

## CONSTRUÇÃO DE UM MAPA PARCIAL DE LIGAÇÃO GÊNICA EM CAFÉ UTILIZANDO MARCADORES RAPD

OLIVEIRA, A.C.B.<sup>1</sup>; SAKIYAMA, N.S.<sup>2</sup> e SILVA, L.C.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> UFV/BIOAGRO, 36.571-000, Viçosa-MG, <abaiiao@mail.ufv.br>; <sup>2</sup> UFV/DFT, <Sakiyama@mail.ufv.br>;

<sup>3</sup> UFV/BIOAGRO, <eg37140@correio.cpd.ufv.br>.

**RESUMO:** Um mapa parcial de ligação gênica para *Coffea arabica* L. foi elaborado com a utilização de uma população segregante RC<sub>1</sub> oriunda do cruzamento entre o Híbrido de Timor e 'Catuaí Amarelo'. Foram avaliados 112 marcadores RAPD polimórficos e consistentes, dos quais 85 apresentaram segregação na proporção esperada de 1:1 (P>0,05) e 27 mostraram desvio nessa proporção, não sendo aproveitados na elaboração do mapa. Quinze marcadores não se mostraram ligados, enquanto os 70 restantes formaram nove grupos de ligação, cobrindo 512,2 cM. A maioria dos grupos obtida apresentou boa densidade de marcadores, em que o maior intervalo entre dois marcadores foi de 30,4 cM e houve um total de sete intervalos que excederam 20 cM. A obtenção de novos marcadores RAPD polimórficos e a inclusão de outros marcadores moleculares, principalmente AFLPs e microssatélites, poderão saturar esses intervalos e/ou formar novos grupos de ligação, além de incluir os marcadores não ligados, melhorando a cobertura do genoma e permitindo determinar possíveis relações homeólogas entre os grupos de ligação de *Coffea arabica*, o que tornará o mapa ainda mais informativo.

**Palavras-chave:** *Coffea arabica*, mapeamento genético, marcadores moleculares.

### CONSTRUCTION OF A PARTIAL LINKAGE MAP WITH COFFEE USING RAPD MARKERS

**ABSTRACT:** A genetic linkage partial map of *Coffea arabica* L. was elaborated with use of a RC<sub>1</sub> segregant population originated from crossing between the Híbrido de Timor and 'Catuaí Amarelo'. It were assessed 112 polymorphic and consistent RAPD markers, of the which 85 presented segregation in the expected ratio of 1:1 (P>0,05) and 27 showed deviation in that ratio, not being taken advantage in the map elaboration. Fifteen markers were not shown linked, while the remaining 70 formed nine linkage groups covering 512,2 cM. The most of the groups obtained it presented good density of markers, in that the largest interval among two markers was of 30,4 cM and there was a total of seven intervals that exceeded 20 cM. The obtaining of new polymorphic RAPD markers and the inclusion of other molecular markers, mainly AFLPs and microsatellites, it can saturate these intervals and, or to form new linkage groups, besides including the unlinked markers, improving the covering of the genome and allowing to

determine possible homeologous relationships among the linkage groups of *Coffea arabica*, what will still turn the map more informative.

**Key words:** *Coffea arabica*, genetic mapping, molecular markers.

## INTRODUÇÃO

O cafeeiro pertence à família Rubiaceae, tribo Coffeae, subtribo Coffeinae e gênero *Coffea*, formado por cerca de 100 espécies, das quais as duas mais cultivadas são *Coffea arabica* L. (café arábica) e *Coffea canephora* Pierre et Froenher (café robusta), sendo *C. arabica* responsável por 70% da produção mundial e 99% da produção da América Latina. Outras espécies importantes do gênero *Coffea* são *C. congensis*, *C. liberica*, *C. dewevrei*, *C. stenophylla*, *C. eugenioides*, *C. racemosa*, *C. salvatrix*, entre outras portadoras de genes de interesse para o melhoramento de cafeeiro.

*Coffea arabica* L. é uma espécie alotetraplóide segmental, com  $2n=4X=44$  cromossomos, autógama e com taxa variável de fecundação cruzada; comporta-se como um diplóide funcional com relação às características morfológicas estudadas. As demais espécies, incluindo *Coffea canephora*, são diplóides, com  $2n=2X=22$  cromossomos, e auto-incompatíveis (Charrier e Berthand, 1985).

O melhoramento genético do cafeeiro por meio dos métodos tradicionais é, via de regra, lento, em razão do longo tempo de geração da cultura (em torno de três anos) e da necessidade de vários anos para realização dos testes de campo para avaliações fenotípicas, o que acarreta redução nos ganhos genéticos por unidade de tempo e demora no lançamento de novos cultivares. Assim, torna-se necessária a implementação de técnicas, como a de marcadores de DNA, que possam facilitar e acelerar os processos de seleção e avaliação de genótipos superiores para os caracteres de interesse.

O mapeamento genético constitui uma das aplicações de maior impacto da tecnologia de marcadores moleculares na análise genética e no melhoramento de plantas, uma vez que propicia a geração de informações básicas a respeito da estrutura, organização e evolução do genoma e possibilita o mapeamento de regiões genômicas que controlam caracteres de interesse econômico, a quantificação dos efeitos dessas regiões nos caracteres estudados, a decomposição de caracteres complexos nos seus componentes mendelianos, a clonagem de genes e a reunião de todas essas informações para serem usadas nos programas de melhoramento (Ferreira e Grattapaglia, 1996).

A construção de mapas de ligação em *Coffea arabica* L. tem sido dificultada em razão do baixo nível de polimorfismo (Orozco-Castillo et al., 1994; Lashermes et al., 1996 e 1999) e de complicações advindas da poliploidia (Paillard et al., 1996). No entanto, a construção de mapas de ligação, com boa saturação, e a

identificação de marcadores moleculares associados a fenótipos de interesse para a cafeicultura são de fundamental importância para a implementação de programas de melhoramento genético assistidos por marcadores moleculares, acelerando de forma significativa a obtenção de cultivares de café de *performance* agrônômica superior. Dessa forma, o presente trabalho objetivou desenvolver um mapa parcial de ligação gênica para *Coffea arabica*, com base em marcadores de DNA do tipo RAPD.

## MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho propôs-se a desenvolver um mapa parcial de ligação gênica para *Coffea arabica* L., com base em marcadores RAPD, utilizando-se uma população segregante de 59 plantas RC<sub>1</sub> derivadas do cruzamento entre o Híbrido de Timor - UFV 445-46 (resistente à ferrugem) e o cultivar Catuaí Amarelo - UFV 2143-235 (suscetível à ferrugem), este utilizado como genitor recorrente. O DNA de folhas jovens dos genitores, do híbrido F<sub>1</sub> e das 59 plantas da geração RC<sub>1</sub> foi extraído, segundo protocolo estabelecido por Paillard et al. (1996), introduzindo-se algumas modificações: sem fenol, em proteinase K, com 2,0% (p/v) de PVP-40, com 1,0% (p/v) de bissulfito de sódio e 1,0% (p/v) de carvão ativado. Na etapa de seleção de marcadores polimórficos foram utilizados 680 “primers” de 10 bases da “Operon Technologies” (Kits OPA-OPZ e OPBA-OPBH) para amplificar o DNA dos genitores e do F<sub>1</sub>. Os “primers” que geraram fragmentos polimórficos consistentes entre os genitores, com presença da banda no genitor não-recorrente (Híbrido de Timor) e no F<sub>1</sub> e ausência no genitor recorrente (‘Catuaí Amarelo’), foram utilizados para amplificar o DNA das 59 plantas RC<sub>1</sub> (etapa de genotipagem da população segregante). A amplificação do DNA foi feita em Termociclador modelo Perkin-Elmer 9600, programado para: um ciclo de desnaturação do DNA (95 °C/1 min), 40 ciclos de amplificação (94 °C/15 seg, 35 °C/30 seg e 72 °C/1 min) e um ciclo final de amplificação de 72 °C/7 min. Cada reação de 25 µL foi composta de 25 ng de DNA genômico, 1 U/µL de Taq DNA polimerase, 0,10 mM de cada dNTP, 0,20 µM “primer”, 50,0 mM de KCl, 10,0 mM de Tris-HCl pH 8,3 e 2,0 mM de MgCl<sub>2</sub>, completando-se o volume final com água ultrapura. A separação dos fragmentos amplificados foi realizada em gel de agarose 1,4%, a 80 V, por 4 horas. Em seguida, o gel foi corado com solução de brometo de etídio (10 ng/mL) por 30 min e, logo após, esta solução foi substituída por água destilada, para eliminar o excesso do produto, pelo período de uma hora. O padrão molecular foi visualizado sob luz UV e fotodocumentado. RAPDs foram registrados como presença ou ausência de banda. Para análise dos dados e construção do mapa foi gerada uma matriz a partir dos marcadores RAPD obtidos, atribuindo-se os escores 1 para presença da banda (genótipo heterozigoto), 0 para ausência da banda (genótipo homozigoto recessivo) e 9 para dado perdido. A análise de segregação dos marcadores RAPD foi feita pelo teste de qui-quadrado (<sup>2</sup>). Na construção do

mapa foi utilizado o programa MAPMAKER/EXP v. 3.0 (Lander et al., 1987). A análise de dois pontos foi utilizada para identificar os grupos de ligação, considerando-se a frequência de recombinação máxima de 35,0% e o LOD score mínimo de 4.0. A função de Kosambi (Kosambi, 1944) foi usada para conversão das taxas de recombinação em distâncias de mapa (cM - centiMorgan).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dentre os 680 “primers” utilizados para seleção de marcadores polimórficos entre os genitores, 80 (11,76%) amplificaram bandas específicas presentes no Híbrido de Timor e no  $F_1$ , mas ausentes no ‘Catuaí Amarelo’. Esses “primers” deram origem a 112 marcadores RAPD polimórficos (1,4 marcador por “primer”), dos quais 85 (75,89%) apresentaram segregação na proporção esperada de 1:1 ( $P > 0,05$ ) e 27 (24,11%) mostraram distorção nesta segregação (Tabela 1). Esta taxa de distorção é ligeiramente superior à encontrada por Paillard et al. (1996) em *Coffea canephora*, que foi da magnitude de 20% para marcadores RAPD e de 12% para marcadores AFLP. Em melão, a distorção na segregação de marcadores AFLP em uma população  $RC_1$  foi de 14% para probabilidades mínimas de 5% (Wang et al., 1997).

Dos 27 marcadores RAPD que exibiram distorção na proporção esperada de 1:1 para  $P > 0,05$ , 22 segregaram na proporção de 5:1, quatro na proporção de 3:1 e apenas um marcador (OPBC-17) mostrou segregação na razão de 2:1 pelo teste de qui-quadrado (Tabela 1). Segundo Allard (1971), a segregação 5:1 é típica de herança tetrassômica, quando é cruzado um duplex (AAaa) com um nuliplex (aaaa), como foi o caso da obtenção da população  $RC_1$  em estudo, e ocorre segregação cromossômica ao acaso no processo de formação dos gametas, supondo que o alelo A produza um fenótipo dominante. No caso da proporção de 3:1, o mesmo autor justifica esta segregação como sendo o resultado de segregação cromatídica ao acaso na formação dos gametas, resultante da presença de permuta entre o loco em questão e o centrômero. Outra justificativa para a segregação 3:1 em tetraplóides pode ser atribuída ao pareamento seletivo dos quadrivalentes, resultante de homologia desigual entre os cromossomos (homeólogos), os quais apresentam afinidades diferentes. A proporção de segregação de 2:1 pode ser considerada um desvio da proporção 3:1, que, segundo Wang et al. (1998), pode ser resultado de seleção gametofítica ou da ocorrência de zigotos letais.

Os 85 marcadores que segregaram na proporção esperada de 1:1 foram utilizados para a construção do mapa parcial de ligação. Quinze desses marcadores não se mostraram ligados a nenhum dos grupos de ligação formados, enquanto 70 marcadores RAPD foram distribuídos em nove grupos de ligação, cobrindo 512,2 cM do genoma (Figura 1). Alguns marcadores, dois (OPM-13 e OPP-06b) no grupo 1, quatro (OPY-16, OPF-02, OPA-10 e OPF-15a), dois (OPV-12a e OPBE-04b); e três (OPR-08b, OPN-06 e

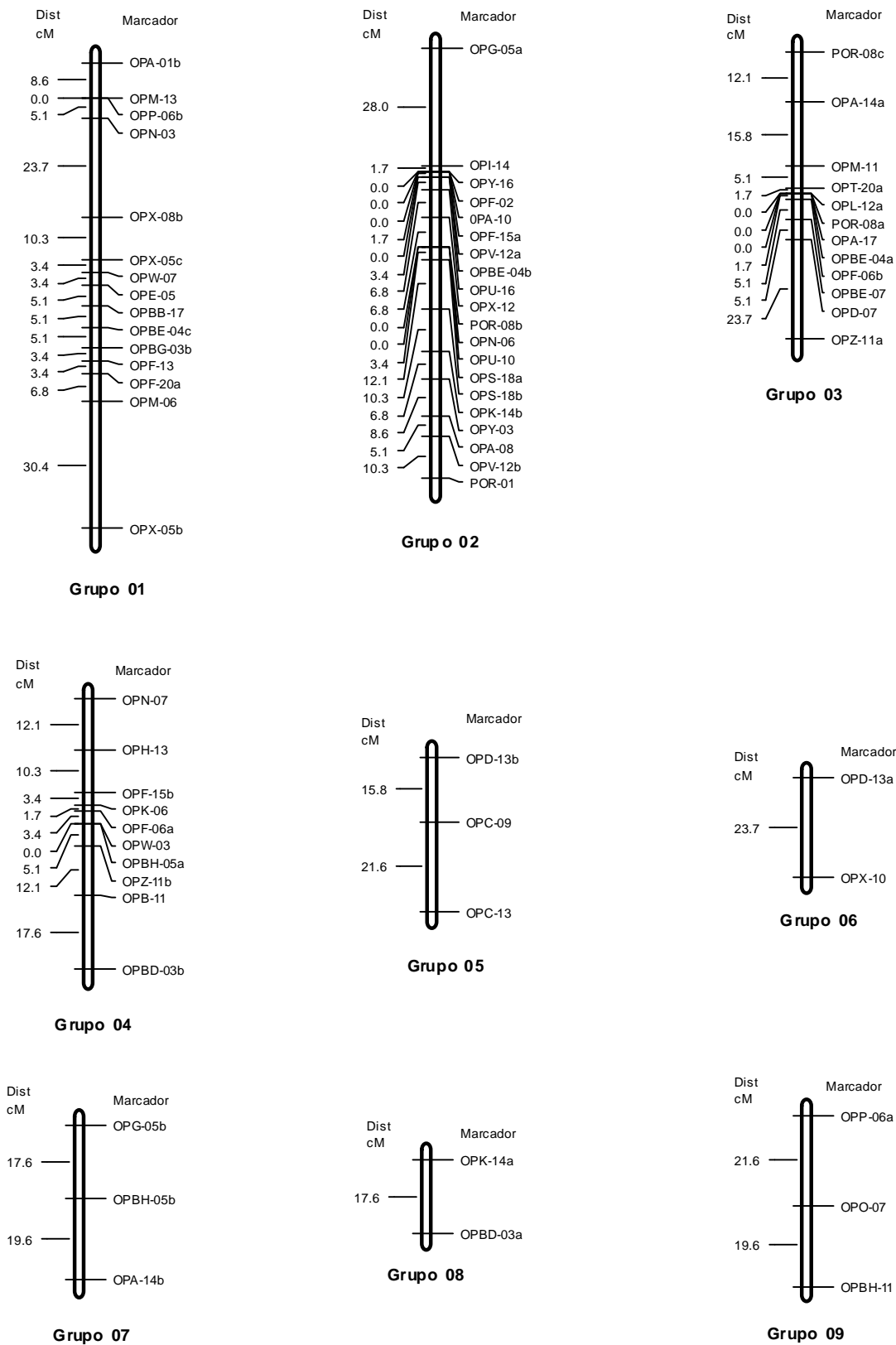
OPU-10) no grupo 2, quatro (OPL-12a, OPR-08a, OPA-17 e OPBE-04a) no grupo 3 e dois (OPW-03 e OPBH-05a) no grupo 4 ocuparam a mesma posição no mapa de ligação (Figura 1). A distância média entre dois marcadores quaisquer, considerando-se todos os grupos de ligação, foi de 14,8 cM, e dentro de cada grupo a distância média entre dois marcadores variou de 8,1 cM (grupo 2) a 23,7 cM (grupo 6). O maior intervalo entre dois marcadores foi de 30,4 cM - marcadores OPM-06 e OPX-05b, no grupo 1. Houve um total de sete intervalos (14%) que excederam a 20 cM.

O tamanho dos grupos de ligação teve alta correlação com o número de marcadores por grupo ( $r=0,95$ ), indicando que houve distribuição aleatória dos marcadores dentro dos grupos. O número de grupos de ligação obtidos foi bastante inferior ao correspondente número haplóide de cromossomos de *Coffea arabica* ( $n=22$ ). Por essa razão, o genoma da espécie foi parcialmente explorado e muitas regiões ainda não foram identificadas. A geração de novos polimorfismos de marcadores RAPD por meio de digestão do DNA genômico com enzimas de restrição e da combinação de “primers” nas reações de PCR e a inclusão de outros marcadores moleculares, principalmente AFLPs e microssatélites, poderão saturar esses intervalos e incluir os marcadores não ligados aos grupos de ligação existentes ou formar novos grupos, melhorando a cobertura do genoma, o que tornará o mapa ainda mais informativo.

**Tabela 1** - Marcadores RAPD originados do genitor Híbrido de Timor segregando nas proporções mendelianas esperadas e respectivos valores de qui-quadrado ( $\chi^2$ ) significativo a  $P > 0,05$ 

| Marcador            | Hipótese | $\chi^2$ | P    | Marcador            | Hipótese | $\chi^2$ | P    |
|---------------------|----------|----------|------|---------------------|----------|----------|------|
| OPA-01b*            | 1:1      | 0.153    | 0.70 | OPBC-19             | 1:1      | 0.017    | 0.90 |
| OPA-10              | 1:1      | 0.424    | 0.52 | OPBD-03a            | 1:1      | 0.153    | 0.70 |
| OPA-17              | 1:1      | 0.153    | 0.70 | OPBD-03b            | 1:1      | 0.153    | 0.70 |
| OPB-11              | 1:1      | 0.017    | 0.90 | OPBE-04a            | 1:1      | 0.153    | 0.70 |
| OPC-15              | 1:1      | 0.424    | 0.52 | OPBE-04b            | 1:1      | 0.153    | 0.70 |
| OPD-03              | 1:1      | 0.017    | 0.90 | OPBE-04c            | 1:1      | 2.051    | 0.15 |
| OPC-13              | 1:1      | 0.017    | 0.90 | OPBE-07             | 1:1      | 0.424    | 0.52 |
| OPD-13 <sup>a</sup> | 1:1      | 0.831    | 0.36 | OPBF-04             | 1:1      | 0.424    | 0.52 |
| OPD-13b             | 1:1      | 3.814    | 0.05 | OPBG-03b            | 1:1      | 2.864    | 0.10 |
| OPD-13d             | 1:1      | 0.017    | 0.90 | OPBH-05a            | 1:1      | 0.017    | 0.90 |
| OPA-08              | 1:1      | 0.831    | 0.36 | OPBH-05b            | 1:1      | 0.153    | 0.70 |
| OPF-02              | 1:1      | 0.424    | 0.52 | OPA-14a             | 1:1      | 0.017    | 0.90 |
| OPF-06a             | 1:1      | 0.017    | 0.90 | OPA-14b             | 1:1      | 0.153    | 0.70 |
| OPF-06b             | 1:1      | 0.017    | 0.90 | OPB-115             | 1:1      | 2.051    | 0.15 |
| OPF-13              | 1:1      | 1.373    | 0.24 | OPD-07              | 1:1      | 1.373    | 0.24 |
| OPF-15a             | 1:1      | 0.424    | 0.52 | OPR-01              | 1:1      | 0.424    | 0.52 |
| OPF-15b             | 1:1      | 0.831    | 0.36 | OPBB-17             | 1:1      | 0.153    | 0.70 |
| OPF-20a             | 1:1      | 2.864    | 0.09 | OPBH-11             | 1:1      | 0.017    | 0.90 |
| OPF-20b             | 1:1      | 0.017    | 0.90 | OPC-09              | 1:1      | 0.017    | 0.90 |
| OPG-05a             | 1:1      | 0.017    | 0.90 | OPL-12 <sup>a</sup> | 1:1      | 0.153    | 0.70 |
| OPG-05b             | 1:1      | 0.017    | 0.90 | OPL-12B             | 1:1      | 0.153    | 0.70 |
| OPH-13              | 1:1      | 0.153    | 0.70 | OPL-12c             | 1:1      | 0.017    | 0.90 |
| OPI-14              | 1:1      | 0.153    | 0.70 | OPN-03              | 1:1      | 0.831    | 0.36 |
| OPI-19              | 1:1      | 0.017    | 0.90 | OPN-07              | 1:1      | 0.017    | 0.90 |
| OPJ-19              | 1:1      | 0.424    | 0.52 | OPE-05              | 1:1      | 0.017    | 0.90 |
| OPK-06              | 1:1      | 0.153    | 0.70 | OPBD-14             | 1:1      | 0.153    | 0.70 |
| OPK-14a             | 1:1      | 0.831    | 0.36 | OPX-05b             | 1:1      | 0.153    | 0.70 |
| OPK-14b             | 1:1      | 0.017    | 0.90 | OPX-05c             | 1:1      | 0.424    | 0.52 |
| OPM-04a             | 1:1      | 0.424    | 0.52 | OPX-08b             | 1:1      | 0.153    | 0.70 |
| OPM-04b             | 1:1      | 2.864    | 0.09 | OPD-13c             | 5:1      | 0.573    | 0.45 |
| OPM-06              | 1:1      | 1.373    | 0.24 | OPE-11              | 5:1      | 0.003    | 0.95 |
| OPM-11              | 1:1      | 0.153    | 0.70 | OPF-10              | 5:1      | 0.166    | 0.68 |
| OPM-13              | 1:1      | 0.017    | 0.90 | OPG-16              | 5:1      | 0.166    | 0.68 |
| OPN-06              | 1:1      | 0.153    | 0.70 | OPI-07              | 5:1      | 0.166    | 0.68 |
| OPO-07              | 1:1      | 0.017    | 0.90 | OPI-15              | 5:1      | 0.166    | 0.68 |
| OPP-06a             | 1:1      | 3.814    | 0.05 | OPK-12              | 5:1      | 0.166    | 0.68 |
| OPP-06b             | 1:1      | 0.017    | 0.90 | OPN-20              | 5:1      | 0.166    | 0.68 |
| OPR-08a             | 1:1      | 0.153    | 0.70 | OPO-13              | 5:1      | 0.003    | 0.95 |
| OPR-08b             | 1:1      | 0.017    | 0.90 | OPP-01              | 5:1      | 0.085    | 0.77 |
| OPR-08c             | 1:1      | 0.153    | 0.70 | OPQ-13              | 5:1      | 0.166    | 0.68 |
| OPS-18a             | 1:1      | 0.017    | 0.90 | OPQ-19              | 5:1      | 0.573    | 0.45 |
| OPS-18b             | 1:1      | 0.424    | 0.52 | OPT-20b             | 5:1      | 0.003    | 0.95 |
| OPT-20a             | 1:1      | 0.017    | 0.90 | OPU-18              | 5:1      | 0.003    | 0.95 |
| OPU-10              | 1:1      | 0.153    | 0.70 | OPW-19              | 5:1      | 0.003    | 0.95 |
| OPU-16              | 1:1      | 0.017    | 0.90 | OPZ-12              | 5:1      | 0.003    | 0.95 |
| OPV-12a             | 1:1      | 0.153    | 0.70 | OPBD-03c            | 5:1      | 0.003    | 0.95 |
| OPV-12b             | 1:1      | 0.424    | 0.52 | OPBD-03d            | 5:1      | 0.573    | 0.45 |
| OPW-03              | 1:1      | 0.017    | 0.90 | OPBE-16             | 5:1      | 0.003    | 0.95 |
| OPW-07              | 1:1      | 0.017    | 0.90 | OPBG-03a            | 5:1      | 0.166    | 0.68 |
| OPX-10              | 1:1      | 0.153    | 0.70 | OPBC-15             | 5:1      | 0.166    | 0.68 |
| OPX-12              | 1:1      | 0.831    | 0.36 | OPX-08a             | 5:1      | 0.003    | 0.95 |
| OPX-16              | 1:1      | 0.153    | 0.70 | OPA-01a             | 3:1      | 0.277    | 0.60 |
| OPY-03              | 1:1      | 0.424    | 0.52 | OPX-05a             | 3:1      | 0.277    | 0.60 |
| OPY-16              | 1:1      | 0.153    | 0.70 | OPX-08c             | 3:1      | 0.051    | 0.82 |
| OPZ-11a             | 1:1      | 0.424    | 0.52 | OPP-06c             | 3:1      | 0.458    | 0.50 |
| OPZ-11b             | 1:1      | 0.424    | 0.52 | OPBC-17             | 2:1      | 0.212    | 0.65 |

\*Primers com mais de uma banda polimórfica foram identificados com as letras a, b, c e d.



**Figura 1** - Mapa parcial de ligação gênica de *Coffea arabica* L. com base em marcadores RAPD, construído com LOD score mínimo de 4.0 e frequência máxima de recombinação de 0,35, convertida em distância de mapa em centiMorgan (cM) pela função de Kosambi.

## CONCLUSÕES

A população segregante utilizada no presente trabalho apresenta bom nível de marcadores RAPD polimórficos, possibilitando a construção de um mapa parcial de ligação gênica com os grupos apresentando boa densidade de marcadores.

É prudente salientar que os esforços na obtenção de mapas de ligação em uma espécie de indubitável importância econômica para o Brasil e o mundo, como é *Coffea arabica* L., devem ser contínuos, até que se atinja um estágio em que o seu genoma esteja suficientemente saturado, para que os benefícios desse conhecimento sejam efetivamente proveitosos para os propósitos do melhoramento da espécie.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLARD, R.W. **Princípios do melhoramento genético de plantas**. São Paulo: Edgard Blücher, 1971. 381p.
- CHARRIER, A.; BERTHAND, J. Botanical classification of coffee. In: Clifford, M.N.; Wilson, K.C. (eds.). **Coffee: botany, biochemistry and production of beans and beverage**. New York: Croom Helm, 1985. p.13-47.
- FERREIRA, M.E.; Grattapaglia, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3<sup>a</sup> ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220p.
- KOSAMBI, D.D. The estimation of maps distance from recombination values. **Ann. Eugen.**, v.12, p.172-175, 1944.
- LANDER, E.S.; GREEN, P.; ABRAHANSON, J.; BRALOW, A.; DALY, M.J.; LINCOLN, S.E.; NEWBURG, L. MAPMAKER: an interactive computer package for construction primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. **Genomics**, v.1, p.174-181, 1987.
- LASHERMES, P.; COMBES, M.C.; ROBERT, J.; TROUSLOT, P.; D'HOUT, A.; ANTONY, F.; CHARRIER, A. Molecular characterization and origin of the *Coffea arabica* L. genome. **Mol. Gen. Genet.**, v.261, p.259-266, 1999.
- LASHERMES, P.; TROUSLOT, P.; ANTONY, F.; COMBES, M.C.; CHARRIER, A. Genetic diversity for RAPD markers between cultivated and wild accessions of *Coffea arabica*. **Euphytica**, v.87, p.59-64, 1996.
- OROZCO-CASTILLO, C.; CHALMERS, K.J.; WAUGH, R.; POWEL, W. Detection of genetic diversity and selective gene introgression in coffee using RAPD markers. **Theor. Appl. Genet.**, v.87, p.934-940, 1994.
- PAILLARD, M.; LASHERMES, P.; PÉTIARD, V. Construction of a molecular linkage map in coffee. **Theor. Appl. Genet.**, v.93, p.41-47, 1996.



WANG, D.; KARLE, R.; BRETTIN, T.S.; LEZZONI, A.F.; Genetic linkage map in sour cherry using RFLP markers. **Theor. Appl. Genet.**, v.97, p.1217-1224, 1998.

WANG, Y.H.; THOMAS, C.E.; DEAN, R.A. A genetic map of melon (*Cucumis melo* L.) based on amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers. **Theor. Appl. Genet.**, v.95, p.791-798, 1997.