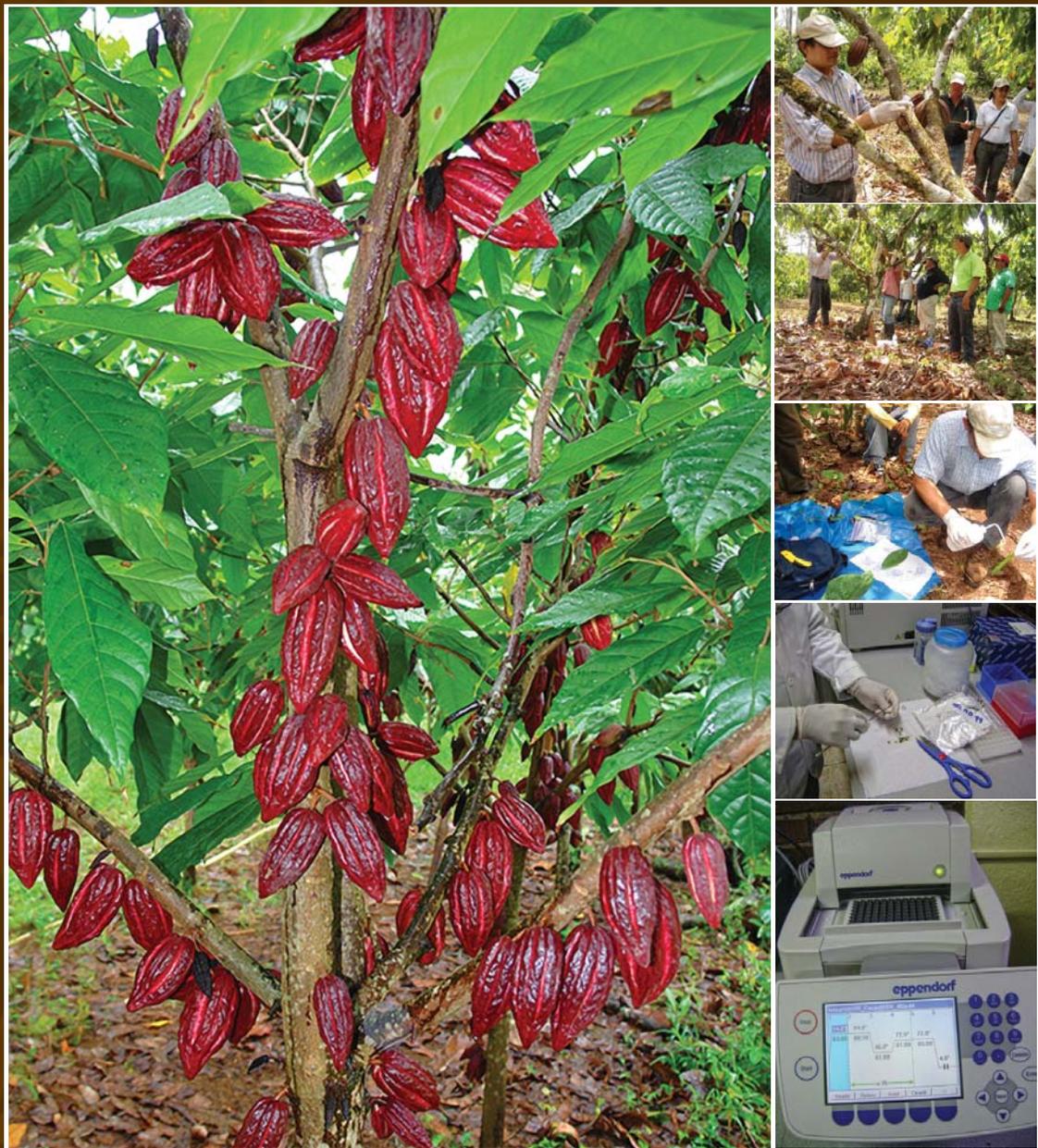




Universidad
Nacional
Autónoma
de Nicaragua
UNAN-Managua



Ecología molecular de la diversidad genética del CACAO en la RAAS



Resultados del análisis molecular de 39 muestras de cacao de la Región Autónoma del Atlántico Sur (RAAS), utilizando marcadores microsatelitales de ADN. Managua, Nicaragua, 2009.

Ecología molecular de la diversidad genética del cacao cultivado en la Región Autónoma Atlántico Sur (RAAS) de Nicaragua

Juan Carlos Ruiz¹, Osvaldo Roa¹, Lester Mejía¹, Christian Martínez² e Iván Marín¹ *

1 Laboratorio Tecnología de los Alimentos, UNAN-Managua. Recinto Rubén Darío. POLISAL II, 2do Piso. Managua-Nicaragua.

2 Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura, IICA-Nicaragua.

*Correspondencia: Teléfono: (505) 2277-2473, 2278-6764, Ext. 191 Fax.: (505) 2277-4943. E-mail: ivmarinarguello@gmail.com

Resumen

El presente estudio abarcó una muestra de 44 árboles de cacao *Theobroma cacao* L. pertenecientes a cuatro poblaciones de la RAAS-Nicaragua: Nueva Guinea, El Rama, Muelle de los Bueyes y de la Estación Experimental El Recreo-INTA. De estas, 39 fueron molecularmente analizadas utilizando un conjunto de 10 microsatélites (SSR) de ADN. Para los 10 locus implementados se logró la amplificación de 58 alelos, con un promedio de 5.8 alelos por locus. La población de Nueva Guinea presentó el mayor average con 4.8 alelos por locus, polimorfismo de 100%, mayor heterocigosidad observada ($H_o=0.556$) y mayor número de alelos efectivos ($N_e=0.29$). Para todas las poblaciones estudiadas el valor de la heterocigosidad observada (H_o) fue de 0.49. La población de Muelle de los Bueyes presentó el mayor índice de diversidad genética ($F_{st}=0.135$). El valor total del Coeficiente de Diferenciación (F_{st}) para todas las poblaciones fue de 0.12. Este valor permite catalogar a la diversidad genética del cacao de la RAAS con un nivel de moderada. El estudio filogenético demostró que las poblaciones de El Recreo-INTA, Muelle de los Bueyes y Nueva Guinea están más emparentadas entre sí y más distantes filogenéticamente de la población de El Rama.

Palabras claves: microsatélites, germoplasma, diversidad genética

Clasificación taxonómica: *Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta; Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; core eudicotyledons; rosids; eurosids II; Malvales; Malvaceae; Byttnerioideae; Theobroma; Theobroma cacao.*

Introducción

Theobroma cacao ($2n=2X=20$) cuyo genoma es de 390 Mb y está distribuido en 10 cromosomas, es una especie neotropical encontrada en América en un rango de 20° N y 20° S. Entre estos paralelos se ubica la región Mesoamericana, la cual es considerada la zona de domesticación del cacao (Henderson, 2007). Además, fue la primera región donde los conquistadores españoles entraron en contacto con la planta de cacao y sus productos. Se considera a Cristóbal Colón como el primer europeo en establecer contacto con el cacao, bajo la forma de semilla seca, en las costas de lo que hoy es el moderno Belice. Pero no fue hasta en 1855 donde se presenta el primer reporte sobre el cacao atribuido a Oviedo y Valdez. En su reporte suministró una completa descripción del árbol, su cultivo, uso de sus productos así como las ceremonias asociadas con la bebida del cacao. Estas observaciones las escribió Oviedo y Valdez durante su estadía en Nicaragua (Bartley, 2005).

El cacao en Nicaragua

El sector productivo cacaotero en Nicaragua está siendo afectado por múltiples factores. La incidencia de enfermedades, la desordenada propagación del material genético, el abandono o limitada atención del cultivo, las precarias vías de comunicación, el poco control en el proceso de fermentado, mezcla de variedades, entre otros, son los principales factores que inciden en la productividad y precios del cacao nacional. Sin embargo, la zona cacaotera de la Región Autónoma Atlántico Sur (RAAS) de Nicaragua ha emprendido un decidido proceso de reactivación, por revertir y controlar los factores mencionados.

El presente estudio es evidencia tangible del esfuerzo multilateral del sector productivo de la zona y tiene como objetivo central conocer el estado de la diversidad genética y la estructura poblacional de los cacaotales en Nueva Guinea, El Rama y Muelle de los Bueyes. Este esfuerzo apunta a la necesidad de mejorar genéticamente los cacaotales de la región, para incidir positivamente en la producción y otros

Ecología Molecular: metodología interdisciplinaria que involucra la interacción entre genotipo, fenotipo y ambiente.

Genoma: material genético completo presente en cada célula del organismo.

Gen: (1) unidad de la herencia transmitida de generación en generación durante la reproducción sexual o asexual (2) Segmento del ADN que codifica para una proteína.

Diversidad genética: variaciones exhibidas y heredables por los individuos de poblaciones creadas, mejoradas o mantenidas por las fuerzas selectivas.

Germoplasma: un individuo o grupo de individuos representando a un genotipo, variedad o especie mantenida en una colección.

Clon: Grupo de plantas genéticamente idénticas las cuales han sido generadas por medio de la propagación vegetativa.

beneficios colaterales, pero antes de mejorar hay que conocer el estado del germoplasma.

Es en este punto donde indagar sobre diversidad genética del cacao de la región tiene repercusiones en la sostenibilidad productiva y no en la dinámica volátil de los precios internacionales.

En Nicaragua las plantaciones de cacao se desarrollaron en base a materiales genéticos híbridos obtenidos por cruzamientos entre trinitarios y amazónicos, y por otro lado por plantaciones endógenas de cacao criollo (cacao fino), aunque se desconoce el impacto de la biodiversidad de estas últimas. Por mucho tiempo los productores, por medio del intercambio social de semillas, han sido los encargados de la propagación de los árboles de cacao, los cuales no fueron obtenidos de jardines clonales o programas de mejoramiento, si no más bien de un proceso de selección aleatorio.

Sin embargo, otro tanto ha sido introducido de materiales genéticos extranjeros. Debido a estos factores los cacaotales de la zona se encuentran caracterizados por una gran variedad de tipos de cacao en una misma plantación (Buchert, 2008).

Sobre la plataforma del material genético y el manejo del cultivo existentes en el país, Nicaragua representa una producción total de 1,500 - 2,000 toneladas mé-

tricas por año, producidas en 6,500 hectáreas (ha), pertenecientes a igual número de pequeños productores. Además, presenta un rendimiento aproximado de 3.5qq/mz, con un rango de precio de 1- 3 U\$ /lbs (Buchert, 2008).

Una de las principales preocupaciones del mercado mundial del cacao es la capacidad que tengan los países productores de abastecer al mercado, permanentemente, con cacao de fina calidad.

También el mercado demanda semillas de alta calidad nutricional e industrial para la elaboración de los productos derivados del cacao. En este aspecto la RAAS, por sus específicas condiciones agro ecológicas, tiene el potencial de ofertarle al mercado internacional granos de excelente calidad y con valor agregado, como son los altos contenidos de aceite de cacao, grupos polifenólicos (antioxidantes) y terpenos (sabor y aroma) (Othman, 2007; Niemenak, 2006). Estos últimos se destacan en el consumo de cacao para la prevención de enfermedades cardiovasculares y el sabor específico del mismo.

En conclusión, el objetivo del presente estudio es establecer el grado de variación genética entre las poblaciones de cacao cultivadas en las zonas de estudio, así como también determinar la diversidad genética del cacao de la zona y extrapolarla con poblaciones élites de cacao de otras regiones del país, inclusive de otros países.

Caracterización de la RAAS

La Región Autónoma del Atlántico Sur de Nicaragua (RAAS) se localiza en la parte sur-este del país, entre los 11° 41' y 13° 06' de Latitud Norte y entre los 83° 03' y 85° 07' de Longitud Oeste. El clima en la Región del Atlántico Sur es lluvioso, presentando una precipitación promedio anual de 2,500 mm. La temperatura es bastante uniforme, registrando un promedio 27° C.

La vegetación original de la RAAS era el bosque húmedo tropical o pluvioselva, el cual se ha visto reducido por causas como el despale para extender la ganadería, la deforestación causada por el corte comercial de árboles sin reposición, el avance de la frontera agrícola, especialmente en la zona del Rama y Nueva Guinea, y el efecto devastador de los huracanes sobre los remanentes de bosques. Debido a los efectos apuntados, es posible que toda la RAAS pierda sus últimos bosques para el año 2015.

La RAAS está dividida administrativamente en 11 municipios, de los cuales tres fueron incorporados en el presente estudio: El Rama, puerto fluvial y de activo comercio, Muelle de los Bueyes donde su principal actividad es el comercio y la ganadería, y Nueva Guinea, una zona ganadera que desde hace 30 años se impuso a una antigua selva, ya casi desaparecida y rodeada de numerosas colonias agrícolas.

Diversidad genética del cacao

El género *Theobroma* contiene 22 especies. De todas éstas *Theobroma cacao* es la única especie cuyas semillas son utilizadas para la elaboración de los productos industriales y alimenticios. Si bien *Theobroma cacao* reporta una amplia variedad, por otro lado los cultivares comerciales poseen una estrecha base genética (Schnell, 2005). Los primarios tipos de cacao comúnmente se refieren como Forastero, Trinitario (híbrido entre Forastero y Criollo) y el Criollo. Aunque otros autores proponen la clasificación de la especie en 10 clusteres o grupos: Marañón, Curaray, Criollo, Iquitos, Nanay, Contamana, Amelonado, Purús, Nacional y Guiana (Motamayor, 2008).

Adicionalmente, otros especialistas plantean dividir al *Theobroma* en dos sub-especies: cacao y *sphaeocarpaceum*, las cuales corresponden al Criollo y Forastero (De la Cruz, 1995), quienes según las posiciones de diversos autores evolucionaron de dos áreas geográficas diferentes: Centroamérica y Suramérica. Sin embargo, otros autores consideran que los tipos Criollo y Trinitario deberían ser considerados como cultivos tradicionales y no como grupos genéticos (Motamayor, 2002). Asimismo la cuenca del Amazonas es considerada como el área que presenta mayor diversidad (Gentry, 1988).

Otro elemento importante a considerar en la diversidad genética del cacao es el sistema de reproducción imperante en cada grupo genético. En los individuos silvestres el sistema de reproducción es de polinización cruzada, debido al sistema de auto incompatibilidad. Por otro lado, en los tipos cultivados comercialmente son autógamias (autocompatibles).

Cacao fino: es un tipo de cacao que se caracteriza por su aroma y sabor superior (dulce, sabor a nueces o frutas y suave).

Variación: Subdivisión natural de una especie que muestra caracteres morfológicos distintos.
2. Categoría específica de una planta de cultivo, seleccionada tomando como base su homogeneidad fenotípica (algunas veces la genotípica).

Qué son los Marcadores Moleculares?

La caracterización e identificación tradicional de las variedades de los cultivos se ha basado en el empleo de caracteres morfológicos y/o agronómicos, como son el tamaño y la cantidad de semillas, precocidad de germinación, crecimiento, etc. No obstante, el uso de marcadores morfológicos en las plantas tiene muchas limitantes, pues su expresión puede estar sujeta a factores ambientales. Con frecuencia estos marcadores sólo es posible evaluarlos a nivel de toda la planta y cuando ésta llega a su estado adulto. En el caso del cacao representa una espera de 4 a 5 años.

A la par de los marcadores morfológicos se incorporó otro tipo de marcadores conocidos como marcadores moleculares, que superan las limitaciones de los marcadores agronómicos. Sus ventajas son: fe-

Cuadro 1. Distribución de áreas de Explotación Agropecuaria (EA) por municipios de la RAAS-Nicaragua.

Municipio	Total EA's	% Total RAAS	Superficie RAAS (mz)	% del territorio RAAS	Cultivo de cacao		
					EA's	mz	% del territorio
Nueva Guinea	5,831	26	323, 718.04	16	573	673	0.2
El Rama	3, 911	17	356, 415.10	18	164	200	0.05
Muelle de los Bueyes	1, 989	9	168, 520.06	8	88	65	0.03
Total	11,731	52	848, 653.20	42	825	938	0.28

Fuente: III Censo Nacional Agrario, Instituto Nacional de Estadísticas y Censo (INEC).

Endogamia:

Apareamiento entre individuos que tienen uno o más antepasados en común. El caso más extremo es la autofecundación que se da de manera natural en muchas plantas y en algunos animales primitivos.

Consanguinidad:

Relación por ascendencia de un antepasado común.

Marcadores

moleculares: marcador genético el cual es asistido a nivel del ADN.

Variación epigenética:

Variación no hereditaria y reversible, a menudo resultado de un cambio en la expresión génica consecuencia de la metilación del ADN.

notípicamente neutros, presentan mayor segregación o polimorfismo que los morfológicos, pueden ser evaluados desde los primeros estados de desarrollo de las plántulas, son aplicables a cualquier tipo de material vegetal, son independientes de la época del año en que se realiza el análisis, permiten la identificación correcta de la variedad sin necesidad de tener que recurrir al monitoreo de muchos caracteres morfológicos y están libres de las variaciones epigenéticas (Nuez, 2000).

Dentro del conjunto de marcadores moleculares sobresalen los de ADN. En el estudio se utilizaron los marcadores de ADN conocidos como Microsatélites o Secuencias Simples Repetidas (SSR). Los microsatélites son re-

giones de secuencias cortas, de dos a 10 pares de bases repetidas, arregladas en serie, las cuales se asume que son altamente variables y distribuidas aleatoriamente por todo el ADN del cultivo en estudio (Azofofeifa-Delgado, 2006). En la presente investigación se utilizaron 10 marcadores SSR diseñados para el genoma del cacao. En la sección de suplementos (S3) se presenta la secuencia de estos microsatélites de ADN. A manera de ilustración a continuación presentamos uno de ellos, conocido con el código de mTc CIR18. Este marcador cuenta con dos pares de bases (GA) que se repiten 12 veces.

mTc CIR 18: GAGAGAGAGAGAGAGAGAGA-GAGA (GA)₁₂

Estas regiones pueden o no estar asociadas a genes. Dado que la repetición por sí misma no codifica para formar ninguna proteína, y debido a que las

secuencias de ADN repetitivo pueden recombinarse y expandirse más frecuentemente que otros tipos de secuencias, estas regiones son altamente variables y consecuentemente útiles para medir la diversidad genética o estructura poblacional de los cultivos.

Es debido a estas virtudes que el presente proyecto se propone la utilización de marcadores microsatélites (SSR) en la caracterización molecular del germoplasma de cacao cultivado en la RAAS, investigación sin precedentes en el ámbito nacional.

Materiales y métodos

Presentación y validación del estudio: Previo a la iniciación del estudio, éste fue presentado a los productores locales, asociaciones, ONG y entidades del Estado representantes de la zona (ver suplemento S1). Con ellos se discutió sobre la pertinencia y nivel de involucramiento. Para alcanzar dicho objetivo se desarrollaron dos talleres. El primero se realizó en febrero del 2008 en el auditorio de la URACAAN, en El Rama, y el segundo en abril del 2008 en la BICUS, Nueva Guinea. A través de la participación de los asistentes se logró elaborar y consensuar la ficha técnica para el levantamiento de los caracteres agro-morfológicos que acompañarán a los caracteres genotípicos del ADN, así como también la organización del proceso de muestreo. Con la información recopilada se elaboró una base de datos y un banco de ADN.

Material vegetal

La recolección del material vegetal fue realizada en la Región Autónoma Atlántico Sur (RAAS) de Nicaragua, entre los meses de marzo y abril del 2008. Se recolectaron 44 muestras de hojas de cacao, no maduras y no jóvenes, pertenecientes a diferentes árboles ubicados en los municipios de Nueva Guinea, El Rama y Muelle de los Bueyes (ver Ilustración 1). La recolección de cada muestra se acompañó con el levantamiento de una ficha agro ecológica de la parcela donde se ubicó el árbol. Además, cada árbol fue referenciado satelitalmente y etiquetado. En la Ilustración 1 se presenta la ubicación de los árboles muestreados. Cada hoja fue envuelta en papel toalla, empacada en una bolsa Ziploc y preservada a -20° C hasta el momento de su procesamiento.



Recolección de muestras en fincas cacoteras de Nueva Guinea, Muelle de los Bueyes y El Rama.

Extracción del ADN

La extracción del ADN se desarrolló en las 44 muestras recolectadas. La hoja fue enjuagada varias veces con agua destilada y perforada hasta obtener discos foliares de un peso de 200 mg. Estos fueron colocados en tubos eppendorf de 1.5 ml, los cuales fueron sumergidos en nitrógeno líquido y triturados con la ayuda de un mortero Kontes. Seguidamente se utilizó un medio comercial para la extracción de ADN, Dneasy Plant Mini Kit (Qiagen, Cat. No. 69104). Se procedió con el protocolo recomendado por la casa comercial, con la salvedad que a la solución de extracción AP1 se le añadió 10 mg/ml de Polyvinylpyrrolidone (Sigma). El ADN fue cuantificado usando bromuro de etidio en un gel de 1.5 % de agarosa. Todas las muestras de ADN fueron diluidas hasta obtener una concentración aproximada de 5 ng/ μ L.



Las 39 muestras de cacao extraídas en la RAAS, listas para recibir la aplicación de los microsatélites.

Marcadores microsatélites y Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Para la aplicación de los microsatélites se seleccionaron y procesaron sólo 39 muestras de las 44 colectadas. Los marcadores moleculares utilizados en el presente estudio fueron previamente reportados (Saunders, 2004) y se consideró las observaciones de otros especialistas (Zhang, 2006). En el presente estudio se utilizaron 10 microsatélites (SSR). El nombre de los marcadores microsatélites, la secuencia de los cebadores, temperatura de alineación y tamaño están referidos en el suplemento 3 (S3). La reacción del PCR se llevó a cabo en un volumen total del 50 μ L, conteniendo 5 ng de ADN genómico. Todas las reacciones del PCR contenían: 1.0 U Platinum Taq DNA polimerasa (Invitrogen), 0.2mM dNTPs (Invitrogen), 0.2 μ M de cada cebador (Invitrogen), 1.5mM MgCl₂, 1X solución amortiguadora (20mM Tris-HCl, pH 8.0, 40mM NaCl, 2mM Fosfato de Sodio, 0.1mM EDTA, 1mM DTT, 50% glicerol). Las condiciones del termociclador fueron: 4 min desnaturalización a 94°C, seguido por 33 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 segundos, 1 minuto a la apropiada temperatura de alineación y 1 minuto de extensión a 72°C: con una extensión final de 72°C por 7 minutos.

Electroforesis

Los productos amplificados fueron separados en un aparato de electroforesis vertical (T-Rex Aluminum Backed Sequencer - Model FB-SEQ-3545-FISHER) en un gel desnaturalizante (6M urea) de 6% de Poliacrilamida (Fisher) corridos a 55W, 1700V por 2 ó 3 horas en 1X TBE (Qiagen) solución amortiguadora y detectada por la tinción de plata. El tamaño de las bandas amplificadas fue determinado con el marcador de ADN, 125bp DNA Ladder (Invitrogen).

Procesamiento estadístico de datos

El programa estadístico Genetic Analysis in Excel v6.1 (GenAIEx) (Peakall, 2006) fue utilizado para determinar el average de alelos por locus, la frecuencia de los alelos, el porcentaje de polimorfismo por loci, el valor de heterocigosis observada y esperada, el patrón de alelos entre la población, y el Análisis de Coordenadas Principales (PCA). El programa estadístico Genetix 4.02 (Belkhir, 2001) se implementó para la determinación estadística de Nei sobre la diversidad genética y el cálculo de la F-estadísticas (F-Statistic of Wright). Con ayuda del programa Structure v2.2 (Prichard, 2000) se determinó el coeficiente de linaje y se construyó el gráfico de linaje por medio de la determinación del parámetro Q para cada individuo, bajo el modelo admixture, usando 10,000 interacciones. El árbol filogenético se construyó usando el programa Phylip v3.6. Otros programas soporte fueron utilizados: Arlequin v3.1 y Convert (Glaubitz, 2004)

Resultados

Una de las fortalezas del presente estudio fue el capital social que involucró el proceso de recolección de las muestras y el levantamiento de las fichas agroecológicas. Los actores locales decidieron las fincas a muestrear territorialmente y, en colaboración con el dueño de la parcela, determinaron los árboles a ser muestreados. En calidad de criterios básicos para la selección se consideró a los árboles productivos, maduros sexualmente y sanos. En el cuadro 2 se detalla el nivel de participación social en el muestreo.

El presente estudio se desarrolló en tres municipios pertenecientes a la RAAS y se recolectaron un total de 44 muestras de cacao. Para el estudio de marcadores moleculares con microsatelites (SSR) se procesaron 39 muestras de *Theobroma cacao*, distribuidas

de la siguiente manera: El Rama 12 muestras, Nueva Guinea 12, Muelle de los Bueyes 10 y Centro Experimental El Recreo-INTA 5 muestras. En la ilustración 1 se presenta el mapa con la ubicación geográfica y georeferenciada de cada muestra procesada. En la sección de suplementos (S1) se detalla información completa sobre cada árbol muestreado.

Adicionalmente se incorporaron dos muestras pertenecientes a otras especies: una de ellas correspondiente a *Theobroma bicolor* (cacao pataste) y el otro *Herrania purpurea* (Pittier) R.E. Schult (cacao de monte). Estas dos últimas muestras, con la aplicación de los 10 microsatelites (SSR) utilizados, no amplificaron para ningún marcador, lo que demuestra la carencia de vínculo genético próximo entre *Theobroma cacao* y estas especies. Dichas muestras fueron utilizadas como controles negativos. En la Ilustración 2 se presenta la morfología de las mazorcas.

Destacamos que la variación genética se puede manifestar en diferentes niveles. En este estudio es cuantificada por medio de la variación y frecuencia de alelos pertenecientes a diferentes locus, el nivel de heterocigosis entre individuos, la distancia genética y el grado de similaridad genética entre poblaciones.

A primera instancia con la implementación de los 10 microsatelites (SSR) se determinó la variación a nivel de alelos. Estos revelaron una amplificación total de 58 alelos con un promedio de 5.8 alelos por locus. El tamaño de los alelos varía desde 155 pares de bases (pb), el más corto, hasta 350 pb, el más largo (Cuadro 3).

El microsatélite mTc CIR40 que amplifica en el cromosoma 3 del genoma del cacao, resultó ser el locus más polimórfico, con nueve alelos amplificados, y el menos polimórfico es el mTc CIR22 (cromosoma 1), con apenas dos alelos en el locus.

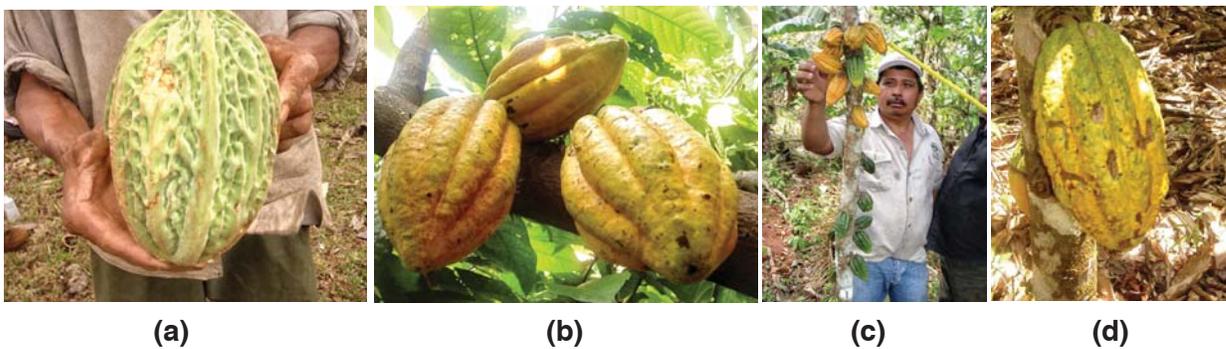
Cuadro 2. Distribución de la participación social en el muestreo

Zona de Muestreo	Número de muestras recolectadas	Organizaciones participantes	Total del participantes
Nueva Guinea	17	8	13
El Rama	16	8	14
Muelle de los Bueyes	11	8	15
Total	44		42

Ilustración 1: Mapa con la ubicación geográfica de los árboles muestreados en la RAAS-Nicaragua



Ilustración 2. Imágenes de la mazorca (a) *Theobroma bicolor* (cacao pataste); (b) mazorca *Theobroma cacao* L; (c-d) Arbol y fruto de cacao de monte *Herrania purpurea* (Pittier) R.E. Schult.



Cuadro 3. Estadísticas generales de los 10 microsatélites utilizados en las muestras de cacao obtenidas en la RAAS de Nicaragua

Locus	Na	Tamaño alelos (bp)	Ho	He	HWE test X2
mTc CIR6	4	230, 235, 240, 250	0.622	0.618	0.2ns
mTc CIR7	6	155,160,165,170,173,175	0.639	0.532	0.4ns
mTc CIR8	4	290,295,300,305	0.299	0.279	0.7ns
mTc CIR11	7	210,280,285,300,305,310,320	0.548	0.556	0.3ns
mTc CIR15	8	220,225,230,235,240,245,250,255	0.586	0.618	0.2ns
mTc CIR18	7	315,320,325,330,340,345,350	0.467	0.673	0.01
mTc CIR22	2	290, 300	0.367	0.264	0.08
mTc CIR26	4	285,290,300,310	0.382	0.338	0.1ns
mTc CIR40	9	250,255,260,265,270,275,280,285,290	0.594	0.557	0.5ns
mTc CIR60	7	180,185,190,195,200,210,215	0.398	0.607	0.01
Total	58				
Average	5.8		0.4902	0.5042	

Número de alelos (Na), Heterocigosis observada (Ho), Heterocigosis esperada (He), Prueba de Exactitud para determina la desviación sobre la relación de Equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE) donde ns significa No Significante ($P \geq 0.05$) la población se encuentra bajo las condiciones de HWE. Los números resaltados en negro representan los alelos raros, son aquellos que tiene una frecuencia menor de 0.050.

Asimismo, se muestran señalados en negrita los alelos considerados como raros, que son aquellos que presentan una frecuencia menor a 0.05 (Cuadro 3). En total para todos los locus hay 15 alelos raros. El locus que presenta el mayor número de alelos raros es el mTc CIR 11 con cuatro, los cuales amplifican en el cromosoma 2 del cacao.

Por último, la columna extrema derecha del cuadro 3 contiene el valor de la prueba de desviación para el Hardy-Weinberg (H-W) equilibrio. Este modelo es fundamental para determinar la relación entre la frecuencia de los alelos y genotipo a través del tiempo, pero para ello es necesario que el organismo cumpla ciertas consideraciones: sea diploide, se reproduzca sexualmente, no presente cruce generacional, presente gen con dos alelos, la frecuencia de los alelos sea idéntica en masculinos y femeninos, que la migración y mutación sea ignorada y por último que la selección natural no afecte los alelos.

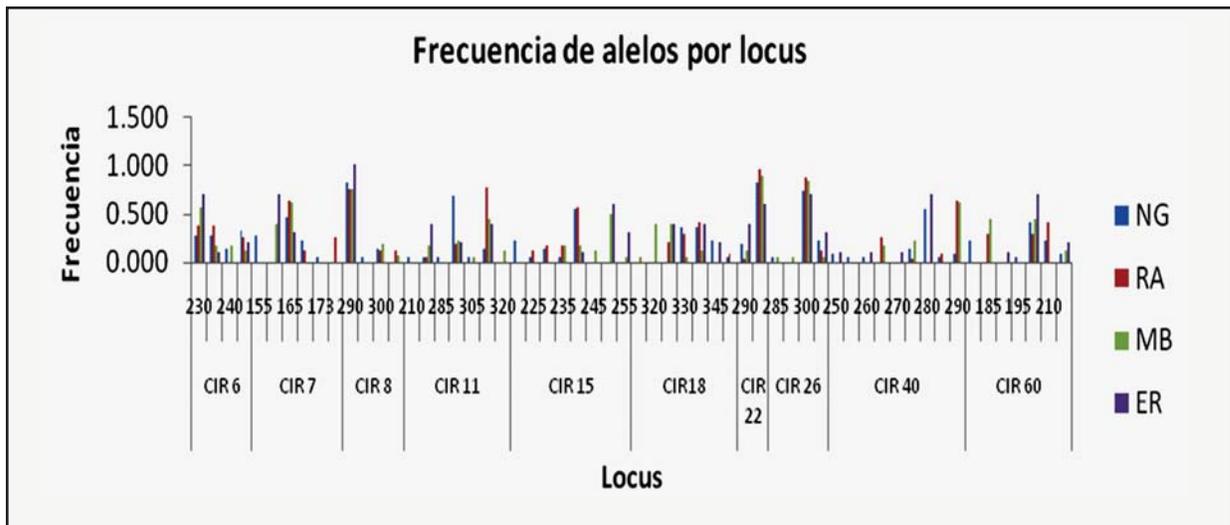
Bajo estas condiciones definimos al equilibrio H-W como la relación matemática que establece el vínculo entre la frecuencia de alelos y la frecuencia de genotipos, además determina la proporción de genotipos en una población que se mantendrá constante, de generación en generación.

El valor de la probabilidad (P), determinado por el Test X2 HWE (Cuadro 3), para la mayoría de los locus es no significativo (ns). Este evalúa el grado de desviación u aproximación entre el valor observado (Ho) y el esperado (He) para la heterocigosis. Para valores mayores de $P \geq 0.05$ (Cuadro3) el modelo de correspondencia entre lo observado y esperado es lo suficientemente próximo para que no sea rechazado (ns, no significativo).

La heterocigosis observada (Ho) por locus oscila desde 0.299 para el locus mTc CIR8, hasta 0.639 correspondiente al locus mTc CIR7. En relación a la heterocigosis esperada (He), el intervalo de los valores oscila entre 0.264 y 0.673. Para la mayoría de los locus el valor de la heterocigosis observada (Ho) es mayor que el valor de la heterocigosis esperada (He) y sus valores son muy próximos entre si. En el caso que estos valores sean muy distantes entre si, es probable que una o varias consideraciones (anteriormente expuestas) para el equilibrio de H-W no se estén cumpliendo. Todos los valores referidos y distribuidos por locus se presentan en el Cuadro 3.

La Ilustración 3 ofrece un panorama global sobre la distribución de la frecuencia alélica reportada para los 10 locus en estudio. Observamos cómo el locus mTc CIR40 presenta el mayor numero de alelos y, a su vez, el menor valor de frecuencia, ya que este va-

Ilustración 3. Distribución del número y frecuencia de alelos por locus estudiado



Nueva Guinea (NG), El Rama (RA), Muelle de los Bueyes (MB), Estación Experimental El Recreo-INTA (ER).

lor se distribuye entre todos los alelos obtenidos. El valor de las frecuencias oscila entre cero y uno. Los valores más altos para las frecuencias es reportada por los locus mTc CIR 8, mTc CIR22 y mTc CIR26.

Resulta atractivo observar en el Cuadro 4 cómo se distribuyen los alelos por región. Nueva Guinea presenta el mayor número de alelos obtenidos (43) por ende el mayor average (4.3) y el menor average lo obtiene el Centro Experimental El Recreo-INTA (2.5), éste en parte porque fue la población en estudio más pequeña, con cinco individuos. Es necesario destacar que en el estudio se incorporaron las muestras del Recreo-INTA debido a que es considerada una población de referencia, élite, introducida y seleccionada. Además, la población de Nueva Guinea presenta los locis con mayor número de alelos por locus. Estos son mTc CIR11, con seis alelos, y mTc CIR 40, con siete alelos.

El total de la población de árboles de la RAAS mostró 58 alelos amplificados, con un average de 5.8. Los locus con mayor average son el mTc CIR11 (7 alelos) y mTc CIR15 (8 alelos), ambos con un average de 4.25.

De manera concisa, la Ilustración 4 nos ofrece un panorama global de la relación de ciertos indicadores de variabilidad genética entre las poblaciones en estudio. En esta ilustración destacamos el valor de alelos efectivos (N_e) para la población de Nueva Guinea. Este no es más que el número de parientes

responsables por la composición genética de la progenie en la siguiente generación, representa la frecuencia de alelos que efectivamente se trasladan de una generación a otra.

El estudio de la diversidad es un tema central en ecología de comunidades y de ecosistemas; sus conceptos y herramientas se utilizan en el estudio de cultivos perennes con sombra, agro-bosques como el caso del cacao. En este caso, el Índice de Shannon es uno de los más comúnmente usados en ecología y agroforestería. Este mide el recíproco de la probabilidad de seleccionar todas las especies en relación a la proporción con que existen en la pobla-

Alelo: forma alternativa de un gen. En una célula diploide, como el cacao, hay dos alelos para cada gen.

Locus: un sitio específico sobre un cromosoma (plural: loci).

Homocigotos: un individuo que tiene dos copias del mismo alelo para un gen específico.

Heterocigoto: un individuo con diferentes alelos para un gen específico.

Genotipo: 1. Constitución genética de un organismo. 2. Constitución alélica de un locus particular, p. ej., Aa o aa. 3. Efecto suma de todos los loci que contribuyen a la expresión de un carácter.

Cuadro 4. Distribución del número de alelos por área de muestreo.

Locus	NG	RA	MB	ER	Average	Total
mTc CIR6	4	3	4	3	3.5	4
mTc CIR7	4	3	2	2	2.75	6
mTc CIR8	3	3	3	1	2.5	4
mTc CIR11	6	3	5	3	4.25	7
mTc CIR15	5	4	5	3	4.25	8
mTc CIR18	4	4	5	3	4.0	7
mTc CIR22	2	2	2	2	2.0	2
mTc CIR26	3	2	4	2	2.750	4
mTc CIR40	7	4	3	4	4.5	9
mTc CIR60	5	3	3	3	3.5	7
Total	43	31	36	25		58
Average	4.3	3.10	3.6	2.5	3.375	5.8

Frecuencias alélicas: número relativo de las copias de un alelo en una población, expresada como una porción del total de números de copias de todos los alelos en un dado locus de una población.

ción. El índice refleja la heterogeneidad de una comunidad sobre la base de dos factores: el número de especies presentes y su abundancia relativa. Conceptualmente es una medida del grado de incertidumbre asociada a la selección

aleatoria de un individuo en la comunidad. El valor más alto obtenido para el Indicador de Shannon, le corresponde a la población de Nueva Guinea (Ilustración 4).

En relación al número de alelos únicos y la heterocigosidad esperada (Ilustración 4, línea ondulada superior) Nueva Guinea marca los valores más altos.

Detalle de la organización genética de las subpoblaciones de la RAAS

La variación genética contenida en las poblaciones y las especies es uno de los ejes centrales asociados a los cambios evolutivos, adaptación, la eficacia biológica y respuesta al cambio climático. Es así desde que existe una correlación entre la cantidad de la variación genética y la capacidad de respuesta.

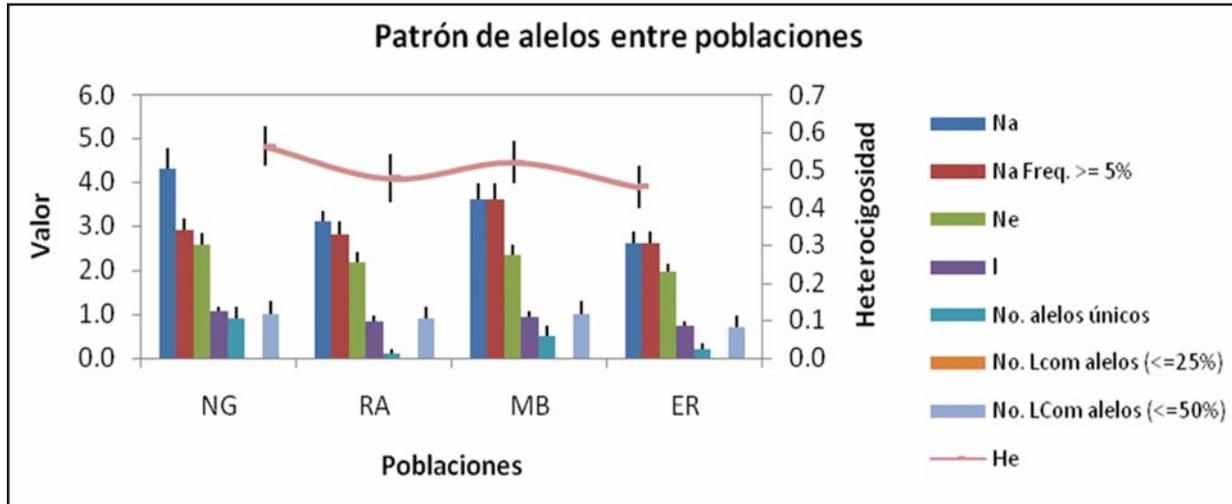
Las consecuencias de la selección natural pueden ser demostradas por medio de la variación alélica (secuencias particulares de ADN) de un locus, en condiciones medioambientales particulares. En la Ilustración 5 mostramos un conglomerado de variables, pretendiendo establecer una correlación entre variación genética y capacidad de cambio por parte de las poblaciones. Cuanto mayor es el número de locis y de alelos variables en éstos, mayor es la posibilidad de cambio en las frecuencias de algunos alelos.

En la misma Ilustración 5 denotamos cómo la subpoblación de Nueva Guinea continúa presentando los mejores indicadores. Con una población de 12 individuos estudiados, que representan el 30% de la población total, reporta 43 alelos (Nal), un average de 4.3 alelos diferentes (Na), 2.56 de alelos efectivos (Ne) y polimorfismo de 100% (P).

Aquí hay que destacar el valor del Porcentaje de Polimorfismo para cada población. Este parámetro refleja el porcentaje de locus que presentan más de un alelo. Las poblaciones de Nueva Guinea, El Rama y Muelle de los Bueyes presentan un 100 % de polimorfismo, es decir que todos los locus estudiados con los 10 microsatélites en estas tres subpoblaciones presentan más de un tipo diferente de alelo.

En una población diploide, como es el caso del cacao, suelen ser homocigóticos si los dos alelos en un dado locus son idénticos, o heterocigóticos si los dos alelos son diferentes. La heterocigosis está determinada por la cantidad de veces que se repiten (frecuencia) los alelos diferentes para un determinado

Ilustración 4. Distribución de alelos por población estudiada



Número de alelos diferentes (Na), Número de Alelos con una frecuencia $\geq 5\%$ (Na Freq. $\geq 5\%$), Número de alelos efectivos (Ne), Índice de información Shannon (I), Número local de alelos comunes (No. LCom alelos $\leq 25\%$), Número local de alelos comunes (No. LCom alelos $\leq 50\%$), Heterocigosidad esperada (He). Poblaciones: Nueva Guinea (NG), El Rama (RA), Muelle de los Bueyes (MB), Centro Experimental El Recreo-INTA (RE).

locus. La correspondencia entre el valor observado y el esperado para la heterocigosis se representa por medio del parámetro H_o y H_e , detallado en el Cuadro 5. Los datos reportados en dicho cuadro reflejan el mayor valor de aproximación entre H_o (0.555) y H_e (0.562) para la población de Nueva Guinea y H_o (0.560) y H_e (0.554) para la población de la Estación Experimental El Recreo-INTA, aunque ambos valores nunca tienden a ser totalmente idénticos, debido a las fluctuaciones estadísticas.

El reparto de la variabilidad genética dentro y entre poblaciones es estimado por medio de la determinación de la diversidad genética propuesta por Nei (1973) y el análisis F-estadístico del mismo, desarrollado por Wright. En el caso de los marcadores codominantes, a como lo son los microsatélites (SSR), permiten distinguir a los individuos heterocigóticos de los homocigóticos.

Se pueden usar los valores de heterocigosidad para obtener una primera estimación de un parámetro, muy importante en las especies vegetales perennes, la tasa de alogamia. La probabilidad que dos alelos de un mismo locus en un individuo sean idénticos a partir del mismo descendiente es denotado como Índice de Fijación o Coeficiente de Diferenciación (F) y en el contexto del presente estudio este índice se corresponde con los valores F del Cuadro 5, donde los símbolos representan el nivel de jerarquía que están siendo comparados.

Así, tenemos que F_{is} representa la probabilidad que cualquier gen particular en una población endogámica tenga idénticos alelos por descendiente. En el Cuadro 5, todos los valores son positivos, lo que permite extrapolar que la probabilidad que dos alelos sean idénticos por descendiente sea moderada (moderada deficiencia de heterocigosis).

El índice F_{ST} es un parámetro decisivo en la medición de la variación genética. Tiene un valor mínimo de 0 (indicando ausencia de divergencia genética) y máximo valor de 1 (indicando la fijación para alelos alternativos en diferentes subpoblaciones), y determina la reducción de la heterocigosidad en la subpoblación. El average de F_{ST} para todas las poblaciones es de 0.13 y según el rango propuesto por Wright (Hartl, 2007) este valor representa a una población con un rango de diversidad genética moderada.

Selección Natural: Supervivencia y eficiencia reproductiva diferenciales de los organismos, atribuidas a las diferencias en las características que afectan a la aptitud con que utilizan los recursos naturales

Codominante: cuando ambos alelos son expresados en el estado heterocigótico, de manera que el fenotipo refleja la contribución de ambos.

Cuadro 5. Estadísticas generales por población. Medición de la diferenciación dentro y entre las poblaciones de la RAAS.

Región	N	%	NAI	Na	Ne	Nu	P	Ho	He	FST	FIS
NG	11	30	43	4.3	2.568	9	100	0.555	0.562	0.12170	0.08742
RA	12	32	31	3.1	2.164	1	100	0.397	0.477	0.12258	0.03734
MB	9	24	36	3.6	2.324	5	100	0.450	0.520	0.13569	0.04854
ER	5	13	26	2.6	1.973	2	90	0.560	0.554	0.10000	0.11487
Total	37	100	136	3.4	2.257	17	97.5	0.490	0.503	0.13	

Número de muestras por población (N), Porcentaje del numero de genotipos analizados por región (%), Número de alelos reportados por población (NAI), Número de alelos diferentes por locus (Na), Número de alelos efectivos por población (Ne), Número de alelos únicos (Nu), Porcentaje de polimorfismo (P), Heterocigosidad observada (Ho), Heterocigosidad esperada (He), Coeficiente de Diferenciación (Índice de fijación) de la Subpoblación al Total de la población (Fst), Coeficiente de Diferenciación del Individuo en relación a la Subpoblación (Fis). Poblaciones: Nueva Guinea (NG), El Rama (RA), Muelle de los Bueyes (MB), Centro Experimental El Recreo-INTA (RE).

Para poder establecer el nivel de heterocigosidad en las subpoblaciones, no sólo es necesario compararlos entre ellas, es importantes valorar como se comporta dicho parámetros (Fis, Fit, Fst) a nivel de los locus estudiados.

En el Cuadro 6 se reportan los valores del Coeficiente de Diferenciación correspondientes a los 10 locus. Los valores positivos para Fis y Fit indican una deficiencia de heterocigosis y los negativos un exceso de heterocigosis. Los valores del Coeficiente de Fijación (F) denota la proporción de alelos idénticos por descendiente. Más próximo a cero, mayor es la proporción de identidad. Para los valores negativos o retirados de cero refleja que los dos alelos sean

diferentes. En el mismo cuadro los valores obtenidos para el Coeficiente Fst es positivo para todos los locus moviéndose dentro del rango de $0 < F \leq 1$, en donde el locus mTcCIR40 presenta el valor más alto de 0.273 y el más bajo es el locus mTc CIR6 con 0.062.

Recordemos que este parámetro valora el nivel de diversidad genética de las subpoblaciones en relación a la población total. El average obtenido de 0.14 para todos los locus (Cuadro 6) no difiere del valor obtenido para el promedio de las subpoblaciones, 0.13 (Cuadro 5). Lo que confirma que la población total de los cacaotales de la RAAS es acreditada con un nivel moderado de diversidad genética.

Cuadro 6. Estimación del Coeficiente de Diferenciación por Microsatélites (SSR) utilizados en la población de cacao de la RAAS. Estos coeficientes son utilizados para valorar la variación genética en una población subdividida en niveles de jerarquía.

Locus	FIS	FIT	FST
mTc CIR6	-0.006	0.068	0.074
mTc CIR7	-0.222	0.034	0.210
mTc CIR8	-0.074	-0.008	0.062
mTc CIR11	0.015	0.189	0.177
mTc CIR15	0.051	0.248	0.207
mTc CIR18	0.305	0.401	0.137
mTc CIR22	-0.393	-0.225	0.120
mTc CIR26	-0.129	-0.080	0.043
mTc CIR40	-0.066	0.226	0.273
mTc CIR60	0.343	0.441	0.149
Average	-0.018	0.129	0.140

Genética poblacional: disciplina científica que estudia el patrón y los factores que producen, mantienen y eliminan la variación genética entre y dentro de individuos.

Distancia genética: medición de la similaridad genética entre cualquier par de poblaciones. Determinada sobre la base de la variación de las características fenotípicas., frecuencia de alelos o secuencia de ADN.

Linaje: grupo de individuos, relacionados por un común descendiente.

Filogenia: deducción de la historia evolutiva entre organismos relacionados.

Para los valores negativos obtenido en FIS y FIT (Cuadro 6) reflejan un exceso de heterocigosidad. El valor FIS representa la probabilidad que dos alelos en un locus sean idénticos por descendientes. A mayor valor negativo más lejana es la probabilidad que los dos alelos sean idénticos. Así tenemos que el locus mTc CIR22 al obtener valores negativos mas bajos para FIS (-0.393) y FIT (-0.225) representa al locus heterocigótico ideal.

Una de las consecuencias de la subdivisión de la población total en poblaciones individuales es la reducción del average de la heterocigosidad. En correspondencia, con este enunciado, en el Cuadro 7 observamos como Hs y Ht tiene diferentes valores.

Por un lado HS denota el average de la heterocigosis entre las subpoblaciones ($H_s = 0.5032$) donde el subíndice indica subpoblación. Por otro lado Ht (0.5994), representa el average de la heterocigosis de los individuos dentro de un área total.

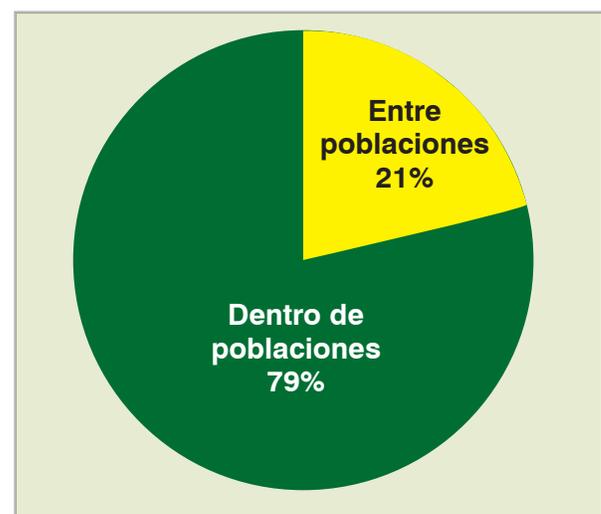
La mayoría de las poblaciones son divididas en poblaciones mas pequeñas (subpoblaciones) donde de alguna manera surge la diferenciación genética, lo que significa que la frecuencia de los alelos entre las subpoblaciones comienzan a ser diferentes. A este proceso se le conoce como Estructura Poblacional. En cambio cuando una subpoblación es dividida en diferentes niveles jerárquicos recibe la clasificación de Estructura Jerárquica de la Población. En el presente estudio ambos procesos son valorados con la determinación de los parámetros Fst, Fit, y Fis presentados en Cuadro 7. Además se incluye la determinación de los parámetros de diferenciación genética Dst, Gst, Dm y Rt.

El coeficiente de diferenciación (Fst) de pares comparativos fue estimado para las cuatro subpoblaciones (Cuadro 8). Este parámetro permite comparar la cercanía o lejanía genética entre dos poblaciones. Es así que El Rama y el Recreo-INTA son las subpoblaciones que presentan el máximo valor de Fst (0.159), reportándose como las poblaciones analizadas más distintas. Contrariamente, las más próximas son El Rama y Muelle de los Bueyes (Fst 0.061), obteniendo el límite de diferenciación.

En la valoración de la genética poblacional del área de estudio, es necesario determinar la discrepancia molecular entre las subpoblaciones.

La ilustración 5, muestra el Análisis de la Variación Molecular (AMOVA) practicado a la totalidad de las muestras de cacao pertenecientes a la RAAS. Este es un método que permite estimar la diferencia entre poblaciones basado en los datos moleculares obtenidos a partir de la aplicación de los 10 microsatelites implementados en el presente estudio. En dicha ilustración se expresa el nivel de diferenciación entre y dentro de las poblaciones. El nivel más alto (79%) de discrepancia molecular se observa dentro de los individuos que componen la población. Por otro lado el nivel de diferenciación entre las cuatro poblaciones de la RAAS es de 21%.

Ilustración 5. Relación de la variación molecular entre y dentro de las poblaciones de la RAAS



Porcentaje de la discrepancia molecular (RAAS-Nicaragua)

Cuadro 7. Parámetros de la Diversidad Genética de la población total de la RAAS.

	Indicadores	Valor	Interpretación
Diversidad genética	HS	0.5032	Average de la Heretocigosis Esperada entre organismos de una sub-población reproduciéndose aleatoriamente
	HT	0.5994	Average Total de la Heterocigosis Esperada (Diversidad Genética) entre organismos dentro de una área, donde $H_t = H_s + D_{st}$. Determina la proporción de la diversidad genética de la especie que esta presente dentro de una población y entre poblaciones. Indica la diferenciación de la diversidad entre poblaciones.
	DST	0.0962	Coefficiente de la diversidad genética entre poblaciones. Es una magnitud absoluta que mide la diferenciación que ocurre entre poblaciones. La relación entre el valor de H_s y D_{st} es un parámetro de diversidad genética. H_s , H_t y D_{st} son parámetros utilizados para medir la diferenciación genética.
Coefficiente de diferenciación genética	GST	0.1605	Coefficiente de Diferenciación Genética o Coeficiente de Nei bajo las condiciones de equilibrio H-W. Es un estimado de la fracción de la diferencia genética entre sub población (Nuez, 2000). $G_{st} = D_{st} / H_t$. G_{ST} y F_{ST} son parámetros que indican el grado de diferenciación entre poblaciones. Estos valores oscilan entre uno y cero, donde los valores más próximos a uno indican una mayor diferenciación repartida entre poblaciones. Valores más próximos a cero indican una baja variación dentro de las subpoblaciones (Serenó, 2006).
Divergencia genética	Dm	0.128	Parámetro de la magnitud absoluta de la divergencia genética entre sub poblaciones. Es independiente de la diversidad genética dentro de subpoblaciones. Esta es definida como: $D_m = sD_{st} / (s-1)$, donde s representa el número de subpoblaciones comparadas (Serenó, 2006). Esta medida nos da el valor de la distancia genética mínima media entre poblaciones, ofrece el grado de diferenciación genética entre organismos (Nuez, 2000). Cuando $D = 0$, indica que las dos muestras comparadas son idénticas, la población posee idéntica frecuencia de alelos.
Wright F- Estadísticas	FIS	0.117	Coefficiente de Diferenciación (Índice de Fijación) de los individuos relacionados a la sub población. Mide la deficiencia de heterocigosis dentro de la población.
	FIT	0.24	Coefficiente de Diferenciación (Índice de Fijación) de los individuos relacionados a la población total. Refleja el déficit total de heterocigosis, donde $F_{it} = F_{is} + F_{st}$
	FST	0.13	Coefficiente de Diferenciación (Índice de Fijación) de la sub-población relacionado a la población total. Estima la cantidad de diferencia en la subdivisión de una población. Con un valor en el rango 0.05 a 0.15 indica una moderada diferenciación genética (Hartl, 2007). Mide la deficiencia de la heterocigosis entre poblaciones.
Diversidad Genética	RST	0.071	Diversidad genética interpoblacional. Es utilizado para estimar la diversidad genética interpoblacional respecto a la intrapoblacional (Nuez, 2000).

Cuadro 8. Coeficiente de Diferenciación Fst entre todas las poblaciones pares

Población	NG	RA	MB	ER
NG	0.000	-	-	-
RA	0.080	0.000	-	-
MB	0.096	0.061	0.000	-
ER	0.107	0.159	0.101	0.000

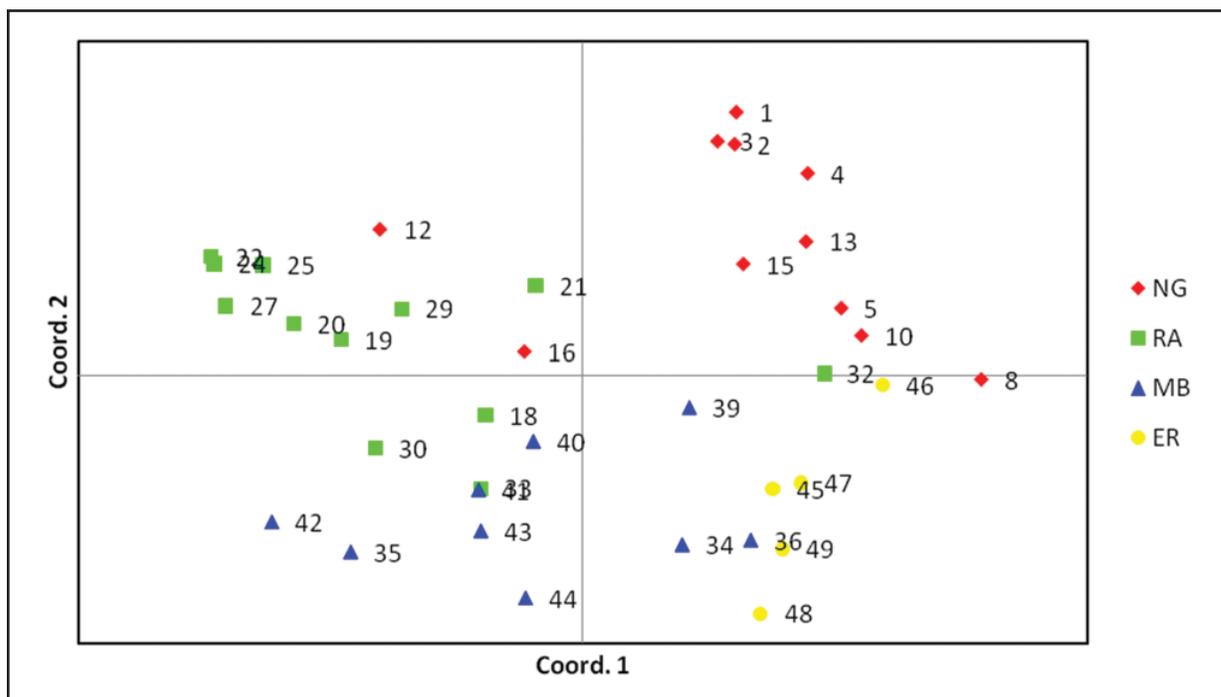
El Análisis de Coordenadas Principales (PCA) es un procedimiento matemático que permite transformar un número posible de variables correlacionadas con un número pequeño de variables no correlacionadas, facilitando la interpretación visual de la similitud o disimilitud que hay entre individuos o grupos. Tal relación es plasmada en un plano donde la distancia geométrica entre los puntos refleja la distancia genética.

En la Ilustración 6 se observa el plano geométrico en que cada punto con su respectivo número representa el árbol muestreado. Los puntos que se cruzan de un cuadrante a otro indican similitud génica entre los individuos. También se observa en ciertos cuadrantes cómo hay puntos que encajan perfectamente uno

sobre otro, como si fuesen un solo punto, tal es el caso de las muestras 22 (Finca Peoresnada, Presentación Pérez) y la 24 (Finca La Argenita, Manuel Rojas Miranda) ambas pertenecientes a El Rama (ver suplemento S2). Más interesante es observar la coincidencia de puntos de diferentes subpoblaciones, como el árbol 41 de Ernesto Rosales, en Muelle de los Bueyes, y la 33 de Santa María Montoya Sequiera, del Rama (ver suplemento S2).

Para profundizar en el estudio de la diversidad genética de la población cacaotea de la RAAS es necesario agruparla por cluster de asociación. En la Ilustración 7 se representan los valores del coeficiente de membresía estimado para cada individuo,

Ilustración 6. Matriz bidimensional de asociación (distancia) entre individuos. Análisis de Coordenadas Principales (PCA) de cuatro poblaciones de cacao. RAAS-Nicaragua



Nueva Guinea (NG), El Rama (RA), Muelle de los Bueyes (MB), Centro Experimental El Recreo-INTA (ER). PCO Coord. 1 (27%) y PCO Coord. 2 (49.66%).

el cual es agrupado en un cluster. Cada individuo está representado por una sencilla y coloreada línea vertical, agrupada en cuatro poblaciones (K=4). Los colores en cada línea representan el porcentaje de la membresía individual en relación al linaje del ancestro o proporción genética heredada del ancestro. La muestra 32 perteneciente a Miguel Escoto Reyes (Finca San Miguel, Muelle de los Bueyes) (ver suplemento S2), posee una constitución genética que está conformada por el aporte del linaje ancestral de tres individuos; en la línea vertical se observa la presencia de tres colores diferentes.

Si un par de genes de especies o poblaciones diferentes se desarrollan paralelamente, y si el grado de divergencia entre los dos genes implica que ellos se hayan originado a partir de la generación t, se puede

inferir que dichos genes divergieron a partir de un ancestro común en un período de tiempo t/2. Este razonamiento nos permite construir el árbol filogenético basado en la distancia genética. En la Ilustración 8 se presenta el árbol filogenético de las cuatro subpoblaciones de la RAAS. Estas son agrupadas en relación a las dos especies que presentan la más pequeña distancia genética. Cada rama representa al más reciente ancestro en común. En nuestro estudio, las poblaciones más distantes desde el punto de vista de ancestro común, corresponden a la subpoblación de El Rama y los individuos de la Estación Experimental El Recreo-INTA, a pesar de que geográficamente ocupan el mismo espacio. Las subpoblaciones de Nueva Guinea y Muelle de los Bueyes comparten un ancestro común próximo.

Ilustración 7. Estimación del Coeficiente de Linaje (descendencia) individual de las 37 muestras de cacao pertenecientes a la RAAS

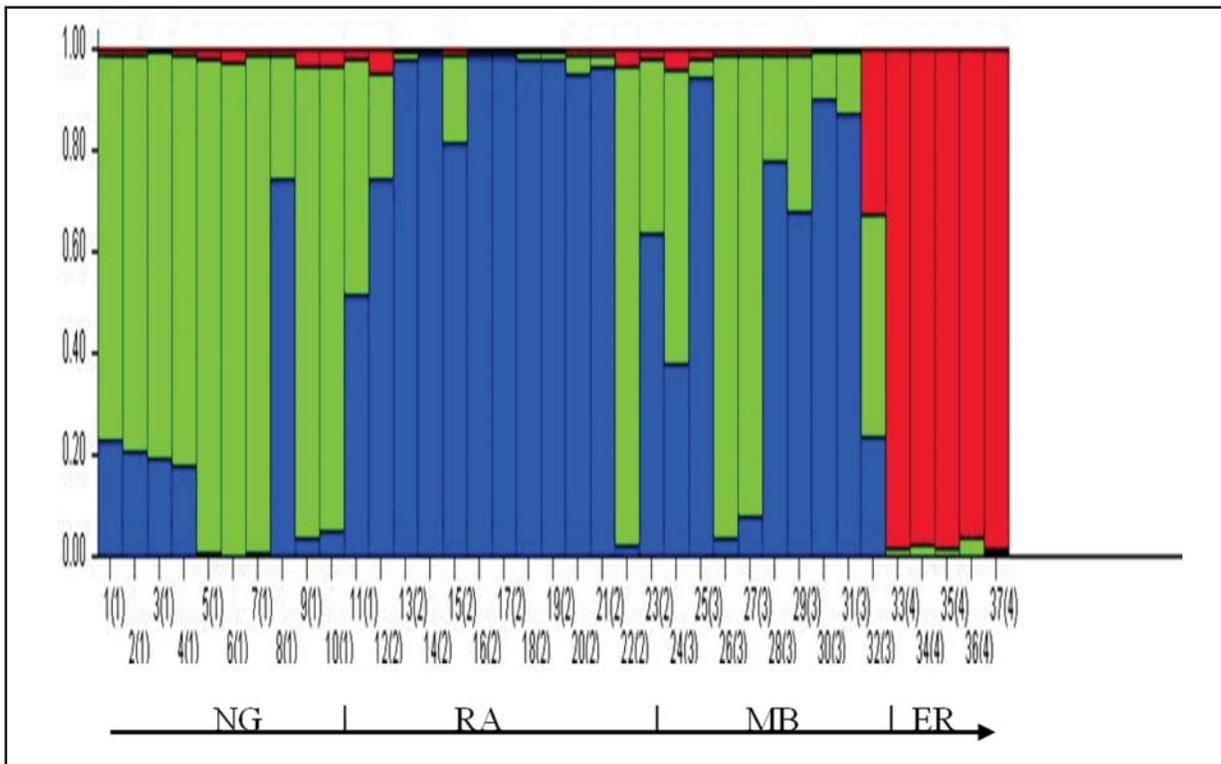
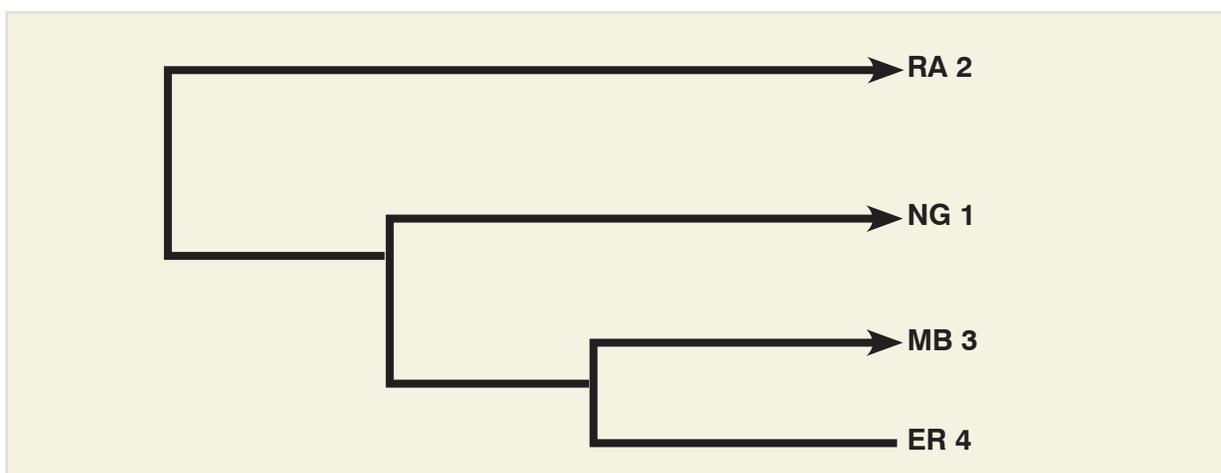


Ilustración 8. Dendograma correspondiente al árbol filogenético de las cuatro poblaciones de cacao pertenecientes a la RAAS



Discusión

La diversidad genética de los cacaotales de la RAAS exhibe una compleja relación entre genotipo (constitución genética) y fenotipo (manifestaciones de las características). Esto debido a que el fenotipo puede depender de la interacción de diferentes genes así como de los efectos ambientales. Para poder cuantificar la variación genética de una población es necesario determinar un conjunto de parámetros. Estos parámetros contemplan dos niveles de relación. El primer nivel abarca un conjunto de indicadores que mide la variación a lo interno de la población (frecuencia de alelos, polimorfismo, heterocigosis observada y esperada, promedio de los alelos por locus, número efectivo de alelos por locus, índice de fijación, etc.), y el segundo nivel incluye otro grupo de indicadores que mide la variación de una población en relación a otras poblaciones (distancia genética, coeficiente de consanguinidad, correlación entre distancia geométrica y genética, análisis en clúster, filogenia, etc.). Muchos de estos indicadores fueron determinados y presentados en la sección anterior y ahora discutidos en esta sección.

En el presente estudio, tenemos como punto de partida la diferenciación entre el genotipo de las poblaciones y los individuos marcada por pequeñas variaciones en la secuencia del ADN. Estas diferencias son reconocidas por el conjunto de 10 microsatélites implementados (ver suplemento S3).

Las especies vegetales representan un problema particular al momento de estimar muchos parámetros poblacionales. Algunas de éstas no cumplen con las condiciones de panmixia y, por ende, con la relación del Principio de Hardy-Weinberg (cruce aleatorio, no consanguinidad, poblaciones infinitas, mutación y migración ignoradas, etc.). Otras especies tienden al incremento del porcentaje de autofecundación facultativa o prácticamente total, lo que hace que la unión de gametos no sea aleatoria. En el presente estudio con la aplicación de los 10 microsatélites y la estimación de la desviación de los mismos en relación del Principio de Hardy-Weinberg (Cuadro 3) observamos cómo 7 de los 10 microsatélites se manejan dentro de las estimaciones del Principio H-W, lo que permite concluir que la población en estudio está cumpliendo en cierto grado las condiciones establecidas para el Principio Hardy-Weinberg.

Desde la década de los 80, diferentes organizaciones de la zona han trabajado en la recuperación y expansión de los cacaotales. Según la información recopilada y procesada en las fichas agro-socio-económicas del presente estudio, un alto porcentaje del germoplasma introducido proviene de Waslala, Centro Experimental El Recreo y de otros países. Dicho germoplasma fue utilizado para sustituir árboles enfermos, viejos, poco productivos o simplemente para expandir el área de siembra. Con el paso del tiempo este cacao se adaptó a la zona, desarrollando un proceso de colonización y cruzamiento entre árboles

emparentados, que condujo a la disminución de la diversidad genética, eventualmente producida por la fijación de ciertos alelos y la pérdida de otros. Esto explica los valores obtenidos para el Coeficiente de Fijación (Cuadro 7).

En el caso de las poblaciones de cacao estudiadas en la RAAS, al observar el valor del Coeficiente de Fijación F_{st} (0.13); F_{is} (0.117) y F_{it} (0.24) (Cuadro 7), podemos sugerir que los cacaotales están presentando una superposición de generaciones y fecundaciones, preferentemente entre plantas emparentadas que crecen próximas entre sí y al lugar ocupado por la planta madre. Esto se expresa en el déficit total de heterocigosis reportado por el valor de F_{it} 0.129 (Cuadro 6) y F_{it} 0.24 (Cuadro 7).

Asimismo, podemos proponer que en base al valor obtenido del Coeficiente de Diferenciación F_{st} , igual a 0.13 (Cuadro 7), la población de cacao de la RAAS presenta una moderada diferenciación genética. Con un valor en el rango 0.05 a 0.15 indica que la población presenta una moderada diferenciación genética (Hartl, 2007).

Por otro lado, el parámetro de la magnitud absoluta de la divergencia genética entre subpoblaciones, D_m (0.128) (Cuadro 7), tiene un valor muy próximo al valor reportado para F_{st} (0.13) (Cuadro 7). Este valor representa la distancia genética mínima media entre poblaciones y ofrece el grado de diferenciación genética entre organismos. Los valores medios obtenidos para ambos parámetros (D_{ST} y F_{ST}), soportan la consideración moderada sobre la diversidad genética de los cacaotales de la RAAS.

El máximo grado de variación genética es aportado por las poblaciones individuales, y no por la población total. Esto es soportado por la distancia entre el valor del parámetro de la Diversidad Genética D_{st} (0.0962) y el Average de la Heterocigosis entre organismos de una subpoblación reproduciéndose aleatoriamente H_s (0.5032). La diferencia entre ambos valores produce un índice de diferencia igual a 5.23 (H_s / D_{st}).

En relación a la comparación de los pares de poblaciones reportadas en el cuadro 8, las poblaciones más diferentes genéticamente entre sí son la de El Rama y la subpoblación de Centro Experimental El Recreo-INTA. Resulta curioso que a pesar que estas dos subpoblaciones están geográficamente

próximas, genéticamente son distantes al reportar el máximo valor de F_{st} , 0.159. Por otro lado, las más próximas son la subpoblación de El Rama y Muelle de los Bueyes (F_{st} , 0.061).

La agrupación de los individuos en cluster según el coeficiente de membresía (Ilustración 7), refleja que las poblaciones de Nueva Guinea, El Rama y El Recreo-INTA presentan un linaje de ancestro más o menos homogéneo, no así la población de Muelle de los Bueyes, que muestra un clúster de linaje totalmente mixto. Bajo este esquema la muestra 32 perteneciente a Miguel Escoto Reyes (Finca San Miguel), está conformada por el aporte de tres ancestros, en una proporción de 25% : 50% : 25%.

Con la implementación del programa Phylip se logró establecer el árbol filogenético para las subpoblaciones de la RAAS. En la Ilustración 8, observamos que los individuos de las subpoblaciones de El Recreo-INTA (ER) y Muelle de los Bueyes (MB), comparten un ancestro en común. En cambio, la población más distante genéticamente le corresponde a las subpoblaciones de El Recreo-INTA y El Rama.

En relación a los parámetros individuales por subpoblación, Nueva Guinea presenta los mejores indicadores en relación a la variabilidad genética. En el cuadro 5 se presentan dichos indicadores. Esta población compuesta por 12 muestras estudiadas representa el 30% de la población total. Reportó 43 alelos amplificados, alcanzando un average de 4.3 alelos diferentes por locus. Además, tiene la representatividad de 2.56 de alelos efectivos (N_e). Esto es el número de parientes responsables por la composición genética de la progenie en la siguiente generación, representa la frecuencia de alelos que efectivamente se trasladan de una generación a otra. Cuenta con el valor máximo de 9 alelos únicos (N_u) entre las subpoblaciones comparadas y el valor del Polimorfismo es de 100. Adicionalmente, el valor de la heterocigosis observada (H_o , 0.555) y la heterocigosis esperada (H_e , 0.562) es muy semejante entre sí. Todos estos indicadores en conjunto convierten a la subpoblación de cacaotales en Nueva Guinea la mejor muestra representativa en cuanto a la variabilidad genética.

En el presente estudio se utilizaron 10 microsatélites (SSR) recomendados internacionalmente (Saunders, 2004). En el suplemento S3 se presentan las principales características. El microsatélite mTcCIR40 pre-

senta los mejores indicadores. En su haber cuenta con 9 alelos diferentes amplificados, 3 alelos raros, un average de 4.5 alelos por locus y el valor de F_{st} (0.273) (ver Cuadros 4 y 6) más alto registrado entre todos los locus comparados. Todos estos valores lo convierten en un locus idóneo para el estudio de diversidad genética entre poblaciones de cacao tradicional cultivado en Nicaragua.

Uno de los factores que está afectando la diversidad genética en la población cacaotal de la RAAS es de orden genético. En nuestro estudio la pequeña y fragmentada población de los cacaotales y el sistema de cruce entre individuos emparentados (no aleatorio) son los principales factores que están contribuyendo a la moderada diversidad genética del cacao cultivado en la zona.

En conclusión, podemos afirmar que el presente estudio ha permitido generar información sobre la diversidad genética del cacao cultivado en la RAAS, obteniendo información en relación al grado de emparentamiento entre las poblaciones en estudio, nivel de diversidad genética y heterocigosis de los cultivos. Asimismo, logramos establecer la distancia genética entre las poblaciones. La información generada sienta la línea de base para establecer un programa de mejoramiento y conservación de la biodiversidad local de cacao.

Agradecimientos

Nuestro rotundo agradecimiento a los productores de cacao de la RAAS, que permitieron, sin ningún interés, tomar muestras de sus plantaciones, y por su activa participación en la toma de muestras. Para el desarrollo del presente estudio reconocemos como decisivo el aporte financiero de la Cooperación Austriaca, canalizado por medio del IICA. Asimismo, valoramos extremadamente positiva la capacitación y asesoría brindada por el Dr. Konstantin Krutovski (Texas A & M University) en el tratamiento estadístico de los datos y facilitada por el Programa de Intercambio Académico del USDA. No podemos dejar de mencionar el apoyo institucional de la UNAN-Managua, definido por medio del Rector Francisco Guzmán Pasos y Jaime López Lowery, así como la oportuna asistencia de Gabriel Moreno (UNAN-Managua) por el procesamiento cartográfico de los puntos del muestreo. A Gerardo Escudero y Rolando Tellez del IICA-Nicaragua, por la confianza y visión asumida a lo largo del estudio investigativo. A todos ellos nuestra gratitud.

Referencias bibliográficas

- Azofeifa-Delgado, A. (2006). Uso de marcadores moleculares en plantas;
- Aplicaciones en frutales del trópico. Revista Agronomía Mesoamericana 17(2): 221-242. San José.
- Belkhir, K. (2001). GENETIX: logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome et Populations, CNRS UPR 9060, Université de Montpellier II, Montpellier, France.
- Buchet, J.C. (2008). Nicaragua: Agrocadena de cacao sostenible y comercio justo. Estudio de agrocadena del cacao. No publicado.
- Bartley, B.G. (2005). "The Genetic Diversity of Cacao and its Utilization". CABI Publishing. 341 pag. USA.
- De la Cruz, M. et al., (1995). Origins of cacao cultivation. Nature 375:542-543. London.
- Hartl, D. and Clark, A. (2007). Principles of Population Genetics. 4th Edition. Sinauer Associates, Inc. Publishers. Massachusetts.
- Henderson, J. et al., (2007). Chemical and archaeological evidence for the earliest cacao beverages. PNAS Vol. 104, 48: 18937-18940. USA.
- Gillespie, J. (2004). Population Genetics. A Concise Guide. 2nd Edition. The Johns Hopkins University Press. London.
- Gentry, A.H. et al., (1988). Tree species richness of upper Amazonian forest. PNAS 85:156-159. USA.
- Glaubitz, J.C. (2004). CONVERT: A user-friendly program to reformat diploid genotypic data for commonly used population genetic software packages. Molecular Ecology Notes, 4: 309-310.
- Nei, M. (1973). Analysis of gen diversity in subdivided populations .PNAS 70: 3321-3323. USA.
- Niemenak, N. et al., (2006). Comparative study of different cocoa (Theobroma cacao L.) clones in terms of theirs phenolics and anthocyanins contents. Journal of Food Composition and Analysis 19: 612-619. USA.
- Motamayor, J.C. et al., (2002). Cacao domestication I: the origen of the cacao cultivated by the Mayas. Heredity, 89:380-386.
- Motamayor, J.C. et al., (2008). Geographic and Genetic Population Differentiation of the Amazonian Chocolate Tree (Theobroma cacao L.).PLOS ONE 3(10): e3311.
- Nuez, F y Carillo, J.M. (2000). "Los marcadores genéticos en la mejora vegetal". Editorial de la Universidad Politécnica de Valencia. España.
- Othman, A. et.al., (2007). Antioxidant capacity and phenolic content of cocoa beans. Food Chemistry, 100: 1523-1530. USA.
- Peakall, R. and Smouse, P.E. (2006). GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. Molecular Ecology Notes, 6: 288-295.
- Pritchard, J.K. et al., (2000). Inference of population structure using multilocus genotypes data. Genetics, 155:945-959.USA.
- Serenio, M. et al., (2006). Genetic diversity and natural population structure of cacao (Theobroma cacao L.) from the Brazilian Amazon evaluated by microsatellite markers. Conservation Genetics (2006) 7:13-24. USA.
- Saunders, J. et al., (2004). Selection of international molecular standards for DNA fingerprinting of Theobroma cacao. Theor. Appl. Genet. (2004). 110:41-47. USA.
- Schell, R.J. et al., (2005). Retrospective Determination of the Parental Population of Superior Cacao (theobroma cacao L.) Seedling and Association of Microsatellite Alleles with Productivity. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 130(2):181-190. USA.
- Zaid, A. et al., (2001). Glossary of biotechnology for food and agriculture. FAO Research and Technology Paper 9. Rome.
- Zhang, D. et al., (2007). Microsatellite variation and population structure in the Refractario cacao of Ecuador. Conserv. Genetic
- Zhang, D. et al., (2006). Accuracy and Reliability of High-Throughput Microsatellite Genotyping for Cacao Clone Identification. Crop. Sci. 46:2084-2092). USA.

SUPLEMENTOS

S1. Listado de participantes involucrados en la organización y recolección de muestras de cacao en la RAAS-Nicaragua

Nombre	Institución	Nombre	Institución
NUEVA GUINEA		EL RAMA	
Elizabeth Zamora Zeledón	INAFOR	Mauricio Martínez	MAGFOR
Gerald Manuel Jiménez	INAFOR	Guillermo Avilés	INTA-EI Recreo
Luis Gaitán	MARENA	Francisco Pérez	INTA- El Recreo
Abel Torrez	MARENA	Oneyda Morales Dávila	IPADE-Rama
Constantino Pettrens	INTA	Melquiades Pérez	AGECSA
Gerald Morales	INATEC	José A. Flores	COMPOR R.L. Rama
Eduardo Sobalvarro	INTA	MUELLE DE LOS BUEYES	
Tony Urbina	PAC	Fco. Pérez Calero	COMULMAR- Campana
Sandra Calero	PAC	Ervin José López	MAGFOR
Sofía Betancourt	MAGFOR	Alfonso Fuentes	MAGFOR
Alvaro Navarrete	INTA	Javier Fajardo	PADESAF
Geovany Reyes	INTA	Santos E. Rosales	COMPROMUB
Miguel Obando	MAGFOR	Mauricio Martínez	MAGFOR
EL RAMA		Auxiliadora Ríos Gutiérrez	COOPAPROMUDEF
Javier Fajardo B.	PADESAF	María Elba González	COOPRAPROMUDEF
Luis Hernández	FADCANIC	Aquiles Gómez	COMULMAR- Campana
Ervin López	PADESAF	Hugo Pérez Calero	COMULMAR- Campana
Alfonso Fuentes	PADESAF	Domingo Salmerón	IICA-Nicaragua
Rafael Acevedo	BICU		

S2. Información y posicionamiento geográfico de los árboles muestreados en la RAAS

Muestra	Municipio	Nombre de la finca	Propietario	Coordenadas	
				X	Y
1	Nueva Guinea	Los Laureles	Rafael Mejía	788622	1294494
2	Nueva Guinea		Denis Espinoza	786932	1293085
3	Nueva Guinea	La Lomita	Víctor Manuel Pauth	786843	1295655
4	Nueva Guinea	Los Cocos	Pablo Pauth Dávila	782878	1293030
5	Nueva Guinea	Pueblo en Acción Comunitaria (PAC)	(PAC)	779611	1291259
7	Nueva Guinea	Mileto	Abel Rivera Urbina	774416	1293921
8	Nueva Guinea	La perla de Rio plata	Efraín Duarte Oporta	776569	1291662
10	Nueva Guinea	Mileto	Abel Rivera Urbina	774422	1293918
12	Nueva Guinea	Madagascar	Corina Martínez Pichardo	764965	1295933
13	Nueva Guinea		Luis García	777737	1290477
15	Nueva Guinea	La Fortuna	Humberto Bucardo	785071	1291576
16	Nueva Guinea	El Cacao	Luis García	776593	1296087
18	El Rama	Palestina	José Amado Romero Calero	784468	1346176
19	El Rama	Palestina	José Amado Romero Calero	784471	1346192
20	El Rama	----	Juan Duarte	784474	1346189
21	El Rama	----	Juan Duarte	783869	1346183
22	El Rama	Peoresnada	Presentación Pérez	795774	1355938
24	El Rama	La Argentina	Manuel Rojas Miranda	794037	1355698
25	El Rama	San Isidro	Juan Sequeira Aragón	802282	1335192
27	El Rama	La Lomita	José Antonio Flores García	803765	1341176
29	El Rama	Bella vista	Rafael Gago Espinoza	783708	1354084
30	El Rama	La Ceiba	Sebastián Chavala	805492	1338021
32	El Rama	San Antonio	Mercedes Escoto León	807561	1339629
33	El Rama	Santa María	Santa María Cleofás Montoya	783696	1354096
34	Muelle de los Bueyes	Oro Blanco	Hugo Pérez Calero	745587	1357162
35	Muelle de los Bueyes	Oro Blanco	Hugo Pérez Calero	745539	1357137
36	Muelle de los Bueyes	Gonzalo Lopez	Aquiles de Jesús Gomes A.	751893	1358210
37	Muelle de los Bueyes	Santa Rosa	Aquiles de Jesús Gomes A.	750353	1360029
39	Muelle de los Bueyes	Peoresnada	Juan Luna Sevilla	775747	1333546
40	Muelle de los Bueyes	San Isidro	Alejandro Palacio Borges	777636	1326395
41	Muelle de los Bueyes		Ernesto Rosales	763564	1353429
42	Muelle de los Bueyes		Ernesto Rosales	763594	1353442
43	Muelle de los Bueyes	San Miguel	Miguel Escoto Reyes	765896	1347012
44	Muelle de los Bueyes	San Miguel	Miguel Escoto Reyes	765902	1347037
45	El Recreo	Centro Exp. El Recreo	POUN13	793573	1347299
46	El Recreo	Centro Exp. El Recreo	ICS-9	793572	1347271
47	El Recreo	Centro Exp. El Recreo	UF-668	793570	1347246
48	El Recreo	Centro Exp. El Recreo	IMC-68	793569	1347216
49	El Recreo	Centro Exp. El Recreo	GS-37	793558	1347265

S 3. Cebadores microsatélites utilizados en el presente estudio y propuestos para la caracterización internacional del *Theobroma cacao*

Microsatélite EMBL No.	No. Cromosoma	Juego de cebadores	Temperatura de alineación (° C)	Tamaño (bp)	Motivo
mTc CIR6-Y16980	6	TTCCCTCTAAACTACCCCTAAAT TAAAGCAAAGCAATCTAACATA	46	224-253	(TG)15
mTc CIR7-Y16981	7	ATGCCAATGACAACCTGGT GCTTTCAGTCCCTTGCTT	51	150-167	(GA)11
mTc CIR8-Y16982	9	CTAGTTCCCAATTACCA TCCTCAGCATTCTTCTTC	46	290-307	(TC)5TT(TC)17TTT(CT)4
mTc CIR11-Y16985	2	TTTGGTGATTATTAGCAG GATTCGATTTGATGTGAG	46	286-321	(TC)13
mTc CIR15-Y16988	1	CAGCCGCCTCTTGTTAG TATTTGGGATTCCTTGATG	46	234-263	(TC)19
mTc CIR18-Y16991	4	GATAGCTAAGGGGATTGAGGA GGTAATTCAAATCATTGAGGATA	51	333-357	(GA)12
mTc CIR22-Y16995	1	ATTCTCGCAAAAAAAGCTTAG GATGGAAGGAGTGTAATAAG	46	276-301	(TC)12N146(CT)10
mTc CIR26-Y16998	8	GCATTCAATACATTC GCACTCAAAGTTCATACTAC	46	285-310	(TC)9C(CT)4TT(CT)11
mTc CIR40-AJ271943	3	AATCCGACAGTCTTTAATC CCTAGGCCAGAGTGTAATAAG	51	262-288	(AC)15
mTc CIR60-AJ271958	2	CGCTACTAACAAACATCAAA AGAGCAAACCATCACTAATCA	51	190-218	(CT)7(CA)20

La tabla muestra los cromosomas en los cuales el locus es mapeado (Saunders, 2004).