



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
FACULTAD DE AGRONOMÍA
DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN VEGETAL

*“Por un Desarrollo Agrario
Integral y Sostenible”*

TRABAJO DE GRADUACIÓN

**Caracterización molecular de 105 accesiones de Cacao
(*Theobroma cacao* L.) utilizando 10 marcadores moleculares tipo SSR en
INTA-CNIAB, Nicaragua, 2011.**

AUTOR:

Br. Kenia María Herrera García

ASESORES:

**Ing. MSc. Erwin Aragón Obando
Dr. Víctor Manuel Aguilar Bustamante**

**MANAGUA, NICARAGUA
JUNIO, 2012**



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
FACULTAD DE AGRONOMÍA
DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN VEGETAL

*“Por un Desarrollo Agrario
Integral y Sostenible”*

TRABAJO DE GRADUACIÓN

**Caracterización molecular de 105 accesiones de Cacao
(*Theobroma cacao* L.) utilizando 10 marcadores moleculares tipo SSR en
INTA-CNIAB, Nicaragua, 2011.**

AUTOR:

Br. Kenia María Herrera García

ASESORES:

**Ing. MSc. Erwin Aragón Obando
Dr. Víctor Manuel Aguilar Bustamante**

Presentado a la consideración del honorable tribunal
examinador como requisito para optar al grado de Ingeniero
Agrónomo

**MANAGUA, NICARAGUA
JUNIO, 2012**

INDICE DE CONTENIDO

SECCIÓN	PÁGINA
DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTOS	ii
ÍNDICE DE CUADROS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
ÍNDICE DE ANEXOS	v
RESUMEN	vii
ABSTRACT	viii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS	4
2.1 Objetivo General	4
2.2 Objetivo Específicos	4
III. MATERIALES Y MÉTODOS	5
3.1 Ubicación del estudio	5
3.2 Diseño metodológico	5
3.2.1 Sitios donde se realizaron las colectas	5
3.2.2 Material colectado	5
3.2.3 Fase de laboratorio	6
3.2.3.1 Extracción de ADN	6
3.2.3.2 Amplificación de ADN mediante la técnica reacción en Cadena de Polimerasa (Polimerase Chain Reaction, PCR)	7
3.2.3.3 Electroforesis	7
3.3 Parámetros evaluados en este estudio	10
3.3.1 Análisis de diversidad genética	10
<i>Frecuencia alélica</i>	10
<i>Heterosigocidad Observada y esperada</i>	10
<i>Contenido de información polimórfica</i>	10
<i>Índice de Shannon</i>	10
3.3.2 Análisis de estructura genética	11
<i>Diferenciación genética</i>	11
<i>Estimación de distancia genética</i>	11
<i>Análisis de componentes principales</i>	11
IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN	12
4.1 Diversidad genética	12
4.1.1 Número de alelos por locus	12
4.1.2 Heterosigocidad observada y esperada por locus	12
4.1.3 Contenido de información	14
4.1.4 Índice de Shannon por locus	15
4.1.5 Número de alelos por grupo	15
4.1.6 Heterosigocidad observada y esperada por grupo	16

SECCIÓN	PÁGINA
4.2 Estructura genética	23
4.2.1 Análisis molecular de varianza	23
4.2.2 Distancia genética	24
4.2.3 Análisis de componentes principales	25
V. CONCLUSIÓN	27
VI. RECOMENDACIONES	28
VII. LITERATURA CITADA	29
VIII. ANEXOS	33

DEDICATORIA

Primeramente a Dios, me dirige a donde debo de estar, y quien le dejo mis proyectos para que todos mis sueños se cumplan, he pedido me ha concedido; he sufrido me a consolado e desvanecido y me ha cuidado estoy aquí donde él quiere que esté.

A mi lindo País, servirle como ciudadano y profesional es un orgullo y gran satisfacción.

A mi padre Rafael, es mi mentor emocional mi principal formador de principios y valores, mi apoyo.

A mi madre Elida, la persona que deposita toda su Fe en mí, quien me consuela, me apoya y me anima a ser cada día mejor.

A mis hermanos y sobrinos, siempre esperan lo mejor de mí, verlos día a día formando parte de mi vida es la luz entre tanta oscuridad

A la persona que amo y con quien quiero estar siempre; porque jamás imagine como era necesitar a alguien y tenerlo cerca dando su apoyo incondicional.

A mi tía Flor, es la voz de la confianza en este mundo de dudas.

A aquellas personas que están cerca de mí con amor y paciencia y que de una u otra forma dejan huellas en mi vida.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, me da la fuerza y un poco de su gran e infinita sabiduría para llegar donde estoy.

A mis padres y mi familia, quienes me dan apoyo, cariño, fuerza, ánimo y confianza para que yo esté siempre dando lo mejor de mí.

La universidad que me formó, docentes que colaboraron en mi preparación académica para que pudiese ser capaz de desempeñarme en cualquier ambiente laboral.

A la Dirección de servicios estudiantiles que colaboró con mi formación profesional en esta universidad.

Al Dr. Víctor Aguilar Bustamante, su confianza depositada en mi para incorporarme en este trabajo significó mucho.

Ing. M.Sc. Erwin Aragón Obando su apoyo y confianza en la realización de este trabajo permitió que se ejecutara y finalizara con éxito; la transmisión de conocimientos en todo lo referente a esta temática tan amplia es producto de su dedicación, esfuerzo y paciencia.

Ing. M.Sc. Claudia Rivera Zeledón, su amistad su disposición a ayudarme, enseñarme y estar como apoyo incondicional durante la realización de este trabajo significó mucho para mí.

Al Instituto Nicaragüense De Tecnología Agropecuaria (INTA), Programa Semilla y Agrobiotecnología, por permitir que pudiese realizar este trabajo.

Dr. Guillermo Reyes Castro, excelente maestro, persona y amigo.

A Jecsa, amiga y apoyo valioso para la realización de este trabajo.

A José Bismarck, su amor, su apoyo y su presencia en mi vida motiva una de las fuerzas para terminar con éxito este trabajo.

A mis amigos más cercanos quienes estuvieron siempre esperando lo mejor de mí.

Y a aquellas personas que de una u otra forma colaboraron en este trabajo.

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO	PÁGINA
1. Descripción de los microsatélites utilizados es este estudio	9
2. Parámetros para diversidad genética basado en los microsatélites utilizados	14
3. Parámetros para diversidad genética basado en los grupos estudiados	17
4. Análisis molecular de varianza para <i>Theobroma cacao</i> L. para los grupos estudiados	23

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	PÁGINA
1. Cámara electroforesis utilizada para geles de agarosa donde se inyectaba ADN genómico y ADN amplificado	8
2. GeneRuler utilizado como referencia para medir el tamaño de los fragmentos	8
3. Frecuencia Alélica presentada para el cebador MTcCIR1 para ocho grupos	18
4. Frecuencia Alélica presentada para el cebador MTcCIR6 para ocho grupos	18
5. Frecuencia Alélica presentada para el cebador MTcCIR7 para ocho grupos	19
6. Frecuencia Alélica presentada para el cebador MTcCIR8 para ocho grupos	19
7. Frecuencia Alélica presentada para el cebador MTcCIR11 para ocho grupos	20
8. Frecuencia Alélica presentada para el cebador MTcCIR12 para ocho grupos	20
9. Frecuencia Alélica presentada para el cebador MTcCIR15 para ocho grupos	21
10. Frecuencia Alélica presentada para el cebador MTcCIR18 para ocho grupos	21
11. Frecuencia Alélica presentada para el cebador MTcCIR22 para ocho grupos	22
12. Frecuencia Alélica presentada para el cebador MTcCIR24 para ocho grupos	22
13. Dendograma de distancias genéticas de Nei's para ocho grupos	24
14. Análisis de componentes principales para 105 accesiones estudiadas y congregadas en ocho grupos	26

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO	PÁGINA
1. Hoja de registro utilizada al momento de la colecta	33
2. Parcela de Cacao en Rivas donde se realizó colecta de material vegetativo para este estudio	35
3. Tipo de hoja seleccionada para el estudio	35
4. Elaboración de CTAB-BUFFER 100 ml	36
5. Elaboración de cloroformo isomilalcohol CIA 24:1	36
6. Preparación de TRIS 1mol para 500 ml	36
7. Preparación de BUFFER EDTA (Ethylenediamineletracetic Acido Dissodium Saltdiol)	36
8. Preparación de Cloruro de Sodio 5 mol para un total de 500 ml	36
9. Preparación de Acetato de Sodio 3 mol para 500 ml pH 5.2	37
10. Preparación de Solución Madre TBE 10X	37
11. Preparación de TE BUFFER	37
12. Preparación de Gel de Agarosa Para verificar la presencia de ADN	37
13. Preparación de Gel de Agarosa Simple para correr el producto PCR	37
14. Medición del Tamaño de las bandas 77-115 MTcCIR22	38
15. Hoja donde se anotaba el tamaño de la banda	39
16. Gráfica exponencial logarítmica utilizada para obtener el rango de pares de bases	40
17. Distancias genéticas de Neis	41
18. Identidades Genéticas de Neis	41
19. Medias y error estándar por Locus	41
20. Medias y error estándar total por locus de los parámetros evaluados para diversidad genética	42

ANEXO	PÁGINA
21. Medias y error estándar por Grupo	42
22. Medias y error estándar total para los grupos	43
23. Glosario	43

RESUMEN

Se realizó la caracterización molecular de 105 accesiones de Cacao que contemplan 79 colectas nacionales, 21 híbridos de referencia y 5 materiales criollo referencia, congregados en 8 grupos de acuerdo a su ubicación geográfica al momento de la colecta; utilizando 10 marcadores moleculares tipo SSR con el fin de conocer la diversidad genética de Cacao colectado en finca de productores nicaragüenses. Se utilizó el método de extracción de ADN CTAB-Buffer, Amplificación de fragmentos de ADN mediante la técnica 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; el CIP y el Índice de Shannon proporcionaron los mayores valores para MTcCIR12 con 0.96 y 1.94 respectivamente. La media general del 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%) es mayor que las diferencias entre grupos (15%); se realizó el dendograma basado en las distancia de Nei's donde revela diferencias mínimas entre los grupos, la mayor relación genética son entre los grupos RSJ y Carazo; en cambio para el grupo Carazo e Híbrido referencia se encontraron las mayores diferencias. En el PCA se encontró materiales colectados que resultaron genéticamente parecidos a los criollos referencias, es el caso de RSJ 0211, RSJ 0311, RSJ 0511, Bomat0510, Ji0210; los materiales Ji-Cuá 0104 y RSJ0411 están estrechamente relacionado. Se demostró que existe una alta diversidad genética y que existen materiales promisorios para posteriores estudios de mejora genética.

Palabras Claves: *Theobroma cacao*, SSR, Diversidad genética, Heterosigocidad esperada, distancia genética, Análisis Molecular de Varianza, PCA.

ABSTRACT

A molecular characterization of 105 accessions of cacao plant was investigated using 10 (SSR) molecular markers. Seventy nine accessions collected around the country were grouped into 8 groups according to geographic collected and, twenty one hybrids and 5 creoles samples (were using as reference materials) in ascertain the genetic diversity of Cocoa farm producers collected in Nicaragua. Was use the method of CTAB-DNA extraction buffer, amplification of DNA fragments by PCR technique, visualization of DNA fragments in electrophoresis chamber. A total of 183 alleles were identified in 105 accessions with a mean of 18.3. The Heterosigocidad observed and expected were higher for 0.437 and 0.81 MTcCIR12 with respectively. The PIC and Shannon index provided the highest values for 0.96 and 1.94 with MTcCIR12 respectively; the average CIP and Shannon index is 0.87 y 1.37 respectively. The analysis of variance revealed the biggest difference within the group (85%) than the differences between groups (15%). A dendrogram based on the distance of Nei's where he reveals minimal differences between groups. The increased interaction between groups is genetic RSJ and Carazo, but instead for the reference group Carazo and Hybrid showed the greatest differences. In the PCA was found collected materials that were genetically similar to creole 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 there are promising materials for future breeding studies.

Keywords: *Theobroma cacao*, SSR, Genetic diversity, Heterosigocidad expected genetic identity, genetic distance, Molecular Analysis of Variance, PCA.

I. INTRODUCCIÓN

Theobroma cacao L. ($2n=20$) pertenece a la familia de las Esterculeáceas, es de origen suramericano, ubicándolo en las cuencas hidrográficas del Alto Amazonas y del Orinoco, en territorios correspondientes a Colombia, Ecuador, Perú, Brasil, Venezuela y las Guayanas. En esa amplia zona se conoce la existencia de variedades silvestres (Motamayor, 2002). Existen controversias acerca del origen del cacao, ya que la primera propuesta acerca de ello fue realizado por Vavilov 1926, quien propuso a México y Centroamérica como centros de diversidad pero esta teoría fue rechazada por Pound en 1937-1938 que encontró una amplia variabilidad en los árboles de cacao silvestres de Ecuador. En 1944 Chessman, basado en la teoría Vavilov y en la variabilidad del cacao reportado por Pound, argumentó que el centro de origen de *Theobroma cacao* se encuentra en un radio de 400 km del río Amazonas, en las proximidades de los ríos Napo, Caquetá y Putumayo; por tanto Motamayor (2002), realizó estudios utilizando herramientas de Biotecnología para detectar el origen de Cacao concluyendo que su centro de origen es en Sur América, pero que logra adaptarse fácilmente a diferentes zonas agrogeográficas.

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, en zonas aparentemente inadecuadas para su desarrollo, y en los traspacios de las casas en muchas localidades del sureste de México, donde actualmente el cacao no representa una actividad agrícola (Millón, 1955). Por ello se le atribuye a México su centro de domesticación porque desde épocas prehispánicas se reconoce la existencia del cacao criollo, habiendo sido una bebida estimulante por el contenido de Teobromina y trazas de Cafeína; en las últimas décadas se ha cambiado al consumo de chocolate como alimento energético, de alto valor nutritivo y estético (León, 2000).

Se han reconocido tres grupos genéticos de Cacao bien diferenciados, siendo los Criollo, Forasteros y Trinitarios. El cacao Criollo se caracteriza por su aroma, la mazorca es de color roja o amarilla cuando maduras, alrededor de 10 surcos profundos, muy rugosos, cascara suave y semillas redondas medianas a grandes, los cotiledones frescos son de color blanco o violeta pálido. El árbol es de porte bajo y menos robustos que los otros genotipos y tiene bajo rendimiento y se caracteriza por su alta susceptibilidad a las principales enfermedades (Soria, 1966).

El cacao 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 (Rodríguez, 2006).

En la actualidad el cacao representa una materia prima importante y de gran demanda para la elaboración de chocolate en países desarrollados. En base a la potencialidad de este rubro para el aporte económico, Nicaragua se podría convertir en uno de los más fuertes productores de cacao de la región.

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, las cuales están distribuidas en 7 grandes núcleos productivos que se ubican en los departamentos del 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.

Durante el siglo XX, la tendencia de enriquecimiento genético se ha desacelerado y en algunos casos se detuvo con el advenimiento de prácticas modernas de fitomejoramiento. Los rendimientos han aumentado, pero la base genética de las especies se ha reducido y el ritmo y escala de la erosión genética no tienen precedentes (Plucknet *et al* 1992). La pérdida de recursos fitogenéticos y la erosión de la biodiversidad amenazan la agricultura y la seguridad alimentaria mundial; a medida que se incrementa la uniformidad de los cultivos, se aumenta la vulnerabilidad genética (FAO, 1999).

El Instituto Nicaragüense de Tecnología Agropecuaria (INTA) está sumando esfuerzos para garantizar la conservación de recursos fitogenéticos de cacao que puedan garantizar una producción sostenible del país; desarrollo que satisfaga las necesidades del presente sin poner en peligro la capacidad de las generaciones futuras. Por tanto, se están realizando colectas nacionales de cultivos de importancia económica para la agroindustria y cultivos que satisfagan la seguridad alimentaria ya sea en la producción o en el aporte de divisas; los que a su vez están siendo caracterizados desde el punto de vista fenotípico y genotípico para conocer el perfil genético de los cultivos en el país e identificar las accesiones que se puedan usar para programas de mejoramiento genético.

Actualmente, la biología molecular es considerada como una herramienta de gran importancia en programas de mejoramiento genético de cultivos, ya que resulta más preciso y brinda resultados en menos tiempo. Las técnicas utilizadas para la caracterización de individuos parten del estudio del ADN, que dan como resultado señalar características únicas que resultan ventajosas para el cultivo en estudio (resistencia a enfermedades, fácil adaptación a diferentes zonas, altamente productivo y de excelente calidad organoléptica). La utilización de marcadores moleculares presenta ventajas en comparación con los marcadores de tipo morfológico por su independencia de los efectos del medio ambiente (Wilches, 2004).

En el mejoramiento genético de un cultivo se requiere la caracterización de los progenitores utilizados en el mismo para conocer su utilidad como fuente genética de un carácter determinado; por ello INTA está trabajando en el mejoramiento genético de Cacao cruzando materiales de tipo forastero con materiales del tipo Criollo (CP Aragón 2011).

En el presente estudio, se realizó la caracterización molecular de 79 accesiones de Cacao colectadas a nivel nacional, comparándolos con materiales mejorados que se distribuyen comercialmente en nuestro país (21 accesiones) y con materiales criollos (5 accesiones) que fueron usados como referencias para la identificación de accesiones pertenecientes a este grupo genético, seleccionados en estudios realizados por Aragón (2009), mediante el uso de herramientas de biología molecular, utilizando marcadores moleculares tipo SSR basados en la técnica PCR, esto con el fin de identificar con mayor precisión los materiales genéticos con los que se cuenta, la diversidad existente en el país y seleccionar los mejores para incorporarlos en programas de mejora genética.

II. OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

Caracterizar a nivel molecular 105 accesiones de Cacao (*Theobroma cacao* L) utilizando 10 marcadores moleculares tipo SSR, en el INTA-CNIAB, Nicaragua 2011.

2.2 Objetivos Específicos

Determinar la diversidad genética en 105 accesiones de *Theobroma cacao* L.

Identificar las diferencias y relaciones genéticas de la colección del germoplasma nicaragüense colectado, empleando marcadores moleculares tipo SSR.

Identificar duplicidad en las accesiones colectadas a nivel nacional.

Establecer las diferencias o similitudes de materiales criollos de referencia internacional con materiales colectados a nivel nacional.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Ubicación del área de estudio

El estudio se llevó a cabo en el laboratorio de Biotecnología situado en el Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias y Biotecnología (INTA-CNIAB), km 14 ½ Carretera Norte y 2 kilómetros al Sur, Managua, localizado entre las coordenadas 12° 08' 36'' latitud norte y a los 86° 09' 49'' longitud oeste.

3.2 Diseño metodológico

3.2.1. Sitios donde se realizaron las colectas

Durante el periodo 2010-2011 INTA realizó la colecta de materiales de Cacao en los departamentos de Rio San Juan, Región Autónoma Atlántico Sur, Matagalpa, Jinotega, Rivas y Carazo, para caracterizarlos a nivel molecular y establecerlos para su conservación, en el banco nacional de Germoplasma de cacao ubicado en, Centro de desarrollo Tecnológico El-RECREO, Rama (Anexo 2).

Al momento de la colecta, se utilizó una hoja de registro para almacenar la información referente a las características de la zona y de los arboles seleccionados (Anexo 1). De cada árbol seleccionado se tomó hoja fresca, en buen estado fitosanitario y se almacenó en bolsas de papel kraft rotulándolas con códigos únicos de acuerdo a su sitio de origen, posteriormente se llevó al CNIAB-INTA. Del árbol que se seleccionó hoja para la extracción de ADN, se extrajeron varetas para trasladarlas al centro experimental El Recreo, Región Autónoma Atlántico Sur- RAAS, Nicaragua.

3.2.2 Material Colectado

Para la colecta se seleccionaron materiales tipo élite (sanos y altamente productivos, buena adaptabilidad a la zona, arboles robustos) y accesiones con características propias de los materiales criollos (árbol pequeño, hojas pequeñas y color 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 como referencia que INTA distribuye comercialmente y 5 materiales criollo utilizados como referencia; de las cuales dos accesiones son internacionales provenientes de CATIE (Yucatán y Criollo 13) y tres encontradas en un estudio realizado por Aragón, (2009) para un total de 105 accesiones evaluadas en este estudio y congregadas en 8 grupos, de acuerdo a su departamento de origen.

3.2.3 Fase de laboratorio

3.2.3.1 Extracción de ADN

Para extraer ADN se utilizó el método de extracción CTAB- Buffer descrito por Doyle & Doyle, (1990). La metodología consta de los siguientes pasos:

1. Se cortó aproximadamente un centímetro cuadrado de hoja y se colocó en un tubo Eppendorf de 1.5 ml, que contenía 500µl de CTAB-Buffer (2% CTAB, 1,4 mM Tris pH 8, 1% PVP al 0,2%) con 2 µl de β-mercaptoetanol previamente calentado en baño maría durante 30 minutos
2. Se agregó arena de mar esterilizada para macerar el tejido vegetal con mayor facilidad, auxiliado con pistilos azules para tubos de 1.5 ml.
3. Se incubó en baño maría durante 45 minutos, agitándolo cada 15 minutos en un Vortex.
4. Se aplicó 500 µl CIA 24:1 (cloroformo: isomilalcohol) y se centrifugó por 10 minutos a 14 800 revoluciones por minuto (RPM).
5. Se extrajo el sobrenadante para colocarlo en otro tubo Eppendorf y se agregó nuevamente 500 µl de CIA 24:1 para centrifugar por 10 minutos a 14 800 RPM.
6. Se extrajo el sobrenadante asegurando 300 µl para agregarle 200 µl de isopropanol helado (2/3 de la cantidad de sobrenadante).
7. Se dejó en reposo durante 1 hora en refrigeración a una temperatura de -20 °C, para luego centrifugar por 10 minutos con las mismas revoluciones y tiempo antes descritos.
8. Se extrajo el sobrenadante sin distorsionar el pellet y se le agregó 200 µl de etanol al 70% para centrifugar a 14 800 RPM.
9. Se extrajo nuevamente el sobrenadante sin distorsionar el pellet y se dejó secar a temperatura ambiente durante 1 hora aproximadamente.
10. Se agregó 200 µl de TE- Buffer para diluir el pellet agitándolo en el Vortex durante 5 minutos y posteriormente se le adicionó 2 µl de RNasa (enzima que degrada ARN).

Para corroborar la efectividad de la extracción, se visualizaron las muestras en luz ultravioleta en un gel de Agarosa simple al 1%, manchadas con Bromuro de etidio.

En el gel se inyectó un volumen total de 6µl, conteniendo: 1 µl de buffer de carga 6x (azul de bromofenol para el seguimiento visual del ADN durante la electroforesis, glicerol, xylene cyanol FF, agua) y 5µl del ADN que se extrajo del tejido vegetal. Se utilizó un GeneRuler de 50 pares de bases para verificar ausencia o presencia de banda. Las muestras se llevaron a una cámara de electroforesis por 30 minutos A 110 voltios y 400 Watts. Para tomar la fotografía, se utilizó el programa transluminador ultravioleta de transporte para la evaluación de la calidad del ADN.

3.2.3.2 Amplificación de ADN mediante la técnica reacción en Cadena de Polimerasa (Polimerase Chain Reaction, PCR)

Se utilizaron 10 microsátelitales 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 1).

Para la reacción de PCR se utilizó un volumen total de 25µl; 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 que logran aportar un total de 1.5 µl), 2µl de cebador izquierdo y 2µl cebador derecho, 3µl de ADN Genómico y 5.5 de agua ultra estéril calidad PCR.

La amplificación del ADN se realizó en un termociclador MyGene termal Cyler modelo MG 96G con el siguiente programa: la desnaturalización inicial durante 4 minutos a 94°C, seguidos de 35 ciclos de desnaturalización por 40 segundos a 94°C, alineamiento durante 40 segundos a 46°C ó 51°C dependiendo del cebador, extensión a 72°C durante 1 minuto y extensión final a 72°C por 8 minutos.

3.2.3.3 Electroforesis

Se mezcló 5µl de ADN amplificado con 1µl de buffer 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 buffer tipo TBE (Tris, Ácido bórico y EDTA) (Figura 1); a la par de las muestras de ADN amplificado se utilizó un marcador de peso molecular de 1000 pares de bases utilizado para determinar el tamaño de las bandas o alelos de cada accesión (Figura 2).

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.

Para medir el tamaño de las bandas se utilizó el programa transluminador ultravioleta de transporte para la evaluación de la calidad del ADN.

Basándose en la fotografía tomada, se midió la distancia que migró el GeneRuler (25, 50, 100, 200, 300, 400 pares de bases) y la distancia que recorrió el ADN amplificado en el gel de Agarosa (Anexo 14).

Los resultados de las distancias que migraron las bandas o alelos, se almacenaron en una hoja de registro para su posterior gráfico (Anexo 15).

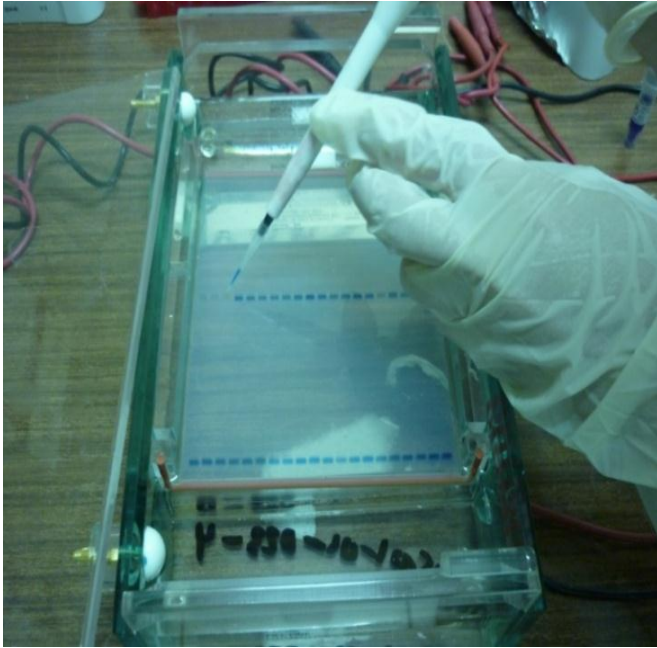


Figura 1. Cámara electroforesis utilizada para geles de agarosa donde se inyectaba ADN genómico y ADN amplificado

La figura 2 muestra las características básicas y presentación comercial del GeneRuler que se utilizó en este estudio.

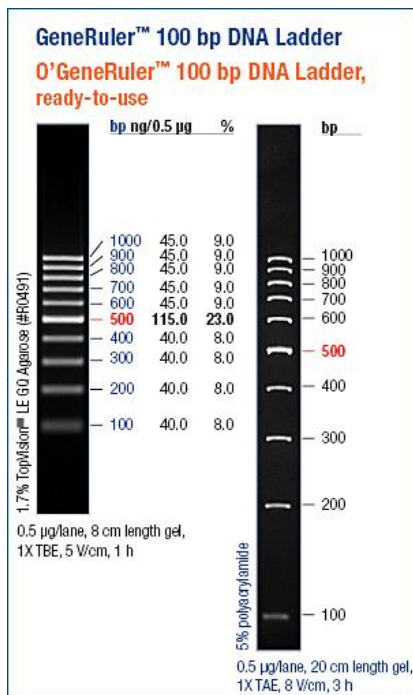


Figura 2. GeneRuler utilizado como referencia para medir el tamaño de los fragmentos

Cuadro 1. Descripción de los marcadores microsátelitales utilizados para este estudio

Microsátelite EMBL no.	Cromosoma no.	5'Cebador izquierdo.	3'Cebador Derecho.	Temperatura de anillamiento (C°).	Tamaño (bp)	Motif
MTcCIR1-Y16883	8	ATGCGAATGACAACCTGGT	GCTTTCAGTCCTTTGCTT	51	150-167	(GA) ₁₁
MTcCIR6-Y16980	6	GATAGCTAAGGGGATTGAGGA	GGTAATTCAATCATTTGAGGATA	46	333-357	(GA) ₁₂
MTcCIR7-Y16981	7	ATTCTCGCAAAAACCTTAG	GATGGAAGGAGTGTAATAG	51	276-301	(TC) ₁₂ N ₁₄₆ (CT) ₁₀
MTcCIR8- Y16982	9	CTAGTTTCCCATTACCA	TCCTCAGCATTTTCTTTC	46	290-307	(TC) ₅ TT(TC) ₁₇ TTT(CT) ₄
MTcCIR11- Y16985	2	TTGGTGATTATTAGCAG	GATTCGATTTGATGTGAG	46	286-321	(TC) ₁₃
MTcCIR12-Y16986	4	TCTGACCCCAAACCTGTA	ATTCCAGTTAAAGCACAT	46	165-256	(CATA) ₄ N ₁₈ (TG) ₆
MTcCIR15- Y16988	1	CAGCCGCCTCTTGTTAG	TATTTGGGATTCTTGATG	46	234-263	(TC) ₁₉
MTcCIR18-Y16991	4	GATAGCTAAGGGGATTGAGGA	GGTAATTCAATCATTTGAGGATA	51	333-357	(GA) ₁₂
MTcCIR22- Y16995	1	ATTCTCGCAAAAACCTTAG	GATGGAAGGAGTGTAATAG	46	276-301	(TC) ₁₂ N ₁₄₆ (CT) ₁₀
MTcCIR24-Y16996	9	TTTGGGGTGATTTCTTCTGA	TCTGTCTCGTCTTTTGGTGA	46	186-207	(AG) ₁₃

3.3 Parámetros evaluados en este estudio de caracterización molecular

3.3.1 Análisis de diversidad genética

Para conocer la diversidad genética de las accesiones en estudio, se utilizó el programa GenAlex v 6.2 como herramienta de apoyo para análisis de datos.

Frecuencia Alélica

Se estimaron el número de alelos por locus; en este caso para un total de diez locus o microsatélites y el número de alelos por grupo. Esto permitió conocer cuantas veces puede copiarse un alelo en un grupo.

Heterocigosidad Observada y Esperada

Esto se realizó para conocer la diversidad genética entre los grupos y entre los locus. El parámetro de heterocigosidad esperada es el que determina el valor de diversidad genética.

Contenido de información polimórfica (CIP)

El contenido de información polimórfica es un valor que se utilizó para medir el polimorfismo del locus mediante un marcador (Botstein *et al.* 1980). Este dependerá solo del número de alelos y de la frecuencia de cada alelo en el locus (Guo y Elston, 1998).

El contenido de información polimórfica para cada locus se calculó mediante la fórmula propuesta por Anderson *et al.*, (1993) donde:

$$PIC_1 = 1 - \sum p_{ij}^2$$

Donde P_{ij} es la frecuencia alélica de los microsatélites.

Determina que tan efectivo puede ser un marcador en el estudio mediante la obtención de valores mayores a 0.50

Índice de Shannon

Este parámetro determina la riqueza genética existente en los locus estudiados; su importancia radica en decir que tan valioso en genes es un individuo.

3.3.2 Análisis de estructura Genética

Para estimar la diferenciación genética y el análisis de componentes principales se realizó con el apoyo del programa GenAlex v 6.2.

Para determinar las distancias genéticas e identidad genética de Nei's se utilizó el programa Popgene,

Diferenciación genética

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

Estimación de la distancia genética

La distancia genética es la estimación entre dos entidades descritas por la variación alélica (Nei's, 1973). Determina que tan parecidas entre sí fueron las accesiones evaluadas. Este parámetro nos explica que entre más se acerque el valor de un grupo y otro, más similares son entre sí.

Análisis de componentes principales

Se obtuvo un gráfico de 2 dimensiones donde se compararon individuos entre sí y se agruparon de acuerdo a su relación genética.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Diversidad Genética de Cacao

4.1.1 Número de Alelos por Locus

Se identificaron 183 alelos para todos los locus estudiados, con un promedio de 18.3 alelos por locus en las 105 accesiones evaluadas. El cebador MTcCIR12 detectó 35 alelos, siendo este el más polimórfico y el que logró obtener el mayor número de muestras con ADN amplificado. Sereno *et al.*, (2006) encuentra 8 alelos para el cebador MTcCIR12 y le resultó el marcador más informativo en cuanto a alelos identificados; aseguran que los alelos encontrados en MTcCIR12 pertenecen a árboles provenientes del alto amazonas; sin embargo en este estudio se logra identificar mayor número de alelos para este cebador, encontrando alelos para cada grupo estudiado, implica que el nivel de polimorfismo de este cebador es capaz de detectar el mayor número de alelos para diferentes poblaciones de Cacao en Nicaragua (Cuadro 3).

Los microsatélites que presentaron menor número de alelos son el MTcCIR7 con 12 alelos y los cebadores MTcCIR15 y MTcCIR22 con de 14 alelos cada uno (cuadro 2). MTcCIR15 fue el cebador que menor número de muestras amplificó y se tuvo que realizar repeticiones de PCR para obtener un número significativo de muestras amplificadas; Efombagn *et al.*, (2006) reportó que MTcCIR15 identificó 22 alelos, siendo este uno de los marcadores más informativo en su estudio y que la identificación de alelos encontrado para este marcador se debe a la facilidad de que tuvo este cebador de amplificar muestras y al nivel de polimorfismo que posee en comparación con los otros cebadores porque logra identificar diferentes alelos.

El número de alelos efectivo para MTcCIR12 es de 5.63 obteniendo el valor más alto y el menor número de alelos identificados lo detectó MTcCIR22 con 2.73 considerándose bajo en cuanto a riqueza alélica; esto se debe a que este cebador es uno de los que presentó el menor número de alelos identificados; Aragón (2009) encuentra un número de alelos efectivos bajo para MTcCIR1 y MTcCIR7 con 2.9 y MTcCIR15 presenta el valor más alto con 6, considerándose el marcador con alelos efectivos altos. La media de alelos efectivos para todos los locus es de 4, según Sereno *et al.*, (2006) considera que los valores arriba de 4 son considerados moderadamente alto debido a que los alelos efectivos encontrados para determinados grupos, son el resultado de la discriminación de alelos totales encontrados.

4.1.2 Heterocigosidad Observada y Esperada por locus.

En este estudio los cebadores MTcCIR1 y MTcCIR12 presentaron los valores promedios más alto de en cuanto a Heterosigocidad observada con 0.43; Para la heterosigocidad esperada el promedio para estos mismos marcadores fue de 0.69 y 0.81 respectivamente, presentando la misma tendencia de una alta diversidad genética para todos los marcadores utilizados en este estudio (Cuadro 2). Romero *et al.*, (2010) reporta datos de H_{Obs} de 0.39 y de H_{Esp} de 0.80 para MTcCIR12 y fue el cebador que

reportó los valores más bajos de diversidad genética debido a que las 41 accesiones de su estudio son clones EET95, EET96, EET103 y EET576.

Lo cebadores MTcCIR15 y MTcCIR22 reportan los rangos más bajos en cuanto a Heterosigocidad esperada, con 0.58 y .052 respectivamente. Aragón (2009), y Romero *et al.*, (2010) reportaron para el cebador MTcCIR15 una heterocigosidad esperada alta de 0.82, en comparación con los otros microsatélites utilizados y resultó el marcador más informativo para ambos estudio, a su vez más polimórfico; sin embargo en este estudio el cebador MTcCIR15 no resultó efectivo al amplificar ADN y se omitió la lectura de algunas muestras porque no se lograron visualizar en la gel de agarosa, pero que sí lograron amplificar para los otros cebadores; como consecuencia generó menor información y brinda menor índice de diversidad en comparación con los otros microsatélites (Cuadro 2).

Los valores promedios de Heterocigosidad observada para todos los locus es de 0.20 y para la Heterosigocidad esperada es de 0.66, lo que implica que existe amplia diversidad genética; por tanto árboles potenciales para posteriores estudios de mejoramiento genético. Londoño *et al.*, (2010) en su estudio evaluaron clones de cacao provenientes de la granja Lucker, donde encuentra un promedio de heterosigocidad observada de 0.58 y heterosigocidad esperada de 0.69; consideran que a pesar de ser plantas propagadas clonalmente y de utilización comercial, se encuentra un nivel de diversidad importante y que podría ser explotado favorablemente para programas de fitomejoramiento.

Zhang *et al.*, (2007) es su estudio, utilizaron accesiones originarias de haciendas productoras de cacao refractario de Ecuador (deriva de tres diferentes orígenes: Nacional de Ecuador, Trinitario de Trinidad y Forastero del Alto Amazonas de Perú. Comparten características entre el Forastero y los trinitario), donde encuentra una media de 0.56 de Heterocigosidad esperada y 0.51 Heterocigosidad observada, obteniendo menor diversidad genética que la encontrada en este estudio, debido a que existe una disminución substancial de individuos progenitores por fuerzas selectivas y propagación clonal de este cacao refractario del Ecuador. En el presente estudio, la diversidad genética es mayor, ya que son accesiones que han respondido favorablemente al medio en que se desarrollan y se utilizaron principalmente, accesiones pertenecientes a los grupos genéticos trinitarios y forasteros y en menor proporción, del tipo Criollo

Cuadro 2. Parámetros para diversidad genética basados en los microsatélites utilizados.

Locus	NA	NE	H_{esp}	H_{Obs}	CIP	I
MTcCIR1	16	4.38	0.69	0.43	0.88	1.46
MTcCIR6	16	4.55	0.66	0.30	0.78	1.43
MTcCIR7	12	3.65	0.61	0.11	0.81	1.25
MTcCIR8	22	3.76	0.68	0.11	0.92	1.33
MTcCIR11	18	4.09	0.71	0.24	0.89	1.45
MTcCIR12	35	5.63	0.81	0.43	0.96	1.94
MTcCIR15	14	3.46	0.58	0.13	0.90	1.11
MTcCIR18	16	3.63	0.67	0.21	0.88	1.31
MTcCIR22	14	2.73	0.52	0.09	0.81	1.00
MTcCIR24	20	3.13	0.64	0.08	0.92	1.19
MEDIA	18.3	4.00	0.66	0.20	0.87	1.357

Número de alelos por locus (NA); Alelos efectivos (NE); Heterocigosidad esperada (H_{esp}); Heterocigosidad observada (H_{Obs}); Contenido de Información Polimórfica (CIP); Índice de Shannon (I)

4.1.3 Contenido de Información Polimórfica (CIP)

En el CIP, se encontró un promedio de 0.87 para todos los locus estudiados, demostrando que los microsatélites utilizados son altamente informativos y polimórficos (Cuadro 2).

Todos los locus de este estudio presentan valor CIP mayor de 0.5, por tanto son polimórficos, nos indica que estos cebadores son capaces de identificar múltiples alelos de un gen. El cebador MTcCIR12 presentó el valor más alto de 0.96 y el cebador MTcCIR6 más bajo con un valor de 0.78. Romero *et al.*, (2010) reporta un CIP bajo para este mismo cebador (0.71), en cambio el valor más alto lo proporcionó MTcCIR15 (CIP = 1.00), ya que encontró una variación alélica mayor para este cebador que en este estudio.

Esto corrobora lo que Saunders *et al.* (2004) menciona acerca de la efectividad de los marcadores para *T. 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, brinda los valores más altos en cuanto a contenido de información polimórfica y número de alelos por locus, es efectivo en análisis de diversidad genética. 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) considera estos marcadores importantes y altamente representativos para *T. cacao*; añadiéndole lo mencionado por Saunders *et al.*, (2004) que estos marcadores son de gran importancia para caracterizar bancos de germoplasma de *T. cacao* alrededor del mundo.

4.1.4 Índice de Shannon por locus

Este índice demostró la riqueza genética alta existente en base a los microsatélites utilizados; para el cebador MTcCIR12 el índice es mayor con una media de 1.94 indicando que en este locus se encontró mayor riqueza de genes debido a que encontró mayor número de alelos (Cuadro 2); en cuanto al cebador MTcCIR22 encuentra el menor índice con 1.003, resultando ser el cebador con menor abundancia de genes (menor frecuencia alélica).

Para los parámetros de diversidad genética en las 105 accesiones evaluadas en este estudio, el cebador MTcCIR12 encontró los valores más altos, lo que implica que la mayor riqueza genética la determinaría este cebador. Sin embargo, los microsatélites utilizados en este estudio determinaron una riqueza genética alta. Sounigo *et al.*, (2005) realizaron una caracterización doble utilizando isoenzimas y RAPD para un banco de germoplasma de Trinidad y Tobago, donde el Índice de Shannon varía de 0.009 a 0.42, valores que están por debajo de los encontrados en este estudio, que oscilan de 1.00 a 1.94, lo que significa que tenemos mayor riqueza genética en los materiales que se evaluaron y que los microsatélites por ser codominantes y altamente polimórficos, brindan mayor precisión para determinar diversidad genética.

Efombagn *et al.*, (2006) reporta el menor valor de índice de Shannon (0.68) para MTcCIR24 y en este estudio este mismo cebador reporta bajo índice de diversidad después de MTcCIR22 (1.19 y 1.00 respectivamente). Implica que el cebador MTcCIR22 identifica una diversidad de genes baja en comparación con los otros cebadores que se utilizaron, lo que significa pocas variaciones de genotipos para este cebador.

4.1.5 Número de Alelos por grupo

El grupo que presentó el mayor número de alelos fue Rio San Juan con un promedio de 13.2 se le acredita esto porque es el grupo que mayor número de accesiones presenta (42 accesiones) Montalván (2010), asegura que en Rio San Juan se encuentran plantaciones jóvenes, y en su mayoría son materiales que provienen del CDT-RECREEO.

El grupo Rivas es el que obtuvo el menor promedio de alelos con 2.60 a causa de que este grupo tiene el menor número de accesiones, y por consiguiente el menor número de alelos efectivos presentando 2.16, porque el número de muestras reduce la cantidad de alelos efectivos.

La media general de alelos efectivos por grupo es de 4 (Cuadro 3). Opoku *et al.*, (2007) en su estudio de árboles colectados en finca de productores de Ghana (235 accesiones) y árboles provenientes del CRIG (banco de germoplasma de Ghana con 142 accesiones), para un total de 377 individuos; encontró una media general de número de alelos efectivos de 4.0, considerándola baja porque proviene de una fuente común de progenitores y provoca baja proporción de alelos por locus (media 6.4).

En relación a los alelos efectivos el grupo alto amazona presenta 4.7, seguido por el grupo región occidental con 4.6. Los datos de media de alelos por grupo coinciden con los de este estudio; sin embargo consideran que la baja proporción de alelos por grupo se debe al número de locus utilizados y no al número de accesiones por grupo, donde utilizaron 17 microsatélites obteniendo una media de alelos por grupo igual a la de este estudio, en el cual se utilizaron 10 microsatélites y menor número de accesiones.

4.1.7 Heterocigosidad observada y esperada por grupo.

Los valores de heterocigosidad esperada más altos es para el grupo Rio San Juan con 0.86 y de heterosigocidad observada es de 0.31. Para el grupo Matagalpa la heterosigocidad observada es la más baja (0.08) en comparación con el resto de grupos. Se esperaba que la heterocigosidad esperada más baja la presentara el grupo Criollo referencia, porque el cacao tipo Criollo tiende a ser homocigoto por su característica de autopolinización e incompatibilidad con los otros grupos genéticos de cacao; pero el grupo con menor heterocigosidad esperadas es Rivas, se pudo ver afectada por tener el menor número de accesiones. Aragón (2009), plantea que si la heterosigocidad esperada es menor a 0.50 la diversidad genética es baja; por tanto el grupo Rivas está en el rango mínimo de diversidad genética alta (Cuadro 3).

Ruiz *et al.*, (2011) realizaron un estudio con accesiones de Nicaragua donde la media de heterosigocidad esperada fue de 0.6 y de heterosigocidad observada fue de 0.16, considerando una deficiencia de heterocigosidad a causa del muestreo de árboles élites y no élites en el que existía una variación heredable entre los mismos y con una fuerte relación entre sí, posible proceso de autofecundación o por efecto wahlun. En este estudio encontramos alta diversidad genética para todos los grupos debido a la variación heredable entre individuos élites seleccionados en este estudio, y su importancia radica en que esta variación heredable es la fuente fundamental para que la selección natural y la evolución, de tal modo que se evite la erosión genética; por tanto si se extinguen poblaciones que albergan una variedad considerable de variación genética, aunque persista la especie, la selección natural tiene menor posibilidad de actuar, y las oportunidades de cambio evolutivo pueden verse aminoradas.

La media general de heterocigosidad observada para este estudio fue de 0.20 y de heterosigocidad esperada fue de 0.66. Zhang *et al.*, (2009) reporta una media de 0.46 de heterocigosidad observada y 0.51 de heterosigocidad esperada debido a que encontraron altos niveles de consanguinidad, por tanto déficit de heterocigotos, utilizando clones de carácter internacional procedentes de CATIE y están mayormente relacionadas entre sí. En este estudio se encuentra mayor diversidad genética porque la mayor parte de accesiones colectadas se encuentran en diferentes zonas geográficas del país, en finca de productores.

Cuadro 3. Parámetros para diversidad genética basada en los Grupos estudiados.

Locus	N	NE	NA	H_{Obs}	H_{esp}
Rio San Juan	43	7.94	13.20	0.31	0.86
Híbridos referencias	21	4.40	7.60	0.20	0.72
Matagalpa	11	3.42	5.20	0.08	0.69
Jinotega	9	5.24	6.20	0.22	0.78
RAAS	6	3.00	3.70	0.19	0.54
Carazo	6	2.96	4.00	0.30	0.60
Criollo Referencia	5	2.87	3.20	0.11	0.58
Rivas	4	2.16	2.60	0.23	0.50
MEDIA		4.00	5.71	0.20	0.66

Número de individuos (N); Alelos efectivos (NE); Alelos por grupo (NA); Heterosigocidad esperada (H_{esp}); Heterosigocidad observada (H_{Obs})

4.1.8 Frecuencia Alélica

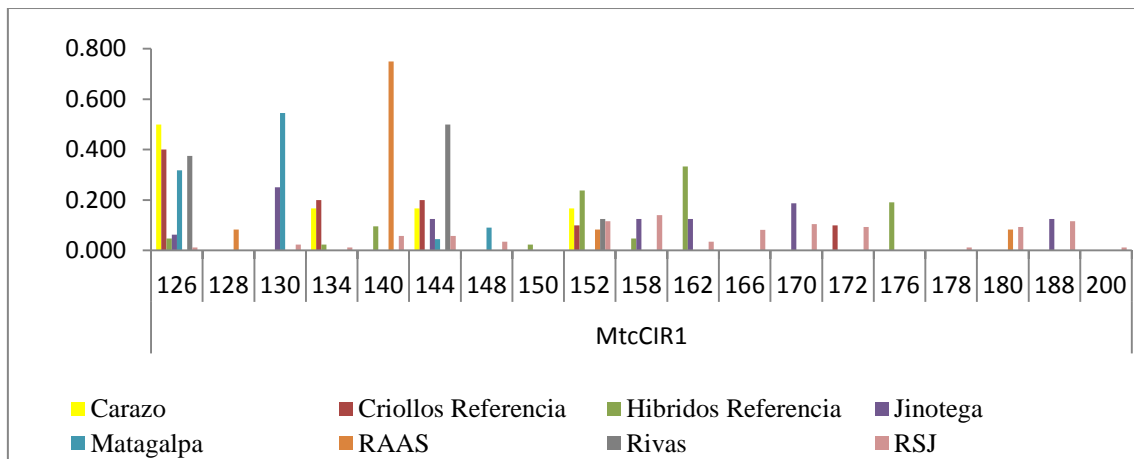


Figura 3. Frecuencia Alélica presentada para el cebador MTcCIR1, para los grupos estudiados

Los alelos 126, 144 y 152 son los que están presentes en la mayoría de los grupos, no así el alelo 128 que está en manifiesto solo para el grupo RAAS y el 166 para el grupo RSJ.

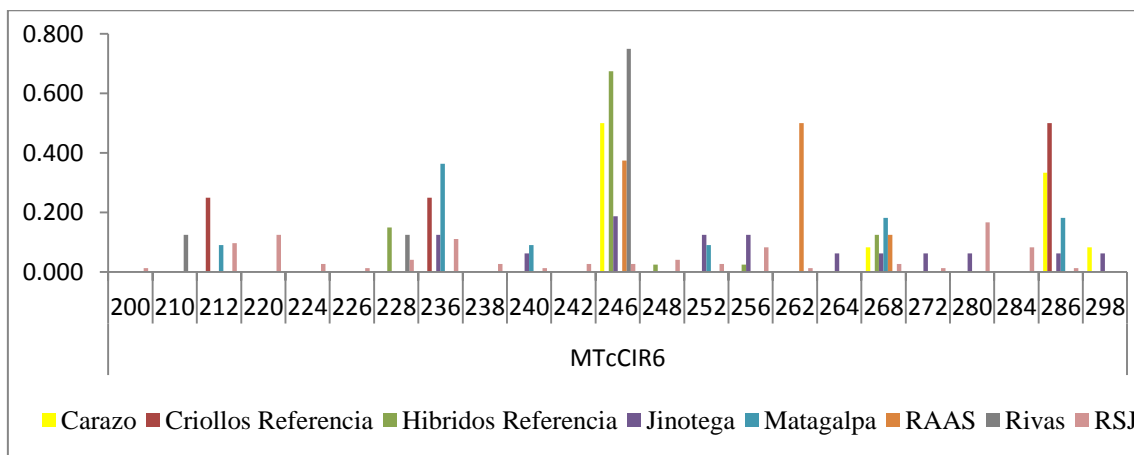


Figura 4. Frecuencia alélica presentada para el cebador MTcCIR6 en ocho grupos

La figura anterior identifica frecuencias altas en cuanto a número de alelos identificados, los alelos 246 y 286 son los que mostraron mayor frecuencia en los grupos estudiados; es decir estos alelos son dominantes para un carácter determinado; sin embargo el grupo RAAS presenta menos alelos frecuentes (246, 262, 268).

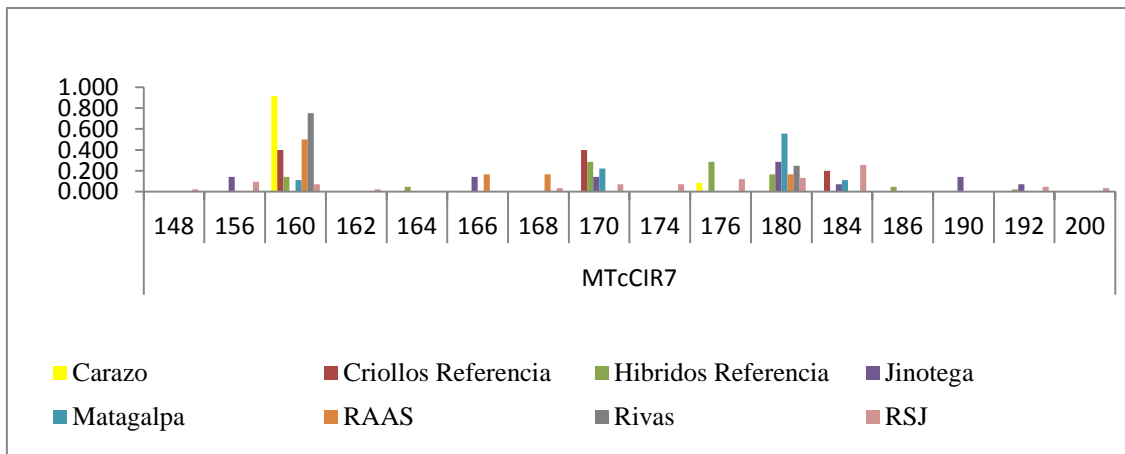


Figura 5. Frecuencia alélica presentada para el cebador MTcCIR7 para ocho grupos

El alelo 160 muestra los valores más altos en frecuencia y en número de grupos presente, principalmente para el grupo Carazo que presenta mayor frecuencia en este alelo. El alelo 180 y 170 también estuvo presente en la mayoría de los grupos estudiados. Observamos el alelo 200 su frecuencia es mínima y solo un grupo lo manifiesta al igual que el alelo 148.

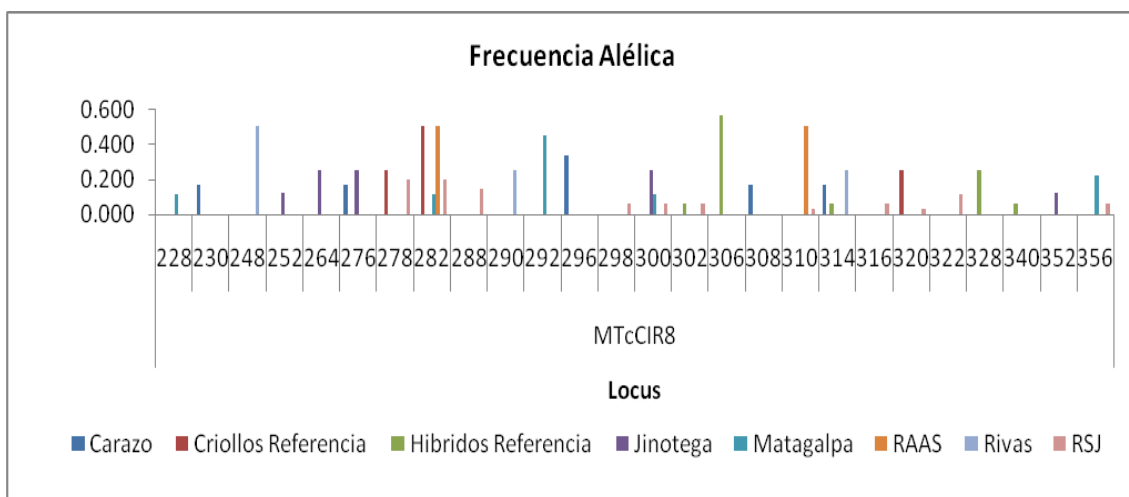


Figura 6. Frecuencia alélica presentada para el cebador MTcCIR8 para ocho grupos

Encuentra frecuencias altas pero los alelos no están presentes en todos los grupos, solo el alelo 282 está presente para el 50% de los grupos estudiados. La mayor frecuencia se registra en el alelo 306 presente únicamente en el grupo híbrido referencia.

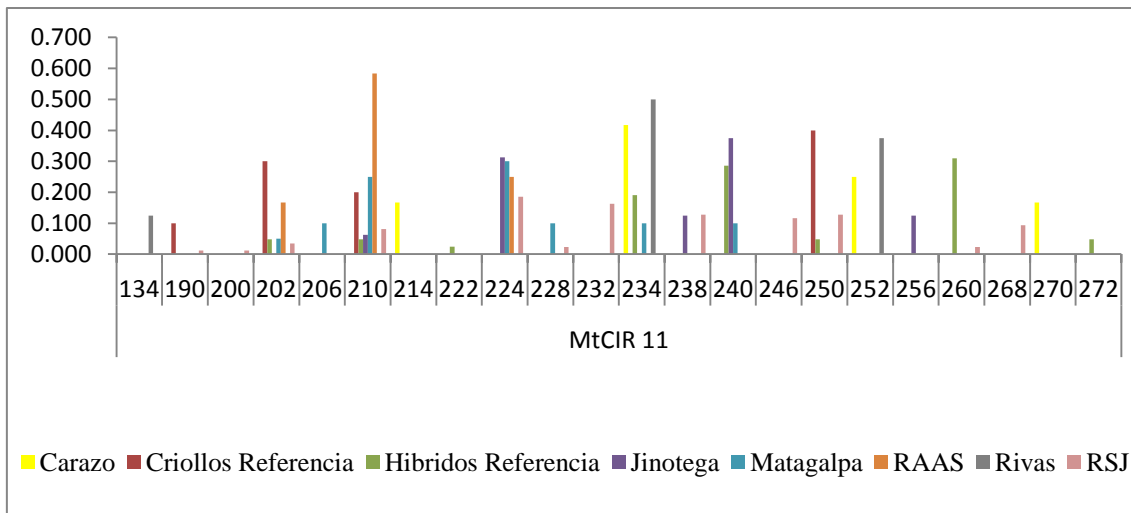


Figura 7. Frecuencia alélica presentada para el cebador MTcCIR11 para ocho grupos

La gráfica 7 muestra frecuencias alélicas altas; para este marcador los alelos 210, 224, 234 se manifiestan en la mayoría de los grupos con frecuencias altas. El alelo 210 está presente en seis de los grupos estudiados.

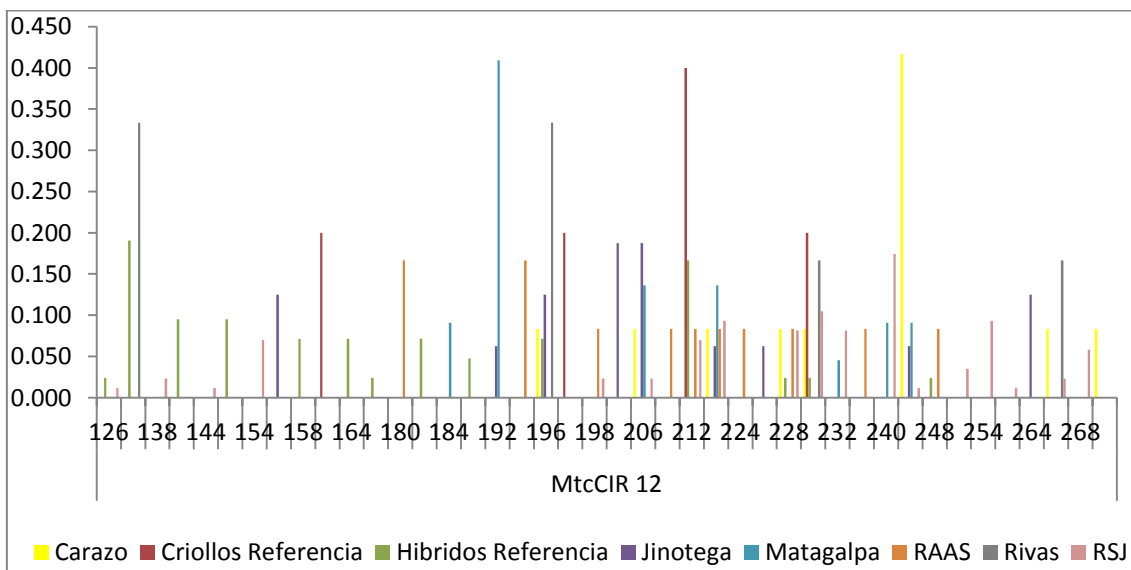


Figura 8. Frecuencia Alélica presentada para el cebador MTcCIR12 para ocho grupos

Este marcador resulto más informativo, con frecuencias altas y mayor número de alelos identificados. Entre los alelos 212-224 son los que más se encuentran presente en los diferentes grupos. La mayor frecuencia se registra en el alelo 192 presente únicamente en el grupo Matagalpa y el alelo 248 presente en la población Carazo.

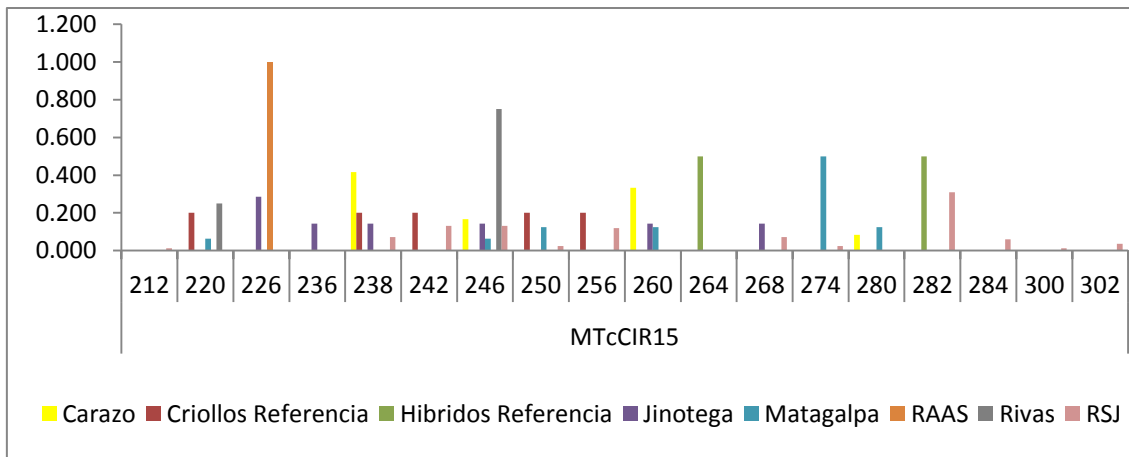


Figura 9. Frecuencia alélica presentada para el cebador MTcCIR15 para ocho grupos

En la Figura 9 se identificaron varios alelos pero no presentan frecuencias altas, solo para el alelo 226 se registró una frecuencia alta en comparación con los otros alelos y está presente en dos grupos que se estudiaron.

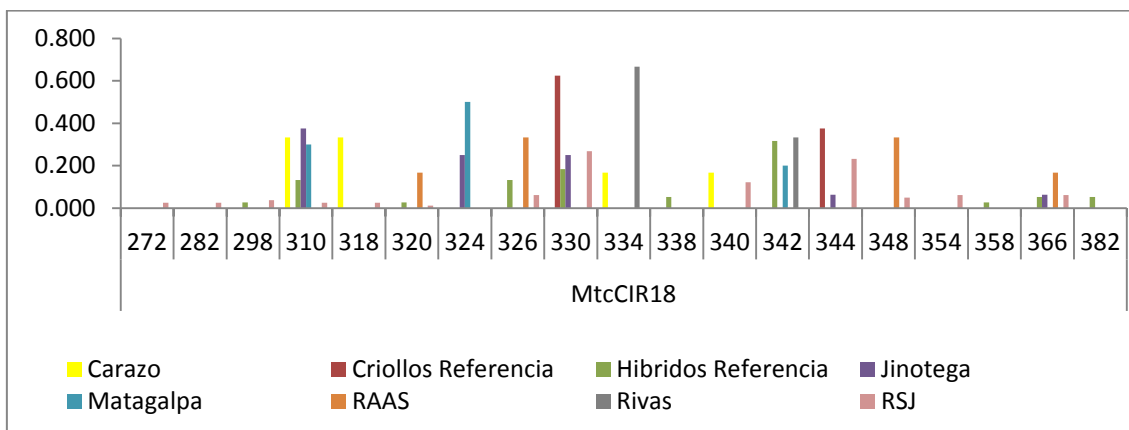


Figura 10. Frecuencia alélica presentada para el cebador MtcCIR18 para ocho grupos

En el alelo 334 presente únicamente en el grupo Rivas, se identificó la mayor frecuencia similar a la frecuencia del alelo 330 presente en el grupo Criollo referencia

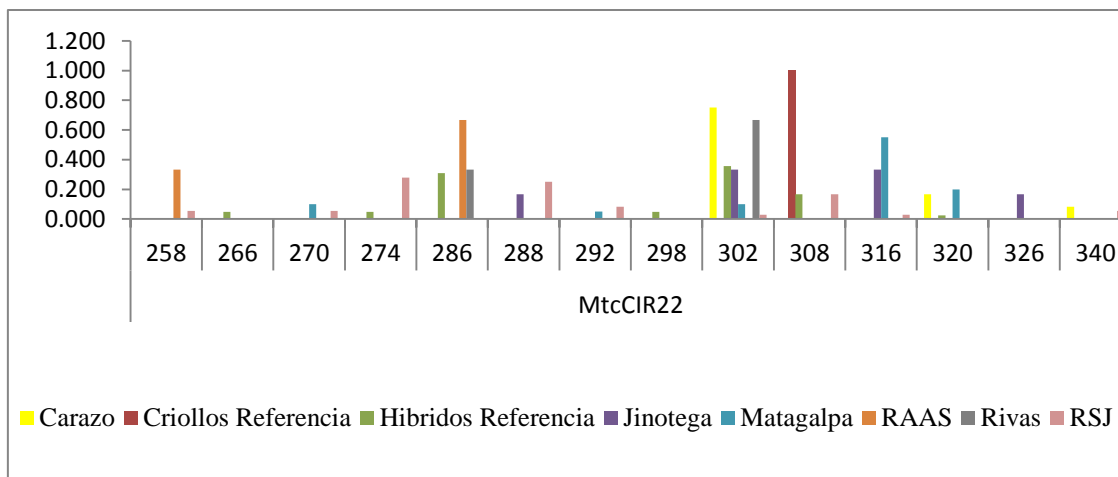


Figura 11. Frecuencia alélica presentada para el cebador MTcCIR22 para ocho grupos

El Alelo 302 proporciona frecuencias altas y este a su vez está presente en el 75% de los grupos estudiado; la frecuencia más alta se observa en el alelo 308 presente en el grupo criollo referencia.

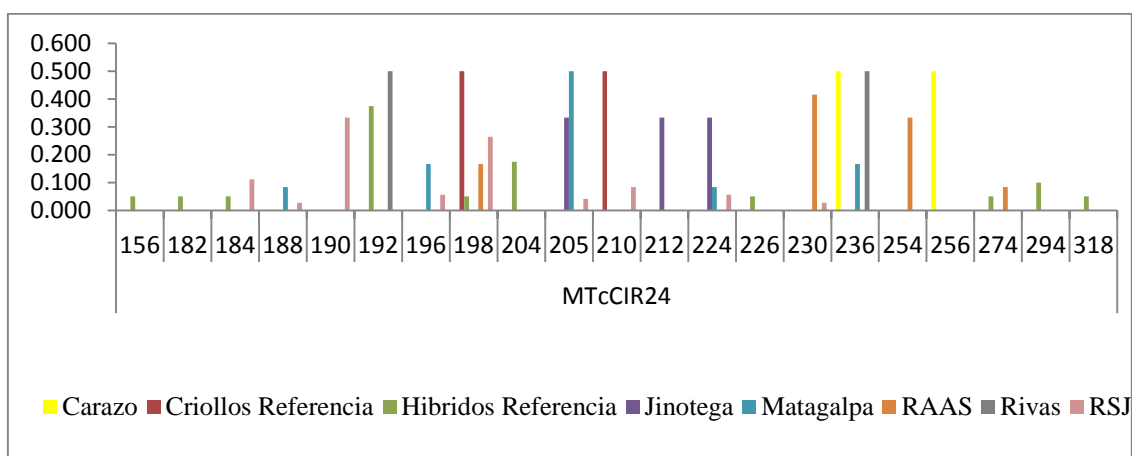


Figura 12. Frecuencia alélica presentada para el cebador MTcCIR24 para ocho grupos

Se puede observar que el alelo 198 está presente en el 50% de los grupos estudiados y que el grupo híbrido referencia presenta los alelos 156, 182, 184 y 318 con frecuencias bajas lo que indica que son alelos específicos para ese grupo

4.2 Estructura Genética

4.2.1 Análisis Molecular de Varianza (AMOVA)

Se encontró que las diferencias genéticas mayores están dentro de los grupos con un 85% y que las diferencias entre grupo fue de 15%, demostrando que aunque se hayan agrupados las accesiones según su sitio de colecta las diferencias genética entre individuos son grandes y las diferencias entre grupo son menores, debido a que muchos individuos agrupados en una misma población, pertenecen al mismo grupo genético, en este caso solo existen tres grupos genéticos que están distribuidos en todo el país y que son bien diferenciados, encontrándose principalmente los tipo Trinitarios y Forasteros, en menor escala los de tipo Criollo; por tanto baja diferenciación.

Zhang *et al.*, (2009) realizaron un estudio para caracterizar una colección de Cacao internacional de Costa Rica; donde encontraron datos similares a los de este estudio en cuanto a AMOVA, 15.4% diferencia entre grupos y 84.6 diferencia dentro de los grupos, considerando como principal causa el mal etiquetado de árboles y las diferencias que existen del cacao nacional y los introducidos. A diferencia de su estudio, se caracterizaron accesiones élites colectadas a nivel nacional, porque se pretende obtener una muestra significativa de plantas y estas por sus características morfológicas pertenecen podrían pertenecer a los grupos genéticos trinitarios y forasteros.

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% y 24% entre grupos; sugiere que esto se debe a la paternidad común de los arboles nacionales ecuatorianos que han contribuido a la formación del Refractario, compartiendo antecedentes genéticos similares. En este caso, la variación del 85% encontrada dentro de grupo, se debe a la variabilidad genética existente en el cacao nacional nicaragüense independientemente de su sitio de origen (geográficamente) y a las características propias de cada individuo que forma cada grupo

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 América Central y del Sur.

Cuadro 4. Análisis Molecular de Varianza para *Theobroma cacao* basado en las colectas realizadas

Fuente	GI	SC	MS	Var. Est.	%
Entre grupo	7	293.460	41.923	2.426	15%
Dentro de grupo	97	1371.207	14.136	14.136	85%
Total	104	1664.667		16.562	100%

GI (Grados de libertad,); SC (Suma de cuadrados,); MS (media de la suma); Var. Est (Variación estándar); Porcentaje de Variación (%)

4.2.2 Distancias Genética

Se encontraron valores altos de distancias genéticas para los grupos estudiados, entre Híbrido referencia 4.96 es el que mayor valor presentó y el que presenta el menor valor es RSJ con 0.48 (Anexo 17). Los grupos más similares entre sí basándose a los valores de distancia genética son RSJ (0.48) y el grupo Carazo. Los Híbridos referencias y el grupo Carazo presentan las mayores diferencias lo que indica que a mayor distancia genética menor identidad genética.

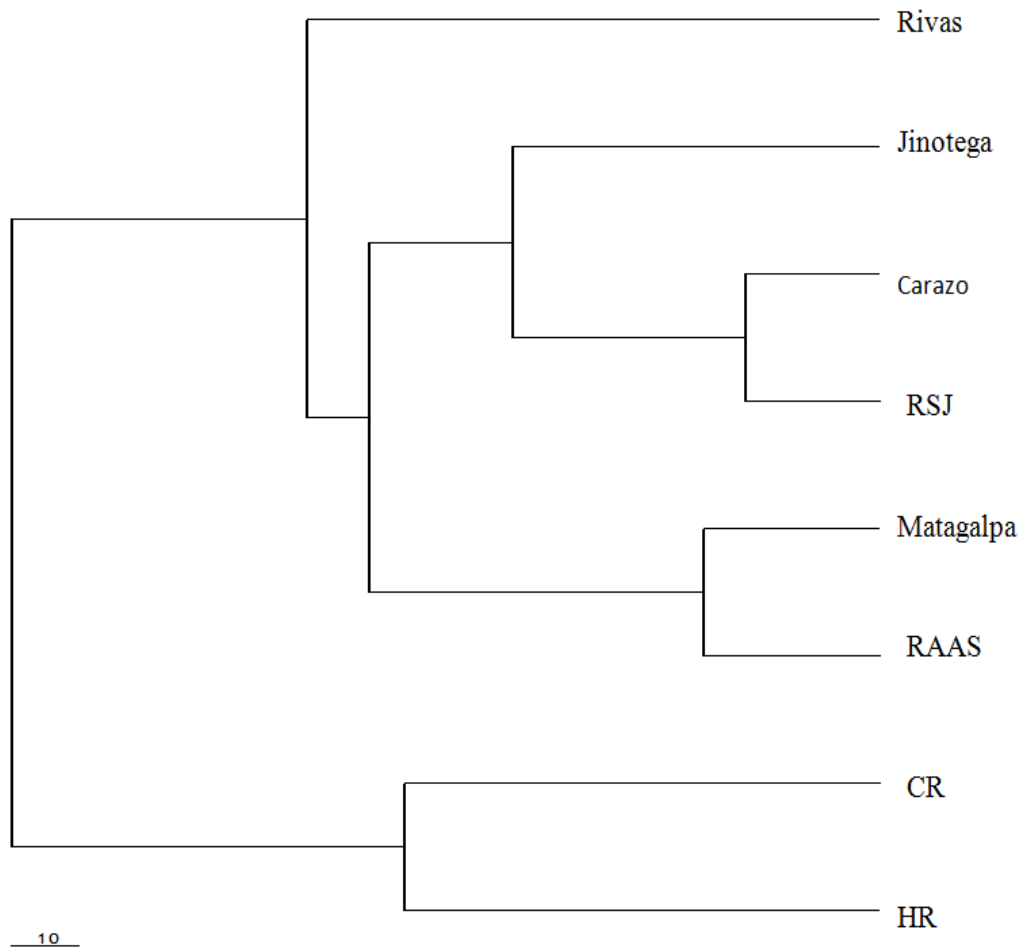


Figura 13. Dendrograma de distancias genéticas de Nei's para ocho grupos

La figura 13 basada en las distancias genéticas de Nei's muestra que las mayores diferencias se encuentran dentro de los grupos, los valores de distancia genética no son significativos porque presentan un porcentaje menor de 50%, el 10 que aparece en la figura equivale al 100 % y ningún grupo se aproxima a este valor, por tanto las diferencias entre los grupos formados no son relevantes. (Anexo 17).

4.2.4 Análisis de Componentes Principales

El eje 1 se encuentra los materiales criollos referencias en su mayoría, RAAS0403 (9 en el gráfico) se relaciona con RSJ0311 (64 en la figura), Bomat0511 (Matagalpa 42) y con Rio San Juan 0511 (66 en el gráfico); 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 (en la figura es 63); el CR10 se relaciona con Ji0210 (Jinotega34 en la figura). Estos materiales se encuentra en el banco de germoplasma de CATIE; Criollo13 es originario de Panamá y el Yucatán originario de México, por tanto su relación genética puede estar ligada a lo expuesto por Motamayor *et al.*, (2002) durante la época precolombina cuando se daba la introducción de cacao como moneda de intercambio para el comercio a través de las rutas Mayas.

En el eje dos se ubicaron dos materiales genéticamente relacionados Ji- Cuá 0104 (36 en la figura) y RSJ 0411 (65 en la figura); se esperaba duplicidad de accesiones en muestras originarias de la misma zona geográfica pero este resultado nos afirma la amplia propagación de material por todo el territorio nacional.

En el eje tres se encuentran los materiales mejorados en su mayoría. El material Rivas0111 (59 en la figura), se relaciona con el Híbrido UF6667xIMC67 (23 en la figura), 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 CATIE y Colombia. La estrecha relación del material de Rivas con el híbrido se debe a que este híbrido es el que mejor se adapta a la zona, ya sea el padre o el cruce.

A sí mismo, en este mismo eje se encuentran los materiales mejorados en su mayoría; la relación más estrecha que se observa en la figura es la de los híbridos EET162xSCV6, EET400xUF613, y UF654xP2 (17,20, 21 respectivamente) con el material Rivas0411 (62 en la figura), los híbridos hoy en producción provienen principalmente de las fases de establecimiento después de 1990 con mejores selecciones que en los 70's y 80's.

En el eje cuatro se ubican la mayor parte de los materiales Rio San Juan, los materiales criollo referencias distribuidos en este eje son los SJC0108 (7 en la figura) relacionado con RSJ1311, RSJ2111 (74, 82 respectivamente) y el criollo MENIER0108 (8 en la figura) está relacionado con el RSJ2011 (81 en la figura). Según Menocal (2006), las primeras plantaciones grandes de Cacao se reportaron en el valle de MENIER en Nandaime, 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 en la figura) 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 artificial entre un material un forastero con un material criollo.

Análisis de Componentes principales

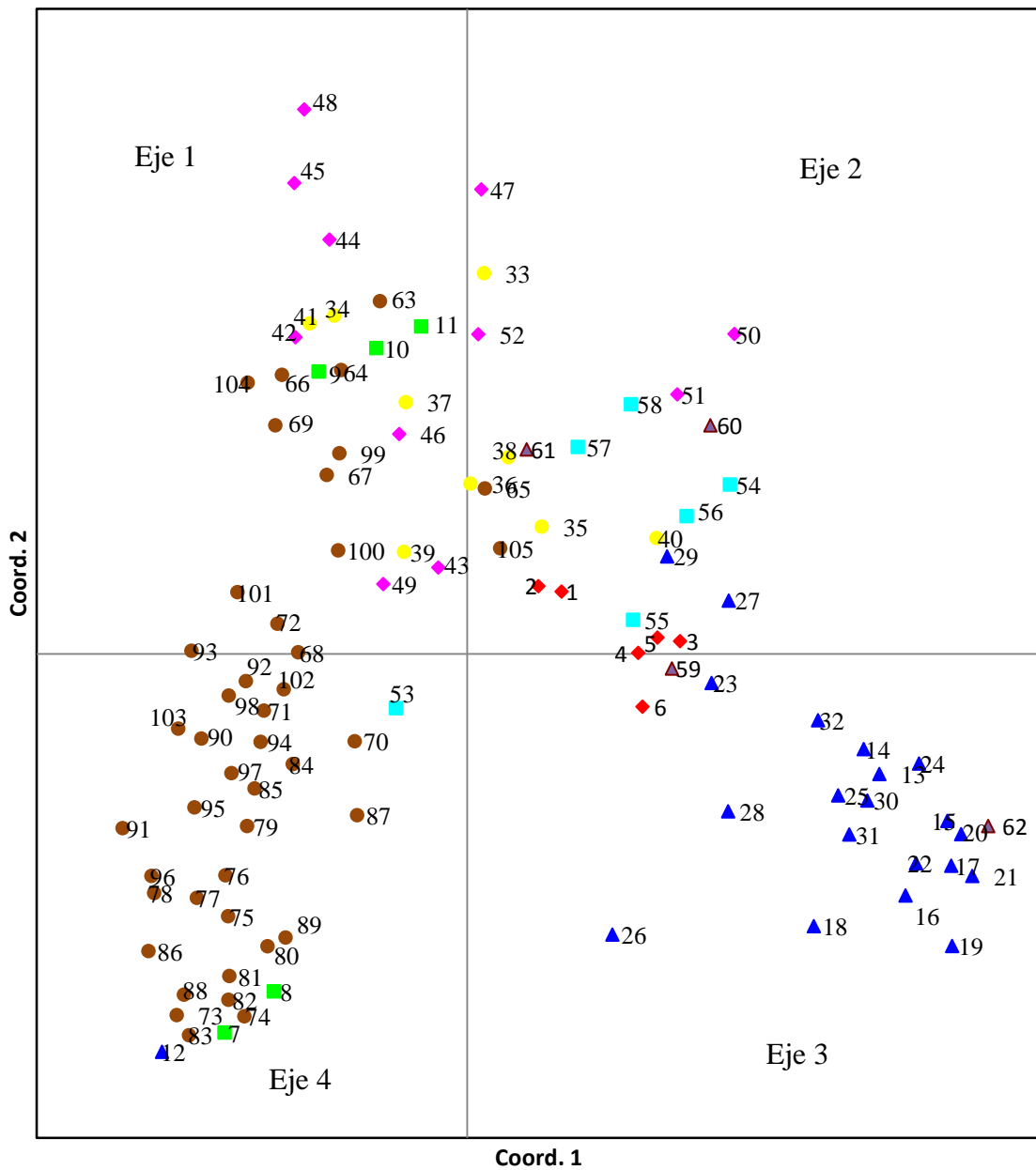


Figura 14. Análisis de componentes principales (ACP) para 105 accesiones estudiadas y congregadas en ocho grupos

V. CONCLUSIONES

Se encontró alta diversidad genética para los locus y grupos estudiados; donde el grupo Rio San Juan manifestó la mayor diversidad genética (0.86) y el cebador MTcCIR12 con 0.96.

El CIP más alto lo detectó el cebador MTcCIR12 (0.96) y el más bajo el cebador MTcCIR6 (0.78), 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.

Las relaciones genéticas reveladas en estos resultados muestran que las variaciones y diferencias genéticas de mayor importancia se encuentran dentro de los grupos estudiados (85%) 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 ACP, las accesiones Bomat0710, Bomat0810 y Bomat1110 de Matagalpa, formaron un grupo diferente al resto de las accesiones evaluadas, se pueden describir como ligadas genéticamente y con características únicas que las difiere de las otras accesiones evaluadas.

Se encontraron 2 materiales genéticamente iguales; es el caso de la accesión Ji- Cuá 0104 y RSJ 0411.

Se encontraron materiales Criollos que están estrechamente relacionados con los utilizados como Criollos Referencias; pero la mayoría de los materiales en este estudio resultaron ser de los otros grupos genéticos (trinitarios o forasteros).

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

VI. RECOMENDACIONES.

Al encontrar una alta diversidad genética, se recomienda realizar más colectas a nivel nacional, hasta abarcar el mayor número de sitios donde se encuentre Cacao para seguir identificando materiales promisorios que sustenten programas de mejora genética; seleccionando materiales élites y materiales con características morfológicas propias de los Criollos con el fin de obtener el mayor número de muestras y empezar a seleccionar los mejores entre ellos y establecerlos en el banco nacional de germoplasma de Cacao (CDT-RECREO).

Los marcadores moleculares utilizados en este estudio deberían incluirse prioritariamente en los estudios de caracterización y evaluación de la diversidad genética en los diferentes materiales de cacao a nivel mundial.

Identificar los materiales que posean alelos de interés (resistencia a enfermedades y productivos), seleccionarlos y que en el futuro sean utilizados como eslabón importante para la obtención de un clon eficiente para los productores.

Crear alianzas con cooperativas, instituciones nacionales y ONGS interesadas en este rubro para que se puedan financiar proyectos de rescate de germoplasma, caracterizaciones tanto morfológicas como moleculares, programas de mejora genética que permitan abrir nuevas oportunidades para el desarrollo del país.

Las muestras Bomat0710, Bomat0810 y Bomat1110 están genéticamente separadas del resto de accesiones, por lo que es necesario estudiarlas con mayor precisión para identificar las diferencias genéticas que poseen en comparación con las otras accesiones evaluadas.

Impulsar un Plan estratégico nacional acerca de la situación actual de nuestros recursos genéticos y la forma de conservarlos y utilizarlos sin extinguirlos.

Seguir promoviendo la conservación *in situ* y *ex situ* de germoplasma nacional de Cacao.

VII. LITERATURA CITADA

- Anderson, J.A., Churchill, G.A., Autrique, J.E., Tanksley, S.D. & Sorrells, M.E. 1993. Optimizing parental selection for genetic linkage maps. *Genome* 36: 181-186 p.
- Aragón, E.M., 2009. Genetic characterization of *Theobroma of Cacao* L. Thesis M, Sc. 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, Colombia. 10-12 p
- Botstein, D., White, R. L., Skalnick, M. H., & Davies, R. W. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. *American Journal of Human Genetics* 32: 314-331 p.
- Cryer, N.C., Fenn, M.G.E., Turnbull. C.J. & Wilkinson, M.J. 2006. Allelic size standards and reference genotypes to unify international cocoa (*Theobroma cacao* L.) microsatellite data. *Genetic Resources and Crop Evolution* 53:1643-1652.
- Cheesman, E.E. 1944. Notes on the nomenclature, classification and possible relationships of cocoa populations. *Trop Agricult* 21: 144–159 p.
- Doyle, J. F., & Doyle, J. L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13–15 p.
- Efombagn, M.I.B., Sounigo, O., Manzanares, M., Cilas, C., Eskes, M.A.B., Allen, K. 2006. Genetic diversity in cocoa germoplasm southern cameron revealed by simple sequences repeat (SSRS) markers. *African Journal of Biotechnology*. Vol 5. (16) 1441-1449 p.
- Evett I.W., Weir B.S. 1998. Interpreting DNA evidence: statistical genetics for forensic scientists. Sunderland, MA: Sinauer.
- 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 p.
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). 1999. Informe sobre el Estado de los Recursos Fitogenéticos en el Mundo. 85 p.
- Guo, X. Elston R.C. 1998. Linkage Information Content of Polymorphic Genetic Markers. *Human Heredity* 49:112-118 p.
- Lanaud, C., Risterucci, A. M., Pieretti, I., Falque, M., Bouet A, & Lagoda P.J.L. 1999. Isolation and characterization of microsatellites in *Theobroma cacao* L. *Molecular Ecology*. 8: 2141–2152 p.

- León, J. 2000. Botánica de los cultivos tropicales. Editorial Agroamérica, IICA, San José, Costa Rica. 103 – 109 p.
- Loaisiga, Carlos 1999. Diversidad genética de especies domesticadas, En Biodiversidad de Nicaragua, Un estudio de país. MARENA-PANIF Primera edición. Managua, Nicaragua.
- Londoño, M.J., Gil, V.D., Rivera P.F., López, G.G. 2010. Caracterización molecular de clones de *Theobroma cacao* L., por medio de marcadores moleculares microsátélites. Luna Azul. Número 32. 1-9 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.. 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.
- Montalvan, O. 2010. Arboles potenciales de *Theobroma cacao* L en Siuna y Rosita. URACCAN. 22 p.
- Motamayor, J.C., Risterucci, A.M., Lopez, P.A., Ortiz, C.F., Moreno, A., & Lanaud, C. 2002. Cacao domestication I: The origin of the cacao cultivated by the mayas. *Heredity* 89: 380-386 p.
- Nei, M. 1972. Analysis of gene diversity in subdivided groups. USA. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 70: 3321–3323 p.
- Nei, M. 1987. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583–590 p.
- Opoku, S.Y, Bhattacharge. R; Koleniskova, A.M; Motamayor, J.C; Schnell,R.:Ingelbrecht, I., Enu, K.L., Adu, A. Y. 2007. Genetic diversity in cocoa (*Theobroma cacao* L.). *Journal of Crop Improvement*. Vol 20 (15 p) 73-87 p.
- Orozco, L. 2010. Mapa cacaotero de Nicaragua: Zonas productivas, organizaciones de productores, agencias de apoyo y exportadores. Proyecto Cacao Centroamérica. 26 p.
- Plucknett, D.L.; Williams, J.T.; Smith, N.J.R. y Murty, N. 1992. Los Bancos Genéticos y la Alimentación Mundial. IICA. CIAT. San José, Costa Rica. 260 p.
- Pound, F.J 1938. Cacao and Witch broom disease (*Marasmius perniciosus*) of South America with Notes on Other Species of *Theobroma*. Yuille's Printery: Port of Spain, Trinidad and Tobago (reprinted in 1982 in *Arch Cocoa Res.* 1: 20–72 p.

- Romero, C.C., Bonilla, J.A., Peralta, E.L. 2010. Identificación varietal de 41 plantas seleccionadas de cacao (*Theobroma cacao* L) provenientes de cuatro cultivares distintos de la región amazonoca Ecuatoriana, mediante el uso de microsátélites. Revista Tecnológica ESPOL Vol.23. 121-128 p.
- Ruiz, J.C., Roa, G.O., Marin, A.I. 2011. Molecular Ecology of genetic diversity of cacao cultivated in the south-east region of Nicaragua. International Research Journal of Agricultural Science Vol. 1. 6-13 p.
- Saunders, J.M., Mischke, S., Leamy, E.A. & Hemeida, A.A. 2004. Selection of international molecular standards for DNA fingerprinting of *Theobroma cacao* L. Theoretical and Applied Genetics 110: 41-47 p.
- Sereno, M.L., Albuquerque, P.S.B., 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 p.
- Silvertown, J & Charlesworth, D. 2001. Plant Population Biology. Blackwell publishing. Fouerth edition. 302 p.
- Soria, V. J. 1966. Obtención de clones de cacao por el método de índices de selección. Turrialba (IICA). Vol.16. 119-124 p.
- Sounigo, O.; Umaharan, R. Christopher, Y. Sankar, A.; Ramdahin, S. 2005. Assessing the genetic diversity in the International Cocoa Gene bank, Trinidad (ICGT) using isoenzyme electrophoresis and RAPD. Genetic Resources and Crop Evolution. Vol 52. 1111–1120 p.
- Thienhaus, S. 2008. Composición genética de las plantaciones híbridas de cacao establecidas en Nicaragua en los últimos 50 años. Foro I “Actualidad y tendencias del germoplasma de cacao en Nicaragua”. Memoria. 10 p.
- Urquhart, D. H. 1963. Cacao. Primera edición. Instituto del libro. Edición Revolucionaria. Habana, Cuba. 322 p.
- Vavilov, N. I. 1926. Theory of centers of diversity in the light of current understanding of wheat domestication and evolution. (En línea) Consultado 14 Enero, 2012 disponible en: <http://www.monografias.com/trabajos53/mejoramiento-plantas/mejoramiento-plantas.shtml>.
- Waits, LP., Luikart G, Taberlet P. 2001. Estimating the probability of identity among genotypes in natural populations: cautions and guidelines. Molecular Ecology 10: 249–256.
- Weir, B. S. 1996. Genetic data analysis II. Sinauer, Sunderland, Massachusetts, USA.
- Weir, BS., Cockerham, C.C. 1984. Estimating F-Statistics for the analysis of population structure. Evolution, 38: 1358–1370 p.

Wilches M, A. 2004. Descripción de algunas herramientas moleculares y sus aplicaciones. Ed. J. Galves, C. Cleaves, Universidad Rafael Landívar. 36 p. (Serie tecnica 15)

Zhang, D., Mischke, S., Johnson, E.S., Phillips-Mora, W., Meinhardt, L. 2009. Molecular characterization of an international cacao collection using microsatellite markers. *Tree Genetics & Genomes* 5: 1-10.

Zhang. D., Boccara, M., Motlilal, L., Butler, D.R., Umahoran.p., Mishk. S., Lyndel, M. 2007. Microsatellite variation and population structure in the Refractorio Cacao of Ecuador. *Conserv Genet.* Vol.9. 327-337 p.

VII. ANEXOS

Anexo 1. Hoja de registro utilizada al momento de la colecta



Gobierno de Reconciliación
y Unidad Nacional
El Pueblo, Presidente!



INSTITUTO NICARAGUENSE DE TECNOLOGIA AGROPECUARIA CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACION AGROPECUARIA Y BIOTECNOLOGIA FICHA ECOGEOGRAFICA DE INVENTARIO DE *THEOBROMA CACAO*

Fecha:	Ficha N°
1. PASAPORTE	8. Sitio de recolección (dirección)
1. Género Theobroma	9. Latitud
2. Especie cacao	10. Longitud
3. Autor L.	11. Altura del sitio (msnm)
4. Variante _____ _____ _____	12. Nombre o número de muestra de herbario
5. Estado de la muestra 1 (cultivado) 2 (silvestre) 3 (Tolerado)	13. Tamaño de la población del sitio (1) un individuo (2) 2 a 10 individuos (3) más de 10 individuos
6. Nombres locales	2.1 Características del sitio
2. RECOLECCION	1. Prácticas agronómicas
1. Institución apoyando la colecta	2. Topografía (1) Plana (2) Ondulada (3) Accidentada
2. Donante	3. Fertilidad del suelo (1) pobre (2) media (3) alta
3. Nombre del recolector	4. Humedad del suelo (1) pobre (2) media (3) alta
4. Fecha de recolección	
5. País de recolección	
6. Departamento	
7. Municipio	

5. Textura del suelo
(1) fina (2) media (3) gruesa
 6. Drenaje
(1) pobre (2) bueno
 7. Iluminación
(1) soleado (2) sombreado
- Especies asociadas

3. DESCRIPCIÓN DE LA PLANTA

1. Edad aproximada de la planta
2. Forma y diámetro del tallo
3. Altura de la horqueta
4. Declinación de la flor
5. Textura del fruto
(1) áspera (2) rugosa (3) fina
6. Color del fruto ya maduro
(1) rojo (2) amarillo (3) otros
7. Forma de la hoja (foto)

3.1 CARACTERÍSTICAS DEL FRUTO

1. Longitud del fruto
2. Diámetro del fruto
3. altura máxima del surco
4. Altura mínima del surco
5. Espesor de la semilla del fruto
Longitudinal:
Transversal:
6. Peso seco de la semilla
7. Numero de semilla por fruto
8. color del pericarpio (semilla)
(1) Blanca (2) Morada (3) Rosada
- 9 lustre de la superficie del fruto
(1) Brillante (2) Oscuro (3) Opaco
10. forma del fruto
(1) Redondo (2) Angulado (3) Ovalado

Anexo 2. Parcela de Cacao en Rivas donde se realizó colecta de material vegetativo para el estudio



Foto cortesía M.Sc Claudia Rivera

Anexo 3. Tipo de hoja que se seleccionaba para el estudio.



Foto cortesía Ing. Raúl Cordonero CDT-Recreo

Anexo 4. Elaboración de CTAB-BUFFER 100 ml

Reactivos	Cantidad
CTAB	2g
ddH ₂ O	
1M, Tris	5M
5M, NaCL	1 ml
0.5M, EDTA	4 ml
Polivinyl Pirrolidone (PVP)	1g

Todos los reactivos se disolvieron y se rellenaron de agua destilada hasta alcanzar un volumen de 100 mL. Se autoclavearon.

Anexo 5. Elaboración de Cloroformo: Isomilalcohol CIA 24:1 50 ml

Reactivos	Cantidad
Cloroformo	48 ml
Isomilalcohol	2 ml

Para un total de 50 ML.

Anexo 6. Preparación de TRIS 1mol para 500 ml

Reactivos	Cantidad
Hidroxymethyl Hydrochloride	Aminomethenl 78.8 g
H ₂ O destilada	300 ml

Se Agregó HCL para fijar el pH a 8, la aplicación fue variable, se completó hasta llegar a los 500mL.

Anexo 7. Preparación de BUFFER EDTA (Ethylenediamineetracetic Acido Dissodium Saltdiol)

0.5 Mol para un total de 1 L.

Reactivos	Cantidad
Ethylenediamineetracetic Dissodium Saltdiol	Acido 186.12 g
H ₂ O destilada	750 ml

La solución se llevó a autoclave con un volumen total de 1 litro.

Anexo 8. Preparación de Cloruro de Sodio 5 mol para un total de 500 ml

Reactivos	Cantidad
NaCL	146.1g
H ₂ O destilada	350 ml

Se utilizó un volumen total de 500 ml y se llevó a autoclave.

Anexo 9. Preparación de Acetato de Sodio 3 mol para 500 ml pH 5.2

Reactivos	Cantidad
Acetato de Sodio	204.12 g
H₂O destilada	350 ml

La solución se rellenó con agua destilada hasta alcanzar el volumen de 500mL. Se llevó a autoclave. Se le adicionó HCL para alcanzar el Ph que se necesitaba

Anexo 10. Preparación de Solución Madre TBE 10X

Reactivos	Cantidad
EDTA	9.3 g
Acido Bórico	55 g
Tris Base	108 g

Se diluyó en 1000mL de agua esterilizada y para llevarlo al 1X , del Stock original se mezcló 100mL con 900mL de agua esterilizada.

Anexo 11. Preparación de TE BUFFER

Reactivos	Cantidad
Tris HCL	10 mM
EDTA	0.1 mM
RNA_{sc}	4 µl

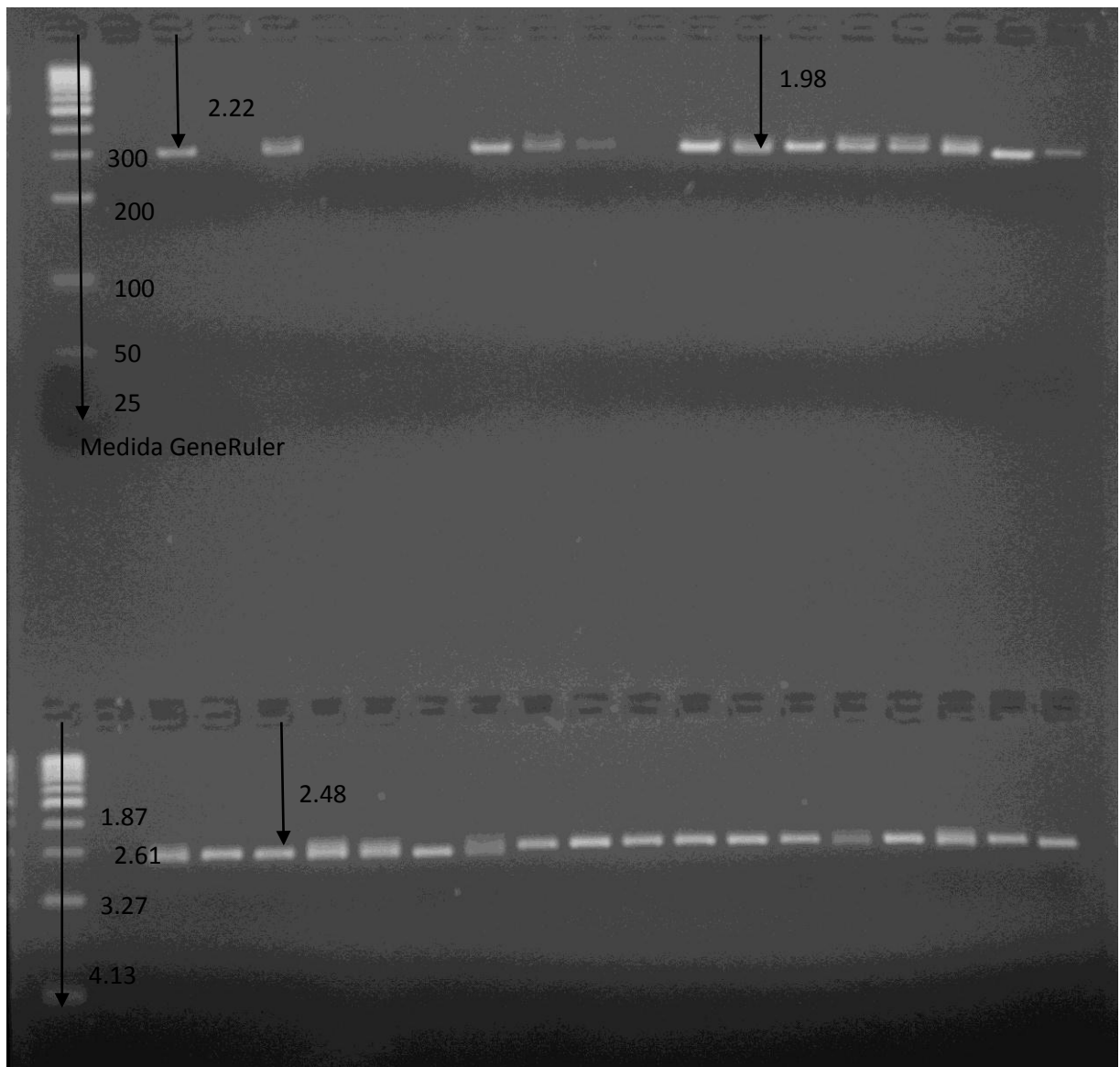
Anexo 12. Preparación de Gel de Agarosa Para verificar la presencia de ADN

Reactivos	Cantidad
Agarosa simple	1.8 g
TBE 1X	180 ml
Bromuro de Etidio	7.5 µl

Anexo 13. Preparación de Gel de Agarosa Simple para correr el producto PCR

Reactivos	Cantidad
Agarosa Simple	8 g
TBE 1X	200 ml
Bromuro de Etidio	8.33 µl

Anexo 14. Medición del Tamaño de las bandas 77-115 MTcCIR22



Arriba se ubica el ruler con el tamaño que le corresponde a cada fragmento y abajo cuanto miden; 100 es 4.13, 200 es 3.27, 300 es 2.61 y 400 es 1.87. A la par el tamaño del fragmento ubicado entre 300 y 400 pares de bases.

Anexo 15. Hoja donde se anotaba el tamaño de la banda

DNA Extraction Record

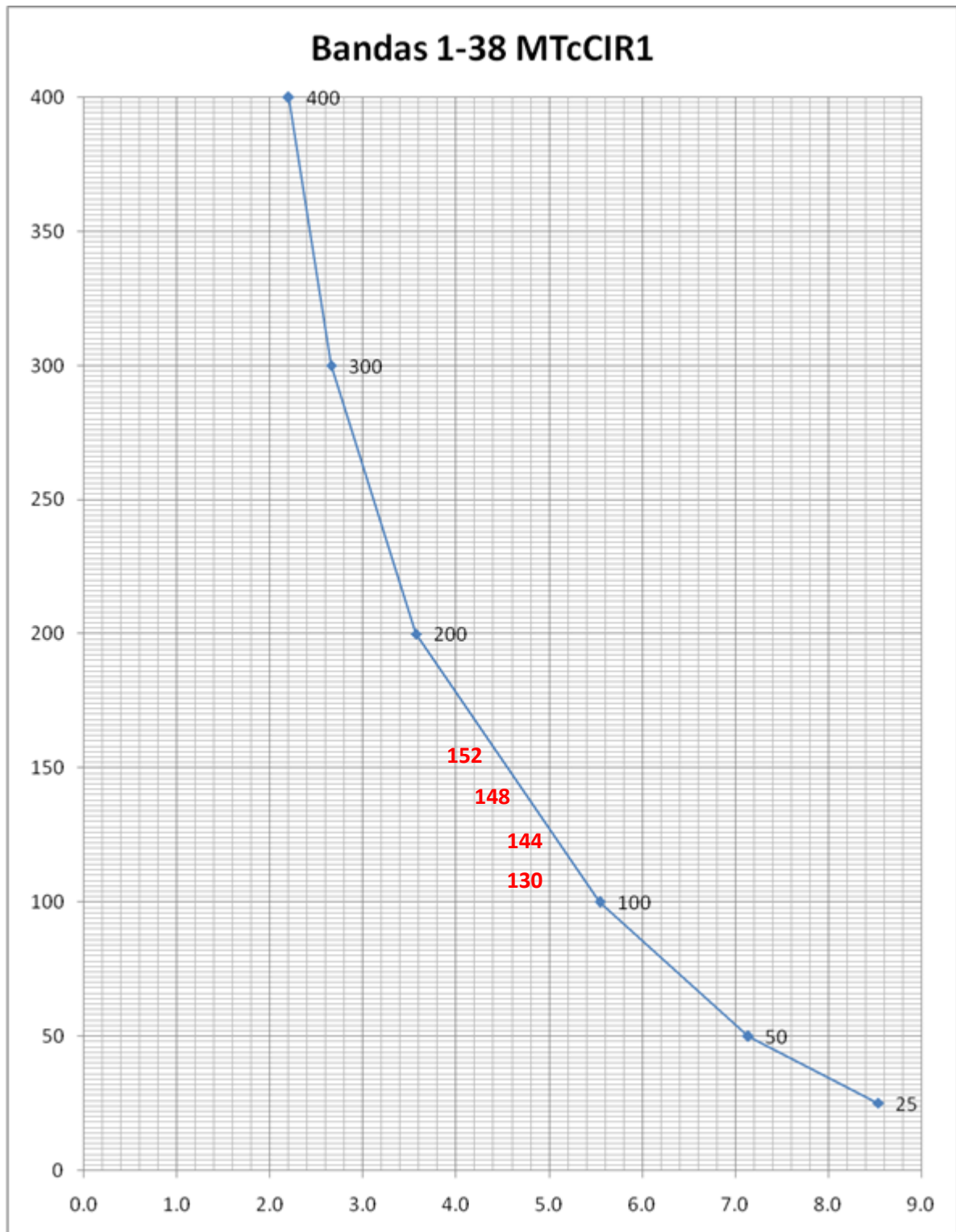
Name: Date:

Project: Color code:

Materials:

Tube #	Sample I.D.	Tube #	Sample I.D.	Tube #	Sample I.D.	Tube #	Sample I.D.
1	2.70	29	2.27	57	2.71	85	2.79 3.01
2	1.20 1.36	30		58	2.90 3.05	86	2.97
3	1.18 1.29	31	3.55	59	2.89 3.04	87	3.08
4	2.12 2.32	32	3.52	60	2.97 3.11	88	2.50 2.75
5		33	3.45 3.63	61	2.90 3.16	89	2.52 2.83
6		34	3.45 3.63	62	2.93	90	1.80 1.98
7	3.05	35	3.60	63	2.89 3	91	2.94 3.08
8		36	2.52	64	2.90 3.19	92	2.78 3.04
9		37	3.45	65	2.90	93	2.83
10		38	3.81	66	2.86	94	2.64 2.90
11		39	2.49 2.75	67	2.86 3.11	95	3.19
12		40	2.42 2.68	68	1.84	96	
13	3.15	41	2.60	69	2.60 2.86	97	3.15
14	3.30	42	2.49	70	2.60 2.86	98	3.05 3.27
15	3.08	43	2.35 2.53	71	2.68 2.90	99	2.94 3.16
16		44	2.50	72	2.78 2.93	100	3.08
17	2.97	45	2.42	73	2.83 3.04	101	2.93 3.13
18	2.72 2.94	46	2.43	74	2.79	102	3.15
19	3.41	47	2.45 2.67	75	2.83 3.04	103	3.04
20	3.63 3.96	48	1.90	76	2.82	104	3.19
21	3.99	49	2.01 2.28	77	3.11	105	3.15
22	3.99	50	2.24 2.50	78	3.16	106	3.04
23	3.99	51	2.28 2.47	79		107	1.84 1.95
24	4	52	2.70 2.85	80	2.87 3.11	108	2.93
25	4	53	2.49	81	2.89	109	1.87 2.05
26	3.69 3.92	54	2.46 2.64	82		110	2.64 2.92
27	3.92	55	1.80	83		111	2.57 2.90
28		56	2.68	84	2.83 3.08	112	3.15

Anexo 16. Gráfica exponencial logarítmica utilizada para obtener el rango de pares de bases



4.7= 152; 4.8=148; 4.9=144; 5.2=130.

Anexo 17. Distancias genéticas de Neis

Pob	Carazo	CR	HR	Jinotega	Matagalpa	RAAS	Rivas	RSJ
Carazo	****							
CR	1.4937	****						
HR	4.9681	1.4774	****					
Jinotega	1.3179	1.8600	3.0638	****				
Matagalpa	1.3177	2.0004	2.4134	1.4397	****			
RAAS	1.4785	1.7040	3.1675	2.0610	0.6370	****		
Rivas	1.8251	1.7681	2.9512	1.6308	1.7045	2.0803	****	
RSJ	0.4803	1.9492	4.3802	0.9609	1.5790	1.7276	1.6226	****

Anexo 18. Identidades Genéticas de Neis

Pob ID	Carazo	CR	HR	Jinotega	Matagalpa	RAAS	Rivas	RSJ
Carazo	****	0.2245	0.0070	0.2677	0.2677	0.2280	0.1612	0.6186
CR		****	0.2282	0.1557	0.1353	0.1820	0.1707	0.1424
HR			****	0.0467	0.0895	0.0421	0.0523	0.0125
Jinotega				****	0.2370	0.1273	0.1958	0.3825
Matagalpa					****	0.5289	0.1819	0.2062
RAAS						****	0.1249	0.1777
Rivas							****	0.1974
RSJ								****

Anexo 19. Medias y error estándar por Locus

Tamaño de la muestra (N); Numero de Alelos (Na); Número de Alelos efectivos (Ne); Índice de Shannon (I); Heterosigocidad Observada (Ho); Heterosigocidad esperada (He)

		MtcC IR1	MtcCI R18	MtcCI R22	MtCI R 11	MtcCI R 12	MTc CIR6	MTc CIR7	MTc CIR8	MTcC IR15	MTcC IR24
N	Me	13.00	12.125	10.875	12.87	12.875	11.37	12.37	10.00	9.125	10.125
	SE	4.698	4.486	4.194	4.707	4.734	4.049	4.512	3.896	4.783	4.228
N a	Me	6.375	5.375	4.125	5.750	9.250	6.875	5.125	4.875	4.750	4.625
	SE	1.499	1.413	0.972	1.098	1.698	2.100	1.202	0.972	1.236	1.133
N e	Me	4.380	3.637	2.735	4.099	6.631	4.555	3.654	3.762	3.460	3.133
	SE	1.055	0.576	0.518	0.646	1.062	1.289	0.781	0.641	0.678	0.426
I	Me	1.461	1.313	1.003	1.455	1.943	1.435	1.258	1.338	1.177	1.193
	SE	0.198	0.193	0.216	0.150	0.169	0.248	0.231	0.161	0.248	0.177
H o	Me	0.430	0.217	0.099	0.240	0.437	0.308	0.111	0.031	0.132	0.086
	SE	0.079	0.089	0.062	0.050	0.090	0.069	0.043	0.031	0.063	0.041
H e	Me	0.692	0.671	0.526	0.719	0.818	0.667	0.616	0.688	0.588	0.640
	SE	0.056	0.053	0.093	0.036	0.028	0.063	0.086	0.042	0.102	0.045

Anexo 20. Medias y error estándar total por locus de los parámetros evaluados para diversidad genética.

Tamaño de la muestra (N); Numero de Alelos (Na); Número de Alelos efectivos (Ne); Índice de Shannon (I); Heterosigocidad Observada (Ho); Heterosigocidad esperada (He)

Medias y error estándar total por Locus			Total
N	Mean		11.475
	SE		1.330
Na	Mean		5.713
	SE		0.439
Ne	Mean		4.005
	SE		0.267
I	Mean		1.357
	SE		0.066
Ho	Mean		0.209
	SE		0.025
He	Mean		0.663
	SE		0.021

Anexo 21. Medias y error estándar por Grupo

Tamaño de la muestra (N); Numero de Alelos (Na); Número de Alelos efectivos (Ne); Índice de Shannon (I); Heterosigocidad Observada (Ho); Heterosigocidad esperada (He)

Pop		N	Na	Ne	I	Ho	He
Carazo	Mean	6.000	4.000	2.968	1.132	0.300	0.601
	SE	0.000	0.537	0.353	0.142	0.092	0.062
Criollos Referencia	Mean	3.900	3.200	2.874	1.018	0.115	0.582
	SE	0.433	0.416	0.358	0.149	0.054	0.072
Híbridos Referencia	Mean	18.200	7.600	4.403	1.584	0.206	0.721
	SE	1.867	1.046	0.674	0.160	0.069	0.043
Jinotega	Mean	6.700	6.200	5.246	1.670	0.227	0.786
	SE	0.578	0.757	0.621	0.118	0.064	0.023
Matagalpa	Mean	9.500	5.200	3.429	1.388	0.086	0.691
	SE	0.500	0.416	0.292	0.084	0.028	0.024
RAAS	Mean	4.600	3.700	3.003	1.016	0.192	0.548
	SE	0.618	0.775	0.709	0.184	0.068	0.075
Rivas	Mean	3.300	2.600	2.167	0.814	0.233	0.508
	SE	0.260	0.221	0.201	0.080	0.088	0.038
RSJ	Mean	39.600	13.200	7.947	2.237	0.313	0.863
	SE	1.077	1.162	0.770	0.089	0.066	0.013

Anexo 22. Medias y error estándar total para los grupos

Medias y error estándar para los grupos							
		N	Na	Ne	I	Ho	He
Total	Media	11.475	5.713	4.005	1.357	0.209	0.663
	SE	1.330	0.439	0.267	0.066	0.025	0.021

Tamaño de la muestra (N); Numero de Alelos (Na); Número de Alelos efectivos (Ne); Índice de Shannon (I); Heterosigocidad Observada (Ho); Heterosigocidad esperada (He)

Anexo 23. Glosario

ADN (Ácido desoxirribonucleico): Base molecular de la herencia. Una molécula de ADN es un polímero de desoxinucleotidos ordenados en una doble hélice (dos hebras) de azucares fosfatados con bases purinas y pirimidinas proyectados al centro. Cada hebra se mantiene unida por enlaces fosfodiester entre los carbonos 3' y 5' de nucleótidos adyacentes.

ADN Genómico: ADN que incluye todas las secuencias de nucleótidos contenida en el genoma de un individuo. Término utilizado para referirse al ADN extraído mediante el uso de solventes (fenol) y detergentes (CTAB).

Agarosa: Polisacárido formado por galactosa alfa y beta que se extraen de las algas de los géneros Gellidium y Gracillaria. La agarosa es un producto natural que forma una matriz inerte y no tóxica que supone una herramienta indispensable en gran cantidad de técnicas de biología molecular, bioquímica y biología Celular. Su uso más extendido es para construir geles que permitan separar moléculas de ADN mediante electroforesis.

Alelo: Cada una de las formas posibles de un gen. En una célula diploide existen dos alelos de cada gen (cada uno heredero de un progenitor aunque sean idénticos). Dentro de un grupo puede haber muchos alelos de un gen.

Alelos efectivos: Número de alelos igualmente frecuentes en un grupo.

Alineamiento de iniciadores: Etapa de la PCR inmediatamente después de la desnaturalización, en la cual se baja la temperatura para permitir que los dos iniciadores se unan a las frecuencias flaqueantes del ADN por amplificar en cada una de las hebras.

Amplificación: Creación de numerosas copias de un segmento de ADN mediante PCR. Multiplicación repetida de una secuencia concreta de ADN.

Bromuro de Etidio: Análogo de bases que se intercala en forma irreversible entre las bases de las moléculas de ADN. Cuando se le excita con la luz ultravioleta emite fluorescencia de color naranja. Para teñir ADN en las geles es fluorescente cuando se le expone a la luz ultravioleta.

Cebador: Fragmentos cortos de ADN, monohebra de 10-20 bases, de secuencia aleatoria o arbitraria. Los cebadores se hibridan en aquellos sitios donde encuentran secuencias complementarias en el ADN usado como molde.

Centrifugar: Separación de las moléculas por tamaño o densidad mediante fuerzas centrifugas por el giro de un rotor.

Clon: Grupo de células o de organismos genéticamente idénticos a partir de una misma célula u organismo por reproducción asexual. Grupo de plantas genéticamente idénticas obtenidas todas ellas por propagación vegetativa de un individuo seleccionado.

Cromosoma: En las células eucariotas son los cuerpos nucleares que contienen la mayoría de los genes responsables en gran parte de la diferenciación y actividad celular.

Desnaturalización del ADN: Separación de las dos hebras que constituyen al ADN por rompimiento de los enlaces de hidrogeno entre bases complementarias. El ADN se desnatura a temperaturas superiores a 90 0C. Primera etapa de la PCR.

dNTPs (desoxinucleotidos): Nucleótidos cuya pentosa es una desoxirribosa y por ende son los monómeros del ácido desoxirribonucleico.

Diversidad genética: Variación heredable dentro y entre las poblaciones que se origina, se favorece o se mantiene por fuerzas evolutivas o selectivas.

Efecto wahlun: El Efecto de Wahlun se refiere a la reducción de heterocigosidad en una población causado por la estructura de la subpoblación. A saber, si dos o más subpoblaciones tienen diferentes frecuencias alélicas entonces la heterocigosidad total se reduce, aunque las subpoblaciones estén en Equilibrio de Hardy-Weinberg. Las causas subyacentes de esta subdivisión de la población podían ser barreras geográficas al flujo de los genes seguido por la deriva genética en las subpoblaciones. El efecto de Wahlund primero fue documentado por el genetista sueco Sten Wahlund en 1928.

Extensión del ADN: Tercera etapa en la PCR. La temperatura es elevada a 72 0C para permitir que una ADN polimerasa inicie la síntesis a partir del iniciador agregando dNTPs libres sobre la hebra que sirve de templado.

Frecuencia alélica: Número relativo de copias de un alelo en un grupo, expresado como proporción del número de copias de todos los alelos del grupo para un determinado locus.

Gen: Unidad hereditaria que contiene información genética (ADN) que es transcrita a ARN y traducida a una cadena polipeptídica (proteína). En el genoma de un organismo, una secuencia de nucleótidos a la que se le puede asignar una función específica.

Genoma: Término utilizado para referirse a todos los genes (información genética) contenida en un solo gameto, es decir un representante de cada cromosoma.

Genotipo: Constitución genética de un organismo, que estará dada por la información heredada por ambos padres. Específicamente para un solo locus, el genotipo estará dado por los alelos heredados por ambos padres.

Heterocigoto: Individuos con alelos no idénticos para un determinado gen o genes. La condición se denomina heterocigosis.

Heterocigosidad: La proporción de individuos heterocigotos para un locus o en promedio para varios locis. Es un estimador de la variabilidad genética en poblaciones naturales o domesticadas.

Iniciador (del inglés primer): Oligonucleótido (Alrededor de 20pb) de una sola hebra que se alinea (homologa) para iniciar la replicación del ADN mediante una polimerasa. Se requieren dos iniciadores (uno para cada hebra de ADN), los cuales flanquearan la región por amplificar.

Monomórfico: En una población ausencia de variación en un marcador, gen, cromosoma o carácter determinado genéticamente.

Microsatélite: Pequeña secuencia entre dos y ocho nucleótidos que se repiten en tandes al azar a lo largo del genoma, en donde el número de repeticiones revela diferencias genéticas entre los individuos. Estos pueden ser dinucleótidos, trinucleotidos y tetranucleótidos.

Marcador Molecular: Genes, proteínas o fragmentos de ADN polimórficos que permiten distinguir entre individuos, familias, poblaciones grupos o especies.

Monómero: Molécula pequeña (aminoácidos, nucleótidos) que pueden combinarse con otras idénticas o similares para formar un molécula más grande y compleja llamada polimerasa.

Nucleótido: Nucleosido (Base (purina o pirimidina) unida de forma covalente a un azúcar pentosa con uno o más grupos fosfatos unidos al hidroxilo 3' o 5' de una pentosa).

Número de alelos: Estimador de la variabilidad genética en poblaciones, se determina para cada muestra poblacional.

Polimorfismo: Variación alélica en un locus.

Polimerasa: Enzima que cataliza la formación de polímeros a partir de un monómero. Un ADN polimerasa sintetiza ADN a partir de desoxinucleotidos trifosfato utilizando una hebra complementaria de ADN y cebador.

Polimerasa Taq: ADN polimerasa termo estable aislada de la bacteria termofílica *Thermus aquaticus*, muy utilizada en PCR.

PCR (del inglés polymerase Chain Reaction) Reacción en la cadena de la polimerasa: Técnica con la que se copian las hebras complementarias de una molécula de ADN blanco simultáneamente a través de una serie de ciclos, que incluyen una desnaturalización del ADN, alineamiento de iniciadores y extensión (Síntesis) mediante una polimerasa (comúnmente Taq polimerasa).

Población: Grupo de organismos de la misma especie que habitan una determinada área geográfica y que por ende se entrecruzan y comparten un acervo común de genes.