

Protocolo para la certificación por conformidad genética de clones en jardines de propagación de caucho (*Hevea brasiliensis*)

Protocol for the certification by genetic conformity of clones in rubber propagation gardens (*Hevea brasiliensis*)

Camilo Andrés Ruiz Avila*, Yolanda Gomez Vargas**, William Burgos Paz**, Anibal L. Tapiero**

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v24n1.83584

RESUMEN

A partir de visualización por electroforesis capilar de 9 regiones micro-satélites amplificadas con cebadores fluoromarcados se determinó el polimorfismo de los marcadores Hmct5, 102, HV 30, 548, HV 15, 416, m574, 103 y 358 identificados en el ADN de muestras de tejido foliar de 12 clones de caucho (*Hevea brasiliensis*) conservados en jardines clonales de AGROSAVIA en Colombia y 25 clones en jardines clonales de origen en Brasil. Con base en los resultados del análisis se consolidó una base de datos que permite corroborar la identidad por conformidad de clones de caucho a partir de muestras foliares. El protocolo establecido consiste en una aproximación metodológica para la amplificación de dichas regiones micro-satélites por PCR punto final y la visualización de los fragmentos obtenidos de este procedimiento por electroforesis capilar multiplexada, reduciendo costos y optimizando el tiempo en laboratorio. Adicionalmente se encontraron discrepancias entre el perfil electroforético obtenido del clon FX 3864 muestreado en Colombia con el obtenido en Brasil. Se propone considerar la necesidad de corroborar la identidad de los clones reproducidos en jardines clonales para su comercialización en Colombia, utilizando metodologías sensibles y reproducibles, como la estandarizada en este estudio.

Palabras clave: marcadores micro-satélite, identificación, polimorfismo.

ABSTRACT

The polymorphism of 9 regions identified in the DNA of leaf tissue sampled from 12 rubber clones conserved in clonal gardens of AGROSAVIA in Colombia and 25 clones in clonal gardens of origin in Brazil was visualized by capillary electrophoresis after amplification with the fluorolabeled primer microsatellite markers Hmct5, 102, HV 30, 548, HV 15, 416, m574, 103 and 358. Upon the results analysis, a database was consolidated that allows to corroborate the genetical identity by conformity with 37 rubber clones from leaf samples. The established protocol is a methodological approach using end-point PCR towards the amplification by multiplexed capillary electrophoresis of micro-satellite regions and their visualization, reducing costs and optimizing time in the laboratory. Additionally, discrepancies were found between the electrophoretic profile obtained from clone FX 3864 sampled in Colombia with that obtained in Brazil. It is proposed to consider the need to corroborate the identity of the clones reproduced in clonal gardens for their commercialization in Colombia, using sensitive and reproducible methodologies, such as the one standardized in this study.

Key words: micro-satellite markers, identification, polymorphism.

Recibido: febrero 15 de 2020

Aprobado: mayo 17 de 2022

* Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá. caaruizav@unal.edu.co

** Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria – AGROSAVIA
ygomez@agrosavia.co, wburgos@agrosavia.co, atapiero@unal.edu.co

INTRODUCCION

Hevea brasiliensis es una especie de la familia Euphorbiaceae originaria de la región amazónica, cuyo cultivo comercial se orienta a la producción de caucho natural en más de 40 países. Entre estos se destacan Vietnam, Indonesia, Tailandia, Malasia, India y China, en la actualidad los países con mayor área destinada al cultivo. En consideración a fuertes limitantes fitosanitarios, particularmente derivados de la incidencia del Mal Suramericano de las Hojas (SALB, por sus siglas en inglés), en América solo se cultiva alrededor de 2% del total del área (Hou et al., 2017).

Recientemente, en Colombia, el cultivo de caucho ha cobrado gran importancia como resultado de iniciativas públicas y privadas que consideran a la “heveicultura” una actividad que promueve el desarrollo económico y social, desde una perspectiva agroindustrial. En tal sentido, mientras que en el 2.000 se contaba con poco menos de 6.000 ha de caucho, en el 2015 se identificaron alrededor de 68.000 ha, distribuidas por todo el territorio nacional y concentradas principalmente en la Orinoquía, el Magdalena Medio, Antioquia, Córdoba y la Amazonia (Confederación cauchera Colombiana, 2015.). El incremento del área sembrada ha sido posible gracias a la identificación de Zonas de Escape al SALB, una aproximación metodológica que permite la determinación de áreas y clones apropiados para el cultivo de caucho. No obstante, subsisten dificultades tecnológicas que garanticen la identidad de los clones de caucho a comercializar, cuyo destino es el establecimiento de nuevas áreas (García et al., 2011). Por tal razón, bajo el marco legal de la resolución No. 001478/2006 ICA, el estado colombiano exige hoy día que los jardines de propagación clonal certifiquen mediante análisis genéticos la identidad de los clones de *H. brasiliensis* que comercializan, a fin de garantizar la adquisición de plantas conforme a los requerimientos determinados por el productor a partir de la vocación de los suelos en sus fincas y la zonificación.

En consecuencia y como respuesta a esta demanda, la homologación de clones de caucho en tiempos recientes se soporta cada vez con mayor énfasis en la conducción de análisis genéticos utilizando marcadores moleculares micro satélites conocidos también como STR (del inglés “Short Tandem Repeat”). Independientemente del estado fenológico y variaciones metabólicas derivadas del ambiente, los STR facilitan la identificación de variedades y cultivares con base en su nivel de polimorfismo, codominancia, repetibilidad y, más recientemente, posibilidades de automatización (García et al., 2011).

Como respuesta a los requerimientos esbozados más arriba, el presente estudio tuvo como objetivo evaluar 9 mar-

cadores moleculares microsatélites (STR) amplificados mediante primers fluoromarcados y visualizados por electroforesis capilar a partir del ADN extraído de muestras foliares de 12 clones de *H. brasiliensis*, provenientes de jardines clonales de colección en Colombia y 25 clones conservados en jardines de origen para la propagación clonal en Brasil. El propósito fue seleccionar los marcadores con mayores índices de polimorfismo, para a su vez generar patrones electroforéticos por clon que permitan disponer de tecnologías más apropiadas para la identificación más precisa de los materiales genéticos a homologar.

MATERIALES Y METODOS

El estudio se realizó en el laboratorio de genética molecular de AGROSAVIA, en el Centro de Investigación Tibaitatá, ubicado en el kilómetro 14 vía Mosquera. Se evaluaron 12 clones de *Hevea sp.*: FX 3864, RRIM 600, FDR 5788, CDC 312, FDR 5240, FDR 5597, FDR 4575, PMB 1, MDX 607, CDC 56, MDX 624 y CDC 1174 provenientes del Jardín Clonal de AGROSAVIA en La Libertad, Villavicencio y 25 clones del Jardín Clonal del Instituto Agronómico de Campinas (IAC-APTA) en Votuporanga – Brasil: IAC 424, IAC 500, IAC 501, PB 314, IRCA 18, IAC 502, IAC 503, IAC 505, IAC 511, PB 330, PB 312, FX 3864, PB 217, PB 235, IAN 873, RRIM 915, RRIM 901, IAC 302, RRIC 100, IRCA 331, IRCA 317, IRCA 230, PB 260, PB 254 y FX 2261.

De cada uno de los clones se tomaron 3 folíolos en estado de desarrollo juvenil que se conservaron con sílica gel dentro de bolsas de papel. Una vez extraído el ADN mediante el protocolo reportado por Salavarieta (2002), se procedió a la amplificación por PCR de las regiones microsatélites: Hmct5 y m574 (Barrera et al., 2015); HV 15 y HV 30 (Regina et al., 2010); 102, 548, 416, 103 y 358 (García et al., 2011).

Calidad y concentración de ADN: la integridad del ADN extraído fue visualizada en gel de agarosa al 1% y su concentración y calidad medida por NanoDrop (2000, Thermo Fischer Scientific™, Massachusetts). En virtud de que todas las muestras presentaban una concentración superior a 200 ng * mL⁻¹, estas se llevaron a una misma concentración de 75 ng * mL⁻¹ con el fin de permitir la amplificación de los marcadores seleccionados, mediante PCR punto final.

Amplificación de ADN: se usó un termociclador marca Bio-Rad (C 1000™, California, USA) modificando la temperatura de anillamiento del protocolo para algunos de los primers utilizados (Tabla 1). Para el máster mix de la reacción se utilizó MgCl₂ a concentración de 2,5 mM, Buffer 0,6 X, dNTPs 0,3 mM, taq polimerasa 0,04 U* μL⁻¹, primer forward y reverse a 0,3 mM cada uno. Adicio-

Tabla 1. Grupos de productos de PCR (PLEX), temperatura de anillamiento para cada marcador, rango de tamaño de producto de amplificación, fluoróforo utilizado y color del marcador identificado mediante el equipo ABI 3500 (Applied Biosystems, California).

PLEX	Marcador	T° Anillamiento	Intervalo de amplificación		Fluoróforo	Color
			Alelo 1	Alelo 2		
1	Hmct 5 ^(a)	54	193	216	NED	NEGRO
	102 ^(b)	54	278	290	VIC	VERDE
	HV 30 ^(c)	54	148	160	FAM	AZUL
2	548 ^(b)	59	227	250	FAM	AZUL
	HV 15 ^(c)	60	200	228	FAM	AZUL
	416 ^(b)	57	222	223	VIC	VERDE
3	m574 ^(a)	55	231	267	VIC	VERDE
	103 ^(b)	55	250	282	FAM	AZUL
	358 ^(b)	57	220	240	NED	NEGRO

^(a) Marcadores HMCT 5 y m574 (Barrera *et al.*, 2015)

^(b) Marcadores 102, 548, 416, 103 y 358 (García *et al.*, 2011)

^(c) Marcadores HV 15 y HV 30 (Regina *et al.*, 2010)

Tabla 2. Composición del máster mix y condiciones de PCR para amplificación punto final de microsatélites implementados.

Componente	Concentración del Stock	Concentración Final	Perfil de Termociclado	
MgCl ₂ (mM)	50	2.5	94 °C (3 min)	35 Ciclos
Buffer	10X	0,6X	94 °C (15 s)	
dNTPs mix (mM)	10	0.3	TA °C (1 min)	
Polimerasa (U/μL)	5	0.04	72 °C (15 s)	
Primer F (μM)	10	0.3	72 °C (60 min)	
Primer R (μM)	10	0.3	4 °C ∞	

nalmente, se usó 2 μL de ADN a concentración de 75 ng* μL⁻¹. El volumen de reacción final fue de 15 μL cómo lo reporta el manual del kit. Así mismo, las condiciones de amplificación por PCR se describen en la (Tabla 2).

Visualización de alelos: La preparación de las muestras se realizó mezclando el producto de PCR de tres marcadores según la PLEX y el fluoróforo descrito en la (Tabla 1), a una relación de 1:15. Posteriormente, se tomó la mezcla de cada uno de los clones amplificados por gru-

po de marcadores y se le adicionó HI-DI formamida (Thermo Fischer ScientificTM, Massachusetts) y marcador de peso molecular GeneScan 500 LIZ dye (Thermo Fischer ScientificTM, Massachusetts). Las muestras fueron denaturadas y analizadas en el secuenciador ABI 3500 (Applied Biosystems, California). Finalmente, el perfil electroforético se analizó con el programa GeneMapper® (Thermo Fischer ScientificTM, Massachusetts) y se determinaron los tamaños de los diferentes alelos para cada uno de los marcadores evaluados sobre los clones.

Tabla 3. Peso de alelos de 12 clones provenientes de Colombia y 25 de Brasil para las regiones microsatelites Hmct5, 102, HV 30, 548, HV 15, 416, m574, 103 y 358.

	PLEX 1						PLEX 2						PLEX 3					
	Hmct 5		102		HV 30		548		HV 15		416		m574		103		358	
	alelo 1	alelo 2	alelo 1	alelo 2	alelo 1	alelo 2	alelo 1	alelo 2	alelo 1	alelo 2	alelo 1	alelo 2	alelo 1	alelo 2	alelo 1	alelo 2	alelo 1	alelo 2
FX3864a	189	205	276	284	276	276	243	243	158	180	218	226	238	248	255	271	221	233
RRIM600	189	200	284	288	276	284	243	243	179	196	216	226	240	254	260	260	233	233
FDR 5788	195	195	280	284	259	267	241	243	157	172	216	216	246	268	259	266	219	233
CDC312	197	205	289	293	261	261	251	251	158	180	216	219	242	246	260	277	233	233
FDR 5240	207	212	280	284	253	284	251	251	192	192	226	226	240	248	263	266	222	225
FDR 5597	197	212	284	284	253	259	250	250	175	194	226	226	244	244	260	266	222	233
FDR 4575	192	197	285	290	284	284	241	251	181	191	220	220	240	256	262	265	201	222
PMB 1	188	197	283	285	259	284	243	243	157	157	218	226	240	240	260	265	233	233
MDX607	197	197	285	287	263	284	241	243	180	180	226	226	233	246	271	275	199	231
CDC 56	196	201	284	284	284	284	243	251	180	180	214	226	246	250	259	275	222	222
MDX624	188	197	285	285	261	296	240	240	174	179	201	225	242	246	261	271	225	231
CDC 1174	190	197	283	289	269	273	243	251	158	181	215	215	248	268	260	263	209	233
IAC 424	192	201	288	291	275	286	240	250	180	180	202	216	246	256	266	270	199	225
IAC 500	196	200	286	289	270	275	242	250	179	179	226	226	248	254	259	270	222	233
IAC 501	197	201	286	289	253	259	242	252	181	181	203	217	242	254	270	274	233	233
PB 314	297	201	286	289	272	284	242	250	179	179	216	226	248	254	259	259	222	233
IRCA 18	198	200	284	291	275	284	250	250	179	179	216	226	248	268	259	274	233	233
IAC 502	197	201	284	284	261	275	245	253	179	179	202	226	240	250	260	265	231	231
IAC 503	192	197	283	284	253	259	243	251	180	180	208	226	240	244	259	259	232	238
IAC 505	197	201	284	289	253	266	243	245	181	181	212	212	240	244	259	259	232	232
IAC 511	196	205	284	289	261	261	244	252	180	180	226	226	256	256	266	271	199	225
PB 330	198	212	285	290	275	275	250	250	203	203	226	226	248	268	259	259	232	232
PB 312	196	200	284	286	270	284	242	250	180	180	216	226	240	248	259	259	222	232
FX 3864	189	200	284	288	275	284	242	242	180	180	216	226	240	254	259	259	222	233
PB 217	189	200	284	288	275	284	242	242	179	179	215	226	240	254	259	259	233	233
PB 235	200	212	286	290	270	270	250	250	191	201	225	225	248	268	259	270	222	239
IAN 873	197	200	270	284	253	270	242	242	180	180	207	207	244	254	259	283	232	259
RRIM 915	197	198	284	289	272	284	250	250	201	201	225	225	248	268	270	274	222	231
RRIM 901	197	200	284	289	272	284	243	251	179	179	225	225	240	268	259	270	233	233
IAC 302	196	200	287	289	275	284	241	251	191	201	215	225	240	252	259	270	233	233
RRIC 100	200	205	279	284	275	275	241	251	191	203	225	225	240	250	265	265	222	231
IRCA 331	196	212	284	290	261	272	251	251	179	179	226	226	248	256	259	259	215	222
IRCA 317	196	212	286	289	261	275	251	251	192	201	226	226	256	268	270	274	215	222
IRCA 230	196	212	286	289	261	275	251	251	192	201	226	226	256	268	270	274	215	222
PB 260	198	200	286	289	272	283	251	251	181	181	226	226	246	268	259	270	222	231
PB 254	201	212	289	289	261	275	251	251	192	203	226	226	244	244	259	259	222	239
FX 2261	196	212	286	290	270	270	251	251	192	201	226	226	248	268	259	270	222	239

Es importante destacar que durante el proceso de visualización se tomó 1 uL de la mezcla de cada uno de los clones amplificados por el grupo de marcadores y se colocó en pozos independientes de una placa diseñada para 96 muestras. A este volumen se le adicionó 10 uL de Hi-DI formamida y 0,5 uL de liz 500. Posteriormente, las muestras se llevaron a 95 °C en el termociclador durante 5 minutos, con el fin de denaturar la doble hebra del ADN amplificado; seguidamente se llevó a 4 °C durante 5 minutos. Una vez concluido este proceso se corrieron en el quipo ABI 3500 (Applied Biosystems, California) y se visualizaron mediante el programa Gene Mapper reportando los datos obtenidos en la (Tabla 3).

Análisis de polimorfismos: Con el fin de evaluar el nivel de polimorfismo de los marcadores utilizados se determinaron los contenidos de información polimórfica (PIC), Heterocigosidad esperada (He) y Heterocigosidad observada (Ho). La determinación del contenido de in-

formación polimórfica fue obtenido mediante la implementación de la formula $PIC = 1 - \sum f_i^2$ $i = 1$, donde f_i es la frecuencia del i th alelo (Garcia *et al.*, 2011).

La heterocigosidad esperada (H_e) se calculó como $H_e = 1 - \sum p_i^2$, donde " p " es la frecuencia del i th alelo en los genotipos evaluados. Por último, se estimó la heterocigosidad observada (H_o) a partir del resultado del cociente del número de individuos heterocigotos sobre el número total de individuos analizados.

Una vez determinados estos valores se calculó el coeficiente de similitud de Nei (1978), mediante procedimientos derivados de rutinas con el software estadístico R studio (R CORE TEAM, 2015) y se graficó un dendrograma con base en el resultado de la aplicación del algoritmo de agrupamiento UPGMA (Unweighted Pair Group Method With Arithmetic Mean).

Tabla 4. Valores contenidos de información polimórfica (PIC), heterocigosidad esperada (*He*) y heterocigosidad observada (*Ho*) a partir de la amplificación con los loci Hmct5, 102, HV 30, 548, HV 15, 416, m574, 103 y 358 del ADN de los clones evaluados.

Microsatélite	Hmct5	102	HV 30	548	HV 15	416	m574	103	358
PIC	0,91	0,90	0,92	0,89	0,92	0,85	0,90	0,89	0,89
<i>He</i>	0,88	0,84	0,88	0,81	0,86	0,74	0,88	0,81	0,82
<i>Ho</i>	0,95	0,86	0,76	0,46	0,41	0,46	0,89	0,70	0,68
alelos	14	14	17	10	14	15	12	14	14

RESULTADOS Y DISCUSION

Al determinar el contenido de información polimórfica (PIC), heterocigosidad esperada (*He*) y heterocigosidad observada (*Ho*) (Tabla 4) en la población analizada, se pudo concluir que todos los marcadores implementados mostraron un alto polimorfismo, el cual contenía clones de procedencia asiática y americana.

Con base en el contenido de información polimórfica (PIC) podemos afirmar que los marcadores más polimórficos sobre los clones evaluados en este estudio son los microsatélites HV30 y HV 15 con PIC = 0,92; microsatélite Hmct5 con PIC 0,91; microsatélites 102 y m574 con PIC 0,90; y microsatélites 548, 103 y 358 con PIC 0,89, en orden descendente.

El análisis de similitud permitió diferenciar 3 grandes grupos de clones, sin que necesariamente incluyan materiales procedentes de un mismo programa de fitomejoramiento en Asia o América (Figura 1). En el cluster I encontramos los clones PMB 1, RRIM 600, FX 3864^a, PB 314, IAC 500, IRCA 18, PB 217, FX 3864, IAC 302, RRIM 901, IAC 505, IAC 503, IAN 873, CDC 56, PB 312, FDR 5788, CDC 1174, CDC 312 y IAC 501. Algunos de estos clones, como es el caso de los materiales RRIM 600, PB 314 y RRIM 901, tienen en común los parentales PB 86 y Tjir 1(Gouvea *et al.*, 2010). En el cluster II, encontramos los clones IRCA 230, IRCA 317, FX 2261, IRCA 331, PB 254, PB 260, FDR 5240, PB 330, FDR 5597, RRIM 915 y PB 235, en donde particularmente se evidencia una estrecha relación entre los materiales de origen asiático PB 330, PB 235, PB 260, PB 254 y RRIM 915. La mayoría de estos clones fueron obtenidos a partir de cruzamientos con materiales PB 5/51 (PB 56 * PB 24), entre sus parentales (Morini *et al.*, 2012). Finalmente, en el cluster III encontramos los materiales RRIC 100, IAC 502, FDR 4575, MDX 607, IAC 511, IAC 424 y MDX 624 (Figura 1).

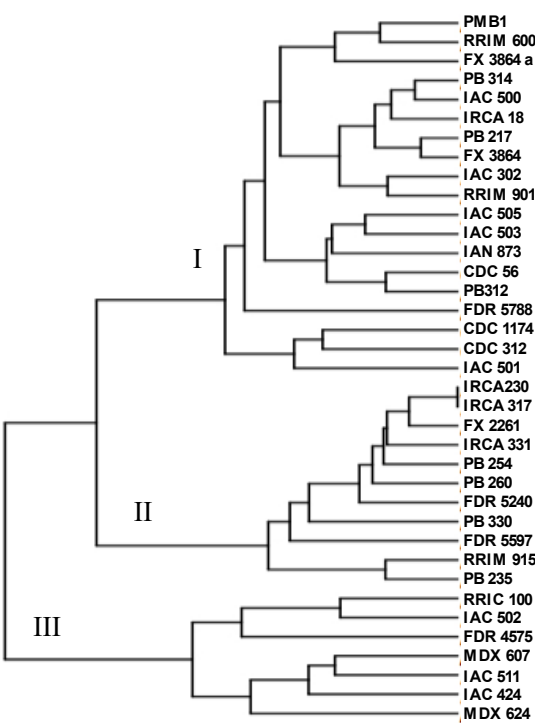


Figura 1. Dendrograma obtenido mediante el algoritmo de agrupamiento UPGMA a partir del coeficiente de similitud de Nei (1987).

Con la aplicación de esta técnica se evidencian las diferencias genéticas entre los clones asiáticos y americanos. En tal sentido, por ejemplo, amplificaciones del locus Hmct5 había sido reportado con valores *He* = 0,74 y *Ho* = 0,75 para clones asiáticos únicamente (Saha *et al.*, 2005), mientras que en el presente estudio mostró un mayor valor para estas variables al ser aplicado sobre clones tanto asiáticos como americanos *He* = 0,88 y *Ho* = 0,95.

Con base en los marcadores evaluados no se pudo establecer diferencias entre los clones IRCA 317 e IRCA 230, los cuales expresaron un perfil electroforético idéntico.

tico para estos loci. Adicionalmente, de los STR's evaluados, el único que permite discriminar entre el clon RRIM 600 y PB217 es el HV15 (PLEX 2). Entre tanto, el marcador 358 de la PLEX 3, se constituye en el único marcador que permite discriminar entre los clones PB 235 y PB 260. Entretanto, el único marcador que discrimina al clon FX 3864 de los clones RRIM 600 y PB 217 es el STR 358, en la PLEX 3.

De las muestras evaluadas del clon FX 3864, las procedentes del jardín clonal en Colombia proporcionaron perfiles electroforéticos distintos a las del FX 3864 proveniente de Brasil. Ello, particularmente, con los microsatélites Hmct 5, 102, HV 30, HV 15, m574 y 103. La información corrobora los resultados obtenidos por García *et al.* (2011), quienes sugirieron que el origen de las diferencias radica en el ingreso sin identificación confiable de origen de los clones de caucho a Colombia.

Con base en los resultados obtenidos es posible afirmar que el proceso de amplificación por PCR punto final y posterior electroforesis capilar con al menos un cebador fluoromarcado es una herramienta altamente sensible que permite aprovechar el carácter codominante de los marcadores moleculares microsatélites y el polimorfismo de las regiones evaluadas para la diferenciación por origen de clones de caucho. Además, es importante destacar que el método de visualización por electroforesis capilar permite determinar el valor exacto de las regiones amplificadas, aspecto por el cual, fue posible obtener valores PIC y He.

CONCLUSIONES

La herramienta permitió implementar una matriz de información que facilita el proceso de certificación de clones de *H. brasiliensis* provenientes de jardines de propagación clonal en Colombia. Su determinación y reproducibilidad, a partir de la evaluación sobre 37 clones procedentes de jardines de propagación clonal de Brasil y Colombia, garantiza la amplificación de material vegetal, a fin de cumplir con los requisitos establecidos por la resolución No. 001478/2006 ICA para la comercialización de material vegetal con destino a la ampliación y reposición de áreas con caucho. Por último, mas no menos importante, la metodología de visualización por electroforesis capilar en forma multiplexada, constituye una alternativa que permite evaluar varias regiones de forma simultanea, reduciendo costos.

AGRADECIMIENTOS

A los Doctores, Paulo Gonçalves y Erivaldo José Escallopi (IAC), Edson Luiz Furtado (UNESP) y Ondino C. Bataglia (CONPLANT) por su permanente apoyo con el desarrollo de esta investigación.

REFERENCIAS

- García, I., Peraza, A., Pinzón, Y., & Santacruz, O., Martínez, A., Tapiero, A., León, G., Arguello, O., Gutiérrez, A., García, F., Castilla, C., (2013) Modelo Productivo para el cultivo del árbol de caucho natural en la Orinoquía. CENICAUCHO-CORPOICA.
- Barrera, L., Zapata, J., Bolaños, D., Sterling, A., & Rodríguez, O. (2015). Caracterización morfológica y molecular de diez clones de caucho natural (*Hevea brasiliensis*) promisorios para la Amazonia colombiana. In *Ampliación de la base genética de caucho natural con proyección para la amazonia colombiana: fase de evaluación en periodo improductivo a gran escala. Instituto amazónico de investigaciones científicas - Sinchi* (p. 141).
- García, I., González, S., Montoya, D., & Aristizabal, F. (2011). Identification in silico of SSR markers for genotyping *Hevea* sp clone gardens in Colombia. *Revista Colombiana de Agronomía*, 29(3), 359–366.
- Hou, B., Feng, S., & Wu, Y. (2017). Systemic Identification of *Hevea brasiliensis* EST-SSR Markers and Primer Screening, *Journal of nucleic acids*, 2017.
- Morini, J., Cardoso, K., Roberto, L., Romão, D. C., & Briñez, B. (2012). Genetic diversity of cultivated accessions and wild species of rubber tree using EST - SSR markers, *Universidade estadual de campinas*, (1), 1087–1094.
- Regina, L., Gouvêa, L., Rubiano, L. B., Chioratto, A. F., Zucchi, M. I., & Gonçalves, P. D. S. (2010). Genetic divergence of rubber tree estimated by multivariate techniques and microsatellite markers, *Genetics and molecular Biology*, 318, 308–318.
- Saha, T. Bindu Roy, C. Nazeer, M. (2005). Microsatellite variability and its use in the characterization of cultivated clones of *Hevea brasiliensis*, *Plant breeding*, 92, 86–93.
- Salavarieta, P. J. R. (2002). Teoría y práctica para la extracción y purificación del ADN de palma de aceite Theory and Practice for the Extraction and Purification of the Oil Palm DNA, 23(42), 9–17.