta el ocaso de su industria, 1600-1983. Editorial Graba, Guayaquil, Ecuador.
- Ayala ME. 1983. Nueva historia del Ecuador. Editorial Grijalbo Ecuatoriana.
- Ayala ME. 1988. Nueva historia del Ecuador II. Editorial Grijalbo Ecuatoriana.
- Baker RED and Crowdy SH. 1943. Studies in the witch's broom disease of cocoa caused by *Marasmius perniciosus* Stahel. Part I. Introduction, symptoms and aetology. *Memorial from the Imperial College Tropical Agriculture* 7 : 1-28.
- Bao JS, Corke H and Sun M. 2006. Nucleotide diversity in *starch synthase IIa* and validation of single nucleotide polymorphisms in relation to starch gelatinization temperature and other physicochemical properties in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor Appl Genet* 113 : 1171-1183.
- Barrett SCH. 1992. Genetics of weed invasions. *In* : Applied Population Biology (eds SK Jain & LW Botsford), 91-119. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

- Bartley BG. 1989. La calidad en el mejoramiento genético del cacao. *In* : Manejo del germoplasma de cacao. Turrialba, Costa Rica, pp1-29.
- Bartley BG. 2005. The genetic diversity of cacao and its utilization. CABI Publishing, London, UK.
- Becker-Donner. 1966. Algunos nuevos hallazgos arqueológicos de las culturas costeñas del Ecuador y sus posibles paralelos con México y América Central. *In* : 36 Congreso Internacional de Americanistas, España.
- Bekele FL. 1992. Use of botanical descriptors for cocoa characterization : CRU experiences. *In* : International workshop on conservation, characterization and utilization of cocoa genetic resources in the 21<sup>st</sup> Century. Port of Spain, Trinidad, September 13-17<sup>th</sup>, pp. 77-91.
- Bekele FL, Kennedy AJ, Mc David C, Lauckner B and Bekele I. 1994. Numerical taxonomic studies on cocoa (*Theobroma cacao* L.) in Trinidad. *Euphytica*, 75: 23-240.
- Beckmann JS and Weber JL. 1992. Survey of human and rat microsatellites. *Genomics* 12 : 627-631.
- Belkhir K, Borsa P, Chikhi L, Raufaste N and Bonhomme F. 2004. GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations, Laboratoire Génome, Populations, Interactions; CNRS UMR 5000; Université Montpellier II, Montpellier (France).
- Benzecri JP. 1973. L'analyse des données. Tome 2 : L'analyse des correspondances. Dunod (eds), Paris, France.
- Bernatzky R and Tanksley SD. 1986. Towards a saturated linkage map in tomato based on isozymes and random cDNA sequences. *Genetics* 112 : 887-898.
- Borhegyi S F. 1961. Pre-Columbian cultural connections between Mesoamerica and Ecuador. Middle American Research Institute. New Orleans. Vol II. 18 : 143-156.
- Botstein D, White RL, Skolnick M and Davis RW. 1980. Construction of a genetic map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet* 32 : 314-331.
- Bowman GF. 1950. Quality in cacao. Cacao information bulletin, IICA (Costa Rica) 2, 5 : 14.
- Boyer J. 1970. Influence des régimes hydrique, radiatif et thermique du climat sur l'activité végétative et la floraison de cacaoyers cultivés au Cameroun. *Café, Cacao, Thé*, 14 : 189-200.
- Braudeau J. 1970. El cacao. Técnicas agrícolas y producciones tropicales. Blume. Barcelona, España. 207p.
- Brerton P, Hague M and Wood R. 1994. The determination of theobromine in cocoa and chocolate products ; collaborative trials. *J. Assoc Publ Analyst* 30 : 49-54.

- Brown JS, Schnell RJ, Motamayor JC, Lopes U and Kuhn DN. 2005. Resistance gene mapping for witches' broom disease in *Theobroma cacao* L. in an f2 population using ssr markers and candidate genes. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 130(3) : 366-373.
- Buckler ES. 2001. TASSEL : Trait Association, Evolution, and Linkage Analysis software package. Available at <http://www.maizegenetics.net>
- Buckler ES and Thornsberry J. 2002. Plant molecular diversity and applications to genomics. *Curr Opin Plant Biol* 5 : 107-111.
- Buckler ES, Gaut BS and McMullen MD. 2006 Molecular and functional diversity of maize. *Curr Opin Plant Biol* 9 : 172-176.
- Buntjer JB, Sorensen AP and Peleman JD. 2005. Haplotype diversity: the link between statistical and biological association, *Trends Plant Sci*. 10 : 466-471.
- Burr B, Burr FA, Thompson KH, Albertsen MC and Stuber CW. 1988. Gene mapping with recombinant inbreds in maize. *Genetics* 118 : 519-526.
- Chalmers W S. 1968. Cacao collecting trip to the Oriente of Ecuador (November 1968). CRU, Port of Spain, Trinidad and Tobago, 4 p.
- Chao S, Sharp PJ, Worland AJ, Warham EJ, Koebner RMD and Gale MD. 1989. RFLP-based genetic maps of wheat homeologous group 7 chromosomes. *Theor Appl Genet* 78 : 495-504.
- Charrier A. 1969. Contribution à l'étude de la morphogénèse et de la multiplication végétative du cacaoyer (*Theobroma cacao* L.). *Café, Cacao, Thé* 13 : 97-114.
- Cheesman EE. 1944. Notes on the nomenclature, classification and possible relationships of cacao populations. *Trop Agric* 21 : 144-159.
- Clapperton J, Yow Tow Keung S, Lim Hong Kee D and Lockwood R. 1993. Genetic variation in cocoa flavour. In : 11ème Conférence Internationale sur la Recherche Cacaoyère. Yamoussoukro, Côte d'Ivoire, pp 749-754.
- Clément D. 2001. Cartographie de QTL contrôlant des caractères d'intérêt chez le cacaoyer (*Theobroma cacao* L.). Thèse de doctorat, INA, Paris-Grignon, 156p.
- Clément D, Risterucci AM, Motamayor JC, N'Goran JAK, Lanaud C. 2003. Mapping QTL for yield components, vigor, and resistance to *Phytophthora palmivora* in *Theobroma cacao* L. *Genome* 46 : 204-212.
- Coe MD. 1973. The Maya scribe and his world. New York : Grolier club.
- Coe SD and Coe MD. 1996. The true history of chocolate. Thames and Hudson, London, UK.
- Cope FW. 1958. Incompatibility in *Theobroma cacao*. *Nature* 181 : 279.



- Cope FW. 1959. Nuclear fusion and non-fusion in *Theobroma cacao* L. *Nature* 183 : 1540.
- Cope FW. 1962. The mechanism of pollen incompatibility in *Theobroma cacao* L. *Heredity* 17 : 157-182.
- Cuatrecasas J. 1964. Cacao and its allies: a taxonomic revision of the genus *Theobroma*. *Contributions from the United States Herbarium* 35 : 379-614.
- Crawford de Roberts L. 1980. *El Ecuador en la época cacaotera: respuestas locales al auge y colapso en el ciclo monoexportador*. Quito : Edit. Universitaria, 276 p.
- Cros E. 1994. Facteurs du développement de l'arôme cacao. Séminaire ADRIA: « Arôme protéines et dérivés ». Paris.
- Cros E and Jeanjean N. 1995. Qualité du cacao. Influence de la fermentation et du séchage. *Plantation, recherche, développement*. 3 : 21-27.
- Cros E, Mermet G, Jeanjean N and Georges G. 1993. Relation précurseurs développement de l'arôme cacao. 11ème Conférence Internationale sur la Recherche Cacaoyère. Yamoussoukro, Côte d'Ivoire, pp 723-726.
- Deheuvels O, Decazy B, Perez R, Roche G and Amores F. 2004. The first Ecuadorean Nacional cocoa collection based on organoleptic characteristics. *Trop. Sci.* 44 : 23-27.
- Demol J. 2002. L'amélioration des plantes. Application aux principales espèces cultivées en régions tropicales. Ed. Presses Agronomiques Gembloux. 560 p.
- Devey ME, Bell JC, Uren TL and Moran GF. 2002. A set of microsatellite markers for fingerprinting and breeding applications in *Pinus radiata*. *Genome* 45 : 984-989.
- Dervin C. 1992. Analyses des Correspondances. Comment interpréter les résultats? Collection STAT-ITCF. Paris, France.
- Díaz del Castillo B. 1568. *Historia verdadera de la conquista de la Nueva España*, México. Editorial Pedro Robredo, 1944.
- Dias LAS. 2001. Melhoramento genético do cacauero. Viçosa:FUNAPE.
- Dias LAS, Barriga PJ, Kageyama YP and Almeida CV. 2003. Variation and its distribution in wild cacao populations from the Brazilian Amazon. *Brazilian Archive of biology and technology* 46 : 507-514.
- Durand FJ. 1967. El cacao entre los aztecas. Estudios de la cultura Náhuatl 7. México p155-181.
- Eilif VM. 1948. "Ecuadorean Soils and Some of Their Fertility Properties." Thesis of PhD. Cornell University, New York. 316 p.

- Ellstrand NC and Elam DR. 1993. Population genetic consequences of small population size: implications for plant conservation. *Annual Review of Ecology Systematics* 24 : 217-242.
- Engels JMM, Bertley BGD, Enriquez GA. 1980. Cacao descriptors their states and modus operanti. Turrialba, 30: 209-218.
- Engels JMM. 1983a. A systematic description of cacao clones. I. The discriminative value of quantitative characteristics. *Euphytica* 32:377-385.
- Engels JMM. 1983b. A systematic description of cacao clones. II. The discriminative value of quantitative characteristics and the practical compatibility of the discriminative value of quantitative and qualitative descriptors. *Euphytica* 32:719-733.
- Enriquez GA. 1980. Mejoramiento en cacao (*Theobroma cacao* L). In: mesa redonda sobre cacao. Guayaquil, Ecuador. 17p.
- Enriquez GA. 1985. Curso sobre el cultivo del cacao. CATIE, Turrialba, Costa Rica.
- Enriquez GA. 1987. Manual de cacao para agricultores. CATIE, ACRI, UNED. San José, Costa Rica.
- Enriquez GA. 1992. Characteristics of cacao “Nacional” of Ecuador. International workshop on conservation, characterisation and utilisation of cocoa genetic resources in the 21<sup>st</sup> century. Port of Spain, Trinidad 13-17<sup>th</sup> September. The Cocoa Research Unit, The University of the West Indies, pp 269-278.
- Enriquez GA and Soria J. 1968. The variability of certain bean characteristics of cacao (*Theobroma cacao* L.) *Euphytica*, 17 : 4-20.
- Escofier B et Pagès J. 1990. Analyses factorielles simples et multiples. Paris: Dunod.
- Eskes, A.B. and Y. Efron, editors. 2006. Global Approaches to Cocoa Germplasm Utilization and Conservation. Final report of the CFC/ICCO/IPGRI project on “Cocoa Germplasm Utilization and Conservation: a Global Approach” (1998-2004). CFC, Amsterdam, The Netherlands/ICCO, London, UK/IPGRI, Rome, Italy.
- Espinosa J, Mite F, Cedeño S, Barriga S and Andino J. 2006. GIS Based Site-Epecific Management of Cocoa. *Better Crops with plant food* 90 : 36-39.
- Fahima T, Röder MS and Wendehake K. 2002. Microsatellite polymorphism in natural populations of wild emmer wheat, *Triticum dicoccoides*, in Israel. *Theor Appl Genet* 104 : 17-29.
- Falconer DS. 1989. Introduction to quantitative genetics. 3rd Ed. Longman Scientific and Technical, Essex, England.
- Faleiro FG, Queiroz VT, Lopes UV, Guimaraes CT, Pires JL, Yamada MM, Araujo IS, Pereira MG, Schnell RJ and De Souza Filho GA. 2006. Mapping QTLs for

- Witches'Broom (*Crinipellis pernicioso*) Resistance in cacao (*Theobroma cacao* L.). *Euphytica*. 149 : 227-235
- Falque M. 1994. Fécondation et développement des fruits et des graines chez le cacaoyer (*Theobroma cacao* L.). Influence de l'irradiation du pollen et de l'intensité de la pollinisation. Thèse de Doctorat, Institut National Polytechnique de Toulouse. France. 175 p.
- Fielding A. 1992. Axiomatic Approaches to Scoring Ordered Classifications. University of Birmingham, Department of Economics, Discussion Paper 92-06.
- Fisher RA. 1918. The correlation between relatives on the supposition of Mendelian inheritance. *Trans Roy Soc Edin* 52 : 399-433.
- Flament MH. 1998. Cartographie génétique de facteurs impliqués dans la résistance du cacaoyer (*Theobroma cacao* L.) à *Phytophthora megakaria* et à *Phytophthora palmivora*. Thèse de Doctorat, Ecole Nationale Supérieure agronomique de Montpellier, Ministère de l'Agriculture, Montpellier, France. 113 p.
- Flament MH, Kele I, Clement D, Pieretti I, Risterucci AM, N'Goran JAK, Cilas C, Despréaux D and Lanaud C. 2001. Genetic mapping of resistance factors to *Phytophthora palmivora* in cocoa. *Genome* 44 : 79-85.
- Flint-Garcia SA, Thornsberry JM and Buckler ES. 2003. Structure of linkage disequilibrium in plants. *Annu. Rev. Plant. Biol.* 54 : 357-374.
- Ford JA. 1969. A comparison of formative cultures in the Americas. *In*: Contribution to Anthropology 11. Smithsonian Institution, Washington D. C.
- Fowler R. 1952. Característica del cacao Nacional. Notas técnicas. Turrialba, Costa Rica. 2 : 1-165.
- Fowler RL and Lopez GH. 1949. *The Cacao Industry of Ecuador*. Foreign Agriculture Report N°34, US Dept of Agriculture, Washington.
- Garcia J. 2001. Cacao and Marker Assisted Selection. Food of the Gods. *In* : Agricultural Research. Journal of Agricultural Research Services U.S. August, pp10-11.
- Gaudeul M, Taberlet P and Till-Bottraud I. 2000. Genetic diversity in an endangered alpine plant, *Eryngium alpinum* L. (*Apiaceae*), inferred from amplified fragment length polymorphism markers. *Molecular Ecology* 9 : 1625-1637.
- Gebhardt C, Ritter E, Barone A, Debener T, Walkemeier B, Schachtschabel U, Kaufmann H, Thompson RD, Bonierbale MW, Ganai MW, Tanksley SD and Salamini F. 1991. RFLP maps of potato and their alignment with the homeologous tomato genome. *Theor Appl Genet* 83 : 49-57.
- Goding FW. 1921. "Cacao Growing". Consulado general de Estados Unidos de Norteamérica en Guayaquil.

- Green DF and Lowe GW. 1967. Altamira and Padre Piedra, Early Preclasic Sites in Chiapas, Mexico. *New Archaeological Foundation* 20:56-57.
- Gupta PK, Balyan HS, Edwards KJ, Isaac P, Korzun V, Röder M, Gautier M-F, Joudrier P, Schlatter AR, Dubcovsky J, De la Pena RC, Khairallah M, Pennier G, Jordan M, Hayden MJ, Sharp P, Keller B, Wang RCC, Hardouin JP, Jack P, Charef B and Leroy P. 2002. Genetic mapping of 66 new microsatellite (SSR) loci in bread wheat. *Theor. Appl. Genet.* 105 : 413-422.
- Hachet S et Boistelle C. 1993. Chocolat et chocolats. Ed. Dormonval. 251 p.
- Harlan JR. 1992. Crops and Man. American Soc. Agronomy. *Crop Science Society of America*, Madison, Wisconsin. 2ème édition. Chapitres 3-7: pp 61-168.
- Harland, SC. 1925. Studies in Cacao. The method of pollination. Ninth West Indian Agr. Conf. Proc. Kingston, Jamaica, 1924 : 61 - 69.
- Hartl DL and Clark AG. 1997. Principles of Population Genetics, 3<sup>rd</sup> edn. Sinauer Associates, Sunderland, MA
- Hasenstein KH and Zavada MS. 2001. Auxin modification of the incompatibility response in *Theobroma cacao* L. *Physiologia Plantarum* 112 : 113-118.
- Helentjaris T, Slocum M, Wright S, Schaeffer A and Nienhuis J. 1986. Construction of genetic linkage maps in maize and tomato using restriction fragment length polymorphisms. *Theor Appl Genet* 72 : 761-769.
- Hirschhorn JN, Lohmueller K, Bryne E and Hirschhor K. 2002. A comprehensive review of genetic association studies. *Gen Med* 4 : 45-61.
- Hurst WJ, Tarka SM, Powis TG, Valdez F and Hester RT. 2002. Archaeology: cacao usage by the earliest Maya civilization. *Nature* 418 : 289-290.
- International Cacao Organization (ICCO). 2006. Statistiques de la consommation mondiale de cacao.
- International Cacao Organization (ICCO). 2007. Bulletin trimestriel sur les statistiques de production de cacao. Vol. XXXIII, N° 1, année cacaoyère 2006/07.
- Jahier J, Chalhoub B and Charcosset A. 2006. La domestication des plantes : de la cueillette à la post-génomique. *Biofutur* 266 : 28-33.
- Jambu M. 1989. Exploration informatique et statistique des données. Paris : Dunod.
- Jeanjean N. 1995. Influence du génotype, de la fermentation et de la torréfaction sur le développement de l'arôme cacao. Rôle des précurseurs d'arôme. Thèses de Doctorat, Université de Montpellier II. France. 200 p.

- Jomphe V. 2006. Comparaison de la puissance de test de déséquilibre de liaison dans les études génétiques. Mémoire du grade de Maître ès Sciences. Faculté des sciences et de génie, Université Laval, Québec, Canada.
- Juan A, Crespo BM, Cowan SR, Lexer C and Fay FM. 2004. Patterns of variability and gene flow in *Medicago citrine*, an endangered endemic of islands in the western Mediterranean, as revealed by amplified fragment length polymorphism (AFLP). *Molecular Ecology* 13 : 2679-2690.
- Justeson JS, Norman WM, Campbell L and Kaufman T. 1985. *The Foreign Impact on Lowland Mayan Language and Script*. Middle American Research Institute Publication 53.
- Karp A, Kresovich S, Bhat KV, Ayad WG and Hodgkin T. 1997. Molecular tools. In: plant genetic resources conservation: a guide to the technologies. IPGRI bulletin 2. 47p.
- Kashi Y and Soller M. 1999. Functional roles of microsatellites and minisatellites. In: Goldstein DB, Schlötterer C (eds) *Microsatellites: evolution and application*. Oxford University Press, Oxford, pp 10-23.
- Kashi Y, King D and Soller M. 1997. Simple sequence repeats as a source of quantitative genetic variation. *Trends Genet* 13 : 74-78.
- King DG and Soller M. 1999. Variation and fidelity: the evolution of simple sequence repeats as functional elements in adjustable genes. In: Wasser SP (ed) *Evolutionary theory and processes: modern perspectives. Papers in honor of Eviatar Nevo*. Kluwer, The Netherlands, pp 65-82.
- Knight R and Rogers H. 1953. Sterility in *Theobroma cacao* L. *Nature* 172 : 164.
- Knight R and Rogers H. 1955. Incompatibility in *Theobroma cacao* L. *Heredity* 9 : 69-77.
- Knight I. 1999. *Chocolate and Cocoa Health and Nutrition*. Blackwell Science Ltd, Oxford
- Davidson, A. *Chocolate botany and early history*. In : *The Oxford Companion to Food*. (1999) Oxford University Press, Oxford.
- Lachenaud P et Sallée S. 1993. Les cacaoyers spontanés de Guyane : localisation, économie et morphologie. *Café, Cacao, Thé*, 37 : 101-114.
- Lachenaud P, Mooleedhar V, Caouturier C. 1997. Les cacaoyers spontanés de Guyane : Nouvelles prospections. *Plantations, Recherche, Développement* 4 : 25-32.
- Lanaud C. 1987. Nouvelles données 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. Thèse de Doctorat d'Etat, Université Paris-Sud, Orsay.
- Lanaud C, Ham P and Duperray C. 1992. Estimation of nuclear DNA content of *Theobroma cacao* L. by flow cytometry. *Café, Cacao, Thé* 36 : 3-8.

- Lanaud C, Risterucci AM, Pieretti I, Falque M, Bouet A, and Lagoda P. 1999. Isolation and characterisation of microsatellites in *Theobroma cacao* L. *Molecular Ecology* 8 : 2141-2152.
- Lanaud C, Boulton E, Clapperton J, Cros E, Chapelin M, Risterucci AM, Allaway D, Gilmour M, Cattaruzza A, Fouet O, N'goran JAK and Petithuguenin P. 2003. Identification of QTLs related to fat content, seed size and sensorial traits in *Theobroma cacao* L. In: 14<sup>ème</sup> Conférence internationale sur la recherche cacaoyère. Accra, Ghana, 13-17 Octobre 2003.
- Lanaud C, Risterucci AM, Pieretti I, N'Goran JAK and Fargeas D. 2004. Characterization and genetic mapping of resistance and defence gene analogs in cocoa (*Theobroma cacao* L.). *Mol Breeding* 13 : 211-227.
- Lande R and Thompson R. 1990. Efficiency of marker-assisted selection in the improvement of quantitative traits. *Genetics* 124 : 743-756.
- Lander ES and Botstein D. 1989. Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics* 121 : 185-199.
- Lander ES and Schork NJ. 1994. Genetic dissection of complex traits. *Science* 265 : 2037-2048.
- Landry BS, Kesseli R, Farrara B and Michelmore RW. 1987. A genetic map of lettuce (*Lactuca sativa* L.) with restriction fragment length polymorphism, isozyme, disease resistance and morphological markers. *Genetics* 116 : 331-337.
- Lang J. 1975. Conquest and Commerce, Spain and England in the Americas. Academic Press. New York.
- Laurent V, Risterucci AM and Lanaud C. 1993a. Variability for nuclear ribosomal genes within *Theobroma cacao*. *Heredity* 71 : 96-103.
- Laurent V, Risterucci AM and Lanaud C. 1993b. Chloroplast and mitochondrial DNA diversity in *Theobroma cacao*. *Theor. Appl. Gen.* 87 : 81-88.
- Laurent V, Risterucci AM and Lanaud C. 1994. Genetic diversity in cocoa revealed by cDNA probes. *Theor. Appl. Gen.* 88 : 193-198.
- León J. 1987. Botánica de los cultivos tropicales. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA). San José, Costa Rica, 445p.
- Lerceteau E. 1996. Diversité génétique, recherche de QTL et analyse des profils protéiques de fèves de *Theobroma cacao* L. pendant la fermentation. Conséquences sur la qualité. Thèse de Doctorat. Université de Paris-Sud.
- Lerceteau E, Robert T, Pétiard V and Cruzillat D. 1997a. Evaluation of the extent of genetic variability among *Theobroma cacao* L. accessions using RAPD and RFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics* 95 : 10-19.

- Lerceteau E, Flipo S, Pétiard V and Crouzillat D. 1997b. Genetic differentiation among Ecuadorian *Theobroma cacao* L. accessions using molecular and morphological analyses. *Euphytica* 95 : 77-87.
- Lewontin R. 1964. The interaction of selection and linkage. I. General considerations: heterotic models. *Genetics* 49 : 49-67
- Liu K and Muse VS. 2005. Power Marker: Integrated analysis environment for genetic marker data. *Bioinformatics* 21 : 2128-2129.
- Lockwood G. 1976. A comparison of the growth and yield during a 20 year period of Amelonado and Upper Amazon hybrid cocoa (*Theobroma cacao*) in Ghana. *Euphytica* 24 : 647-658.
- Loor RG. 1998. Obtención de híbridos de cacao tipo Nacional provenientes de materiales de alta productividad y resistentes a enfermedades. Tesis de Ingeniero Agrónomo. Universidad Técnica de Manabí, Portoviejo, Ecuador.
- Loor RG. 2002. Caracterización morfológica y molecular de 37 clones de cacao (*Theobroma cacao* L.) Nacional de Ecuador. Tesis de Maestro en Ciencias. Colegio de Postgraduados, Montecillo, Texcoco, Edo de México.
- Marcano M, Pugh T, Cros E, Morales S, Portillo E, Courtois B, Glaszmann JC, Engels J, Phillips W, Astorga C, Risterucci AM, Fouet O, Gonzalez V, Rosenberg K, Vallat I, Dagert M and Lanaud C. 2006. Adding value to cocoa (*Theobroma cacao* L.) germplasm information with domestication history and admixture mapping. *Theor Appl Genet* 114 : 877-884.
- Marshall TC, Slate J, Kruuk LEB and Pemberton JM. 1998. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology* 7 : 639-655.
- McCouch SR, Kochert G, Yu ZH, Wang ZY, Kush GS, Coffman WR and Tanksley SD. 1988. Molecular mapping of rice chromosomes. *Theor Appl Genet* 76 : 815-829.
- Michelmore R, Paran I and Kesseli RV. 1991. Identification of marker linked to disease resistance gene by bulk segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions using segregating populations. *Proc Natl Acad Sci USA* 88 : 9828-9832.
- Moreno M. 1970. Determinación de la autocompatibilidad y la compatibilidad cruzada de sesenta clones de cacao. Tesis Ing. Agr. Universidad de Guayaquil, Ecuador.
- Morgante M and Olivieri AM. 1993. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *The Plant Journal* 3 : 175-182.
- Morris D. 1882. Cocoa : how to grow and how to cure it. Jamaica, pp 1-45.
- Mossu G. 1990. Le cacaoyer. Le technicien d'agriculture tropicale, Maisonneuve et Larose, Paris, France.

- Mossu G., Paulin D., De RP. 1981. Influence de la floraison et de la pollinisation sur les rendements du cacaoyer. Liaisons mathématiques entre les données expérimentales. Equation du rendement. *Café, Cacao, Thé*, 25 : 155-168.
- Motamayor JC. 2001. Etude de la diversité génétique et de la domestication des cacaoyers du groupe Criollo (*Theobroma cacao* L.) à l'aide de marqueurs moléculaires. Thèse de doctorat, Université Paris XI, Orsay, France.
- Motamayor JC, Risterucci AM, Lopez PA, Ortiz CF, Moreno A and Lanaud C. 2002. Cacao domestication I: the origin of the cacao cultivated by the Mayas. *Heredity* 89 : 380-386.
- Motamayor JC, Risterucci AM, Heath M and Lanaud C. 2003. Cacao domestication II: progenitor germplasm of Trinitario cacao cultivar. *Heredity* 91: 322-330.
- Mullis KB and Faloona F. 1987. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase chain reaction. *Methods Enzymol* 155 : 335-350.
- Nei M. 1972. Genetic distance between populations. *Am Nat* 106 : 283-292.
- Nei M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89 : 583-590.
- N'Goran JAK, Laurent V, Risterucci AM and Lanaud C. 1994. Comparative genetic diversity of *Theobroma cacao* L. using RFLP and RAPD markers. *Heredity* 73 : 589-597.
- N'Goran JAK, Laurent V, Risterucci AM and Lanaud C. 2000. The genetic structure of cocoa populations (*Theobroma cacao* L.) revealed by RFLP analysis. *Euphytica* 115 : 83-90.
- Nosti JJ. 1953. Cacao, café y té. Editorial Salvat, Barcelona. pp 88-91.
- O'Brien S. 1994. A role for molecular genetics in biological conservation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91: 5748-5755.
- Ochoa M, Rostain S, Salazar E. 1997. Montículos precolombinos en el Alto Upano. Cultura, Banco Central del Ecuador, Quito 2:63-73.
- Oswald M. 2006. Déterminisme génétique de la biosynthèse des terpénols aromatiques chez la vigne. Thèse de doctorat, Université Louis Pasteur, Strasbourg I. 126p.
- Othick, J. 1976. The cocoa and chocolate industry in the nineteenth century. In The Making of the modern British Diet. Edité par Derek Oddy and D. S. Miller, Croon Helm, London Schenker, S. Chocolate. *British Nutrition Foundation Bulletin* (2000) 25 : 199-200.
- Oviedo GF. 1944. Historia general y natural de las Indias, Madrid. 246 p.



- Palaisa KA, Morgante M, Williams M and Rafalski A. 2003. Contrasting effects of selection on sequence diversity and linkage disequilibrium at two phytoene synthase loci. *Plant Cell* 15 : 1795-1806.
- Pastorelly RD. 1992. Evaluación de algunas características del cacao tipo Nacional, en la zona de Tenguel. Tesis Ing. Agr. Universidad Agraria del Ecuador. Guayaquil, Ecuador.
- Paulin D, Decazy B, Coulibaly N. 1983. Etude des variations saisonnières des conditions de pollinisation et de fructification dans une cacaoyère. *Café, Cacao, Thé*, 27 : 165-176.
- Paulin D and Eskes AB. 1995. Le cacaoyer: stratégie de sélection. *Plantations, recherche, développement* 2 : 5-13.
- Pearsall DM and Piperno DR. 1990. Antiquity of maize cultivation in Ecuador: Summary and re-evaluation of evidences. *American Antiquity* 55 : 324-336.
- Perrier X, Flori A and Bonnot F. 2003. Data analysis methods. In: Hamon P, Seguin M, Perrier X, Glaszmann JC. Ed., Genetic diversity of cultivated tropical plants. Enfield, Science Publishers. Montpellier, France pp 43-76.
- Petithuguenin P et Roche G. 1995. Équateur : la filière cacao, bilan et perspectives. *Plantations, recherche, développement* 2 : 15-21.
- Phillips D. 1995. Correspondence analysis. Social Research Update. Department of Sociology, University of Surrey, Guildford GU2 7XH, England.
- Pike E. 1932. La propagación vegetative en cacao. Reporte anual de investigación en cacao. Colegio Imperial de Agricultura Tropical, Trinidad 2:3-9.
- Piperno DR and Stothert KE. 2003. Phytolith evidence for early Holocene *Cucurbita* Domestication in Southwest Ecuador. *Science* 299: 1054-1057.
- Plaza S. 1976. La incursion Inca en el septentrion andino ecuatoriano. Otavalo, I.O.A.
- Portillo Paez E. 2006. Caracterisation de l'arôme du cacao de type Criollo : influence des conditions de traitement post-récolte. Thèse de Doctorat, sciences des aliments. Université de Montpellier II.
- Posnette AF. 1950. The pollination of cacao in the gold coast. *Journal of Horticultural Science* 25 : 155-163
- Pound FJ. 1932. Studies in fruitfulness in cacao, II. Evidence for partial sterility. First Annual Report on Cacao Research 1931, Imperial College of Tropical Agriculture (Trinidad) : 26-28.
- Pound FJ. 1938. Cacao and Witches' broom disease (*Marasmius perniciosus*) of South America, with notes on other species of *Theobroma*. Yuille's Printerie, Port of Spain, Trinidad and Tobago, 9-49. (Reprinted 1982, *Archives of Cocoa Research* 1 : 21-64).

- Pound FJ. 1945. A note about the cacao populations of South America. *Report and Proceedings Cocoa Research Conference, London*. Colonial 192 : 95-7. (Reprinted 1982 in *Arch. Cocoa Res* 1: 93-97).
- Prescott HW. 1847. *History of the Conquest of Peru*. New York, A. L. Burt Co. pp. 192-243.
- Preuss P. 1901. *Expedition nach Central and Sudamerika 1899/1900*. Verlag des Kolonial-Wirtschaftlichen Komitees (Berlin).
- Pritchard JK, Stephens M, Rosenberg NA and Donnelly P. 2000. Association mapping in structured populations. *Am J Hum Genet* 37 : 170-181.
- Proyecto Cacao. 2000. El cacao Nacional del Ecuador. Memorias de las actividades del Proyecto ECU-B7-3010/93/176. Reactivación de la producción y mejora de la calidad del cacao en Ecuador 1996-2000. Guayaquil, Ecuador. 146 p.
- Pugh T, Fouet O, Risterucci AM, Brottier P, Abouladze M, Deletrez C, Courtois B, Clement D, Larmande P, N’Goran JAK and Lanaud C. 2004. A new cacao linkage map based on codominant markers: development and integration of 201 new microsatellite markers. *Theor Appl Genet* 108 : 1151-1161.
- Pugh T. 2005. Etude des déséquilibres de liaison dans une collection de cacaoyers (*Theobroma cacao* L.) appartenant au groupe criollo/trinitario et application au marquage génétique des caractères d’intérêt. Thèse de Doctorat, sciences agronomiques. Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier, France.
- Purseglove JW. 1968. *Theobroma* L. In : Purseglove J. W. (ed). Tropical crops. Dicotyledons 2. John Wiley and Sons Inc. pp. 571-599.
- Queiroz VT, Guimaraes CT, Anherth D, Schuster I, Daher RT, Pereira MG, Miranda VRM, Loguercio LL, Barros EG and Moreira MA. 2003. Identification of a major QTL in cocoa (*Theobroma cacao* L.) associated with resistance to witches’ broom disease. *Plant Breeding* 122 : 268-272.
- Quiroz J. 1990. Estudio de la compatibilidad en algunos cultivares de cacao (*Theobroma cacao* L.). Tesis de Ing. Agr. Universidad Técnica de Babahoyo. Babahoyo, Ecuador.
- Quiroz J. 2002. Caracterización molecular y morfológica de genotipo superiores de cacao nacional (*Theobroma cacao* L.) de Ecuador. Tesis Ms. Sc. Turrialba, CR, Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza.
- Rahman MH and Rajora OP. 2002. Microsatellite DNA fingerprinting, differentiation, and genetic relationships of clones, cultivars, and varieties of six poplar species from three sections of the genus *Populus*. *Genome* 45 : 1083-1094.
- Reents-Budet D. 1996. Classic Maya Pottery Vessels: Social Rituals and Cosmological Rites. In : 14th Annual Maya Weekend, University Museum, University of Pennsylvania, March 30-31.

- Reichel-Dolmatoff and Dussan de Reichel A. 1956. Momil: Excavaciones en el Sinú". *Revista Colombiana de Antropología* 5:111-333.
- Remington DL, Thornsberry JM, Matsuoka Y, Wilson LM, Whitt SR, Doebley J, Kresovich S, Goodman MM and Buckler ES. 2001. Structure of linkage disequilibrium and phenotypic associations in the maize genome, *Proc Natl Acad Sci USA* 98 : 11479-11484.
- Risch N, and Merikangas K. 1996. The future of genetic studies of complex human diseases. *Science* 273 : 516-1517.
- Risterucci AM, Grivet L, N'Goran JAK, Pieretti I, Flament MH and Lanaud C. 2000. A high-density linkage map of *Theobroma cacao* L. *Theoretical and Applied Genetics* 101 : 948-955
- Rorer JB. 1926. Ecuador cacao. *Tropical Agriculture (Trinidad)* 3 : 69-69.
- Rostain S. 1999. Occupations humaines et fonction domestique de monticules préhistoriques d'Amazonie équatorienne. *Bulletin de la Société Suisse des Américanistes*, Genève, 63 : 71-95.
- Salazar E. 1995. El Ecuador aborigen, Quito, Corporación Editora Nacional.
- Salazar E. 1998. De vuelta al Sangay, investigaciones arqueológicas en el alto Upano, Amazonía ecuatoriana. *Bulletin de l'Institut Français d'Etudes Andines* 27(2), Lima:213-241.
- Salazar Ernesto. 2000. Pasado precolombino de Morona Santiago. *Casa de la Cultura Benjamín Carrión*, Macas; 82pp.
- Sallée B. 1987. Compte rendu de prospections dans les populations naturelles de *Theobroma cacao* L. du Haut Camopi (Guyane française). Kourou, Guyane, CIRAD, 45p.
- Salomon F. 1986. Native lords of Quito in the age of the Incas. The political economy of north Andean chiefdoms. Cambridge University.
- Saunders JA, Hemeida AA, Mischke S. 2001. USDA DNA fingerprinting programme for identification of *Theobroma cacao* accessions. In: Proceeding of the INGENIC International Workshop on New Technologies and Cocoa Breeding. Kota Kinabalu, Sabah, Malaysia. pp 108-114.
- Schultes R. 1984. Amazonian Cultigens and Their Northward and Westward Migration in Pre-Columbian Times. In: *Pre-Columbian Plant Migration*. Cambridge, MA, Harvard University Press. pp.21-26.
- Seguin M, Attard A, Bataillon T, Billot C, Cenci A, Chantret N, Courtois B, David J, Deu M, El Azhari N, Glaszmann JC, Glemin S, Haudry A, Le Guen V, Maynadier M, Pomiès V, Ronfort J, Tsitronne A and Weber C. 2006. Analyse et prédiction des patrons de déséquilibre de liaison dans les collections de ressources génétiques de plantes pérennes ou annuelles, autogames ou allogames. *Les Actes du BRG* 6 : 57-74.

- Smith BD. 1996. The emergence of agriculture. Scientific American Library. HPHLP. New York. pp18-33.
- Soria JV. 1961. El mejoramiento del cacao. *In* : Hardy F, Manual del cacao, Turrialba, Costa Rica. Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas. pp 358-380.
- Soria JV. 1966. Principales variedades de cacao cultivadas en América tropical. Turrialba, Costa Rica 16(3): 261-266.
- Soria JV. 1970. Principal varieties of cocoa cultivated in tropical America. *Cocoa Grower's Bulletin* 19 : 12-21.
- Soria JV and Enríquez GA. 1981. International cocoa cultivar catalogue. CATIE, Technical series, Technical Bulletin Turrialba, Costa Rica, n°6. 156 p.
- Soria JV. 1996. Principales variedades cultivadas en América tropical. *Notas técnicas. Turrialba, Costa Rica* 16 : 261-266.
- Staller JE. 1994. Late Valdivia occupation in El Oro Province, Ecuador: excavation at the early formative period (3500-1500 BC) site of La Emerenciana. Ann. Arbor : University Microfilms.
- Staller JE. 2002. A multidisciplinary approach to understanding the initial appearance of maize into coastal Ecuador. *Journal of Archaeological Science* 29 : 33-50.
- Stevenson WB. 1829. Historical and descriptive narrative of twenty year's residence in South America. Vol. II. Londres.
- Stone D. 1984. Pre-Columbian migration of *Theobroma cacao* Linnaeus and *Manihot esculenta* Crantz from Northern South America into Mesoamerica: a partial hypothetical view. *In: Pre-Columbian Plant Migration*. Cambridge, MA, Harvard University Press. Pp.67-79, 81-83.
- Tanksley SD, Bernatzky R, Lapitan NL and Prince JP. 1988. Conservation of gene repertoire but not gene order in pepper and tomato. *Proc Natl Acad Sci USA* 85,: 6419-6423.
- Tanksley SD and McCouch SR. 1997 Seed banks and molecular maps: unlocking genetic potential from the wild. *Science* 277 : 1063-1066
- Tautz D. 1989. Hypervariability of simple sequence as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research* 17 : 6463-6471.
- Tautz D and Rentz M. 1984. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eucariotic genome. *Nucleic Acids Research* 12 : 4127-4138.
- Tedlock, D. 1993. Popol Vuh. El libro maya del albor de la vida y las glorias de los dioses y reyes. Editorial Diana. México.

- Testolin RT, Marrazzo G, Cipriani R, Quarta I, Verde DMT, Pancaldi M and Sansavini S. 2000. Microsatellite DNA in peach (*Prunus persica* L. Batsch) and its use in fingerprinting and testing the genetic origin of cultivars. *Genome* 43 : 512-520.
- Thornsberry JM, Goodman MM, Doebley J, Kresovich S, Nielsen D and Buckler ES. 2001. *Dwarf8* polymorphisms associate with variation in flowering time. *Nature Genetics* 28 : 286-289.
- Van Hall CJ. 1914. Cacao, MacMillan & Co., Ltd., London. pp 88-91.
- Van Hall CJ. 1932. Cocoa. Second edition. MacMillan & Co., Ltd., London. pp 304-320.
- Vera BJ. 1969. Estudio de la compatibilidad en híbridos interclonales de cacao (*Theobroma cacao* L.). Tesis de Ingeniero Agrónomo. Universidad de Guayaquil, 30 p.
- Vera BJ, Suarez C, Mogrovejo E. 1984. Descripción técnica de algunos híbridos y clones de cacao recomendados por el Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias. Quevedo, Ecuador. Comunicación técnica N°12, 45 p.
- Vera BJ. 1987. Antecedentes históricos. Manual del cultivo de cacao. INIAP, EET-Pichilingue. Quevedo, Ecuador, pp 6-9.
- Vera BJ. 1993. Botánica del cacao. Manual del cultivo de cacao 2da edición. INIAP, EET-Pichilingue. Quevedo, Ecuador, pp 10-15.
- Vijverberg K, Kuperus P, Breeuwer JAJ and Bachmann K. 2000. Incipient adaptive radiation of New Zealand and Australian *Microseris* (*Asteraceae*), an amplified fragment length polymorphism (AFLP) study. *Journal of Evolutionary Biology* 13 : 997-1008.
- Waters DE, Henry RJ, Reinke RF and Fitzgerald MA. 2006. Gelatinization temperature of rice explained by polymorphisms in starch synthase. *Plant Biotechnol J* 4 : 115-122.
- Weir BS. 1979. Inferences about linkage disequilibrium. *Biometrics* 35: 235-254.
- Weir BS and Cockerham CC. 1979. Estimation of linkage disequilibrium in randomly mating populations. *Heredity* 42: 105-111.
- Weir BS and Cockerham CC. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38 : 1358-1370.
- White GM, Boshier DH and Powell W. 1999. Genetic variation within a fragmented population of *Swietenia humilis* Zucc. *Molecular Ecology* 8 : 1899-1909.
- Whitlock B, Bayer C and Baum D. 2001. Phylogenetic relationships and floral evolution of the *Byttnerioideae* ("Sterculiaceae" or Malvaceae s.l.) based on sequences of the chloroplast gene *ndhF*. *Systematic Botany* 26 : 420-437.
- Wilson LM, Whitt SR, Ibanez AM, Rocheford TR, Goodman MM and Buckler ES. 2004. Dissection of maize kernel composition and starch production by candidate gene association. *Plant Cell* 16 : 2719-2733.

- Wood GAR. 1973. Cocoa. Tropical Agriculture Series, 3<sup>th</sup> edition. Trinidad and Tobago. pp:25-27.
- Wood GAR, Lass RA. 1987. Cocoa. Tropical Agriculture Series, 4<sup>th</sup> edition. London.
- Wright S. 1969. Evolution and the genetics of populations. Vol.2. The theory of gene frequencies. University of Chicago, Chicago.
- Young AM. 1982. Population biology of tropical insects. Plenum Press.
- Young AM. 1983. Seasonal differences in abundance and distribution of cocoa-pollinating midges in relation to flowering and fruit-set between shaded and sunny habitats of "La Lola" Cocoa farm in Costa Rica. *J Appl Ecol* 20 : 801-831.
- Young AM. 1984. Pollen-colleting by singles bees on cocoa flowers. *Experientia*, 4 : 760-762.
- Young AM. 1985. Research on the natural pollination of cocoa in Central America : overview of current directions. *In: Proc. 9 Int. cocoa Res. Conf. Lome, Togo.* Stephen Austin 1 Sons Ltd.
- Young AM. 1994. *The Chocolate Tree : a natural history of cacao.* Smithsonian Nature books. Washington, 240 p.
- Yu JM, Pressoir G, Briggs WH, Bi IV, Yamasaki M, Doebley JF, McMullen MD, Gaut BS, Nielsen DM, Holland JB, Kresovich S and Buckler ES. 2006. A unified mixed-model method for association mapping that accounts for multiple levels of relatedness. *Nat Genet* 38 : 203-208.
- Ziegleder G. 1990. Linalol contents as characteristic of some flavor grade cocoas. *Z Lebensm Unters Forsch*, 191 : 306-309.

# **ANNEXES**

Annexe 1. Liste totale des individus analysés et pourcentage de hétérozygotie obtenu à l'aide de 40 SSR (1-332) et 80 SSR (333-495).

N°	Nom	Origine	Collection	% hétérozygotie
1	L27-H68	Equateur	CCAT	52.6
2	L28-H46	Equateur	CCAT	87.5
3	L29-H47	Equateur	CCAT	42.5
4	L29-H48	Equateur	CCAT	57.5
5	L30-H47	Equateur	CCAT	80
6	L28-H48	Equateur	CCAT	87.5
7	L26-H60	Equateur	CCAT	30
8	L25-H60	Equateur	CCAT	72.5
9	L25-H62	Equateur	CCAT	72.5
10	L24-H62	Equateur	CCAT	53.8
11	L24-H64	Equateur	CCAT	30
12	L25-H57	Equateur	CCAT	76.3
13	L25-H64	Equateur	CCAT	72.5
14	L21-H56	Equateur	CCAT	57.5
15	L31-H48	Equateur	CCAT	47.5
16	L21-H54	Equateur	CCAT	80
17	L14-H44	Equateur	CCAT	45
18	L30-H01	Equateur	CCAT	82.5
19	L33-H49	Equateur	CCAT	72.5
20	L33-H47	Equateur	CCAT	72.5
21	L33-H27	Equateur	CCAT	72.5
22	L33-H24	Equateur	CCAT	68.4
23	L33-H23	Equateur	CCAT	72.5
24	L34-H57	Equateur	CCAT	36
25	L34-H58	Equateur	CCAT	85
26	L34-H59	Equateur	CCAT	37.5
27	L34-H61	Equateur	CCAT	45
28	L34-H66	Equateur	CCAT	46
29	L34-H67	Equateur	CCAT	50
30	L31-H54	Equateur	CCAT	72.5
31	L31-H68	Equateur	CCAT	72.5
32	L32-H72	Equateur	CCAT	67.6
33	L32-H69	Equateur	CCAT	72.5
34	L13-H46	Equateur	CCAT	45.8
35	L31-H45	Equateur	CCAT	42.5
36	L30-H06	Equateur	CCAT	85
37	L15-H39	Equateur	CCAT	78
38	L14-H48	Equateur	CCAT	82.5
39	L33-H10	Equateur	CCAT	47.5
40	L34-H46	Equateur	CCAT	85
41	L32-H48	Equateur	CCAT	72.5
42	L33-H65	Equateur	CCAT	55



43	L33-H58	Equateur	CCAT	72.5
44	L33-H55	Equateur	CCAT	72.5
45	L20-H43	Equateur	CCAT	50
46	L28-H34	Equateur	CCAT	62.5
47	L36-H61	Equateur	CCAT	47.5
48	L20-H07	Equateur	CCAT	52.5
49	L47-H75	Equateur	CCAT	46.2
50	L29-H63	Equateur	CCAT	53
51	L48-H73	Equateur	CCAT	62
52	L23-H53	Equateur	CCAT	45
53	L23-H49	Equateur	CCAT	55.3
54	L23-H48	Equateur	CCAT	57.9
55	L23-H42	Equateur	CCAT	41.4
56	L23-H41	Equateur	CCAT	52.8
57	L21-H61	Equateur	CCAT	55
58	L20-H57	Equateur	CCAT	67.5
59	L39-H64	Equateur	CCAT	38.5
60	L39-H70	Equateur	CCAT	75
61	L39-H54	Equateur	CCAT	72.5
62	L46-H83	Equateur	CCAT	77.5
63	L29-H59	Equateur	CCAT	45
64	L36-H37	Equateur	CCAT	44.9
65	L35-H60	Equateur	CCAT	45
66	L36-H53	Equateur	CCAT	37.5
67	L47-H78	Equateur	CCAT	77.5
68	L16-H36	Equateur	CCAT	55.6
69	L16-H26	Equateur	CCAT	77.5
70	L39-H46	Equateur	CCAT	40.6
71	L40-H12	Equateur	CCAT	85
72	L23-H38	Equateur	CCAT	51.5
73	L22-H39	Equateur	CCAT	57.5
74	L21-H53	Equateur	CCAT	77.5
75	L30-H20	Equateur	CCAT	40
76	L30-H43	Equateur	CCAT	77.5
77	L30-H46	Equateur	CCAT	77.5
78	L23-H63	Equateur	CCAT	59.3
79	L39-H61	Equateur	CCAT	85
80	L39-H51	Equateur	CCAT	74.4
81	L48-H99	Equateur	CCAT	60
82	L38-H31	Equateur	CCAT	32.5
83	L39-H13	Equateur	CCAT	40
84	L37-H31	Equateur	CCAT	40
85	L37-H53	Equateur	CCAT	77.5
86	L37-H68	Equateur	CCAT	57.5
87	L36-H28	Equateur	CCAT	35
88	L36-H17	Equateur	CCAT	34.5

89	L36-H27	Equateur	CCAT	67.5
90	L35-H46	Equateur	CCAT	67.5
91	L35-H62	Equateur	CCAT	37.5
92	L35-H56	Equateur	CCAT	52.5
93	L45-H76	Equateur	CCAT	76.9
94	L46-H92	Equateur	CCAT	61
95	L43-H15	Equateur	CCAT	42.5
96	L46-H63	Equateur	CCAT	79.5
97	L46-H81	Equateur	CCAT	82.1
98	L43-H59	Equateur	CCAT	50
99	L19-H27	Equateur	CCAT	31.6
100	L18-H49	Equateur	CCAT	65
101	L18-H58	Equateur	CCAT	64.5
102	L17-H46	Equateur	CCAT	29.7
103	L17-H42	Equateur	CCAT	52.5
104	L46-H45	Equateur	CCAT	56.4
105	L45-H75	Equateur	CCAT	80
106	L45-H78	Equateur	CCAT	79
107	L45-H83	Equateur	CCAT	72.5
108	L46-H51	Equateur	CCAT	47.4
109	L45-H85	Equateur	CCAT	71.8
110	L44-H63	Equateur	CCAT	74.4
111	L45-H74	Equateur	CCAT	73.7
112	L44-H88	Equateur	CCAT	71.8
113	L40-H90	Equateur	CCAT	47.4
114	L43-H92	Equateur	CCAT	65
115	L43-H71	Equateur	CCAT	71
116	L10-H25	Equateur	CCAT	47.5
117	L10-H28	Equateur	CCAT	47.5
118	L10-H29	Equateur	CCAT	50
119	L13-H34	Equateur	CCAT	62.5
120	L13-H37	Equateur	CCAT	77.5
121	L13-H41	Equateur	CCAT	60
122	L14-H34	Equateur	CCAT	42.5
123	L14-H39	Equateur	CCAT	45
124	L14-H40	Equateur	CCAT	47.5
125	L14-H45	Equateur	CCAT	58
126	L15-H30	Equateur	CCAT	80
127	L15-H31	Equateur	CCAT	77.5
128	L15-H32	Equateur	CCAT	50
129	L15-H33	Equateur	CCAT	80
130	L15-H38	Equateur	CCAT	82.5
131	L15-H43	Equateur	CCAT	57.5
132	L16-H29	Equateur	CCAT	77.5
133	L16-H43	Equateur	CCAT	77.5
134	L17-H53	Equateur	CCAT	77.5

135	L18-H38	Equateur	CCAT	65
136	L18-H46	Equateur	CCAT	50
137	L18-H59	Equateur	CCAT	65
138	L19-H29	Equateur	CCAT	52.5
139	L19-H32	Equateur	CCAT	52.5
140	L19-H34	Equateur	CCAT	52.5
141	L19-H37	Equateur	CCAT	52.5
142	L20-H35	Equateur	CCAT	52.5
143	L20-H46	Equateur	CCAT	75
144	L21-H38	Equateur	CCAT	75
145	L21-H44	Equateur	CCAT	80
146	L21-H46	Equateur	CCAT	50
147	L21-H47	Equateur	CCAT	80
148	L21-H48	Equateur	CCAT	77.5
149	L22-H38	Equateur	CCAT	55
150	L22-H43	Equateur	CCAT	42.5
151	L22-H58	Equateur	CCAT	52.5
152	L22-H62	Equateur	CCAT	52.6
153	L23-H44	Equateur	CCAT	55
154	L23-H56	Equateur	CCAT	55
155	L24-H41	Equateur	CCAT	35
156	L24-H60	Equateur	CCAT	65
157	L24-H65	Equateur	CCAT	47.5
158	L25-H46	Equateur	CCAT	42.5
159	L25-H61	Equateur	CCAT	72.5
160	L26-H64	Equateur	CCAT	72.5
161	L27-H51	Equateur	CCAT	32.5
162	L27-H53	Equateur	CCAT	45
163	L27-H58	Equateur	CCAT	42.5
164	L27-H67	Equateur	CCAT	65
165	L28-H47	Equateur	CCAT	50
166	L28-H59	Equateur	CCAT	52.5
167	L29-H45	Equateur	CCAT	52.5
168	L30-H54	Equateur	CCAT	55
169	L30-H59	Equateur	CCAT	55
170	L30-H62	Equateur	CCAT	52.5
171	L31-H47	Equateur	CCAT	75
172	L32-H46	Equateur	CCAT	52.5
173	L32-H56	Equateur	CCAT	60
174	L32-H58	Equateur	CCAT	45
175	L32-H65	Equateur	CCAT	72.5
176	L33-H45	Equateur	CCAT	85
177	L33-H68	Equateur	CCAT	55
178	L35-H40	Equateur	CCAT	48.7
179	L35-H51	Equateur	CCAT	32.5
180	L36-H42	Equateur	CCAT	47.5

181	L36-H49	Equateur	CCAT	47.5
182	L36-H65	Equateur	CCAT	47.5
183	L37-H41	Equateur	CCAT	57.5
184	L37-H55	Equateur	CCAT	35
185	L38-H51	Equateur	CCAT	47.5
186	L39-H52	Equateur	CCAT	72.5
187	L39-H62	Equateur	CCAT	47.5
188	L39-H63	Equateur	CCAT	45
189	L39-H66	Equateur	CCAT	10
190	L40-H64	Equateur	CCAT	57.5
191	L41-H64	Equateur	CCAT	62.5
192	L41-H75	Equateur	CCAT	55
193	L42-H73	Equateur	CCAT	57.5
194	L42-H83	Equateur	CCAT	65
195	L42-H87	Equateur	CCAT	45
196	L42-H90	Equateur	CCAT	37.5
197	L42-H96	Equateur	CCAT	57.5
198	L42-H97	Equateur	CCAT	55
199	L43-H78	Equateur	CCAT	32.5
200	L43-H90	Equateur	CCAT	35
201	L43-H96	Equateur	CCAT	37.5
202	L44-H66	Equateur	CCAT	73.7
203	L44-H68	Equateur	CCAT	72.5
204	L44-H72	Equateur	CCAT	42.5
205	L44-H84	Equateur	CCAT	55
206	L46-H70	Equateur	CCAT	79.5
207	L46-H74	Equateur	CCAT	80
208	L46-H75	Equateur	CCAT	79.5
209	L46-H85	Equateur	CCAT	80
210	L46-H88	Equateur	CCAT	80
211	L46-H90	Equateur	CCAT	80
212	L48-H77	Equateur	CCAT	53.9
213	L48-H93	Equateur	CCAT	45
214	L49-H74	Equateur	CCAT	46.2
215	L49-H84	Equateur	CCAT	70
216	L49-H87	Equateur	CCAT	50
217	L49-H93	Equateur	CCAT	80
218	L49-H98	Equateur	CCAT	80
219	L49-H100	Equateur	CCAT	41.1
220	L50-H65	Equateur	CCAT	35.9
221	Sa8	Chone, Manabi	EET-P	60
222	Sa16	Chone, Manabii	EET-P	10*
223	SNA101		EET-P	66.7
224	SNA104		EET-P	47.5
225	SNA107		EET-P	41.4
226	SNA203		EET-P	35.7

227	SNA204		EET-P	57.9
228	SNA305	Naranjal, Guayas	EET-P	35.7
229	SNA403		EET-P	40
230	SNA405	Balao, Guayas	EET-P	50
231	SNA407	Balao, Guayas	EET-P	40
232	SNA409	Balao, Guayas	EET-P	50
233	SNA409a	Balao, Guayas	EET-P	12.5*
234	SNA412		EET-P	59
235	SNA418	Balao, Guayas	EET-P	45.7
236	SNA423	Balao, Guayas	EET-P	37.5
237	SNA425		EET-P	38.5
238	SNA428		EET-P	37.5
239	SNA433		EET-P	59.4
240	SNA438		EET-P	77.5
241	SNA503	Mocache, Los Rios	EET-P	9.21*
242	SNA504	Mocache, Los Rios	EET-P	37.5
243	SNA505	La Maná, Cotopaxi	EET-P	33.4
244	SNA512	Empalme, Guayas	EET-P	48.3
245	SNA602	Vinces, Los Rios	EET-P	60.5
246	SNA604	Vinces, Los Rios	EET-P	5.0*
247	SNA608		EET-P	40
248	SNA610		EET-P	56.5
249	SNA613		EET-P	60.9
250	SNA614		EET-P	40.7
251	SNA701	Urdaneta, Los Rios	EET-P	61.3
252	SNA707	Baba, Los Rios	EET-P	45
253	SNA718	Baba, Los Rios	EET-P	40
254	SNA901	Pasaje, El Oro	EET-P	57.5
255	SNA903	Pasaje, El Oro	EET-P	48.6
256	SNA907		EET-P	47.5
257	SNA1001	Equateur	EET-P	6.41*
258	SNA1003	Equateur	EET-P	11*
259	L11H19	Equateur	EET-P	64
260	L12H01	Equateur	EET-P	57.5
261	L19H16	Equateur	EET-P	50
262	L19H28	Equateur	EET-P	35
263	L19H30	Equateur	EET-P	50
264	L21H43	Equateur	EET-P	80
265	L22H40	Equateur	EET-P	46.7
266	L30H50	Equateur	EET-P	75.7
267	L30H61	Equateur	EET-P	69.7
268	L32H60	Equateur	EET-P	61.9
269	L34H07	Equateur	EET-P	67.5
270	L42H60	Equateur	EET-P	66.7
271	L42H65	Equateur	EET-P	75
272	L43H64	Equateur	EET-P	67.5

273	L45H84	Equateur	EET-P	74.4
274	L50H64	Equateur	EET-P	52
275	L51H36	Equateur	EET-P	52.5
276	L52H06	Equateur	EET-P	55
277	L52H12	Equateur	EET-P	55
278	L54H77	Equateur	EET-P	45
279	EET-19	Equateur	EET-P	76.9
280	EET-48	Equateur	EET-P	75
281	EET-62	Equateur	EET-P	75
282	EET-62LL	Equateur	EET-P	76.9
283	EET-95	Equateur	EET-P	80
284	EET-96	Equateur	EET-P	67.5
285	EET-103	Equateur	EET-P	79.5
286	EB-01-04	Machala, El Oro	EET-P	35.9
287	EB-04-01	EET-P	EET-P	36.9
288	EB-04-02	Chontillal, El Oro	EET-P	37.5
289	EB-05-01	Cone, Guayas	EET-P	65
290	EB-10-10	Astudillo, Guayas	EET-P	53.4
291	EB-10-11	Milagro, Guayas	EET-P	54.9
292	EB-10-13	Milagro, Guayas	EET-P	50
293	EB-12-03	El Triunfo, Guayas	EET-P	37.5
294	EB-15-16	P. Viejo, Los Rios	EET-P	80
295	EB-16-17	EET-P	EET-P	35.2
296	EB-19-15	Vinces, Los Rios	EET-P	42.5
297	EB-19-22	Vinces, Los Rios	EET-P	55
298	EB-20-09	Zapotal, Los Rios	EET-P	43.6
299	EB-21-02	Mcache, Los Rios	EET-P	62.5
300	EB22-22	Camreta, Manabí	EET-P	60.5
301	EB-22-33	Calceta, Manabí	EET-P	45
302	EB-22-36	Canuto, Manabí	EET-P	42.1
303	EB-22-37	Canuto, Manabí	EET-P	42.5
304	EB-501	Cone, Guayas	EET-P	42.5
305	BCH-9	Balao, Guayas	EET-P	48.7
306	BCH-14	Balao, Guayas	EET-P	65.8
307	FIDENCIO	Zapotal, Los Rios	EET-P	50
308	EET-34	EET-P	EET-P	67
309	EET-38	EET-P	EET-P	45.3
310	EET-50	EET-P	EET-P	54.5
311	EET-58	EET-P	EET-P	78.8
312	EET-59	EET-P	EET-P	62
313	EET-64	EET-P	EET-P	74
314	EET-65	EET-P	EET-P	48
315	EET-67	EET-P	EET-P	65
316	EET-69	EET-P	EET-P	39.7
317	EET-71	EET-P	EET-P	67.5
318	EET-73	EET-P	EET-P	58.6

319	EET-117	EET-P	EET-P	35
320	Nac-2	EET-P	EET-P	43.6
321	Nac-4	EET-P	EET-P	53.9
322	Espe-2	EET-P	EET-P	36.4
323	B-240	Manabí, Equateur		12.5
324	LAN-28	Chiapas, Mexique		0
325	MAT-1-6	Costa Rica		0
326	SCA-6 ®	Loreto, Peru		43.6
327	UF-676	Costa Rica		100
328	C362	Brésil		0.0
329	CATONGO	Brésil		0.0
330	BA(II)	Brésil		0.0
331	GU114	Guyane	CIRAD	8.9
332	GU144	Guyane	CIRAD	15.4
333	GU151	Guyane	CIRAD	2.6
334	GU154	Guyane	CIRAD	6.5
335	GU195	Guyane	CIRAD	2.7
336	GU255	Guyane	CIRAD	5.1
337	GU277	Guyane	CIRAD	2.7
338	GU300	Guyane	CIRAD	5.2
339	GU322	Guyane	CIRAD	11.8
340	GU339	Guyane	CIRAD	0.0
341	GU353	Guyane	CIRAD	9.0
342	BEN2	Merida, Venezuela		0.0
343	HABILLAL1	Michoacan, Mexique		0.0
344	CHA5	Chiapas, Mexique		4.3
345	COL10	Magdalena, Colombie		0.0
346	COL4	Magdalena, Colombie		0.0
347	HE4	Tachira, Venezuela		0.0
348	LAN14	Chiapas, Mexique		1.3
349	LAN17	Chiapas, Mexique		0.0
350	LAN2	Chiapas, Mexique		0.0
351	LAN28b	Chiapas, Mexique		0.0
352	LAN9	Chiapas, Mexique		0.0
353	LIB1	Nicaragua		0.0
354	LIB2	Nicaragua		0.0
355	NOVC5	Tachira, Venezuela		1.4
356	RANCHITO1	Michoacan, Mexique		0.0
357	SJU1	Guasare, Venezuela		0.0
358	SP1	Zulia, Venezuela		0.0
359	SP10	Zulia, Venezuela		0.0
360	SP2	Zulia, Venezuela		0.0
361	Y-1	Yucatan, Mexique		1.3
362	ZEA4	Merida, Venezuela		5.0
363	IMC107	Iquitos, Pérou	Trinidad	52.0
364	IMC16	Iquitos, Pérou	Trinidad	50.6

365	IMC20	Iquitos, Pérou	Trinidad	48.1
366	IMC38	Iquitos, Pérou	Trinidad	37.5
367	IMC57	Iquitos, Pérou	Trinidad	60.3
368	IMC58	Iquitos, Pérou	Trinidad	41.3
369	IMC6	Iquitos, Pérou	Trinidad	46.8
370	IMC60	Iquitos, Pérou	Trinidad	45.3
371	IMC65	Iquitos, Pérou	Trinidad	36.8
372	IMC66	Iquitos, Pérou	Trinidad	48.7
373	IMC76	Iquitos, Pérou	Trinidad	53.8
374	IMC87	Iquitos, Pérou	Trinidad	45.3
375	IMC94	Iquitos, Pérou	Trinidad	49.4
376	LCT-21	Napo, Équateur	Trinidad	17.1
377	LCT-212	Napo, Équateur	Trinidad	15.5
378	LCT-372	Napo, Équateur	Trinidad	22.7
379	LCT-409	Napo, Équateur	Trinidad	38.4
380	LCT-325	Napo, Équateur	Trinidad	43.8
381	LCT-326	Napo, Équateur	Trinidad	31.2
382	LCT-411	Aguarico, Équateur	Trinidad	39.7
383	LCT-414	Aguarico, Équateur	Trinidad	41.5
384	LCT-30	capocuy, Équateur	Trinidad	20.8
385	LCT-31	Indillama, Équateur	Trinidad	60.3
386	LCT-32	Indillama, Équateur	Trinidad	28.8
387	LCT-36	Anangu, Équateur	Trinidad	22.9
388	LCT-46	LoretoN, Équateur	Trinidad	39.7
389	LCT-57	LoretoN, Équateur	Trinidad	18.9
390	LCT-63	Smiguel, Équateur	Trinidad	2.7
391	LCT-201	Smiguel, Équateur	Trinidad	37.9
392	LCT-202	Smiguel, Équateur	Trinidad	66.2
393	LCT-327	Smiguel, Équateur	Trinidad	2.6
394	LCT-109	INIAPay, Équateur	Trinidad	21.3
395	LCT-162	INIAPay, Équateur	Trinidad	38.4
396	LCT-163	INIAPay, Équateur	Trinidad	27.1
397	LCT-188	Putumay, Équateur	Trinidad	42.7
398	LCT-189	Putumay, Équateur	Trinidad	40.5
399	LCT-195	Putumay, Équateur	Trinidad	27.3
400	LCT-133	INIAPSnC, Équateur	Trinidad	74.6
401	LCT-146	INIAPSnC, Équateur	Trinidad	23.4
402	LCT-282	INIAPSnC, Équateur	Trinidad	11.8
403	LCT-283	INIAPSnC, Équateur	Trinidad	15.6
404	LCT-127	LagAgrio, Équateur	Trinidad	22.1
405	LCT-403	Yasuni1, Équateur	Trinidad	46.5
406	LCT-217	Villano, Équateur	Trinidad	9.9
407	LCT-218	Villano, Équateur	Trinidad	17.6
408	LCT-220	Villano, Équateur	Trinidad	36.6
409	LCT-221	Villano, Équateur	Trinidad	56.6
410	LCT-223	Villano, Équateur	Trinidad	14.9



411	LCT-227	Villano, Équateur	Trinidad	16.7
412	LCT-246	Villano, Équateur	Trinidad	56.6
413	LCT-121	Bobonaz, Équateur	Trinidad	16.2
414	LCT-122	Bobonaz, Équateur	Trinidad	23.5
415	LCT-124	Bobonaz, Équateur	Trinidad	16.9
416	LCT-362	Conanbo, Équateur	Trinidad	31.9
417	LCT-368	Conanbo, Équateur	Trinidad	43.7
418	LCT-60	Puyo1, Équateur	Trinidad	53.9
419	LCT-94	Curaray, Équateur	Trinidad	21.7
420	LCT-249	Curaray, Équateur	Trinidad	42.3
421	LCT-251	Curaray, Équateur	Trinidad	29.9
422	LCT-253	Curaray, Équateur	Trinidad	33.3
423	LCT-258	Curaray, Équateur	Trinidad	47.1
424	LCT-261	Curaray, Équateur	Trinidad	71.0
425	LCT-262	Curaray, Équateur	Trinidad	76.0
426	LCT-264	Curaray, Équateur	Trinidad	29.7
427	LCT-267	Curaray, Équateur	Trinidad	29.2
428	LCT-278	Curaray, Équateur	Trinidad	29.9
429	LCT-67	Zamora, Équateur	Trinidad	26.5
430	LCT-81	Zamora, Équateur	Trinidad	19.2
431	LCT-82	Zamora, Équateur	Trinidad	54.8
432	LCT-83	Zamora, Équateur	Trinidad	51.5
433	LCT-85	Yacuamb, Équateur	Trinidad	30.6
434	LCT-86	Yacuamb, Équateur	Trinidad	32.0
435	LCT-300	Upano, Équateur	Trinidad	19.2
436	LCT-302	Upano, Équateur	Trinidad	16.9
437	LCT-312	Upano, Équateur	Trinidad	13.8
438	LCT-333	Upano, Équateur	Trinidad	11.4
439	LCT-91	Nangarit1, Équateur	Trinidad	16.0
440	LCT-432	Santiag1, Équateur	Trinidad	22.7
441	MO121	Morona, Pérou	Trinidad	31.6
442	MO122	Morona, Pérou	Trinidad	31.6
443	MO125	Morona, Pérou	Trinidad	35.9
444	MO76	Morona, Pérou	Trinidad	21.1
445	MO80	Morona, Pérou	Trinidad	31.9
446	MO94	Morona, Pérou	Trinidad	23.1
447	MO96	Morona, Pérou	Trinidad	32.4
448	MO99	Morona, Pérou	Trinidad	33.3
449	NA149	Nanay, Pérou	Trinidad	35.1
450	NA168	Nanay, Pérou	Trinidad	19.0
451	NA187	Nanay, Pérou	Trinidad	22.4
452	NA226	Nanay, Pérou	Trinidad	14.9
453	NA227	Nanay, Pérou	Trinidad	28.2
454	NA235	Nanay, Pérou	Trinidad	25.0
455	NA289	Nanay, Pérou	Trinidad	0.0
456	NA327	Nanay, Pérou	Trinidad	25.3

457	NA504	Nanay, Pérou	Trinidad	1.3
458	NA670	Nanay, Pérou	Trinidad	36.0
459	NA699	Nanay, Pérou	Trinidad	35.1
460	NA807	Nanay, Pérou	Trinidad	48.0
461	P10C	Pound, Pérou	Trinidad	0.0
462	P12A	Pound, Pérou	Trinidad	48.6
463	P16	Pound, Pérou	Trinidad	34.7
464	P2	Pound, Pérou	Trinidad	10.5
465	P25A	Pound, Pérou	Trinidad	35.4
466	P26C	Pound, Pérou	Trinidad	14.1
467	P27C	Pound, Pérou	Trinidad	56.0
468	P2A	Pound, Pérou	Trinidad	11.0
469	P31A	Pound, Pérou	Trinidad	32.9
470	P5C	Pound, Pérou	Trinidad	7.6
471	P7A	Pound, Pérou	Trinidad	37.2
472	P9B	Pound, Pérou	Trinidad	52.0
473	PA12	Parinari, Pérou	Trinidad	29.2
474	PA121	Parinari, Pérou	Trinidad	28.6
475	PA124	Parinari, Pérou	Trinidad	27.4
476	PA126	Parinari, Pérou	Trinidad	28.8
477	PA13	Parinari, Pérou	Trinidad	47.2
478	PA136	Parinari, Pérou	Trinidad	23.1
479	PA141	Parinari, Pérou	Trinidad	20.0
480	PA16	Parinari, Pérou	Trinidad	18.8
481	PA165	Parinari, Pérou	Trinidad	31.9
482	PA169	Parinari, Pérou	Trinidad	32.1
483	PA173	Parinari, Pérou	Trinidad	32.9
484	PA197	Parinari, Pérou	Trinidad	23.5
485	PA27	Parinari, Pérou	Trinidad	34.2
486	SCA12	Ucayali, Pérou	Trinidad	39.7
487	SCA6	Ucayali, Pérou	Trinidad	38.8
488	SCA19	Ucayali, Pérou	Trinidad	38.0
489	SCA24	Ucayali, Pérou	Trinidad	34.7
490	SCA3	Ucayali, Pérou	Trinidad	36.5
491	SCA5	Ucayali, Pérou	Trinidad	33.8
492	SCA9	Ucayali, Pérou	Trinidad	33.8
493	SCA9b	Ucayali, Pérou	Trinidad	29.5
494	VEN11	Venezuela	CIRAD	9.9
495	VEN20	Venezuela	CIRAD	0.0

\* Ces résultats ont été obtenus avec 80 marqueurs SSR

## LISTE DES PHOTOS

### Chapitre I

- Photo 1. Tête colossale retrouvée sur le site de San Lorenzo (Sud du Mexique). Vestiges du peuple Olmèque (1500-400 avant J.-C.) premier utilisateur du cacao en Amérique centrale.
- Photo 2. Poterie représentant une femme Maya symbolisant l'importance du cacao lors d'une cérémonie de mariage. Musée National d'archéologie à Guatemala.
- Photo 3. Représentation Aztèque du dieu-roi Quetzacóatl ou « Dieu serpent à plumes ».
- Photo 4. Instrument préhispanique utilisé par les Aztèques pour moudre les fèves de cacao.
- Photo 5. Inflorescence de cacaoyer portée sur le tronc.
- Photo 6. Cabosses de cacaoyer.  
(a) cabosses de la variété Nacional, (b) cabosses d'autres génotypes illustrant la grande diversité qui caractérise l'espèce *Theobroma cacao* L.
- Photo 7. Cabosse et fèves fraîches de cacao avec et sans mucilage.
- Photo 8. Jeune plantation clonale de cacaoyers de type Nacional en Équateur.
- Photo 9. Cabosse infectée par *Phytophthora palmivora*
- Photo 10. Cabosses infectées par *Phytophthora megakarya*
- Photo 11. Symptômes de la maladie du « *Vascular Streak Dieback* » (VSD) sur branches.
- Photo 12. Jeune plant de cacaoyer montrant les symptômes de la maladie virale du *Swollen Shoot*.
- Photo 13. Symptôme typique de la moniliose (*Moniliophthora roreri*) sur cabosse.
- Photo 14. Symptômes caractéristiques de la maladie du « balai de sorcière ».  
(a) sur des branches, (b) sur coussinets floraux et (c) sur cabosses. L'agent pathogène responsable de cette maladie est *Moniliophthora perniciosa*.
- Photo 15. Dégâts sur les cabosses occasionnés par des mirides.  
(a) taches brunes visibles sur jeune fruit et (b) insecte en cause (*Sahlbergella*).
- Photo 16. Dégâts occasionnés par le *cocoa pod borer* (CPB) sur cabosse.  
(a) perforation visible sur la cabosse (flèche) et (b) dommage initial visible à l'intérieur du fruit.
- Photo 17. Cabosse endommagée par rats.
- Photo 18. Clone de cacaoyer hybride « CCN-51 ».

(a) cultivé sur exposition solaire maximale et (b) à une forte densité d'arbres.

Photo 19. L'écabossage des cabosses de cacaoyer.

Photo. 20. Fermentation des fèves de cacao.

(a) en tas et (b) ou dans des bacs en bois recouverts de feuilles de bananier.

## **Chapitre IV**

Photo 1. Vestiges de la culture Valdivia (3500 av. J. C.): las venus valdiviennes

## LISTE DES FIGURES

### Chapitre I

- Figure 1. Illustration montrant les principales régions productrices de cacao pendant la période Maya au Sud du Mexique et au Guatemala.
- Figure 2. Exemple de graphisme Maya.  
(a) Numération et (b) écriture Maya représentant ici le mot « cacao ».
- Figure 3. Illustration Maya (1000 avant J.-C. – 800 après J.-C.) représentant la scène du transfert du chocolat d'un récipient à l'autre pour le faire mousser.
- Figure 4. Illustrations représentant les rituels Mayas.  
Danse lors (a) d'un rituel de guerre et (b) lors de banquets ou de cérémonies au cours desquelles la consommation de la boisson cacao avait une signification particulière.
- Figure 5. Détail de la fresque retrouvée à Tlaxcala (Mexique) représentant le dieu des marchands faisant une halte en face d'un cacaoyer.
- Figure 6. Illustration montrant le dieu « Serpent-Oiseau » auquel les Aztèques attribuaient l'origine du cacaoyer.
- Figure 7. Représentation d'un moulin Aztèque utilisé pour faire mousser le chocolat.
- Figure 8. Architecture générale d'un cacaoyer issu de semence. (D'après Demol, 2002).
- Figure 9. Représentation schématique d'une fleur de cacaoyer. Description des différentes pièces florales.
- Figure 10. Différentes formes de cabosses de cacaoyer.
- Figure 11. Répartition mondiale de la culture du cacaoyer.
- Figure 12. La carte génétique du cacaoyer. (D'après Pugh et al., 2004).
- Figure 13 Exemple de mutation avec et sans recombinaison. (D'après Jomphe, 2006).
- Figure 14. Représentation graphique du déséquilibre de liaison (DL) en fonction du temps et du taux de recombinaison. (D'après Jomphe, 2006).

### Chapitre II

- Figure 1. Map of Ecuador showing the different ecological zones, the geographic locations of National germplasm banks and the zone called ARRIBA where was cultivated the first *Nacional* cacao population in Ecuador.

Figure 2. Polymorphism profile of some Ecuadorian samples on chromosome 6 using mtcCIR 136.

Figure 3. Multidimensional scaling plot of Factorial Analysis of Correspondence (FAC) showing the genetic diversity among the Ecuadorian cacao samples. The 2 first axe explain 15% of the total variation.

Figure 4. Neighbor-joining tree of *Theobroma cacao* individuals based on the allelic dissimilarity calculated from SSR data set by Darwin software.

### **Chapitre III**

Figure 1. Map of Ecuador showing the different ecological zones and the geographic locations of each *Theobroma cacao* L accessions sampled in the coast and Amazonian regions (A,B,C) of this country.

Figure 2. PCoA plot of the first and second axes based on SSRs fingerprinting of *Theobroma cacao* L. populations. The identification for each population code is shown in Table 1.

Figure 3. Neighbour-joining tree from dissimilarity matrix, representing genetic relationships among the wild and cultivated cacao accessions analysed in this study. See Table 1 for each code identification.

### **Chapitre IV**

Figure 1. Identification de la région « arriba » sur la carte de l'Équateur.

## **LISTE DES TABLEAUX**

### **Chapitre I**

Tableau 1. Synthèse de la production mondiale de fèves de cacao au cours des trois dernières années.

Tableau 2. Pays producteurs exportant exclusivement ou partiellement du cacao fin ou aromatique.

### **Chapitre II**

Table 1. List of Ecuadorian cacao accessions used in this study and level of heterozygosity (%) at the forty loci studied. CCAT (1-220), EETP (221-332).

Table 2. Summary of genetic parameters values for the 40 microsatellite loci evaluated on the cacao populations collected in the coast region from Ecuador. Allele parameters, Ne: number of allele per locus; Fa: frequency of most common allele. Genotype parameters, Ng: number of effective genotype; Fg: frequency of most common genotype). Gene diversity, He: Nei's expected heterozygosity; Ho: observed heterozygosity, and PIC: polymorphism information content.

Table 3. Summary of genetic statistics parameters measured for each population.

### **Chapitre III**

Table 1. Passport information available for the group accessions used in this study.

Table 2. List of microsatellite loci and number of alleles per locus identified in this study.

Table 3. Summary of genetic diversity revealed by microsatellite markers within each group analyzed. Hexp.: Expected heterozygosity ; Hn.b.: Unbiased gene diversity (Nei, 1978); Hobs.: Observed heterozygosity; Proportion of polymorphic loci when most frequent allele does not exceed 95% (0.95) and 99% (0.99); and, mean number of alleles per locus (NMA/L).

Table 4. Coefficients of genetic distance (Nei, 1972) calculated for pair-wise comparisons of the 14 populations of *T. cacao* studied.

Table 5. The two most likely parents of Nacional cacao individuals with high level of homozygosity. According to Cervus 2.0 software parentage analysis.

### **Annexes**

Annexe 1. Liste totale des individus analysés.





## **Domestication of the Nacional *Theobroma cacao* L. variety from Ecuador: An approach to identify the native Nacional variety and its wild ancestors**

### **Summary :**

The native *Theobroma cacao* L variety from Ecuador, known as Nacional, is famous by its particular floral and fine cocoa flavour called “ARRIBA”. It has been subjected, however, to genetic erosion, due principally to successive introductions of foreign germplasm, which have hybridised with the native variety. This hybrid population, which now constitutes the modern Nacional variety, gradually replaced the native plantations from the beginning of 20<sup>th</sup> century.

In order to increase our knowledge on the pattern of diversity among modern Nacional cacao populations, forty SSR markers were selected to analyse 322 samples collected along of the coast region from Ecuador and conserved in germplasm banks of CCATenguel and EETPichilingue.

A total of 169 alleles were observed in these samples which displayed a high heterozygosity level with a continuous variation between them. Some cacao trees, however, showed high levels of homozygosity. Based on an AFC, this homozygous group was located at an extreme side of the hybrid Ecuadorian population and is the less introgressed by Trinitario alleles.

The origin of this hybrid population was assessed using paternity analysis. The highly homozygous genotypes appeared to be at the origin of more than 90% of the modern Nacional population and the larger part of the population probably represent more advanced generation of recombination involving crosses between hybrid plants. Our analyses suggest that the highly homozygous individuals identified in this study could represent the native Nacional variety present in Ecuador before the foreign introductions.

Until now, the origin of the Nacional variety remained unknown. In this work, we used 80 microsatellite markers isolated from EST to analyse the genetic relationships between the native Nacional founders, and a wide range of wild and cultivated genotypes, collected in an extensive geographical spectrum from South and Central America. A strong genetic similarity was observed between the Nacional pool and some wild genotypes from the south Amazonian region of Ecuador, this result was confirmed by a parentage analysis. A few wild genotypes collected along the Yacuambi and Nangaritza river shores, showed the highest parentage relationship with the Nacional pool from the coast region.

Based on our results, and on a literature review about pre-Columbian civilization (Valdivias and Chorreras) and Spanish colonization history of Ecuador, we traced for the first time, the possible centre of origin and migration events of Nacional variety back to wild populations, since the Amazonian area until its arrival to the Coast Provinces.

In addition, this research gives us new insight that could explain the migration and appearance events of pre-Columbian cacao Criollo from South to Central America (Mexico and Guatemala) thousands of years before the Spanish arrival. Indeed, Valdivias extended their maritime travels until meso-America and could have spear headed cocoa domestication not only in South America, but also in central America.

The results of this work could guide us towards precious genetic resources suitable to enlarge the genetic diversity necessary to improve both the flavour and disease resistance in modern Ecuadorian cacao varieties. Large unexplored forest areas still exist at South of Ecuadorian Amazonian region, and must be considered to new cacao prospections.

**Key words:** *Theobroma cacao* L., Nacional Variety, SSR, genetic diversity, domestication, Ecuador, Amazonia.

## **Contribution à l'étude de la domestication de la variété de cacaoyer Nacional d'Équateur: recherche de la variété native et de ses ancêtres sauvages.**

### **Résumé :**

La variété de cacaoyer native d'Équateur, appelée « Nacional » est connue et recherchée pour son arôme floral qui la classe parmi les cacaos fins. Cependant, de par les introductions successives de génotypes étrangers qui se sont hybridés avec elle, cette variété est entrain de disparaître et sa qualité spécifique aussi. Depuis le début du XXème siècle, un complexe hybride, a remplacé graduellement les plantations natives.

Afin d'accroître notre connaissance de la diversité génétique de ce complexe hybride Nacional, 40 marqueurs microsatellites ont été utilisés pour analyser 322 génotypes collectés le long de la côte pacifique de l'Équateur et conservés dans les collections de Tenguel et de EET-Pichilingue.

Un total de 169 allèles ont été observés dans ces accessions qui montrent en général un niveau d'hétérozygotie élevé et une variation continue entre elles. Quelques génotypes présentent cependant un niveau homozygotie plus élevé. Ces génotypes apparaissent aussi les moins introgressés par les Trinitario introduits au siècle dernier et se placent à l'extrémité du nuage de points d'une AFC formé par le complexe hybride.

Par une étude de paternité, ces génotypes plus homozygotes apparaissent à l'origine de plus de 90% de la population analysée dont la majorité des éléments correspondent à des générations plus avancées de recombinaison, impliquant des croisements entre hybrides. Nos analyses suggèrent que ces génotypes plus homozygotes pourraient être des représentants de la variété native présente en Équateur avant les introductions de matériel étranger.

Jusqu'à présent, l'origine du Nacional est restée inconnue. Au cours de ce travail, l'étude des relations génétiques entre des représentants de la variété native et un large échantillonnage de cacaoyers sauvages ou cultivés principalement issus d'Équateur, du Pérou et de Guyane a été réalisée à l'aide de 80 microsatellites issus d'EST. Une forte similarité génétique a été observée entre les Nacional et des génotypes présents dans le sud de l'Amazonie équatorienne, et en particulier ceux collectés le long des rivières Yacuambi et Nangaritzza. Ces résultats ont été confirmés par des analyses de paternité montrant que ces génotypes amazoniens pourraient représenter la population ancestrale à l'origine de la domestication du Nacional.

Cette hypothèse est aussi cohérente avec des données historiques et archéologiques liées aux populations pré-colombiennes, les Valdivia et Chorrera, qui habitaient la côte pacifique et qui entretenaient des échanges commerciaux avec les communautés de l'Amazonie. Les Valdivia étendaient leurs voyages jusqu'en Amérique centrale par voie maritime et ont peut-être été aussi les acteurs principaux de la migration d'autres variétés de cacaoyer vers le Mexique, tel que le Criollo dont l'origine, encore inconnue, est probablement sud américaine.

C'est la première fois qu'une population de cacaoyers sauvages a été identifiée comme possible point de départ de la domestication d'une variété de cacaoyer. Ces résultats ouvrent de nouvelles perspectives pour enrichir les collections de ressources génétiques liés en particulier au cacao aromatique. De larges forêts inexplorées existent encore dans l'Amazonie équatorienne et pourraient faire l'objet de nouvelles prospections.

**Mots clés:** *Theobroma cacao* L., Variété Nacional, SSR, diversité génétique, domestication, Equateur, Amazonie.