

## Diversidad molecular de una población de cocoteros en la región de Baracoa

Maruchi Alonso Esquivel<sup>1\*</sup>, Jorge R. Cueto Rodríguez<sup>1</sup>, Yusniel Santos Rodríguez<sup>2</sup>, W. Romero<sup>3</sup>, Raixa Llauger Riverón<sup>1</sup>, Maribel Rodríguez<sup>1</sup>, Wolfgang Rohde<sup>4</sup>. \*Autor para correspondencia.

<sup>1</sup>Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical. Ave. 7ma. No. 3005 entre 30 y 32, Miramar, Playa. Ciudad de La Habana. Cuba, CP 11 300. e-mail: mejoramiento@iift.cu

<sup>2</sup>Facultad de Biología, Universidad de La Habana. Cuba.

<sup>3</sup>Empresa de Coco Baracoa, Guantánamo. Cuba.

<sup>4</sup>Max-Planck Institut für Züchtungsorschung (MPIZ), Carl-von-Linné-Weg 10, 50829, Köln, Germany.e-mail: rohde@mpiz-koeln.mpg.de

### RESUMEN

Se realizó la caracterización molecular de 37 ecotipos de cocoteros (*Cocos nucifera* L.) pertenecientes a una población natural del municipio de Baracoa, provincia Guantánamo empleando la técnica Repetición de Secuencias Inversas Marcadas (ISTR). El análisis molecular ISTR detectó un polimorfismo del 93%, demostrando la potencialidad de este marcador para realizar estudios de diversidad molecular en el cocotero. El porcentaje de identificación fue alto ( $P_i=86\%$ ), lo cual sugiere que las combinaciones de oligonucleótidos empleadas pudieran ser utilizadas para estudios de identificación de ecotipos en poblaciones de cocotero de la zona de Baracoa. La evaluación de la diversidad en los diferentes ecotipos de cocoteros mediante marcadores ISTR mostró que se cuenta con un nivel de variabilidad bajo dentro de la población estudiada. Esto pudiera deberse a que durante el proceso de surgimiento de las poblaciones de cocoteros en dicha zona, se introdujeron cocoteros que involucraron un número de semillas relativamente pequeño o, materiales procedentes de poblaciones con baja diversidad.

Palabras clave: marcadores moleculares, polimorfismo, variabilidad

### ABSTRACT

Molecular characterization of 37 coconut (*Cocos nucifera* L.) ecotypes from a natural population of Baracoa municipality, Guantánamo province, was carried out by using Inverse Sequence Tagged Repeat (ISTR) technique. This method was able to detect the high polymorphism (93%) of the evaluated population showing its usefulness for studies on molecular diversity in coconut. The identification percentage was also relatively high ( $P_i=86\%$ ) suggesting that the selected primer combinations could be used for the ecotype identification studies on coconut populations of Baracoa. Evaluation of the diversity in different coconut ecotypes by means of ISTR markers showed a low level of variability within the population studied in Baracoa region. These data suggest that coconut populations in this zone have been originated from coconuts with a relatively small quantity of seeds or even from introduced materials from populations of low diversity.

Key words: molecular markers, polymorphism, variability

### INTRODUCCIÓN

El cocotero (*Cocos nucifera* L.) se distribuye, principalmente en las áreas tropicales, donde es cultivado para la obtención de aceite y agua (Zizumbo-Villareal *et al.*, 2006). En Cuba, el cultivo del cocotero representa el 13% de la estructura de la producción de frutales, existe un programa de desarrollo de la agroindustria nacional, donde se replanta en la principal región productora de coco del país (Baracoa) y se incrementa su desarrollo en zonas de interés turístico y áreas ociosas (Cueto *et al.*, 2004).

Las condiciones ecológicas, culturales y sociales en dicha zona han favorecido la incorporación de un

gran número de plantas originadas en otras regiones del mundo, generándose nuevos sistemas de cultivo. El proceso de introducción y asimilación ha sido favorecido por los propios agricultores, cuyo sistemas agrícolas han estado basados en parte, en la selección y el manejo de esa diversidad de plantas (Cueto, 1987). Por otra parte, la polinización cruzada que presenta esta especie ha favorecido la hibridación entre muchas generaciones a lo largo del tiempo, lo que ha dificultando la distinción de tipos originales.

Los esfuerzos que se realizan para el estudio de la variabilidad genética en el cocotero demandan del empleo de herramientas más efectivas y novedosas. Las técnicas de marcadores de ácido desoxirribonucleico (ADN) están siendo utilizadas

para la identificación, caracterización y evaluación de la diversidad genética en este cultivo (Rohde *et al.*, 1999). Dichas técnicas son usadas para generar marcadores que complementan a los marcadores morfológicos tradicionales y se conoce que son independientes de las influencias ambientales y que detectan un número mayor de polimorfismos.

Un aspecto importante lo constituye la selección del tipo de marcador que se empleará. Dicha elección dependerá del objetivo del estudio que se pretende abordar y de la biología de la especie. Sin embargo, no se puede olvidar que todas las técnicas moleculares presentan ventajas y limitaciones y su aplicación dependerá, en última instancia, de la disponibilidad de recursos para ejecutar un sistema de marcadores moleculares dado (Coto, 2005).

Las técnicas de Polimorfismo del ADN Amplificado al Azar (RADP, del inglés: *Random Amplified Polymorphism*) (Ashburner *et al.*, 1997; Manimekhalai y Nagarajan, 2006b) y de Polimorfismo de Longitud de Fragmentos Restringidos (RFLP, del inglés: *Restriction Fragment Length Polymorphism*) (Lebrun *et al.*, 1998; Teulat *et al.*, 2000) fueron aplicadas en cocotero mostrando ser adecuadas para la identificación de poblaciones próximas, comportamiento de híbridos y evaluación de la distancia genética entre cocoteros de las diferentes regiones del mundo. Asimismo, el empleo de los microsátelites (SSR, del inglés: *Simple Sequence Repeat*) son consideradas técnicas apropiadas para detectar y cuantificar la variabilidad genética en dicha especie (Rivera *et al.*, 1999; Perera *et al.*, 2003), construcción de mapas de ligamiento (Rohde *et al.*, 1999), estrategias de selección asistida por marcadores (Kameswara, 2004) diagnóstico de enfermedades (Hodgson *et al.*, 1998), identificación de especies y estudios de genética de poblaciones (Zizumbo-Villareal *et al.*, 2006).

En este sentido, el análisis de la Repetición de Secuencias Inversas Marcadas (ISTR, del inglés: *Inverse Sequence Tagged Repeat*) es una técnica basada en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, del inglés: *Polymerase Chain reaction*) aplicable a genomas de animales, plantas y microorganismos (Rohde, 1996). Se ha demostrado que el polimorfismo detectado mediante ISTR ha sido de utilidad para estudios de diversidad genética y mapeo genético en coco (Rohde *et al.*, 1995, 1999; Duran *et al.*, 1997), mango (*Mangifera indica* L.) (Capote *et al.*, 2003), aguacate (*Persea americana* Mill.) (Ramírez *et al.*, 2003) y ha sido recomendado para la certificación de variedades de cereales (Donini *et al.*, 1999).

Considerando la utilidad de las técnicas moleculares para estudios de diversidad en frutales tropicales, el presente trabajo tuvo como objetivo evaluar la variabilidad genética entre ecotipos de cocoteros

pertenecientes a una población de la región de Baracoa mediante el polimorfismo detectado por los ISTR.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Área de estudio

El estudio fue realizado en el municipio de Baracoa, que está situado al norte de la provincia de Guantánamo, próximo al extremo oriental de la isla de Cuba y limitada al Norte con el Océano Atlántico. Esta localidad se encuentra ubicada en los 20° 35' latitud norte y los -74° 5' de longitud oeste.

### Material vegetal

Se realizó una exploración detallada de la región de Baracoa y se seleccionaron 37 ecotipos de cocoteros (*Cocos nucifera* L.) perteneciente a una población natural de dicha zona. Cada ecotipo es un individuo (planta) considerado como descendientes de antiguas introducciones u obtenidos del proceso de polinización cruzada presente en la especie (Tabla 1).

### Análisis de diversidad genética mediante ISTR

Para el aislamiento del ADN se utilizó la metodología basada en el uso de CTAB (bromuro de hexadeciltrimetilamonio) descrito por Doyle y Doyle (1990) con modificaciones según Rohde *et al.* (1995).

Las reacciones de ISTR fueron realizadas mediante el protocolo establecido por Rohde (1996) y se utilizaron en la amplificación, las combinaciones de oligonucleótidos F1/B2A, F3/B3 y F7/B3, diseñados previamente (Tabla 2). Cada reacción contenía 10-25 ng de ADN genómico, 0.2 mM de dNTPs, 2.5mM MgCl<sub>2</sub>, tampón de PCR 1x (Gibco/BRL, Groningen, Netherlands), 2.5 pmol de cada oligonucleótido y 1 unidad de Taq ADN polimerasa (GIBCO-BRL) en un volumen final de 30µl. La amplificación fue realizada bajo las condiciones siguientes: 94°C por 2 min, 40 ciclos de (94°C, 30 seg, 50°C por 30 seg, 72°C por 2 min) y un ciclo final de 72°C por 10 min. Las corridas electroforéticas se realizaron en geles de poliacrilamida al 4% y los productos de amplificación fueron visualizados mediante tinción con plata de acuerdo con lo sugerido por Rohde (1996).

Se realizó la lectura visual de los geles de poliacrilamida y las bandas polimórficas se evaluaron de forma binaria con 1 y 0 para la presencia o ausencia de bandas respectivamente para cada genotipo. A partir de las matrices de datos originales se calcularon los siguientes parámetros de acuerdo con lo sugerido por Belaj *et al.* (2003):

<sup>(1)</sup>Número de unidades de ensayo (u: producto de la amplificación de la PCR obtenida con una pareja de oligonucleótidos);

- (2) Número de bandas polimórficas ( $n_p$ );
- (3) Número de bandas no polimórficas ( $n_{np}$ );
- (4) Número total de bandas ( $n = n_p + n_{np}$ );
- (5) Número promedio de bandas polimórficas por unidad de ensayo ( $n_p/u$ );
- (6) Número de patrones de bandas identificados por combinación de oligonucleótidos ( $T_p$ );
- (7) Número de patrones únicos de bandas identificados por combinación de oligonucleótidos ( $T_{pu}$ );
- (8) Porcentaje de identificación ( $Pi = (T_{pu}/T_p) \times 100$ );
- (9) Número promedio de patrones de bandas identificados ( $I$ );
- (10) Número promedio de patrones únicos de bandas identificados ( $I_u$ );
- (11) Heterocigosidad esperada (Hep) del loci polimórfico:  $He = 1 - \sum p_i^2$  donde  $p_i$  es la frecuencia de alelos en el  $i^{mo}$  alelo y la media aritmética de la heterocigosidad del

loci polimórfico: 
$$H_{ep} = \frac{\sum H_{np}}{n_p}$$

donde n es el número de marcadores analizados. En todos los casos, los valores fueron corregidos por el tamaño de la muestra como:

$$H_{ep} = \frac{2nH_e}{2n-1}$$

(12) Media de la heterocigosidad esperada de los loci polimórficos:  $He = (\sum Hep)/C$ .

Se estimó la similitud genética entre todos los genotipos estudiados, para ello se utilizó el subprograma SIMQUAL, empleando como coeficiente Dice y como método de agrupamiento, el Método las Medias Aritméticas por Grupo No Ponderadas (UPGMA) por presentar los valores cofenéticos más elevados, cálculos realizados mediante el paquete estadístico NTSys-PC (versión 2.1).

Tabla 1. Principales ecotipos seleccionados en una población de cocoteros en la región de Baracoa, Cuba.

Planta	Nombre	Simb.	Planta	Nombre	Simb.
P-1	Inmune	INM	P-20	Enano Verde de Sabana	EVS
P-2	Indio Verde-1	IV-1	P-21	Alto Verde de Sabana	AVS
P-3	Enano Amarillo de Duaba	EAD	P-22	Enano Amarillo de Jamal	EAJ
P-4	Indio Rojo de Duaba	IRD	P-23	Hondureño Verde	HV
P-5	Enano Verde de Malasia	EVM	P-24	Hondureño Amarillo	HA
P-6	Enano Amarillo de Malasia	EAM	P-25	Enano Rojo de Fruto Grande.	ERFG
P-7	Enano Rojo de Malasia	ERM	P-26	Criollo del Pino	CP
P-8	Súper Enano Verde	SEV	P-27	Cocotero Criollo	CC
P-9	Cobrizo de Nibujón	CN	P-28	Índio Rojo de Fruto Grande	IRFG
P-10	Indio Verde Fino	IVF	P-29	Indio Rojo de Manglito	IRMn
P-11	Indio Verde-2	IV-2	P-30	Enano Verde de Sabana-1	EVS-1
P-12	Enano Aceitoso	EA	P-31	Indio Amarillo Grande de Nibujón	IAGN
P-13	Indio Amarillo Grande de Sabana	IAGS	P-32	Alto Verde de Manglito	AVMn
P-14	Indio Rojo de Sabana	IRS	P-33	Indio Verde de Nibujón	IVN
P-15	Enano Cobrizo de Sabana	ECS	P-34	Parecido al Panamá "Tall"	PPT
P-16	Indio Verde Aperado de Sabana.	IVAS	P-35	Indio de la India	IDI
P-17	Indio Verde del Rodeo	IVR	P-36	Enano Amarillo de La Piedra	EAP
P-18	Indio Verde de Maisí	IVMs	P-37	Enano Amarillo de Nibujón	EAN
P-19	Alto Verde de Maisí	AVMs			

Tabla 2. Secuencias de los oligonucleótidos (ISTR) utilizados en la caracterización molecular de diferentes ecotipos de cocotero.

Cebadores (ISTR)	Nomenclatura
5' AATAAATCGATCATCGACTC 3'	(B2A)
5' ATTCCCATCTGCACCATT 3'	(B3)
5' AGGAGGTGAATACCTTAG 3'	(F1)
5' GTCGACATGCCATCTTTC 3'	(F3)
5' CAACAGCGCTCCCACTGA 3'	(F7)

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Análisis de diversidad genética mediante ISTR

En el estudio de todos los ecotipos de cocoteros de la población, como resultado de las parejas de oligonucleótidos F1/B2A, F3/B3 y F7/B3, se lograron identificar un total de 75 bandas que mostraron un 93% de polimorfismo (Tabla 3). Estos resultados corroboran lo referido por Rohde (1996) respecto a la

eficiencia de esta técnica para generar un gran número de marcadores en un período de tiempo corto.

El número de bandas polimórficas varió de 20 con F1/B2A hasta un máximo de 29 con F3/B3. La combinación F1/B2A presentó el menor número de bandas, pero el 100% de las mismas fueron polimórficas. Las restantes parejas de oligonucleótidos (F3/B3 y F7/B3) manifestaron un polimorfismo de 96.1% y 84% respectivamente (Figura 1).

Tabla 3. Niveles de polimorfismo detectados entre los ecotipos de cocotero de la población de Baracoa para cada combinación de oligonucleótidos empleados en el análisis de ISTR.

Indices y sus abreviaturas		Combinaciones de oligonucleótidos ISTR		
		F1/B2A	F3/B3	F7/B3
Nº de bandas polimórficas	$n_p$	20	29	21
Nº de bandas no polimórficas	$n_{np}$	0	1	4
Nº total de bandas	$n$	20	30	25
Nº promedio de bandas polimórficas	$P$	23.33		
Nº de patrones de bandas	$T_p$	33	29	33
Nº de patrones únicos de bandas	$T_{pu}$	29	25	29
Porcentaje de identificación (%)	$P_i$	87	86	87
Nº promedio de patrones bandas	$I$	31.6		
Nº promedio de patrones únicos de bandas	$I_u$	27.6		
Heterocigocidad esperada	$H_{ep}$	0.2880	0.2909	0.2910
Promedio de Heterocigocidad esperada	$H_e$	0.2900		

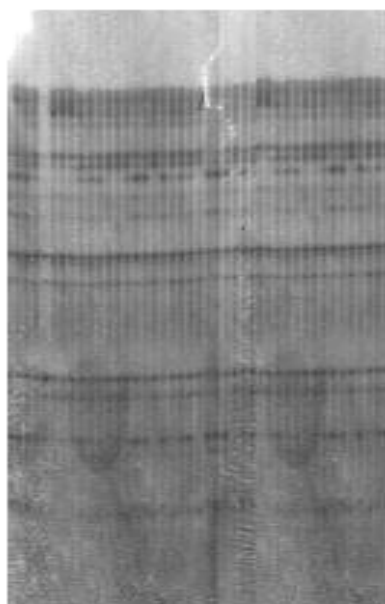


Figura 1. Autorradiografía representativa del análisis ISTR. ADN genómico de los ecotipos de cocotero P-1 hasta P-37 (de izquierda a derecha, Tabla 1) con las combinaciones de oligonucleótidos F7/B3. Productos de amplificación teñidos con plata y separados en geles de poliacrilamida al 4%.

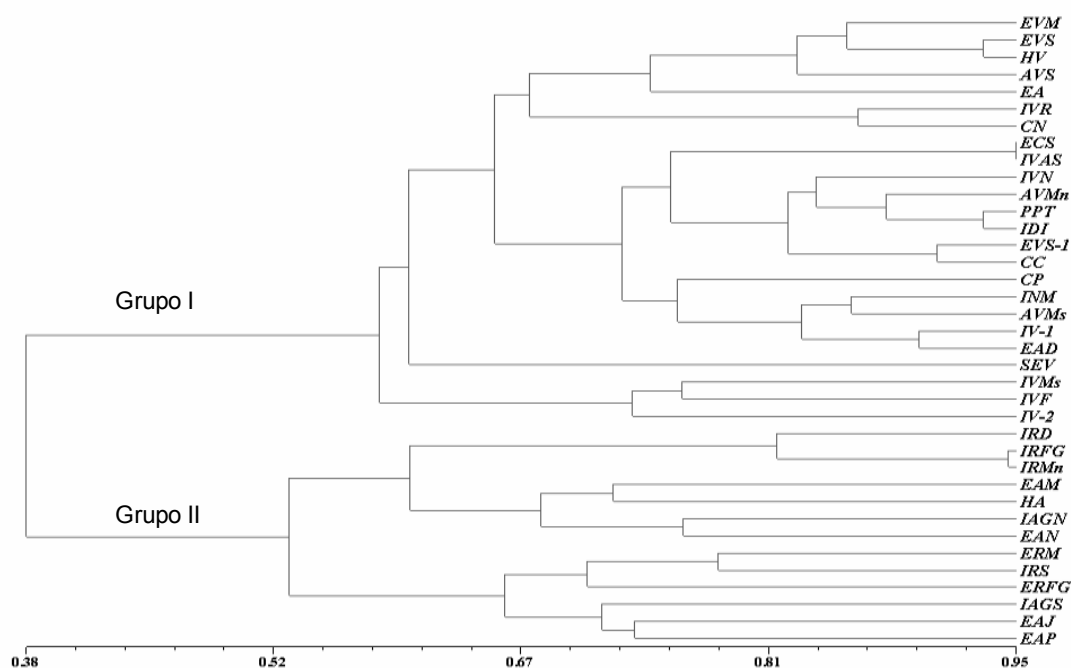


Figura 2. Resultados del análisis de agrupamiento realizado sobre la base de tres combinaciones de oligonucleótidos ISTR, mediante el coeficiente de Dice y el método de agrupamiento UPGMA del paquete de programa NTSYS-pc (versión 2.1).

El índice de polimorfismo (bandas polimórficas / total de bandas) para ISTR en cocotero, se encuentra en el rango de 48-100%, dependiendo de la combinación de oligonucleótidos empleada (Duran *et al.*, 1997). Dichos resultados coinciden con los presentados en este trabajo.

El número total de patrones de bandas se mantuvo prácticamente igual en todas las combinaciones utilizadas, con un valor que varió de 29 con F3/B3 a 33 para F7/B3 y F1/B2A (Tabla 3).

El total de patrones de bandas identificados por combinación de oligonucleótidos varió de 29 a 33, con un porcentaje de identificación alto por combinación (aproximadamente  $P_i=86\%$ ). Esto sugiere que estas tres combinaciones pudieran ser empleadas para estudios de variabilidad genética en poblaciones naturales de cocoteros de la región de Baracoa.

Por otra parte, el número de patrones de banda únicos (Tpu) mostró un rango de variación de 25-29 por unidad de ensayo, lo que comparado con el total de patrones de bandas detectado sugiere la efectividad de estos oligonucleótidos en la identificación de todos los genotipos evaluados (Tabla 3). Además, corrobora su utilidad para la identificación de ecotipos de cocoteros (Rohde, 1996; Rohde *et al.*, 1999). Resultados similares han sido obtenidos en aguacatero (*Persea americana* Mill.) por Ramírez *et al.* (2000), en mango

(*Mangifera indica* L.) por Capote *et al.* (2003) y en el guayabo (*Psidium guajava* L.) por Rodríguez *et al.* (2003).

También, se ha descrito la eficiencia de este tipo de marcador en un estudio previo con RAPD realizado por Rohde *et al.* (1999), en el cual mediante la utilización de oligonucleótidos ISTR, confirmaron los agrupamientos obtenidos por RAPD en la evaluación del germoplasma de cocotero africano del este (EAT) procedente de Tanzania y Kenya.

De manera general, la heterocigocidad esperada en la población objeto de estudio fue baja ( $H_e=0.29$ ), resultados que corroboran los valores obtenidos para la heterocigocidad esperada por combinación. Esto pudiera deberse, a que a pesar del diferente origen de las introducciones en esta región, las mismas involucraron materiales vegetales con poca variabilidad genética. Resultados similares fueron encontrados por Lebrun *et al.* (1998), Zizumbo-Villareal (1998) y Perera *et al.* (2003) en estudios de diversidad genética de la especie en México, Sri Lanka, África y Pacífico Sur.

En el análisis de agrupamiento (*Cluster*) de los ecotipos de cocoteros de la población estudiada en la región de Baracoa, se evidencia la formación de dos grupos con un índice de similitud de 0.38 (Figura 2).



En el grupo I, se encuentran principalmente los ecotipos enanos que a su vez están muy relacionados con los Enanos Malayos, lo que sugiere que cuando se introdujeron de manera oficial en 1960 las variedades de enanos de Malasia en Cuba (Cueto *et al.*, 2004a), ya existían poblaciones de cocoteros similares a los de esta variedad. Los mismos pudieron ser introducidos a partir de la región del Caribe por hacendados ricos de la zona de Maisí y sirvieron como fuente de semilla para el establecimiento y desarrollo de las poblaciones naturales en diferentes áreas de Baracoa (Cueto *et al.*, 2004b).

Sin embargo, dentro del grupo II, se localizan fundamentalmente ecotipos de cocoteros que fueron resultado de un largo proceso de polinización cruzada que favoreció la recombinación en muchas generaciones (Cueto *et al.*, 2004b). Además, incluye ecotipos que han sido introducidos de diferentes regiones del mundo, lo cual sugiere que la dispersión del cocotero en la zona de Baracoa favoreció el contacto de diferentes ecotipos.

De manera general, en el análisis de agrupamiento, puede observarse que a pesar del polimorfismo detectado, en el dendrograma no están adecuadamente representadas en grupos las variedades enanas y altas definidas para esta especie. Este resultado puede estar relacionado con la caracterización morfológica de las palmeras utilizada en la clasificación de los ecotipos, al conocerse que la eficiencia de estos descriptores para la clasificación filogenético es limitada. Adicionalmente, se conoce que tales caracteres son influenciados por el ambiente, lo que puede contribuir a errores de clasificación. Este resultado no se corresponde con los informes de Zizumbo-Villarreal *et al.* (2006) en cocotero y, sí con los obtenidos por Mhameed *et al.* (1997) y por Ramírez *et al.* (2003) para el aguacatero. Estos resultados corroboran la necesidad de complementar los estudios morfológicos para la evaluación de la diversidad genética e identificación de accesiones con los marcadores moleculares basados en el ADN (Mendoza y Simpson, 1997).

La caracterización molecular por ISTR de estos ecotipos reafirma lo informado por Rohde *et al.* (1995) y Duran *et al.* (1997), respecto a lo poderosa que resulta esta técnica para la identificación de accesiones y la evaluación de la variación genética. Además, constituye una herramienta moderna y poderosa para el viejo arte de la selección (Cornide *et al.*, 2002).

Por otra parte, en el presente trabajo se demuestra que existe poca variabilidad genética dentro de la población estudiada de la región de Baracoa. Esto pudiera deberse a que durante el proceso de surgimiento de las poblaciones de cocoteros en dicha zona, se introdujeron cocoteros que involucraron un

número de semillas relativamente pequeño o, materiales procedentes de poblaciones con baja diversidad. Además, que tales introducciones se efectuaron a lo largo de los últimos 400 años y en varias ocasiones durante ese intervalo de tiempo. Por tanto, la dispersión del cocotero en la región de Baracoa permitió el contacto entre diferentes ecotipos durante muchas generaciones favorecido, fundamentalmente, por la polinización cruzada que presenta esta especie.

## CONCLUSIONES

Los marcadores ISTR se emplearon para realizar estudios de diversidad molecular en el cocotero y se demuestra que existe poca variabilidad genética dentro de la población estudiada de la región de Baracoa.

La heterocigocidad esperada ( $H_e=0.29$ ) sugiere que a pesar del diferente origen de las introducciones en esta región, las mismas involucraron materiales vegetales con poca variabilidad.

El porcentaje de identificación por combinación (aproximadamente  $P_i=86\%$ ), sugiere que las combinaciones (F1/B2A, F3/B3 y F7/B3) pueden ser empleadas para estudios de variabilidad genética en poblaciones naturales de cocoteros de la región de Baracoa.

## AGRADECIMIENTOS

A la Empresa del Coco Baracoa por su apoyo en la selección de los ecotipos de cocoteros del ensayo. Al Dr. Orlando Coto y a la Lic. Alicia Jordán por contribuir a la revisión del manuscrito.

## REFERENCIAS

- Ashburner, GR, Thompson, WK, Halloron, GM (1997) RADP analysis of South Pacific coconut palm populations. *Crop Sci.* 32: 992-997
- Belaj, A, Satovis, Z, Cipriano, G, Baldono, L, Testolin, R, Rallo, L, Trujillo, I (2003) Comparative study of the discriminating capacity of RADP, AFLP and SSR markers and of their effectiveness in establishing genetic relationships in olive. *Theor Appl Genet* 107: 736-744
- Capote, M, Becker, D, Cueto, JR, Rohde, W (2003) Development and application of various DNA marker types for the characterization of genetic diversity within commercial mango varieties in Cuba. *J. Gent. Breed.* 57: 175-184
- Cornide, MT, Arencibia, A, Berovides, V, Calvo, D, Coto, O, González, C, Rodríguez, M, Sánchez, J, Sigarrosa, A y Xiqués, X (2002) Marcadores moleculares. Nuevos horizontes en la genética y la selección de las plantas. Editorial Felix Varela. La Habana
- Coto, O (2005) Tendencias actuales del mejoramiento genético de la uva (*Vitis* spp.). *Revista Citrifrut.* 22 (1): 31-37
- Cueto, JR (1987a) El intercalamiento de cultivos como componente de un sistema integral en las plantaciones de cocotero. Informe. Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical (IIFT). Ciudad de La Habana

- Cueto, JR, Alonso M, Llauger R, González V, Romero W (2004b) Historia del cultivo de cocotero (*Cocos nucifera* L.) en Cuba: su origen en la Región de Baracoa. Disponible en: <http://fao.org/docrep.htm>. [Consultado 1 agosto de 2006]
- Cueto, JR, Alonso M, Llauger R, Rohde W, Romero W, Becker D, González V, Rodríguez M, Juncal J, Fajardo D (2004a) Principales ecotipos del germoplasma *in situ* de cocotero (*Cocos nucifera* L.) en Baracoa y Maisí, Guantánamo. Memorias Convención Trópico 2004
- Donini, P, Cooke R, Reeves R (1999) Molecular markers in variety and seed testing. En: Proceedings of International Symposium on plant genetic engineering. pp.259-260, CIGB, La Habana
- Doyle, JJ, Doyle L (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12 (1):13-15
- Duran, Y, Rohde W, Kullaya A, Goikoetxea P, Ritter E (1997) Molecular analysis of East African tall coconut genotypes by DNA marker technology. J. Genet. Breed. 51:279-288
- Hodgson, R, Wall C, Randles JW (1998) Specific Identification of Coconut Tinangaja Viroid for Differential Field Diagnosis of Viroids in Coconut Palm. The American Phytopathological Society 88 (8): 779-798
- Kameswara, RN (2004) Plant genetic resources: Advancing conservation and use through biotechnology. African Journal of Biotechnology 3 (2): 136-145
- Lebrun, P, N'Cho YP, Seguin M, Grivet L, Baudouin L (1998) Genetic diversity in coconut (*Cocos nucifera* L.) revealed by restriction length polymorphism (RFLP) markers. Euphytica. 101: 103-108
- Manimekalai, K, Nagarajan P (2006b) Assessing genetic relationships among coconut (*Cocos nucifera* L.) accessions using inter simple sequence repeat markers. Scientia Horticulturae 108: 49-54
- Mendoza-Herrera, A, Simpson J (1997) Uso de marcadores moleculares en la agronomía. Avance y perspectiva 1608:15-20
- Mhameed, SD, Sharon D, Kaufman E, Lahar J, Hulel C, Sari V (1997) Genetic relationships within avocado (*Persea americana* Mill.) cultivars and between *Persea* species. Theor Appl Genet 94: 279-286
- Perera, L, Russell J, Provan L, Powell L (2003) Studying genetic relationships among coconut varieties/populations using microsatellite markers. Euphytica. 132: 121-128
- Ramírez, IM, Fuentes JL, Rodríguez NN, Cueto JR, Rohde W (2003) DNA polymorphism in Cuba varieties of avocado (*Persea americana* Mill.) as detected by Inverse Sequence Tagged Repeat (ISTR). Cultivos Tropicales 23 (3): 75-85
- Rivera, R, Edwards KJ, Baker JHA, Arnold GM, Ayad G, Hodkin T, Karp A (1999) Isolation and characterization of polymorphic microsatellite in *Cocos nucifera* L. Genome 24: 668-675
- Rohde, W (1996) Inverse sequence-tagged repeat (ISTR) analysis, a novel and universal PCR-based technique for genome analysis in the plant and animal kingdom. J.Genet and Breed. 50: 249-261
- Rohde, W, Kullaya A, Rodríguez J, Ritter E (1995) Genetic analysis of *Cocos nucifera* L. by PCR amplification of spacer sequences separating a subset of copia-like EcoRI repetitive elements. J. Genet. And Breed. 49: 179-186
- Rohde, W, Becker D, Kullaya A, Rodríguez J, Herran A, Ritter E (1999) Analysis of coconut germplasm biodiversity by DNA markers technologies and construction of a genetic linkage map. Current Advances in Coconut Biotechnology. pp.99-121. Kluwer Academic Publishers. Dordrech
- Teulat, B, Aldam C, Trehin R, Lebrun P, Barrer JHA, Arnod GM, Karp A, Baudouin L, Rognon F (2000) An analysis of genetic diversity in coconut (*Cocos nucifera* L.) populations across the geographic range using sequence-tagged microsatellites (SSRs) and AFLPS. Theor. Appl. Genet. 100: 764-771
- Zizumbo-Villarreal, D (1998) Diversidad del cocotero en México y su evaluación al Amarillamiento Letal. Bol. Soc. Bot. México 62: 157-170
- Zizumbo-Villarreal, D, Ruiz-Rodríguez M, Harries H, Colunga-García Marín P (2006) Population Genetics, Lethal Yellowing Disease, and Relationships among Mexican and Imported Coconut Ecotypes. Crop Sci 46: 2509-2516