

DETECÇÃO DE POLIMORFISMO DE ÚNICA BASE (SNPs) PELAS TÉCNICAS DE PCR-RFLP E ARMS-PCR NO CAFÉ¹

Luciana Pasqualini Schincariol², Paula Yuri Yamamoto³, Carlos Augusto Colombo⁴

¹Trabalho financiado pelo Finep e Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café

²Mestranda, IAC, Campinas-SP, lucianaschincariol85@gmail.com

³Doutoranda, CENA-ESALQ, Piracicaba-SP, paulayamamoto@gmail.com

⁴Pesquisador, Dr, IAC, Campinas-SP, ccolombo@iac.sp.gov.br

RESUMO: O desenvolvimento de mapas genéticos é uma das aplicações de maior impacto da tecnologia de marcadores moleculares quando o interesse é a localização de genes que controlam características de importância econômica, como produção de grãos, qualidade, altura de planta, teor de proteína, resistência a doenças, etc. Elas resultam da ação cumulativa de um conjunto de genes e tais características são denominadas poligênicas e os locos que as controlam chamados de QTL. Apesar da sua importância econômica de destaque, há poucos estudos de mapas genéticos associados a marcadores moleculares no cafeeiro. O crescente interesse sobre a qualidade de bebida no café estimula a utilização de marcadores moleculares para utilização em práticas de seleção assistida. Uma classe importante de marcadores moleculares consiste no polimorfismo de nucleotídeo único (SNPs e INDELS) derivado de diferenças em um único par de bases na sequência do DNA de indivíduos de uma mesma espécie. Como constituem as formas mais abundantes de variações do genoma, os SNPs podem fornecer uma fonte para saturação de mapas genéticos, aumentando sua precisão. Assim, o presente estudo teve por finalidade detectar e validar marcadores do tipo SNPs derivados de genes envolvidos com qualidade de bebida em café para fins de mapeamento.

Palavras-chave: SNP, qualidade de bebida, mapeamento genético e *Coffea arabica*

POLYMORPHISM DETECTION OF SINGLE BASE (SNPs) THROUGH THE TECHNIQUES OF PCR-RFLP AND ARMS-PCR IN COFFEE

ABSTRACT: The development of genetic maps is an application with the greatest impact of the technology of molecular markers when the interest is the location of genes controlling economically important traits, such as yield, quality, plant height, protein content, disease resistance, etc. They result from the cumulative action of a set of genes and these are called polygenic traits and the loci that control called QTL. Despite its economic importance, there are few studies of genetic maps associated with molecular markers in coffee. The growing interest about the quality of drinking coffee promotes the use of molecular markers for use in assisted selection practices. An important class of molecular markers consisting of single nucleotide polymorphisms (SNPs and INDELS) derived from differences in a single base pair in the DNA sequence of individuals from the same species. As they are the most abundant forms of genome variation, SNPs may provide a source for saturation of genetic maps, increasing its accuracy. Thus, this study aimed to identify and validate markers like SNPs derived from genes involved in coffee-beverage quality for mapping purposes.

Key words: SNP, beverage quality, genetic mapping and *Coffea arabica*

INTRODUÇÃO

Os mapas genéticos são considerados ferramentas de grande impacto para estudos de herança e de manipulação de germoplasma. Um mapa genético é uma maneira de observar a segregação de genes e mostrar a relação física entre eles. Destaca-se por auxiliar na fundamentação de estudos comparativos e de evolução, no entendimento dos processos biológicos e organização cromossômica e, quando saturado, proporciona simplificação na manipulação genética (EMBRAPA, 2006). Uma importante aplicação dos mapas genéticos é a localização de genes que controlam características de importância econômica, como produção de grãos, qualidade, altura da planta, teor de proteína, etc, que resultam da ação cumulativa de um conjunto de genes. Essas características são denominadas poligênicas, quantitativas ou de herança complexa, e os locos que as controlam são chamados de QTL's (TANKSLEY, 1993). Normalmente são encontrados estudos de mapas genéticos utilizando as regiões intergênicas do DNA. De acordo com Cato *et al.* (2001), há algumas vantagens para o uso de seqüências expressas (ESTs) ao invés de seqüências anônimas de DNA como marcadores genéticos para a construção de mapas genéticos. Quando o marcador EST está geneticamente associado com a característica de interesse é possível que o gene mapeado afete diretamente a característica e se apresenta homologia a genes candidatos ou esteja diferencialmente expresso no tecido de interesse, pode ser utilizado em mapeamento genético. Desta forma, os ESTs têm sido utilizados como fonte de marcadores moleculares para mapeamento em plantas (SCOTT *et al.*, 2000; da SILVA *et al.*, 2001; da SILVA, 2001).

Poucos estudos de mapas genéticos associados a marcadores moleculares foram realizados no cafeeiro. Paillard *et al.* (1996) construíram um mapa de ligação na espécie *Coffea canephora* ($2n=22$) a partir de uma população de duplo-haplóides obtida artificialmente por Couturon (1982). Ky *et al.* (2000) apresentaram um mapa de ligação baseado em marcadores AFLP e RFLP, a partir de um cruzamento interespecífico entre espécies silvestres do gênero *Coffea pseudozanguebarie* ($2n=2x=22$) e *Coffea liberica dewerei* ($2n=2x=22$). Lashermes *et al.* (2001) incluíram marcadores microssatélites no mapa de ligação da população de duplo-haplóides de *C. canephora*, encontrando resultados mais satisfatórios na associação destes locos e identificação de gametas masculinos e femininos. Em *Coffea arabica*, Teixeira-Cabral *et al.* (2004) mapearam 93 loci RAPD em uma população RC1 proveniente do cruzamento entre a cultivar Mundo Novo e o Híbrido de Timor CIFIC 2570, sendo este último utilizado como genitor recorrente. Pearl *et al.* (2004) construíram um mapa genético de ligação de uma população pseudo- F2 de cruzamentos das cultivares Mokka e Catimor utilizando a técnica de AFLP.

O crescente interesse sobre a qualidade de bebida no café estimula a utilização de marcadores moleculares para utilização em práticas de seleção assistida. Uma classe importante de marcadores moleculares consiste nos polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs e INDELS) que são diferenças de um único par de bases na seqüência do DNA entre membros individuais de uma mesma espécie. Os SNPs surgem por mutação e são herdados como variantes alélicas, podendo ou não gerar diferenças fenotípicas (HAYASHI *et al.*, 2004). Como constituem as formas mais abundantes de variações do genoma, os SNPs podem fornecer uma fonte para saturação de mapas genéticos, aumentando sua precisão, podem ser utilizados também na análise e caracterização de recursos genéticos, possibilitando um melhor gerenciamento dos mesmos para o melhoramento vegetal, e atuam como ferramentas para seleção assistida por marcadores (RAFALSKI, 2002). Portanto, o presente trabalho teve por objetivo obter marcadores SNPs de genes relacionados com a qualidade da bebida através da análise do banco de seqüências do genoma café para fins de mapeamento genético.

MATERIAL E MÉTODOS

A população para fins de genotipagem por marcadores SNPs é constituída por 90 plantas F2 mantidas na Estação Experimental de Mococa do IAC. O cruzamento original partiu de plantas existentes de *C. arabica* cv Bourbon Vermelho (P1), de *C. canephora* cv Robusta 4n (P2,1330) e do híbrido tetraplóide entre ambas (F1, H2460-10-1). O parental P1 é halotetraplóide ($2n=4x=44$), enquanto o parental P2, originalmente é diplóide ($2n=2x=22$) e teve seu número de cromossomos duplicado antes de ser usado como doador no cruzamento. O parental P2 possui forte barreira de fertilidade e sempre foi utilizado como progenitor masculino.

A busca de seqüências gênicas iniciou-se por aquelas depositadas no banco de ESTs do projeto Genoma Café. A prospeção foi realizada na base de dados utilizando os termos para genes ligados a qualidade de bebida.

Tetra-primer (ARMS-PCR): Para a detecção *in silico* dos SNPs foi utilizado o *software* CODONCODE ALIGNER v. 3.5.7 (CodonCode Corporation), onde as seqüências de *C. arabica* e *C. canephora* foram alinhadas e comparadas, assim, permitindo a localização destes. O desenho dos *primers* para amplificação dos genes que codificam Ácido Clorogênico (CQT), Invertase (CWI), Açúcar (INVAC), Fenilalanina (PAL) e Sacarose Sintase (SUSY 1 e SUSY2) foi realizado com bases nas seqüências analisadas contendo SNP de cada um dos genitores. O aplicativo *web* utilizado foi o Tetra-primer (ARMS-PCR) - http://cedar.genetics.soton.ac.uk/public_html/primer1.html - desenvolvido especialmente para esse tipo de técnica.

O método *Tetra-primer Amplification Refractory Mutation System* (ARMS - PCR) (YE *et al.*, 2001) consiste em uma reação onde se emprega quatro *primers* para amplificar um fragmento longo de DNA usado como controle da reação, e até outros dois fragmentos, cada um representando um alelo determinado pelo SNP. Os *primers* que amplificam o fragmento maior são denominados *primers* externos (Fe e Re, para os *primers forward* e *reverse*, respectivamente), enquanto os *primers* alelo-específico são denominados *primers* internos (Fi e Ri, para os *primers forward* e *reverse*, respectivamente). Para aumentar a especificidade da reação, é introduzida uma base não-complementar na penúltima posição da extremidade 3' de cada um dos dois iniciadores alelo-específico.

Os amplificadores gerados foram analisados em gel de agarose (2%) e a genotipagem ocorreu na forma de presença ou ausência (1 e 0) de fragmentos, permitindo a geração de uma matriz de dados cujas análises estatísticas serão usadas, posteriormente, para o mapeamento desses genes na população-mapa de referência.

PCR-RFLP: Foram desenvolvidas atividades de análise *in silico* desses genes e obtido o perfil de polimorfismos de restrição nos genitores da população mapa (arábica e conilon), bem como no híbrido F1. Foram desenhados *primers* no aplicativo *web* PRIMER3 (ROZEN; SKALETSKY, 2000) para amplificação de genes que codificam para Cisteína Proteinase, Aspártico e β -Fructosidase/Invertase (CWI), Sacarose Fosfato Sintase (SPS) e Sacarose Sintase (SUSY). Os amplificadores gerados por PCR de amplificação específica nos genitores, híbrido F1 e na população F2 foram digeridos por enzimas de restrição (*Alu* I, *Dde* I, *Eco* RI, *Hae* III, *Mse* I, *Msp* I, *Fnu* DII, *Taq* I e *Scr* FI) e o produto analisado em gel de agarose (1,2%). Os indivíduos foram genotipados da mesma forma que no método anterior.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em relação aos genes candidatos identificados no banco de ESTs do genoma café e com provável influência na qualidade de bebida foram identificados e analisados 28 genes com relação direta com a qualidade de bebida em café e destes, 8 apresentaram polimorfismo genético para fins de mapeamento.

Tetra-primer (ARMS-PCR): A procura por SNPs candidatos nas sequências dos fragmentos obtidos por meio da identificação no banco de ESTs foi estabelecida pelo *software* CODONCODE ALIGNER, que possibilitou a análise concomitante das sequências igualmente alinhadas base a base. Através desta análise foi possível desenhar quartetos de primers – Tetra-primers (ARMS-PCR) - para 6 genes (tabela 1) do total de 26 analisados.

Tabela 1 – Sequências dos Tetra-primers desenhados, posições dos polimorfismos e tamanhos esperados para cada alelo (AE, em pb) para genotipagem de SNPs em *Coffea*.

GENE	PRIMERS	SEQUENCIAS (5' - 3')	ALELO	POSICÃO SNP	AE (pb)
CQT	CQT1 - Fi	TGCAAAAAGAAATCCACCAC	C	1169	Fi+Re (alelo C): 202
	CQT1 - Ri	TATCCATTCTTGCCAAGTCA	T		Fe+Ri (alelo T): 297
	CQT1 - Fe	CACCTGAACAACCTTAGCCAG			Fe+Re (controle): 460
	CQT1 - Re	ATATGAATAGGCTGCCCCA			
	CQT2 - Fi	CATGCCACTCTTCCACAG	G	1468	Fi+Re (alelo G): 219
	CQT2 - Ri	CTCAGAAAATCGTACAGGACCT	A		Fe+Ri (alelo A): 294
	CQT2 - Fe	ACTTAAGATCAGCCCTGGAT			Fe+Re (controle): 474
	CQT2 - Re	CTCTGGCCATGATAAAGAAA			
	CQT3 - Fi	CATCTCTGCACCTTCACTACTA	A	2773	Fi+Re (alelo A): 159
	CQT3 - Ri	AGCTATGCTGACCAAGGC	G		Fe+Ri (alelo G): 109
	CQT3 - Fe	GGTAACTCGTTCAAGTGIG			Fe+Re (controle): 229
	CQT3 - Re	ATCTGATTTTAGTTGAGGGG			
CWI	CW11 - Fi	CTCCAGAGAAACAAAAGCA	A	541	Fi+Re (alelo A): 181
	CW11 - Ri	TCTCTGAATGAGCTTGACTC	G		Fe+Ri (alelo G): 269
	CW11 - Fe	TTAATCAACTGGAACCCCTC			Fe+Re (controle): 412
	CW11 - Re	GTATTGAATACAGTGGGTC			
	CW12 - Fi	CGCGATTGGAAACATAGGI	T	857	Fi+Re (alelo T): 169
	CW12 - Ri	GAAAACATCCTTGGAAATTCG	C		Fe+Ri (alelo C): 251
	CW12 - Fe	GTCGAGGAAAGCACTTCTG			Fe+Re (controle): 382
	CW12 - Re	AATGACTCGTTGATCCAAAC			
INVAC	INVAC1 - Fi	TGACAAGAAGACTGGAACACAC	C	1365	Fi+Re (alelo C): 179
	INVAC1 - Ri	ACCGGCCATTGAAGTCTA	T		Fe+Ri (alelo T): 253
	INVAC1 - Fe	CGAATAACAATAAGTGGACCC			Fe+Re (controle): 392
	INVAC1 - Re	TGCCTCACTATCCACTTCAA			
PAL	PAL1 - Fi	CAACGGGACCGAAACTTG	G	670	Fi+Re (alelo G): 210
	PAL1 - Ri	CGAGTGGAGCAATGTGTGACG	C		Fe+Ri (alelo C): 231
	PAL1 - Fe	GTAAAGGTGGAGCTGTCCGA			Fe+Re (controle): 403
	PAL1 - Re	TGTAGGAGAGCGGAACCAAA			
SUSY1	SUSY1.1 - Fi	CTGATGAGAACCCTTGCA	A	505	Fi+Re (alelo A): 185
	SUSY1.1 - Ri	TGGTAATACAAGTCAACGAC	G		Fe+Ri (alelo G): 252
	SUSY1.1 - Fe	TTGTGGTGTCTTACAGG			Fe+Re (controle): 399
	SUSY1.1 - Re	AACGAAATAGCAATGTCAGC			
SUSY2	SUSY2.1 - Fi	CAATACAAGGCAAGCCG	G	238	Fi+Re (alelo G): 196
	SUSY2.1 - Ri	GATCCTGTGCTTAAGCATCCTT	A		Fe+Ri (alelo A): 235
	SUSY2.1 - Fe	AAGAACTCGTTGATGGAAGCA			Fe+Re (controle): 391
	SUSY2.1 - Re	CATTTCGAAGACACGCTCAG			
	SUSY2.2 - Fi	GCCAGGATTAACAGAGTTTG	G	1192	Fi+Re (alelo G): 181
	SUSY2.2 - Ri	CAAAAACATCAATGCCAGGT	A		Fe+Ri (alelo A): 260
	SUSY2.2 - Fe	AACACAGTGTACCATTGCTCA			Fe+Re (controle): 399
	SUSY2.2 - Re	AGGTGTTCCCAATCTCCAC			

Através do perfil de amplificação dos genitores e do híbrido F1 (figura 1), os conjuntos de quatro primers foram amplificados na população mapa para geração de uma matriz de dados.

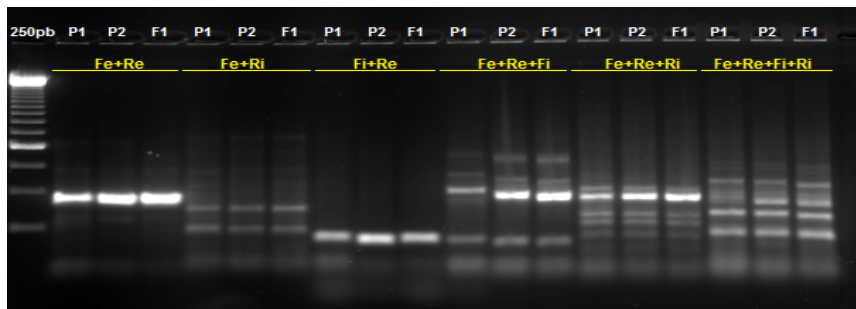


Figura 1 – Perfil de amplificação do quarteto de *primers* para SUSY2.2 nos genitores e híbrido F1, sendo o *ladder* de 250 pb e as 6 combinações entre os *primers* externos (Fe e Re) e internos (Fi e Ri). Tamanhos dos amplificados: Fe+Re – 400pb; Fe+Ri – 250pb; Fi+Re – 200pb; Fe+Re+Fi – 400pb e 200pb; Fe+Re+Ri – 400pb e 250pb e Fe+Re+Fi+Ri – 400pb, 250pb e 200pb

A partir da matriz de dados gerada pela genotipagem dos fragmentos foi realizado um teste de qui-quadrado (χ^2), através do *software* R 2.13.0 (IHAKA & GENTLEMAN, 1996) para saber se os marcadores gerados apresentaram segregação na proporção esperada (3:1). A partir deste cálculo foi fornecido o *p-value* (valor p) que consiste na significância do resultado. O nível de significância adotado foi de 5% (0,05). Portanto, aqueles que obtiveram valores de *p-value* abaixo de 0,05 obedeceram a proporção esperada. Dos 20 marcadores obtidos, 15 (75%) apresentaram resultados satisfatórios (tabela 2).

Tabela 2 – Valores do cálculo qui-quadrado e *p-value* gerados a partir das análises das freqüências esperadas e observadas pelo *software* R 2.13.0

Gene	Alelo	Qui-quadrado (χ^2)	p-value
CQT1	Fi+Re (alelo C)	10.9635	0.0009293
	Fe+Ri (alelo T)	14.8356	0.0001173
CQT2	Fi+Re (alelo G)	8.4429	0,003665
	Fe+Ri (alelo A)	9.2466	0,002359
CQT3	Fi+Re (alelo A)	2.0137	0,1559*
	Fe+Ri (alelo G)	9.2466	0,002359
CW11	Fi+Re (alelo A)	0.2237	0,6362*
	Fe+Ri (alelo G)	16.9909	3.756e-05
CW12	Fi+Re (alelo T)	12.8265	0,0003417
	Fe+Ri (alelo C)	3.8402	0,05004*
INVAC	Fi+Re (alelo C)	2.0137	0,1559*
	Fe+Ri (alelo T)	12.8265	0,003417
PAL	Fi+Re (alelo G)	14.8356	0,0001173
	Fe+Ri (alelo C)	0.7717	0,3797*
SUSY1	Fi+Re (alelo A)	21.7397	3.123e-06
	Fe+Ri (alelo G)	8.4429	0,003665
SUSY2.1	Fi+Re (alelo G)	21.7397	3.123e-06
	Fe+Ri (alelo A)	21.7397	3.123e-06
SUSY2.2	Fi+Re (alelo G)	21.7397	3.123e-06
	Fe+Ri (alelo A)	21.7397	3.123e-06

*valores acima do nível de significância 5% (0,05)

PCR-RFLP: A busca de polimorfismo dentro dos genes de proteases (cisteínas e aspártico) e açúcares (CWI, SUSY e SPS) foi feita a partir da digestão dos amplificdos dos genes gerados com cinco a oito enzimas de restrição, tanto nos genitores como no híbrido F1. As combinações gene amplificado-enzima que revelaram sítios polimórficos com pelo menos uma delas em cada loco (figura 2) foram adotadas para genotipagem da população mapa (figura 3).

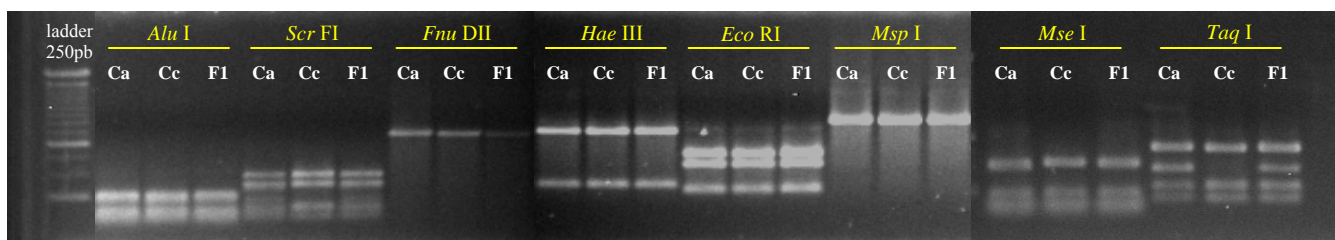


Figura 2 – Enzimas usadas para buscar polimorfismo no gene que codifica sacarose fosfato sintase (SPS). Enzima que apresenta polimorfismo: *Taq I* (400 pb)

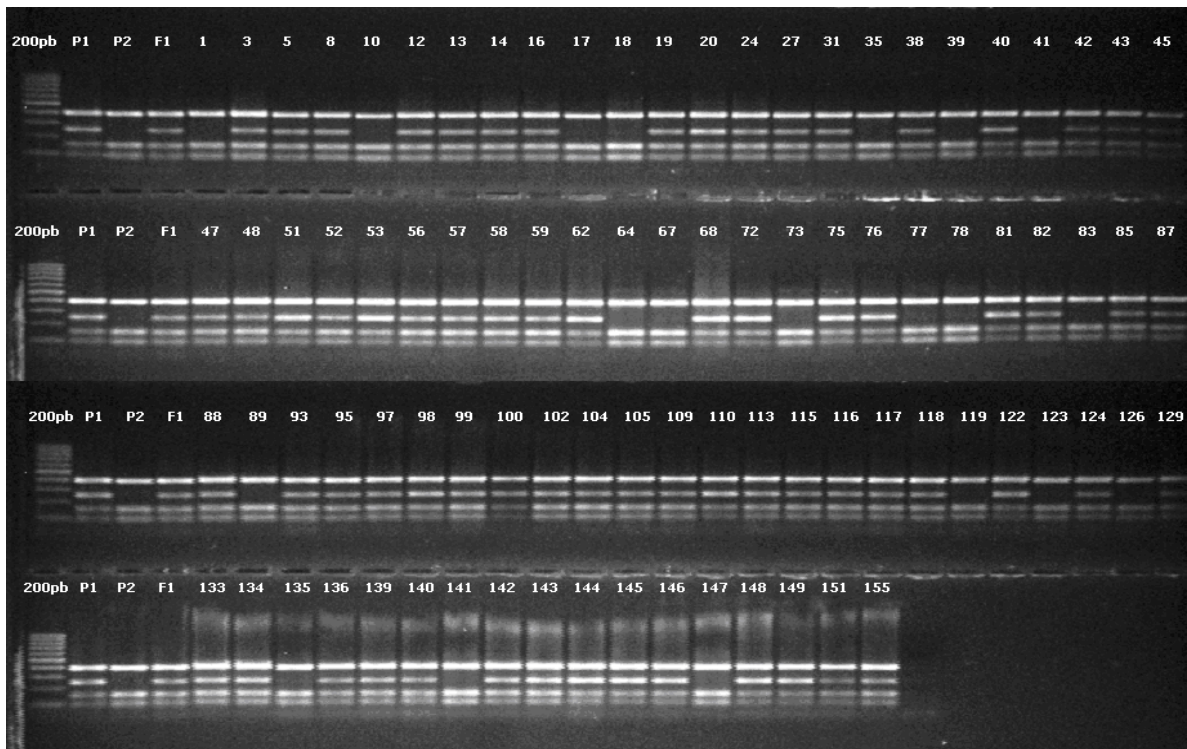


Figura 3 - Mapa de restrição para o gene que codifica sacarose fosfato sintase (SPS) digerido pela enzima *Taq* I. Fragmento polimórfico: 400 pb.

A partir da matriz de dados gerada pela genotipagem dos fragmentos digeridos (mapa de restrição), foi realizado o teste de qui-quadrado para saber se os marcadores gerados pela restrição apresentaram segregação na proporção esperada. Dos 8 marcadores obtidos, 5 (62,5%) obedeceram a esta proporção (tabela 3).

Tabela 3 – Genes de proteases e açúcares, enzimas de restrição usadas para obtenção de polimorfismo para a genotipagem da população mapa, tamanho dos fragmentos polimórficos e suas segregações.

	Genes	Enzimas testadas	Genotipagem	Fragmentos polimórficos	Segregação
Proteases	Cisteína 5	<i>Alu</i> I, <i>Dde</i> I, <i>Eco</i> RI, <i>Hae</i> III, <i>Mse</i> I e <i>Msp</i> I	<i>Mse</i> I	300 pb	(3:1)
	Cisteína 8	<i>Alu</i> I, <i>Dde</i> I, <i>Eco</i> RI, <i>Hae</i> III, <i>Mse</i> I e <i>Msp</i> I	<i>Hae</i> III	750 e 1000 pb	(9:1)* e (3:1)
	Cisteína 22	<i>Alu</i> I, <i>Dde</i> I, <i>Eco</i> RI, <i>Hae</i> III, <i>Mse</i> I e <i>Msp</i> I	<i>Msp</i> I	600 ou 1750 pb	(9:1)*
	Aspártico	<i>Fnu</i> DII, <i>Hae</i> III, <i>Eco</i> RI, <i>Msp</i> I e <i>Taq</i> I	<i>Msp</i> I	3000 pb	(9:1)*
Açúcares	CW1 c4	<i>Alu</i> I, <i>Scr</i> FI, <i>Fnu</i> DII, <i>Hae</i> III, <i>Eco</i> RI e <i>Msp</i> I	<i>Msp</i> I	600 pb	(3:1)
	SUSY c6	<i>Alu</i> I, <i>Scr</i> FI, <i>Fnu</i> DII, <i>Hae</i> III, <i>Eco</i> RI, <i>Msp</i> I, <i>Mse</i> I e <i>Taq</i> I	<i>Taq</i> I	400 pb	(3:1)
	SPS c2	<i>Alu</i> I, <i>Scr</i> FI, <i>Fnu</i> DII, <i>Hae</i> III, <i>Eco</i> RI, <i>Msp</i> I, <i>Mse</i> I e <i>Taq</i> I	<i>Msp</i> I	500 pb	(3:1)

*marcadores que não atingiram a segregação esperada para genotipagem (3:1)

As técnicas usadas permitiram a obtenção de 20 marcadores SNPs (15 ARMS-PCR e 5 PCR-RFLP) que apresentaram polimorfismos e que tiveram segregação dentro da proporção esperada. A partir dos dados gerados por esses marcadores será possível adicionar novas marcas no mapa de ligação dessa população, assim, tendo uma maior informação genética e estrutural.

CONCLUSÕES

As metodologias de PCR-RFLP e ARMS-PCR são estratégias que apresentaram resultados satisfatórios para a detecção de polimorfismos de única base (SNPs) de genes relacionados com a qualidade de bebida do café e com grande potencial para mapeamento genético em café.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CATO, S.A.; GARDNER, R.C.; KENT, J.; RICHARDSON, T.E. A rapid PCR-based method for genetically mapping ESTs. *Theoretical and Applied Genetics*, 102: 296-306,

2001.

COUTURON, E.; LASHERMES, P.; CHARRIER, A. Double haploids of *Coffea canephora*: development, fertility and agronomic characteristics. **Euphytica**, 74: 149-157, 1994.

DA SILVA, J.A.G. Preliminary analysis of microsatellite markers derived from sugarcane expressed sequence tags (ESTs). **Genetics And Molecular Biology**, 24 (1-4): 155-159, 2001.

DA SILVA, J.A.G.; ULIAN, E. and BARSALOBRES, C.F., Development of EST-derived RFLP markers for sugarcane breeding. **Proc. Int. Soc. Sugar Cane Technol.**, 24: 318-322, 2001.

EMBRAPA. Documento 170: Mapeamento Genético de Caracteres Quantitativos e sua Interação com o Ambiente. 2006.

HAYASHI, K., HASHIMOTO, N., DAIGEN, M., ASHIKAWA, I. Development of PCR-based SNP markers for rice blast resistance genes at the Piz locus. **Theor Appl Genet.** 108(7):1212-20, 2004.

IHAKA R & GENTLEMAN R. R: A Language for Data Analysis and Graphics. **Journal of Computational and Graphical Statistics**, 5 (3): 299-314, 1996.

KY, C. L., P. BARRE, M. LORIEUX, P. TROUSLOT, S. AKAFFOU *et al.* Interspecific genetic linkage map, segregation distortion and genetic conversion in coffee (*Coffea* sp.). **Theor. Appl. Genet.**, 101: 669–676, 2000.

LASHERMES, P. COMBES, M. C.; PRAKASB, 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 meioses. **NCR Research Press Website**. Julho, 2001.

PEARL, H.M., NAGAI, C., MOORE, P.H., STEIGER, D.L., OSGOOD, R.V., MING, R. Construction of a genetic map for arabica coffee. **Theor Appl Genet**, 108: 829-835, 2004.

PFLIEGER, S.; LEFEBVRE, V.; CAUSSE, M. The candidate gene approach in plant genetics: a review. **Molecular Breeding**, 7: 275-291, 2001.

PILLARD, M.; LASHERMES, P. PÉTRAID, V. Construction of molecular linkage map in coffee. **Theor Appl Genet.**, 93: 41-47, 1996.

RAFALSKI, A., MORGANTE, M. Corn and humans: recombination and linkage disequilibrium in two genomes of similar size. **Trends Genet.**, 20: 103–111, 2004.

TEIXEIRA-CABRAL, T.A., SAKIYAMA, N.S., ZAMBOLIM, L., PEREIRA, A.A., SCHUSTER, I. Single-locus inheritance and partial linkage map of *Coffea arabica* L. **Crop Breed Appl Biotec**, 4:416-421, 2004.

ROZEN, S.; SKALETSKY, H.J. *Primer3*: pick primers from a DNA sequence. 2000. Disponível em: <<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/input.htm>>.

SCOTT, K.D.; EGGLER, P.; SEATON, G.; et al. Analysis of SSRs derived from grape ESTs. **Theoretical And Applied Genetics**, 100 (5): 723-726, 2000.

TANKSLEY, S.D. Mapping polygenes. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v.27, p.205-233, 1993.

YE, S.; DHILLON, S.; KE, X.; COLLINS, A.R.; DAY, I.N.M. An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms. **Nucleic Acids Research**, v.29, n.17, 2001.