

CONSTRUCCIÓN DE UN MAPA DE LIGAMIENTO GENÉTICO PRELIMINAR EN *Coffea liberica* x *C. eugenioides*

Germán López-Gartner* ; María del Pilar Moncada-Botero**

RESUMEN

LÓPEZ G., G.; MONCADA B., M del P. Construcción de un mapa de ligamiento genético preliminar en *Coffea liberica* x *C. eugenioides*. *Cenicafé* 56(4):319-338. 2005.

La investigación genética en el cultivo del café ha sido escasa y se ha concentrado en las especies más cultivadas, *Coffea arabica* L. y *C. canephora* P., sin explorar aún el potencial genético de otras especies del género *Coffea*. En este estudio se describe la construcción de un mapa de ligamiento genético interespecífico de café, y se utilizó una población de mapeo obtenida en Cenicafé compuesta por 91 plantas híbridas F₁, procedentes del cruzamiento entre las especies diploides *Coffea liberica* x *C. eugenioides*. Se estudiaron 327 marcadores genéticos moleculares desarrollados en Cenicafé, de los cuales 116 presentaron patrones de segregación que permiten hacer el análisis de ligamiento. Para los cálculos asociados a la construcción del mapa genético se utilizó el programa JoinMap 3.0. Los resultados indican que 76 loci se integran en 12 grupos principales de ligamiento. Otros 40 loci conforman grupos de ligamiento menores. Los análisis de segregación revelan la existencia de una tendencia muy marcada de distorsión de segregación en una gran proporción de loci (39%). Los conocimientos derivados de este trabajo tendrán aplicaciones en el mejoramiento del cultivo a través de los programas de selección asistida por marcadores, análisis de desequilibrio de ligamiento e identificación de caracteres cuantitativos, entre otros.

Palabras clave: Café, mapa genético, ligamiento genético, genómica.

ABSTRACT

Research on coffee genetics has been scarce and concentrated on the widely cultivated species *Coffea arabica* L. and *C. canephora* P., leaving unexplored the genetic potential of other species in the genus. This study describes the construction of an interspecific genetic linkage map using a mapping population of 91 F₁ hybrid plants from the cross between the diploid species *C. liberica* and *C. eugenioides*. From 327 molecular genetic markers developed at Cenicafé, 116 displayed segregation patterns that allowed the linkage analysis. The program JoinMap 3.0 was used for the calculations associated to the construction of the map. The results indicate that 76 loci are integrated in 12 main linkage groups, and 40 other loci make up smaller linkage groups. Segregation analyses revealed the existence of a very marked segregation distortion tendency in a large proportion of loci (39%). This information will be applied towards the improvement of marker assisted selection, linkage disequilibrium analysis and identification of quantitative traits, among others, in coffee breeding programs.

Keywords: Coffee, genetic map, genetic linkage, genomics.

* Becario. Universidad de Caldas, Manizales. gerlogar@hotmail.com.

** Investigador Científico III. Mejoramiento Genético. Centro Nacional de Investigaciones de Café, Cenicafé. Chinchiná, Caldas, Colombia.

En los programas de mejoramiento del cafeto uno de los problemas centrales es su condición de especie perenne, con un ciclo de vida de cultivo cercano a los 20 años, lo cual es causa de que el proceso de mejoramiento tome mucho tiempo y por ende, que se incrementen los costos de investigación. Otra característica limitativa radica en que las variedades cultivadas poseen un bajo grado de variabilidad genética, debido a que los cultivos de mayor importancia comercial en este continente provienen de dos introducciones: Típica y Borbón, obtenidas a partir de unos pocos individuos originarios de África, desde Yemen vía Java y Holanda, e introducidos a América a principios del siglo XVIII (9, 7, 22). Estos factores inducen a que el trabajo científico encaminado a mejorar las variedades cultivadas de café deba mirar cuidadosamente la posibilidad de utilizar materiales silvestres, aplicando tecnologías de biología molecular modernas en combinación con los métodos clásicos de mejoramiento y los esquemas apropiados de introgresión, para ampliar la base genética.

Dentro de este contexto, es de gran interés para los mejoradores de un cultivo de importancia comercial como el café el conocimiento del genoma de la planta y con ello, la posibilidad de manipular con precisión los genes de interés, disminuyendo así el tiempo y los costos que esto demanda. Para lograr este propósito, es prerequisite fundamental contar con un mapa de ligamiento genético que permita asistir la selección de los genotipos más deseables desde el punto de vista agronómico como los caracteres de herencia cuantitativa tales como: la resistencia a enfermedades, la calidad y el rendimiento, entre otros.

La mayoría de los modelos experimentales que se utilizan en la construcción de mapas de ligamiento genético en plantas requieren

de mucho tiempo, como es el caso de *Coffea arabica* L., pues con frecuencia dichos modelos requieren poblaciones segregantes, F_2 o retrocruzas, que provienen de padres homocigóticos contrastantes. Una alternativa es el modelo conocido como falso cruce de prueba (pseudo test-cross) que ha sido aplicado con éxito en especies arbóreas (23) y constituye una alternativa de mapeo en el género *Coffea*. Aunque este tipo de mapa es menos informativo que los utilizados regularmente en otros cultivos, es una buena alternativa para estructurar una base inicial que sirva como referencia en la construcción de mapas con información de ambos padres (21).

Los microsatélites son un tipo de marcador ideal para construir mapas de ligamiento genético, dadas sus propiedades genéticas que han sido ampliamente documentadas, entre las que se encuentran su gran variabilidad, el ser marcadores codominantes y su fácil aplicación (25, 33, 48).

Aunque el potencial de uso de marcadores moleculares de ADN en especies perennes es enorme, debido principalmente a su largo período requerido para la obtención de diferentes generaciones, la mayoría de los trabajos se han realizado en especies anuales o semestrales como tomate, maíz, trigo, arroz, tabaco o *Arabidopsis*, que son más fáciles de estudiar y sobre las que se ha acumulado una gran cantidad de información genética (29).

La utilización de marcadores moleculares de ADN en cultivos perennes es relativamente reciente; sin embargo, en los últimos años se han producido avances importantes. En particular, se ha empleado esta técnica en el estudio de frutales y otras especies de importancia forestal y comercial para la caracterización de materiales vegetales, tanto de patrones como de variedades. Para citar

algunos ejemplos, se han utilizado RFLP en los géneros *Prunus*, *Malus* y *Rubus* (51, 58 62), y en palma de aceite *Elaeis guineensis* (31). Así mismo se han utilizado los RAPD en pistachero (*Pistacia vera*, L) (13); olivo (*Olea europea*) (15, 27); manzano (*Malus* spp.) (24, 34, 49, 61) y albaricoque japonés (*Prunus mume*) (60).

Los marcadores de ADN también se han utilizado con éxito en estudios de diversidad genética y en la construcción de árboles filogenéticos. Algunos trabajos sobresalientes incluyen especies como nogal (*Juglans* spp) (16, 17), pistachero (*Pistacia vera*) (28), olivo (*Olea europea*) (28), manzano (*Malus* spp.) (14) y albaricoque (*Prunus mume*) (60).

La construcción de mapas genéticos permite la ubicación de marcadores moleculares de ADN que pueden estar asociados a genes de interés. En la actualidad existen varios trabajos publicados y proyectos en marcha para la construcción de mapas genéticos en diversas especies arbóreas. La mayoría de éstos combinan varios tipos de marcadores como isoenzimas, RFLP, RAPD, AFLP, SSR, entre otros, con el fin de saturar el genoma de la especie bajo estudio (18, 21, 26, 44, 63).

En el caso del café, los estudios genéticos que utilizan marcadores moleculares de ADN son más limitados y en su mayoría se han enfocado en los orígenes y las relaciones filogenéticas entre especies, así como a los análisis de diversidad (1, 2, 39, 41, 42), utilizando algunas veces, incluso ADN de cloroplastos (40). También se han realizado estudios de diversidad genética con microsatélites (47).

El café pertenece al género *Coffea*, subgénero *Coffea*, familia *Rubiaceae*, cuya presencia se restringe principalmente a áreas tropicales y subtropicales. Este cultivo es

importante en la actividad comercial de más de 50 países de África, Asia y América. El género comprende alrededor de 100 taxones, en su mayoría diploides con $2n = 22$, a excepción de *Coffea arabica* L. con $2n = 44$ (4). De todas las especies de café, solamente dos se cultivan comercialmente: *Coffea arabica* y *Coffea canephora*, siendo más importante la primera de ellas. *Coffea arabica*, que se considera oriunda del suroeste de Etiopía y el sureste de Sudán, representa alrededor del 73% de la producción mundial; es un alotetraploide de comportamiento reproductivo principalmente autógamo con autofertilidad del 90% y con una dotación cromosómica de $2n = 4x = 44$. El resto de la producción corresponde a *Coffea canephora* P., especie diploide con $2n = 2x = 22$ cromosomas y con un comportamiento reproductivo alógamo (8, 57). Su grano se considera de menor calidad en el mercado internacional, según criterios que se basan en el aroma y el contenido de cafeína.

En lo que respecta al tamaño del genoma, los estudios de citometría de flujo indican que *C. liberica* contiene 1,68pg de ADN por núcleo y *C. eugenioides* 1,39pg. Cros *et al.* (12), afirman que el rango para todas las especies diploides de café va desde 0,95pg para *C. racemosa* hasta 1,78pg para *C. humilis*. El mismo estudio revela que *C. arabica* contiene 2,61pg de ADN por núcleo, lo cual es compatible con su estado tetraploide. Según esto, las especies de *Coffea* en general pueden considerarse como especies con un bajo nivel de contenido de ADN nuclear en comparación con otras especies de angiospermas como *Viscum album* (152pg), *Alium cepa* (32,7pg) o *Pinus carabeae* (45,6pg). De otro lado, el tamaño del genoma del café es similar al de especies como *Acacia heterophylla* (1,60pg), *Beta vulgaris* (1,75pg), *Daucus carota* (1,19pg), *Dioscorea alata* (1,47pg) y *Vigna unguiculata* (1,20pg) (12).

En *C. canephora* se ha reportado que el genoma haploide promedio del café se estima en 800 millones de pares de bases, y se asume que en promedio, un par de nucleótidos pesa 660 daltons (12). Según Lashermes-P *et al.* (43), en *C. canephora* 1cM se estima que corresponde aproximadamente a 570kb, aunque las relaciones entre distancias físicas y genéticas no son lineales usualmente.

Existen pocos antecedentes sobre la construcción de mapas genéticos en café. El primer mapa se construyó utilizando una población de 85 individuos doble haploides de ocurrencia espontánea obtenidos a partir de *Coffea canephora* (53). Se emplearon los marcadores RFLP y RAPD, que permitieron la construcción de 15 grupos de ligamiento, con un LOD score de 4,0 y el posicionamiento de 47 loci RFLP y 100 RAPD a lo largo de una distancia total de 1.402cM y una distancia promedio entre marcadores de 10cM. Sin embargo, la baja reproducibilidad de los marcadores tipo RAPD y el hecho de ser un mapa inconcluso, representan las grandes limitaciones de ese trabajo.

En otro estudio se reporta la construcción de un mapa de café utilizando una población de 62 híbridos obtenidos por retrocruce de la F_1 del cruzamiento entre las especies silvestres *Coffea pseudozanguebariae* x *Coffea liberica* variedad *Dewevrei* (37). El retrocruzamiento se hizo hacia el parental paterno *C. liberica*, por medio de polinización abierta. Se lograron posicionar 167 loci del tipo AFLP y 13 RFLP, ensamblados en 14 grupos de ligamiento, bajo un criterio de LOD score de 3,1, y cubriendo una distancia genómica total de 1.144cM. Se consideró que el número básico de cromosomas del café es 11; este resultado de 14 grupos de ligamiento indica un cubrimiento insuficiente del genoma en términos de marcadores mapeados. No obstante, lo más interesante de este trabajo es la selección de marcadores

específicos de *C. pseudozanguebariae*, de tal manera que los gametos del parental *C. liberica*, podían considerarse genéticamente homocigotos para esos marcadores, y de esta manera facilitar la identificación de los recombinantes en la descendencia del retrocruce F_1 x *C. liberica*. Adicionalmente, los marcadores AFLP permitieron identificar ocho agrupamientos característicos de regiones centroamericanas.

En otro caso, se construyó un mapa de *C. canephora* utilizando 92 plantas doble haploides. Se analizaron 160 loci incluyendo 18 microsatélites, 97 AFLPs, 11 RAPDs y 36 RFLPs. El análisis generó 11 grupos de ligamiento que a excepción del grupo 11, reúnen más de diez marcadores cada uno y cubren un total de 1.041cM (43). Este trabajo es notable en su cubrimiento del genoma del café, aunque adolece de haber utilizado demasiados marcadores dominantes y de baja reproducibilidad, pues sólo incluye 18 microsatélites.

Recientemente, Pearl-HM *et al.* (55) reportan un mapa en *C. arabica* L. utilizando solamente 60 plantas del cruce entre los cultivares Mokka y Catimor. Se emplearon 456 marcadores dominantes (AFLPs), lo cual limita de manera considerable los resultados del trabajo. Al finalizar se obtuvieron 31 grupos de ligamiento que cubren 1.802cM, que indican que se sobre-estimó el tamaño real del genoma de esta especie.

El objetivo de este trabajo fue el de construir un mapa de ligamiento genético preliminar obtenido a partir de una población de mapeo de 91 individuos híbridos interespecíficos F_1 , obtenidos a partir del cruzamiento entre las especies diploides *C. liberica* x *C. eugenoides*, originarios de África Oriental y África Central, respectivamente. Estas dos especies son diploides y de hábitat silvestre, cuyos genomas comprenden $2n =$

$2x = 22$ cromosomas. *C. eugenioides* está relacionado evolutivamente con el origen de *C. arabica*, que es el único tetraploide en el género ($2n = 4x = 44$ cromosomas). De otro lado, *C. liberica* mantiene una distancia genética estrecha con *C. canephora*, lo cual hace muy interesante el mapeo de esta población, no solo por la disponibilidad actual de estas plantas en campos experimentales de Cenicafé, sino desde el punto de vista de la posibilidad de relacionar los resultados con el genoma de las especies *C. arabica* y *C. canephora*, y las aplicaciones que esta información tiene para la detección de loci cuantitativos asociados con características de importancia agronómica.

El padre *C. eugenioides* tiene menor contenido de cafeína en el grano, alrededor de 0,2%, comparado con *C. liberica*, que alcanza el 1% (3). También se ha reportado que el grano de *C. liberica* tiene un alto contenido de ácidos clorogénicos que están relacionados con la calidad de la bebida (36). De estas dos especies, *C. liberica* tiene mayor acogida como cultivo comercial en ciertas zonas de África, contribuyendo con un 1% de la producción global. Su sistema radical es vigoroso y de rápida regeneración, en contraste con *C. arabica*. Esta característica hace de *C. liberica* una especie tolerante al ataque de nematodos (6).

MATERIALES Y MÉTODOS

Extracción de ADN. Se realizó a partir de 10g de tejido fresco, proveniente de hojas jóvenes de cada planta, y se empleó el método de extracción descrito por Ky *et al.* (37). La calidad del ADN se evaluó

por medio de geles de agarosa del 0,9% y la concentración se estimó mediante un espectrofotómetro.

Material vegetal. A partir del cruzamiento entre *C. liberica* x *C. eugenioides*, se obtuvo la población de mapeo que comprendió los progenitores y 91 plantas híbridas F_1 de dos años de edad, sembradas en la Estación Central Naranjal de Cenicafé, localizada en Chinchiná (Colombia). Durante los cruzamientos se tuvieron en cuenta varias precauciones, entre ellas la emasculación de flores antes de la anthesis y el embolsado de las ramas con flores recién fertilizadas, para evitar la contaminación con polen foráneo.

Marcadores moleculares. Se evaluaron en los padres de la población un total de 327 marcadores moleculares, 235 SSRs desarrollados por Cenicafé en asocio con la Universidad de Cornell¹ de éstos, 112 fueron de secuencia repetida (GA_n) y 123 de secuencia (CA_n). Así mismo, se incluyeron 72 SSRs originados en Francia por el grupo del Dr. Philippe Lashermes. En esta población también se evaluaron 20 EST.

De todos estos marcadores, 196 (60%) resultaron promisorios por su patrón polimórfico y se aplicaron a la población completa de 91 plantas y 2 parentales. Éstos comprenden 106 GA, 50 CA, 12 EST y 28 marcadores obtenidos del Genbank/EMBL (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>). En total se obtuvieron 18.228 datos genotípicos individuales, los cuales se analizaron genéticamente con el fin de definir los modelos genéticos de segregación que más se ajustan, las proporciones de segregación por locus y las frecuencias de recombinación entre loci.

¹ Gaitán A. y Greene R. y Cristancho, M., Laboratorios de -Dr. Susan McCouch, Cornell University, Ithaca, NY.

Al final, 116 marcadores de los 196 polimórficos (59,2%), presentaron patrones de segregación que permitieron hacer el análisis de ligamiento. De éstos, 70 lograron combinarse en 12 grupos de ligamiento principales y el resto en grupos menores (60,37%).

Detección del polimorfismo. Los marcadores se evaluaron por reacciones de amplificación con un perfil consistente en cinco minutos de precalentamiento a 94°C, un minuto de desnaturalización a 94°C, un minuto de asociación a 55°C y un minuto de extensión a 72°C. Posteriormente se realizaron 34 ciclos y diez minutos de extensión final a 72°C.

Los productos de amplificación se corrieron en geles estándar de poliacrilamida del 4% y para la coloración se utilizó nitrato de plata.

Análisis de ligamiento. Se utilizó el programa JoinMap 3.0, para realizar los cálculos asociados a las estimaciones de frecuencias de recombinación, la estimación de las distancias y la conformación de grupos de ligamiento. La estrategia general en la construcción del mapa genético requiere la ejecución secuencial y lógica de varias etapas de procedimientos matemáticos asistidos por computador. La logística de tales procedimientos sigue el siguiente esquema de trabajo:

1- Análisis de segregación en cada locus.

Este análisis consiste en definir los modelos de segregación de los microsatélites y seleccionar aquellos informativos para el análisis de ligamiento. La población en estudio constaba de una familia de hermanos completos provenientes del cruce interespecífico de individuos de polinización cruzada, lo cual

implica que pueden tenerse hasta cuatro alelos distintos segregando. Esto abre un sinnúmero de posibilidades de combinaciones genotípicas y con ello diversas características informativas de los loci. Para este análisis se tuvieron en cuenta todas las combinaciones posibles de marcadores que segregaron, los cuales se agruparon en siete casos o modelos genéticos.

En el **caso 1** se incluyen todos los loci que segregan en *C. eugenoides* con dos alelos y en los que *C. liberica* es homocigótico.

El **caso 2** comprende todos los loci que segregan en *C. liberica* con dos alelos y son homocigóticos en *C. eugenoides*.

El **caso 3** incluye loci genéticos en los que ambos padres son heterocigóticos, pero en los que los pesos moleculares de las bandas alélicas coinciden en ambos padres y por tanto, suscitan incertidumbre sobre el origen de algunos genotipos en la descendencia. Esto genera información parcial de segregación que puede usarse en los cálculos del mapa.

El **caso 4** comprende loci con ambos padres heterocigóticos que segregan con cuatro alelos. Se incluyen aquellos con dos alelos idénticos en los padres, es decir tres alelos segregando.

El **caso 5** comprende loci en los que ambos padres son heterocigóticos como el caso 3, pero esta vez segregando para dos alelos, uno de los cuales es nulo y por tanto, no se detecta en la técnica PCR ni en electroforesis, bajo las condiciones experimentales que se establecieron para los cebadores.

El **caso 6** es parcialmente informativo y sólo para el padre *C. eugenoides*. Siendo ambos padres heterocigóticos coinciden en

un alelo visible pero en *C. liberica* tiene un alelo nulo adicional. Para su análisis en JoinMap 3.0, debe manejarse codificándolo como si fuera el caso 1 e ignorar el alelo nulo y así solo es posible extraer información para *C. eugenioides*.

En el **caso 7**, inverso al caso 6, con el fin de extraer información para el parental *C. liberica* únicamente.

2- Detección de ligamiento entre locus.

3- Estimación de frecuencias de recombinación y distancias genéticas.

4- Determinación de grupos de ligamiento.

5- Selección del mejor orden dentro de cada grupo.

Para el procesamiento estadístico de los datos se utilizó el programa JoinMap versión 3.0, que permite construir mapas conjuntos de ambos padres así como mapas parciales utilizando alelos de un solo padre. Este software también ofrece la posibilidad de combinar información de varios mapas para generar un resultado unificado (38).

Para las pruebas de hipótesis de ligamiento vs independencia se utilizó el estadístico LOD Score (Z), introducido por Haldane y Smith en 1947 y Morton en 1955 citados por Nuez y Carrillo (50), para estudios de genética humana. El término es una abreviación de la expresión inglesa “Log of the odds” y se define estadísticamente como el logaritmo decimal de la proporción de probabilidades de ligamiento e independencia, es decir, $L(r=\check{r})$ respecto a $L(r=0,5)$, donde r es la frecuencia de recombinación:

$$\text{LOD} = Z = \text{Log}_{10} \left[\frac{L(r = \check{r})}{L(r = 0,5)} \right]$$

Una ventaja al utilizar LOD Score es que su valor indica ligamiento directamente sin necesidad de recurrir a comparaciones con tablas. Si $\check{r} < 0,5$ es más verosímil que $r = 0,5$, el valor LOD es positivo. Una convención aceptada generalmente en genética humana, es que cuando el valor de LOD Score es ≥ 3 indica que dos loci están ligados, debido a que hay un exceso de 1.000 a 1 en la razón de las verosimilitudes de las hipótesis de ligamiento vs independencia, aunque pueden tomarse otros criterios en otros organismos y aún en experimentos diferentes (45).

Por el contrario, cuando el ligamiento es menos verosímil que la segregación independiente de los marcadores, el valor LOD es negativo y se considera que debe rechazarse la hipótesis de ligamiento cuando $\text{LOD} \leq -2$. Para valores de $-2 \leq \text{LOD} \leq 3$ se recomienda aportar más datos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Detección de marcadores polimórficos y segregantes. Inicialmente, el nivel de polimorfismo se evaluó para los dos parentales y seis descendientes, en total se analizaron 327 marcadores. De éstos, 116 presentaron patrones de segregación que permiten hacer los análisis de ligamiento genético. Todos los geles se digitalizaron y la calificación de bandas alélicas se realizó siguiendo estrictamente los patrones de segregación que se ajustan a los criterios mendelianos en la familia de mapeo. Una muestra de algunos resultados de la electroforesis se presenta en las Figuras 1 y 2.

Análisis de segregación. Para este análisis en el **caso 1** se incluyen todos los loci que segregaron en *C. eugenioides* con dos alelos y en los que *C. liberica* es homocigótico. Se encontraron 21 loci

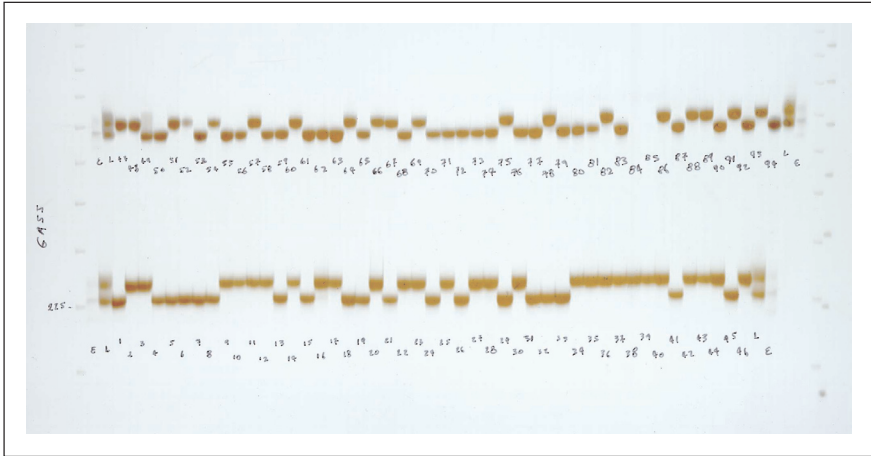


Figura 1. Gel PAGE con el marcador GA55 en la población de mapeo. Las muestras de cada carril corresponden a *C. eugenioides* (E) y *C. liberica* (L). Los números representan a los descendientes del cruce interespecífico. Las muestras se cargaron en dos frentes de corrida consecutivos en el mismo gel.

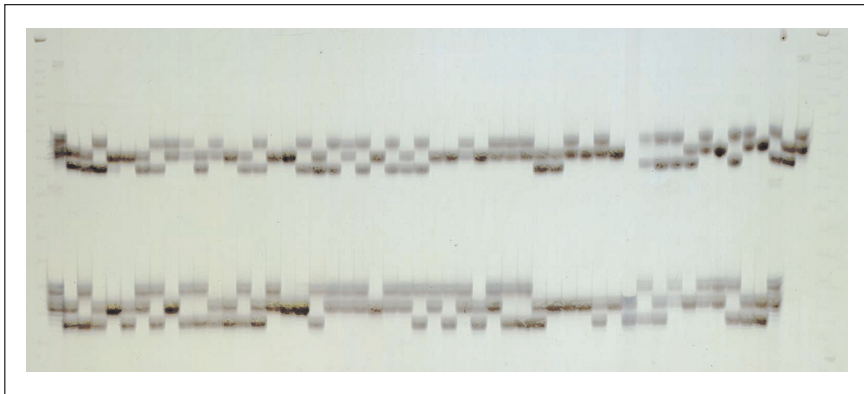


Figura 2. Gel PAGE con el marcador GA1132 en la población de mapeo. Los padres en los dos últimos pozos de cada extremo y los descendientes en el medio en el mismo orden. Las muestras se cargaron en dos frentes de corrida consecutivos en el mismo gel.

genéticos con estas características que corresponden al 18,1% del total segregante (Tabla 1).

El **caso 2** se encontraron 60 marcadores que se ajustan a este caso, correspondientes al 51,7% del total de marcadores segregantes (Tabla 2).

El **caso 3** se encontraron dos marcadores, correspondientes al 0,02% del total segregante (Tabla 3).

El **caso 4** es el más informativo y útil para los cálculos del mapa de ligamiento genético. En este caso se identificaron 29 loci que corresponden al 25,0% del total analizado (Tabla 4).

Del **caso 5** los marcadores no se encontraron segregando.

El **caso 6** solo se encontraron cuatro marcadores segregantes (0,04%)(Tabla 1).

Tabla 1. Frecuencias genotípicas y análisis de segregación para el caso 1, donde se incluyen los loci que segregan en *C. eugenioides* con dos alelos y en los que *C. iberica* es homocigótico.

No.	Locus	Tipo segregante	Clases genotípicas	II	Im	Fallos	X ²	Df	Significancia
90	CFGAl03	< mx >	[:lm]	33	56	2	5,9	1	**
91	CFGAl71	< mx >	[:lm]	28	63	0	13,5	1	*****
92	CFGAl206	< mx >	[:lm]	34	57	0	5,8	1	**
93	CFGAl528	< mx >	[:lm]	50	41	0	0,9	1	-
94	CFGAl254	< mx >	[:lm]	47	44	0	0,1	1	-
95	CFGAl465	< mx >	[:lm]	22	68	1	23,5	1	*****
96	CFGAl547a	< mx >	[:lm]	69	22	0	24,3	1	*****
97	CFGAl574	< mx >	[:lm]	44	47	0	0,1	1	-
98	CFGAl910	< mx >	[:lm]	64	27	0	15	1	*****
99	CFGAl042	< mx >	[:lm]	55	36	0	4	1	**
100	CFGAl081	< mx >	[:lm]	50	41	0	0,9	1	-
101	CFGAl115	< mx >	[:lm]	67	24	0	20,3	1	*****
102	CFGAl123	< mx >	[:lm]	45	46	0	0	1	-
103	CFGAl2065	< mx >	[:lm]	45	46	0	0	1	-
104	CFGAl2129	< mx >	[:lm]	48	42	1	0,4	1	-
105	CFGAl2195	< mx >	[:lm]	54	37	0	3,2	1	*
106	CFCA167	< mx >	[:lm]	53	38	0	2,5	1	-
107	CFCA212	< mx >	[:lm]	49	42	0	0,5	1	-
108	CFCAR255	< mx >	[:lm]	27	64	0	15	1	*****
109	EST230	< mx >	[:lm]	49	42	0	0,5	1	-
110	EST274	< mx >	[:lm]	44	35	12	1	1	-
111	FR-8-3	< mx >	[:lm]	65	26	0	16,7	1	*****
112	FR-80-3	< mx >	[:lm]	42	49	0	0,5	1	-
113	FRF-9-3	< mx >	[:lm]	28	63	0	13,5	1	*****
114	FRH-6-3	< mx >	[:lm]	49	42	0	0,5	1	-

En el **caso 7**, inverso del caso 6, no se encontraron marcadores segregantes.

De los 116 marcadores aptos para análisis de ligamiento, el 39% de ellos (45) resultaron con algún grado de distorsión de segregación según los valores de X^2 estimados con un valor mínimo de significancia de $P = 0,05$ (Tablas 1 a la 4).

Análisis de ligamiento. Se construyó un mapa genético de ligamiento en una familia de 91 plantas descendientes del cruzamiento interespecífico de *C. liberica* x *C. eugenioides*. Este mapa preliminar contiene 76 marcadores microsatélites distribuidos en una distancia de 378cM, con valores de LOD por encima de 3,0 con excepción del grupo de ligamiento 12, que se estableció con un LOD de 2,0 (Figura 3). Estos marcadores constituyen un conjunto inicial estándar de referencia para ser utilizados como puntos de anclaje en los trabajos encaminados a saturar el genoma de café y para efectos de genómica comparativa. Es interesante el hecho de que los microsatélites se distribuyeron al azar en el genoma como se observa en la Figura 3.

La construcción del mapa se encuentra en la etapa preliminar, y aún no se han incorporado a grupos de ligamiento 40 marcadores (Tabla 5); no obstante, se van a realizar algunas modificaciones de los parámetros para intentar su incorporación.

Los marcadores microsatélites resultan muy eficientes como una herramienta de mapeo en especies con bajo nivel de polimorfismo; sin embargo, este no es el caso en especies diploides. En este caso, alrededor del 36% de los marcadores evaluados en la población de mapeo resultaron adecuados para los análisis de ligamiento, lo cual puede explicarse en buena parte por el

hecho de poseer segregando cuatro alelos, lo cual en muchos casos impidió interpretar la segregación. Esto resalta la necesidad de ampliar considerablemente la base inicial de marcadores con el fin de lograr un buen nivel de saturación del mapa.

A este respecto, se planea incorporar al mapa marcadores AFLP, que a pesar de ser dominantes, permiten obtener buenos niveles de polimorfismo en poco tiempo y ser incorporados a una matriz construida con marcadores codominantes como la que se tiene.

Los modelos de segregación que se ajustan a los marcadores estudiados se agruparon en cinco casos o categorías fundamentales e incluyen aquellos que segregan para uno de los padres $lm \times ll$ o $nn \times np$ (casos 1 y 2 para el padre y la madre, respectivamente), cuando ambos padres son heterocigotos coincidiendo en los alelos $hk \times hk$ (caso 3) y cuando ambos padres son heterocigotos pero con alelos diferentes, $ab \times cd$ o $ef \times eg$ (caso 4). El caso 6 con ambos padres heterocigotos pero que la madre incluye un alelo nulo ($ab \times a0$) se codifica como el caso 1 ($lm \times ll$).

Un aspecto notable del estudio es el número de loci que presentan distorsión de las proporciones mendelianas de segregación (Tablas 1 a 4). Varios trabajos han reportado ampliamente distorsiones de segregación en plantas, en poblaciones de mapeo de diferentes especies (19, 20, 37, 46, 64).

En los estudios relacionados directamente con café, Pearl-HM *et al.* (55) reportan que en café tetraploide las distorsiones de segregación de las proporciones esperadas se encuentran ampliamente distribuidas en los genomas de los cultivares Catimor y Mokka, y alcanzan valores de 22 y 45% de los marcadores, respectivamente.

Tabla 2. Frecuencias genotípicas y análisis de segregación para el caso 2, donde se incluyen los loci que segregan en *C.liberica* y son homocigóticos en *C. eugenioides*.

No.	Locus	Tipo segregante	Clases genotípicas	nn	np	Fallos	X ²	Df	Significancia
30	CFGA54	<nnxnp>	[nn:np]	53	38	0	2,5	1	-
31	CFGA55	<nnxnp>	[nn:np]	46	45	0	0	1	-
32	CFGA92	<nnxnp>	[nn:np]	43	47	1	0,2	1	-
33	CFGA210	<nnxnp>	[nn:np]	41	50	0	0,9	1	-
34	CFGA227	<nnxnp>	[nn:np]	45	46	0	0	1	-
35	CFGA240	<nnxnp>	[nn:np]	49	42	0	0,5	1	-
36	CFGA249	<nnxnp>	[nn:np]	44	47	0	0,1	1	-
37	CFGA259	<nnxnp>	[nn:np]	54	37	0	3,2	1	*
38	CFGA280	<nnxnp>	[nn:np]	66	25	0	18,5	1	*****
39	CFGA285	<nnxnp>	[nn:np]	48	42	1	0,4	1	-
40	CFGA1103	<nnxnp>	[nn:np]	44	47	0	0,1	1	-
41	CFGA1147	<nnxnp>	[nn:np]	36	55	0	4	1	**
42	CFGA2057	<nnxnp>	[nn:np]	47	44	0	0,1	1	-
43	CFGA2230	<nnxnp>	[nn:np]	63	28	0	13,5	1	*****
44	CFGA2247	<nnxnp>	[nn:np]	56	35	0	4,8	1	**
45	CFGA297	<nnxnp>	[nn:np]	59	28	4	11,1	1	*****
46	CFGA494	<nnxnp>	[nn:np]	32	59	0	8	1	****
47	CFGA502	<nnxnp>	[nn:np]	49	41	1	0,7	1	-
48	CFGA569a	<nnxnp>	[nn:np]	40	51	0	1,3	1	-
49	CFGA901	<nnxnp>	[nn:np]	41	49	1	0,7	1	-
50	CFGA917	<nnxnp>	[nn:np]	46	42	3	0,2	1	-
51	CFGA1056	<nnxnp>	[nn:np]	50	41	0	0,9	1	-
52	CFGA1057	<nnxnp>	[nn:np]	49	42	0	0,5	1	-
53	CFGA1107	<nnxnp>	[nn:np]	46	45	0	0	1	-
54	CFGA1150	<nnxnp>	[nn:np]	59	32	0	8	1	****
55	CFGA1180	<nnxnp>	[nn:np]	39	52	0	1,9	1	-
56	CFGA1193	<nnxnp>	[nn:np]	44	47	0	0,1	1	-

Continúa...

30	CFGA54	<nrxnp>	[nn.np]	53	38	0	2,5	1	-
31	CFGA55	<nrxnp>	[nn.np]	46	45	0	0	1	-
32	CFGA92	<nrxnp>	[nn.np]	43	47	1	0,2	1	-
33	CFGA210	<nrxnp>	[nn.np]	41	50	0	0,9	1	-
34	CFGA227	<nrxnp>	[nn.np]	45	46	0	0	1	-
35	CFGA240	<nrxnp>	[nn.np]	49	42	0	0,5	1	-
36	CFGA249	<nrxnp>	[nn.np]	44	47	0	0,1	1	-
37	CFGA259	<nrxnp>	[nn.np]	54	37	0	3,2	1	*
38	CFGA280	<nrxnp>	[nn.np]	66	25	0	18,5	1	*****
39	CFGA285	<nrxnp>	[nn.np]	48	42	1	0,4	1	-
40	CFGA1103	<nrxnp>	[nn.np]	44	47	0	0,1	1	-
41	CFGA1147	<nrxnp>	[nn.np]	36	55	0	4	1	**
42	CFGA2057	<nrxnp>	[nn.np]	47	44	0	0,1	1	-
43	CFGA2230	<nrxnp>	[nn.np]	63	28	0	13,5	1	*****
44	CFGA2247	<nrxnp>	[nn.np]	56	35	0	4,8	1	**
45	CFGA297	<nrxnp>	[nn.np]	59	28	4	11,1	1	*****
46	CFGA494	<nrxnp>	[nn.np]	32	59	0	8	1	*****
47	CFGA502	<nrxnp>	[nn.np]	49	41	1	0,7	1	-
48	CFGA569a	<nrxnp>	[nn.np]	40	51	0	1,3	1	-
49	CFGA901	<nrxnp>	[nn.np]	41	49	1	0,7	1	-
50	CFGA917	<nrxnp>	[nn.np]	46	42	3	0,2	1	-
51	CFGA1056	<nrxnp>	[nn.np]	50	41	0	0,9	1	-
52	CFGA1057	<nrxnp>	[nn.np]	49	42	0	0,5	1	-
53	CFGA1107	<nrxnp>	[nn.np]	46	45	0	0	1	-
54	CFGA1150	<nrxnp>	[nn.np]	59	32	0	8	1	*****
55	CFGA1180	<nrxnp>	[nn.np]	39	52	0	1,9	1	-
56	CFGA1193	<nrxnp>	[nn.np]	44	47	0	0,1	1	-
57	CFGA1236	<nrxnp>	[nn.np]	39	52	0	1,9	1	-
58	CFGA2078	<nrxnp>	[nn.np]	42	49	0	0,5	1	-
59	CFGA2082	<nrxnp>	[nn.np]	50	41	0	0,9	1	-
60	CFCA20	<nrxnp>	[nn.np]	42	49	0	0,5	1	-
61	CFCA52	<nrxnp>	[nn.np]	43	47	1	0,2	1	-

Tabla 3. Frecuencias genotípicas y análisis de segregación para el caso 3, donde se incluyen los loci en los que *C. eugenioides* y *C. liberica* son heterocigóticos.

No.	Locus	Tipo segregante	Clases genotípicas	hh	hk	kk	Fallos	X ²	Df	Significancia
115	CFGA965	<hkxhk>	[hh:hk:kk]	33	47	11	0	10,7	2	****
116	CFGA1082	<hkxhk>	[hh:hk:kk]	27	36	25	3	3	2	-

Tabla 4. Frecuencias genotípicas y análisis de segregación para el caso 4, donde se incluyen los loci de *C. eugenioides* y *C. liberica* segregando con cuatro alelos.

No.	Locus	Tipo segregante	Clases genotípicas	ac	ad	bc	bd	ce	ef	eg	fg	Fallos	X ²	Df	Significancia
1	CFGA52	<abxcd>	[ac:ad:bc:bd]	21	21	23	26					0	0,7	3	-
2	CFGA69	<abxcd>	[ac:ad:bc:bd]	25	25	19	22					0	1,1	3	-
3	CFGA97y99	<abxcd>	[ac:ad:bc:bd]	27	29	15	19					1	5,8	3	-
4	CFGA205	<efxeg>	[ee:ef:eg:fg]					23	28	23	17	0	2,7	3	-
5	CFGA239	<abxcd>	[ac:ad:bc:bd]	12	31	18	30					0	11,4	3	***
6	CFGA1132	<efxeg>	[ee:ef:eg:fg]					23	23	21	24	0	0,2	3	-
7	CFGA462a	<efxeg>	[ee:ef:eg:fg]					11	30	19	29	2	10,9	3	**
8	CFGA529	<efxeg>	[ee:ef:eg:fg]					36	26	12	15	2	16,2	3	*****
9	CFGA651	<abxcd>	[ac:ad:bc:bd]	18	37	13	23					0	14,1	3	*****
10	CFGA1033	<abxcd>	[ac:ad:bc:bd]	31	14	24	22					0	6,5	3	*
11	CFGA1120	<abxcd>	[ac:ad:bc:bd]	20	19	25	27					0	2	3	-
12	CFGA1122	<abxcd>	[ac:ad:bc:bd]	32	25	18	16					0	7	3	*
13	CFGA1159	<efxeg>	[ee:ef:eg:fg]					15	25	19	32	0	7,2	3	*
14	CFGA1246	<abxcd>	[ac:ad:bc:bd]	34	14	33	10					0	20,7	3	*****
15	CFGA2011	<abxcd>	[ac:ad:bc:bd]	35	18	20	17					1	9,5	3	**
16	CFGA2147	<abxcd>	[ac:ad:bc:bd]	32	19	21	19					0	5,1	3	-
17	CFGA2258	<abxcd>	[ac:ad:bc:bd]	12	22	27	30					0	8,2	3	**
18	CFGA2260	<abxcd>	[ac:ad:bc:bd]	10	22	29	30					0	11,2	3	**
19	CFCA12	<abxcd>	[ac:ad:bc:bd]	26	28	17	20					0	3,5	3	-
20	CFCA44	<abxcd>	[ac:ad:bc:bd]	19	24	15	33					0	8	3	**
21	CFCA177	<abxcd>	[ac:ad:bc:bd]	30	23	21	16					1	4,5	3	-
22	CFCA193	<abxcd>	[ac:ad:bc:bd]	22	27	21	18					3	1,9	3	-

Continúa...

...Continuación

23	CFCA285	<abxcd>	[ac:ad:bc:bd]	13	30	25	23	0	6,7	3	*
24	CFCA358	<abxcd>	[ac:ad:bc:bd]	12	32	26	20	1	9,7	3	**
25	FR-73-5	<abxcd>	[ac:ad:bc:bd]	17	24	26	24	0	2	3	-
26	FR-102-5	<abxcd>	[ac:ad:bc:bd]	21	24	26	20	0	1	3	-
27	FR-147-5	<efxeg>	[ee:ef:eg:fg]	20	21	17	33	0	6,5	3	*
28	FRE-7-3	<abxcd>	[ac:ad:bc:bd]	29	15	30	17	0	8,1	3	**
29	FRH-1-3	<abxcd>	[ac:ad:bc:bd]	17	14	33	27	0	10,2	3	**

Tabla 5. Marcadores no agrupados en el mapa parcial.

No.	Locus	No.	Locus
77	CFGA69	97	CFCAR257
78	CFGA651	98	CFCAR258
79	CFCA44	99	CFCAR259
80	FR-147-5	100	FR-4-1
81	FRH-1-3	101	FR-28-2
82	CFGA210	102	FR-34-2
83	CFGA2057	103	FRE-8-3
84	CFGA2247	104	FRE-12-3
85	CFGA297	105	CFGA103
86	CFGA494	106	CFGA171
87	CFGA502	107	CFGA528
88	CFGA1056	108	CFGA1254
89	CFGA1057	109	CFGA465
90	CFGA1107	110	CFGA547a
91	CFGA1150	111	CFGA910
92	CFGA1193	112	CFGA1042
93	CFCA85	113	CFGA1081
94	CFCA169	114	CFGA1115
95	CFCA420(LocusA)	115	FR-8-3
96	CFCAR253	116	FRF-9-3

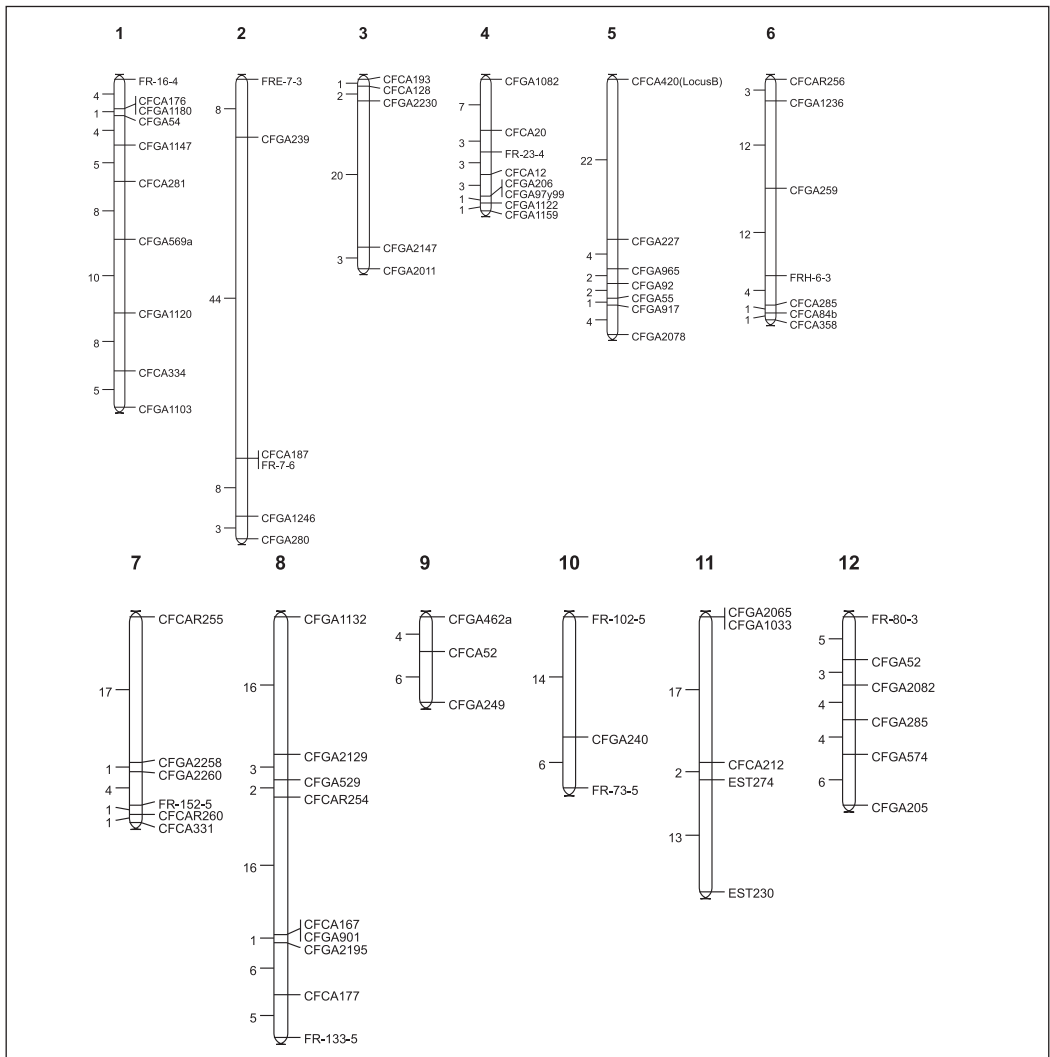


Figura 3. Mapa de ligamiento genético de *C. liberica* x *C. eugenioides*. Construido a partir de 91 híbridos interespecíficos. Se agruparon 74 loci microsatélites y 2 EST, utilizando la función de mapeo de Kosambi y el programa JoinMap 2.0. Se obtuvieron 12 grupos de ligamiento y un cubrimiento total de 378cM.

En general, los trabajos en este campo argumentan diversas causas posibles para explicar este fenómeno. Solo para mencionar algunas de las más sobresalientes se cita el aborto de cigotos, la exclusión selectiva de un genotipo gamético particular en el momento de la fertilización debida a incompatibilidad y la selección cigótica, entre otras (35).

De acuerdo con estas hipótesis y considerando que se trata de un cruzamiento interespecífico, es muy probable que la distorsión de segregación en esta familia de mapeo esté relacionada con procesos de selección gamética o cigótica, aunque los experimentos descritos están fuera del alcance de resolver este aspecto y para ello se requiere de más experimentación.

Los efectos de la distorsión de segregación en las estimaciones de frecuencias de recombinación son variables y muchas veces no hay consenso al respecto. Por ejemplo, en experimentos de mapeo con la especie *C. canephora*, Lashermes-P *et al.* (43) encontraron una tendencia hacia una sobreestimación notable de la fracción de recombinación en las regiones que contienen mayor cantidad de loci distorsionados que según los autores estaría relacionada con la selección en favor de los genotipos recombinantes y/o en detrimento de los genotipos parentales.

En contraste, Cloutier-S *et al.* (10) al comparar diversos mapas en *Brassica napus* L. y concluyeron que la distorsión de segregación, aún en cantidad menor en cuanto al número de loci distorsionados pero altamente significativa estadísticamente, puede resultar en estimaciones reducidas de la fracción de recombinación.

En este estudio, parece evidente que el efecto de la distorsión de segregación en una proporción de loci tiene un efecto de subestimación de las frecuencias de recombinación, como puede evidenciarse de la distancia genética total tan reducida (378cM) que cubre los 76 loci agrupados hasta este momento, comparado con las distancias que se han reportado en otros trabajos sobre mapas de ligamiento en café, que alcanzan valores entre los 1.041 y los 1.402cM en especies diploides (37, 43, 53) y de 1.802cM en tetraploides (55).

En la actualidad, se están desarrollando estudios encaminados a incrementar el número y el tipo de marcadores microsatélites en esta misma población, así como la exploración de la posibilidad de incluir marcadores asociados a regiones de expresión, llamados también marcadores funcionales.

Otro hallazgo interesante en este estudio es la alta proporción de loci con alelos nulos

(32% de 114 microsatélites y 2 ESTs). A un genotipo en un locus particular se le asignan uno o más alelos nulos cuando el o los productos de amplificación esperados, según el modelo de segregación, no se detectan para una combinación particular planta-marcador, aún después de varias repeticiones. Es posible que esto se deba a que el origen de las secuencias para el diseño de cebadores fue *C. arabica* variedad Caturra y a que han ocurrido mutaciones en el transcurso de la evolución, que impiden la detección de algunos alelos en otras especies del género *Coffea*, que incluyen a los parentales diploides de la población de mapeo.

Aunque no siempre se han podido establecer sus causas moleculares con precisión, en algunos casos la presencia de alelos nulos pueden atribuirse a sustituciones de bases en el sitio de asociación de los cebadores para microsatélites (30). Su ocurrencia y posibles mecanismos moleculares y de evolución se han estudiado en varios organismos, en los cuales se incluyen varios mamíferos como humanos (11), venados (56) y osos (52). En plantas se han reportado alelos nulos en loci de microsatélites en arroz (32), uva (59) y trigo (5), entre otros.

En otros estudios se ha demostrado que las mutaciones asociadas a microsatélites no están restringidas exclusivamente a las regiones hipervariables y en muchos casos pueden estar localizadas en las regiones flanqueantes (54). Esto limita la asociación entre cebadores y ADN molde, impidiendo la detección de ciertos alelos, y sugiere la necesidad de adelantar estudios de secuencia en este tipo de loci para confirmar la presencia de las mutaciones que generan alelos nulos. En este estudio se han adelantado algunos ensayos que incluyen la utilización de cebadores rediseñados en regiones adyacentes a los sitios originales de amplificación para tratar de evitar los posibles puntos de mutación, en

caso de que ellos existan en estas zonas. Los resultados preliminares han podido confirmar la presencia de dichos alelos, aunque se requieren más análisis para esclarecer las bases moleculares de este fenómeno.

A partir de este mapa, la determinación de las relaciones de ligamiento de estos grupos de loci en otras especies relacionadas, arrojará valiosa información acerca de las relaciones evolutivas en las especies del género *Coffea* y en particular, los grupos de ligamiento de *C. eugenioides* podrían ser muy útiles para estudiar los procesos de organización genómica de *C. arabica* y los modelos de herencia e intercambio genético de los híbridos interespecíficos, dados los cercanos vínculos evolutivos de estas dos especies.

El grado de homogeneidad genética en los cultivares de *C. arabica* hace necesaria una mayor exploración del genoma de las especies diploides, relacionadas evolutivamente con la especie cultivada.

Adicionalmente, *C. arabica* es una especie perenne en la cual el desarrollo de una población apta para mapeo genético puede tardar entre 5 a 7 años. La estrategia que presentamos en este estudio representa una alternativa eficiente para reducir el tiempo y los costos del mapeo en café, al utilizar un falso cruce de prueba entre dos especies polimórficas.

AGRADECIMIENTOS

A la Federación Nacional de Cafeteros de Colombia que a través del Centro Nacional de Investigaciones de Café - Cenicafé, aportó gran parte de los recursos para financiar este proyecto.

A la Universidad de Caldas, por otorgar la comisión de estudios de Germán López,

lo que ha permitido adelantar este trabajo de investigación.

LITERATURA CITADA

1. ANTHONY, F.; BERTRAND, B.; QUIROS, O.; WILCHES, A.; LASHERMES, P.; BERTHAUD, J.; CHARRIER, A. Genetic diversity of wild coffee (*Coffea arabica* L.) using molecular markers. *Euphytica* 118:53-65. 2001.
2. ANTHONY, F.; COMBES, M.C.; ASTORGA, C.; BERTRAND, B.; GRAZIOSI, G.; LASHERMES, P. The origin of cultivated *Coffea arabica* L. varieties revealed by AFLP and SSR markers. *Theoretical and Applied Genetics* 104:894-900. 2002.
3. BARRE, P.; AKAFFOU, D.S.; KY, C.L.; LOUARN, J.; CHARRIER, A.; HAMON, S.; NOIROT, M. Introgression of quality traits from *C. pseudozanguebariae* to *C. liberica* var. *Dewevrei*. In: COLLOQUE Scientifique International sur le Café, 17. Nairobi, Juillet 20-25, 1997. Paris, ASIC, 1997. p. 520-526.
4. BRIDSON, D.M.; VERDCOURT, B. Flora of tropical East Africa – Rubiaceae. Part 2. Rotterdam, Balkema, 1988. 333 p.
5. BRYAN, G.C.; COLLINS, J.; STEPHENSON, P.; ORREY, A.; SMITH, J.B.; GALE, M.D. Isolation and characterization of microsatellites from hexaploid bread wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 94:557-563. 1997.
6. CALLES, J. Avance de algunos trabajos sobre la evaluación de materiales genéticos considerados tolerantes a nematodos. In: SEMINARIO Regional de Nematología en el Cultivo de Café, 2. Antigua, noviembre 29 - diciembre 2, 1993. Memoria. Guatemala, Anacafé-IICA, 1994. 9 p.
7. CARVALHO, A. Distribuição geográfica e classificação botânica do gênero *Coffea* com referência especial à espécie *Arabica*. V. Origem e classificação botânica do *C. arabica* L. *Boletim da Superintendencia dos Serviços do Café* 21(230):174-184. 1946.
8. CHARRIER, A.; BERTHAUD, J. Botanical classification of coffee. In: COFFEE: botany, biochemistry and production of beans and beverage. Londres, Croom Held, 1985. p. 13-47.

9. CHEVALIER, A.; DAGRON, M. Recherches historiques sur les débuts de la culture du caféier en Amérique. Paris, Communications et Actes de l'Académie des Sciences Coloniales, 1928. 38 p.
10. CLOUTIER, S.; CAPPADOCCIA, M.; LANDRY, B.S. Analysis of RFLP mapping inaccuracy in *Brassica napus* L. Theoretical and Applied Genetics 95:83-91. 1997.
11. CALLEN, D.F.; THOMPSON, A.D.; SHEN, Y. Incidence and origin of null alleles in the (AC)_n microsatellite markers. American Journal of Human Genetics 52:922-927. 1993.
12. CROS, J.; COMBES, M.C.; CHABRILLANGE, N.; DUPERRAY, C.; MONNOT DES A., A.; HAMON, S. Nuclear DNA content in the subgenus *Coffea* (Rubiaceae): inter- and intra-specific variation in African species. Canadian Journal of Botany 73:14-20. 1995.
13. DOLLO, L.; HORMAZA, J.I.; POLITO, V.S. RAPD polymorphism among pistachio (*Pistacia vera* L.) cultivars. Fruit Varieties Journal 49(3):147-152. 1995.
14. DUNEMAN, F. Genetic relationships in *Malus* evaluated by RAPD "fingerprinting" of cultivars and wild species. In: PROGRESS in temperate fruit breeding. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, 1995. p. 309-311.
15. FABBRI, A.; HORMAZA, J.I.; POLITO, V.S. Random amplified polymorphic DNA analysis of olive (*Olea europaea* L.) cultivars. Journal of the American Society of Horticultural Science 120(3):538-542. 1995.
16. FJELLSTROM, R.G.; PARFITT, D.E.; MCGRANAHAN, G. Genetic relationships and characterization of Persian walnut (*Juglans regia* L.) cultivars using restriction fragment length polymorphisms (RFLPs). Journal of American Society for Horticultural Science 119(4):833-839. 1994.
17. FJELLSTROM, R.G.; PARFITT, D. Walnut (*Juglans* spp.) genetic diversity determined by restriction fragment length polymorphisms. Genome 37(4):690-700. 1994.
18. FJELLSTROM, R.G.; PARFITT, D. RFLP inheritance and linkage in walnut. Theoretical and Applied Genetics 89(6):665-670. 1994.
19. FREGENE, M.; ÁNGEL, F.; GÓMEZ, R.; RODRÍGUEZ, F.; CHAVARRIAGA, P.; ROCA, W.; THOME, J.; BONIERBALE, M. A molecular map of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). Theoretical and Applied Genetics 95:431-441. 1997.
20. GARRIS, A.J.; MCCOUCH, S.R.; KRESOVICH, S. Population structure and its effect on haplotype diversity and linkage disequilibrium surrounding the *xa5* locus of rice (*Oryza sativa* L.). Genetics 165:759-769. 2003.
21. GRATTAPAGLIA, D.; SEDEROFF, R. Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus europhylla* using a pseudo-testcross: Mapping strategy and RAPD markers. Genetics 137:1121-1137. 1994.
22. HAARER, A.E. Modern coffee production. Londres, Leonard Hill, 1958. 467 p.
23. HACKETT, C.A.; WACHIRA, F.N.; PAUL, S.; POWELL, W.; WAUGH, R. Construction of a genetic linkage map for *Camelia sinensis* (tea). Heredity 85:346-355. 2000.
24. HARADA, T.; MATSUKAWA, K.; SATO, T.; ISHIKAWA, R.; NIIZEKI, M.; SAITO, K. DNA-RAPDs detect genetic variation and paternity in *Malus*. Euphytica 65:87-91. 1993.
25. HEARNE, C.M.; GHLOSH, S.; TODD, J.A. Microsatellites for linkage analysis of genetic traits. Trends in Genetics 8:288-294. 1992.
26. HEMMAT, M.; WEEDEN, N.F.; MANGANARIS, A.G.; LAWSON, D.M. Molecular markers linkage map for apple. Journal of Heredity 85:4-11. 1994.
27. HERNÁNDEZ, P.; DE LA ROSA, R.; RALO, R.; DORADO, G.; MARTÍN, A. Development of SCAR markers in olive (*Olea europaea*) by direct sequencing of RAPD products: applications in olive germoplasm evaluation and mapping. Theoretical and Applied Genetics 103(5):788-791. 2001.
28. HORMAZA, J.I.; DOLO, L.; POLITO, V.S. Determination of relatedness and geographical movements of *Pistacia vera* L. (Pistachio) germoplasm by RAPD analysis. Economic Botany 48(4):349-359. 1994.
29. HORMAZA U., J.I. Marcadores de ADN aplicados a la mejora de frutales. ITEA. Producción Vegetal 92(1):5-16. 1996.
30. ISHIBASHI, Y.; SAITOH, T.; ABE, S.; YOSHIDA, M.C. Null microsatellite alleles due to nucleotide

- sequence variation in the grey-sided vole *Clethrionomys rufocanus*. *Molecular Ecology* 5:589-590. 1996.
31. JACK, P.L.; DIMITRIJEVIC, T.A.F.; MAYES, S. Assessment of nuclear, mitochondrial and chloroplast RFLP markers in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Theoretical and Applied Genetics* 90:643-649. 1995.
 32. JAIN, S.; JAIN, R.K.; MCCOUCH, S. Genetic analysis of Indian aromatic and quality rice (*Oriza sativa* L.) germplasm using panels of fluorescently-labeled microsatellite markers. *Theoretical and Applied Genetics* 109:965-977. 2004.
 33. JAME, P.; LAGODA, P.J.L. Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in Ecology and Evolution* 11:424-429. 1996.
 34. KOLLER, B.; LEHMANN, A.; MACDERMOTT, J.M.; GESSLER, G. Identification of apple cultivars using RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics* 85:901-904. 1993.
 35. KREIKE, C.M.; STIEKEMA, W.J. Reduced recombination and distorted segregation in a *Solanum tuberosum* (2x) x *S. spegazzinii* (2x) hybrid. *Genome* 40:180-187. 1997.
 36. KY, C.L.; LOUARN, J.; GUYOT, B.; CHARRIER, A.; HAMON, S.; NOIROT, M. Relations between inheritance of chlorogenic acid contents in an interspecific cross between *Coffea pseudozanguebariae* and *Coffea liberica* var 'dewevrei'. *Theoretical and Applied Genetics* 98:628-637. 1999.
 37. KY, C.L.; BARRE, P.; LORIEUX, M.; TROUSLOT, P.; AKAFFOU, S.; LOUARN, J.; CHARRIER, A.; HAMON, S.; NOIROT, M. Interspecific genetic linkage map, segregation distortion and genetic conversion in coffee (*Coffea* sp.). *Theoretical and Applied Genetics*, 101:669-676. 2000.
 38. KYASMA B.V. WAGENINGEN. HOLLANDA. JoinMap® 3.0. Software for the calculation of genetic linkage maps. Wageningen, Plant Research International, 2001. 51 p.
 39. LASHERMES, P.; COMBES, M.C.; CROS, J.; TROUSLOT, P.; ANTHONY, F.; CHARRIER, A. Origin and genetic diversity of *Coffea arabica* L. based on DNA molecular markers. In: COLLOQUE Scientifique International sur le Café, 16. Kyoto, Avril 9-14, 1995. Paris, ASIC, 1995. p. 528-535.
 40. LASHERMES, P.; CROSS, J.; COMBES, M.C.; TROUSLOT, P.; ANTHONY, F.; HAMON, S.; CHARRIER, A. Inheritance and restriction fragment length polymorphism of chloroplast DNA in genus *Coffea* L. *Theoretical and Applied Genetics* 93:626-632. 1996.
 41. LASHERMES, P.; COMBES, M.C.; TROUSLOT, P.; CHARRIER, A. Phylogenetic relationships of coffee-tree species (*Coffea* L.) as inferred from ITS sequences of nuclear ribosomal DNA. *Theoretical and Applied Genetics* 94:947-955. 1997.
 42. LASHERMES, P.; COMBES, M.C.; ROBERT, J.; TROUSLOT, P.; D'HONT, A.; ANTHONY, F.; CHARRIER, A. Molecular characterization and origin of the *Coffea arabica* L. genome. *Molecular and General Genetics* 261:259-266. 1999.
 43. LASHERMES, P.; COMBES, M.C.; PRAKASH, N.S.; TROUSLOT, P.; LORIEUX, M.; CHARRIER, A. Genetic linkage map of *Coffea canephora*: effect of segregation distortion and analysis of recombination rate in male and female meiosis. *Genome* 44:589-596. 2001.
 44. LESPINASSE, D.; RODIER, G., M.; GRIVET, L.; LECONTE, A.; LEGNATE, H.; SEGUIN, M. A saturated genetic linkage map of rubber tree (*Hevea* spp.) based on RFLP, AFLP, microsatellite and isozyme markers. *Theoretical and Applied Genetics* 100:127-138. 2000.
 45. LIU, B.H. *Statistical Genomics. Linkage, mapping and QTL analysis*. Boca Raton, CRC Press, 1998. 611 p.
 46. LORIEUX, M.; NDJIONDJOP, M.N.; GHESQUIERE, A. A first interspecific *Oryza sativa* x *Oryza glaberrima* microsatellite-based genetic linkage map. *Theoretical and Applied Genetics* 100:593-601. 2000.
 47. MONCADA B., M. DEL P.; MCCOUCH, S. Simple sequence repeat diversity in diploid and tetraploid *Coffea* species. *Genome* 47:501-509. 2004.
 48. MORGANTE, M.; OLIVIERI, A.M. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *The Plant Journal* 3:175-182. 1993.
 49. MULKAHY, D.L.; CRESTI, M.; SANSVINI, S.; DOUGLAS, G.C.; LINSKENS, H.F.; MERGAMINIM, G.; VIGNANI, R.; PANCALDI, M. The use of random amplified polymorphic DNAs to fingerprint apple genotypes. *Scientia Horticulturae* 54:89-96. 1993.

50. NUEZ, F.; CARRILLO, J.M. Los marcadores genéticos en la mejora vegetal. Valencia, Universidad Politécnica de Valencia, 2000. 579 p.
51. NYBOM, H.; ROGSTAD, S.H.; SCHALL, B.A. Genetic variation detected by the use of M13 "DNA fingerprint" probe in *Malus*, *Prunus* and *Rubus* (Rosaceae). Theoretical and Applied Genetics 85(8):153-156. 1990.
52. PAETKAU, D.; STROBECK, C. The molecular basis and evolutionary history of microsatellite null allele in bears. Molecular Ecology 4:519-520. 1995.
53. PAILLARD, M.; LASHERMES, P.; PÉTIARD, V. Construction of a molecular linkage map in coffee. Theoretical and Applied Genetics 93:41-47. 1996.
54. PEAKALL, R.; GILMORE, S.; KEYS, W.; MORGANETE, M.; RAFALSKI, A. Cross-species amplification of soybean (*Glycine max*) simple sequence repeats (SSRs) within the genus and other legume genera: Implications for transferability of SSRs in plants. Molecular and Biological Evolution 15(10):1275-1287. 1998.
55. PEARL, H.M.; NAGAI, C.; MOORE, P.H.; STEIGER, D.L.; OSGOOD, R.V.; MING, R. Construction of a genetic map for arabica coffee. Theoretical and Applied Genetics 108:829-835. 2004.
56. PEMBERTON, J.M.; SLATE, J.; BANCROFT, D.R.; BARRETT, J.A. Non-amplifying alleles at microsatellite loci: a caution for parentage and population studies. Molecular Ecology 4:249-252. 1995.
57. RAINA, S.N.; MUKAI, Y.; YAMAMOTO, M. In situ hybridization identifies the diploid progenitor species of *Coffea arabica* (Rubiaceae). Theoretical and Applied Genetics 97:1204-1209. 1998.
58. RAJAPAKSE, S.; BELTHOFF, L.E.; HE, G.; HESTAGER, A.E.; SCORZA, R.; VERDE, I.; BALLARD, R.E.; BAIR, W.V.; CALLAHAN, A.; MONET, R.; ABBOTT, A.G. Genetic linkage mapping in peach using morphological, RFLP and RAPD markers. Theoretical and Applied Genetics 90:503-510. 1995.
59. SEFC, K.M.; REGNER, F.; TURETSCHKE, E.; GLÖSSL, J.; STEINKELLNER, H. Identification of microsatellite sequences in *Vitis riparia* and their applicability for genotyping of different *Vitis* species. Genome 42:367-373. 1999.
60. SHIMADA, T.; HAH, T.; YAMAGUCHI, M.; TAKEDA, T.; NOMURA, K.; YOSHIDA, M. Classification of mume (*Prunus mume* Sieb et Zucc.) by RAPD assay. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science 63(3):543-551. 1994.
61. TANCREED, S.J.; ZEPPA, A.G.; GRAHAM, G. The use of the PCT-RAPD technique in improving the plant variety rights description of a new Queensland apple (*Malus domestica*) cultivar. Australian Journal of Experimental Agriculture 34(5):665-667. 1994.
62. WATILLON, B.; DRUART, P.; DU JARDIN, P.; KETTMANN, R.; BOXUS, P.; BURNY-A. Use of random cDNA probes to detect restriction fragment length polymorphisms among apple clones. Scientia Horticulturae 46:235-243. 1991.
63. WU, R.L.; HAN, Y.F.; HU, J.J.; FANG, J.J.; LI, L.; LI, M.L.; ZENG, Z.B. An integrated genetic map of *Populus deltoides* based on amplified fragment length polymorphisms. Theoretical and Applied Genetics 100:1249-1256. 2000.
64. XU, Y.; ZHU, L.; XIAO, J.; HUANG, N.; MCCOUCH, S.R. Chromosomal regions associated with segregation distortion of molecular markers in F₂, backcross, doubled haploid and recombinant inbred populations in rice (*Oryza sativa* L.). Molecular and General Genetics 253:535-545. 1997.