

DIVERSIDADE GENÉTICA ENTRE ACESSOS CLONais DE SERINGUEIRA (*Hevea* spp.) UTILIZANDO MARCADORES MOLECULARES RAPD

José Raimundo Bonadie Marques¹, Rogério Mercês Ferreira Santos², Ronaldo Carvalho Santos¹

¹CEPLAC/Centro de Pesquisas do Cacau, Seção de Genética, Caixa Postal 07, 45600-970, Itabuna, Bahia, Brasil,
bonadie@cepec.gov.br; ²Universidade Estadual de Feira de Santana, Departamento de Ciências Biológicas/DCBIO,
rogeriomerces@gmail.com

No continente americano, a seringueira tem enfrentado uma série de problemas relacionados à ocorrência de doenças, principalmente as foliares, causada pelos fungos *Microcyclus ulei* e *Phytophthora* spp. Para superar este problema, o desenvolvimento de variedades clonais produtivas e resistentes é a forma mais viável economicamente e correta de controle. Sabe-se ainda que as fontes de resistência envolvidas nos clones de *Hevea brasiliensis*, recomendados para a produção de borracha no mundo, são bastante restritas. Portanto, a identificação de novos genes e seus respectivos alelos de resistência, em outras espécies do gênero *Hevea*, é uma estratégia que pode ser eficientemente aproveitada nos programas de melhoramento para as áreas tradicionais de cultivo. O conhecimento da diversidade genética disponível nos clones da série CPAA C, recém-introduzidos e mantidos na Estação Experimental Djalma Bahia (EDJAB), em Una, BA, assume papel preponderante para o programa. Isto porque existe a possibilidade de que esses acessos, descendentes da hibridização de *H. pauciflora* com as espécies *H. rigidifolia* e *H. guianensis* var. *marginata*, venham a se constituir em novas e distintas fontes de resistência. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a diversidade genética de 16 acessos dessa série por meio de marcadores moleculares RAPD, com base em oito iniciadores, que geraram 48 fragmentos polimórficos. A análise do agrupamento revelou que os marcadores RAPD foram eficientes para discriminação dos acessos e que houve variabilidade genética potencial para uso em programas de melhoramento que visam à incorporação de genes de resistência nos clones de *H. brasiliensis* de alta produção de borracha.

Palavras-chave: melhoramento genético, germoplasma, similaridade.

Genetic diversity among rubber (*Hevea* spp.) clones using RAPD molecular markers. In the Americas, the rubber tree has faced a number of problems related to the diseases occurrence, especially leaf diseases, caused by the fungi *Microcyclus ulei* and *Phytophthora* spp. To cope with this problem, the development of productive and resistant clonal varieties is the most economically viable and correct form of control. It is also known that resistance sources involved in clones of *Hevea brasiliensis* recommended for rubber production in the world are very restricted. Therefore, the identification in other species of the *Hevea* genus of new genes and their respective resistance alleles is a strategy that can be efficiently utilized in breeding programs for traditional cultivation areas. Knowledge of the genetic diversity available in clones of the CPAA C series, newly introduced and maintained at Djalma Bahia Experimental Station (EDJAB) in Una, BA, Brazil, assumes leading role in the program. This is because the possibility exists that such accesses, descendants of the hybridization of *H. pauciflora* with species of *H. rigidifolia* and *H. guianensis* var. *marginata*, may constitute new and distinct sources of resistance. Therefore, we assessed the genetic diversity of 16 accesses of this series using RAPD molecular markers based on 8 primers, which generated 48 polymorphic fragments. Cluster analysis revealed that the RAPD markers were efficient for accesses discrimination and that there was genetic variability with potential for its use in breeding programs aimed at incorporating resistance genes in clones of *H. brasiliensis* of high rubber production.

Key words: genetic breeding, germoplasm, similarity

Introdução

Um dos principais problemas enfrentados pelos heveicultores nas áreas tradicionais de cultivo da seringueira (*Hevea* spp.) no continente americano é, sem dúvida, a ocorrência de diversas doenças causadas em folhas pelos fungos *Microcyclus ulei* (mal-das-folhas), *Phytophthora* spp. (requeima e queda-anormal-das-folhas) e *Colletotrichum gloeosporioide* (antracnose) e em painéis de sangria por *Phytophthora* spp. (cancro-do-painel) e *Ceratocystis fimbriata* (mofo cinzento). Dentre as doenças de folhas, o mal-das-folhas é a que causa maiores danos econômicos aos seringais tecnicamente implantados, por apresentar grande variabilidade e mutabilidade (Miller, 1966; Junqueira et al., 1986; Gasparotto e Junqueira, 1994), tendo sido já caracterizadas oito raças fisiológicas do fungo *M. ulei* (Chee et al., 1986).

Muito embora exista ampla variabilidade genética nas espécies que compõem o gênero *Hevea*, favorecendo a prospecção e uso de vários genes e seus respectivos alelos para diversas características de interesse agronômico, as variedades clonais atualmente cultivadas possuem uma base genética bastante estreita (Lopes e Marques, 2015). Desse modo, o conhecimento da diversidade genética disponível em diferentes populações de seringueira é de fundamental importância para o programa de melhoramento genético. Isto possibilitaria a identificação de parentais divergentes para uso em cruzamentos, buscando-se combinações gênicas que possibilitem a obtenção de genótipos superiores.

Nos últimos anos, métodos biotecnológicos têm sido cada vez mais incorporados aos programas de melhoramento convencional, por acessar mais rapidamente a variabilidade genética, em nível de DNA, assim como identificar a diversidade disponível nas coleções de germoplasma. A utilização direta dessas informações em várias culturas perenes tem propiciado alta eficiência na seleção, rapidez na obtenção de ganhos genéticos quando comparados com a seleção baseada em apenas dados fenotípicos (Ferreira e Grattapaglia, 1998). Essas técnicas, além de não interagirem com o ambiente, conseguem distinguir parentais divergentes e ainda são passíveis de aplicação em qualquer estádio de desenvolvimento da planta, aspecto particularmente importante nos

estudos de diversidade genética da seringueira (Gouvêa, 2009).

Diferentes tipos de marcadores moleculares encontram-se disponíveis para a detecção da variabilidade genética em nível de DNA. Dentre esses marcadores, o RAPD foi o mais utilizado para interpretação da diversidade genética em seringueira (Bicalho et al., 2008; Hernandez et al., 2006; Venkatachalam et al., 2002; Marques et al., 2002; Varghese et al., 1997). Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a diversidade genética existente entre acessos clonais de seringueira da série CPAA C, resultantes de cruzamentos interespecíficos entre parentais de *H. pauciflora* e das espécies *H. rigidifolia* e *H. guianensis* var. *marginata*, via marcadores moleculares RAPD, visando identificar parentais divergentes de *H. pauciflora* para posterior utilização em programas de melhoramento desta cultura.

Material e Métodos

Material Genético

Para o estudo foram analisados 16 acessos de seringueira (Tabela 1), selecionados no Centro de Pesquisa Agroflorestal da Amazônia (CPAA) como clones para uso nos trabalhos de enxertia de copa (Moraes, 2000; Moraes e Moraes, 1996; Moraes e Moraes, 1995). Destes, 15 acessos são resultantes do cruzamento entre seis clones parentais distintos de *H. pauciflora* (CBA 1, CNS AM 7745, CNS G 112, CNS G 124, CNS G 118 e um acesso da coleção de Baldwin) com os clones de *H. guianensis* var. *marginata* (Hgm 1 e Hgm 14) e *H. rigidifolia* (CNS AM 8105). Apenas o CPAA C 01 é uma seleção ilegítima de *H. guianensis* var. *marginata* (Marques et al., 2003). As amostras foram coletadas na coleção de germoplasma de seringueira, mantida na Estação Experimental Djalma Bahia (EDJAB), em Una, BA. Foi amostrada apenas uma planta de cada acesso. Todas as amostras de DNA utilizados apresentaram quantidade e qualidade satisfatórias para análise de diversidade genética.

Extração de DNA

O DNA genômico dos 16 acessos de seringueira foi extraído no Laboratório de Biotecnologia do Centro de Pesquisa do Cacau (CEPEC) de acordo com o

Tabela 1. Acessos clonais de seringueira da série CPAA C e seus respectivos parentais, estabelecidos na Estação Experimental Djalma Bahia (EDJAB), em Una, BA, 2015

Acesso clonal	Parentais
CPAA C 01	Ilegítimo de Hgm 1 (<i>H. guianensis</i> var. <i>marginata</i>) ¹
CPAA C 11	<i>H. pauciflora</i> ² x CNS AM 8105 (<i>H. rigidifolia</i>)
CPAA C 12	CNS AM 8105 (<i>H. rigidifolia</i>) x <i>H. pauciflora</i> ²
CPAA C 13	Hgm 1(<i>H. guianensis</i> var. <i>marginata</i>) x CNS G 112 (<i>H. pauciflora</i>)
CPAA C 14	Hgm 1 (<i>H. guianensis</i> var. <i>marginata</i>) x CNS G 112 (<i>H. pauciflora</i>)
CPAA C 18	Hgm 1 (<i>H. guianensis</i> var. <i>marginata</i>) x CNS G 112 (<i>H. pauciflora</i>)
CPAA C 16	CNS G 112 (<i>H. pauciflora</i>) x Hgm 1(<i>H. guianensis</i> var. <i>marginata</i>)
CPAA C 47	Hgm 14 (<i>H. guianensis</i> var. <i>marginata</i>) x CBA 1 (<i>H. pauciflora</i>)
CPAA C 49	CBA 1 (<i>H. pauciflora</i>) x CNS AM 8105(<i>H. rigidifolia</i>)
CPAA C 27	CNS AM 7745 (<i>H. pauciflora</i>) x CNS AM 8105 (<i>H. rigidifolia</i>)
CPAA C 26	CNS AM 7745 (<i>H. pauciflora</i>) x CNS AM 8105 (<i>H. rigidifolia</i>)
CPAA C 50	CNS AM 7745 (<i>H. pauciflora</i>) x CNS AM 8105 (<i>H. rigidifolia</i>)
CPAA C 51	CNS AM 7745 (<i>H. pauciflora</i>) x CNS AM 8105 (<i>H. rigidifolia</i>)
CPAA C 52	CNS AM 7745 (<i>H. pauciflora</i>) x CNS AM 8105 (<i>H. rigidifolia</i>)
CPAA C 33	CNS G 124 (<i>H. pauciflora</i>) x CNS AM 8105 (<i>H. rigidifolia</i>)
CPAA C 60	CNS G 118 (<i>H. pauciflora</i>) x CNS AM 8105 (<i>H. rigidifolia</i>)

¹ Muito provavelmente com pólen de *H. pauciflora*.

² Clone de *H. pauciflora* da coleção de espécies do antigo CNPSD, trazido da matriz da coleção de Baldwin, do antigo Instituto Agronômico do Norte (IAN).

protocolo CTAB 7% de Doyle & Doyle (1990), modificado por Araújo et al. (2000). Após a extração, a concentração e a pureza do DNA foi estimada por espectrofotometria a 260/280 nm (Sambrook et al., 1989). Depois da quantificação, o DNA foi diluído para 10 ng/ μ L.

Genotipagem

As amostras de DNA de cada acesso clonal foram amplificadas pela técnica de RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic DNA - Polymerase chain Reaction). As reações de amplificação foram feitas em volume total de 25 μ L, contendo água ultrapura, tampão de reação 10X (Tris-HCL 10 mM 8,3; KCL 50 mM), 2 mM MgCl₂, desoxinucleotídeos (dATP, dTTP, dGTP e dCTP), 4 μ M primer (Operon Technologies Inc., Alameda, CA, EUA), uma unidade de Taq polimerase (1u) e 30 ng de DNA genômico. Foram utilizados 20 iniciadores decâmeros para obtenção dos marcadores RAPD. As amplificações foram efetuadas em termociclador MJ Research PTC-100 programado para 40 ciclos. Cada ciclo foi constituído pela seguinte sequência: 15 s a 94°C, 30 s a 35°C e 90 s a 72°C. Após a amplificação, foram adicionados, a cada amostra, 3 μ L de uma mistura de

azul de bromofenol (0,25%), glicerol (60%) e água (39,75%). Essas amostras foram aplicadas em gel de agarose (1,2%), submerso em tampão TBE (Tris-Borato 90 mM, EDTA 1 mM). Os fragmentos amplificados por PCR e separados por eletroforese, foram visualizados sob luz UV e documentados em fotodocumentador modelo L-Pix (Loccus).

Análises genéticas

Por meio da análise do bandeamento produzido com o uso de cada oligonucleotídeo iniciador aleatório, foi conferido o parâmetro 1 para a presença de banda e 0 para a ausência de banda, permitindo a elaboração de uma matriz binária. A partir dessa matriz, foi determinado o coeficiente de similaridade de Jaccard entre

indivíduos e, posteriormente, realizado o agrupamento do tipo UPGMA (método das médias das distâncias). A análise dos dados e a construção de um dendrograma, foram feitas com o auxílio do programa DarWIN 5.0 (Perrier & Jacquemoud-Collet, 2006).

Resultados e Discussão

O método de extração das amostras de DNA utilizado foi eficiente para os referidos acessos clonais da série CPAA C. Os padrões de bandas gerados pelas reações de RAPD foram nítidos e produziram bandas de média a alta intensidade (Figura1). Os iniciadores utilizados nas análises permitiram a amplificação de todas as amostras, produzindo bandas polimórficas e possibilitando a identificação da existência de variabilidade genética entre os acessos clonais de seringueira.

Entretanto, cabe mencionar que dos 20 iniciadores inicialmente escolhidos, para a caracterização dos acessos pela técnica de RAPD, somente oito deles foram utilizados para as análises por apresentarem boa amplificação e presença de bandas polimórficas, sendo produzidas 48 bandas. Os demais iniciadores, oito não

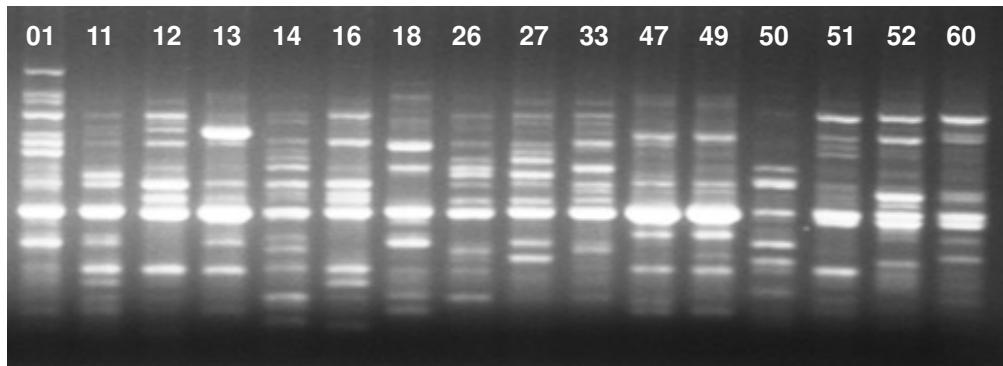


Figura 1. Perfil de um gel de RAPD utilizando o iniciador OPQ-7 em 16 acessos clonais da série CPAA C de seringueira.

apresentaram amplificação e quatro geraram padrões monomórficos. Na Figura 1 verifica-se o resultado da amplificação do iniciador OPQ-7 que gerou o maior número de bandas polimórficas em todos os acessos clonais de seringueira.

O coeficiente de correlação cofenética entre a matriz de similaridade de Jaccard e a matriz cofenética foi de $r = 0,89$, revelando um bom ajuste entre a representação gráfica das distâncias e a sua matriz original (Rohlf, 2000), possibilitando a realização de inferências por meio da avaliação visual do dendograma. Segundo Lapointe & Legendre (1992), o melhor ajuste é encontrado quando os valores de r são superiores a 0,9; porém, valores superiores a 0,7 já são significativos para a análise em questão.

As similaridades observadas variaram de 0,19 a 0,6 entre os acessos clonais da série CPAA C, sendo o valor médio de 0,40 (Tabela 2). Essa diferença entre as distâncias genéticas pode ser explicada pelo envolvimento de diferentes parentais nos cruzamentos que originaram tais acessos clonais. E como se tratam de acessos resultantes de três diferentes espécies de *Hevea*, os resultados refletem o grau de divergência genética encontrado entre eles e a importância de utilizá-los nas diferentes etapas dos programas de melhoramento, que visam o desenvolvimento de variedades clonais cuja resistência seja fundada em fontes distintas.

O agrupamento dos 16 materiais botânicos, com base no método UPGMA, mostrou uma discriminação dos seis parentais de *H. pauciflora* nos quatro grupos formados (Figura 2). Através da análise do dendrograma observa-se a formação de um grupo de similaridade contendo os clones CPAC C 11, 12, 27,

49 e 60 (Figura 2). Este grupo se destaca dos demais por ser bastante distinto e não conter subgrupos, indicando que os clones descendentes de *H. pauciflora*, envolvidos nos cruzamentos interespecíficos com a espécie *H. rigidifolia*, são mais relacionados pela possível presença de genes de resistência comuns. Este interrelacionamento de quatro dos seis parentais de *H. pauciflora* pode ser também explicada pelo envolvimento de um acesso comum de *H. rigidifolia* (CNS AM 8105) nos cruzamentos que originaram tais genótipos. Outro aspecto importante observado no dendrograma (Figura 2) é que os acessos clonais de *H. rigidifolia* e *H. guianensis* var. *marginata* foram distribuídos cada um deles em dois grupos bem distintos, provavelmente devido a sua origem genética e ao envolvimento de diferentes parentais de *H. pauciflora* nos cruzamentos interespecíficos. Isto fica ainda melhor evidenciado quando se faz um ponto de corte no segundo clado, em que se verifica a presença de três grupos. No primeiro encontram-se, justamente todos 10 acessos clonais resultantes dos cruzamentos envolvendo parentais de *H. pauciflora* com clones de *H. rigidifolia*. Nos dois outros grupos reúnem-se os seis cruzamentos envolvendo parentais de *H. pauciflora* e *H. guianensis* var. *marginata* havendo, portanto, uma clara separação entre os clones resultantes destas duas espécies, independente do parental utilizado de *H. pauciflora* nos cruzamentos interespecíficos.

Esses resultados permitem uma análise preliminar da diferenciação entre os acessos clonais da série CPAA C e também dos parentais de *H. pauciflora* envolvidos na hibridização com as espécies *H.*

Tabela 2. Matriz de similaridade genética entre 16 acessos clonais da série CPAA C de seringueira pelo método do coeficiente Jaccard

	60	18	49	51	14	27	12	16	47	13	26	11	52	33	50
18	0.41														
49	0.26	0.42													
51	0.41	0.43	0.38												
14	0.44	0.38	0.38	0.43											
27	0.24	0.42	0.31	0.27	0.37										
12	0.29	0.36	0.35	0.36	0.44	0.29									
16	0.34	0.23	0.27	0.37	0.37	0.35	0.34								
47	0.54	0.48	0.51	0.53	0.59	0.60	0.54	0.50							
13	0.49	0.42	0.41	0.51	0.50	0.50	0.53	0.35	0.31						
26	0.38	0.50	0.39	0.35	0.49	0.33	0.42	0.43	0.46	0.33					
11	0.22	0.40	0.24	0.35	0.44	0.23	0.22	0.33	0.45	0.39	0.25				
52	0.41	0.53	0.47	0.39	0.47	0.37	0.41	0.50	0.55	0.48	0.21	0.40			
33	0.38	0.50	0.40	0.36	0.53	0.34	0.38	0.43	0.41	0.50	0.38	0.38	0.36		
50	0.33	0.41	0.35	0.26	0.45	0.23	0.38	0.34	0.56	0.45	0.19	0.27	0.30	0.28	
01	0.51	0.46	0.40	0.46	0.36	0.53	0.51	0.39	0.41	0.22	0.43	0.42	0.52	0.57	0.48

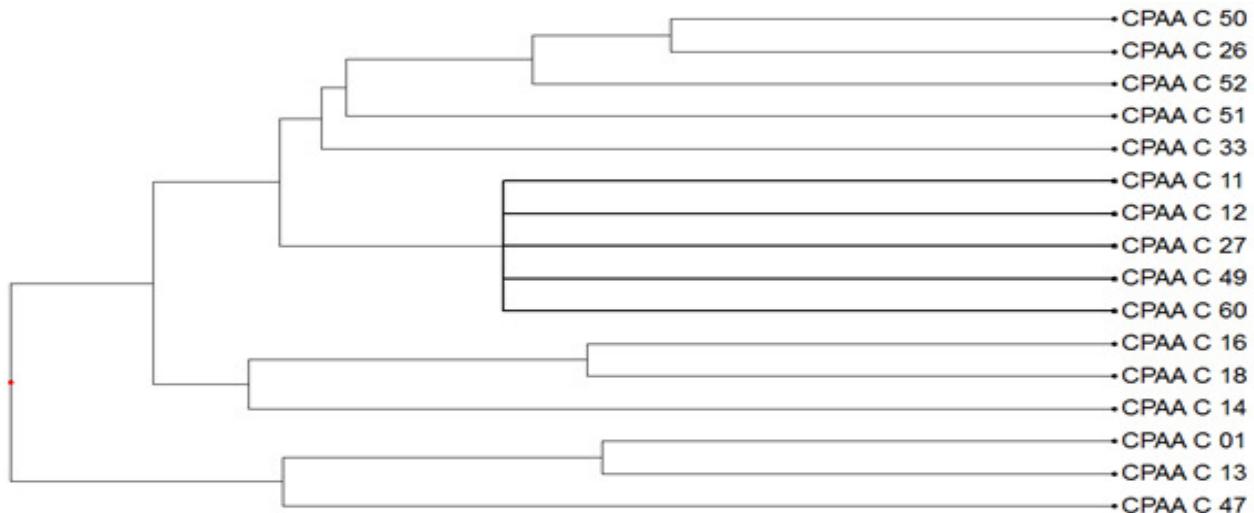


Figura 2. Dendrograma obtido a partir de 16 acessos clonais de seringueira, série CPAA C, por meio do índice de similaridade de Jaccard e agrupamento UPGMA.

rigidifolia e *H. guianensis* var. *marginata*, sendo o CNS G 112 e CNS AM 7745 geneticamente os mais divergentes. A continuidade dessas pesquisas é fundamental para subsidiar o uso futuro destes parentais como novas e distintas fontes de resistência às doenças em programas de melhoramento, visando ampliar e diversificar a variabilidade genética para este caráter.

Considerações Finais

No melhoramento da seringueira a resistência genética às doenças foliares deve ser vista com muito interesse, sobretudo nas áreas tradicionais de plantio, a exemplo da região do sul da Bahia. Isto em razão dos prejuízos causados anualmente aos seringais desta região pela ocorrência do mal-das-folhas após o

reenfolhamento. As fontes de genes de resistência dentro dos clones de *H. brasiliensis* de alta produção de borracha são bastante restritas e as poucas utilizadas em cruzamentos são provenientes de outras espécies do gênero: inicialmente a *H. benthamiana* e posteriormente a *H. pauciflora* (Townsend Jr., 1960; Pinheiro e Libonati, 1971; Gonçalves et al., 1983; Marques e Monteiro, 2007; Gonçalves e Marques, 2014). Assim sendo, a identificação de novas e distintas fontes de resistência deve ser um processo contínuo, quando se busca resistência durável, especialmente em populações representadas em sua maioria com genes de *H. pauciflora*, como aquelas da série CPAAC (Marques et al., 2003).

Para tanto, o conhecimento do grau de variabilidade genética disponível nesses acessos da série CPAAC, por meio dos estudos de divergência, torna-se vantajoso no processo de identificação de genes de interesse e seus respectivos alelos de resistência. Além disso, esses estudos fornecem informações de potenciais parentais para uso em programa de melhoramento genético da cultura. As técnicas moleculares têm-se mostrado muito úteis em todos os programas de melhoramento, especialmente para culturas perenes como a seringueira, por possibilitar e acelerar os processos de análise da variabilidade e seleção (Gouvêa, 2009). A seleção assistida por marcadores moleculares, especialmente para aqueles caracteres de baixa herdabilidade, como a produção e resistência certamente irão simplificar as etapas de avaliação e os procedimentos para o desenvolvimento de variedades clonais superiores. Além do mais, não necessitam que a planta complete seu ciclo para efetuar as análises, não sofrem interferência do meio e ainda apresentam alta eficiência para discriminação de acessos (Ferreira e Grattapaglia, 1995). Assim, é possível uma melhor compreensão da variabilidade genética, envolvida nesse germoplasma, possibilitando o conhecimento do seu real valor genotípico. Esta é uma estratégia bastante interessante, dada à possibilidade de que esses acessos venham a se constituir em novas e distintas fontes de resistência às doenças foliares, o que certamente vai contribuir para ampliação da base genética do programa de melhoramento visando resistência às doenças foliares, em especial ao *M. ulei*.

Conclusões

A alta diversidade genética observada entre os acessos clonais evidencia que a introdução desses materiais no programa de melhoramento genético ampliará a base genética para a resistência ao *M. ulei*, reduzindo, com isso, a vulnerabilidade atual do cultivo.

Agradecimentos

Os autores agradecem aos técnicos de laboratório Rita de Cássia Bahia e Reinaldo Figueiredo dos Santos, pelo apoio técnico e logístico.

Literatura Citada

- ARAÚJO, I. S. et al. 2000. Otimização da extração e amplificação de DNA de *Theobroma cacao* L. visando à obtenção de marcadores moleculares RAPD. *Genetics and Biology* 23:219-220.
- BICALHO, K. C. et al. 2008. Similaridade genética entre clones de seringueira (*Hevea brasiliensis*), por meio de marcadores RAPD. *Ciência Agrotécnica* (Brasil) 32 (5):1510-1515.
- CHEE, K. H.; KAI-MING, Z.; DARMONO, T. W. 1986. Occurrence of eight races of *Microcyclus ulei* on *Hevea rubber* in Bahia, Brazil. *Transactions of the British Mycological Society* 87:15-21.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13-15.
- FERREIRA M. E.; GRATTAPAGLIA, D. 1995. Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética. Brasília, DF, EMBRAPA/CENARGEN. 220p.
- FERREIRA, M. E.; GRATAPAGLIA, D. 1998. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análises genéticas. 3 ed. Brasília, DF, EMBRAPA/CENARGEN. Documentos nº 20.
- GASPAROTTO, L.; JUNQUEIRA, N. T. V. 1994. Ecophysiological variability of *Microcyclus ulei*,

- causal agent of rubber tree leaf blight. *Fitopatologia Brasileira* 18:22-24.
- GONÇALVES, P. de S.; PAIVA, J. R. de; SOUZA, R. A. 1983. Retrospectiva e atualidade do melhoramento genético da seringueira (*Hevea* spp.) no Brasil e em países asiáticos. Manaus, AM, EMBRAPA/CNPSD. 69p.
- GONÇALVES, P. de S.; MARQUES, J. R. B. 2014. Melhoramento genético da seringueira: passado, presente e futuro. In: Alvarenga, A. P.; Carmo, C. A. F. S. coords . Seringueira. 2 ed. Viçosa, MG, EPAMIG. pp. 489-594.
- GOUVÊA, L. R. L. 2009. Divergência genética em seringueira estimada através de técnicas multivariadas e marcadores moleculares microssatélites. Dissertação Mestrado. Campinas, SP, Instituto Agronômico. 89p.
- HERNANDEZ, C. A. R. et al. 2006. Analysis of genetic variation in clones of rubber (*Hevea brasiliensis*) from Asian, South and Central American. *Revista Colombiana de Biotecnología* 2: 24-34.
- JUNQUEIRA, N. T. V. et al. 1986. Variabilidade fisiológica de *Microcyclus ulei*. *Fitopatologia Brasileira* 11:823-833.
- LAPOINTE, F. J.; LEGENDRE, P. 1992. Statistical significance of the matrix correlation coefficient for comparing independent phylogenetic trees. *Systematic Biology* 41:378-384.
- LOPES, U. V; MARQUES, J. R. B. 2015. Diversity, inbreeding and inbreeding depression in rubber tree (*Hevea* spp.). *Agrotrópica* (Brasil) 27(1):33-44.
- MARQUES, J. R. M. et al. 2002. Diversidade genética entre clones de seringueira das séries SIAL e Fx com base em marcadores RAPD. *Agrotrópica* (Brasil) 14(3):159-164.
- MARQUES, J. R. B.; MONTEIRO, W. R.; MORAES, V. H. de F. 2003. Ampliação dos recursos genéticos de seringueira (*Hevea* spp.) pela introdução de novos clones-copa resistentes ao mal-das-folhas (*Microcyclus ulei*). *Agrotrópica* (Brasil) 15 (2):121-126.
- MARQUES, J. R. M.; MONTEIRO, W. R. 2007. Melhoramento genético da seringueira - Um enfoque sobre o desenvolvimento de clones com aptidão para uso em sistemas agroflorestais (SAFs). In: Congresso Brasileiro de Heveicultura. Anais. Guarapari, ES, INCAPER. CD Rom.
- MILLER, T. W. 1966. Differential clones of *Hevea* for identifying races of *Dothidella*. *Plant Disease Report* 50(3):187-190.
- MORAES, V. H. de F. 2000. Avaliação preliminar de clones de copa de seringueira. *Agrotrópica* (Brasil) 12(1):41-44.
- MORAES, V. H. de F.; MORAES, L. A. C. 1996. Seleção precoce de clones de copa e de painel de seringueira para experimentos de avaliação de clones com copas enxertadas. *Agrotrópica* (Brasil) 8(1):23-26.
- MORAES, V. H. de F.; MORAES, L. A. C. 1995. Diagnóstico do látex em sangria precoce de seringueira com copas enxertadas: possibilidades de emprego na seleção precoce de clones de copa e de painel. *Agrotrópica* (Brasil) 7(3):63-69.
- PERRIER, X.; JACQUEMOUD-COLLET, J. P. 2006. Darwin Software, <http://darwin.cirad.fr/darwin> (September 22, 2009).
- PINHEIRO, E.; LIBONATI, V. F. 1971. O emprego de *Hevea pauciflora* M.A. como fonte de resistência ao mal-das-folhas. *Polímeros* (Brasil) 1(1):31-40.
- ROHLF, F. J. 2000. NTSYS-PC Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Version 2.1. Manual. Applied Biostatistics. New York, USA.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, v.3.
- TOWSEND JUNIOR, C. H. T. 1960. Progress in developing superior *Hevea* clones in Brazil. *Economic Botany* 14:196-198.
- VARGHESE Y. A. et al. 1997. Evaluation of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in *Hevea brasiliensis*. *Plant Breeding* 116:47-52.

VENKATACHALAN, P. et al. 2002. Identification of DNA Polymorphism among clones of *Hevea brasiliensis* Muell-Arg. using RAPD analysis. Plant Cell Reports 15: 172-181.

