

# VARIABILIDAD MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE UNA POBLACIÓN DE COCOTEROS VERDES EN LA REGIÓN DE BARACOA

Maruchi Alonso<sup>✉</sup>, J. R. Cueto, Y. Santos, W. Romero, Raixa LLauger y W. Rohde

**ABSTRACT.** In Cuba, Baracoa region constitutes one of the main coconut producing zones of the country, as well as a diversity center for this crop. In order to obtain a sustainable agricultural development of coconut in that zone, it is necessary to maintain the genetic diversity of cultured species and preserve wild species, which is of great importance for the selection of highly productive varieties and of those that present resistance and/or tolerance to the diseases affecting the culture. Since the use of morphological and molecular studies constitute an effective and valuable way to estimate the genetic diversity of coconut population in Cuba, a molecular and morphological characterization of 21 ecotypes of green coconut (*Cocos nucifera* L.), belonging to a natural population of Baracoa municipality, Guantánamo province, was carried out. Fourteen descriptors were used for the morphological characterization and ISTR marker technique (Inverse Sequence Tagged Repeat) for the molecular characterization. Patterns of morphological variation between coconut ecotypes were obtained, which permitted to differ population groups in the region. The presence of characteristics of wild and domestic types described for the species was evidenced. The variables that contributed the most to characterization of ecotypes were those related with fruit components and plant morphology. ISTR analysis detected 84 % of polymorphism, showing the potentiality of this marker to carry out studies on molecular diversity in coconut. In addition, it is suggested that coconut dispersion in Baracoa region permitted the contact between different ecotypes during many generations mainly helped by the cross-pollination present in this species.

**Key words:** *Cocos nucifera*, genetic variation

## INTRODUCCIÓN

La especie *Cocos nucifera* Linn, conocida comúnmente como cocotero o palma de coco, es tal vez uno de

Ms.C. Maruchi Alonso, Ms.C. J. R. Cueto y Ms.C. Raixa LLauger, Investigadores Auxiliares, Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical, Miramar, Ciudad de La Habana; Y. Santos, Reserva Científica de la Facultad de Biología, Universidad de La Habana; W. Romero, Especialista, Empresa de Coco Baracoa, Guantánamo; Dr. W. Rohde, Investigador Titular, Max-Planck Institut für Züchtungsorschung (MPIZ), Carl-von-Linné-Weg 10, 50829, Köln, Germany.

✉ mejoramiento@iift.cu

**RESUMEN.** En Cuba, la región de Baracoa constituye una de las principales zonas productoras de coco del país así como un centro de diversidad para este cultivo. Para lograr un desarrollo agrícola sostenible en el cocotero en dicha zona, es necesario mantener la diversidad genética de las especies cultivadas así como la conservación de las especies silvestres, lo cual es de gran importancia para la selección de variedades de mayor productividad y que presenten resistencia y/o tolerancia a las enfermedades que afectan al cultivo. Considerando que la utilización de los estudios morfológicos y moleculares constituye una vía efectiva y valiosa para estimar la diversidad genética en poblaciones de cocotero en Cuba, en el presente trabajo se realizó la caracterización morfológica y molecular de 21 ecotipos de cocoteros verdes (*Cocos nucifera* L.), pertenecientes a una población natural del municipio de Baracoa, provincia Guantánamo. Se utilizaron 14 descriptores para la caracterización morfológica y la técnica ISTR (*Inverse Sequence Tagged Repeat*) para la caracterización molecular. Se obtuvieron patrones de variación morfológica entre los ecotipos de cocotero, que permitieron diferenciar grupos poblacionales en la región. Se evidenció la presencia de las características del “tipo silvestre” y del “tipo domesticado” descritas para la especie. Las variables más importantes para la caracterización de los ecotipos analizados fueron las relacionadas con los componentes del fruto y la morfología de la planta. El análisis molecular ISTR detectó un polimorfismo del 84 %, demostrando la potencialidad de este marcador para realizar estudios de diversidad molecular en el cocotero. Además, sugiere que la dispersión del cocotero en la región de Baracoa permitió el contacto entre diferentes ecotipos durante varias generaciones, favorecido fundamentalmente por la polinización cruzada que presenta esta especie.

**Palabras clave:** *Cocos nucifera*, variación genética

los árboles de los trópicos mejor reconocidos y más importantes económicamente. El cocotero se distribuye principalmente en las áreas tropicales, donde se utiliza como fuente de alimento, bebida, aceite, fibra, combustible, madera y otros productos. También es empleado como planta ornamental (1, 2).

Para lograr un desarrollo agrícola sostenible en el cocotero, es necesario mantener la diversidad genética de las especies cultivadas así como la conservación de las especies silvestres, lo cual es de gran importancia para la selección de variedades de mayor productividad y

que presenten resistencia y/o tolerancia a las enfermedades que afectan al cultivo (3).

En Cuba, el cultivo del cocotero se ha dispersado por todo el país, aunque las mayores áreas tradicionales del cultivo se han localizado fundamentalmente en Baracoa (Guantánamo) y en Niquero y Pilón (Granma) así como en varios municipios de Holguín, Pinar del Río y Sancti Spiritus (4, 5).

Las condiciones ecológicas, culturales y sociales de la región de Baracoa han favorecido la incorporación de un alto número de palmas de cocoteros, originadas en otros centros de diversidad del mundo, generándose nuevos sistemas de cultivo. El proceso de introducción y asimilación ha sido favorecido por los propios agricultores, cuyos sistemas agrícolas están basados, en parte, en la selección y el manejo de alta diversidad de plantas (6).

La determinación de esta diversidad genética en poblaciones naturales de cocotero en dicha zona, permitirá entender el proceso evolutivo de esta especie así como resultará de gran importancia para la selección de genotipos promisorios que serán empleados en programas de mejoramiento del cultivo.

La evaluación morfológica de las poblaciones de cocotero permite una primera observación a simple vista de los atributos principales de las plantas, para analizar las diferencias entre las variedades en estudio (7). Este método es relativamente económico pero está sujeto a una marcada influencia ambiental. Es por ello, que los esfuerzos que en la actualidad se realizan para el mejoramiento de frutales tropicales demandan el empleo de efectivas y novedosas herramientas. Las técnicas de marcadores moleculares están siendo utilizadas para la identificación, caracterización y evaluación de la diversidad genética en plantas (8).

En este sentido, el análisis de las secuencias inversas repetidas y marcadas (ISTR: *Inverse Sequence-Tagged Repeat*) es una técnica basada en PCR aplicable a genomas de animales, plantas y microorganismos (9). Se ha demostrado que el polimorfismo generado mediante ISTR ha sido de utilidad para estudios de diversidad genética y mapeo genético en coco (10, 11, 12), mango (13), aguacate (14) y ha sido recomendado para la certificación de variedades de cereales (15).

El presente trabajo tiene como objetivos:

1. Caracterizar la diversidad genética en ecotipos de cocoteros verdes, pertenecientes a una población natural de la región de Baracoa, mediante el empleo de 14 marcadores morfológicos.
2. Utilizar el marcador molecular ISTR para estudios de diversidad en los ecotipos de cocoteros.

## 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.

**Materiales vegetales.** Se realizó una exploración detallada de la región de Baracoa y se seleccionaron 21 ecotipos de cocoteros verdes (*Cocos nucifera* L.), pertenecientes a una población natural de dicha zona; se consideraron descendientes de antiguas introducciones y ecotipos obtenidos del proceso de polinización cruzada presente en la especie (Tabla I).

**Tabla I. Principales ecotipos de cocoteros verdes seleccionados en la población natural de la región de Baracoa**

Planta	Nombre	Simbología
P-1	Inmune	INM
P-2	Indio Verde-1	IV-1
P-3	Enano Verde de Duaba	EVD
P-4	Enano Verde de Malasia	EVM
P-5	Súper Enano Verde	SEV
P-6	Verde-Cobrizo de Nibujón	CN
P-7	Indio Verde Fino	IVF
P-8	Indio Verde de Nibujón	IVN
P-9	Enano Aceitoso	EA
P-10	Enano Cobrizo de Sabana	ECS
P-11	Indio Verde Aperado de Sabana.	IVAS
P-12	Enano Verde de Sabana	EVS
P-13	Alto Verde de Sabana	AVS
P-14	Hondureño Verde	HV
P-15	Criollo del Pino	CP
P-16	Enano Verde de Sabana-1	EVS-1
P-17	Alto Verde de Manglito	AVM
P-19	Alto Verde de Maisí	AVMs
P-19	Indio Verde de Maisí	IVMs
P-20	Indio Verde del Rodeo	IVR
P-21	Cocotero criollo	CC

Para la selección de los caracteres evaluados, se ha seguido fundamentalmente el sistema de descriptores mínimos para el cocotero del Instituto de Investigaciones de Recursos Fitogenéticos (16). En dicha población se analizó el patrón de variación morfológica del fruto y de la planta en condiciones *in situ*, utilizando 14 caracteres cuantitativos según la metodología descrita por Zizumbo y Piñero (7). Los caracteres cuantitativos analizados fueron: circunferencia del tallo (cm), distancia entre nueve hojas (cm), longitud de la hoja (cm), longitud del pecíolo (cm), longitud de la lámina foliar (cm), longitud y ancho del folíolo (cm), número de folíolos, masa del fruto (g), masa del mesocarpio o fibra (g), masa de la nuez o copra (g), masa del endocarpio o concha (g), volumen de agua o endospermo líquido (mL) y masa del endospermo sólido o albumen (g). Basado en esta información, se calcularon tres proporciones: masa de la nuez/masa del fruto, masa del endocarpio/masa del fruto y masa de albumen/masa de la nuez.

**Aislamiento de ADN.** Para el aislamiento del ADN se utilizaron 10 g de material foliar. Los ADN totales se aislaron por el método del CTAB descrito por Doyle y Doyle (17) con modificaciones (9). La integridad y concentración del ADN se determinaron por electroforesis en un gel de agarosa al 0.7 % con un Ladder de 1 kb (GIBCO-BRL, Groningen) como marcador de peso molecular.

**Caracterización molecular mediante análisis ISTR.** Se utilizaron en la amplificación las combinaciones de cebadores F1/B1A, F1/B2A, F3/B3, F7/B3 y F7/B1A, diseñados previamente (Tabla II). Las reacciones de PCR fueron realizadas mediante el protocolo establecido por Rohde (9), en un volumen final de 30 µl, conteniendo 10-25 ng de ADN genómico, 0.2 mM de dNTPs, 2.5mM MgCl<sub>2</sub>, tampón de la enzima 1X (Gibco/BRL, Groningen, Netherlands), 2,5 pmol de cada cebador y 1 unidad de Taq ADN polimerasa (GIBCO-BRL).

**Tabla II. Secuencias de los cebadores ISTR utilizados en la caracterización molecular de los ecotipos de cocoteros verdes seleccionados en la población**

Cebadores (ISTR)	Nomenclatura
5' TTTTCTACTTCATGTCTGAAT 3'	B1A
5' AATAAATCGATCATCGACTC 3'	B2A
5' ATTCCCATCTGCACCATT 3'	B3
5' AGGAGGTGAATACCTTAG 3'	F1
5' GTCGACATGCCATCTTTC 3'	F3
5' CAACAGCGCTCCCCTGA 3'	F7

En la amplificación se utilizó el siguiente programa: 94°C por dos minutos, 40 ciclos de 94°C, 30 seg., 50°C por 30 seg., 72°C por dos minutos y un ciclo final de 72°C por 10 min. Los geles se revelaron empleando el protocolo de tinción con plata (9).

**Análisis de los datos.** Para el análisis de los patrones de variación morfológica en la población, las variables cuantitativas fueron analizadas mediante el Análisis de Componentes Principales a partir de una matriz de correlación de Pearson y se utilizó el paquete estadístico STATISTICA (versión 6.0; StatSoft, Inc. 1984-2001).

En el análisis molecular, 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 por cada genotipo. Para el cálculo de la similitud genética se utilizó el subprograma SIMQUAL, empleando como coeficiente Dice (18) y como método de agrupamiento, el método de las medias aritméticas por grupo no ponderadas (*Unweighted pair-group method arithmetic averages*, UPGMA), cálculos realizados mediante el paquete estadístico NTSYS-PC, versión 2.1 (19).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Caracterización morfológica.** El análisis de los componentes principales para los caracteres evaluados explica un 68.83 % de la variación total. El primer componente extrajo el 43.69 % y los caracteres de mayor interés fueron: número de folíolos, masa del fruto, masa de la fibra, masa de la nuez, volumen de agua, masa de albumen, masa de la concha y la proporción masa de la concha/masa del fruto. El segundo componente extrajo el 15.30 % y las variables que más aportaron al modelo fueron la longitud de la hoja, del peciolo y la lámina foliar. La tercera componente explica el 9.74 % y la variable de mayor contribución fue el ancho del folíolo (Tablas III y IV). Los caracteres relacionados con la morfología de la hoja, también resultaron significativos en el análisis de variación morfológica de 18 poblaciones de cocoteros en México (20).

**Tabla III. Contribución de las variables cuantitativas seleccionadas en el Análisis de Componentes Principales en la población de cocotero. Matriz de autovectores**

Caracteres	Componente 1	Componente 2	Componente 3
Circunferencia del tronco	0.393813	0.309324	0.601374
Distancia entre 9 hojas	0.567359	-0.086954	-0.681271
Longitud de la hoja	0.504469	0.835698*	0.013282
Longitud del peciolo	0.537727	0.701357*	-0.281417
Longitud del folíolo	0.491705	0.484625	0.187784
Longitud de la lámina	0.404672	-0.775087*	0.174039
Ancho del folíolo	-0.089347	-0.120029	0.771045*
Número de folíolos	0.703268*	0.116389	-0.155764
Masa del fruto	0.920217*	-0.287902	0.056840
Masa de la fibra	0.787485*	-0.299366	0.210901
Masa de la nuez	0.905897*	-0.256112	0.117055
Volumen de agua	0.882489*	-0.154095	0.035940
Masa del albumen	0.739668*	-0.386387	0.186104
Masa de la concha	0.737560*	-0.317344	-0.126671
Masa de la nuez/masa del fruto	-0.505010	0.204967	0.074849
Masa del endocarpo/masa del fruto	-0.760752	0.173776	-0.137153
Masa de albumen/masa de la nuez	-0.676104*	-0.057086	0.089050
Autovalor	7.863461	2.754478	1.754435
Variación total (%)	43.68590	15.30265	9.74686
% Acumulativo	43.68590	58.98855	68.73541

Los análisis de los patrones de variación morfológica del fruto y de la planta identificaron cinco grupos de plantas diferenciados, que forman parte de la población de cocoteros verdes en dicha región. Estos grupos pueden visualizarse en la Figura 1 y sus características son las siguientes:

### ✿ Grupo I

Las plantas producen frutos de grandes dimensiones, son alargados con aristas pronunciadas. Presentan un alto porcentaje de fibra y alto contenido de albumen, cualidades favorables para la producción de fibra y copra.

Las hojas poseen peciolo largo y lámina foliar corta, con folíolos muy largos y delgados que se presentan en alta densidad. La estructura de la hoja sugiere un peciolo fuerte y una lámina foliar que ofrece poca oposición al viento. Los caracteres de este grupo han sido considerados como pertenecientes al "tipo silvestre" de la especie *Cocos nucifera* Linn. (21, 22). Las plantas de cocoteros de este grupo serán reconocidas como Ecotipos Nativos e incluye a los genotipos 'Inmune' e 'Indio Verde-1'.

**Tabla IV. Media, máximo, mínimo y coeficiente de variación de los 14 caracteres morfológicos evaluados en los 21 ecotipos de cocoteros verdes perteneciente a una población natural de la región de Baracoa**

Ecotipos de cocoteros	Simb.	CT	DI	LH	LP	LF	LL	AF	NFD	NFI	MDF	MDFr	MDN	VDA	MDA	MDC	MDN/MDF	MDC/MDF	MDA/MDN
Inmune	IMN	84	62	415	145	141	270	4,8	115	118	1712,8	638,6	1074,1	378,5	471,41	225	0,6271	0,1314	0,4389
Indio Verde-1	IV-1	96	69	363	143	116	220	3,9	123	121	1727,2	616,88	1110,3	452	467,47	229,1	0,6428	0,1326	0,4210
Enano Verde de Duaba	EVD	73	63	360	114	139	246	4,5	94	96	1613,8	590,36	1023,5	394,4	412,57	228,1	0,6342	0,1414	0,4031
Enano Verde de Sabana	EVS	70	61	315	107	91	208	4,3	92	93	1112,3	355,25	756,23	222,4	331,66	174,1	0,6799	0,1565	0,4386
Super Enano Verde	SEV	68	73	319	109	114	210	4,2	106	102	1717,3	628,87	1090,5	354,7	489,69	243,5	0,6350	0,1418	0,4491
Verde-Cobrizo de Nibujón	CN	92	59	400	128	135	272	5,5	108	103	1316,1	488,54	872,55	292,8	405,29	184,3	0,6630	0,1400	0,4645
Indio Verde Fino	IVF	71	60	360	125	103	235	4,5	104	107	1437,7	482,12	955,58	311,7	393,41	201,7	0,6647	0,1403	0,4117
Enano Aceitoso	EA	65	62	298	109	105	189	5,2	109	111	1582	604,42	977,62	322,2	427,67	275,1	0,6179	0,1739	0,4375
Enano Cobrizo de Sabana	ECS	91	61	296	99	100	197	5	106	108	1768,7	662,25	1106,6	340,6	520,4	215	0,6257	0,1215	0,4703
Indio Verde Aperado de Sabana.	IVAS	75	62	305	97	114	208	5	97	98	1778,5	674,43	1104,1	324,8	535,02	199,5	0,6208	0,1122	0,4846
Indio Verde del Rodeo	IVR	89	61	345	121	105	224	4,8	106	110	1219,8	452,5	997,5	330	469,2	222,3	0,8178	0,1822	0,4704
Indio Verde de Maisí	IVMs	77	49	323	95	100	228	5,4	103	101	1087,1	681,53	947,6	340,5	410,8	193,5	0,8717	0,1780	0,4335
Alto Verde de Maisí	AVMs	85	59	316	110	105	206	5,5	102	93	1178,3	478,45	967,78	318,9	449,97	210,6	0,8213	0,1787	0,4608
Enano Verde de Malasia	EVM	74	47	280	95	120	185	5,1	92	88	1096,6	451,64	644,92	272,1	396,7	172,1	0,5881	0,1570	0,6151
Alto Verde de Sabana	AVS	93	51	332	116	115	216	6,3	113	114	1912,3	704,16	1208,4	419,8	481,89	229,2	0,6319	0,1198	0,3988
Hondureño Verde	HV	86	48	323	113	104	210	4,5	96	94	1521	620,85	900,17	279,1	386,95	207,2	0,5918	0,1362	0,4299
Criollo del Pino	CP	94	55	331	118	117	213	5,3	112	115	1526,4	512,14	1014,2	279,9	432,18	199,3	0,6645	0,1306	0,4261
Cocotero criollo	CC	86	59	342	117	112	225	4,8	119	121	1724,2	667,07	1057,1	371,3	455,83	225,1	0,6131	0,1305	0,4312
Enano Verde de Sabana-1	EVS-1	94	52	331	117	116	214	5,2	114	112	1738,5	632,73	1105,8	366,6	473,43	254,4	0,6361	0,1463	0,4281
Alto Verde de Manglito	AVM	71	81	332	128	116	204	4,3	121	119	1856,7	706,7	1149,8	406,8	497,83	231,3	0,6193	0,1246	0,4330
Indio Verde de Nibujón	IVN	81	54	320	117	112	203	4,9	97	100	1165,5	358,08	956,72	304,7	463,26	208,8	0,8209	0,1791	0,4842
<b>Media</b>		<b>81,667</b>	<b>59,4</b>	<b>333,6</b>	<b>115</b>	<b>113,3</b>	<b>218</b>	<b>4,9</b>	<b>106</b>	<b>106</b>	<b>1513,9</b>	<b>571,79</b>	<b>1001</b>	<b>337,3</b>	<b>446,13</b>	<b>215,7</b>	<b>0,6708</b>	<b>0,1455</b>	<b>0,4491</b>
<b>Mínimo</b>		<b>65,0</b>	<b>47,0</b>	<b>280</b>	<b>95</b>	<b>91</b>	<b>185</b>	<b>3,9</b>	<b>92</b>	<b>88</b>	<b>1087,1</b>	<b>355,25</b>	<b>644,92</b>	<b>222,4</b>	<b>331,66</b>	<b>172,1</b>	<b>0,558</b>	<b>0,112</b>	<b>0,399</b>
<b>Máximo</b>		<b>96,0</b>	<b>81,0</b>	<b>415</b>	<b>145</b>	<b>141</b>	<b>272</b>	<b>6,3</b>	<b>123</b>	<b>121</b>	<b>1912,3</b>	<b>706,7</b>	<b>1208,4</b>	<b>452</b>	<b>535,02</b>	<b>275,1</b>	<b>0,872</b>	<b>0,182</b>	<b>0,615</b>
<b>CV</b>		<b>12,149</b>	<b>13,8306</b>	<b>9,75</b>	<b>11,8</b>	<b>11,22</b>	<b>10,3</b>	<b>11,2</b>	<b>8,82</b>	<b>9,55</b>	<b>18,27</b>	<b>19,21</b>	<b>13,196</b>	<b>16,33</b>	<b>11,03</b>	<b>11,71</b>	<b>12,55</b>	<b>14,99</b>	<b>10,04</b>

CT: circunferencia del tronco; DI: distancia de 9 hojas; LH: longitud de la hoja; LP: longitud del peciolo; LF: longitud del foliolo; LL: longitud de la lámina foliar; AF: ancho del foliolo; NFD: número de folíolos derecho; NFI: número de folíolos izquierdo; MDF: masa del fruto; MDFr: masa de la fibra; MDN: masa de la nuez; VDA: volumen de agua; MDA: masa de albumen; MDC: masa de la concha

#### ✿ Grupo II

Las plantas producen frutos de tamaño medio, con bajo porcentaje de fibra y alto contenido de agua y albumen. Estas características son favorables para la producción de copra y agua. Las hojas presentan peciolo corto y lámina foliar larga, con folíolos largos, gruesos y en baja densidad. La estructura de la hoja sugiere que el peciolo presenta menor fortaleza y que la lámina foliar ofrece alta oposición al viento en relación con el ecotipo nativo, lo cual permite reducir los daños ocasionados por los ciclones que ocurren frecuentemente en el área del Caribe. Las plantas de cocoteros de este grupo serán reconocidas como Ecotipos Indio Verde-1 e incluyen a los genotipos 'Verde Cobrizo de Nibujón', 'Enano Verde de Duaba', 'Criollo del Pino', 'Indio Verde Fino', 'Indio Verde del Rodeo', 'Hondureño Verde', 'Indio Verde de Nibujón', 'Enano Verde de Sabana', 'Alto Verde de Maisí' e 'Indio Verde de Maisí'.

#### ✿ Grupo III

Presentan frutos de tamaño medio, en forma ovoide y redonda, con bajo contenido de fibra, similares contenidos de agua y albumen, favorables para la producción de agua y copra. Las hojas poseen peciolo corto y lámina foliar larga, folíolos largos y gruesos y con densidad media.

Las dimensiones del peciolo sugieren menor fortaleza en las hojas, mientras que el tamaño y la forma de los folíolos en la lámina foliar ofrecen una mayor oposición al viento. Las plantas de cocotero de este grupo serán reconocidas como Ecotipos Indio Verde-2 e incluyen a los

genotipos 'Enano Verde de Sabana-1', 'Alto Verde de Manglito', 'Alto Verde de Sabana' y 'Cocotero Criollo'.

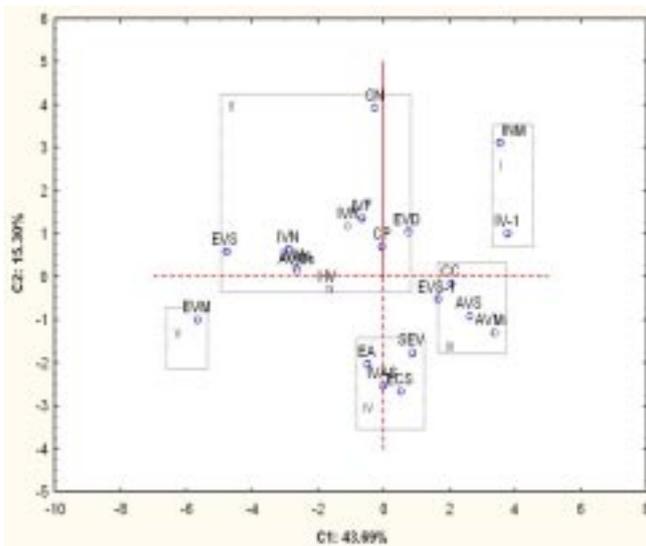
#### ✿ Grupo IV

Las plantas producen frutos de tamaño pequeño y forma ovoide. Presentan un bajo porcentaje de fibra, similares contenidos de agua y albumen, favorables para la producción de copra y agua.

Las hojas poseen peciolo corto y lámina foliar larga, con folíolos largos y gruesos con densidad media. Las dimensiones de la hoja sugieren que puede ofrecer una mayor oposición al viento. Estos caracteres presentados en los grupos II, III y IV han sido considerados como pertenecientes al tipo domesticado de la especie (23, 24). Las plantas de cocotero de este grupo serán reconocidos como Ecotipos Indio Verde-3 e incluye a los genotipos 'Enano Aceitoso', 'Super Enano Verde', 'Indio Verde Aperado de Sabana' y 'Enano Cobrizo de Sabana'.

#### ✿ Grupo V

Está caracterizado por frutos pequeños y redondos. Presentan bajo porcentaje de concha y fibra, con alto contenido de albumen así como baja proporción masa de la concha/masa del fruto. Las hojas son pequeñas, con peciolo largo y lámina foliar corta. Los folíolos son cortos y gruesos presentándose en baja densidad. Los caracteres de este grupo han sido señalados como típicos de poblaciones de cocoteros enanos de Malasia presentes en diferentes regiones del mundo (25, 26). Las plantas de cocoteros de este grupo serán reconocidas como Ecotipo Enano Verde Malayo.



INM: Immune; IV-1: Indio Verde-1; EVD: Enano Verde de Duaba; EVM: Enano Verde de Malasia; SEV: Súper Enano Verde; CN: Verde-Cobrizo de Nibujón; IVF: Indio Verde Fino; IVN: Indio Verde de Nibujón; EA: Enano Aceitoso; ECS: Enano Cobrizo de Sabana; IVAS: Indio Verde Aperado de Sabana; EVS: Enano Verde de Sabana; AVS: Alto Verde de Sabana; HV: Hondureño Verde; CP: Criollo del Pino; EVS-1: Enano Verde de Sabana-1; AVM: Alto Verde de Manglito; AVMs: Alto Verde de Maisí; IVMs: Indio Verde de Maisí; IVR: Indio Verde del Rodeo; CC: Cocotero criollo

**Figura 1. Distribución de los diferentes ecotipos de cocoteros verdes pertenecientes a la población estudiada en la región de Baracoa, según el análisis de componentes principales basado en las variables cuantitativas consideradas. El primer y segundo componentes principales explican el 43.69 y 15.30 % de la variación total, respectivamente**

Estos resultados sugieren que el empleo de los caracteres vegetativos, tales como los parámetros de la hoja y los componentes del fruto, permite la diferenciación de grupos poblaciones o ecotipos de cocoteros con buena precisión. La longitud del pecíolo foliar, asociada a las menores longitudes de las hojas y el número de folíolos verificados para los ecotipos enanos, son características importantes en el sentido de permitir mejorar la distancia de plantación. Además, dicha longitud se encuentra relacionada con el fin de soportar el propio peso de las hojas, así como el peso de los racimos de este tipo de cocotero (27). Comparando los resultados obtenidos para la longitud del pecíolo en nuestro estudio, en el caso del ecotipo Enano Verde de Malasia se apreciaron valores similares a los encontrados en una población de cocoteros enanos malayos del estado Colima en México (22).

La selección natural favoreció los frutos (28) con alto contenido de mesocarpio, bajo contenido de agua, alto contenido de albumen y una baja o retardada germinación, lo cual incrementó su capacidad de colonizar sitios distantes y en donde la flotación constituyó el principal medio de dispersión. Estas características fueron típicas del grupo I o Ecotipos Nativos. Sin embargo, a través de la selección, siembra y dispersión humana (29), se favore-

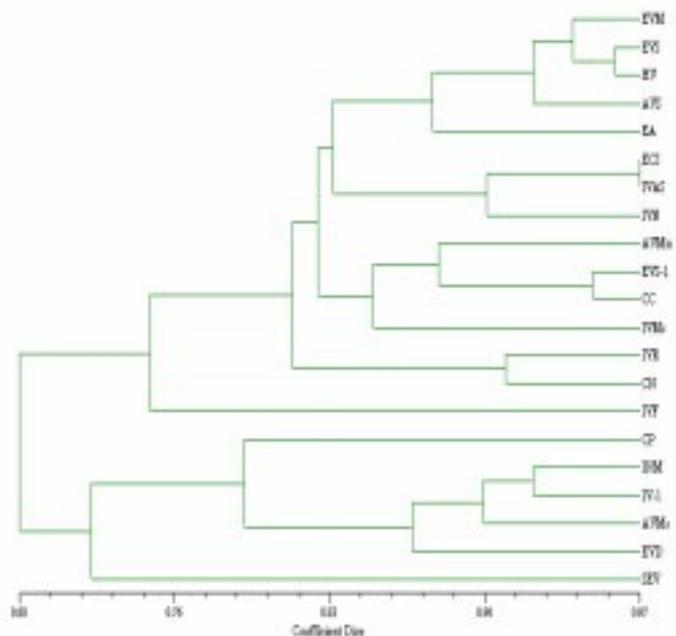
cieron y diseminaron otras variantes que posteriormente contribuyeron al flujo genético entre poblaciones aisladas, lo que permitió una diferenciación asociada al proceso de domesticación de la especie. Dichas variantes presentaron germinación precoz, frutos con bajo porcentaje de fibra, alto contenido de agua y albumen como resultado del proceso de domesticación y son muy similares a las características obtenidas en los grupos Indio Verde 1, 2 y 3.

**Caracterización molecular.** En el análisis molecular de los ecotipos de cocoteros verdes, con el empleo de las cinco combinaciones de cebadores, fue posible identificar un total de 107 bandas, de las cuales 91 fueron polimórficas, lo que representa un 84 % de polimorfismo.

La combinación F1/B1A permitió identificar el mayor número de bandas (31 fragmentos), mientras que la pareja de cebadores F1/B2A identificó el menor número de fragmentos (14 bandas). Las parejas de oligonucleótidos F1/B1A y F7/B1A revelaron solamente marcadores polimórficos, mientras las combinaciones F7/B3 y F1/B2A presentaron un polimorfismo de 61 y 78 %, respectivamente.

La combinación F3/B3 permitió detectar 11 fragmentos polimórficos. Resultados superiores fueron encontrados en un estudio de caracterización de la diversidad genética en cultivares de mango (*Mangifera indica* Linn.) en Cuba, la cual identificó 32 bandas polimórficas (13).

Los resultados del análisis de agrupamiento permitieron la formación de dos grupos (Figura 2).



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

En el primer grupo se incluyen ecotipos enanos, cocoteros de tipo intermedio y algunos altos, muchos de los cuales fueron el resultado de la polinización cruzada que presenta esta especie, la cual favoreció la hibridación en muchas generaciones. Por otra parte, se localizan principalmente ecotipos pertenecientes a los grupos II, III y IV (obtenidos en el análisis morfológico), que presentan características del tipo domesticado de la especie. Los estudios evolutivos en *Cocos nucifera* L. sugieren que el proceso de diferenciación asociado a la domesticación se desarrolló antes de su posible introducción en el Caribe (23). Por tanto, las introducciones de cocotero en las costas de Baracoa debieron involucrar propágulos de poblaciones previamente diferenciadas.

Dentro del grupo II, se incluyen ecotipos que, según los estudios históricos, estos tipos de cocotero fueron introducidos de las costas occidentales de África a Puerto Rico hacia 1549 y posteriormente a Cuba y México. Estos procedían de un número reducido de semillas de una plantación de Mozambique, que los portugueses sembraron en Cabo Verde (5, 30, 31). Por otra parte, se localizan los ecotipos considerados como cocoteros nativos (Inmune e Indio Verde-1), que presentan características del tipo silvestre de la especie, los cuales se han propuesto que son el resultado de la selección natural en donde la flotación constituyó el principal medio de dispersión (21).

Estos resultados demuestran la potencialidad de los marcadores ISTR para realizar estudios de diversidad molecular en el cocotero. El empleo de varias combinaciones de cebadores ISTR permitieron obtener patrones de bandas polimórficos, que caracterizaron la diversidad genética de la población de cocotero verde de la región de Baracoa. Resultados similares fueron obtenidos en estudios de diversidad en coco (*Cocos nucifera* L.) (11, 12). El polimorfismo generado mediante ISTR ha sido utilizado en estudios de variabilidad genética en el género *Musa* (32), en el análisis de las relaciones genéticas de los 30 principales cultivares de mango (*Mangifera indica* L.) en Cuba (13) y en una población de híbridos de guayaba (*Psidium guajava* L.) (33).

En el presente trabajo, el análisis de la variación morfológica indicó que se presentan los dos tipos de patrones morfológicos descritos para la especie. En varios de los ecotipos se presentan características del "tipo silvestre" (frutos alargados, aristas pronunciadas, alto porcentaje de mesocarpio), los cuales se han propuesto que son el resultado de la selección natural, en donde la flotación constituyó el principal medio de dispersión (20). También se presentaron características del "tipo domesticado" (frutos redondos, bajo porcentaje de mesocarpio, alto contenido de agua y endospermo sólido), propuestas como resultado del proceso de domesticación (23, 24).

Por otra parte, este estudio sugiere que durante el proceso evolutivo de la especie en la región de Baracoa, ocurrió una diferenciación ecotípica en la estructura de la planta y las hojas. Probablemente ocurrió producto de la

adaptación a diferentes condiciones ecológicas en un largo lapso de tiempo. Resultados similares fueron encontrados en el estudio de la diversidad genética del cocotero en México (20).

El análisis molecular de los diferentes ecotipos de cocoteros verdes sugiere que en el proceso evolutivo del cultivo en dicha zona, se introdujeron cocoteros que involucraron un número de semillas relativamente pequeño o materiales procedentes de poblaciones previamente diferenciadas. 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 y que la intervención humana ha tenido una influencia de manera determinante en la dinámica del proceso evolutivo del cocotero (6).

La búsqueda de correlación entre caracteres morfológicos, fisiológicos y genéticos con la resistencia y la productividad, podría conducir al descubrimiento de marcadores genéticos para el desarrollo de programas de mejoramiento y conservación en el cocotero. Estos marcadores serían particularmente relevantes, debido a que se trata de una especie de ciclo de vida largo y a la enorme dificultad para realizar las evaluaciones de resistencia en el campo.

La utilización de marcadores genéticos de variedad, resistencia y productividad podrían permitir eventualmente la selección de plantas élites en lapsos de tiempo sustancialmente más cortos (20).

## REFERENCIAS

1. Parrotta, J. A. *Cocos nucifera* L. coconut palm, palma de coco. SO-ITF-SM-57. New Orleans, LA: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Southern Forest Experiment Station, 1993. 7 p.
2. Phillips, L. R. The coconut. This document is Fact Sheet HS-40, a series of the Horticultural Sciences Department, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. [Consultado 6-2004]. Disponible en: <<http://www.plantapalm.com/vpe/misc/the-coconut.pdf>>.
3. Ferreira, J. M.; S.; Warwick, R. N. y Siquiera, L. A. A cultura do coqueiro no Brasil. Brasília: Ed. EMBRAPA. 1998. 292 p.
4. Cueto, J. R.; Alonso, M.; Llauger, R.; Rohde, W.; Romero, W.; Becker, D.; González, V.; Rodríguez, M.; Juncal, J. y Fajardo, D. Principales ecotipos del germoplasma *in situ* de cocotero (*Cocos nucifera* L.) en Baracoa y Maisí, Guantánamo. En: Memorias Convención Trópico (2004:Guantánamo).
5. Cueto, J. R.; Alonso, M.; Llauger, R.; González, V. y Romero, W. Historia del cultivo de cocotero (*Cocos nucifera* L.) en Cuba: su origen en la región de Baracoa. [Consultado 6-2007]. Disponible en: <[www.fao.org/docrep/](http://www.fao.org/docrep/)>.
6. Cueto, J. R.; Delgado, I.; Rivero, W. Los contenidos foliares de N, P y K en el cocotero "Indio verde" y su relación con los rendimientos. *Ciencia y Técnica de la Agricultura*, 1989, vol. 12, no. 4, p. 111-119.

7. Zizumbo-Villarreal, D. y Piñero, D. Pattern of morphological variation and diversity of *Cocos nucifera* L. (Arecaceae) in Mexico. *American Journal of Botany*, 1998, vol. 85, no. 6, p. 855-865.
8. Karp, A.; Seberg, O. y Buiatti, M. Molecular techniques in the assessment of botanical diversity. *Annals of Botany*, 1996, vol. 78, p. 143-149.
9. Rohde, W. 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.*, 1996, vol. 50, p. 249-261.
10. Rohde, W.; Kullaya, A.; Rodríguez, J. y Ritter, E. 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.*, 1995, vol. 49, p. 179-186.
11. Rohde, W.; Becker, D.; Kullaya, A.; Rodríguez, J.; Herran, A. y Ritter, E. Analysis of coconut germplasm biodiversity by DNA marker technologies and construction of a genetic linkage map. En: *Current Advances in Coconut Biotechnology*. Kluwer Academic Publishers, 1999, p. 99-121.
12. Duran, Y.; Rohde, W.; Kullaya, A.; Gaikaetxea, P. y Ritter, E. Molecular analysis of East African tall coconut genotypes by DNA marker technology. *J. Genetics & Breed.*, 1997, vol. 51, p. 279-288.
13. Capote, M.; Becker, D.; Cueto, J. y Rohde, W. Development and application of various DNA marker types for the characterization of genetic diversity within commercial mango varieties in Cuba. *J. Genet. and Breed.*, 2003, vol. 57, p. 175-184.
14. Ramírez, I. M.; Fuentes, J. L.; Rodríguez, N. N.; Cueto, J. R. y Rohde, W. DNA polymorphism in Cuba varieties of avocado (*Persea americana* Mill.) as detected by Inverse Sequence Tagged Repeat (ISTR). *Cultivos Tropicales*, 2003, vol. 23, no. 3, p. 75-85.
15. Donini, P.; Cooke, R. y Reeves, R. Molecular markers in variety and seed testing. En: *Proceedings of International Symposium on Plant Genetic Engineering*. p259-260, CIGB, Havana, 1999.
16. IPGRI. Descriptors for coconut (*Cocos nucifera* L.). International Plant Genetic Resources Institute, Rome, 1998. 61 p.
17. Doyle, J. J. y Doyle, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 1990, vol. 12, no. 1, p. 13-15.
18. Dice, L. R. Measures of the amount of ecological association between species. *Ecology*, 1945, vol. 26, p. 297-302.
19. Rohlf, F. J. NTSYS-PC, numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 2.1. Exeter Software, Setauket, New York. [Consultado 16-9-2005]. Disponible en: <<http://www.exetersoftware.com/cat/ntsypc.html>>.
20. Zizumbo-Villarreal, D. Diversidad del cocotero en México y su evaluación al amarillamiento letal. *Bol. Soc. Bot. México*, 1998, vol. 62, p. 157-170.
21. Harries, H. C. Practical identification of coconut varieties. *Oleagineux*, 1978, vol. 36, no. 2, p. 63-72.
22. Zizumbo-Villarreal, D. y Colunga-GarcíaMarín, P. Morphological variation and phenotypic plasticity in Mexican populations of coconut (*Cocos nucifera* L.). *Genetic Resource and Crop Evolution*, 2001, vol. 48, p. 547-554.
23. Harries, H. C. Malesian origin for a domestic *Cocos nucifera* L. En: *Bans P. et al. (eds), The plant diversity of Malesia*, Dordrecht. Kluwer, 1990. p. 351-357.
24. Zizumbo-Villarreal, D.; Ruiz-Rodríguez, M.; Harries, H. y Colunga-GarcíaMarín, P. Population genetics, lethal yellowing disease, and relationships among Mexican and imported coconut ecotypes. *Crop Science*, 2005, p. 1-22.
25. Vargas, C. A. y Blanco, F. A. Fruit characterization of *Cocos nucifera* L. (Arecaceae) cultivars from Pacific Coast of Costa Rica and the Philippines. *Genetic Resource and Crop Evolution*, 2000, vol. 47, p. 483-847.
26. Cueto, J. R.; Alonso, M.; Romero, W.; Llauger, R.; Rodríguez, M. y González, V. Caracterización morfológica de ecotipos del germoplasma *in situ* de cocoteros (*Cocos nucifera* L.) en Baracoa, Guantánamo. En: *Memorias FITOGEN (2003:Guantánamo)*. 18 p.
27. Jucá, M. P.; Gaíva, H. N.; Pereira, W. E. y Mileski, A. Comportamento vegetativo de seis cultivares de coqueiro-anão (*Cocos nucifera* L.), em Santo Antônio de Levenger-MT. *Rev. Brás. Frutic*, 2002, vol. 24, no. 2, p. 463-467.
28. Harries, H. C. Coconut. En: *Evolution of Crop Plant 2*. Edition. London:Scientific and Technical Logman. p. 351-357.
29. Zizumbo-Villarreal, D.; Cordeña-López, R. y Piñero, D. Diversity and phylogenetic analysis in *Cocos nucifera* L. in Mexico. *Genetic Resource and Crop Evolution*, 2002, vol. 49, p. 237-245.
30. Harries, H. C. Coconut varieties in America. *Oleagineux*, 1971, vol. 26, p. 235-242.
31. Zizumbo-Villarreal, D. El cultivo del cocotero en el occidente de México, siglos XVI-XVIII. En: *Agricultura y Agronomía en México: 500 años*. Universidad Autónoma Chapingo, 1993. p. 257-280.
32. Román, M. I. Estudio de la diversidad genética en el género *Musa* (*Musa* sp). [Tesis de doctorado]; Universidad de La Habana. 2004. 80 p.
33. Rodríguez, N. N.; Valdés-Infante, J.; Becker, D.; Velázquez, B.; Coto, O.; Ritter, E. y Rohde, W. Morphological, agronomic and molecular characterization of Cuban accessions of guava (*Psidium guajava* L.). *Journal of Genetics and Breeding*, 2004, vol. 58, p. 70-90.

Recibido: 9 de noviembre de 2006

Aceptado: 1 de agosto de 2007