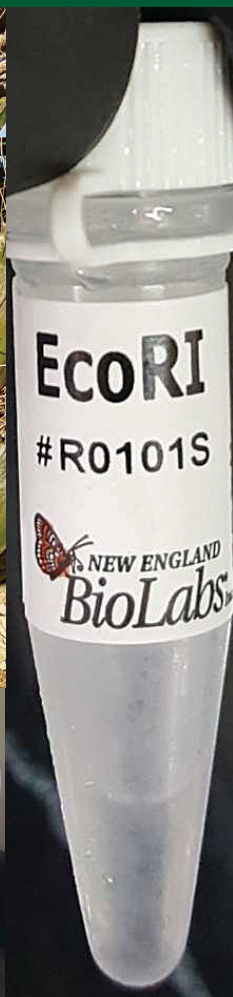


“Análisis de diversidad genética de palma aceitera (*Elaeis guineensis* y *Elaeis oleifera*) en la Región Ucayali usando marcadores Microsatélitales”



PERÚ

Ministerio
de Agricultura y Riego



Instituto Nacional de Investigación Agraria

PROGRAMA NACIONAL DE INNOVACIÓN AGRARIA - PNIA

Proyecto PI_0142

*“Caracterización molecular de palma aceitera *Elaeis guineensis* x *Elaeis oleifera*, para la obtención de progenitores como base para la producción de semilla híbrida oleífera x *guineensis* (OxG) en Ucayali”*

Proyecto PNIA_042

Autores:

Alina Alexandra Camacho Villalobos¹

Manuel Fernando Serna Chumbes²

Héctor Hernán Flores Guillén³

Editado por:

Estación Experimental Agraria Pucallpa

Av. Centenario km 4.0 - Pucallpa

I a. Edición:

Setiembre 2018

Tiraje:

1000 ejemplares

Fotografía:

Propiedad intelectual del INIA - Estación Experimental Agraria Pucallpa.

HECHO EL DEPÓSITO LEGAL EN LA BIBLIOTECA NACIONAL DEL PERÚ N° 2018-16701

Se terminó de imprimir en setiembre del 2018 en:

ezaac S.R.L.

RUC: 20393712512

Jr. Zavala N° 385 Cel.: 995019405- Pucallpa

Se autoriza la reproducción total y/o parcial de esta publicación, bajo la condición de que cite esta fuente.

1 Investigador Responsable del Proyecto PI 042

2 Colaborador Técnico proyecto 042

3 Consultor de proyecto PI 42

ÍNDICE

RESUMEN	ABSTRACT
I. INTRODUCCIÓN	II. MATERIALES Y MÉTODOS
III. RESULTADOS	IV. DISCUSIONES
V. CONCLUSIONES	BIBLIOGRAFÍA





“Análisis de diversidad genética de palma aceitera (*Elaeis guineensis* y *Elaeis oleífera*) en la Región Ucayali usando marcadores Microsatélites”

RESUMEN

En el presente estudio se analizó la diversidad genética de 83 individuos (75 *E. oleífera* y 8 *E. guineensis*) con 12 marcadores SSR, encontrándose 160 alelos en total, siendo los cebadores mEgCIR0353 y el mEgCIR0254 los que obtuvieron una mayor cantidad de alelos, 22 y 20 respectivamente. Se encontraron 5 clústeres asumidos y el dendrograma de todos los individuos para hallar la distancia genética entre estos y cruzarlos sin perder el vigor híbrido. Se tiene el grupo de las Palmas africanas (*E. guineensis*) separadas de las Palmas americanas (*E. oleífera*) mostrándose la distancia genética acorde con las distancia geográfica. Se observa que los individuos P-06, D-42 y T-01 son similares alelicamente según los cebadores utilizados, estos pueden utilizarse como productores de semilla por triplicado para tener una mayor cantidad de semilla híbrida OxG producida.

Palabras Clave: SSR, Polimorfismo, ADN, Palma aceitera, *guineensis*, *oleífera*.

ABSTRACT

For this research we worked with 83 individuals (75 *E. oleífera* and 8 *E. guineensis*) with 12 SSR primers and we worked a PCR temperature set with a “touchdown”. We found 160 markers; the primers mEgCIR0353 and mEgCIR0254 have the most quantity of alleles per marker (22 and 20 respectively). We found 5 assumed groups and the dendrogram for each individual to found the genetic distance between them and cross them without losing the hybrid vigor. Having the group of African oil palms (*E. guineensis*) separated of the American oil palms (*E. oleífera*), showing the genetic distance accord to the geographic distance. The individuals P-06, D-42 and T-01 are similar in alleles under the primers used; they can be used as seed producers by threefold, this can be used to have more quantity of Hybrid OxG seed produced.

Keywords: SSR, Polymorphism, DNA, oil palm, *guineensis*, *oleífera*

I. INTRODUCCIÓN

La palma de aceite africana (*Elaeis guineensis* Jacq.) es una especie perenne originaria de África Central y Occidental, su cultivo es propio de las tierras bajas húmedas del trópico. Esta especie posee gran importancia comercial gracias al aceite que se extrae del mesocarpio, ya que de este tejido se obtiene el aceite utilizado en la industria alimenticia. Por otra parte se extraen otros ácidos grasos que están presentes en el endospermo de sus frutos, que también son importantes para la agroindustria (Arias, 2014). La historia muestra que el material comercial sembrado mundialmente proviene de cuatro plantas cultivadas en el Jardín Botánico de Bogor de Java (Indonesia) en 1884, hecho que ha provocado uniformidad en el material productivo, generándose un efecto de estrechez en la base genética.

Esto ha provocado la homogenización del cultivo, evidenciando la necesidad de ampliar la base genética de la palma de aceite, garantizando la obtención y conservación de una amplia gama de recursos genéticos, lo cual justifica la exploración y estudio de diversidad genética de materiales de palma provenientes del continente africano, en especial de Camerún, uno de los países centro de origen de esta especie (Arias, 2014).

En Perú, la palma aceitera fue cultivada por primera vez el año 1970, en la provincia de Tocache, departamento de San Martín. Así se creó la empresa para el desarrollo y explotación de palma aceitera (EMDEPALMA S.A.) de propiedad del estado, en 1980 llegan a sembrar 5273 Hectáreas. El 2014 fue un año excepcional, se exportaron 52 516 toneladas de aceite crudo de palma y 6769 toneladas de aceite refinado de palma (Borasino, 2016).

Una de las características más relevantes de la palma aceitera es su alto rendimiento de aceite. La palma aceitera produce de 3 a 8 veces más aceite por hectárea que cualquier otro cultivo oleaginoso. Además Ofrece un rendimiento de 3.8 toneladas por Ha al año como promedio mundial, los otros cultivos oleaginosos como la soya, tienen rendimientos promedio de 0.4 toneladas por Ha, el algodón de 0.2 toneladas por Ha y el piñón de 1.5 a 2 toneladas por Ha (Borasino, 2016).

En los estudios de mejoramiento genético, los experimentos basados en ADN, especialmente marcadores moleculares, son reconocidos por ser herramientas eficientes para la evaluación de diversidad genética, estudios de biología molecular, mapeo genético y selección asistida de marcadores (MAS).

Entre todos los marcadores moleculares, los microsatélites o SSR siguen siendo los más utilizados, debido a sus múltiples ventajas, los cuales incluyen multivariabilidad, una amplia distribución genómica, herencia codominante, naturaleza multialélica y locación específica de los cromosomas, además de que son un ensayo relativamente simple de hacer en PCR. Actualmente, los SSR se les considera los marcadores moleculares más promisorios para entender la estructura genética poblacional de la palma aceitera (Zaki, 2012).

Para este trabajo se colectaron un total de 83 accesiones de Palma aceitera, 75 de estas son *Elaeis oleifera* (Palmera aceitera americana) y 8 son *Elaeis guineensis* (Palmera aceitera africana) provenientes de la Estación Experimental Agrícola del INIA en Ucayali (EEA-Ucayali). Siendo las palmeras africanas seleccionadas por su rendimiento de racimo (Kg). Este trabajo se realizó con el fin de seleccionar los mejores progenitores para la obtención de semillas híbridas *E. oleifera* x *E. Guineensis* con el fin de seleccionar las características agronómicas de cada especie.



Foto 1 y 2. Izquierda: núcleo genealógico productivo de *Elaeis oleifera* ubicado en el anexo Pacacocha - Distrito de Yarinacocha. Derecha: núcleo genealógico de *Elaeis guineensis* en el anexo Campo Verde - Distrito de Campo Verde.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

Se colectaron 83 accesiones, 75 de *Elaeis oleifera*, propiedad del Anexo de la Estación Experimental Agraria (EEA) del INIA, en Pacacocha, Ucayali, y 8 accesiones de *Elaeis guineensis* propiedad del anexo de la EEA del INIA, en caballococha, Ucayali (Figura 1).



Foto 3 y 4. Izquierda: colecta de tejido foliar en el anexo Campo Verde.
Derecha: preparación in situ de muestra para análisis molecular.

Extracción y cuantificación de ADN

La extracción se realizó con el método Doyle & Doyle (1990) Modificado por el Instituto de Biotecnología de la UNALM (IBT-UNALM, 2010), con Polivinilpirrolidona (PVP) al 1%. La calidad de ADN se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa 1% con un marcador de peso molecular Generuler® de 1Kb y la cuantificación de ADN se realizó por espectrofotometría UV con un equipo EPOCH 2®.

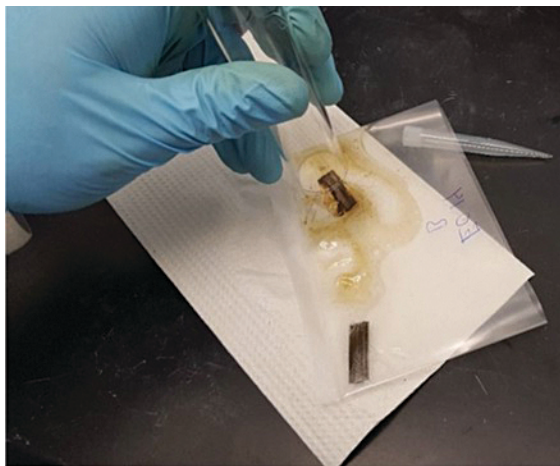


Foto 5. Extracción y cuantificación de ADN: La Extracción se realiza con 2ml de buffer CTAB en 100mg de muestra fresca, esta se tritura hasta formar una mezcla homogénea, luego se procede a la purificación con Etanol y finalmente de coloca en buffer TE

Ampliación por Microsatélites SSR (Short Sequence Repeat)

Los marcadores SSR son los marcadores idóneos para entender la estructura genética de una población de palma aceitera. Los SSR que son transferibles a través de los taxones no han sido estudiados detalladamente. Los marcadores SSR son

herramientas útiles para estudios genéticos comparativos dentro del género. Asimismo, el PCR (Reacción en cadena de la Polimerasa) es una reacción cíclica dirigida enzimáticamente que permite la ampliación *in vitro* de una región del ADN localizada entre dos regiones de secuencia conocida. Utiliza los oligonucleótidos que funcionan como iniciadores, que se hibridan en las cadenas opuestas del ADN de secuencia complementaria, flanqueando a las secuencias de interés. Los iniciadores toman diferentes denominaciones, tales como oligonucleótidos, cebadores, primadores, amplímeros, detonadores o primers.

En cada ciclo de ampliación las cadenas de ADN sintetizadas se convierten en un patrón (substrato) para cualquier nuevo ciclo; idealmente, la secuencia de “ADN Blanco” se ampliará de manera selectiva ciclo tras ciclo.

Los iniciadores son moléculas de ADN de cadena individual y longitud corta (10 - 30 nucleótidos), se hibridan complementariamente a las partes terminales o flancos de una secuencia específica de la cadena sencilla del ADN patrón, se efectúa la amplificación por DNA polimerasa, la enzima que cataliza la síntesis de cadenas largas de polinucleótidos. La síntesis se dirige incorporando monómero de trifosfato de desoxinucleósido al grupo libre 3' - hidroxilo del iniciador en dirección 5' a 3'. La polimerización se efectúa siempre sobre el α - fosfato 5' del trifosfato de desoxinucleósido al grupo hidroxilo terminal 3' de la cadena creciente de ADN. Esto resulta en la síntesis de nuevas cadenas de ADN complementarias a las cadenas patrón parciales.

La reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) se realizó con 12 cebadores utilizados por Billote (2001), Bakoum (2007), Zaki (2010), LA Putri (2010) y D. Arias (2014), estos fueron seleccionados debido a su alto índice de polimorfismo (PIC). Al cebador de Inicio se le agregó una secuencia universal denominada “Cola M13” (CACGACGTTGTAAAACGAC) la cual permitió unir al cebador con un fluoróforo de secuencia complementaria, permitiéndonos determinar el peso del producto amplificado por electroforesis capilar.

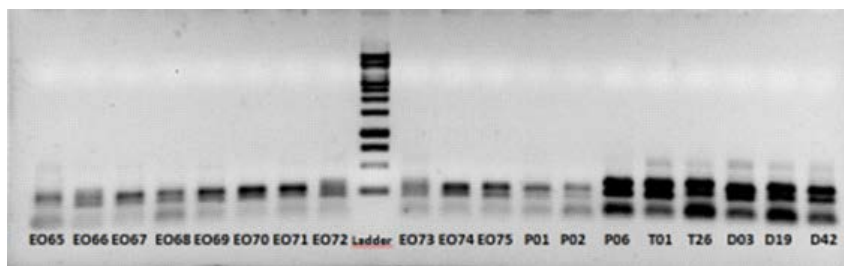


Fig. 1. Ampliación por Microsatélites: Amplificación mediante PCR (Polymerase Chain reaction) evidenciada en electroforesis con agarosa 1% de los 83 Individuos colectadas, las múltiples bandas muestran la ampliación de los individuos diploides además se observan diferencias o polimorfismos. EO=Palmas Americanas, P,D y T= Palmas Africanas (Pisífera, Dura y Tenera).

La reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) se realizó con 12 cebadores utilizados por Billote (2001), Bakoum (2007), Zaki (2010), LA Putri (2010) y D. Arias (2014), estos fueron seleccionados debido a su alto índice de polimorfismo (PIC). Al cebador de Inicio se le agregó una secuencia universal denominada “Cola M13” (CACGACGTTGTAAAACGAC) la cual permitió unir al cebador con un fluoróforo de secuencia complementaria, permitiéndonos determinar el peso del producto amplificado por electroforesis capilar.

La amplificación de los SSR se llevó a cabo en un volumen final de 10µl que contenía una solución buffer PCR KAPA Technologies®, 2mM de MgCl₂, 5mM de dNTPs Mix, 0.15µM de cola M13 y 1U de Taq DNA Polimerasa KAPA Technologies®. Las condiciones de amplificación fueron: 1 minuto a 94°C, 30 segundos a 55°C y 1 minuto a 72°C, todo por 19 ciclos. Luego 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 52°C-58°C (Touchdown) y 1 minuto a 72°C, todo por 30 ciclos.

La verificación de los resultados se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%, colocando el Generuler® 1kb como referencia.

Protocolo de Amplificación de ADN con AFLP

> Digestión

En la etapa de Digestión del ADN genómico se realiza con una enzima de corte raro combinado con una enzima de corte frecuente. Las enzimas de corte raro reconocen de 6 a 8 pares de bases o una secuencia rara de bases (EcoRI) y las de corte frecuente reconocen 4 pares de bases (MseI). Las reacciones se realizan separadamente, tratando primero el ADN con la enzima de corte raro y después con la de corte frecuente. Con esta digestión secuencial se generan 3 clases de fragmentos, las cuales difieren en cuanto a las extremidades: fragmentos grandes resultantes de la digestión por la enzima rara en ambos fragmentos, fragmentos pequeños resultantes de corte con la enzima frecuente en ambos extremos y fragmentos de tamaños intermedios resultantes del corte combinado de ambas enzimas raras/frecuente.

> Ligación

Luego de fragmentar el ADN en la Digestión, se incorporan adaptadores específicos que poseen terminales complementarios a los extremos resultantes del corte con las enzimas de restricción.

Generalmente, los adaptadores EcoRI específicos se unen a los extremos “adhesivos” producidos por la enzima EcoRI, mientras que los adaptadores MseI se unen específicamente a los extremos resultantes del corte con la enzima MseI. Los adaptadores poseen de 20 a 20 pares de bases, cuyas secuencias son diferentes en cada uno de ellos.

> Pre - amplificación

En este caso los adaptadores utilizados contienen un solo nucleótido arbitrario adicional, con lo que solamente 1 de cada 4 bases posibles (A, C, G y T), intervienen en la producción de fragmentos amplificados. Una vez que esta presión de selección se realiza de forma independiente en cada sitio de iniciación de la PCR, el resultado es solamente 1 de cada 16 fragmentos existentes serán amplificados (1 cada 4x4 bases).

>Amplificación selectiva

En esta etapa hay una mayor intensidad de selección, los primers utilizados poseen otros dos nucleótidos arbitrarios adicionales, totalizando 3. Así, solamente 1 de cada 43 x 43 (es decir, 1 de cada 4096 fragmentos) será amplificado. Los fragmentos resultantes de la digestión por la enzima de corte raro en ambas extremidades tienen un tamaño medio aproximado de 4 a 5 Kb. Luego pueden ser analizados mediante distintos métodos (geles de acrilamida, analizadores genéticos.)



Foto 6. Enzima de Restricción MseI y EcoRI: utilizadas para el proceso de Amplificación de ADN con AFLP.

Análisis por Electroforesis Capilar en el Analizador Genético

El análisis por electroforesis capilar se realizó en el analizador genético ABI3130XL (Applied Biosystems®) con capacidad de 16 muestras por inyección, la corrida duró 30 minutos a 1500 voltios, 60°C de Temperatura de horno.

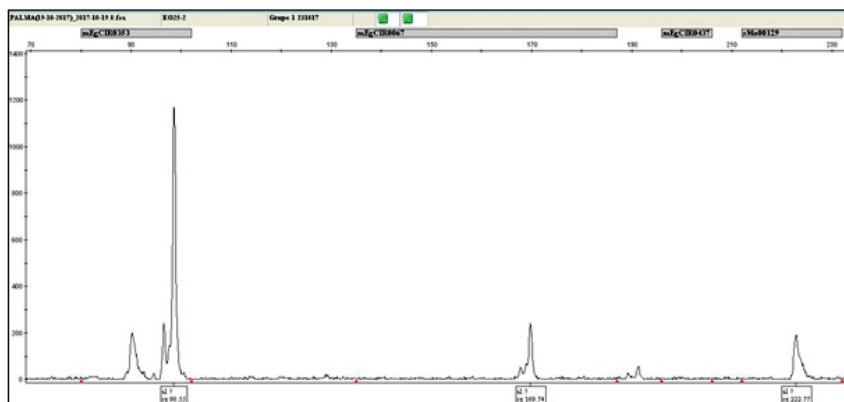


Fig. 2. Análisis por Electroforesis: Capilar en el Analizador Genético: Análisis por el secuenciador genético ABI 3130XL, los picos son señales de los fragmentos de ADN amplificados, estos nos dan información sobre el polimorfismo mediante diferencia entre los pesos de los fragmentos.

Análisis de datos

Con los resultados obtenidos del análisis del ABI3130XL se encontró el porcentaje de Heterozigocidad, para ello se utilizó el programa GENEALLEX 6.0 (Peakall, 2006), además se identificaron clústeres o grupos asumidos con el programa STRUCTURE 2.3.4. (Pritchard, 2000). Para hallar el Contenido de Información Polimórfica (PIC) se utilizó software CERVUS 3.0.7.

Finalmente se halló el dendrograma por individuo basado en la disimilitud entre las muestras y las poblaciones con el programa NTSYS 2.2 (Rohlf, 2000), basado en el método UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages) y la distancia genética de Nei (Nei, 1972, 1978, 1979, 1987).

III. RESULTADOS

Los 12 SSR analizados presentaron un buen porcentaje de polimorfismo, obteniéndose 160 alelos en total. Estos se seleccionaron teniendo en cuenta los rangos de los alelos reportados por Billote *et al.* (2001, 2010) según se observa en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Rangos de Amplificación reportados y observados para los 12 SSR evaluados.

Primer	Peso Esperado (bp)	Peso Observado (bp)
mEgCIR0353	80-102	81-118
sMo00020	182-208	185-202
mEgCIR3282	232-272	234-252
mEgCIR0067	135-187	139-179
mEgCIR3886	184-218	185-224
mEgCIR0802	236-272	238-260
mEgCIR0254	148-179	153-179
mEgCIR0437	196-206	103-203
mEgCIR3285	278-314	279-293
mEgCIR0018	158-177	141-198
sMo00129	212-232	206-225
mEgCIR3546	286-336	287-319

Se observa el Índice de Polimorfismo (PIC) por cada cebador, estos se obtuvieron con el programa CERVUS 3.0.7 se observa en el cuadro 2.

Cuadro 2. Contenido de Información polimórfica (PIC) por cada cebador seleccionado.

Locus	PIC
mEgCIR0018	0.945
sMo00129	0.965
mEgCIR3546	0.963
mEgCIR0067	0.958
mEgCIR3886	0.969
mEgCIR0802	0.926
mEgCIR0254	0.974
mEgCIR0437	0.976
mEgCIR3785	0.974
mEgCIR0353	0.985
sMo00020	0.969
mEgCIR3282	0.906

También se hallaron los clústeres o grupos asumidos con el programa STRUCTURE 2.3.4, encontrándonos con el grupo de las palmas africanas (Grupo 3) alejado de las palmas americanas (Grupo 1, 2, 4 y 5). Esto puede deberse a que son diferentes especies. También tenemos a un Grupo 4 alejado de los otros grupos de palmeras americanas, esto puede suceder por diferencias o brechas geográficas que aíslan grupos definidos de genes (Fig 4).

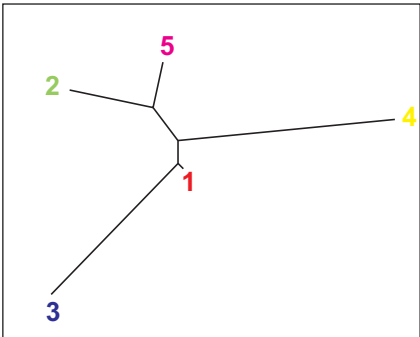


Fig 3. Grupos asumidos con el software STRUCTURE®, se observa el grupo 3 (*E. guineensis*), diferenciado de los grupos 1, 2, 4 y 5 (*E. oleifera*).

Finalmente se construyó un dendrograma con los datos obtenidos mediante el programa NTSYS® 2.2. De acuerdo al dendrograma por individuo obtenido (Figura 3), se asume que las palmas africanas P-06, D-42 y T-01 comparten los mismos alelos con los cebadores SSR seleccionados, además se observa una gran variedad de Palmas americanas (Código EO) con una distancia genética significativa, lo cual nos ayudará a la selección de los progenitores junto con los estudios agronómicos y morfológicos realizados en el EEA-Ucayali.

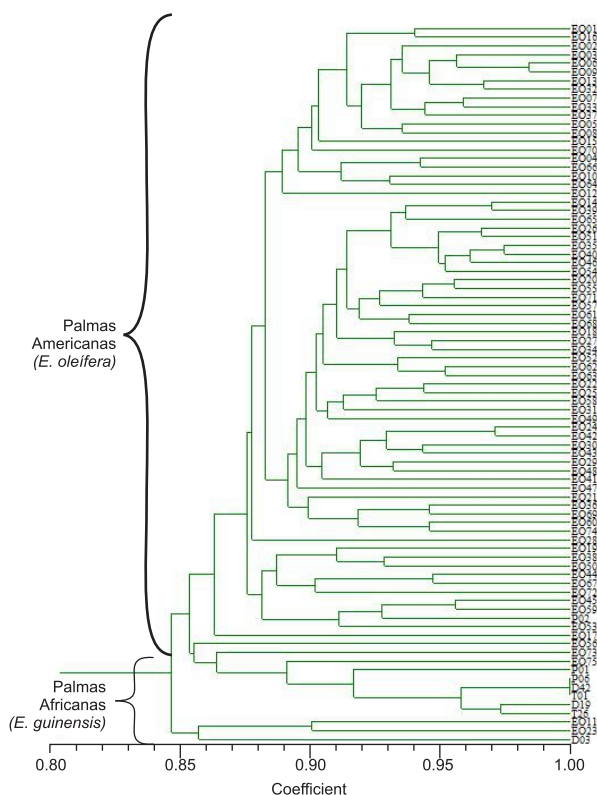


Fig 4. Dendrograma de las 83 accesiones de palma aceitera evaluadas.

EO=Palmas Americanas, P,D y T= Palmas Africanas (*Pisífera*, *Dura* y *Tenera*).

DISCUSIONES

La hoja de palma aceitera presento alto contenido de polifenoles, lo que inicialmente dificultó la obtención de ADN de buena calidad. Una solución fue coleccionar hojas jóvenes (Verde claro), una mayor cantidad de β -mercaptoetanol y la modificación del protocolo de Doyle (1990) con Polivinilpirrolidona (PVP) al 1% (p/v).

El número de alelos obtenidos por locus varió de 5 a 22 y los cebadores con mayores cantidades de alelos encontrados fueron el mEgCIR0353 y el mEgCIR0254 con 22 y 20 alelos respectivamente. Se encontraron 160 alelos en total. Los PIC obtenidos por cebador fueron mayores a 90% (0.916 a 0.991), demostrando que los cebadores seleccionados nos aportaron suficiente información para el análisis.

Los cebadores SSR utilizados nos ayudarán a formar una base para la obtención de semilla híbrida *E. guineensis* x *E. oleifera*. Basándonos en la distancia genética podremos cruzar los ejemplares de *E. oleifera* y *E. guineensis* con mejores atributos fenotípicos y agronómicos, teniendo en cuenta las palmas que tienen mayor

distancia genética entre sí para obtener vigor híbrido.

En el caso de las muestras de *E. guineensis* P-06, D-42 y T-01, estas comparten la totalidad de alelos evaluados con los cebadores considerados, por lo que podrían ser utilizadas como productoras de semilla, teniendo una mayor cantidad de semilla con una alta similitud alélica esperada. La palma es considerada monoica y alógama (Hurtado y Ramos 1970), se recomienda realizar cruces dirigidos y controlados para la obtención de semilla híbrida con los progenitores deseados. Con el debido cuidado de que el polen de la misma palma o de una palma no deseada ingrese a la parte femenina de la palma seleccionada para producción de semillas.

CONCLUSIONES

Con los resultados obtenidos, tenemos una base molecular para la obtención de semilla híbrida OxG mediante un cruzamiento dirigido y controlado de las palmas evaluadas. Esto se logró debido a una óptima selección de los cebadores y el uso de programas estadísticos adecuados.

Además se debe tener en cuenta la especie a cruzar, ploidía del cultivo, lugar de origen, distancia genética, rendimiento de racimo y una caracterización morfológica, todo ello en conjunto para tener una alta probabilidad de seleccionar a los mejores progenitores para la semilla híbrida OxG.

BIBLIOGRAFÍA

- APPLIED BIOSYSTEMS. 2005. Microsatellite Analysis Getting Started Guide.
- APPLIED BIOSYSTEMS. 2012. DNA Fragment Analysis by Capillary Electrophoresis User Guide.
- ARIAS D.; PACHECO. E.; OJEDA Z.; ROMERO H. 2014. Diversidad y Estructura Genética de Acciones de Palma de Aceite (*Elaeis guineensis* Jacq.). Revista Colombiana de Biotecnología. V.16.no2.pp57-67.
- ARIAS, D., GONZÁLEZ, M., & ROMERO, H. 2015. Genetic diversity and establishment of a core collection of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) based on molecular data. Plant Genetic Resources, 13(3), 256-265.
- BAKOUME C.; WICKNESWARI R.; RAJANAIDU R. 2007. Allelic Diversity of Natural Oil Palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) Populations Detected by Microsatellite Markers: Implications for Conservation. Plant Genetic Resources. Vol.2.pp104-107.
- BILLOTE N; RISTERUCCI AM; BARCELOS E. 2001. Development, Characterisation, and Across-Taxa Utility of Oil Palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) Microsatellite Markers. Genome. V.44.
- BORASINO E; FORT R. 2016. ¿Agroindustria en la Amazonía?: posibilidades para

el desarrollo inclusivo y sostenible de la palma aceitera en el Perú. Grupo de Análisis para el Desarrollo (GRADE).Capítulo 2.

DOYLE, J.J. AND DOYLE, J.L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus, v12, no1, pp. 13-15.

HURTADO JR.; NÚÑEZ GR. 1970. Estudio de la palmera noli (*Elaeis mclanococca* Gaert.) y preliminares de su fitomejoramiento en Colombia. Acta Agronómica, 20(1-2), 9-23.

MARSHALL, TC, SLATE, J, KRUUK, LEB & PEMBERTON, JM. 1998. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. Molecular Ecology 7: 639-655.

NEI M.1972.Genetic distance between populations. The American Naturalist. 106(949), 283-292. NEI M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individual. Genetics. 89:583-590.

NEI M; Li WH. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proceedings of the National Academy of Science. 76: 5269–5273

NEI M. 1987. Molecular evolutionary genetics. Columbia University Press.

PEAKALL R.; SMOUSE P. 2006. Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research (GENALEX), version 6.0.

PUTRI LAP; BILLOTE N.; et al.2010. Allelic Diversity of 22 Sampoerna Agro's Oil Palm *Pisifera* Based on Microsatellite Markers.

PRITCHARD J, STEPHENS M, DONNELLY P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. Genetics 155:945–959. STRUCTURE. Version 2.3.4.

ROHLF FJ. 2000. "NTSYS-pc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, Version 2.1," Exeter Software.

ZAKI NM.; I. ISMAIL; R. ROSLI. 2010. Development and Characterization of *Elaeis oleifera* Microsatellite Markers. Sains Malaysiana. V.6.pp909-912.

ZAKI NM.; RAJINDER S.; ROZANA R.; ISMANIZAN I.2012. *Elaeis oleifera* Genomic-SSR Markers: Exploitation in Oil Palm Germplasm Diversity and Cross-Amplification in Arecaceae. International Journal of Molecular Sciences.V.13.

ESTACIÓN EXPERIMENTAL AGRARIA PUCALLPA

Carretera Federico Basadre Km. 4

Pucallpa - Ucayali - Perú

T: (061) 57-1913-575751

E:pucallpa@inia.gob.pe