

# SIMILARIDADE GENÉTICA ENTRE CLONES DE SERINGUEIRA (*Hevea brasiliensis*), POR MEIO DE MARCADORES RAPD

## Genetic similarity among rubber tree (*Hevea brasiliensis*) clones using RAPD markers

Karine Cristina Bicalho<sup>1</sup>, Luiz Edson Mota de Oliveira<sup>2</sup>, João Bosco dos Santos<sup>3</sup>,  
Alessandro Carlos Mesquita<sup>4</sup>, Evânia Galvão Mendonça<sup>5</sup>

### RESUMO

A seringueira [*Hevea brasiliensis* (Willd. ex. ADR. de Juss) Muell.-Arg.] é uma espécie nativa da região amazônica e compreende a maior fonte produtora de borracha natural do mundo. Na busca de condições mais favoráveis ao cultivo, além da busca pela auto-suficiência na produção de borracha natural, o cultivo da seringueira migrou para outras regiões do país. Objetivou-se, com o presente trabalho, estimar a similaridade genética de genótipos de seringueira, provenientes de regiões distintas do país, Lavras-MG (UFLA) e Campinas-SP (IAC), por meio de marcadores moleculares RAPD. A análise foi efetuada em 41 indivíduos, representados por 17 genótipos diferentes, com base em 19 *primers*, que geraram 121 fragmentos polimórficos. Os dados foram analisados utilizando o software NTSYS-pc – 2.1, por meio do coeficiente de Dice e pelo método das médias (UPGMA). A similaridade genética entre o material analisado variou de 0,56 a 1,00. Na análise do dendrograma, foram observados 18 grupos. Os clones (RRIM600, GT1, PB235, PL PIM e FX2261), utilizados em diferentes repetições, foram idênticos, quando comparados entre si, entretanto o mesmo não foi observado para os clones identificados como RRIM 701. Os resultados obtidos sugerem que o material avaliado na UFLA é o mesmo implantado no IAC, exceto o RRIM 701, mostrando uma ampla variabilidade genética, disponível para estudos e propagação da cultura.

**Termos para indexação:** Marcador de DNA, diversidade genética, germoplasma, identidade genética.

### ABSTRACT

The rubber tree [*Hevea brasiliensis* (Willd. ex. ADR. de Juss) Muell.-Arg.] is a native species from Amazon region, and represents the biggest source of natural rubber in the world. However, the rubber tree culture has had an expansion to other Brazilian regions, in search of more favorable conditions for its cultivation and self-sufficiency in natural rubber. The aim of this work was to estimate genetic similarity among rubber tree clones, from different Brazilian regions, Lavras (UFLA) and Campinas (IAC), by using RAPD molecular markers. The analysis was made using 41 individual plants, which represent 17 different clones, based on 19 primers, which raised 121 polymorphic fragments. The data were analysed with NTSYS-pc – 2.1 software, by using Dice coefficient and UPGMA method. Genetic similarity among the materials showed variation from 0,56 to 1,00. In dendrogram analysis, 18 groups were observed. The clones RRIM600, GT1, PB235, PLPIM and FX2261 used in different replications, were identical, when compared among themselves. However, results were not the same for the clones identified by RRIM 701. Results suggest that the UFLA material is the same of IAC material, except for RRIM 701, showing wide genetic variability available for studies and culture propagation.

**Index terms:** DNA marker, genetic diversity, germoplasm, genetic identity.

(Recebido em 13 de julho de 2006 e aprovado em 9 de abril de 2007)

### INTRODUÇÃO

A história da produção da borracha natural brasileira mostra que o país desfrutou da condição de principal produtor e exportador mundial no início do século XX, passando a ser hoje importador dessa matéria-prima (BERNARDES et al., 2000). Ao longo dos anos, a produção

de borracha natural tem sofrido flutuações, e o consumo interno tem crescido linearmente. Em 2005, a produção mundial de borracha natural foi de 8.682 mil toneladas, para um consumo de 8.742 mil toneladas. Os países asiáticos, principalmente Tailândia, Indonésia e Malásia, destacam-se como os maiores produtores mundiais de borracha e respondem por, aproximadamente, 90% da

<sup>1</sup>Bióloga, Mestre em Fisiologia Vegetal – Departamento de Biologia/DBI – Universidade Federal de Lavras/UFLA – Cx. P. 3037 – 37200-000 – Lavras, MG – karinecbribeiro@yahoo.com.br

<sup>2</sup>Doutor em Fisiologia Vegetal, Professor Titular – Departamento de Biologia/DBI – Universidade Federal de Lavras/UFLA – Cx. P. 3037 – 37200-000 – Lavras, MG – ledson@ufla.br

<sup>3</sup>Doutor em Agronomia, Professor Titular – Departamento de Biologia/DBI – Universidade Federal de Lavras/UFLA – Cx. P. 3037 – 37200-000 – Lavras, MG – jbsantos@ufla.br

<sup>4</sup>Doutor em Fisiologia Vegetal, Pesquisador – Departamento de Biologia/DBI – Universidade Federal de Lavras/UFLA – Cx. P. 3037 – 37200-000 – Lavras, MG – mesquita@ufla.br

<sup>5</sup>Engenheira Florestal – Mestranda em Biotecnologia Vegetal – Departamento de Ciências Florestais/DCF – Universidade Federal de Lavras/UFLA – Cx. P. 3037 – 37200-000 – Lavras, MG – evaniafloresta@hotmail.com

produção de borracha natural consumida mundialmente (IRSG, 2006). Esses dados retratam a importância econômica da cultura no contexto nacional e internacional (GONÇALVES, 2002; PEREIRA, 2002). A seringueira [*Hevea brasiliensis* (Willd. ex. ADR. de Juss.) Muell.-Arg.] é considerada a principal fonte de borracha natural do mundo, constituindo entre outros, um produto de grande importância econômica na indústria de pneumáticos, contribuindo com 75% da produção mundial.

Em função da alta demanda de borracha natural e da incidência do mal das folhas, causado pelo *Microcyclus ulei* (P.Henn.), o cultivo da seringueira migrou para fora de sua região tradicional, onde as condições ambientais são diferentes da região de origem da espécie, principalmente para a região sudeste, procurando ocupar as chamadas áreas de escape. As diferentes procedências em outros ambientes possibilitam a mistura de material, gerando dúvidas em relação à sua verdadeira identidade, acarretando respostas potencialmente diferentes dentro dos clones, refletindo-se expressivamente no comportamento fisiológico e, conseqüentemente, na produção de borracha. Entretanto, a expansão da heveicultura constitui uma solução para minimizar os volumes de importação do produto na busca da auto-suficiência em borracha natural, representando uma importante alternativa de ganhos sócio-econômicos e ambientais. Além disso, a seringueira contribui para a eliminação do CO<sub>2</sub> (seqüestro de carbono) reduzindo, portanto, o efeito estufa (GONÇALVES et al., 2002). Com base no exposto, a heveicultura tem um papel social de grande relevância e pode ser considerada como uma alternativa viável para a redução dos atuais problemas sócio-econômicos e ambientais do Brasil.

Em razão da interferência do ambiente e algumas semelhanças de ordem genética entre clones, nem sempre é possível distingui-los visualmente, requerendo um método de identificação que seja isento de influências ambientais (KALIL FILHO et al., 2000). Diversas técnicas de biologia molecular estão hoje disponíveis para a detecção de variabilidade genética ao nível de DNA (FERREIRA & GRATAPAGLIA, 1998). Marcadores de DNA permitem a avaliação, em curto prazo, de um número elevado de genótipos e por um custo relativamente baixo. Além disso, não são influenciados pelas condições ambientais e mostram alto nível de polimorfismo (WILLIAMS et al., 1990).

Atualmente, existe grande variedade de marcadores moleculares disponíveis para diferentes tipos de estudos genéticos (CAIXETA et al., 2006). Entre eles destacam-se o RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*). Em seringueira, estudos utilizando marcadores moleculares já vêm sendo realizados em muitas partes do mundo, Besse

et al. (1994), Kalil Filho et al. (1998, 2000) e Lespinasse et al. (2000). Alguns trabalhos, utilizando o marcador RAPD, têm sido realizados com seringueira (MARQUES et al., 2002; VARGHESE et al., 1997; VENKATACHALAM et al., 2004).

Objetivou-se, neste estudo, estimar a similaridade genética entre genótipos de seringueira, por meio de marcadores RAPD e dentro de alguns clones; comparar as diferentes procedências de alguns desses genótipos, com o intuito de estabelecer a semelhança genética entre eles e dentro dos genótipos.

## MATERIALE MÉTODOS

### Material vegetal e extração de DNA

O material analisado foi composto de 17 genótipos de seringueira, pertencentes ao jardim clonal e plantio experimental, ambos localizados no Setor de Fisiologia Vegetal - Departamento de Biologia (DBI), da Universidade Federal de Lavras - MG (UFLA) e provenientes do Instituto Agrônomo (IAC), em Campinas, São Paulo. Os genótipos utilizados foram: RRIM 701, RRIM 600, GT1, PB 235, PL PIM, Fx 2261, PR 255, IAN 3087, IAC 15, IAN 3156, IAN 2880, IAN 3193, Fx 3899, PR 107, ESAL 1, ESAL 2, IPA 1, os quais foram avaliados em mais de um ramete, sendo oriundos do jardim clonal e do plantio experimental, ambos pertencentes à UFLA/MG e os 4 genótipos restantes foram provenientes do IAC/SP (Tabela 1). Nota-se nessa tabela que os clones RRIM 600, GT1, PB 235, PLPIM, FX2261 e RRIM 701 foram analisados em diferentes plantas oriundas de localidades distintas.

O DNA foi obtido de folhas verdes, no estágio de desenvolvimento D (completamente expandidas) de plantas jovens oriundas do jardim clonal e de plantas adultas, em processo de sangria, cultivadas em plantios experimentais e no IAC, como mencionado anteriormente. A extração do DNA foi realizada de acordo com o procedimento descrito por Nienhuis et al. (1995), com algumas modificações, utilizando-se cerca de 2,5g de folhas de cada indivíduo, que foram maceradas em nitrogênio líquido e em seguida adicionados 10mL de tampão de extração, CTAB 2% (100mM de TRIS - pH 8,0; 20mM de EDTA- pH 8,0; 1,4M de NaCl ; 1% de PVP a 65°C), acrescido de 100µl de β-mercaptoetanol. O material triturado foi transferido para tubos plásticos que foram agitados e mantidos em banho-maria a 65°C, por 30 minutos. O extrato foi misturado com 10mL clorofórmio: álcool isoamil (24:1), sendo homogeneizado para a separação das fases orgânicas e aquosas. Após centrifugar por 10 minutos a 5.000 rpm, o sobrenadante foi coletado e colocado em 30mL de álcool etílico a 95%: acetato de amônio 7,5M (6:1) e armazenado

em freezer à -20°C, para a precipitação do DNA. O material foi coletado e transferido para tubos eppendorf, centrifugado e posteriormente seco à temperatura ambiente. O DNA foi ressuscitado com 300µl tampão TE (TRIS 1mM e EDTA 0,1mM, pH 7,7). Foi realizada uma segunda extração com o DNA dissolvido, pelo acréscimo de clorofórmio álcool isoamil, sendo centrifugado a 12.000 rpm. O sobrenadante foi coletado em tubo eppendorf e completado com o triplo de seu volume pela solução de álcool etílico a 95%: acetato de sódio 3M (20:1), sendo mantido sob baixa temperatura. Após a precipitação, eliminou-se o sobrenadante e o DNA foi seco à temperatura ambiente e reidratado em 50-100µL de tampão TE. A concentração de DNA foi estimada em fluorímetro, colocando-se 2µL de DNA, em 2mL de tampão (Tris 10mM, EDTA 1,0mM, NaCl 0,1M com pH 7,4), contendo 0,1 µL.mL<sup>-1</sup> do corante H32258. As amostras de DNA quantificadas

foram diluídas em TE, para a concentração de 10ng.µL<sup>-1</sup> para ser usado nas reações de PCR .

#### Análise RAPD

Na análise RAPD foram utilizados os *primers* OPAI-15, OPA-02, OPA-03, OPA-11, OPB-01, OPB-04, OPB-08, OPB-11, OPB-12, OPC-08, OPD-07, OPD-11, OPD-13, OPD-15, OPE-02, OPE-14, OPE-15, OPE-16, OPN-16.

As reações foram preparadas de acordo com o procedimento de Nienhuis et al. (1995), com algumas modificações, num volume total de 12 µL, contendo: 22 ng da mistura de DNA, 50 µM de cada um dos desoxirribonucleotídeos trifosfatos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 0,4 µM de *primer*, 0,6 unidades da enzima Taq DNA polimerase, tampão de reação (50mM de Tris pH 8,3; 2,0mM de MgCl<sub>2</sub>; 20mM de KCl; 250 µg.mL<sup>-1</sup> de albumina de soro bovino; 1% de ficoll 400 e 1 mM de tartrazina) e água. As ampliações foram realizadas em termociclador,

Tabela 1 – Identificação do material e suas respectivas origens: (JC) = Jardim clonal; (PE) = Plantio experimental, ambos (UFLA/MG) e (IAC) = Instituto Agrônomo (IAC-SP).

Identificação	Genótipo	Origem	Identificação	Genótipo	Origem
1	RRIM 701	JC	22	PL PIM	PE
2	RRIM 701	IAC	23	PL PIM	PE
3	RRIM 600	JC	24	PL PIM	PE
4	RRIM 600	IAC	25	FX2261	JC
5	RRIM 600	PE	26	FX2261	PE
6	RRIM 600	PE	27	FX2261	PE
7	RRIM 600	PE	28	FX2261	PE
8	RRIM 600	PE	29	FX2261	PE
9	RRIM 600	PE	30	FX2261	PE
10	GT1	JC	31	PR255	JC
11	GT1	IAC	32	IAN 3087	JC
12	GT1	PE	33	IAC15	JC
13	GT1	PE	34	IAN3156	JC
14	GT1	PE	35	IAN 2880	JC
15	GT1	PE	36	IAN 3193	JC
16	GT1	PE	37	FX3899	JC
17	PB235	JC	38	PR 107	JC
18	PB235	IAC	39	ESAL2	JC
19	PL PIM	JC	40	ESAL1	JC
20	PL PIM	PE	41	IPA1	JC
21	PL PIM	PE	-	-	-

RRIM = Rubber Research Institut of Malaysia; GT= Godan Tapan; PB= Prang Besar; PL PIM= Pil Pilmoor; Fx= Ford cruzamento; PR= Proefstation Voor Rubber; IAN= Instituto Agrônomo do Norte; IAC= Instituto Agrônomo de Campinas; ESAL= Escola Superior de Agricultura de Lavras; IPA= Empresa de Pesquisa Agropecuária de Itapirema-PE. \*Genótipo e origem repetidos correspondem ao mesmo clone.

programado para 40 ciclos de 94°C por 2 e 15 segundos, 35°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto; seguidos de mais 7 minutos a 72°C, para completar a extensão dos produtos amplificados. Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese horizontal, em gel de agarose 1% e tratados com brometo de etídio 0,5µg.mL<sup>-1</sup>, por 20 minutos. Foi utilizado TBE (0,45M de Tris-Borato e 0,01M de EDTA), como tampão de gel e de corrida. Após a eletroforese, os géis foram visualizados em transiluminador de luz ultravioleta; as imagens capturadas em câmera digital e arquivadas em computador, para posterior avaliação dos padrões de bandas.

### Análise dos dados

Para análise dos dados, foi construída uma matriz de dados binários com presença (1) e ausência de banda (0), para os fragmentos amplificados. Foram incluídas na análise somente as bandas de intensidade média ou intensa, eliminando as bandas de coloração fraca e que não apresentavam repetibilidade. Os dados foram analisados utilizando o software NTSYS-pc – 2.1 (ROHLF, 2000). A similaridade entre os genótipos foi estimada pelo coeficiente de Dice, que gerou a matriz de similaridade. A partir dessa matriz, foi realizado o agrupamento pelo método UPGMA, (*Unweighted Pair Group Method Averages*), gerando o dendrograma. Os erros associados a cada similaridade ( $s_{sg}$ ) e o valor máximo significativo de similaridade ( $sg_m$ ), estimado pelo teste de  $t$ , no nível de 1% de probabilidade foram determinados, de acordo com Hagiwara et al. (2001). O valor de  $t$  obtido foi utilizado para realizar um corte no dendrograma e delimitar os grupos distintos.

Um histograma foi construído para analisar os dados de similaridade genética, sendo as classes de similaridade e a frequência porcentual obtida por meio do software Genes (CRUZ, 2001). Portanto, a matriz de similaridade genética foi analisada por meio da distribuição de frequência e coeficiente de assimetria. Os valores de referência adotados para o coeficiente de assimetria foram:  $S < 0$ , distribuição assimétrica à esquerda e  $S > 0$ , distribuição assimétrica à direita (ZAR, 1999).

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os 19 *primers* utilizados produziram um total de 121 fragmentos polimórficos. O número médio de bandas por *primers* foi (6,3), variando de 10 (OPA-03) a 4 (OPD-13 e OPE-14). Com base nos fragmentos amplificados foi construída uma matriz de dados binários e estimada a similaridade genética, relacionando todos os genótipos dois a dois. Foram obtidas 820 estimativas de similaridades

genéticas, dadas pela expressão  $n(n-1)/2$ , em que  $n$  é o número de genótipos. Tais estimativas de similaridade genética estão representadas na figura 1, onde a distribuição de frequência das similaridades foi positivamente assimétrica, indicando que valores inferiores de similaridade genética predominam entre os genótipos analisados.

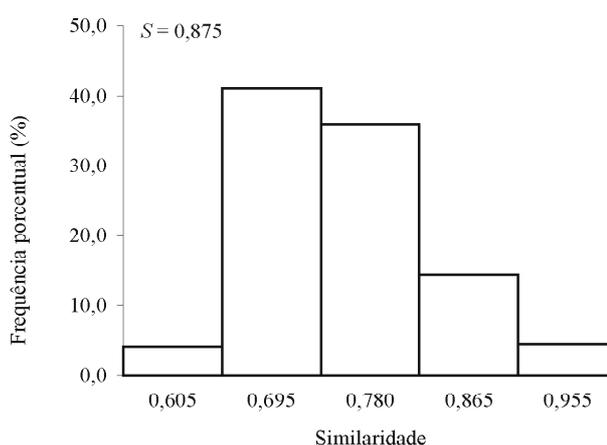


Figura 1 – Histograma representativo das frequências de similaridade, com base nos dados estimados, através dos índices de similaridade genética.

Os índices de similaridade estimado para todos os genótipos variou de 0,56 a 1,00, apresentando média de 0,77, o que confirma os dados representados na figura 1, onde as menores classes de similaridade estão representadas por um maior número de genótipos. Em clones de seringueira, já foram relatadas similaridades genéticas com amplitudes bem diferentes à dos valores observados nesse trabalho, variando de 0,05-0,75 (VARGHESE et al., 1997) e 0,18-0,40 (MARQUES et al., 2002).

Através da análise do dendrograma observa-se a formação de grupos, os quais são delimitados por uma linha de corte dada pela estimativa  $sg_m$  ao nível 1% de probabilidade e determinada pelo teste de  $t$ , identificando os genótipos geneticamente diferentes, acima dos quais os indivíduos são similares (HAGIWARA et al., 2001). O valor de  $t$  ao nível de 1% foi de 0,91 e permitiu identificar 18 grupos, considerados distintos, evidenciando a variabilidade genética entre o material, conforme observa-se na figura 2. Pode-se visualizar que 13 grupos foram formados por um indivíduo cada. Os demais agrupamentos foram construídos por, pelo menos dois indivíduos, sendo os grupos 15 e 16 os mais numerosos, abrangendo cada

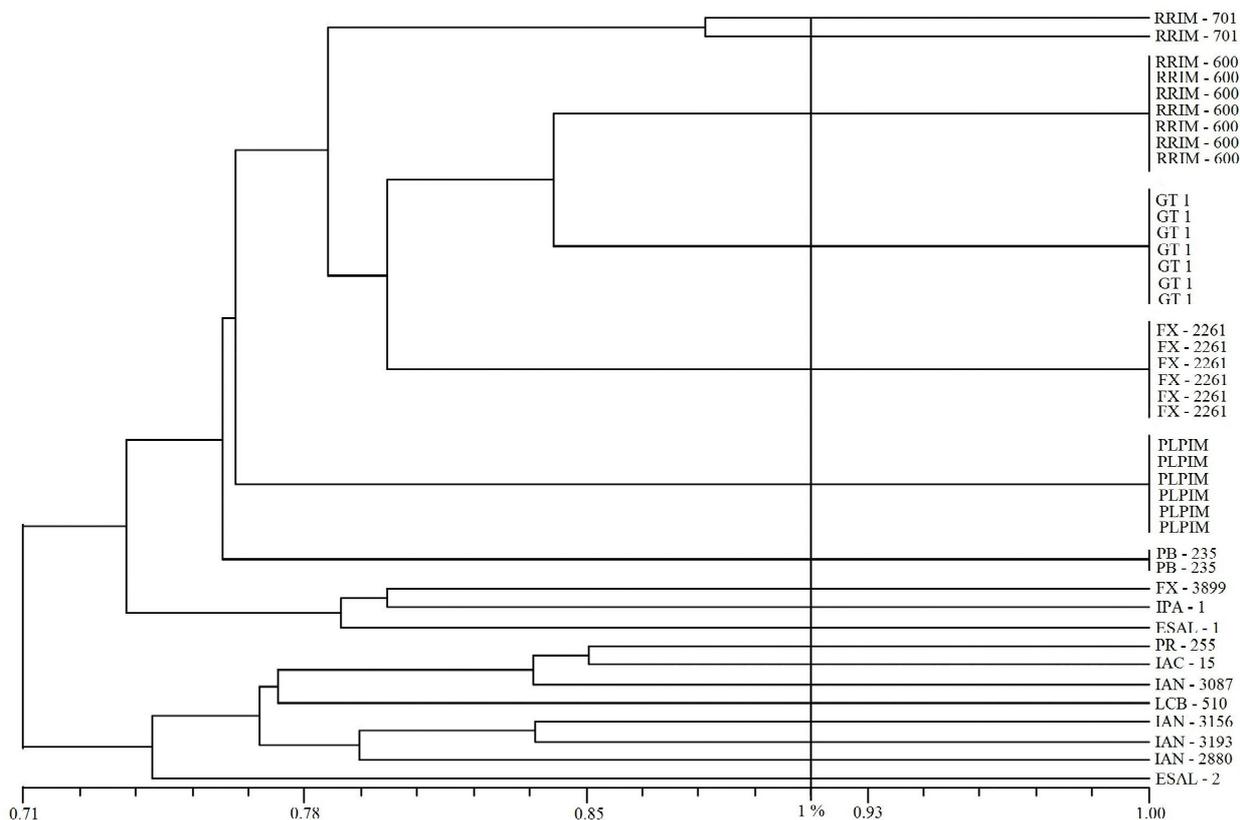


Figura 2 – Similaridade genética entre os 17 genótipos de seringueira, definida pelo critério de agrupamento UPGMA, com base no coeficiente de Dice e o ponto de corte ao nível de 1% de probabilidade, baseada no teste *t*.

um sete plantas repetidas dos respectivos clones. Vale destacar que os grupos de menor similaridade genética concentram-se nos primeiros grupos e, portanto, correspondem àqueles mais divergentes. É importante ainda ressaltar que, na análise de agrupamento os clones identificados por RRIM 701, formaram dois grupos distintos, embora dispostos próximos no dendrograma. Esse resultado sugere a existência de pequena dissimilaridade entre os dois materiais genéticos, decorrente de erro na identificação de clones, porém, morfológicamente semelhantes. Nota-se que, os grupos 12, 13, 14, 15 e 16 são formados pelas plantas repetidas de cada clone, confirmando a identidade genética. Esses resultados permitem uma análise preliminar da diferenciação entre o material em estudo, fornecendo subsídio para a realização de outros trabalhos. A continuidade dessas pesquisas é fundamental para a compreensão dos processos fisiológicos e genéticos dessa espécie, nas mais variadas condições ambientais.

## CONCLUSÕES

Constatou-se ampla variabilidade genética entre os clones, baseada na similaridade estimada a partir de marcadores RAPD;

A identidade da maioria dos clones foi confirmada, contudo os dados moleculares foram eficientes em detectar um erro na identificação de duas plantas mencionadas como sendo o clone RRIM 701, provenientes de locais diferentes.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BERNARDES, M. S.; VEIGA, A. S.; FONSECA FILHO, I. I. Mercado brasileiro de borracha natural. In: BERNARDES, M. S. (Ed.). **Sangria da seringueira**. Piracicaba: Esalq, 2000. p. 365-388.

BESSE, P.; SEGUIN, M.; LEBRUN, P.; CHEVALLIER, M. H.; NICOLAS, D. Genetic diversity among wild and cultivated populations of *Hevea brasiliensis* assessed by nuclear RFLP analysis. **Theoretical Applied Genetics**, New York, v. 88, p. 199-207, 1994.

- CAIXETA, E. T.; OLIVEIRA, A. C. B.; BRITO, G. G.; SAKIYAMA, N. S. Tipos de marcadores moleculares. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. (Eds.). **Marcadores moleculares**. Viçosa: UFV, 2006. p. 9-78.
- CRUZ, C. D. **Programa genes**: versão Windows: aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa: UFV, 2001.
- FERREIRA, M. E.; GRATAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análises genéticas**. 3. ed. Brasília, DF: Embrapa-CERNAGEN, 1998. (Documento, 20).
- GONÇALVES, P. de S. Uma história de sucesso: a seringueira no estado de São Paulo. **O Agrônomo**, Campinas, v. 54, n. 1, 2002a.
- GONÇALVES, P. de S.; MARTINS, A. L. M.; FURTADO, E. L.; SAMBUGARO, R.; ORTOLANI, A. A.; JÚNIOR, G. G. Desempenho de clones de seringueira da série IAC 300 na região do planalto de São Paulo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 2, fev. 2002b.
- HAGIWARA, W. E.; SANTOS, J. B. dos; CARMO, S. L. M. do. Use of RAPD to aid selection in common bean backcross breeding programs. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Londrina, v. 1, n. 4, p. 335-362, 2001.
- INTERNATIONAL RUBBER STUDY GROUP. **Production and consumption of natural rubber**: rubber industry Report. Disponível em: <<http://www.rubberstudy.com/statistics-quarstat.aspx>>. Acesso em: 10 maio 2006.
- KALIL FILHO, A. N.; LAMA, M. A.; MESTRINER, M. A. Aperfeiçoamento da técnica de eletroforese para análise isoenzimática de clones de seringueira. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 28, n. 1, p. 1-40, 1998.
- KALIL FILHO, A. N.; LAMA, M. A. L.; MESTRINER, M. A. Identificação de clones de seringueira por isoenzimas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, n. 51, p. 1-3, dez. 2000.
- LESPINASSE, D.; RODIER-GOUD, M.; GRIVET, L.; LECONTE, A.; LEGNATE, H.; SEGUIN, M. A saturated genetic linkage map of rubber tree (*Hevea* spp) based on RFLP, AFLP, microsátélites and isozime markers. **Theoretical Applied Genetics**, New York, v. 100, p. 127-138, 2000.
- MARQUES, J. R. B.; FALEIRO, F. G.; ARAUJO, I. S.; ANHERT, D. Diversidade genética entre clones de seringueira (*Hevea brasiliensis*) das séries Fx e SIAL com base em marcadores moleculares RAPD. **Agrotropica**, Salvador, v. 14, n. 3, p. 159-164, 2002.
- NIENHUIS, J.; TIVANG, J.; SCKROCH, P.; SANTOS, J. B. Genetic relationships among cultivars and lines of lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) as measured by RAPD markers. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 120, n. 2, p. 300-306, Mar. 1995.
- PEREIRA, A. V. **Cultura da seringueira em Goiás**. 2002. Disponível em: <[http://bbeletronica.cpac.embrapa.br/2002/posteres/p2002\\_79.pdf](http://bbeletronica.cpac.embrapa.br/2002/posteres/p2002_79.pdf)>. Acesso em: 8 maio 2006.
- ROHLF, F. J. **Numerical taxonomy and multivariate analysis system**. Version 2.1. New York: Exeter Software, 2000. 38 p.
- VARGHESE, Y. A.; KNAACK, C.; SETHURAJ, M. R.; ECKE, W. Evaluation of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in *Hevea brasiliensis*. **Plant Breeding**, Berlin, v. 116, n. 1, p. 47-52, 1997.
- VENKATACHALAM, P.; PRIYA, P.; SARASWATHY-AMMA, C. K.; THULASEEDHARAM, A. Identification, cloning and sequence analysis of a dwarf genome-specific RAPD markers in rubber tree [*Hevea brasiliensis* (Muell.) Arg.]. **Plant Cell Rep.**, [S.l.], v. 23, p. 327-332, 2004.
- WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, [S.l.], v. 18, p. 6531-6535, 1990.
- ZAR, J. H. **Biostatistical analysis**. New Jersey: Prentice-Hall, 1999.