

Análisis de diversidad genética en materiales tolerantes y susceptibles a la pudrición de cogollo en palma de aceite mediante marcadores moleculares

Genetic Diversity Analysis in Oil Palm Material Tolerant and Susceptible to Bud Rot by Means of Molecular Markers

Diana M. Arias M.¹
Pedro Rocha S.²

Resumen

La incidencia de la pudrición de cogollo (PC) en Colombia, especialmente en la Zona Oriental del país, ha agudizado las pérdidas económicas del sector debido a una disminución media de 28,6% en la producción de aceite de palma. Por tanto, el programa de mejoramiento genético de Cenipalma, con su laboratorio de marcadores moleculares, incorpora metodologías tales como RAPD, AFLP y microsatélites (SSR) para acelerar o apoyar la selección de individuos tolerantes a esta enfermedad. En el presente estudio se utilizaron muestras foliares de palma de aceite provenientes de materiales *E. guineensis*, de diferentes casas comerciales y *E. oleifera* del banco de germoplasma de Cenipalma. El ADN de estos materiales fue aislado mediante el empleo de una nueva metodología de extracción que se reporta aquí. El ADN obtenido fue analizado con las técnicas RAPD, AFLP y SSR. Con los puntos de información obtenidos de cada técnica se establecieron relaciones de similitud genética entre las accesiones. En el material *E. oleifera*, que presenta tolerancia (o incluso resistencia) a la enfermedad, se evidenció amplia variabilidad genética con respecto a los materiales *E. guineensis* susceptibles que presentaron una limitada diversidad genética.

Summary

The incidence of the bud rot complex disease (called PC for its name in Spanish) in the Eastern Zone of Colombia is responsible for economic losses calculated in 28.6% of the total palm oil production. For this reason, Cenipalma's breeding program, with the support of its molecular markers laboratory, incorporated several methodologies such as RAPD, AFLP and microsatellites (SSR) in order to accelerate the selection of individuals displaying tolerance against the PC disease. In this study, leaf samples from commercial *E. guineensis* and *E. oleifera* from Cenipalma's germplasm bank were used. A new method for DNA isolation was developed and it is reported here. The purified DNA was used in RAPD, AFLP and SSR analyses. The information obtained by using these techniques allows establishing the genetic distances between accessions. *E. oleifera*, which presents tolerance (if not resistance) against the PC disease, showed broad genetic variability when compared to susceptible *E. guineensis* materials, which displayed a limited genetic diversity.

Palabras clave

Selección asistida por marcadores, ADN, RAPD, AFLP, SSR, marcadores moleculares, pudrición de cogollo

1. Investigadora del Programa Jóvenes Investigadores de Colciencias.
2. Investigador titular, Director Laboratorio de Marcadores Moleculares, Cenipalma. E-mail: pedro.rocha@cenipalma.org

Recibido: 27 de agosto de 2004. Aprobado: 23 de septiembre de 2004

Introducción

En Colombia la palma de aceite (*Elaeis guineensis* Jacq.) es afectada por un gran número de enfermedades que causan cuantiosas pérdidas al sector palmero. Una de las enfermedades de mayor impacto es el complejo de pudrición de cogollo (PC), que arroja pérdidas de miles de dólares (30 dólares/ha/año) en manejo sanitario (Acevedo, *et al*, 2000). Esta enfermedad apareció por primera vez en el país hacia el año 1964 en la plantación «La Arenosa» de Codelsa, en Turbo (Antioquia), afectando a palmas de dos años de edad, lo que llevó a la quiebra y desaparición de esa plantación (Acosta, 1991; Nieto y Gómez, 1991).

La PC se expresa internamente como una pudrición húmeda y fétida de los folíolos de las hojas que aún no han abierto, lo cual afecta los folíolos superiores y medios del raquis. Por lo general, en la PC de la Zona Oriental las palmas enfermas se recuperan de manera natural debido a que no se comprometen los tejidos meristemáticos, mientras que la PC que afecta a la Zona Occidental colombiana y a la zona nororiental de Ecuador se constituye en letal debido a que causa daños irreparables en los tejidos internos (Franqueville, 2001).

Hasta el momento no hay claridad sobre la etiología de la enfermedad y se ha relacionado con diversos factores abióticos de naturaleza fisiológica y biótica de naturaleza patógena. Se ha sugerido que *Thielaviopsis paradoxa* sea el agente causal de la PC (Nieto y Gómez, 1991). Estudios preliminares han reportado que ningún elemento nutritivo en forma individual se asocia con la incidencia de PC (Gómez, 1995), aunque es posible que el desequilibrio de nutrientes en el suelo, junto con el exceso de agua, entre otros, se conviertan en factores predisponentes a la enfermedad (Munévar *et al*, 2001).

Todos los materiales comerciales de la palma de aceite (Ténera) han mostrado en mayor y menor grado susceptibilidad a la PC. Por su parte, la palma de aceite americana (*E. oleífera*) y el híbrido interespecífico (*E. oleífera* X *E. guineensis*, OxG) han presentado tolerancia (si no resistencia) a la enfermedad en Colombia (Corley y Tinker, 2003; Hartley, 1988), no así en Ecuador, en donde se ha reportado incidencia de PC en las progenies en algunos cruces OxG (Rocha, *et al*, 2004). Evidencia de campo obtenida de plantaciones comerciales ha sugerido que la resistencia presente en *E. oleífera* y en los híbridos OxG es una característica con comportamiento mendeliano (Rocha, 2002).

Las metodologías de marcadores moleculares sobre el ADN han ampliado el campo de acción del fitomejoramiento de cultivos agrícolas. Los análisis del genoma con base en la detección de polimorfismos en los cultivos permiten desarrollar mapas de ligamiento de genes, identificar huellas genéticas, hacer selección asistida por marcadores e investigación de relaciones genéticas (Rocha, 2003). La información obtenida con las técnicas de marcadores moleculares permite establecer relaciones de similitud genética entre accesiones y puede ser usada para ejecutar diseños racionales de cruzamientos, conservación de germoplasma y manejo de recursos genéticos (Powell, *et al*, 1996).

Los marcadores moleculares de mayor uso en la detección de la variabilidad genética son los RAPD, AFLP y SSR. Estas técnicas ofrecen información sobre las relaciones inter e intraespecíficas y permiten desarrollar estrategias para el mejoramiento de cada especie o para la obtención de híbridos exitosos (Shah, *et al*, 1994). La técnica RAPD

(polimorfismos de ADN amplificado aleatoriamente) permite detectar secuencias polimórficas utilizando cebadores sencillos que amplifican fragmentos arbitrarios del ADN blanco. La técnica de AFLP (polimorfismos en la longitud de los fragmentos amplificados) se utiliza para la obtención de un gran número de marcadores moleculares distribuidos en el genoma (Vos, *et al.*, 1995). Los SSR son regiones de secuencias repetidas que están distribuidas a todo lo largo del genoma. Dichas regiones presentan un alto nivel de polimorfismo (Rocha, 2003).

Los experimentos típicos de programas de mejoramiento, análisis de diversidad genética en poblaciones naturales y caracterización de germoplasma comprometen por lo general a centenas o millares de individuos. En este contexto, las técnicas de RAPD, AFLP y SSR se constituyen en herramientas valiosas que permiten llevar a cabo análisis genéticos detallados de un gran número de marcadores (Grattapaglia, *et al.*, 1992).

Una alternativa para el manejo de las enfermedades es el mejoramiento genético. Un ejemplo claro es la generación de variedades de palma africana resistentes a la Fusariosis (Franqueville y Renard, 1990). Cenipalma, mediante el programa de mejoramiento genético, busca desarrollar materiales tolerantes adaptados a las distintas zonas productoras colombianas, para lo cual cuenta con un laboratorio de marcadores moleculares, que incorpora metodologías que podrían acelerar el proceso de selección de material tolerante a la PC.

Materiales y métodos

El presente estudio se llevó a cabo en el laboratorio de marcadores moleculares de Cenipalma (Bogotá). Las palmas muestreadas provinieron

de lotes comerciales de las plantaciones La Cabaña, Palmar del Oriente y el banco de germoplasma de Cenipalma (Campo Experimental Palmar de La Vizcaina).

El material vegetal utilizado incluyó folíolos de palma provenientes de los cruces Ekona/ Deli x Ekona (20 muestras); Ekona/ Deli x La Mé (20 muestras); Tanzania x Avros (13 muestras) y Deli x Avros (14 muestras), suministrados por la plantación Palmar del Oriente. El material *E. guineensis* IRHO (29 muestras) provino de la plantación La Cabaña y el material *E. oleífera* (41 muestras) del banco de germoplasma (Rey, *et al.*, 2003). En total se analizaron 137 muestras.

Extracción del ADN de la palma de aceite

La metodología de la extracción del ADN nuclear se realizó inicialmente de conformidad con el protocolo reportado por Rocha (2002). Sin embargo, se generó una nueva metodología de aislamiento de ADN que se describe a continuación.

Los folíolos fueron marcados, registrados y finalmente incubados a -70°C, para luego realizar la ruptura de tejidos y paredes celulares utilizando nitrógeno líquido. El tejido finamente pulverizado se almacenó en tubos de 15 ml (falcon) a -70 °C hasta su uso. Para la extracción de ADN se colocaron 500 mg de tejido en un tubo eppendorff de 2.0 ml previamente enfriado. A esta cantidad de tejido se le añadieron 1,2 ml de solución de extracción (Tris HCl 100 mM, pH 8.0; EDTA 50 mM, pH 8.0; NaCl 500 mM; β -mercaptoetanol 10 mM y 1% (p/v) de PVP-360.000) precalentada a 65°C. El procedimiento de extracción se llevó a cabo en cámara extractora de vapores.

La mezcla se agitó a máxima velocidad durante 5 segundos con un agitador vortex™, posteriormente

se agregaron 85 µl de SDS (dodecil sulfato de sodio) al 20% para solubilizar proteínas y membranas. Los tubos que contenían la mezcla se incubaron en baño maría a 65°C durante 30 minutos. Para facilitar la homogeneización del tejido y la solubilización del ADN en la solución de extracción, la mezcla se agitó cada 10 minutos. Luego se agregaron 390

de acetato de potasio 5 M a cada mezcla para precipitar las proteínas. La mezcla se centrifugó a 12.500 xg durante 15 minutos. El sobrenadante se transfirió a un tubo limpio y se le adicionó 1 ml de isopropanol frío para precipitar los ácidos nucleicos. La mezcla se incubó a -20°C durante toda la noche. Después se centrifugó a 25.000 xg, durante 30 minutos. Se desechó el líquido, teniendo cuidado de no perturbar el botón de ADN. Para lavar las sales se utilizaron 2 ml de etanol al 70% y en seguida se centrifugó a 25.000 xg, durante 3 minutos. Finalmente, se dejó secar el botón a temperatura ambiente y se le adicionó un volumen de 350 (µl de solución TE-ARNasa (Tris HCl 10 mM, pH 8.0; EDTA 1 mM, pH 8.0 y 5 mg/ml de ARNasa). La mezcla se incubó a 37°C durante 15 minutos para degradar el ARN presente. El ADN obtenido se almacenó a 4°C para su posterior utilización.

Cuantificación del ADN

La cuantificación del ADN se realizó mediante un método comparativo, empleando como patrón de referencia

ADN genómico de tomate suministrado por el *kit AFLP Analysis System I*. El procedimiento consistió en realizar una electroforesis en gel de agarosa al 0,7% teñido con bromuro de etidio (0,5 µg/ml), en el que se sembró el patrón de ADN de tomate a diferentes concentraciones (25, 50, 100 y 200 ng/µl) y las muestras de ADN por cuantificar. La determinación de las concentraciones de las bandas se realizó sobre un transiluminador de luz ultravioleta (TFX-35M *Life Technologies*) mediante la comparación de la fluorescencia de los patrones con las distintas muestras.

Implementación de técnicas

RAPD (polimorfismo de ADN amplificado aleatoriamente)

Esta técnica está basada en la metodología de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) y consiste en la amplificación de fragmentos de ADN con un cebador de diez nucleótidos que se alinea al ADN molde de manera aleatoria (Rocha, 2003).

La implementación de esta técnica se basó en la metodología originalmente descrita por Williams, *et al*, (1990). Se emplearon cinco cebadores anteriormente evaluados en palma (Ochoa, *et al*, 1997) (Tabla 1). Para la reacción de amplificación se utilizaron 50 ng de ADN, solución tampón 1X (Tris-HCl 20 mM, pH 8.4; KCl 50 mM), MgCl₂ 3 mM, 2 µM de cebador (sintetizado por Invitrogen), 200 µM de dNTP (Invitrogen) y 2.5 U de Taq DNA polimerasa (Invitrogen). El volumen total de la reacción fue de 25µl.

Las reacciones transcurrieron en un termociclador PTC-100 (MJ Research), programado de la siguiente manera: 3 minutos a 94°C (denaturación inicial), seguido por 35 ciclos de amplificación, cada uno compuesto por los siguientes pasos: 94°C

Tabla 1 Cebadores utilizados para la reacción de amplificación RAPD. Nomenclatura y secuencias obtenidas de *Operon Technologies, Inc.*

Cebador RAPD	Secuencia 5' -3'
A-08	GTGACGTAGG
B-06	TGCTCTGCCC
H-06	ACGCATCGCA
L-12	GGGCGGTACT
W-05	GGCGGATAAG

Tabla
2Cebadores reportados por Billotte, *et al.* (2001) utilizados para la reacción de amplificación (SSR)

Locus que amplifican	Código de los cebadores SSR	Cebadores	
		Directo	Reverso
mEgCIR0008	PRO1F-PRO1R	CGGAAAGAGGGAAGATG	ACCTTGATGATTGATGTGA
mEgCIR0009	PRO2F-PRO2R	CAGTCTTTAAGTACGGCTATGAT	GAATTTTATAGTTCAACCAGGTAGA
mEgCIR0018	PRO3F-PRO3R	CCTTATTTTCTTTGCTTACC	TTCTATTTTATTTTCTTCCT
mEgCIR0046	PRO4F-PRO4R	AGCCTTAGTATTTTGTGAT	CCTCTGATTTGTCCTTTTGG
mEgCIR0067	PRO5F-PRO5R	TACACAACCCATGCACAT	AAAAACATCCAGAAATAAAA
mEgCIR0219	PRO6F-PRO6R	TTTGCTCGGCGGATACAT	CTCACTGGCCTCTTTCTT
mEgCIR0221	PRO7F-PRO7R	TGCCATGTTCCAGAGAGC	TTCAGATTTTCCGACTTC
mEgCIR0230	PRO8F-PRO8R	CCCTGGCCCCGTTTTC	AGCGCTATATGTGATTCTAA
mEgCIR0254	PRO9F-PRO9R	CCTTTTGTGCTTCTTC	GCTGTGCTAGGTTTC
mEgCIR0304	PRO10F-PRO10R	CCACAAACAATCCAAGCAAGT	TGGCATAACACGAAAGCATAA

durante 1 minuto, 36°C durante 1 minuto (alineamiento), 72°C durante 2 minutos (extensión). Un paso de extensión final de 7 minutos a 72°C fue incorporado para amplificar los productos parcialmente generados.

El producto de la PCR (amplicones) fue analizado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,4% en TBE 1X (Sambrook y Russell, 2001). El gel fue teñido con bromuro de etidio y las bandas visualizadas a través del transiluminador.

Microsatélites

Los microsatélites son regiones de secuencias repetidas (conocidas también como SSR, por sus siglas en inglés) que están distribuidas a lo largo del genoma. Se caracterizan por estar «flanqueadas» por secuencias altamente conservadas. Dichas secuencias microsatélites pueden ser amplificadas mediante PCR usando cebadores específicos, diseñados a partir de las secuencias flanqueantes conservadas de los microsatélites aislados de una genoteca genómica (Rocha, 2003).

Condiciones de amplificación

La amplificación de los microsatélites mediante PCR se llevó a cabo en un

volumen final de 25 μ l. Se utilizaron 50 ng de ADN y se emplearon los cebadores reportados por Billotte, *et al.* (2001) (Tabla 2). La reacción contenía: solución tampón 1X (Tris-HCl 20 mM, pH 8.4 y KCl 50 mM), MgCl₂ 1,5 mM; 0,2 μ M de cada cebador (sintetizado por Invitrogen); 200 μ M de dNTP (Invitrogen) y 1 U de Taq DNA polimerasa (Invitrogen).

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 1 minuto a 95°C (denaturación inicial), seguido por 35 ciclos de amplificación, cada uno compuesto por los siguientes intervalos de temperatura: 94°C durante 30 segundos; 52°C durante 1 minuto y 72°C durante 2 minutos. Un paso de extensión final a 72°C durante 8 minutos.

Elaboración del gel denaturante de poliacrilamida

Para la verificación del producto amplificado se realizó una electroforesis en gel denaturante de poliacrilamida al 5% y 8 M de urea, conforme al protocolo del laboratorio de marcadores moleculares de Cenipalma (Rocha y Arias, 2004).

La solución de poliacrilamida al 5% y 8M de urea se preparó adicionando 17 ml de acrilamida al 30% (1,5 g de N-N' metilen-bis-acrilamida,

28,5 g de acrilamida y 80 ml de agua destilada desionizada), 48,05 g de urea y 20 ml de buffer TBE 5X, hasta completar un volumen de 100 ml con agua destilada desionizada (Milli-Q_{lus} conductividad de 0,055 $\mu\text{S}/\text{cm}$).

El lavado de los vidrios y la cámara de secuenciación (*Sequi-Gen cell* 38x50, Bio-Rad) se realizó con abundante agua y jabón comercial (Axion). Posteriormente los vidrios se limpiaron tres veces con etanol absoluto. Se esparcieron 600 μl de la solución de pegado (1 μl de bind silane [Sigma], 5 μl de ácido acético glacial y 954 μl de etanol al 95%) a través de todo el vidrio. La solución aplicada al vidrio se dejó evaporar durante 5 minutos. De igual forma se aplicaron 5 ml de antiempañante comercial (Lluviex) al vidrio de la cámara y se dejó evaporar durante 5 minutos. Finalmente, se armó la cámara de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

En un vaso de precipitado que contenía 100 ml de poliacrilamida se adicionaron 60 μl de temed (Sigma) y 300 μl de persulfato de amonio al 10% (p/v). La solución se sirvió con cuidado con una jeringa plástica de 50 ml. La polimerización del gel duró toda la noche.

La cámara de electroforesis fue ensamblada al sistema según las instrucciones del fabricante. La precorrida se realizó sembrando 2 μl de solución de carga 2X (95% de formamida, 0,05% de azul de bromofenol y 0,05% de xilene cyanol), dejando un pozo de por medio para verificar el estado de los mismos. La fuente de poder (*Power Pac* 3000, Bio-Rad) se programó para que suministrara 100 W constantes durante 20 minutos, tiempo suficiente para alcanzar una temperatura de 50°C.

A 25 μl de muestra, resultado de la amplificación, se le añadieron 15 μL de solución de carga 2X. Las muestras

se denaturaron a 94°C durante 3 minutos en el termociclador, y de inmediato fueron enfriadas en una cubeta con hielo. El exceso de urea se removió de los pozos con una jeringa y se sirvieron 5 μl de cada muestra previamente desnaturada a cada pozo. La duración de la electroforesis fue de 1,5 horas.

Tinción del gel con nitrato de plata

Una vez finalizada la electroforesis se desarmó la cámara y se colocó el gel (pegado al vidrio) en agitación durante 20 minutos, dentro de una cubeta de acrílico que contenía solución fijadora (ácido acético 10%). Luego el gel se lavó dos veces con agua destilada desionizada, durante 1 minuto cada vez, con agitación constante (100 r.p.m.). Posteriormente el gel se incubó en solución de tinción (2 g de AgNO_3 , 3 ml de formaldehído al 37%, en 2 L de agua), con agitación permanente y completa oscuridad, durante 35 minutos. El exceso de plata se retiró con agua destilada desionizada durante 5 segundos. Después el gel se mantuvo en agitación constante y bajo oscuridad, durante 4 minutos (o hasta visualizar las bandas) en la solución de revelado (60 g de Na CO_3 3 ml de formaldehído al 37% y 400 μl de tiosulfato de sodio [10 mg/ml] en 2 L de agua), previamente enfriada a 4°C. Por último, el gel se incubó durante 5 minutos en solución de parada (ácido acético 10%) y se lavó durante 5 minutos con agua destilada desionizada. El gel teñido se dejó secar a temperatura ambiente durante toda la noche. La imagen del gel se llevó a formato electrónico mediante la utilización de un escáner (HP ScanJet 3200C).

AFLP (polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados)

El ensayo de AFLP combina la especificidad, resolución y poder de

muestreo de la digestión con enzimas de restricción con la velocidad y practicidad de la detección de polimorfismos vía PCR (Vos, *et al*, 1995). Para el desarrollo de la técnica de AFLP se utilizó el *kit AFLP Analysis System I* (Invitrogen). Sin embargo, se realizaron modificaciones al manual suministrado por el fabricante, las cuales son presentadas a continuación:

Digestión del ADN

La digestión enzimática se realizó en un volumen final de 25 μ l, adicionando a 270 ng de ADN, 2 U de EcoRI, 2 U de MseI y 5 μ l de solución tampón de reacción (Tris-HCl 50 mM, pH 7.5; acetato de magnesio 50 mM y acetato de potasio 250 mM). Posteriormente, se incubó la mezcla durante 2 horas a 37 °C en un termociclador e inmediatamente después se incubó a 70°C durante 15 minutos para inactivar las endonucleasas de restricción. En este paso se almacenaron las reacciones a 4°C.

Ligación de adaptadores

La ligación de los adaptadores a los extremos cohesivos de los fragmentos de restricción se realizó adicionando, a los 25 μ l de la reacción de ADN digerido, 24 μ l de solución de ligación de adaptadores (adaptadores EcoRI/MseI; 0.4 mM de ATP; Tris-HCl 10 mM, pH 7.5; acetato de magnesio 10 mM y acetato de potasio 50 mM) y 1 μ l T4 DNA ligasa (1U/ μ l). La mezcla se incubó a 20°C durante dos horas en el termociclador y posteriormente se realizó una dilución 1:10 (10 ml de la mezcla de ligación y 90 μ l de TE). La porción no usada de la mezcla de ligación se almacenó a -20°C para posteriores reacciones.

Pre amplificación

La reacción de preamplificación con los cebadores que contienen una base selectiva (PCR+1) se realizó adicionando a un tubo de PCR de 0,2 ml los

siguientes componentes: 5 μ l de la mezcla de dilución (1:10) del paso anterior; 40 μ l de mezcla de cebadores para la preamplificación; 5 μ l de solución tampón 10X (que contenía MgCl₂ 15 mM) y 1 μ l de Taq DNA polimerasa (5 U/ μ l). Las reacciones fueron llevadas al termociclador, programado así: 30 segundos a 94°C, 1 minuto a 56°C y 1 minuto a 72°C, durante 20 ciclos. El resultado de esta PCR se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. El resultado del PCR+1 fue diluido diez veces (10 μ l de muestra y 90 μ l de TE). Las reacciones diluidas y no diluidas se almacenaron a -20°C.

Amplificación

La PCR +3 se llevó a cabo en un volumen final de 20 μ L. Cada reacción incluyó 5 μ l de ADN (PCR+1 diluido 1:10), 2 μ l de solución tampón 10X (Tris-HCl 200 mM, pH 8.4; MgCl₂ 15 mM y KCl 500 mM), 0,5 μ l del cebador *EcoRI-primer* y 4,5 μ l del cebador *MseI-primer*, 7,9 μ l de agua destilada y 0,1 μ l de Taq DNA polimerasa (5 U/ μ l). Las combinaciones de cebadores empleadas aquí fueron reportadas, según la literatura, como polimórficas para palma de aceite (Purba, *et al*, 2000; Rajinder, *et al*, 1998; Barcelos, 1998) (Tabla 3). Las reacciones de PCR fueron llevadas a cabo durante 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 65°C y 60 segundos a 72°C, durante 1 ciclo. Posteriormente la temperatura de alineamiento bajó 0,7°C en cada ciclo durante 12 ciclos (*touch down*) y continuó con 30 segundos a 94°C, 60 segundos a 56°C y 60 segundos a 72°C, durante 23 ciclos. El resultado de la PCR se almacenó a 4°C. Para la verificación del producto amplificado se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida al 5% y 8 M de urea, teñido con nitrato de plata, conforme al protocolo anteriormente descrito.

Tabla 3 Combinaciones de cebadores empleados para AFLP

Cebadores
E-ACT/M-CAA
E-ACA/M-CAG
E-ACC/M-CAA
E-ACC/M-CAG
E-ACC/M-CAC
E-ACT/M-CAT
E-ACT/M-CTA

La descripción de los materiales analizados con AFLP es mostrada en la Tabla 4.

Análisis de datos

Las bandas polimórficas en el gel fueron registradas visualmente con la ayuda de un transiluminador de luz blanca. Una banda fue considerada polimórfica si estaba presente al menos en un individuo y ausente en los otros. Se generó una matriz binaria, donde las bandas fueron contadas como «1» para presente y «0» para ausente.

La matriz binaria de datos fue convertida en una matriz de similitud de acuerdo con la definición de Nei y Li (1979): $S_{ij} = 2a / (2a + b + c)$, donde S_{ij} es la similitud entre los individuos i y j ; a es el número de

bandas presentes en ambos i y j ; b es el número de bandas presentes en i y ausentes en j ; y c es el número de bandas presentes en j y ausentes en i . La conversión de similitud a distancia genética se realizó con la ecuación $D_{ij} = 1 - S_{ij}$.

El dendrograma fue construido a partir de la matriz de similitud agrupando los datos con el método UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method Arithmetic Average*) utilizando el software NTSYS - pc versión 2.11L (Rohlf, 2000).

Resultados y discusión

Extracción del ADN

El trabajo con marcadores moleculares involucra el análisis de gran cantidad de individuos y por tanto requiere de la capacidad de extraer ADN de buena calidad y en cantidades adecuadas, en forma rápida y eficiente. El protocolo que se utilizó en el presente trabajo fue una alternativa al reportado por Rocha (2002).

Con el procedimiento reportado aquí se obtuvo ADN de buena calidad (Figura 1), reflejado en su estabilidad aún después de un mes de almacenamiento a 4°C y en la reproducibilidad de los resultados obtenidos con las técnicas moleculares empleadas. La cantidad total de ADN extraído por este método varió entre 3 μ g y 10 μ g de ADN, provenientes de 500 mg de tejido foliar, es decir, entre 6 y 20 μ g de ADN/gramo de tejido, valores que son comparables con los 8 (μ g de ADN /gramo de tejido) obtenidos con el método de Rocha (2002). Sin embargo, la eficiencia del nuevo método es diez veces mayor, porque parte de muy poco tejido (500 mg en lugar de 8 g).

La eficiencia del procedimiento aquí empleado se refleja en el aislamiento del material genético de

Tabla 4 Material vegetal utilizado en el estudio de diversidad mediante AFLP

Código Laboratorio	Descripción	Reacción a PC
DA 18	<i>E. guineensis</i> (IRHO)	Resistente
DA 25	<i>E. guineensis</i> (IRHO)	Susceptible
DA 31	<i>E. guineensis</i> (IRHO)	Susceptible
DA 39	<i>E. oleifera</i> (colecta del Amazonas)	Resistente
DA 50	<i>E. oleifera</i> (colecta del Amazonas)	Resistente
DA 75	<i>E. oleifera</i> (colecta del Amazonas)	Resistente
DA 88	Deli/Avros	Susceptible
DA 98	Ekona/Deli X La Mé	Susceptible
DA 109	Ekona/Deli X La Mé	Resistente
DA 122	Ekona/Deli X Ekona	Resistente
DA 130	Tanzania X Avros	Susceptible
DA 138	Tanzania X Avros	Susceptible

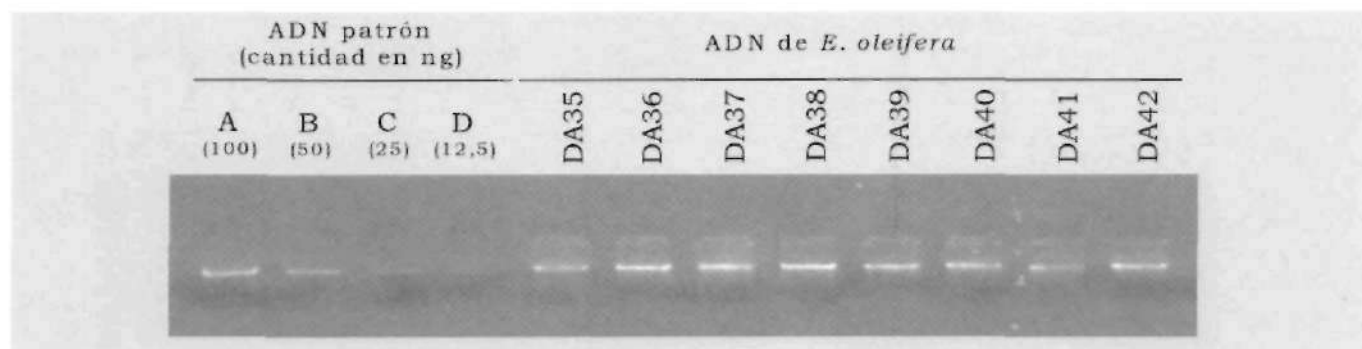


Figura 1 Electroforegrama de un gel de agarosa al 0,7 %, teñido con bromuro de etidio. Verificación de la calidad del ADN. Se observan intensidades diferentes lo que significa cantidades variables de los ADN extraídos. Se presentan ocho de las 137 muestras de ADN extraídas. DA35 a DA42 son muestras de ADN provenientes del material *E. oleifera* del banco de germoplasma de Cenipalma.

un gran número de muestras, cuando se compara con el método anteriormente utilizado (Rocha, 2002). Por ejemplo, con el método de extracción reportado por Rocha (2002), un operario extrae el ADN de 24 muestras aproximadamente en tres días, mientras que con la metodología presentada aquí el mismo operario puede aislar el ADN de 72 muestras en un día, utilizando sólo 500 mg de tejido foliar pulverizado.

Aparte de la mayor eficiencia en el proceso, la nueva técnica disminuye los costos totales del procedimiento aproximadamente en 60% (P. Rocha, datos sin publicar). Además, la ausencia de fenol y cloroformo disminuye los riesgos de toxicidad para el personal ocupacionalmente expuesto y tiene un efecto positivo sobre el ambiente debido a la disminución de la cantidad de residuos tóxicos generados. En la actualidad el método aquí reportado es el utilizado de manera rutinaria en el laboratorio.

Estandarización de las técnicas de marcadores moleculares

Los marcadores moleculares detectan la variabilidad que existe en el ADN. Las técnicas más empleadas incluyen los RAPD, AFLP y micro satélites (Rocha, 2003). Estas técnicas

fueron estandarizadas e implementadas bajo las condiciones del Laboratorio de Marcadores Moleculares de Cenipalma (Rocha, 2002; Arias 2003; Galeano, 2004).

RAPD

El número medio de bandas amplificadas para cada uno de los 137 materiales analizados fue de 26, obtenidas con cinco cebadores. Dichos cebadores fueron previamente reportados por Ochoa *et al.* (1997) como potenciales marcadores moleculares asociados con la resistencia a PC. Sin embargo, para el presente estudio, tales cebadores arrojaron patrones monomórficos (Figura 2) y diferentes a los reportados (Ochoa, *et al.*, 1997). Estos resultados confirman la baja reproducibilidad de la técnica RAPD, debido a que ésta se basa en la baja especificidad de la hibridación del cebador con el molde de ADN (Hansen, *et al.*, 1998; Purba, *et al.*, 2000; Virk, *et al.*, 2000; Rocha 2002) y se hace evidente con la aparición de bandas o patrones de bandas diferentes a los obtenidos inicialmente. Aunque la técnica RAPD fue estandarizada bajo las condiciones del laboratorio y se obtuvieron 6.302 puntos de información, de los cinco cebadores evaluados en las 137 muestras de ADN de palma de aceite, los resul-

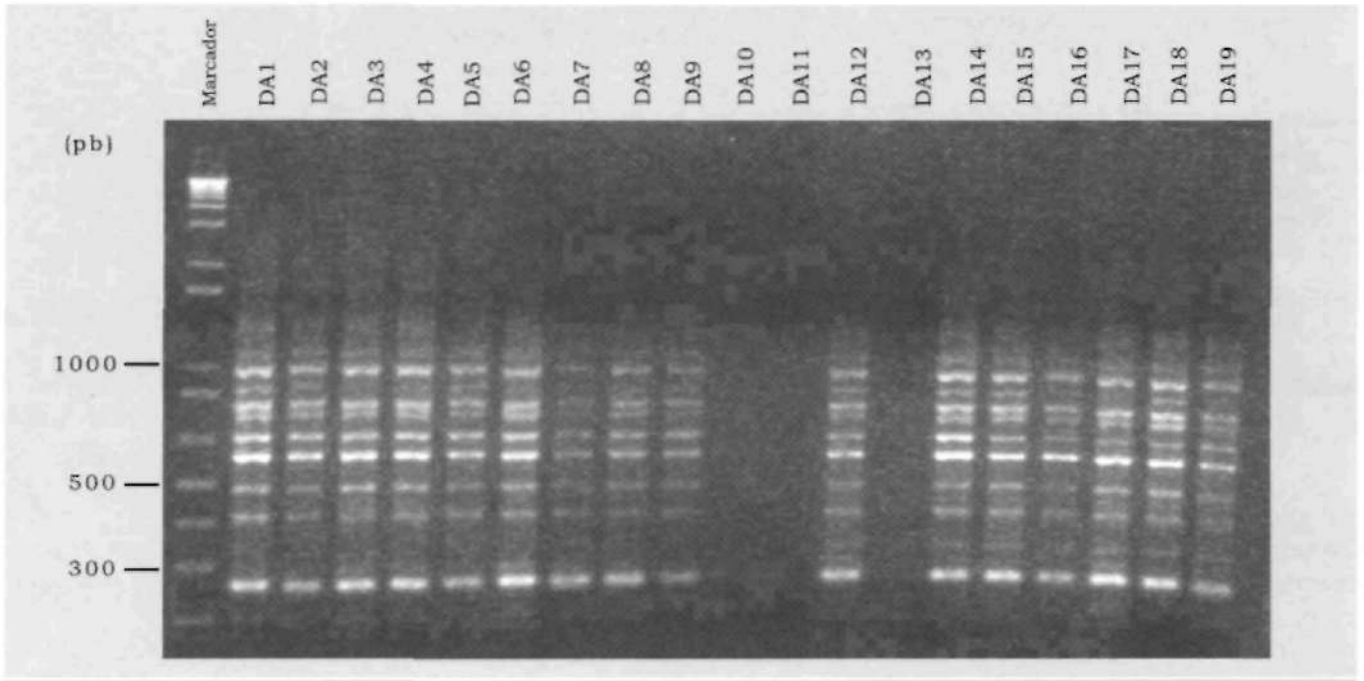


Figura 2 Electroforegrama de RAPD obtenido en un gel de agarosa al 1,4%, teñido con bromuro de etidio. Marcador de peso molecular 1 Kb *plus DNA Ladder* (Invitrogen). Bandas monomórficas originadas con el cebador H-06 en materiales *E. guineensis*, IRHO tolerante a PC (DA1 a DA19), suministrados por Hacienda La Cabaña. Las líneas de las muestras DA10, DA11 y DA13 no amplificaron para este caso en particular.

tados no fueron informativos para el análisis de diversidad y por tanto se decidió explorar otro tipo de marcadores.

Microsatélites

Los microsatélites están considerados por la mayoría de los autores como la más poderosa herramienta para los estudios de genética de poblaciones (Cheng y Crittenden, 1994) ya que estos marcadores son altamente polimórficos, presentan herencia mendeliana simple, son codominantes (es decir, se pueden diferenciar individuos homocigotos de los heterocigotos) y generan datos reproducibles.

La metodología de microsatélites fue estandarizada en el laboratorio utilizando la información que de las secuencias publicaron Billotte, *et al.* (2001). El número medio de alelos por *locus* fue de 12, obtenidos de las diez combinaciones de cebadores. De es-

tas diez combinaciones (Tabla 2), solamente tres fueron monomórficas (mEgCIR0018, mEgCIR0219 y mEgCIR0221). Las restantes siete combinaciones permitieron amplificar 42 alelos con tamaños entre 109 y 320 pares de bases (pb), en 120 de los 137 individuos (Figura 3). Los 17 individuos de la diferencia fueron muestras en las cuales no se evidenció amplificación y aunque dichos materiales fueron evaluados varias veces, no se pudieron descartar inconvenientes técnicos y se prefirió no incluirlos en el análisis a considerarlos alelos nulos. El porcentaje de polimorfismo alélico fue estimado en 45%.

Con la técnica de SSR se obtuvieron 7.672 puntos de información. Dicha información fue empleada para calcular distancias genéticas (Tabla 5) y posteriormente se utilizó en la elaboración de un dendrograma (Figura 4).

Los valores de distancias genéticas permitieron establecer que la divergencia genética (medida de las diferencias entre individuos de una población) entre *E. guineensis* y *E. oleífera* es baja, confirmando las apreciaciones de Barcelos, *et al.* (2002), quienes encontraron que la divergencia genética entre estas dos especies era muy baja y de la misma magnitud que la encontrada entre miembros de *E. oleífera*. Dichos resultados sugirieron que, en términos evolutivos, estas dos especies poseían un origen común y un genoma conservado para el género *Elaeis* (Barcelos, *et al.*, 2002; Barcelos, 1998). Dicha conclusión resalta la importancia de llevar a cabo acciones para explorar la diversidad de *E. oleífera*

(Rey, *et al.*, 2003) y evidencia las posibilidades reales para incorporarla en el acervo genético de *E. guineensis*.

Con el análisis UPGMA se pudo apreciar la formación de cuatro grupos (Figura 5) en donde los materiales *E. guineensis* se mezclaron con *E. oleífera*. Los materiales *E. oleífera* que presentan tolerancia (incluso resistencia) a la PC presentaron valores de distancia altamente significativos, lo cual sugiere una notable variabilidad genética entre ellos. Las diferencias observadas en el campo molecular pueden explicar parte del comportamiento diferencial ante la PC observado en algunos de los híbridos OxG, particularmente en Ecuador (Rocha y Arias, 2004). No se

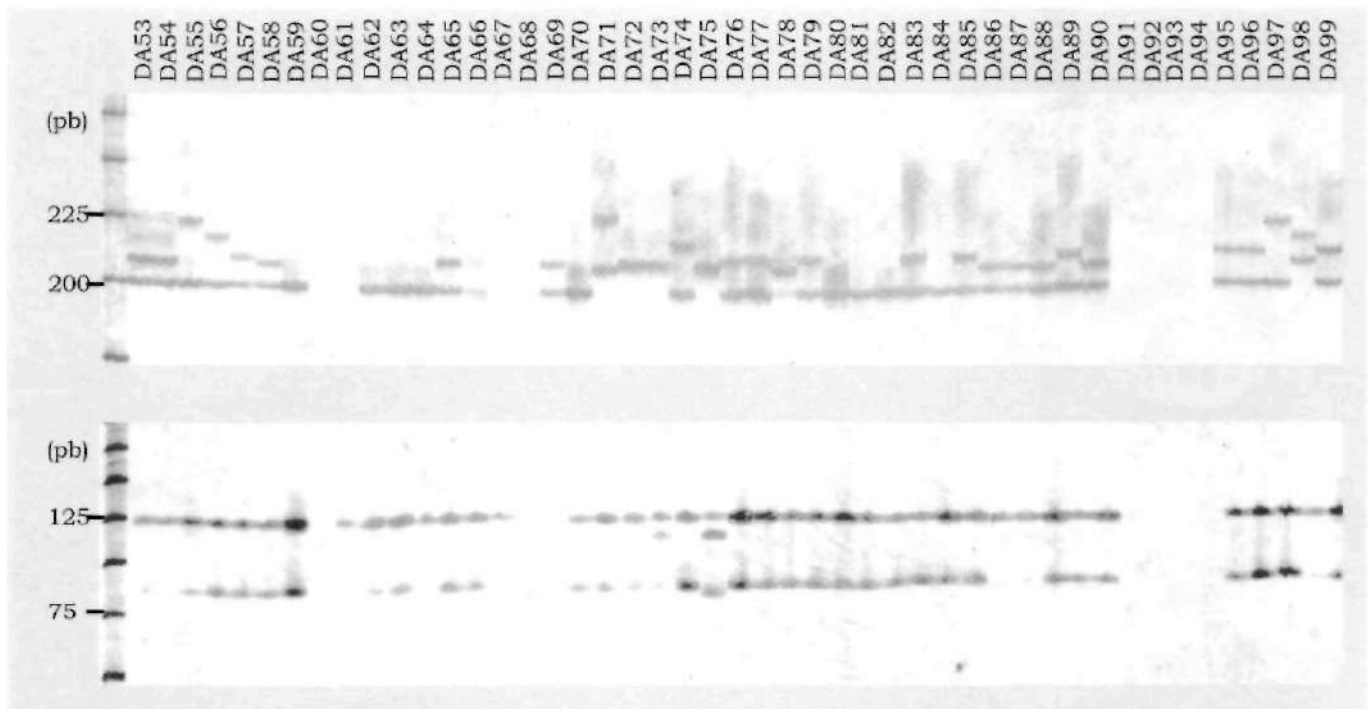


Figura 3 Electroforegramas de microsatélites obtenidos de geles de poliacrilamida al 5% y urea 8 M, teñidos con nitrato de plata. Patrón de peso molecular (25 bp DNA Ladder, Invitrogen) expresado en pares de bases (pb). (A): Polimorfismo originado con la combinación de cebadores PRO1F/PRO1R (*locus* amplificado mEGCIR008) en materiales *E. oleífera* y *E. guineensis*. DA53 hasta DA75 son muestras de ADN provenientes de los materiales *E. oleífera* y DA76 hasta DA99 son muestras de ADN provenientes de los materiales *E. guineensis* cruce Ekona/Deli X Ekona. Se observan cinco alelos entre 200 y 220 pb. (B): Polimorfismo generado con la combinación de cebadores PRO10F/PRO10R (*locus* amplificado mEgCIR0304). Se observan cuatro alelos de 107, 109, 118 y 120 pb.

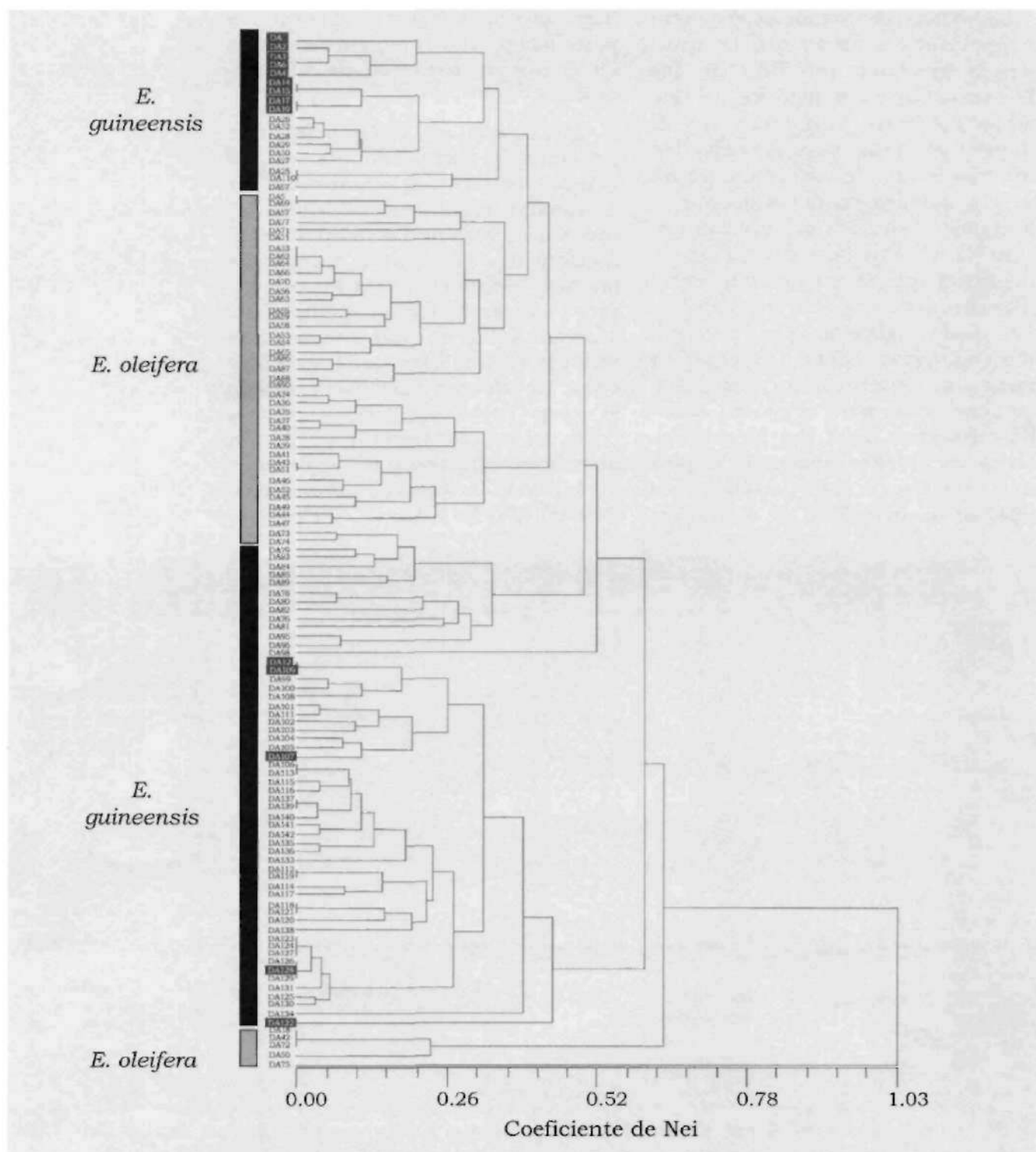


Figura 4 A: Dendrograma construido con el método de agrupamiento UPGMA, basado en las distancias genéticas de Nei (1973) obtenidas mediante la amplificación de microsatélites en 120 materiales de palma de aceite. (DA1 a DA34 material *E. guineensis* IRHO; DA35 a DA75 material *E. oleifera*; DA76 a DA85 material Ekona/ Deli X Ekona ; DA86 a DA92 material Deli X Avros; DA93 a DA112 material Ekona / Deli X La Mé; DA113 a DA122 material Ekona/ Deli X Ekona; DA123 a DA129 material Deli X Avros y DA130 a DA142 material Tanzania X Avros).

encontraron diferencias significativas entre los valores de las distancias de los materiales *E. guineensis* que presentaban susceptibilidad o tolerancia a la PC. Sin embargo, para determinar la relación entre los agrupamientos obtenidos y la tolerancia a la enfermedad se realizó la prueba Chi-cuadrado, para la cual se seleccionaron dos grupos representativos del dendrograma obtenido con los SSR (Figura 5). De cada uno se contaron los individuos tolerantes y susceptibles que conformaban el grupo. Como resultado se encontró que el Z calculado fue altamente significativo, por tanto, se aceptó la hipótesis alterna que sugiere que la característica de tolerancia a PC puede estar asociada con el grupo representativo formado dentro del dendrograma, lo cual se evidencia en la concentración en un mismo grupo de los materiales *E. oleífera* y *E. guineensis* tolerantes a la PC.

Es de anotar que la separación de los individuos resistentes a la PC se debe a la contribución que para el análisis hizo la combinación de cebadores PRO1F/PRO1R (que amplifican el locus mEgCIR0304, Billotte, *et al*, 2001). De manera adicional se encontró que la combinación de cebadores PRO5F/PRO5R {locus mEgCIR0067} permitía agrupar a los individuos susceptibles. Si bien no es posible decir que estos cebadores sean marcadores moleculares asociados a la resistencia o a la susceptibilidad, sí es posible considerarlos como bandas de interés para el programa de mejoramiento. Es necesario incorporar estos hallazgos en el programa de mejoramiento para la validación de la información obtenida.

En palma de aceite es importante no dejarse deslumbrar con resultados como el aquí presentado. El ejemplo más conocido que soporta la anterior afirmación está relacionado con la identificación de marcadores mole-

**Tabla
5**

Alelos polimórficos observados mediante amplificación de microsatélites

Combinación de cebadores SSR	No. de alelos	
	Totales	Polimórficos
PRO1F-PRO1R	5	2
PRO2F-PRO2R	5	3
PRO3F-PRO3R	4	0
PRO4F-PRO4R	6	3
PRO5F-PRO5R	13	6
PRO6F-PRO6R	5	0
PRO7F-PRO7R	5	0
PRO8F-PRO8R	4	1
PRO9F-PRO9R	5	2
PRO10F-PRO10R	4	2
Total	56	19

culares asociados con la característica de grosor del cuesco. Varios marcadores han sido reportados en cruces particulares, sin embargo, cuando se prueban en cruces distintos el potencial marcador ni siquiera aparece ligado (Moretzsohn, *et al*, 2000; Billotte, *et al*, 2001).

Técnica AFLP

Si bien los marcadores SSR revelaron un nivel aceptable de polimorfismo, se decidió implementar la técnica de AFLP para analizar doce de los individuos representativos y contrastantes de los grupos generados mediante microsatélites. La razón para esta selección estuvo asociada con los elevados costos que los AFLP representan para el laboratorio de Cenipalma (P. Rocha, datos sin publicar). Siete combinaciones de AFLP fueron seleccionadas y evaluadas (Tablas 3 y 4) con base en los resultados que se han reportado para palma de aceite en la literatura (Purba, *et al*, 2000; Rajinder, *et al*, 1998; Barcelos, 1998).

Los marcadores AFLP revelaron altos niveles de polimorfismo de ADN al compararlos con los generados por las técnicas de RAPD y microsatélites. Un total de 258 bandas poli-

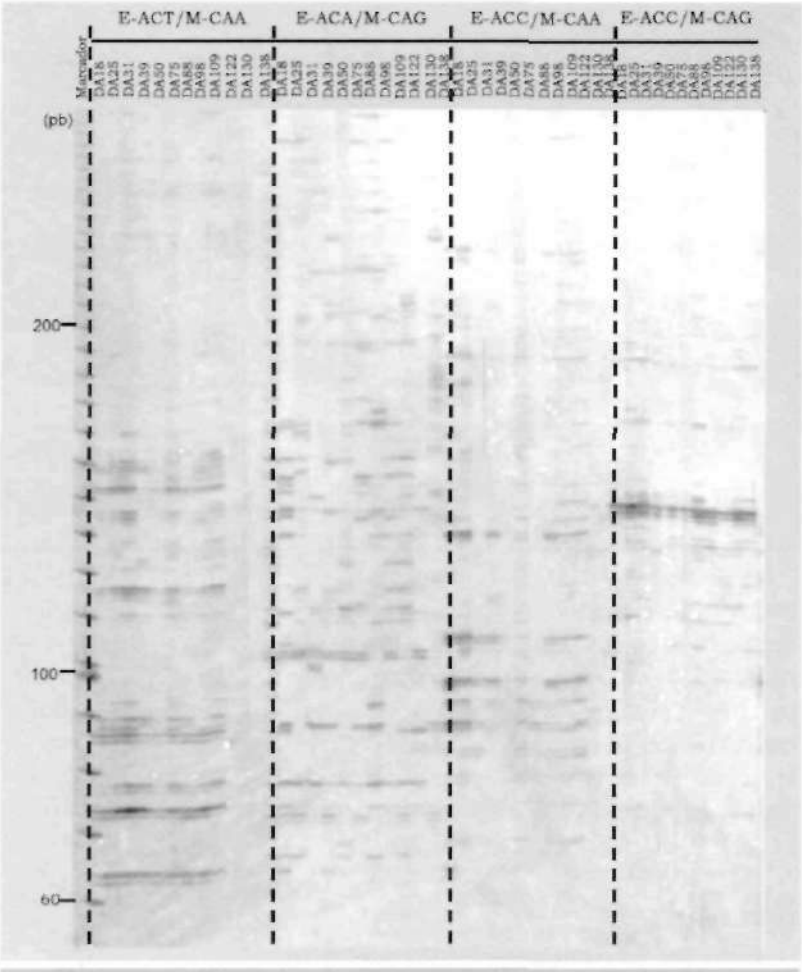


Figura 5 Electroforegrama de AFLP de un gel de poliacrilamida 5%, 8 M urea, teñido con nitrato de plata. Cuatro combinaciones de cebadores fueron evaluadas en 12 muestras contrastantes según la información obtenida con SSR. DA18, DA25 y DA31 son muestras de ADN provenientes de los materiales *E. guineensis*, IRHO; DA39, DA50 y DA75 son muestras de ADN provenientes de los materiales *E. oleífera*; DA88, DA98, DA109, DA122, DA130, DA138 son muestras de ADN provenientes de los materiales *E. guineensis* pertenecientes a los cruces Deli/Avros; Ekona/Deli X La Mé; Ekona/Deli X Ekona y Tanzania X Avros, respectivamente

Tabla 6 Bandas polimórficas observadas por cada combinación de cebadores AFLP

Cebadores AFLP	No. de Bandas
E-ACT / M-CAA	26
E-ACA / M-CAG	43
E-ACC / M-CAA	38
E-ACC / M-CAG	21
E-ACC/ M-CAC	41
E-ACT/ M-CAT	37
E-ACT/ M-CTA	52
Total	258

mórficas fueron reportadas (Figura 5). La combinación de cebadores E-ACT/ M-CTA presentó el mayor número de polimorfismos (Tabla 6).

De los siete cebadores evaluados en los 12 materiales se obtuvieron 5.748 puntos de información que fueron utilizados en la elaboración de un dendrograma (Figura 6). En éste se pueden apreciar dos grupos claramente diferenciados conformados por los materiales *E. guineensis* y *E. oleífera*. Si bien existe un grado de similitud entre las dos especies, los valores de distancia genética obtenidos sugieren que la diversidad genética dentro de *E. guineensis* es limitada y menor que la desplegada dentro de *E. oleífera*, lo cual confirma una vez más los resultados obtenidos con la técnica SSR y se ve reflejado en el fenotipo que expresan (Rey, *et al*, 2003).

Conclusiones

Las metodologías para la extracción de ADN y para la amplificación de marcadores tipo RAPD, AFLP y microsatélites han sido implementadas en el laboratorio de marcadores moleculares de Cenipalma. El método para extracción de ADN permite obtener entre 6 y 20 µg de ADN por cada gramo de tejido. Sólo se necesitan 500 mg de tejido foliar.

La técnica RAPD proporcionó información sin conocimiento previo del genoma de los individuos analizados, confirmando lo expuesto por Grattapaglia, *et al*, (1992). Sin embargo, el nivel de polimorfismo fue nulo aun utilizando los cebadores reportados como polimórficos por Ochoa, *et al*, (1997). La discrepancia que resulta de la comparación de los dos resultados refleja uno de los más grandes problemas (limitantes) que se han observado cuando se emprenden programas de selección asistida por marcadores: los marcadores identifi-

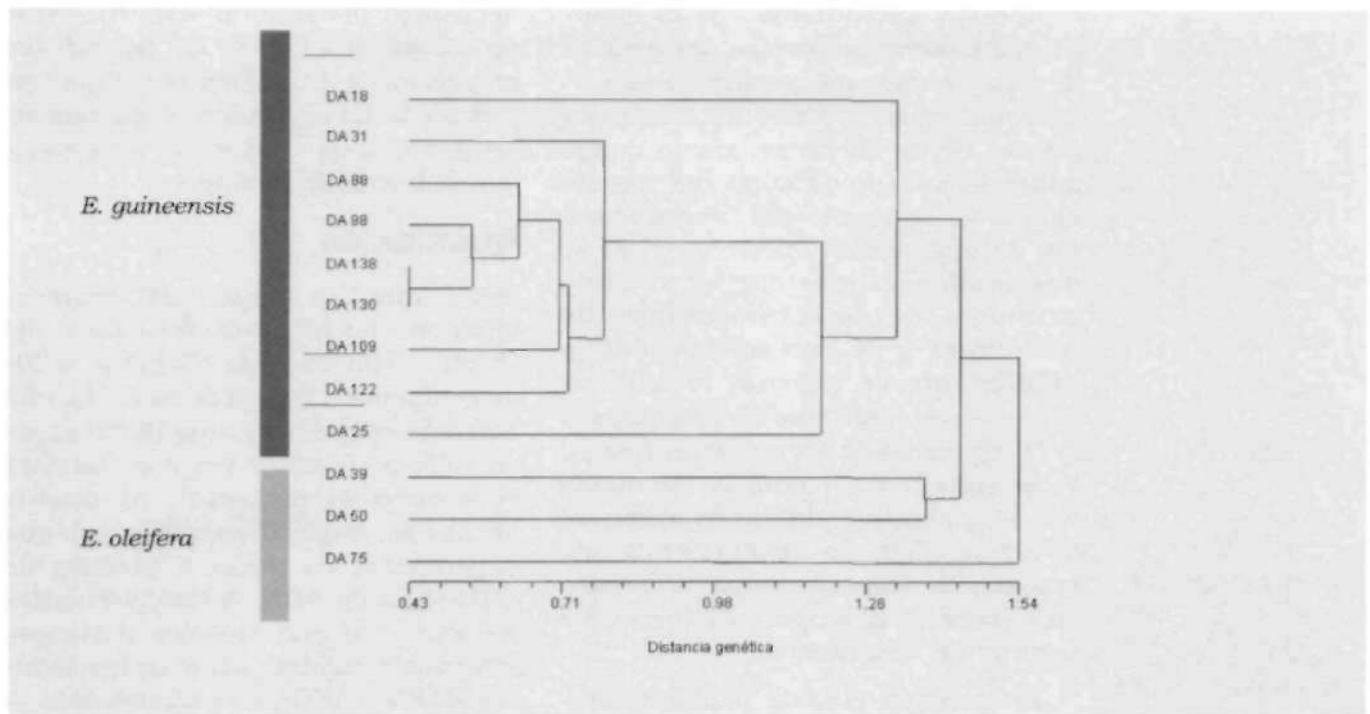


Figura 6 Dendrograma generado por la técnica de AFLP con 12 materiales de palma de aceite, basado en las distancias genéticas de Nei (1973) y construido con el método de agrupamiento UPGMA. DA18, DA25 y DA31 son muestras de ADN provenientes del material *E. guineensis* IRHO; DA88, DA98, DA109, DA122, DA130 y DA138 son muestras de ADN provenientes del material *E. guineensis* pertenecientes a los cruces Deli X Avros, Ekona/Deli X La Mè. Ekona/Deli X Ekona y Tanzania X Avros, respectivamente. DA39, DA50 y DA75 son muestras de ADN provenientes del material *E. oleífera*.

cados (bien RAPD o AFLP) en los individuos de un cruce particular no necesariamente funcionan en otros cruces. Esto sucede no sólo en palma de aceite sino en otras especies.

Los resultados de los análisis de diversidad genética confirman que entre las especies *E. guineensis* y *E. oleífera* existe un grado considerable de similitud, lo cual es importante para el desarrollo de programas de mejoramiento en cualquiera de las dos especies. Sin embargo, la variabilidad genética presente dentro de *E. guineensis* es menor que la observada dentro de *E. oleífera*. Además, los análisis muestran que la combinación de cebadores PRO1OF/PRO1OR amplifica un locus (mEgCIR0304) que posiblemente esté relacionado con la tolerancia a la enfermedad. De igual manera, la combinación PR05F/

PR05R amplifica un focus (mEgCIR0067) posiblemente asociado con la susceptibilidad a la PC. Sin embargo, no se presenta esta información como marcadores moleculares ligados a la resistencia o a la susceptibilidad.

Consideraciones finales

Uno de los objetivos del programa de mejoramiento genético de la palma de aceite de Cenipalma está orientado a la identificación de fuentes de resistencia a la PC. A pesar de los esfuerzos realizados, desde hace más de 15 años, los conocimientos sobre la enfermedad (por ejemplo, su herencia y fisiología) son muy limitados. Hasta hoy no se ha detectado ningún material *E. guineensis* resistente a la PC. Además, no se cuenta con procedimientos de inoculación rutinarios, eficaces ni confiables que permitan

reproducir los síntomas de la enfermedad y poder desarrollar así ensayos de resistencia que permitan identificar materiales promisorios tolerantes (Ayala, 1999). Mientras existan dudas sobre la caracterización del agente causal no se cuente con procedimientos de inoculación eficientes y no se desarrollen cruces con el objetivo principal de detectar fuentes de resistencia a PC, no será posible (o difícilmente se logrará) identificar marcadores moleculares asociados a la PC en palma de aceite. Sin embargo, la resistencia o, al menos la tolerancia a la PC puede ser alcanzada mediante la introgresión de características de resistencia aparentemente presentes en la especie *E. oleífera*, exclusiva del continente americano.

En plantaciones de palma colombianas se ha observado la tolerancia (quizás resistencia) a la PC en los híbridos interespecíficos OxG (Zambrano, 2004, Torres, *et al*, 2004). No obstante, aunque los resultados en Colombia han sido prometedores, en plantaciones de Ecuador (en donde la PC es de carácter letal), algunos de los cruces de híbridos OxG han presentado susceptibilidad a la enfermedad (Rocha, *et al*, 2004). Por tanto, es

necesario desarrollar experimentos de caracterización de los potenciales progenitores *E. oleífera* para que con certeza se incorporen a *E. guineensis* los genes responsables de esta resistencia a la enfermedad.

Agradecimientos

Los autores expresan sus agradecimientos a las plantaciones Palmar del Oriente, Hacienda La Cabaña, a los investigadores Leonardo Rey, Marcelo Torres (Cenipalma) y José Ramírez por su valiosa colaboración para facilitar el acceso al material. Al doctor Fernando Ángel (Cenicaña) por sus sugerencias en torno al proceso de extracción de ADN. A Fanny Fuentes y Carlos Galeano, quienes participaron en la estandarización de las técnicas RAPD y AFLP, respectivamente. A Colciencias por la cofinanciación de Diana Arias (programa Jóvenes Investigadores de Colciencias, convenio 168 de 2003). Esta publicación hace parte del proyecto financiado por Fontagro (Convenio de Cooperación Técnica IICA-BID-FTG-01 1 1999 y FTG-2411999). La investigación de Cenipalma es apoyada por el Fondo de Fomento Palmero administrado por Fedepalma.

Bibliografía

- Acevedo, N; *et al*. 2000. Valoración económica de las pérdidas en aceite generadas por la pudrición de cogollo en los llanos orientales. *Palmas* (Colombia) 21(2):53-62.
- Acosta, A. 1991. Factores físicos de los suelos y su influencia en la predisposición a la pudrición de cogollo de la palma de aceite de Colombia. *Palmas* (Colombia) 12(2):71-79.
- Arias M, DM. 2003. *Asistencia para la identificación de marcadores moleculares asociados a la pudrición de cogollo en palma de aceite (E. guineensis Jacq.)*. Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. Tesis de pregrado. Tunja. 82p.
- Ayala, L. 1999. Metodología para la selección de progenitores de palma de aceite (*Elaeis guineensis* Jacq.) resistentes a pudrición de cogollo. *Cenianunces* (Colombia) 63:1-4.
- Barcelos, E; *et al*. 2002. Genetic diversity and relationship in American and African oil palm as revealed by RFLP and AFLP molecular markers. *Brasilia. Pesq. Agropec. Bras.* 37(8) : 1105-1114.
- Barcelos, E. 1998. Étude de la diversité génétique du genre *Elaeis* (*E. oleífera* (Kunth) Cortés *et al* *E. guineensis* Jacq.) par marqueurs moléculaires (RFLP et AFLP). Montpellier II. Tesis de doctorado. Francia. 137p.
- Billotte N; *et al*. 2001. Development, characterization and across-taxa utility of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) microsatellite markers. *Genome* 44:413-425.
- Cheng, HH; Crittenden, LB. 1994. Microsatellite markers for genetic mapping in the chicken. *Poultry Sci.* 73:539-546.
- Corley, RHV; Tinker, PB. 2003. *The Oil Palm*. Fourth Edition. Blackwell. Oxford. 562p.

- Franqueville, H. 2001. *La pudrición del cogollo de la palma aceitera en América Latina*. Revisión preliminar de hechos y logros alcanzados. 35p. Montpellier.
- Franqueville, H; Renard JL. 1990. Improvement of oil palm vascular wilt tolerance results and development of the disease at the R. Michaux plantation. *Oleagineux* 45:399-403.
- Galeano, CH. 2004. *Estandarización de AFLP para palma de aceite tipo dura (Elaeis guineensis Jacq.)*. Universidad Nacional de Colombia. Tesis de pregrado. Bogotá. 59p.
- Gómez C, PL. 1995. Estado actual de la investigación sobre pudrición de cogollo. *Palmas* (Colombia) 16(1):9-23.
- Grattapaglia, DJ; et al. 1992. Mapping in woody plants with RAPD markers: application to breeding in forestry and horticulture. In: Applications of RAPD technology to plant breeding. *Joint plant breeding symposia series Minnesota*. 37-40.
- Hartley, CW. 1988. *The oil palm*. Third edition. Longman, London. 452p.
- Hansen, MC; Sall, T. 1998. Error rates and polymorphism frequencies for three RAPD protocols. *Plant Mol. Biol. Rep.* 16:139-146.
- Li, Y; Su, Z.; Chen, F. 2002. Rapid extraction of genomic DNA from leaves and bracts of bave tree (*Davidia involucreata*). *Plant Mol. Biol.* 20:185a-185e.
- Moretzshon, MC; et al. 2000. RAPD linkage mapping of the shell thickness locus in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) *Theor. Appl. Genet.* 100:63-70.
- Munévar M, F; Acosta, A; Gómez C, PL. 2001. Factores edáficos asociados con la pudrición de cogollo de la palma de aceite en Colombia. *Palmas* (Colombia) 22(2):9-19.
- Nei, M; Li, WH. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* :5269-5273.
- Nieto, LE; Gómez C, PL. 1991. El complejo de pudrición de cogollo en palma de aceite (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Palmas* (Colombia) 14(1):13-19.
- Ochoa, IE; Villegas, VE; Beebe, SE. 1997. Identificación de marcadores moleculares RAPD asociados con la resistencia al complejo de pudrición de cogollo en palma de aceite (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Palmas* (Colombia) 18(1):33-38.
- Powell, W; et al. 1996. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR markers for germplasm analysis. *Mol. Breed.* 2:225-237.
- Purba, AR; et al. 2000. A new aspect of genetic diversity of Indonesia oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) revealed by isoenzyme and AFLP markers and its consequences for breeding. *Theor. App. Gen.* 101:956-961.
- Rajinder, S; Suan-Choo, C; Rahimah, A. 1998. Generation of molecular markers in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) using AFLP™ analysis. *Plant Biotech.* 20:26-27.
- Rey, L; et al. 2003. Colecta de material genético de palma noli *Elaeis oleifera* [H.B.K] Cortes en el trapezio amazónico. *Cenivances* (Colombia) 101:1-4.
- Rocha S, PJ. 2002. Teoría y práctica para la extracción del ADN de palma de aceite. *Palmas* (Colombia) 23(3):9-17.
- Rocha S, PJ. 2003. Marcadores moleculares, una herramienta útil para la selección genética de palma de aceite. *Palmas* (Colombia) 24(2):9-25.
- Rocha S, PJ, Arias M, DM. 2004. Manual de protocolos del laboratorio de marcadores moleculares. Documento interno de trabajo. Cenipalma.
- Rocha S, PJ, et al. 2004. Visita técnica al centro de investigación INIAP y a la plantación Palmeras del Ecuador SA. Reporte final de actividades. Bogotá. 50p.
- Rolhf, F. 2000. NTSYS pc. Numerical Taxonomy and multivariate analysis system. Exeter Software. (New York).
- Sambrook, J; Russell, D. 2001. *Molecular cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory. (New York) 3ª ed.
- Shah, F; et al. 1994. The utility of RAPD markers for determination of genetic variation in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Theor. Appl. Gen.* 89:713-718.
- Torres, M; et al. 2004. Evaluación del comportamiento de los híbridos interespecíficos *Elaeis oleifera* x *Elaeis guineensis* en la plantación de Guaicaramo S.A. *Palmas* (Colombia) 25(especial, tomo II):350-357.
- Virk, P; et al. 2000. Effectiveness of different classes of molecular markers for classifying and revealing variations in rice (*Oryza sativa*) germplasm. *Euphytica* 112:275-284.
- Vos, P; et al. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 21:4407-4414.
- Williams, J; et al. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18(22):6531-6535.
- Zambrano, JE. 2004. Los híbridos interespecíficos *Elaeis oleifera* H.B.K. x *Elaeis guineensis* Jacq. una alternativa de renovación para la Zona Oriental de Colombia. *Palmas* (Colombia) 25(especial, tomo II):339-349.