

Diversidad genética en 105 accesiones de cacao (*Theobroma cacao* L.) colectadas en nicaragua, utilizando 10 marcadores moleculares tipo SSR

Genetic diversity in 105 cocoa accessions (*Theobroma cacao* L.) collected in nicaragua, using 10 molecular markers type SSR

Kenia Herrera-García¹, Erwin Aragón-Obando², Víctor Aguilar-Bustamante³

¹ Graduada de la carrera de ingeniería agronómica, ² Instituto Nicaragüense de Tecnología Agropecuaria, ³ Facultad de Agronomía, Universidad Nacional Agraria



RESUMEN

Se realizó una caracterización molecular a 105 accesiones de cacao de 79 colectas nacionales, 21 híbridos de referencia y cinco materiales criollos de referencia agrupados en ocho grupos (Rio San Juan, Criollos referencia, híbridos referencia, Carazo, Rivas, Matagalpa, Jinotega y RAAS), utilizando 10 marcadores moleculares tipo SSR con el objetivo de conocer la diversidad genética del cacao colectado en fincas de productores nicaragüenses. Se utilizó el método de extracción de ADN CTAB-Búfer, amplificación de fragmentos de ADN mediante la técnica de la cadena de reacción de la polimerasa (PCR), visualización de fragmentos de ADN en cámara electroforesis. Se identificaron 183 alelos en las 105 accesiones con una media de 18.3, los rangos de heterosigocidad observada y esperada resultaron mayores para MTcCIR12 con 0.437 y 0.81 respectivamente; La media general del contenido de información polimórfica (CIP) e Índice de Shannon para todos los locus es de 0.87 y 1.37 respectivamente; el análisis molecular de varianza reveló que las diferencias genéticas dentro de los grupos (85%), mayor que las diferencias entre grupos (15%). En el análisis de componentes principales (PCA) se encontró cacaos colectados que resultaron genéticamente parecidos a los criollos referencias, es el caso de RSJ0211, RSJ 0311, RSJ 0511, Bomat0510, Ji0210; los materiales Ji-Cuá 0104 y RSJ0411 están estrechamente relacionados. Se demostró que existe una alta diversidad genética y que existen materiales promisorios para posteriores estudios de mejora genética.

Palabras clave: *Theobroma cacao*, SSR, diversidad genética, heterosigocidad esperada, identidad genética, distancia genética.

ABSTRACT

A molecular characterization of 105 accessions of cacao (79 national, 21 hybrids and 5 creoles) plant was conducted using 10 (SSR) molecular markers. Seventy-nine accessions collected around the country were comprised into 8 groups according to geographic site (Rio San Juan, Creoles reference, hybrids reference, Carazo, Rivas, Matagalpa, Jinotega, RAAS). Twenty-one hybrids and 5 creoles samples were using as reference materials. A total of 183 alleles were identified in 105 accessions with a mean of 18.3. The observed and expected heterosigocity were higher with 0.437 and 0.81 MTcCIR12, respectively. The means of PIC and Shannon index were 0.87 and 1.37 respectively. The analysis of variance revealed high difference within group (85%) and low differences among groups (15%). The PCA was found collected materials that were genetically similar to creoles references, in the case of RSJ 0211, RSJ 0311, RSJ 0511, Bomat0510, Ji0210, Ji-Cua materials RSJ0411 0104 and are closely related. It was shown that a high genetic diversity and that are promising materials for future breeding studies.

Keywords: *Theobroma cacao*, Simple Sequence Repeat - SSR, genetic diversity, expected heterosigocity, genetic identity, genetic distance

Recibido: 26 de noviembre 2014

Aceptado: 8 de mayo 2015

RECURSOS GENÉTICOS

Theobroma cacao L. (2n=20), pertenece a la familia de las Esterculeáceas. Es una planta nativa del trópico húmedo. En épocas prehispánicas se cultivaba cacao prácticamente en cualquier sitio que presentara condiciones mínimas para su desarrollo, esto se comprobó con el hallazgo de plantas cultivadas en diversos lugares en el centro de la Península de Yucatán (Millón, 1955). Para la cultura Maya y Azteca, el cacao era usado en ceremonias religiosas y casamientos, como una bebida especial, dándole diferentes usos, preparación y consumo al cacao, caso contrario ocurría con las culturas precolombinas de Sudamérica (McNeil, 2006). Por ello se le atribuye a México y Centro América su centro de domesticación.

Se han reconocido tres grupos genéticos de cacao bien diferenciados, Criollos, Forasteros y Trinitarios. El grupo criollo, se caracteriza por su aroma, la mazorca es de color roja o amarilla cuando madura, presenta alrededor de 10 surcos profundos, muy rugosos, cáscara suave y semillas redondas de medianas a grandes, los cotiledones frescos son de color blanco o violeta pálido, este grupo fue encontrado en México y Nicaragua (Días, 2001). El árbol es de porte bajo y menos robustos que los otros genotipos, tiene bajo rendimiento y se caracteriza por su alta susceptibilidad a las principales enfermedades (Soria, 1966). El grupo forastero produce una mazorca amarilla cuando están maduras y con surcos y rugosidades poco conspicuas, lisas y de extremo redondeado o punta muy corta; las semillas son más o menos aplanadas y los cotiledones frescos son de color violeta (Urquhart, 1963). El cacao tipo trinitario es el resultado de la hibridación natural entre los cacaos criollos y forasteros, ocurrida en el norte de Brasil. Comprenden formas híbridas heterogéneas, su calidad y características botánicas son intermedias entre los criollos y forasteros (Arguello et al., 2000). Son árboles de gran vigor, alta producción y resistencia

a enfermedades. Las mazorcas y sus semillas presentan una amplia variabilidad, el color de la mazorca varía en cuanto al tono de morado que ellos presentan.

Nicaragua se ubica en el lugar 42 de los países productores de cacao y participa con un 0.03% en el comercio mundial. Se estima que hay alrededor de 7 500 ha sembradas con cacao, distribuidas en siete grandes núcleos productivos que se ubican en los departamentos de la RAAS, RAAN, Matagalpa, Jinotega, Río San Juan, Granada y Rivas (Orozco, 2010). Aunque en volumen de producción no es significativo, en calidad sí, beneficiado por las condiciones agrogeográficas de nuestro país y la genética misma de los materiales; es por ello la demanda de nuestro cacao en el mercado internacional.

En el presente estudio, se describe la caracterización molecular de 79 accesiones de cacao colectadas a nivel nacional, agregando 21 híbridos y 5 criollos de referencia con el objetivo de identificar las diferencias y relaciones genéticas de la colección del germoplasma nicaragüense, a través del uso de marcadores moleculares tipo microsátélites.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material colectado. Se colectaron 79 accesiones a nivel nacional en las principales zonas donde se encuentran plantaciones de cacao. Se seleccionó material tipo élite (sanos y altamente productivos, alta adaptabilidad a la zona, árboles robustos) y accesiones con características propias de los materiales criollos (árbol pequeño y débil, hojas pequeñas y verde claro, mazorca en forma angoleta o cundeamor, cáscara fina y suave, superficie de la mazorca rugosa, almendras blancas y redondeadas, sabor fino de las almendras y con poca adaptabilidad a la zona). Se consideraron 21 híbridos y cinco materiales criollos utilizados como referencia y agrupadas en ocho grupos, de acuerdo a su departamento de origen (cuadro 1).

Cuadro 1. Descripción de los tratamientos empleados en el ensayo

Entrada	Nombre de accesión	Departamento	Tipo genético
1	CRZ 0111	Carazo	Élite
2	CRZ 0211	Carazo	Elite
3	CRZ 0311	Carazo	Elite
4	CRZ 0411	Carazo	Elite
5	CRZ 0511	Carazo	Elite
6	CRZ 0611	Carazo	Elite
7	SJC 0108	Criollos Referencia	Criollo
8	MENIER 0108	Criollos Referencia	Criollo
9	RAAS 0403	Criollos Referencia	Criollo
10	Criollo 13	Criollos Referencia	Criollo
11	Yucatán CR	Criollos Referencia	Criollo
12	SHN 8602	Híbridos Referencia	Híbrido
13	IMC67xUF613	Híbridos Referencia	Híbrido
14	UF12xIMC67	Híbridos Referencia	Híbrido

RECURSOS GENÉTICOS

Cuadro 1. Continuación...

15	ICS8xP12	Híbridos Referencia	Híbrido
16	UF668xIMC67	Híbridos Referencia	Híbrido
17	EET162xSCV6	Híbridos Referencia	Híbrido
18	SCV6xUF613	Híbridos Referencia	Híbrido
19	UF650xIMC67	Híbridos Referencia	Híbrido
20	EET400xUF613	Híbridos Referencia	Híbrido
21	UF654xP2	Híbridos Referencia	Híbrido
22	UF221xIMC67	Híbridos Referencia	Híbrido
23	UF677xIMC67	Híbridos Referencia	Híbrido
24	GS36xUF296	Híbridos Referencia	Híbrido
25	UF296xIMC67	Híbridos Referencia	Híbrido
26	EET96xSCV6	Híbridos Referencia	Híbrido
27	UF67xP12	Híbridos Referencia	Híbrido
28	EET95xSCV6	Híbridos Referencia	Híbrido
29	EET399	Híbridos Referencia	Híbrido
30	UF613	Híbridos Referencia	Híbrido
31	POUND7	Híbridos Referencia	Híbrido
32	SPA9	Híbridos Referencia	Híbrido
33	Ji 0110	Jinotega	Criollo
34	Ji 0210	Jinotega	Criollo
35	Cuá 0110	Jinotega	Criollo
36	Ji-Cuá 0104	Jinotega	Criollo
37	Cuá 0402	Jinotega	Criollo
38	wla1001	Jinotega	Elite
39	wla1003	Jinotega	Elite
40	wla1008	Jinotega	Elite
41	wla1019	Jinotega	Élite
42	Bomat 0510	Matagalpa	Criollo
43	Bomat 0610	Matagalpa	Criollo
44	Bomat 0710	Matagalpa	Criollo
45	Bomat 0810	Matagalpa	Criollo
46	Bomat 0910	Matagalpa	Criollo
47	Bomat 1010	Matagalpa	Criollo
48	Bomat 1011	Matagalpa	Criollo
49	Wamat 0110	Matagalpa	Criollo
50	Wamat 0310	Matagalpa	Criollo
51	Wamat 0410	Matagalpa	Criollo
52	Wamat 01210	Matagalpa	Criollo
53	NG 0211	RAAS	Élite
54	NG0111	RAAS	Elite
55	NG0311	RAAS	Elite
56	NG0411	RAAS	Elite
57	NG0511	RAAS	Elite
58	Corozo	RAAS	Criollo
59	RIV0111	Rivas	Elite
60	RIV0211	Rivas	Elite
61	RIV0311	Rivas	Elite
62	RIV0411	Rivas	Elite
63	RSJ 0211	RSJ	Elite
64	RSJ 0311	RSJ	Elite

RECURSOS GENÉTICOS

Cuadro 1. Continuación...

65	RSJ 0411	RSJ	Elite
66	RSJ 0511	Rio San Juan	Élite
67	RSJ 0611	Rio San Juan	Élite
68	RSJ 0711	Rio San Juan	Élite
69	RSJ 0811	Rio San Juan	Élite
70	RSJ 0911	Rio San Juan	Élite
71	RSJ 1011	Rio San Juan	Élite
72	RSJ 1111	Rio San Juan	Élite
73	RSJ 1211	Rio San Juan	Élite
74	RSJ 1311	Rio San Juan	Élite
75	RSJ 1411	Rio San Juan	Élite
76	RSJ 1511	Rio San Juan	Élite
77	RSJ 1611	Rio San Juan	Élite
78	RSJ 1711	Rio San Juan	Élite
79	RSJ 1811	Rio San Juan	Élite
80	RSJ 1911	Rio San Juan	Élite
81	RSJ 2011	Rio San Juan	Élite
82	RSJ 2111	Rio San Juan	Élite
83	RSJ 2311	Rio San Juan	Élite
84	RSJ 2411	Rio San Juan	Élite
85	RSJ 2511	Rio San Juan	Élite
86	RSJ 2611	Rio San Juan	Élite
87	RSJ 2711	Rio San Juan	Élite
88	M 0210	Melchorita	Élite
89	M 0220	Melchorita	Élite
90	La F 01	La Fortuna	Élite
91	La F 02	La Fortuna	Élite
92	La F 03	La Fortuna	Élite
93	La F 04	La Fortuna	Élite
94	La F 05	La Fortuna	Élite
95	Mar01	Las Maravillas	Élite
96	Mar 0102	Las Maravillas	Élite
97	Mar 0104	Las Maravillas	Élite
98	Mar 0105	Las Maravillas	Élite
99	Mar 0106	Las Maravillas	Élite
100	Mar 0107	Las Maravillas	Élite
101	Mar 0108	Las Maravillas	Élite
102	Mar 0109	Las Maravillas	Élite
103	MER 0110	Las Maravillas	Élite
104	Mar 0402	Las Maravillas	Élite
105	Pentagona	RSJ	Criollo

Extracción de ADN. Para la extracción de ADN se utilizó el método de Bromuro de Cetil-Trimetil Amonio (Doyle y Doyle, 1990). Se tomó aproximadamente un cm² de hoja de cada material (descritos en el cuadro 1). El ADN se suspendió en 100 µl de búfer TE y se mantuvo a una temperatura de -20°C hasta su uso.

Amplificación de ADN. Se utilizaron 10 cebadores desarrollados por Lanaud et al., (1999) y seleccionados por Saunders *et al.*, (2004) como cebadores estándar para la caracterización molecular de bancos de germoplasma de cacao (cuadro 2).

Para la reacción de PCR se utilizó un volumen total de 25 µl; la mezcla contenía 12.5 de Master mix (Taq polimerasa 0.8 µl, dinucleotidos 0.5 µl y determinadas cantidades de magnesio en forma de MgCl₂, KCl 1.5 µl), 2

µl de cebador izquierdo y 2 µl cebador derecho, 3 µl de ADN Genómico y 5.5 de agua ultra estéril calidad PCR.

La amplificación del ADN se realizó en un termociclador MyGene thermal cycler modelo MG 96G con el siguiente programa: la desnaturalización inicial durante cuatro minutos a 94°C, seguidos de 35 ciclos de desnaturalización por 40 segundos a 94°C, alineamiento durante 40 segundos a 46°C o 51°C dependiendo del cebador, extensión a 72°C durante un minuto y extensión final a 72°C por ocho minutos.

Electroforesis. Se mezcló 5 µl de ADN amplificado con 1 µl de búfer de carga 6x, para inyectarlos en gel de agarosa simple al 4.5%, teñida con bromuro de etidio en una cámara de electroforesis que contenía búfer tipo TBE (tris, ácido bórico y EDTA), a la par de las muestras de ADN amplificado se utilizó un marcador de peso molecular de 1000 pares de

RECURSOS GENÉTICOS

bases, utilizado para determinar el tamaño de las bandas o alelos de cada accesión.

Las muestras se llevaron a la cámara de electroforesis durante 60 minutos a 400 Watts y 120 Voltios. La visualización de las bandas se realizó en una cámara de luz ultravioleta (transluminator High performance UV), posteriormente se procedió a tomar la fotografía de las bandas de ADN amplificadas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Diversidad genética de cacao

Número de alelos por locus. Se identificaron 183 alelos con un promedio de 18.3 alelos por locus en las 105 accesiones evaluadas. MTcCIR12 detectó 35 alelos con una media de 9.25, siendo este el locus más polimórfico y a su vez más informativo, comportándose mejor que el resto de los marcadores, al obtener ADN amplificado. Sereno *et al.*,

Cuadro 2. Descripción de los marcadores microsátelitales utilizados en este estudio

Cebador	Cromosoma Nº	5' Cebador izquierdo	3' Cebador Derecho	TA* (C°)	Tamaño (bp)	Motif
MTcCIR1	8	ATGCGAATGAC AACTGGT	GCTTTCAGTCCT TTGCTT	51	150-167	(GA) ₁₁
MTcCIR6	6	GATAGCTAAGG GGATTGAGGA	GGTAATTCAATC ATTGAGGATA	46	333-357	(GA) ₁₂
MTcCIR7	7	ATTCTCGCAAAA ACTTAG	GATGGAAGGAG TGAAAATAG	51	276-301	(TC) ₁₂ N ₁₄₆ (CT) ₁₀
MTcCIR8	9	CTAGTTTCCCAT TTACCA	TCCTCAGCATT TCTTTC	46	290-307	(TC) ₅ TT(TC) ₁₇ TTT(CT) ₄
MTcCIR11	2	TTTGGTGATTAT TAGCAG	GATTCGATTTGA TGTGAG	46	286-321	(TC) ₁₃
MTcCIR12	4	TCTGACCCCAAAA CCTGTA	ATTCCAGTTAAA GCACAT	46	165-256	(CATA) ₄ N ₁₈ (TG) ₆
MTcCIR15	1	CAGCCGCCTCTT GTTAG	TATTTGGGATTC TTGATG	46	234-263	(TC) ₁₉
MTcCIR18	4	GATAGCTAAGG GGATTGAGGA	GGTAATTCAATC ATTTGAGGATA	51	333-357	(GA) ₁₂
MTcCIR22	1	ATTCTCGCAAAA ACTTAG	GATGGAAGGAG TGAAAATAG	46	276-301	(TC) ₁₂ N ₁₄₆ (CT) ₁₀
MTcCIR2	9	TTTGGGGTGATT TCTTCTGA	TCTGTCTCGTCT TTTGGTGA	46	186-207	(AG) ₁₃

*Temperatura anillamiento

Parámetros evaluados en este estudio

Análisis de diversidad genética. Para conocer la diversidad genética de las accesiones en estudio, se utilizó el software GenAlex v 6.2 como herramienta de apoyo para análisis de datos. Los análisis realizados fueron: número de alelos por locus y grupo, Heterosigocidad observada y esperada por grupo y locus, contenido de información polimórfica por locus.

Análisis de estructura genética. Para los parámetros de diferenciación genética y análisis de componentes principales, se realizó con el programa GenAlex v 6.2.

Diferenciación genética. La diferenciación genética se cuantificó mediante un análisis molecular de varianza (AMOVA), descritas por Weir y Cockerha (1984), Excoffier et al., (1992) y Weir (1996).

Análisis de componentes principales. Se obtuvo una figura de dos dimensiones donde se compararon individuos entre sí y se agruparon de acuerdo a su relación genética.

(2006) encontraron un promedio de ocho alelos para este mismo cebador y resultó ser el marcador más informativo (cuadro 3).

Los cebadores MTcCIR1 y MTcCIR12 proporcionaron mayor información, en cambio los microsátelites que revelaron menor número de alelos fueron el MTcCIR22 y MTcCIR15 con 14 alelos cada uno (cuadro 3); este a su vez fue el cebador que se comportó recesivo al momento de visualizar el producto PCR y se tuvo que realizar repeticiones de PCR para obtener un número significativo de muestras ampliadas. Efofombagn *et al.*, (2006) reportaron que MTcCIR15 identificó 22 alelos, siendo este uno de los marcadores más informativos en su estudio, no así, a los resultados registrados en este estudio.

Heterosigocidad observada y esperada por locus. A mayor heterosigocidad observada en comparación con la heterosigocidad esperada, menor diversidad genética. En este estudio MTcCIR12 y MTcCIR1 presentó el valor promedio más alto (0.43) en cuanto a la heterosigocidad observada, sin embargo, este valor está por debajo del promedio de heterosigocidad esperada para este mismo marcador (0.81 y

RECURSOS GENÉTICOS

0.69 respectivamente), lo que indica que para este y el resto de los marcadores utilizados, presenta una alta diversidad genética para todos los locus estudiados (cuadro 3). Romero et al., (2010) reportaron datos de Hobs de 0.39 y de Hesp de 0.80 para MTcCIR12 y fue el cebador que registró los valores más bajos de diversidad genética en híbridos de cacao en Ecuador.

El marcador que detectó menor heterosigicidad esperada en este estudio fue MTcCIR15 (0.58). Aragón (2009) encontró para este mismo marcador, una heterosigicidad esperada de 0.82 y le resultó el marcador más informativo; sin embargo, en este estudio este marcador se comportó recesivo al amplificar ADN y se omitió la lectura de algunas muestras que podrían haber sido heterocigotos (cuadro 3).

Cuadro 3. Parámetros para diversidad genética basada en los microsatélites utilizados

Locus	NA	Hesp	Hobs	CIP
MTcCIR1	16	0.69	0.43	0.88
MTcCIR6	16	0.66	0.30	0.78
MTcCIR7	12	0.61	0.11	0.81
MTcCIR8	22	0.68	0.11	0.92
MTcCIR11	18	0.71	0.24	0.89
MTcCIR12	35	0.81	0.43	0.96
MTcCIR15	14	0.58	0.13	0.90
MTcCIR18	16	0.67	0.21	0.88
MTcCIR22	14	0.52	0.09	0.81
MTcCIR24	20	0.64	0.08	0.92
Media	18.3	0.66	0.20	0.87

NA: Número de alelos por locus, Hesp: Heterosigicidad esperada, Hobs: Heterosigicidad observada, CIP: Contenido de información polimórfica.

Los valores promedios de heterosigicidad observada para todos los locus es de 0.209 y para la heterocigicidad esperada es de 0.663, y se debe a que ningún microsatélite utilizado para este estudio reveló una heterosigicidad observada menor que el de heterosigicidad esperada; Zhang et al., (2009) registraron 0.51 de heterosigicidad esperada y 0.46 heterosigicidad observada en clones mejorados, sin embargo, en este estudio se utilizaron materiales pertenecientes a los grupos genéticos trinitarios y forasteros en su mayoría y en menor proporción criollos y mejorados; lo que explica porque encontramos mayor diversidad genética.

Contenido de información polimórfica. El contenido de información polimórfica, mostró un valor mayor de 0.5, demostrando que los microsatélites utilizados son altamente informativos (cuadro 3). El MTcCIR12 presentó el valor más alto de 0.96 y la mayoría de los marcadores utilizados en este estudio presentan valores altos, MTcCIR6 con un valor de 0.78 siendo este el valor más bajo. Romero et al., (2010) reportan un CIP bajo para este mismo cebador (0.71), en cambio el valor más alto se lo proporcionó MTcCIR15 (CIP = 1.00).

Esto corrobora lo que Saunders et al., (2004) menciona acerca de la efectividad de los marcadores para cacao, utilizando en este estudio ocho de los que consideró mejores para análisis de diversidad genética y dos de los que le resultaron ser los más difíciles de amplificar (MTcCIR6, MTcCIR12), pero que en este estudio son los que mejor se comportaron y que brindaron mayor información.

Se demuestra que MTcCIR12 es el más informativo y polimórfico, registra los valores más altos en cuanto a CIP y número de alelos por locus, es efectivo en análisis de diversidad genética sin importar la calidad de ADN que se utilice y el número de muestras amplificadas. MTcCIR12 después de MTcCIR1 fue el cebador que amplificó el mayor número de muestras sin repeticiones. Para el total de

muestras estudiadas en comparación al número de marcadores utilizados en este estudio, se encontró un alto nivel de polimorfismo; Cryer *et al.*, (2006) consideran a estos marcadores importantes y altamente representativos para la especie, añadiéndole lo mencionado por Saunders *et al.*, (2004) al considerar que estos marcadores son más que suficientes para caracterizar bancos de germoplasma de cacao alrededor del mundo.

Número de alelos por grupo. El grupo que presentó el mayor número de alelos fue Rio San Juan con un promedio de

13.2, dado que en esta

zona, predominan plantaciones jóvenes

provenientes de programas de mejoramiento genético. El grupo Rivas es el que obtuvo el menor promedio de alelos con 2.6 (cuadro 4).

Heterosigicidad observada y esperada por grupo: El grupo Rio San Juan presenta el valor promedio más alto en cuanto a la heterosigicidad observada, siendo de 0.313, sin embargo, no mayor que el de la heterosigicidad esperada que es de 0.863 siendo el rango mayor. El grupo Matagalpa presenta el menor valor promedio de heterosigicidad observada (0.08) no mayor que el de la esperada que es de 0.69, pero para este mismo parámetro el valor promedio más bajo de heterosigicidad esperada lo presentó el grupo Rivas con 0.50, determinando una diversidad genética media de acuerdo a Aragón (2009), quien indican que si la heterosigicidad esperada es menor a 0.50, la diversidad genética es baja.

En el grupo Rivas pueden encontrarse materiales homocigotos, características propias del grupo genético criollo y es el grupo donde se encontró menor número de alelos. Por ello, el valor promedio del grupo criollo referencia presenta una media de 0.58, parecido al del grupo Rivas que es de 0.50 (cuadro 4).

RECURSOS GENÉTICOS

Cuadro 4. Parámetros para diversidad genética basada en los grupos estudiados

Locus	N	NA	Hobs	Hesp
Rio San Juan	43	13.20	0.31	0.86
Híbridos referencias	21	7.60	0.20	0.72
Matagalpa	11	5.20	0.08	0.69
Jinotega	9	6.20	0.22	0.78
RAAS	6	3.70	0.19	0.54
Carazo	6	4.00	0.30	0.60
Criollo Referencia	5	3.20	0.11	0.58
Rivas	4	2.60	0.23	0.50
MEDIA	105	5.71	0.20	0.66

N: Número de individuos, NA: Alelos por grupo, Hesp: Heterosigocidad esperada, Hobs: Heterosigocidad observada

Estructura genética

Análisis molecular de varianza (AMOVA). Este parámetro determinó la estructura genética de los materiales en estudio, reveló que las diferencias genéticas mayores están dentro de los grupos con un 85% y que las diferencias entre grupo fue de 15% (cuadro 5), demostrando que aunque se hayan agrupado las accesiones según su sitio de colecta, las diferencias genéticas entre individuos son grandes y las diferencias entre grupos son menores porque en el caso de cacao solo existen tres grupos genéticos que están distribuidos en todo el país, y por tanto baja diferenciación. Zhang et al., (2007) realizaron un estudio para determinar la variación en la estructura genética del cacao ecuatoriano, reportando en el AMOVA una variación dentro de los grupos de 76%.

Según Silvertown y Charlesworth (2001), la naturaleza endémica de un cultivo provoca baja variación entre grupo. Por tanto, para cacao este resultado demuestra la existencia de poblaciones aisladas y que la baja variación entre grupo se debe a la naturaleza misma de este cultivo, que es propio de Centro y Sur América.

Cuadro 5. Análisis molecular de varianza para cacao basado en las colectas realizadas

Fuente	GL	SS	MS	VE	% variación
Entre grupo	7	293.5	41.9	2.4	15%
Dentro de grupo	97	1371.2	14.1	14.1	85%
Total	104	1664.7		16.6	100%

GL: Grados de libertad, SS: Suma de cuadrados, MS: Media de la suma; VE: Variación estándar.

Análisis de componentes principales. En la figura 1, en el eje uno se encuentran los materiales criollos referencia en su mayoría, RAAS0403 (9 en la figura 1) se relaciona con RSJ0311 (64 en la figura 1), Bomat0511 (Matagalpa 42) y con Rio San Juan 0511 (66 en la figura 1); estos materiales son de diferentes zonas geográficas del país y su relación genética puede estar relacionada al intercambio de materiales entre los productores. El CR10 (criollo 13) y el CR11 (Yucatán) se relaciona con RSJ0211 (63 en la figura 1); el CR10 se relaciona con Ji0210 (Jinotega, 34 en la figura 1). En el eje

dos se ubicaron dos materiales genéticamente relacionados Jinotega 0110 (33 en la figura 1) y RSJ 0411 (65 en la figura 1).

En el eje tres se encuentran los materiales mejorados en su mayoría. El material Rivas0111 (59 en la figura 1), se relaciona con el híbrido UF6667xIMC67 (23 en la figura 1). Thienhaus (2008) concluye que a partir de la década de los 70 los híbridos de cacao fueron el principal material de siembra en Nicaragua, estos fueron introducidos desde Centro de Agricultura Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE) y Colombia. La estrecha relación del material de Rivas con el híbrido se debe a que este último es el que mejor se adapta a la zona, ya sea el padre o el cruce.

En este mismo eje se encuentran los materiales mejorados en su mayoría; la relación más estrecha que se observa en la figura 1, es la de los híbridos EET162 x SCV6, EET400 x UF613 y UF654 x P2 (17, 20 y 21) con el material Rivas0411 (62). Los híbridos hoy en producción provienen principalmente de las fases de establecimiento después de 1990 con mejores selecciones que en los años 70's y 80's.

En el eje cuatro se ubican la mayor parte de los materiales Rio San Juan, los materiales criollos referencia. SJC0108 (7) relacionado con RSJ1311, RSJ2111 (74 y 82) y el criollo MENIER0108 (8) está relacionado con el RSJ2011 (81). Según Menocal (2006), las primeras plantaciones grandes de cacao se reportaron en el valle de MENIER, por tanto, la relación genética de estos materiales puede acreditarse a las migraciones humanas de la época.

En este mismo eje se encontró un híbrido referencia que es SHN8602, relacionado con el material RSJ2311 (83), este a su vez se relaciona con el criollo 7; se le acredita a que este híbrido, a diferencia del resto que se utilizaron para este estudio, es producto de un cruce de material forastero con un material criollo.

RECURSOS GENÉTICOS

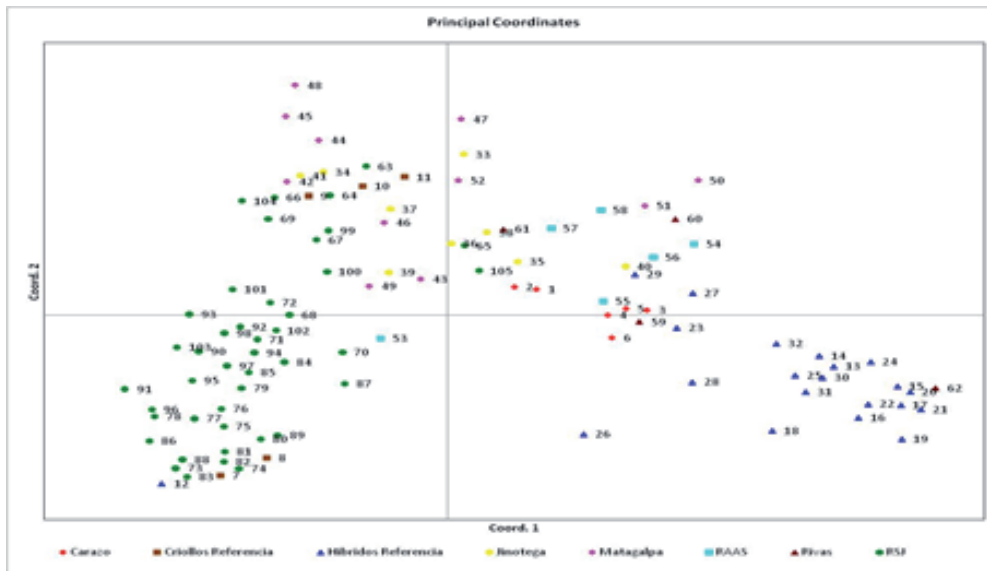


Figura 1. Distribución de las accesiones de cacao según el análisis de componentes principales.

CONCLUSIONES

Se encontró alta diversidad genética para los locus y grupos estudiados, donde el grupo Rio San Juan manifestó la mayor diversidad que el MTcCIR12. Se identificaron 183 alelos para todos los grupos estudiados.

El contenido de información polimórfica (CIP) más alto lo detectó MTcCIR12 y el más bajo MTcCIR6, por tanto los microsatélites que se utilizaron en este estudio resultaron ser altamente informativos y polimórficos porque no se registraron valores menores a 0.50.

pero diferentes al resto de accesiones evaluadas.

Se encontraron materiales criollos que fueron estrechamente relacionados con los utilizados como criollos referencias; pero la mayoría de los materiales en este estudio resultaron ser de los otros grupos genéticos.

Se encontraron materiales híbridos relacionados con materiales colectados, indicando alta adaptación de estos híbridos en determinadas zonas del país.

Las relaciones genéticas reveladas en estos resultados muestran que las variaciones y diferencias genéticas de mayor importancia se encuentran dentro de los grupos estudiados y que las diferencias como grupos son menores; por tanto los individuos son diferentes entre sí independiente del lugar donde se encuentre geográficamente.

En el análisis de componentes principales (PCA), las accesiones Bomat0710, Bomat0810 y Bomat1110 de Matagalpa, formaron un grupo diferente al resto de las accesiones evaluadas, se pueden describir como ligadas genéticamente,

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aragón, EM. 2009. Genetic characterization of *Theobroma cacao* L. in Nicaragua. Thesis MSc. University of Helsinki, Department of Applied Biology. Helsinki. FL. 49 p.

Arguello, O; Mejía, L; Palencia, C. 2000. Origen y descripción botánica. In Tecnología para el mejoramiento de sistemas de producción de cacao, Corpoica, Bucaramanga, CO. p 10-12.

Cryer, NC; Fenn, M.G.E; Turnbull, CJ; Wilkinson, MJ. 2006. Allelic size standards and reference genotypes to unify international cocoa (*Theobroma cacao* L.) microsatellite data. Genetic Resources and Crop Evolution 53:1643-1652.

Días L, AS. 2001. Genetic improvement of cacao (melhoramento genético do cacauero) (ed. Dias LAS), FUNAPE-UFG, Brazil. Translated into English by Abreu-Richart CE (<http://ecoport.org>).

Doyle, JF; Doyle, JL. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12:13-15.

Efombagn, M,I,B; Sounigo, O; Manzanares, M; Cilas, C; Eskes, M.A.B; Allen, K. 2006. Genetic diversity in cocoa germoplasm southern Cameroon revealed by simple sequences repeat (SSRS) markers. African Journal of Biotechnology. 5(16):1441-1449.

Excoffier, L; Smouse, P; Quattro, J. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. Genetics 131(2):479-491.

Lanaud, C; Risterucci, AM; Pieretti, I; Falque, M; Bouet, A; Lagoda P, JL. 1999. Isolation and characterization of microsatellites in *Theobroma cacao* L. Molecular Ecology. 8:2141-2152.

McNeil, C. 2006. Chocolate in Mesoamerica. A cultural history of cacao. University Press of Florida. 542 p.

Menocal, O. 2006. El cacao: Riqueza potencial de la tierra nica a la espera de ser explotada comercialmente en los mercados internacionales. Instituto Nicaragüense de Tecnología Agropecuaria (INTA). Dirección de Investigación y Desarrollo. DSA-INTA. 7 p.

Millon, R. 1955. When the money grew on the trees. A study of cacao in ancient Mesoamerica, thesis doctoral, Columbia University, University of Microfilms, Ann Arbor. 12 p.

Orozco, L. 2010. Mapa cacaotero de Nicaragua: zonas productivas, organizaciones de productores, agencias de apoyo y exportadores. PCC. 26 p.

RECURSOS GENÉTICOS

- Romero, CA; Bonilla, JA; Santos, EG; Peralta, EL. 2010. Identificación varietal de 41 plantas seleccionadas de cacao (*Theobroma cacao* L.) provenientes de cuatro cultivos distintos de la región amazónica ecuatoriana, mediante el uso de microsatélites. Revista Tecnológica ESPOL 23(1):121-128.
- Saunders, JM; Mischke, S; Leamy, EA; Hemeida, AA. 2004. Selection of international molecular standards for DNA fingerprinting of *Theobroma cacao*. Theoretical and Applied Genetics 110:41-47.
- Sereno, ML; Albuquerque P, SB; Vencovsky, R; Figueira, A. 2006. Genetic diversity and natural population structure of cacao (*Theobroma cacao* L.) from the Brazilian Amazon evaluated by microsatellite markers. Conservation genetics 7:13-24.
- Silvertown, J; Charlesworth, D. 2001. Plant population biology. Blackwell publishing. ed. 4. 302 p.
- Soria, VJ. 1966. Obtención de clones de cacao por el método de índices de selección. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura, Turrialba, CR. 16:119-124.
- Thienhaus, S, 2008. Composición genética de las plantaciones híbridas de cacao. El Recreo. Diagnóstico de la producción de cacao en Nicaragua. 25p.
- Urquhart, DH. 1963. Cacao. Instituto del libro. Edición revolucionaria. Habana, CU. 322 p.
- Weir, BS. 1996. Genetic data analysis II. Sinauer, Sunderland, Massachusetts, USA.
- Weir, BS; Cockerham, CC. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. Evolution 38:1358-1370.
- Zhang, D; Boccara, M; Motlall, L; Butler, DR; Umahoran P; Mishk, S; Lyndel, M. 2007. Microsatellite variation and population structure in the refractory cacao of Ecuador. ConsevGenet. 9:327-337.
- Zhang, D; Mischke, S; Johnson, ES; Phillips Mora, W; Meinhardt, L. 2009. Molecular characterization of an international cacao collection using microsatellite markers. Tree Genetics & Genomes 5:1-10.