

Estimación de la variabilidad genética entre ecotipos de cocoteros presentes en Cuba por ISTR

Genetics variability estimation among coconut ecotypes in Cuba by ISTR

Maruchi Alonso Esquivel¹, Jorge R. Cueto Rodríguez¹, Yusniel Santos Rodríguez²,
Raixa Llauger Riverón¹, Maribel Rodríguez¹, Yusniel Santos Rodríguez², Wolfgang Rohde³

Resumen

Se realizó la caracterización molecular entre 16 ecotipos de cocoteros pertenecientes a una población del municipio de Baracoa, provincia Guantánamo, empleando la técnica Inverse Sequence Tagged Repeat (ISTR). El análisis molecular ISTR detectó un polimorfismo del 81,8%, demostrando la potencialidad de este marcador para realizar estudios de diversidad molecular en el cocotero. El porcentaje de identificación fue alto ($P_i=91,2\%$), lo cual sugiere que las combinaciones de oligonucleótidos empleadas pudieran ser utilizada para estudios de identificación de ecotipos en poblaciones de cocotero de la zona de Baracoa mientras, que la heterocigocidad esperada fue baja ($H_e=0,30$). La evaluación de la diversidad en los diferentes ecotipos de cocoteros mediante marcadores ISTR mostró que se cuenta con un nivel de variabilidad, atendiendo a los grupos formados, lo que se corresponde con la gran variación morfológica observada en la población *in situ*. Además, estos resultados sugieren que la hibridación natural ha sido un factor determinante en la generación de la variabilidad encontrada entre los ecotipos, característica de las variedades de cocotero.

Palabras clave: variabilidad, *Cocos nucifera*, marcadores moleculares, polimorfismo, heterocigocidad.

Abstract

The molecular characterization among 16 coconut ecotypes belonging to a population of Baracoa municipality, Guantanamo province, employing the ISTR technique (Inverse Sequence Tagged Repeat) has been done. The molecular analysis ISTR detected a polymorphism of 81,8%, showing the potenciality of this marker to do studies on molecular diversity in coconut. The identification percentage was high ($P_i= 91,2\%$) suggesting that primer combinations employed could be used to ecotype identification studies on coconut populations of Baracoa. The heterocigosity hoped was low ($H_e=0,30$). Diversity evaluation in different coconut ecotypes by means of ISTR markers showed the variability level, according to the groups. This corresponds with the great morphologic variation observed in the population *in situ*. These results suggest that natural hybridization has been a determinant factor generating the variability found between the ecotypes, typical of coconut varieties.

Key words: Variability, *Cocos nucifera*, molecular markers, polymorphism, heterozigosity.

Recibido: febrero 29 de 2008

Aprobado: octubre 23 de 2008

1 Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical, Ave. 7ma. No. 3005 entre 30 y 32, Miramar, Playa. La Habana, Cuba, mejoramiento@iift.cu ; direccion@iift.cu; dadjunto@iift.cu

2 Estudiante de biología, Facultad de Biología.

3 Max-Planck Institut für Züchtungsorschung (MPIZ), Carl-von-Linné-Weg 10, 50829, Köln, Germany. rohde@mpiz-koeln.mpg.de

Introducción

El cocotero (*Cocos nucifera* L.), pertenece a la familia Palmae. Dentro de la subfamilia Coicoideae es la única especie del género cocos. Se distribuye principalmente en las áreas tropicales, donde es cultivado para la obtención de aceite de gran demanda para la producción de jabones de alta calidad, en la fabricación de surfactantes y espumas estabilizadoras para detergentes, champús, cosméticos, inhibidores de corrosión y emulsificantes. Además, otras partes de la planta son utilizadas para la obtención de azúcar, alcohol, carbón activado, fibra, madera y combustible (Zizumbo-Villareal et ál., 2006).

En Cuba, el cultivo del cocotero representa el 13% de la estructura de la producción, y el 30% del área de frutales, ocupando aproximadamente 18.125 ha entre los sectores estatal y campesino. La región de Baracoa constituye una de las principales zonas productoras de coco del país, así como un centro de diversidad para este cultivo. La polinización cruzada que presenta esta especie ha favorecido la hibridación entre muchas generaciones a lo largo del tiempo, dificultando la distinción de tipos originales. La introducción de poblaciones con diferente origen y características, así como su cultivo dentro de las plantaciones por un largo periodo de tiempo ha favorecido la recombinación y el incremento de la diversidad en el cultivo (Alonso et ál., 2007).

Los esfuerzos que en la actualidad se realizan para el estudio de la variabilidad genética demandan el empleo de efectivas y novedosas herramientas. Las técnicas de marcadores de ADN están siendo utilizadas para la identificación, caracterización y evaluación de la diversidad genética en los cultivos (Coto y Cornide, 2003).

Las metodologías moleculares han revolucionado el análisis genético en el caso específico del cocotero. Las técnicas de polimorfismo del ADN Amplificado al azar (Ashburner et ál., 1997; Manimekalai y Nagarajan, 2006) y de polimorfismo de longitud de fragmentos restrin-

gidos (Lebrun et ál., 1998; Teulat et ál., 2000) fueron aplicadas en cocotero mostrando ser adecuadas para la identificación de poblaciones próximas, comportamiento de híbridos y evaluación de la distancia genética entre sus países. Por otra parte, el empleo de los microsatélites (Lebrun et ál., 2001; Perera et ál., 2003), la construcción de mapas de ligamiento (Herran et ál., 2000; Baudouin et ál., 2006), las estrategias de selección asistida por marcadores (Kameswara, 2004), y la identificación de especies y estudios de genética de poblaciones (Zizumbo-Villareal et ál., 2006), son consideradas técnicas apropiada para detectar y cuantificar la variabilidad genética en dicha especie. Estas técnicas se utilizan para complementar los estudios donde los marcadores morfológicos han proporcionado resultados limitados, o para acelerar los programas de mejoramiento (Meerow et ál., 2003).

En este sentido, el análisis de las secuencias inversas repetidas y marcadas (ISTR) es una técnica basada en PCR aplicable a genomas de animales, plantas y microorganismos (Rohde, 1995). Se ha demostrado que el polimorfismo generado mediante ISTR ha sido de utilidad para estudios de diversidad genética y mapeo genético en coco (Duran et ál., 1997; Rohde et ál., 1999) y mango (Capote et ál., 2003), y ha sido recomendado para la certificación de variedades de cereales (Donini et ál., 1999).

Considerando la utilidad de los marcadores ISTR para estudios de diversidad en frutales tropicales, el presente trabajo tiene como objetivo estimar la variabilidad genética entre ecotipos de cocoteros presentes en Cuba, mediante el polimorfismo generado 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 limitado 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 16 ecotipos de cocoteros (*Cocos nucifera* L.) pertenecientes a una población de dicho cultivo ubicada en la región de Baracoa, provincia Guantánamo (tabla 1). Cada ecotipo es un individuo (planta) considerado como descendiente de antiguas introducciones u obtenido del proceso de polinización cruzada presente en la especie. Además, presentan características morfológicas distintivas relacionadas con los componentes del fruto y la estructura de la hoja.

Análisis de diversidad genética mediante ISTR

Para el aislamiento del ADN se utilizó el método del CTAB 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 (1995). En la amplificación se utilizaron las combinaciones de oligonucleótidos F1/B1A, F1/B2A, F3/B3, F7/B3 y F7/B1A, las cuales detectaron mayor polimorfismo en un previo pesquizaje realizado con varios oligonucleótidos (tabla 2). Cada reacción contenía 10-25 ng de ADN genómico, 02 mM de dNTPs, 2,5mM

Tabla 1. Identificación de los 16 ecotipos seleccionados en una población de cocotero de Cuba.

Planta	Nombre	Simb.
P-1	Indio Rojo de Duaba	IRD
P-2	Enano Amarillo de Malasia	EAM
P-3	Enano Rojo de Malasia	ERM
P-4	Indio Amarillo Grande de Sabana	IAGS
P-5	Indio Rojo de Sabana	IRS
P-6	Indio Amarillo de Nibujón	IAN
P-7	Hondureño Amarillo	HA
P-8	Indio Rojo de Fruto Grande-1	IRFG-1
P-9	Indio Rojo de Manglito	IRMn
P-10	Indio Amarillo Grande de Nibujón	IAGN
P-11	Indio Dorado de Jamaica	IDJ
P-12	Indio Amarillo de Bariguita	IABr
P-13	Indio Rojo de Caibarien	IRC
P-14	Indio Rojo de Baracoa	IRB
P-15	Indio Amarillo de Baracoa	IAB
P-16	Indio Amarillo Dorado	IAD

MgCl₂, tampón de PCR 1x (Gibco/BRL, Groningen, Netherlands), 2,5 pmol de cada cebador, y una unidad de Taq ADN polimerasa (GIBCO-BRL) en un volumen final de 30 µL. 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 propuesta de forma similar a lo reportado por Rohde (1995).

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 Belej et ál. (2003):

- (1) 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 (I_p).
- (7) Número de patrones únicos de bandas identificados por combinación de oligonucleótidos (I_{pu}).
- (8) Porcentaje de identificación ($P_i = (I_{pu}/I_p) \times 100$).
- (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: $H_e = 1 - \sum p_i^2$ donde p_i es la frecuencia de alelos en el i^{mo} alelo y la media aritmética de la heterocigosidad del loci polimórfico: $H_\phi = \frac{\sum H_{ip}}{n}$, donde n es el número de marcadores analizados. En todos los casos, los valores fueron corregidos por el tamaño de la muestra como: $H_\phi = \frac{2nH_e}{2n-1}$;
- (12) Media de la heterocigosidad esperada de los loci polimórficos: $H_e = (\sum Hep)/C$.

Se estimó la similitud genética entre todos los genotipos estudiados, para ello se utilizó el

Tabla 2. Secuencias de los oligonucleótidos (ISTR) utilizados en la caracterización molecular de los 16 ecotipos de cocotero.

Oligonucleótidos (ISTR)	Nomenclatura
5' TTTTCTACTTCATGCTGAAT 3'	(B1A)
5' AATAAATCGATCATCGACTC 3'	(B2A)
5' ATTCCCATCTGCACCATT 3'	(B3)
5' AGGAGGTGAATACCTTAG 3'	(F1)
5' GTCGACATGCCATCTTTC 3'	(F3)
5' CAACAGCGCTCCCACTGA 3'	(F7)

subprograma SIMQUAL, empleando como coeficiente Dice, y como método de agrupamiento 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).

Resultados y discusión

En el estudio molecular de los ecotipos de cocotero, con el empleo de las 5 combinaciones de oligonucleótidos ISTR, se obtuvieron un total de 99 bandas, de las cuales el 81,8% resultaron ser polimórficas. El total de bandas reveladas por combinación varió entre 13 y 25 para las combinaciones F1/B2A y F1/B1A respectivamente (tabla 3).

La combinación F1/B2A presentó el menor número de bandas, pero el 100% de las mismas fueron polimórficas. Sin embargo, el polimorfismo revelado por la pareja de oligonucleótidos F7/B3 solamente ascendió al 55,5%. Las restantes parejas de oligonucleótidos (F1/B1A, F3/B3 y F7/B1A) mostraron valores in-

termedios en cuanto al total de bandas obtenidas, manifestando un polimorfismo de 96,1, 80,9 y 76,1% respectivamente. Los resultados obtenidos muestran que con cinco pares de oligonucleótidos del marcador ISTR se pudieron detectar 81 fragmentos polimórficos. Sin embargo, Rodríguez et al. (2004) identificaron 41 bandas polimórficas con el empleo de dos combinaciones de oligonucleótidos de ISTR (F7A/B3 y F3/B2B) que le permitieron distinguir todos los genotipos en un estudio de caracterización molecular de una población de híbridos de guayaba (*Psidium guajava* L.). Resultados similares fueron encontrados en aguacatero (*Persea americana* M.), que con una sola combinación de oligonucleótidos ISTR (F3/B2A) utilizada produjo un total de 157 fragmentos polimórficos que permitió la identificación de 18 variedades de aguacate (Ramírez et ál., 2003).

Los patrones de bandas identificados por la combinación F1/B2A fueron únicos, por lo que la misma resultó ser altamente eficiente para diferenciar todos los ecotipos analizados.

El porcentaje de identificación fue alto ($P_i=91,2\%$), teniendo en cuenta las cinco com-

Tabla 3. Niveles de polimorfismo detectado entre los 16 ecotipos de cocoteros para cada combinación de oligonucleótidos empleados en el análisis de ISTR.

Índices y sus abreviaturas		Combinaciones de oligonucleótidos ISTR				
		F1/B1A	F1/B2A	F3/B3	F7/B3	F7/B1A
No de bandas polimórficas	np	25	16	17	10	16
No de bandas no polimórficas	nnp	1	0	4	8	5
No total de bandas	n	26	16	21	18	21
No promedio de bandas polimórficas	P	19,8				
No de patrones de bandas	Tp	25	16	18	11	16
No de patrones únicos de bandas	Tpu	22	16	16	10	14
Porcentaje de identificación	Pi	88,0	100	88,9	91,0	88,0
No promedio de patrones bandas	l	16,6				
No promedio de patrones únicos de bandas	lu	10,4				
Heterocigocidad esperada	Hep	0,40	0,36	0,29	0,21	0,23
Promedio de heterocigocidad esperada	He	0,30				

binaciones de oligonucleótidos empleadas. Las combinación F1/B1A y F7/B1A presentaron un menor porcentaje de identificación ($P_i=88\%$), seguidas da F3/B3 ($P_i=88,9\%$). Valores superiores fueron encontrados para el par de oligonucleótidos F1/B2A. Estos resultados sugieren que esta última combinación pudiera ser utilizada para estudios de identificación de ecotipos en poblaciones de cocotero de la zona de Baracoa, debido al elevado porcentaje de identificación ($P_i=100\%$) y el polimorfismo generado (100%).

De manera general, la heterocigidad media esperada fue baja ($H_e=0,30$), resultados que corroboran los valores obtenidos para la heterocigidad esperada por combinación. Esto pudiera deberse a que a pesar del diferente origen de las introducciones en esta región, las mismas involucraron materiales con muy poca variabilidad. Resultados similares fueron encontrados por Lebrun et ál. (1998), Meerow et ál. (2003), Perera et ál. (2003) y Zizumbo-Villareal et ál. (2006) en estudios de diversidad genética de la especie en Sri Lanka, África y Pacífico Sur, Estados Unidos y México. Por otra

parte, la combinación F1/B1A mostró el mayor valor de heterocigidad esperada ($H_e=0,40$), mientras que para la combinación F7/B3 se obtuvo el menor valor ($H_e=0,21$).

En la figura 1 se muestran las relaciones genéticas entre los 16 ecotipos de cocoteros estudiados. Con excepción de los ecotipos Indio Amarillo de Bariguita (IABr) e Indio Dorado de Jamaica (IDJ), los cuales presentaron un alto valor de similitud (88%), el análisis de agrupamiento permitió la diferenciación de todos los ecotipos. Mas, de un modo general, el dendrograma mostró dos grupos principales, cuya similitud genética fue $0,67$. El grupo I lo conforman los ecotipos que tienen un origen común, o sea, refuerza la hipótesis de que en la primera mitad del siglo XIX se logró un movimiento de semillas de coco desde Centro América, principalmente de la región noroeste de Honduras y sur de México hacia Cuba a través de la United Fruit Company dueña de plantaciones de bananos y cocoteros en Cuba (Cueto et ál., 2004). Sin embargo, en el grupo II se presentan ecotipos procedentes de introducciones de diferentes regiones geográficas de América

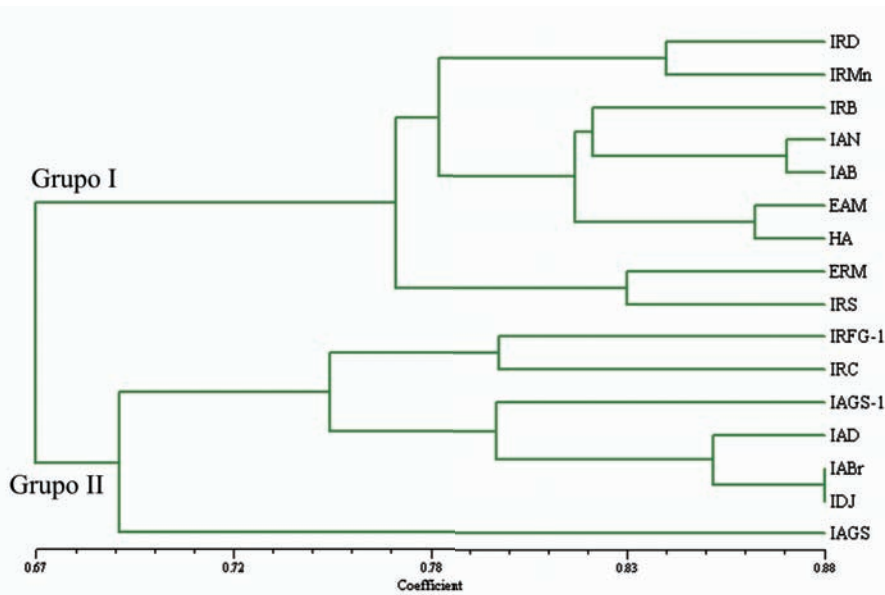


Figura 1. Resultados del análisis de agrupamiento realizado sobre la base de 5 combinaciones de oligonucleótidos ISTR, mediante el coeficiente de Dice y el método de agrupamiento UPGMA del paquete de programa NTSYS-pc (versión 2.1).

que pudieron involucrar materiales obtenidos de poblaciones de cocoteros diferenciadas con baja diversidad genética.

Es válido destacar que los ecotipos Enano Rojo de Malasia (ERM) e Indio Rojo de Sabana (IRS), así como Indio Rojo de Duaba (IRD) e Indio Rojo de Manglito (IRMn), se mostraron relacionados, con valores de similitud de 83 y 84%, respectivamente (figura 1, grupo D), lo cual es de esperar dado el tipo de variedad de cocotero, la cual se corresponde con ecotipos enanos. Esto sugiere que el alto nivel de autopolinización en esta variedad ha permitido la endogamia en dichos materiales, lo que coincide con estudios morfológicos y moleculares realizados en *Cocos nucifera* L. (Perera et ál., 2003; Zizumbo-Villarreal et ál., 2006).

La evaluación de la diversidad en los diferentes ecotipos de cocoteros mediante marcadores ISTR mostró que se cuenta con un nivel de variabilidad, analizando los grupos formados, lo que coincide con la variación morfológica observada (atendiendo a los caracteres del fruto y estructura de la hoja) en la población in situ según lo señalado por Santos (2006).

El polimorfismo generado mediante ISTR ha sido utilizado en estudios de variabilidad genética en el género *Musa* (Román, 2004), cebada (Castiglioni et ál., 1998), en el análisis de las relaciones genéticas de los 30 principales cultivares de mango (*Mangifera indica* Linn.) en Cuba (Capote et ál., 2003), y en una población de híbridos de guayaba (*Psidium guajava* Linn) (Rodríguez et ál., 2004). También ha sido recomendado para la certificación de variedades de cereales (Donini et ál., 1999), y en la identificación de genotipos en colecciones de aguacate-ro (*Persea americana* Mill.) (Ramírez et ál., 2003). Por tanto, estos marcadores podrían apoyar los trabajos de selección de materiales promisorios en los programas de mejoramiento genético del cultivo.

Conclusiones

Los marcadores ISTR se emplearon para realizar estudios de diversidad genética en el cocotero, y se demuestra que existe un nivel de variabilidad entre los ecotipos estudiados.

La combinación F1/B2A puede ser utilizada para estudios de identificación de ecotipos en poblaciones de cocotero de la zona de Baracoa.

La variabilidad genética encontrada en los ecotipos sugiere que a pesar del diferente origen de las introducciones en esta región, las mismas involucraron materiales con poca diversidad.

Referencias bibliográficas

- Alonso, M.; Cueto, J. R.; Santos, Y.; Romero, W.; Llauger, R.; Rohde, W. 2007. Variabilidad morfológica y molecular de una población de cocotero verde en la región de Baracoa. *Cultivos Tropicales* 28 (2): 69-75.
- Ashburner, G. R.; Thompson, W. K.; Dhallowan, G. M. 1997. RADP analysis of South Pacific coconut palm populations. *Crop Sci* 32: 992-997.
- Baudouin, L.; Lebrun, P.; Konam, J. L.; Ritter, E.; Berger, A.; Billotte, N. 2006. QTL analysis of fruit components in the progeny of a Rennell island tall coconut (*Cocos nucifera* L.) individual. *Theor Appl Genet* 112: 258-268.
- Belaj, A.; Satovis, Z.; Cipriano, G.; Baldono, L.; Testolin, R.; Rallo, L.; Trujillo, I. 2003. Comparative study of the discriminating capacity of RADP, ALP and SSR markers and of their effectiveness in stablishing genetic relationships in olive. *Theor Appl Genet* 107: 736-744.
- Capote, M.; Becker, D.; Cueto, J. R.; 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.
- Castiglioni, P.; Pozzi, C.; Heun, M.; Terzi, V.; Moher, J.; Rohde, W.; Salamini, P. 1998. An AFLP based procedure for the efficient mapping of mutations and DNA probes in barley. *Genetics* 49: 2039-2056.
- Coto, O.; Cornide, M. T. 2003. Principales aplicaciones de los marcadores moleculares. En: Félix Varela (ed.).

- Marcadores moleculares. Nuevos horizontes en la genética y la selección de las plantas. pp. 92-119.
- Cueto, J. R.; Alonso, M.; Llauger, R.; Rohde, W.; Romero, W.; Becker, D.; González, V.; Rodríguez, M.; Juncal, J.; Fajardo, D. 2004. 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. In: Proceedings of International Symposium on plant genetic engineering. La Habana: CIGB.
- Doyle, J. J.; Doyle, L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12 (1): 13-15.
- Durán, 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* 5: 279-288.
- Herrán, A.; Estioko, L.; Becker, D.; Rodríguez, M.; Rohde, W. 2000. Linkage mapping and QTL analysis in coconut (*Cocos nucifera* L.). *Theor Appl Genet* 101: 292-300.
- Kameswara, R. N. 2004. Plant genetic resources: advancing conservation and use through biotechnology. *African Journal of biotechnology* 3 (2): 136-145.
- Lebrun, P.; N'Cho, Y. P.; 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.
- Lebrun, P.; Baudouin, L.; Bourdeix, R.; Konan, J. L.; Barker, J. H. A. 2001. Construction of a linkage map of the Rennell Island Tall coconut type (*Cocos nucifera* L.) and QTL analysis for yield characters. *Genome* 44: 962-970.
- Manimekalai, K.; Nagarajan, P. 2006. Assessing genetic relationships among coconut (*Cocos nucifera* L.) accessions using inter Simple Sequence Repeat markers. *Scientia Horticultura* 108: 49-54.
- Meerow, A. W.; Wisser, R. J.; Brown, J. S.; Kuhn, D. N.; Schnell, R. J.; Broschat, K. 2003. Analysis of genetic diversity and population structure within Florida coconut (*Cocos nucifera* L.) germplasm using microsatellite DNA, with special emphasis on the Fiji dwarf cultivar. *Theor Appl Genet*. 106: 715-726.
- Perera, L.; Russell, J.; Provan, L.; Powell, L. 2003. Studying genetic relationships among coconut varieties/populations using microsatellite markers. *Euphytica* 132: 121-128.
- Rodríguez, N. N.; Valdés-Infante, J.; Becker, D.; Velázquez, B.; Coto, O.; Ritter, E.; Rohde, W. 2004. Morphological, agronomic and molecular characterization of Cuban accessions of guava (*Psidium guajava* L.). *Journal of Genetic and Breeding* 58: 70-90.
- Ramírez, I.; Fuentes, J. L.; Rodríguez, N. N.; Cueto, J. R.; 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.
- Rohde, W.; Becker, D.; Kullaya, A.; Rodríguez, J.; Herrán, A.; Ritter, E. 1999. Analysis of coconut germplasm biodiversity by DNA markers technology and construction of a genetic linkage map. In: Current advances in coconut biotechnology. Kluwer Academic publishers. pp. 99-121.
- Rohde, W. 1995. 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.
- Román, M. I. 2004. Estudio de la diversidad genética en el género *Musa* (*Musa* sp). Tesis de Doctorado, Facultad de Biología, Universidad de La Habana.
- Santos, Y. 2006. Estudio de la diversidad genética en una población de cocotero de Cuba. Tesis de Maestría, Facultad de Biología.
- Teulat, B.; Aldam, C.; Trehin, R.; Lebrun, P.; Barrer, J. H. A.; Arnod, G. M.; 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.; Ruiz-Rodríguez, M.; Harries, H.; Colunga-García, P. 2006. Population genetics, lethal yellowing disease, and relationships among Mexican and imported coconut ecotypes. *Crop Sci* 46: 2509-2516.