

CARACTERIZACIÓN DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA DE CACAO NACIONAL (*Theobroma cacao* L.) EN LA REGIÓN DEL NORTE PACEÑO BOLIVIANO

Arteaga-Voigt, D.¹, Sandy-Valencia, X²., Torres-Tola, E¹., Luna-Barrón, R¹ & Chávez-Canaza, E.³

¹ Instituto de Investigaciones Técnico Científicas de la Universidad Policial (IITCUP), cingen@iitcup.org, dic@iitcup.org

² Wildlife Conservation Society (WCS), xsandy@wcs.org

³ Unidad Académica Campesina Tihuanacu (UAC-T), Universidad Católica Boliviana “San Pablo” (UCB).

RESUMEN.

Esta investigación se realizó con el objetivo de establecer la estructura genética y la relación filogenética de poblaciones de Cacao Nacional Silvestre y Cultivado de 19 zonas productoras del Norte de La Paz (Bolivia). Se analizaron nueve marcadores microsatélites tipo SSRs para caracterizar 201 genotipos, donde, el número de polimorfismos por locus fue de 4 a 13 alelos y su diversidad génica (DG) o heterocigosidad observada (Ho), como el contenido de información polimórfica (PIC), muestran patrones de distribución semejantes entre sí. Para todas las poblaciones estudiadas la He y Ho mostró un 99,98% de probabilidad de ajuste al equilibrio HW, y para la DG/He, PIC y Ho, los promedios mostraron diferencias entre las poblaciones silvestre (0,507; 0,534; 0,479; 0,558; respectivamente) y cultivadas (0,240; 0,286; 0,227; 0,258; respectivamente). El cladograma de distancias genéticas según el modelo de NJ-Slatkin (1995) para los 9 SSRs sugiere que las poblaciones de El Camba y El Paltal podrían ser los linajes más antiguos, mientras que los linajes de las poblaciones Paraíso, Don Nelo, Candelaria y San Antonio parecen ser de evolución más reciente. Se estudió también el gen inhibidor de la tripsina tipo Kunitz para analizar las relaciones filogenéticas entre las variedades, donde, los haplotipos de las muestras 145-A y 145-B de la población “El Camba” se muestran ancestrales, siendo las poblaciones cultivadas y silvestres analizadas, diferentes a las poblaciones hasta ahora estudiadas de cacao del mundo. Esta información permite tomar decisiones para incrementar la variabilidad genética de las poblaciones de *T. cacao* y potenciar características únicas de interés productivo, contribuyendo con la revalorización del cacao nacional boliviano como un recurso de importancia para la conservación de la biodiversidad y alternativa sostenible, mejorando la economía de las pequeñas familias productoras y recolectoras de la región amazónica de Bolivia.

Palabras Clave: *Cacao silvestre, Cacao cultivado, Estructura genética, Filogenia.*

ABSTRACT.

This research was conducted with the aim of establishing the genetic structure and phylogenetic relationship of populations of wild and cultivated National Cacao of 19 producing areas of northern of La Paz department (Bolivia). Nine type SSRs microsatellite markers were analyzed to characterize 201 genotypes, where the number of polymorphisms per locus ranged from 4 to 13 alleles, and genetic diversity (DG) or observed heterozygosity (Ho), such as polymorphic information content (PIC) show similar distribution patterns to each other. For all the studied populations He and Ho shown a 99.98% probability adjustment to HW equilibrium, and for DG / He, PIC and Ho, the averages showed differences between wild populations (0.507; 0.534; 0.479; 0.558; respectively) and cultivated (0.240; 0.286; 0.227; 0.258; respectively). The cladogram of genetic distances (NJ-Slatkin (1995) model) for 9 SSRs suggests that populations of the El Camba and the El Paltal could be the oldest lineages, whereas the lineages of Paraíso, Don Nelo, Candelaria and San Antonio populations seem to be more recent. The Kunitz-like trypsin inhibitor gene was also studied to analyze the phylogenetic relationships among varieties, from which, the haplotypes of samples 145-A and 145-B of "El Camba" population are ancestral, being cultivated and wild populations analyzed, different to studied cocoa populations in the world. This information allows take decisions to increase the genetic variability of populations of *T. cacao* and enhance unique characteristics of productive interest, contributing to the appreciation of the Bolivian national cocoa as an important resource for the conservation of biodiversity and sustainable alternative, improving economy of small producers and pickers families in the Amazon region of Bolivia.

Key Words: *Wild cocoa, cultivated cocoa, genetic structure, phylogeny.*

INTRODUCCIÓN.

Se ha reportado 22 especies de plantas tropicales que pertenecen al género *Theobroma*, pero solamente *Theobroma cacao* L., de la familia Sterculiaceae, presenta significativa importancia comercial (Hunter, 1990) en los bosques húmedos tropicales del mundo (Kalvatchev *et al.*, 1998). Las semillas de cacao son una fuente importante del cacao comercial: chocolate y manteca de cacao. Las semillas fermentadas son tostadas, rotas y esparcidas para dar un polvo del cual se obtiene la grasa. Este es el cacao

del cual se obtiene y se prepara la popular bebida. En la preparación del chocolate, este polvo es mezclado con azúcar, sabores artificiales, y grasa extra de cacao. Las semillas de cacao son la mayor cosecha económica del mundo tropical pero, solamente cerca del 10% por peso fresco de la fruta es comercializado, aunque varios productos comerciales promisorios pueden ser obtenidos de este fruto (Kalvatchev *et al.*, 1998).

El cacao (*Theobroma cacao* L.), que es cultivado en las áreas tropicales de Bolivia (La Paz, Beni, Pando, Santa Cruz y

Cochabamba) se encuentra también en forma silvestre en la zona de Alto Beni - La Paz, siendo considerado una de las zonas con principales actividades agrícolas, con una producción de 1000 toneladas/año y constituye el 13 % de los ingresos de los hogares Alto Benianos (July 2002; Somarriba y Trujillo 2005; Miranda y Somarriba 2005). En nuestro territorio, al cacao local se le conoce internamente como “Cacao Nacional Boliviano” o “cacao criollo”, aunque no debe confundirse este nombre con el grupo genético de los criollos, pues se trata más bien de un cacao Forastero, cuyas características lo distinguen de otros genotipos, donde su relación genética con los otros Forasteros (aunque se le ha vinculado con ciertos genotipos brasileños) es desconocida (July, 2007).

El mejoramiento genético asistido por los marcadores moleculares como los microsatélites tipo SSRs (Repeticiones de Secuencias Simples), permiten solucionar problemas actuales de los cultivos, proporcionando nuevas alternativas de producción. Estos marcadores moleculares se caracterizan por estar ampliamente distribuidos en todo el genoma, tener herencia mendeliana y no estar influenciados por el medio ambiente, por lo cual resultan adecuados para su utilización en la identificación varietal de especies y la caracterización de la diversidad genética (Londoño *et al.*, 2011). Los SSRs son marcadores moleculares altamente polimórficos, y su característica de ser codominantes los potencia como una herramienta muy poderosa para generar una identificación

confiable de organismos y permitir una evaluación adecuada de la diversidad genética (Tolares *et al.*, 2005; Londoño *et al.*, 2011).

Por otro lado, el gen inhibidor de tripsina permite investigar la filogenia entre las diferentes variedades de *T. cacao*. Este gen de 21 kDa, es el constituyente principal de la semilla de cacao en la fracción de albumina (Sosua Silva & Figueira, 2005). Su característica informativa de cDNA permite observar la taxonomía y filogenia de *T. cacao* en el contexto mundial.

Por tanto, la presente investigación pretende establecer la estructura genética y la relación filogenética de las poblaciones de cacao silvestre y cultivado del Norte Paceño, determinando la variabilidad, diversidad genética y heterocigosidad dentro y entre las poblaciones de estudio, a través de nueve marcadores microsatélites, a la vez de conocer su poder de discriminación y nivel de polimorfismo, estableciendo, finalmente, sus relaciones filogenéticas a través del gen inhibidor de la tripsina tipo Kunitz. De esta manera, se pretende generar información complementaria en la elaboración de documentos técnicos que sirvan como base para una buena toma de decisiones respecto a la conservación y manejo sostenible del cacao. Además de revalorizar el cacao nacional boliviano como un recurso de importancia para la conservación de la biodiversidad y alternativa sostenible, mejorando la economía de las pequeñas familias productoras y recolectoras de la región amazónica de Bolivia.

METODOLOGÍA.

Análisis Genético.

Se analizaron 201 muestras de tejido de vegetal de *T. cacao*, secándolas en sílica gel. Luego se procedió a la pulverización, prosiguiendo con la adición de buffer CTAB al 2% (20 g de CTAB, 10 g de PVP, 100 ml de 1M Tris-Cl pH 8,0, 40 ml de 0,5 M EDTA pH 8,0, 280 ml de 5 M NaCl) precalentado a 65°C, según Borsch *et al.* (2003). La calidad del ADN recuperado se verificó por electroforesis en gel de

agarosa al 1%, cuantificando luego por espectrofotometría a 260, 280 y 320 nm.

La amplificación de SSR específicos se realizó según Lambert *et al.* (2008), considerándose los sistemas A, B y C (Tabla 1).

Los cebadores para el gen inhibidor de tripsina de 21 kDa, se diseñaron según la secuencia disponible de ADNc (666 pb) de *T. cacao* (GenBank X56509.1), publicada por McHenry y Fritz (1992), para amplificar un fragmento de 465 pb.

Tabla 1: SSRs utilizados en la caracterización de la estructura genética de *T. cacao*.

Locus	Secuencias de pares de cebadores	Motivo repetición	Fluoróf.	Tamaño de Alelos (pb)
Sistema A				
CIR26	GCATTCATC AATACATTC GCACTCAAAGTTCATACTAC	(CT) ₉ C(CT) ₄ TT(CT) ₁₁	VIC	272-308
CIR57	TGTAGATGTGATTTTATAGTTTG GGAGGGATA AGAAGCAG	(AC) ₁₃	PET	247-257
CIR243	ACAGCAGTAGACGCATTC AAAAGGCT TGGCACAG	(CT) ₉ N ₂₀ (CA) ₁₁	FAM	125-141
Sistema B				
CIR15	CAGCCGCC TCTTGTTAG TATTTGGGA TTCTTGATG	(CT) ₁₉	FAM	232-260
CIR42	TTGCTGAAGT ATCTTTTGAC GCTCCACC CCTATTTG	(CA) ₂₁	NED	202-238
CIR244	TGGCAATAACAATGAACA ATTTTGATGATTGATGAAGA	(TA) ₄ CATA (CA) ₁₇ (TA) ₄	PET	240-270
Sistema C				
CIR12	TCTGACCCC AACCTGTA ATTCCAGTT AAAGCACAT	(CATA) ₄ N ₁₈	NED	164 – 216
CIR33	TGGGTTGA AGATTTGGT CAACAATGA AAATAGGCA	(GT) ₁₁	FAM	273-347
CIR37	CTGGGTGCT GATAGATAA AATACCCTC CACACAAAT	(GT) ₁₅	VIC	134-178

Análisis estadísticos.

La valoración estadística se realizó utilizando los programas bioinformáticos “PowerMarker v3.0” (Jack Liu, 2004), Arlequin 3.1 (Excoffier, 2007) y “Cervus

v3.0.7”. (Kalinowski *et al.*, 2007). Las secuencias se alinearon con el programa “Sequencing Analysis Software 6” (Applied Biosystems), empleando el modelo matemático “Kimura 2-Parámetros” (Kumur & Nei, 2000) e

inferencia de “Neighbor-Joining (NJ)” descrita por Saitou & Nei (1987), con un bootstrap de 1000 réplicas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Estructura Genética.

A partir de las hojas de cacao, se obtuvieron 201 extractos de ADN en calidad y cantidad suficiente para realizar la subsecuente amplificación de los fragmentos a analizar. Así, se observa que en poblaciones con equilibrio HW significativo, tanto la diversidad génica (DG) o heterocigosidad observada (Ho) como el contenido de información polimórfica (PIC) muestran patrones de distribución semejantes entre sí, para marcadores moleculares tipo SSR, con

valores ligeramente menores para PIC en relación a DG. Entre los 9 marcadores SSR estudiados en las poblaciones de cacao (Tabla 2), CIR12, CIR37 y CIR244 comparten elevada diversidad (mayor o igual a 0,7), mientras que CIR26, CIR42, y CIR243 exponen niveles por debajo del 50% (0,5), y CIR15, CIR33 y CIR57 poseen DG intermedia entre ambos grupos. El análisis chi-cuadrado (Tabla 2) para la heterocigosidad esperada (He) y observada (Ho) con los 9 marcadores SSR estudiados (Figura 1) sugiere un 99,98% de probabilidad de ajuste al equilibrio HW, aunque el índice de Ho sea 0,171 menor a la He, lo cual sugiere la presencia e incidencia de factores indeterminados de selección dentro de las poblaciones, que pueden apreciarse mejor en la Tabla 3.

Tabla 2: Estructura génica intrapoblacional por marcador molecular en *T. cacao* L. nacional y silvestre boliviano del norte de La Paz, Bolivia (DG = Diversidad Génica, PIC = Contenido de Información Polimórfica, Ho = Heterocigosidad Observada, He = Heterocigosidad Esperada).

Locus	Genotipo	Alelo	DG	PIC	Ho	He
mTcCIR12	34	12	0,763	0,74	0,517	0,767
mTcCIR15	20	11	0,671	0,619	0,517	0,675
mTcCIR26	11	7	0,423	0,401	0,303	0,426
mTcCIR33	20	11	0,566	0,506	0,408	0,57
mTcCIR37	30	13	0,687	0,657	0,512	0,691
mTcCIR42	9	8	0,433	0,356	0,224	0,435
mTcCIR57	12	9	0,573	0,489	0,338	0,577
mTcCIR243	7	4	0,424	0,366	0,308	0,426
mTcCIR244	36	17	0,815	0,793	0,65	0,819
					0,426	0,598
0,999850454						

La Tabla 3 muestra comparativamente la DG/He, PIC y Ho para todas las poblaciones estudiadas. Los promedios

muestran clara diferencia entre las poblaciones silvestres y cultivadas, mostrando a las primeras más polimórficas

con más del doble de intensidad promedio. Asimismo, las poblaciones silvestres parecen más cercanas al equilibrio HW que las cultivadas; especial atención debe ponerse a las cultivadas de “Villa Alcira” y “Chavarría”, pues su elevado PIC las propone como silvestres en reciente proceso de domesticación, mientras que “Tutilimundi”, “Candelaria” y “Michiplaya” exponen signos del efecto de

selectividad, probablemente de origen humano. Entre las poblaciones silvestres, la baja DG de “Don Nelo” y de “Esperanza del Madidi” sugiere la presencia de presión selectiva, mientras que “Isla de Oro”, “Ojaki” y “Paltal” se muestran no solo más polimórficas, sino también más próximas al equilibrio y, probablemente, mejor conservadas en su estructura génica nativa.

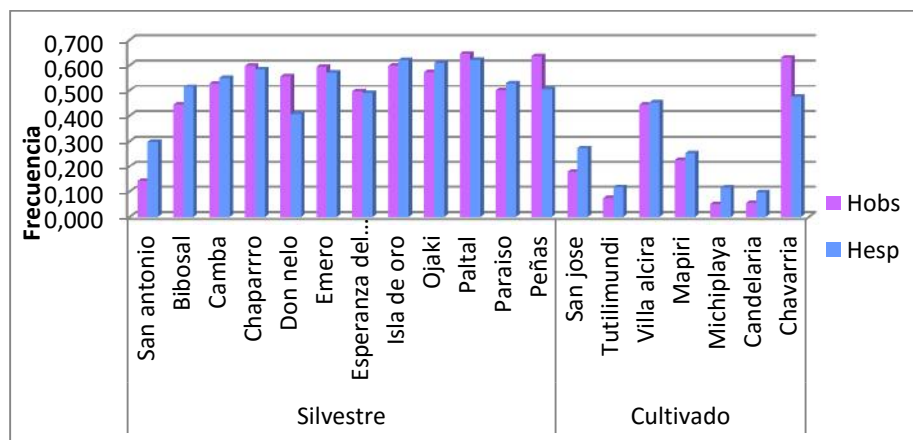


Figura 1: Heterocigosidad observada y esperada en las poblaciones estudiadas.

Las frecuencias alélicas y génicas de los 9 microsatélites estudiados cotejadas con la información de la Tabla 2, permiten una interpretación más precisa de las propiedades de cada microsatélite. Así, los SSR CIR12, CIR27 y CIR244 han mostrado ser informativos para estudios de genética poblacional con *T. cacao*, por lo que para futuros estudios similares podrían excluirse los marcadores CIR26, CIR42 y CIR243, sin perder profundidad en la información poblacional. Por otro lado, las características génicas del sistema de 9 SSR indican que estos podrían emplearse para pruebas de parentesco genético a nivel de individuo. Esto lo demuestra el poder de discriminación calculado de

75.17% (es decir que, de una muestra de 100, 2 de cada 75 no comparten el mismo par de alelos) y la probabilidad de coincidencia de 24.88%. Sin embargo, para esta específica aplicación deberán emplearse los 9 SSR considerando, incluso, incrementar su número.

El índice general de fijación (F_{st}) de 0,262 sugiere un 73,8 % de entrecruzamiento entre poblaciones mientras que el índice de estimación de endogamia (F_{is}) propone a la población Mapiri como significativamente afectada por este factor, seguida de Emero, Ojaki y Chaparro (Tabla 4).

Tabla 3: Estructura génica inter-poblacional de *T. cacao* L. en 8 poblaciones de cacao cultivado y 11 de cacao silvestre del norte de La Paz (DG = Diversidad Génica, PIC = Contenido de Información Polimórfica. Ho = Heterocigosidad Observada, He = Heterocigosidad Esperada).

Variedad	Población	Nº	Genotipo	Alelo	DG	PIC	Ho	He
SILVESTRE	Bibosal	11	4	4	0,466	0,437	0,434	0,492
	Camba	8	5	4	0,495	0,480	0,528	0,530
	Chaparro	13	5	4	0,541	0,508	0,590	0,562
	Don Nelo	4	2	3	0,368	0,356	0,556	0,406
	Emero	17	6	4	0,554	0,527	0,595	0,571
	Esperanza del Madidi	15	4	3	0,448	0,410	0,489	0,464
	Isla de Oro	18	7	4	0,598	0,559	0,599	0,617
	Ojaki	14	5	4	0,575	0,531	0,571	0,598
	Paltal	10	5	4	0,567	0,527	0,622	0,592
	Paraíso	7	4	4	0,496	0,486	0,524	0,539
	Peñas	7	3	3	0,472	0,443	0,635	0,501
Promedio y Chi-cuadrado					0,507	0,479	0,99999997	
CULTIVADO	San José	15	3	3	0,211	0,198	0,163	0,22
	Tutilimundi	3	1	1	0,088	0,098	0,074	0,117
	Villa Alcira	8	4	4	0,415	0,41	0,417	0,446
	San Antonio	14	3	3	0,285	0,265	0,151	0,299
	Candelaria	2	1	1	0,06	0,076	0,056	0,097
	Chavarria	3	2	3	0,475	0,412	0,63	0,475
	Mapiri	17	4	3	0,264	0,249	0,239	0,274
	Michiplaya	15	2	2	0,118	0,111	0,052	0,125
Promedio y Chi-cuadrado					0,240	0,227	0,999964759	

Filogenia.

En las figuras 2 y 3 observamos a partir del análisis de microsatélites el vínculo genético a corto plazo entre las poblaciones e individuos estudiados mientras que las figuras 4 y 5 presentan las relaciones filogenéticas identificadas a partir del gen de la tripsina considerando la relación con otras variedades de *Theobroma cacao* del mundo.

El cladograma de distancias genéticas según el modelo NJ-Slatkin (1995) para los 9 SSR estudiados (Figura 2), sugiere a las poblaciones “Emero” y “El Camba” como parentales en relación a las demás

estudiadas, excepto “El Paltal” que se muestra perteneciente a un linaje único y no emparentado con el resto. Las poblaciones “Isla de Oro”, “Peñas” y “Bibosal”, “Chaparro”, y “Ojaki” y “Esperanza del Madidi” conforman los cuatro clados más antiguos, de los que probablemente derivaron “Paraíso” y “Don Nelo” en un linaje, y “Candelaria”, “San Antonio”, “Chavarria”, “Tutilimundi”, “Mapiri”, “San José”, “Michiplaya” y “Villa Alcira” por otro.

Los linajes de las poblaciones “Paraíso”, “Don Nelo”, “Candelaria” y “San Antonio” parecen ser los de evolución o aparición más reciente, mientras que

“Emero”, “El Camba” y “El Paltal” parecen ser los linajes más antiguos.

Tabla 4: Estadísticos “F” de la estructura génica por población (Fis = deficiencia o exceso de heterocigosidad media de cada población, Fst = índice de fijación o diferenciación genética entre poblaciones, Fit = deficiencia o exceso de heterocigotos promedio en un grupo de poblaciones).

POBLACIÓN	Fit	Fis	Fst
San Antonio	0,008	0,026	0,262
Bibosal	0,02	0,027	
Camba	0,017	0,019	
Candelaria		0,001	
Chavarria	0,008	0,004	
Chaparro	0,032	0,03	
Don Nelo	0,009	0,004	
Emero	0,042	0,038	
Esperanza del Madidi	0,031	0,03	
Mapiri	0,044	0,048	
Michiplaya	0,015	0,018	
Isla de oro	0,003	0,011	
Ojaki	0,033	0,037	
Paltal	0,027	0,025	
Paraíso	0,017	0,018	
Peñas	0,018	0,011	
San José	0,011	0,023	
Tutilimundi	0,001	0,002	
Villa Alcira	0,015	0,015	

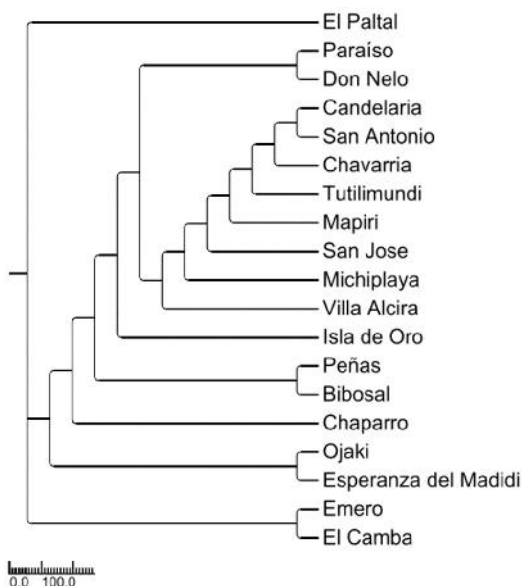
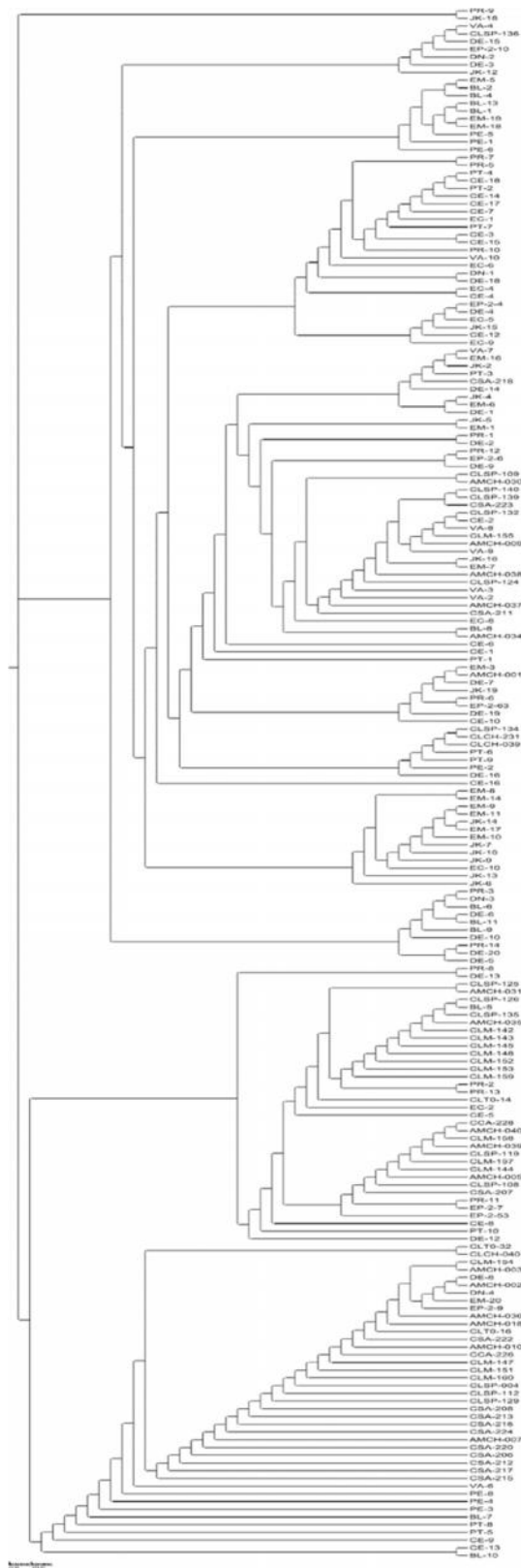


Figura 1: Cladograma de poblaciones silvestres y cultivadas de *Theobroma cacao* del Norte de

La Paz en base al análisis de microsatélites según el modelo de NJ-Slatkin (1995).

El cladograma de la figura 3, elaborado con los genotipos de los 201 especímenes por separado, muestra la agrupación de los mismos en al menos 13 linajes consanguíneos de *T. cacao* dentro de las 19 poblaciones estudiadas, mientras que en la figura 14, que emplea como grupo externo a *T. grandiflorum*, se muestra una distribución más homogénea, lo que es expectable ya que la evolución génica al nivel de secuencia es mucho más lenta y, por tanto, permite apreciar con más precisión las relaciones evolutivas entre poblaciones. Es así que las secuencias 145-A y 145-B de la población “El Camba” se muestran ancestrales en relación al resto, en contraste a lo sugerido por el análisis de SSRs para la población “El Paltal”. En este sentido, no debe olvidarse que la evolución de estos dos sistemas es muy distinta, y que se emplean para responder preguntas de investigación diferentes.

Los SSR proveen información sobre el parentesco genético por individuo, linaje y población, mientras que las secuencias del gen inhibidor de la tripsina sobre la evolución de las poblaciones y la especie. Esto último es evidente en la figura 4 si consideramos la proximidad y agrupación de las poblaciones entre sí, y mucho más evidente en la figura 5, donde todas las poblaciones estudiadas conforman un clado distante a los existentes de *T. cacao* en la base de datos GenBank, lo que sugiere incluso considerar la posibilidad de una nueva sub-especie (Figura 5).



POBLACION	INICIAL DEL CÓDIGO
San Jose	CLSP
San Antonio	CSA
Michiplaya	CLM
Candelari	CCA
Chavarria	CLCH
Tutilimundi	CLTO
Mapi	AMCH
Villa Alcira	VA
Paraiso	EP
El Paltal	PT
Don Nelo	DN
Chaparro	PR
El Camba	EC
Emero	CE
Peñas	PE
Ojaki	JK
Esperanza	EM
Isla de Oro	DE
Bibosal	BL

Figura 2: Cladograma de poblaciones de *Theobroma cacao* del Norte de La Paz por individuo (n=201) según NJ-Slatkin (1995).

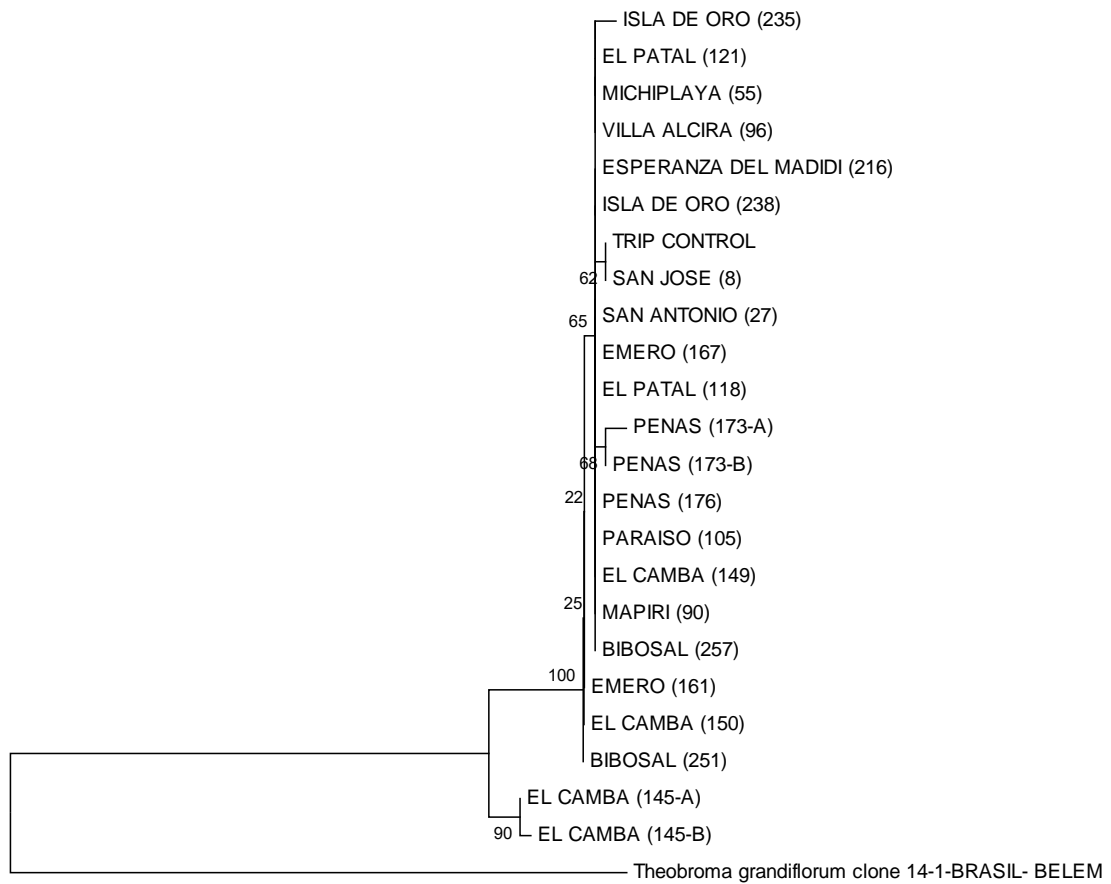


Figura 3: Árbol filogenético de poblaciones de *Theobroma cacao* del norte de La Paz en base a secuencias del gen inhibidor de la tripsina y el modelo NJ-Tamura y Nei (1993).

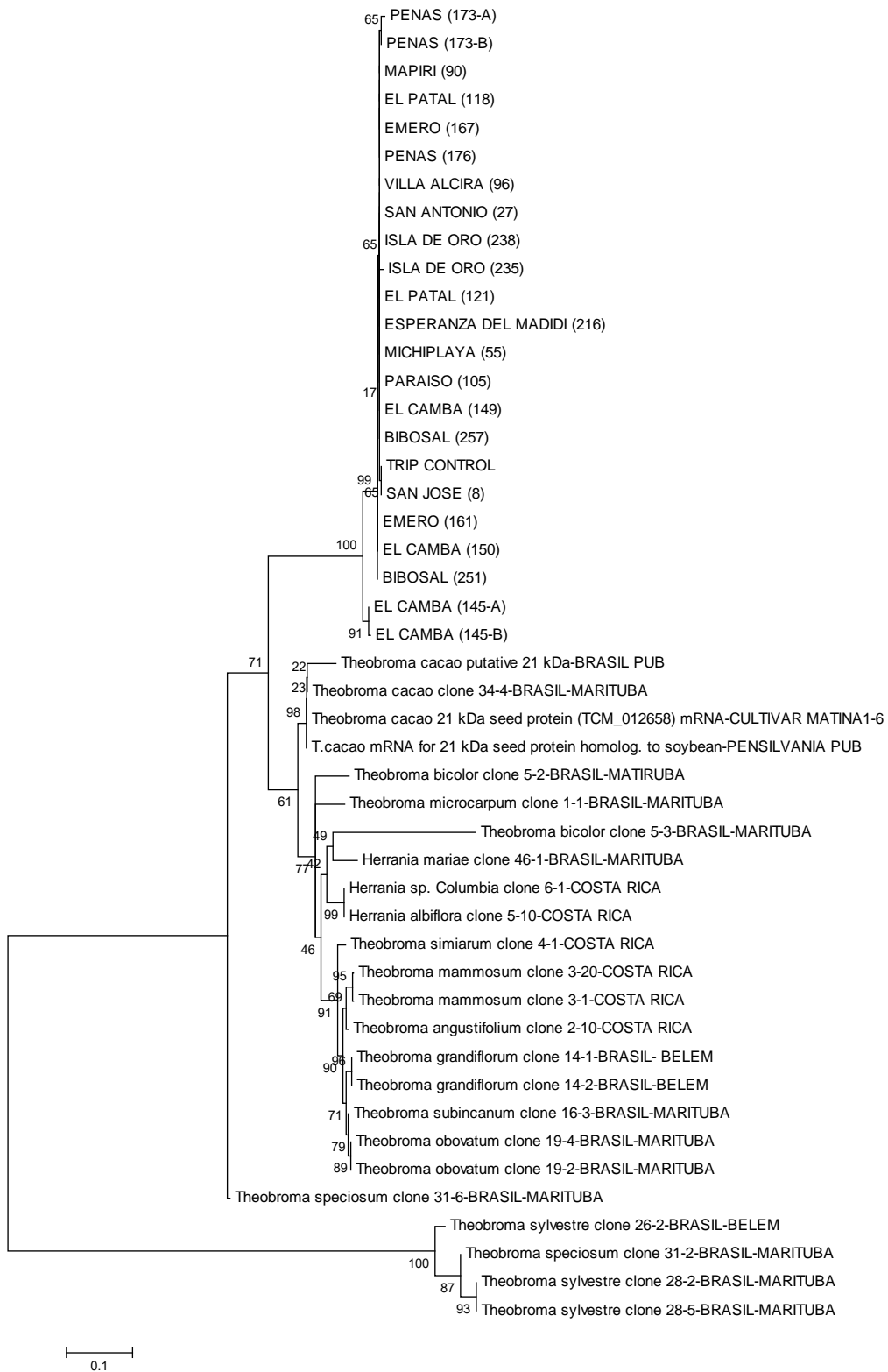


Figura 4: Árbol filogenético de las poblaciones de *Theobroma cacao* del Norte de La Paz y poblaciones del mundo en base al modelo NJ-Tamura y Nei (1993).

CONCLUSIONES.

Los resultados encontrados en la presente investigación sugieren una marcada diferencia en la diversidad genética entre las poblaciones silvestres y cultivadas de cacao del norte paceño, siendo significativamente mayor en las poblaciones silvestres, tendencia que se observa también para el Contenido de Información Polimórfica (PIC), mostrando mayor diversidad alélica y genotipos diferenciados, acercándose al equilibrio HW. Así, poblaciones como “Villa Alcira” y “Chavarría” podrían estar atravesando un proceso reciente de domesticación. Por otro lado, las poblaciones de “Isla de Oro”, “Ojaki” y “Paltal” parecen estar mejor conservadas en su estructura génica nativa. Sin embargo, a pesar de estos resultados, la diferenciación genética entre las poblaciones es poco significativa ($F_{st} = 0,62$). Esto, en suma a los cladogramas obtenidos a partir del análisis de los 9 microsatélites estudiados y la filogenia observada en relación a otras especies de *Theobroma* y variedades de *T. cacao* del mundo, sugiere que estas variedades se han propagado a partir de una planta común. Así, las poblaciones “El Camba” y “El Paltal” podrían ser los linajes más antiguos, mientras que los linajes de las poblaciones “Paraíso”, “Don Nelo”, “Candelaria” y “San Antonio” los más recientes. Por otro lado, el análisis del gen de inhibidor de la tripsina tipo Kunitz sugiere la posibilidad de que las poblaciones de cacao del norte paceño correspondan a una nueva sub-especie.

En Bolivia, los estudios de la estructura genética y filogenia de *T. cacao* son escasos (July, 2002; July 2007), por lo que es importante desarrollar estudios sobre la estructura genética, la caracterización del germoplasma y la filogenia de esta especie con el fin de contribuir a un mejor entendimiento de su origen y variabilidad genética en nuestro país. Además, los resultados promueven la conservación y manejo sostenible de esos recursos genéticos de manera que se tomen decisiones para incrementar la variabilidad genética de *T. cacao* y potenciar características únicas de interés productivo, contribuyendo con la revalorización del cacao nacional boliviano como un recurso de importancia para la conservación de la biodiversidad, mejorando la economía de las pequeñas familias productoras y recolectoras de la región amazónica de Bolivia.

AGRADECIMIENTOS.

Agradecemos a Wildlife Conservation Society (WCS) Bolivia y a la Ing. Ximena Sandy Valencia, Coordinadora del Proyecto “Caracterización morfológica y genética de *Theobroma cacao* L. en el Norte Paceño” por haber confiado en la capacidad científica del Centro de Investigación Genética (CINGEN) del Instituto de Investigaciones Técnico Científicas de la Universidad Policial (IITCUP) para desarrollar conjuntamente este proyecto.

REFERENCIAS.

- Bazoberry, O. & Salazar, C. 2008. El cacao en Bolivia: Una alternativa económica de base campesina indígena. CIPCA. La Paz –Bolivia.
- Borsch, T.; Hilv, K.; Quandt, D.; Wilde, V., Neinhuis, C. & Barthlott, W. 2003. Non-coding plastid trnT-trnF sequences reveal a well-supported phylogeny of basal angiosperms. *Journal of Evolutionary Biology*, 16: 558 – 576.
- Excoffier Laurent. 2007. An Integrated Software for Population Genetics Data Analysis., CMPG, Institute of Ecology and Evolution, University of Bern.
- Chia, J. 2009. Caracterización molecular mediante marcadores ISSR de una colección de 50 árboles clonales e híbridos de cacao (*Theobroma cacao* L.) de la UNAS-Tingo Maria. (Tesis de Maestría). UNAS, Tingo Maria, PR.
- Kalinowski, S. T., Taper, M. L. & Marshall, T. C. 2007. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology* 16: 1099-1106. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-294x.2007.03089.x>
- July, W. 2002. Comportamiento de estacas de tres variedades de cacao (*Theobroma cacao* L.) a tres tratamientos de fitohormonas en la región de Alto Beni. Tesis Ingeniero Agrónomo. UMSA, La Paz BO 98 p.
- July, W. 2007. Caracterización morfológica y molecular del Cacao Nacional Boliviano y de selecciones élites del Alto Beni, Bolivia. Tesis de maestría.
- Kalvatchev, Z, Garzaro, D y Guerra, C. F..1998. *Theobroma cacao* L.: Un nuevo enfoque para la nutrición y salud. Agroalimentaria. No 6.
- Helvetas Swiss Intercooperation /WCS, 2011. Proyecto “Apoyo a la cadena de cacao de calidad en el norte paceño tropical”. La Paz, Bolivia.
- Hunter, J. R. 1990. The status of cacao (*Theobroma cacao*, Sterculiaceae) in the Western hemisphere. *Economic Botany* 44, 4:425-439.
- Lambert, A.; Dapeng, Z.; Pathmanathan, U.; Mischke, S.; Michel, B. & Stephen, P. 2009. Increasing Accuracy and Throughput in Large-Scale Microsatellite Fingerprinting of Cacao Field Germplasm Collections. *Tropical Plant Biology* 2: 23 – 37.
- Londoño, M. L., Gil, V. D. M., Aguilar, M. S. B., Rivera, P. F. & López, G. G. 2011. Caracterización molecular de clones de *Theobroma Cacao* L., por medio de marcadores moleculares microsatélites. *Luna Azul* ISSN 1909-2474. No. 32, enero - junio 2011.
- Miranda, M & Somarriba, E. 2005. Evaluación agronómica de las plantaciones de cacao injertado de productores de la Central de Cooperativas El Ceibo, Alto Beni, Bolivia. In *Agroforestería en las Américas* no.43-44: 62-65.

- Somarriba, E. & Trujillo, L. 2005. El Proyecto “Modernización de la cacao cultura orgánica del Alto Beni, Bolivia”. In *Agroforestería en las Américas* no.43-44: 6-13.
- Sosua Silva, C. R., & Figueira, A. 2005. Phylogenetic analysis of *Theobroma* (Sterculiaceae) based on Kunitz-like trypsin inhibitor sequences. *Plant Syst. Evol.* 250: 93–104 (2005) DOI 10.1007/s00606-004-0223-2.
- Tolares, S., Marcucci, P. & Harrond, L.. 2005. Identificación genética de clones en *Eucalyptus grandis* utilizando Microsatélites. Instituto de Recursos Biológicos CNIA, INTA Castelar.