

CONSTRUCCIÓN DE UN MAPA GENÉTICO PRELIMINAR DE YERBA MATE (*ILEX PARAGUARIENSIS*)

Construction of a preliminary genetic linkage map of yerba mate (Ilex paraguariensis)

STEIN J¹; LUNA C²; ESPASANDIN F²; SARTOR M²; ESPINOZA F²;
ORTIZ JPA^{1,2}; SANSBERRO P²; PESSINO SC¹

¹Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Rosario
Parque Villarino, S2125ZAA, Zavalla, Argentina
jstein@unr.edu.ar,

²Instituto de Botánica del Nordeste (IBONE-CONICET), Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Nordeste
Sargento Cabral 2131, 3400 Corrientes, Argentina.

Resumen

Las hojas de la yerba mate se utilizan para la preparación del mate, una infusión de profunda raigambre histórica, social y cultural en Sudamérica. Su cultivo reviste importancia estratégica para varios países de la región, especialmente Argentina, Brasil y Paraguay. Nuestro objetivo fue establecer una población segregante y construir un mapa de ligamiento genético preliminar de esta especie para facilitar la futura identificación de loci asociados con caracteres de interés agronómico. Dos genotipos genéticamente divergentes con comportamiento contrastante respecto a la tolerancia a sequía se seleccionaron como progenitores femenino y masculino. Mediante cruzamientos controlados y rescate de embriones, se estableció una población F₁ tipo "pseudo-test cross" de 700 individuos, con potencial para extenderse hasta 1900. Un subgrupo de 117 plantas fue empleado para construir un mapa genético marco. Se ensayaron 5 combinaciones de cebadores de AFLP y 16 cebadores de RAPDs, para generar 119 marcadores informativos, de los cuales el 68,9% se ajustó a los valores de segregación mendeliana esperados. El análisis de ligamiento se realizó con el programa JoinMap 3.0. Los marcadores originados en cada progenitor se analizaron independientemente para generar un mapa femenino formado por 11 grupos de ligamiento y otro masculino con 16 grupos. Las distancias genéticas cubiertas por los mismos fueron de 223 cM y 678 cM, respectivamente. Este trabajo permitió establecer una progenie de mapeo segregante para yerba mate y construir un mapa genético preliminar que podrá usarse como base para la futura identificación de marcadores ligados a genes de interés agronómico.

Palabras clave: mapeo genético-marcadores moleculares-mejoramiento vegetal

Introducción

Ilex paraguariensis Saint Hilaire, conocida vulgarmente como yerba mate, es una especie dioica, diploide ($2n = 2x = 40$) y arbórea subtropical, cuyo hábitat natural lo constituye el sotobosque (Andrés & Saura, 1945; Eibl et al., 2000). Crece espontáneamente en el sur de Brasil, nordeste de Argentina y este de Paraguay (Giberti, 1997; Coelho et al., 2002), y es cultivada vía sistemas de agroforestación en el nordeste de Argentina, el sudeste de Brasil y todo el Paraguay. Sus hojas son utilizadas para preparar la infusión conocida como mate, una bebida amplia-

Summary

The "yerba mate" leaves are used to make an infusion named "mate tea", which is deeply rooted in the historical, social and cultural tradition of South America. Its sustainable use is of strategic significance to several countries of this region, particularly Argentina, Brazil and Paraguay. Our objective was to establish a segregating population and build a framework genetic map, in order to contribute to the future identification of loci associated with desirable traits. Two genetically divergent genotypes with contrasting drought tolerance capacity were selected as female and male parents. A "pseudo-test cross" F₁ population of 700 individuals, with potential to be extended to 1900 individuals, was produced after controlled crossing followed by embryo rescue. A subset of 117 plants was used to produce a framework genetic map. Five AFLP primer combinations and 16 RAPD primers generated 119 informative markers, out of which 68.9% showed the expected Mendelian segregation values. Linkage analyses were carried out by using Joinmap 3.0. Markers originated from each progenitor were independently evaluated to generate a female map including 11 linkage groups and a male one with 16 linkage groups. Total genetic distances covered by the female and male maps were 223 cM and 678 cM, respectively. This work allowed the establishment of a yerba mate segregating population and the construction of a preliminary genetic map, which will be used as a framework for the future identification of markers linked to genes of interest.

Keywords: genetic mapping- molecular markers-plant breeding

mente consumida en Sudamérica, que está siendo introducida rápidamente en el mercado mundial para consumo directo o como ingrediente en alimentos formulados/suplementos dietarios (Heck & de Mejía, 2007).

La República Argentina, favorecida por sus condiciones agroclimáticas, es el principal productor mundial de yerba mate. Sus plantaciones se concentran en las provincias de Misiones (88,9%) y Corrientes (11,1%), donde se registran 202.736,33 ha

cultivadas (<http://www.inym.org.ar>). Por su parte, Brasil y Paraguay poseen 85.000 y 35.000 ha implantadas, respectivamente (Gortari, 2007). Las plantaciones de yerba mate presentan una marcada heterogeneidad genotípica. La mayor parte de los individuos contribuyen con un bajo porcentaje al rendimiento, siendo éste aportado de manera principal por un 35% de los mismos (Belingheri, 2003). La causa del bajo rendimiento de una proporción significativa de los individuos en las plantaciones es la susceptibilidad al estrés hídrico (Sansberro et al., 2004), ya que *I. paraguariensis* crece naturalmente en la selva protegida bajo la sombra de *Araucaria angustifolia*, un hábitat donde predominan las condiciones de baja densidad de flujo de fotones y alta humedad. Se han reportado estudios fisiológicos sobre esta especie y su habilidad de adaptarse a nuevos ambientes como campos de cultivo, en particular respecto al aumento en la irradiación de luz solar y el incremento resultante de la demanda de agua por evapotranspiración (Sansberro et al., 2004).

Dada la riqueza de su composición química, la yerba mate ha despertado el interés de los sectores dedicados a la salud humana, habiendo sido objeto de variados estudios que revelaron la acción terapéutica de los numerosos compuestos contenidos en sus extractos, que podrían contribuir al desarrollo de nuevos mercados farmacéuticos de origen vegetal. La población sudamericana ha estado usando esta infusión por centurias con fines sociales y medicinales (Heck & de Mejía, 2007). El alto contenido de flavonoides determina sus propiedades antioxidantes (Dudonné et al., 2009), asociándose su consumo a un retraso de los síntomas de envejecimiento (Lunceford & Gugliucci, 2005; Miranda et al., 2008). También se le ha atribuido la prevención de algunas formas de cáncer (Gonzalez de Mejía et al., 2005), un efecto cardioprotector (Menini et al., 2007) y una reducción de la progresión de la aterosclerosis (Schinella et al., 2005; Mosimann et al., 2006). Se ha reportado que el consumo de cafeína contenida en esta infusión reviste acciones farmacológicas con efectos beneficiosos para el sistema nervioso central, el sistema cardiovascular y la homeostasis del calcio (De María & Moreira,

2007). Por otra parte se describió un efecto estimulante de la actividad mental, ya que disminuye el estado de fatiga y aumenta la cognición (Choi et al., 2005; Azevedo Cortés Efig, 2008). Finalmente, se ha determinado que presenta cierta actividad antimicrobiana (Prado Martín et al., 2013).

La investigación sobre este cultivo se enfocó principalmente en su fisiología, su uso, química, actividad biológica y efectos sobre la salud, como así también en sus potencialidades para proveer compuestos relevantes a la industria nutracéutica (Heck & de Mejía, 2007). En contraste con las extensivas caracterizaciones bioquímicas y fisiológicas, los análisis de genética molecular sobre los cultivares actuales de yerba mate orientados a asistir al mejoramiento de la especie son escasos. Entre ellos se destacan: a) un estudio de las especies del género *Ilex* en Sudamérica basado en huellas genéticas usando marcadores moleculares de AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) (Gottlieb et al., 2005); b) un relevamiento genómico de ejemplares femeninos y masculinos por RDA (Representational Difference Analysis), que tuvo como objetivo investigar la ocurrencia de variaciones genómicas relacionadas con el sexo y desarrollar un método de detección temprana de plantas masculinas y femeninas (Gottlieb & Poggio, 2010); y c) estudios transcriptómicos que revelaron una correlación entre la expresión de una variante genética de la enzima succinato deshidrogenasa, la intensidad del estrés hídrico y los niveles de actividad de ABA endógeno en genotipos de yerba mate tolerantes a sequía (Acevedo et al., 2013).

El trabajo que presentamos aquí tuvo como objetivo desarrollar una progenie de mapeo adecuada para localizar genes asociados a caracteres de interés agronómico en yerba mate (tales como el sexo y la tolerancia a estrés hídrico) y comprobar la utilidad de diferentes tipos de marcadores moleculares en la construcción de un mapa preliminar de ligamiento genético de la especie. Dicho mapa podrá ser ampliado en el futuro, y constituir un punto de partida en el desarrollo de herramientas moleculares para el mejoramiento.

Materiales y Métodos

Selección del material vegetal

El criterio de selección de los genotipos parentales se basó en las siguientes premisas: 1) que mostrasen características contrastantes respecto al grado de tolerancia a sequía, lo cual resulta útil para mapear genes mayores ligados a ese carácter cuantitativo en trabajos posteriores; 2) que presentasen un nivel de polimorfismo genético aceptable para facilitar la construcción del mapa.

Se evaluaron eco-fisiológicamente durante tres ciclos anuales de crecimiento en un huerto clonal 10 genotipos masculinos y femeninos que integran parte de la colección viva de yerba mate mantenida en el IBONE, utilizando ensayos de déficit hídrico según la metodología indicada en Acevedo et al. (2013). Los 10 cultivares utilizados constituyen líneas comerciales cedidas gentilmente por el establecimiento Las Marías S.A. para la realización de este estudio. A partir de esta primera evaluación se seleccionaron los genotipos SI-67 (femenino, susceptible a estrés hídrico) y SI-49 (masculino, tolerante a estrés hídrico).

Luego se evaluó la distancia genética entre ambos genotipos mediante AFLP (Vos et al., 1995), para estimar si permitía la generación de un número apreciable de marcadores segregantes. Los datos de presencia/ausencia de marcadores para cada planta y sus duplicados fueron volcados en una matriz binaria, que fue procesada con el programa NTSyS para generar estimaciones de similitud utilizando el coeficiente J (Jaccard, 1908).

Obtención de la población segregante

La población de mapeo fue generada a partir del cruzamiento dirigido entre los genotipos SI-67 (femenino) y SI-49 (masculino). Aproximadamente 90 días luego del cruzamiento, los embriones inmaduros en estado de corazón fueron extraídos de los frutos y cultivados siguiendo el protocolo desarrollado por Sansberro et al. (1998). Al cabo de 30 días de incubación, los embriones alcanzaron el estado de plántulas, con una estructura bipolar y con los meristemas apical y radicular visibles. En ese momento fueron transferidos a biorreactores de inmersión temporal para estimular su crecimiento. Se llevaron 700 plántulas al estadio de 4 hojas verdaderas y se las traspasó a la etapa de rusticación. Además se almacenaron 1200 semillas que permitirían extender la población de mapeo a 1900 individuos.

Extracción de ADN genómico

La extracción de ADN genómico se realizó a partir de brotes de hojas, utilizando el método descripto por Permingeat et al. (1998) para cultivos con un alto contenido de polifenoles, con las modificaciones que se describen a continuación. Se homogeneizaron de forma manual 50 mg del tejido en tubos Eppendorf de 1,5 ml conteniendo nitrógeno líquido, hasta obtener un polvo fino. Se adicionó 1 ml de buffer de extracción (Tris HCl 100 mM pH 8, EDTA 20 mM, NaCl 1,4M, CTAB 2%, Glucosa 0,5 M) precalentado a 75°C, se mezcló por inversión e incubó durante 2 h a 75°C, agitando cada 30 min. Las preparaciones se enfriaron

hasta temperatura ambiente y centrifugaron a 10.000 rpm por 10 min. Setecientos (700) μ l del sobrenadante se trasvasaron a un tubo limpio. Se realizó una extracción de proteínas con 1 volumen de cloroformo, agitando hasta formar una emulsión. Se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente. Se tomaron 600 μ l de la fase superior acuosa y se los trasvasó a un nuevo tubo Eppendorf de 1,5 ml. Se repitió la extracción con cloroformo. Se tomaron 500 μ l de la fase acuosa y se precipitó el ADN adicionando 1 volumen de isopropanol a 4 °C. Luego se almacenó la muestra durante 12 hs a -20°C. Se centrifugó a 10.000 rpm durante 20 min a temperatura ambiente, se lavó el precipitado con 1 ml de etanol 70% v/v, se descartó el sobrenadante y se dejó secar 1 h en estufa a 37°C. Las muestras se resuspendieron en 100 μ l de TE (Tris HCl 100 mM pH 8; EDTA 1 mM), y se mantuvieron 1 h a temperatura ambiente con agitación. Se agregó 1 μ l de ARNasa A (4 mg/ml) y se incubó durante 45 min a 37°C. Se precipitó el ADN agregando dos volúmenes de etanol absoluto a 4°C, en presencia de 5% v/v de NaCl 5 M, y se almacenó 12 h a -20°C. Finalmente, las muestras se centrifugaron a 12.000 rpm durante 20 min a temperatura ambiente, se lavaron con 0,4 ml de etanol 70% v/v, se descartaron los sobrenadante y se dejaron secar 1 h en estufa a 37°C. Se resuspendieron en 50 μ l de agua destilada estéril y se incubaron 1 h a temperatura ambiente con agitación.

Marcadores moleculares

La generación de marcadores de AFLP (Vos et al., 1995) se llevó a cabo de acuerdo a lo descrito por Stein et al. (2007), empleando las enzimas *EcoRI* y *MseI*. La pre-amplificación y la amplificación específica de las muestras se realizaron con cebadores que poseían una y tres base(s) selectiva(s), respectivamente. Los cebadores fueron diseñados según el protocolo de KeyGene (AFLP Protocol for Public Release, Version 2.0, Netherlands, 1994) y sintetizados por IDT (Integrated DNA Technologies, Iowa, USA). Los marcadores de RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) (Williams et al., 1991) se generaron según lo descrito por Martínez et al. (2003), con las siguientes modificaciones: las reacciones de amplificación se realizaron en un volumen final de 10 μ l, conteniendo 10 ng de ADN, 12 ng de cebador, solución reguladora de GoTaq 1X (Promega, Madison, Wisconsin, USA), dNTPs 200 mM y GoTaq Polimerasa 0,6 U (Promega). Para ambos tipos de marcadores, los productos de amplificación se resolvieron en geles de poliacrilamida al 5% que fueron teñidos con nitrato de plata. Los geles se secaron y las imágenes fueron detectadas con un escáner. Las bandas fueron registradas manualmente, y marcadas sobre el vidrio del gel previo a un segundo escaneado. En los ensayos de determinación de variabilidad entre los progenitores todas las muestras se procesaron por duplicado. En los experimentos de mapeo las muestras correspondientes a los progenitores se procesaron por duplicado, pero las F_1 se amplificaron una sola vez, ya que las tasas de error inherentes al genotipado fueron consideradas aceptables (ver Resultados). Dichas tasas se estimaron según lo recomendado por Bonin et al. (2004), como el número de polimorfismos entre los duplicados dividido por el número total de fragmentos registrados. La proporción de polimorfismos entre los duplicados y el

intervalo de confianza al 95% de dicha proporción fue calculada según el método de Newcombe (1998), incluyendo una corrección por continuidad.

Registro y clasificación de los marcadores moleculares y estrategia de mapeo genético

Debido a que la yerba mate es una especie dioica y los genotipos progenitores empleados en la creación de la población de mapeo presentan un alto número de *loci* en heterocigosis, la población F_1 obtenida a partir del cruzamiento entre SI-67 y SI-49 fue considerada como un cuasi cruzamiento de prueba ("pseudo-test cross"). Este tipo de poblaciones pueden contener *loci* con configuraciones alélicas variadas y por lo tanto mostrar diferentes tipos de segregación. Por ejemplo, los *loci* pueden segregarse desde el progenitor femenino (Aa x aa), desde el progenitor masculino (aa x Aa) o desde ambos progenitores (Aa x Aa). Las relaciones de segregación esperadas son 1:1 para los marcadores parentales (Aa x aa o aa x Aa) y 3:1 o 1:2:1 para los biparentales (Aa x Aa), en caso de marcadores dominantes o codominantes, respectivamente. Para el caso del presente trabajo, los marcadores empleados fueron de tipo dominante, por lo tanto los marcadores biparentales presentaban segregación 3:1. Los datos de segregación derivados de las meiosis femenina y masculina fueron analizados por separado siguiendo la metodología descrita en Ortiz et al. (2001). Brevemente, se confeccionaron dos archivos con los datos genotípicos de los 117 individuos de la población de mapeo. Uno de los archivos contenía solamente los datos de los marcadores segregantes a partir del progenitor femenino (marcadores maternos) y el otro los que segregaron a partir del progenitor masculino (marcadores paternos). Aquellos marcadores segregantes a partir de ambos progenitores fueron considerados como puentes alélicos e incluidos en ambos archivos de datos (Ritter et al., 1990). Los valores de segregación de cada marcador fueron examinados mediante una prueba de ajuste de Chi-cuadrado ($p < 0,01$) contra los valores esperados para una segregación 1:1 (marcadores parentales) o 3:1 (marcadores biparentales). Aquellos marcadores que mostraron desviaciones mayores al valor p establecido fueron considerados como distorsionados. La determinación de los grupos de segregación y el ordenamiento de los marcadores en los grupos de ligamiento fueron realizados utilizando el programa JoinMap 3.0 (Van Ooijen et al., 2003). El desarrollo del mapa atravesó las etapas descriptas a continuación: a) se corroboró el ajuste de los marcadores a los valores esperados, b) se realizó un análisis de ligamiento de dos puntos y se determinaron los grupos de cosegregación (ligamiento) a valores de LOD score entre 1,0–6,0 y un $r_{\max} = 0,45$; c) una vez establecidos los grupos de cosegregación se ordenaron los marcadores dentro de cada grupo a un valor de LOD = 0,5 y se estimaron las distancias en unidades centimorgan (cM) usando la función de mapeo de Kosambi (1944); d) se agregaron los marcadores con segregación distorsionada de acuerdo a su asociación a los marcadores de los grupos establecidos anteriormente, solo cuando no causaran una distorsión en el grupo preexistente, y se incluyeron a los grupos de ligamiento a un valor mínimo de LOD = 0,5.

Resultados

Análisis de similitud genética de los genotipos parentales y establecimiento de la población de mapeo

Los genotipos parentales SI-67 (femenino, susceptible a estrés hídrico) y SI-49 (masculino, tolerante a estrés hídrico) fueron analizados mediante la utilización de marcadores de AFLP a fin de determinar su nivel de divergencia genética. Se ensayaron 13 combinaciones de cebadores, por duplicado. Como todos los marcadores se registraron por duplicado, y todos fueron mono-

mórficos entre ambos duplicados, en este caso la tasa de error inherente al genotipado se consideró como 0,0%, según lo recomienda Bonin et al. (2004). De las combinaciones usadas, 9 mostraron un patrón de amplificación claro y reproducible, generando un total de 427 marcadores, de los cuales 86 (20,14%) resultaron polimórficos entre ambos genotipos (Tabla 1). En un análisis de agrupamiento, la similitud genética entre ambos individuos fue de 0,8. El nivel de polimorfismo observado fue

considerado suficiente para iniciar el establecimiento de una población de mapeo segregante a partir del cruzamiento entre ambos, utilizando la metodología descrita en Materiales y Métodos.

Generación de marcadores moleculares de AFLP y RAPD

Previo al inicio de los experimentos de mapeo con AFLP, se calculó la tasa de error inherente al genotipado con esta técnica, según lo recomendado por Bonin et al. (2004). El cálculo se realizó sobre un total de 292 marcadores, y la proporción de marcadores polimórficos entre duplicados resultó ser de 0,0068 (intervalo de confianza de 95%: $0,0012 < p < 0,0272$). En base a estos cálculos, la tasa de error se estimó como $< 2,72\%$, lo que se consideró aceptable, ya que se trata de valores muy similares a los reportados por Bonin et al. (2004). Ciento diecisiete plantas F_1 fueron seleccionadas al azar a fin de constituir la población de mapeo. Inicialmente se ensayaron 5 combinaciones de cebadores de AFLP (e35m44, e41m38, e40m40, e34m41 y e41m44). Solo tres de estas combinaciones (e35m44, e41m38 y e40m40) generaron patrones reproducibles de amplificación en un número considerable de individuos de la población. En total fueron obtenidas 21 bandas segregantes (Tabla 2).

También se ensayaron marcadores de RAPD (Williams et al. 1991), por ser versátiles, económicos y de implementación sencilla. En primer lugar se estimó la tasa de error inherente al genotipado por RAPD, según lo recomendado por Bonin et al. (2004). Los RAPDs pueden presentar una tasa baja de reproducibilidad si se utilizan en condiciones poco controladas (Agarwal et al., 2008), por lo que el protocolo de trabajo se estandarizó cuidadosamente. La proporción de marcadores polimórficos entre los duplicados fue estimada para los individuos parentales. Se calculó sobre un total de 695 marcadores, y resultó ser de 0,0029 (intervalo de confianza de 95%: $0,0005 < p < 0,0116$). En base a estos cálculos, la tasa de error resultó $< 1,16\%$. Se consideró que esta tasa de error era aceptable, y que la técnica resultaba apropiada para el mapeo. Se ensayaron sobre los progenitores un total de 55 cebadores de la serie BC300 (University of British-Columbia's Nucleic Acid-Protein Service). Once (11) de ellos mostraron patrones muy tenues o inespecíficos (304, 305, 310, 314, 315, 324, 330, 343, 347, 348, 349). Quince (15) no

generaron amplificaciones (306, 307, 309, 311, 316, 321, 323, 325, 332, 334, 339, 346, 350, 351, 356). Treinta (30) mostraron buenos patrones de amplificación, produciendo 542 marcadores (con un promedio de 18,6 marcadores por cebador), de los cuales 123 (22,7%) resultaron polimórficos entre los genotipos parentales. Dieciséis (16) de los oligonucleótidos que amplificaron eficientemente fueron además aceptablemente polimórficos (301, 302, 303, 308, 312, 313, 320, 327, 333, 336, 337, 340, 341, 342, 344 y 345), por lo que se los utilizó para los experimentos de mapeo genético sobre el ADN de los 117 individuos de la población. Resta aún mapear los otros 14 cebadores que también mostraron buena amplificación (317, 318, 326, 328, 329, 331, 335, 337, 338, 352, 353, 354, 355, 357). En total se contaron 98 marcadores de RAPD informativos (Tabla 2).

El total de bandas segregantes registradas a partir de los experimentos de AFLP y RAPD fue de 119 (Tabla 2). Ejemplos de las amplificaciones con cebadores de AFLP y RAPD generadas a partir de la población de yerba mate se muestran en la Figura 1.

Análisis de ligamiento genético

Los datos de segregación fueron volcados en dos matrices binarias, una correspondiente a los marcadores originados en el progenitor femenino, y otra en el progenitor masculino. En total, el archivo materno contó con 57 marcadores y el paterno con 76. La Tabla 2 muestra un resumen de los datos de todos los marcadores generados en la población.

El análisis de ligamiento fue realizado en una primera etapa utilizando solamente aquellos marcadores que mostraron relaciones de segregación que ajustaban a los valores esperados de 1:1 (parentales) y 3:1 (biparentales). Luego de la construcción de estos grupos de ligamiento, se adicionaron los marcadores presentando desviaciones, cuyo valor p fue mayor al establecido. De los 41 marcadores parentales derivados de SI-67, 29 (70,7%) segregaron de acuerdo al modelo esperado para alelos simples (1:1), 6 mostraron segregación distorsionada y otros 6 resultaron no segregantes (Tabla 2). En el caso del progenitor SI-49, del total de 56 marcadores registrados, 36 (64,2%) ajustaron al valor 1:1, 18 resultaron distorsionados y 2 fueron no segregantes (Tabla 2).

Tabla 1: Marcadores de AFLP obtenidos para cada combinación de cebadores ensayada sobre el ADN genómico de los genotipos candidatos SI-49 y SI-67.

Combinación de cebadores ^a	Número de marcadores	Marcadores polimórficos	
		Total	%
e39m42	52	8	15,4
e34m36	43	7	16,3
e36m37	37	11	29,7
e37m44	22	6	27,2
e32m32	17	5	29,4
e33m32	81	12	14,8
e33m42	73	14	19,2
e32m44	59	14	23,7
e41m36	43	9	20,9

^a Cebadores: e32: 5'-GACTGCGTACCAATTCAAC-3'; e33: 5'-GACTGCGTACCAATTCAAG-3'; e34: 5'-GACTGCGTACCAATTCAAT-3'; e36: 5'-GACTGCGTACCAATTCAAC-3'; e37: 5'-GACTGCGTACCAATTCA CG-3'; e39: 5'-GACTGCGTACCAATTCAAG-3'; e41: 5'-GACTGCGTACCAATTCAAG-3'; m32: 5'-GATGAGTCTGAGTAAAC-3'; m36: 5'-GATGAGTCTGAGTAAAC-3'; m37: 5'-GATGAGTCTGAGTAAACG-3'; m42: 5'-GATGAGTCTGAGTAAAGT-3'; m44: 5'-GATGAGTCTGAGTAAATC-3'

En el mapa del progenitor femenino (SI-67), se asociaron 30 marcadores formando 11 grupos de ligamiento de al menos 2 marcadores cada uno. Veintisiete marcadores permanecieron sin asociarse. En 9 de los 11 grupos fue posible ordenar los marcadores al valor mínimo de LOD de 0,5 (Figura 2). En los grupos F1, F2, F7 y F9, algunos marcadores no pudieron ser localizados en una única posición. Los grupos F10 y F11, constituidos por los marcadores MR337a-MR341c y M3544b-X4138h, no se muestran, porque si bien el programa logró agrupar a estos marcadores en dos grupos de ligamiento diferentes, los datos disponibles hasta el momento no fueron suficientes para determinar la distancia exacta entre los mismos. El mapa parcial obtenido para el progenitor femenino cubrió una distancia total de 223 cM, con una distancia promedio entre marcadores de 7,43 cM.

En el mapa del progenitor masculino (SI-49), se asociaron 46 marcadores formando 16 grupos de 2 o más marcadores. Quince marcadores permanecieron sin unirse. Cuarenta y dos marcadores fueron localizados en 14 grupos de ligamiento, mientras que 4 marcadores pertenecientes a dos grupos diferentes no pudieron ordenarse a los valores de LOD establecidos. El mapa paterno cubrió una distancia total de 678 cM, con una distancia promedio entre marcadores de 14,74 cM (Figura 2). Al igual que en el caso del mapa materno, los grupos M15 y M16, constituidos por los marcadores PR308e-P4138f y PR345b-XR342e no se muestran, porque no se pudo estimar la distancia exacta entre los *loci*.

Discusión

La utilización de herramientas moleculares y el conocimiento de la estructura del genoma pueden hacer grandes aportes al mejoramiento de las especies cultivadas como la yerba mate, que presentan un gran porte, una larga fase juvenil, y una frecuencia considerable de *loci* en heterocigosis. En el caso particular de *I. paraguariensis*, sería especialmente deseable contar con marcadores moleculares ligados al sexo para poder desarrollar un método rápido de detección temprana de genotipos masculinos y femeninos. Esto eliminaría la necesidad de esperar a la primera floración, que en los ejemplares obtenidos a partir de semillas se produce luego de 5 años de cultivo. Asimismo, sería muy conveniente disponer de marcadores ligados a genes mayores que determinen tolerancia a estrés hídrico, para lograr seleccionar de manera anticipada aquellos genotipos con buenas posibilidades de comportamiento a campo durante los programas clásicos de mejoramiento.

En este trabajo se informa el establecimiento de una progenie de mapeo del tipo F₁ “pseudo-test cross”, el ensayo y análisis de la segregación de un grupo de marcadores moleculares y la construcción de un mapa genético preliminar de *I. paraguariensis*. Este último proporcionará la base para la futura localización de marcadores asociados a caracteres de interés agronómico en la especie. Aunque nuestro objetivo se limitó a desarrollar una metodología básica para la construcción de un mapa preliminar de uso general, las mismas matrices de mapeo presentadas aquí pueden completarse y utilizarse para localizar genes mayores. Por ejemplo, podrían identificarse *loci* que determinen caracteres de importancia agronómica como el sexo y la tolerancia a estrés hídrico, dado que la progenie establecida es segregante para estos caracteres. La detección del sexo todavía no pudo realizarse en esta población en particular, ya que al tratarse de plantas jóvenes aún no han florecido por primera vez. Sin embargo, esperamos que en un futuro próximo se incorporen estos datos a la matriz. Asimismo, actualmente se están iniciando las evaluaciones de tolerancia a estrés hídrico sobre las plantas de la población.

Los marcadores de RAPD han sido utilizados para la construcción de mapas de alta densidad en numerosas especies de plantas, como alfalfa (Kiss et al. 1993), haba (Torress et al., 1993), manzano (Hemmat et al., 1994), yute (Haque et al., 2008) y lenteja (Gupta et al., 2012). El análisis por medio de RAPDs en combinación con la utilización de líneas cuasi isogénicas (NILs: near-isogenic lines) ha permitido la identificación de genes de resistencia a enfermedades en tomate (Martin et al., 1991), lechuga (Paran et al., 1991) y poroto (Adam-Blondon et al., 1994), así como también la identificación de marcadores ligados al carácter juvenil en soja (Cairo et al., 2002). Sin embargo, se ha descrito que esta técnica presenta una menor reproducibilidad respecto a otras metodologías de obtención de marcadores moleculares, por lo que se recomienda utilizar condiciones de trabajo cuidadosamente estandarizadas y estimar la tasa de error del genotipado (Agarwal et al., 2008; Bonin et al., 2004). Los estudios realizados en este trabajo demostraron una tasa de error aceptable (< 1,16%) y una muy buena reproducibilidad en amplificaciones independientes de ADN de yerba. La comparación de los perfiles de amplificación entre duplicados y repeticiones experimentales fueron consistentes en todos los ensayos realizados.

Los análisis de segregación de los marcadores de AFLP y RAPD confirmaron que existe un número considerable de *loci* en hete-

rocigosis en los genotipos parentales. La mayor parte de los marcadores segregaron de acuerdo al modelo de alelos en dosis simple y solo una pequeña proporción (6,72%) correspondió al estado homocigota (no segregantes). Esta característica simplificó notablemente la estrategia de mapeo genético, debido a que resultó relativamente simple detectar *loci* segregantes que pudieran emplearse en los análisis de ligamiento. Asimismo, la mayor parte de los marcadores (68,90%) segregó de acuerdo con los valores esperados, aunque un porcentaje considerable mostró una segregación distorsionada (24,36%). Lo anteriormente mencionado podría deberse a alguna condición de viabilidad gamética y/o post-cigótica que no fue analizada en este trabajo.

Como era de esperar, el mapa del genotipo SI-49, utilizado como progenitor masculino, presentó un mayor número de grupos de ligamiento (16 grupos) y mejor cobertura genómica comparado con el mapa de SI-67 (11 grupos). Esto se debe a que para la construcción del mapa de ligamiento en las poblaciones de tipo “pseudo-test cross” se analizan las meiosis femenina y masculina por separado. Es un hecho ampliamente conocido que la meiosis masculina presenta mayor número de quiasmas, y habitualmente los mapas generados a partir de marcadores originados en el progenitor masculino presentan una cobertura mayor (Stein et al., 2004).

Sobre la base del mapeo de los marcadores del tipo biparental, fue posible hacer algunas inferencias preliminares con respecto a la existencia de grupos homólogos en ambos genotipos. Los grupos F2 y M2 comparten los marcadores puentes alélicos XR333b y XR345h, aunque solo en el progenitor masculino se pudieron mapear ambos marcadores en una única posición. De la misma manera los grupos F7 y M5 comparten a XR337d y XR337e. Los grupos F5-M9 y F8-M11 resultaron compuestos solo por marcadores puentes alélicos en ambos mapas. Los grupos F4 y M12 compartieron al marcador X4040f. Estos resultados indican que hasta el momento se han identificado 4 grupos de ligamiento homólogos (F2/M2; F7/M5; F5/M9 y F8/M11) entre los genotipos SI-67 y SI-49 y posiblemente haya uno más (formado por los grupos F4/M12). Este último caso debería confirmarse con la presencia de un segundo marcador de tipo puente alélico. La futura saturación del mapa con un mayor número de marcadores permitirá realizar una integración más completa. Asimismo, permitirá aumentar los valores de LOD utilizados para establecer el orden de los marcadores dentro de los grupos. En este mapa preliminar se ha utilizado un valor de LOD bajo (0,5), lo que introduce una alta incertidumbre en la asignación de esos marcadores a localizaciones genéticas específicas.

Considerando que *I. paraguariensis* es una especie diploide con un número básico de cromosomas $x = 20$, se espera que los mapas femenino y masculino, una vez saturados, cuenten con 20 grupos de ligamiento cada uno. Con los datos disponibles hasta el momento se pudieron detectar 11 grupos en el genotipo femenino y 16 en el masculino. Debe continuarse el mapeo para poder completar los 20 grupos. Aunque estos resultados son preliminares, los grupos de ligamiento desarrollados representan el primer mapa genético marco de *I. paraguariensis*. La continuación del desarrollo de marcadores permitirá definir inequívocamente el orden de los mismos y detectar los grupos faltantes.

Tabla 2: Número de marcadores correspondientes a los diferentes tipos de segregación observadas para los marcadores maternos, paternos y puentes alélicos

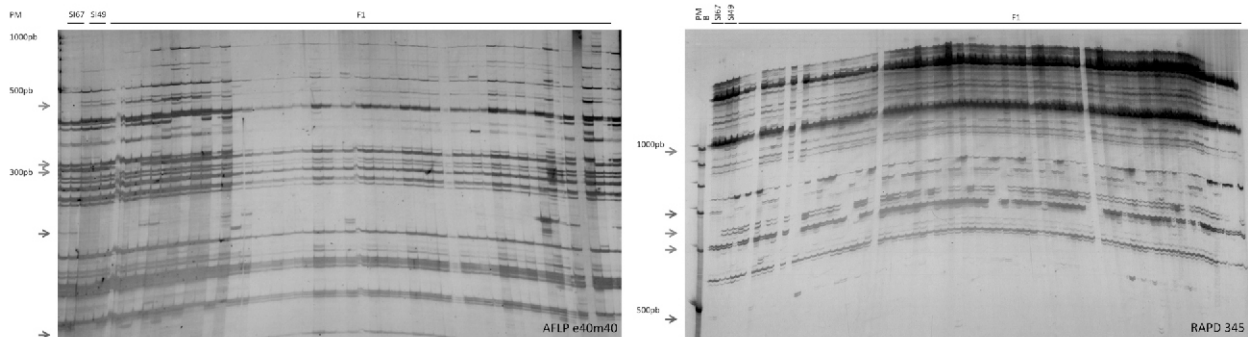
Origen	Tipo ^{b,c}	Segregación			Totales
		ADS (1:1/3:1 ^a)	ADD (1:0)	Distorsionados	
Maternos					
	AFLP	10	-	1	11
	RAPD	19	6	5	30
Paternos					
	AFLP	5	-	-	5
	RAPD	31	2	18	51
Biparentales (puentes alélicos)					
	AFLP	5	-	-	5
	RAPD	12	-	5	17

^aSegregación esperada para marcadores dominantes en dosis simple

^bCebadores utilizados para generar las bandas de AFLP: e35: 5'-GACTGCGTACCAATTCACA-3', e40: 5'-GACTGCGTACCAATTCAGC-3', e41: 5'-GACTGCGTACCAATTCAGG-3', m38: 5'-GATGAGTCCTGAGTAAACT-3', m40: 5'-GATGAGTCCTGAGTAAAGC-3', m44: 5'-GATGAGTCCTGAGTAAATC-3'

^cCebadores utilizados para generar las bandas de RAPD: 301: 5'-CGGTGGCGAA-3', 302: 5'-CGGCCACGT-3', 303: 5'-GCGGGAGACC-3', 308: 5'-AGCGGCTAGG-3', 312: 5'-ACGGCGTCAC-3', 313: 5'-ACGGCAGTGG-3', 320: 5'-CCGGCATAGA-3', 327: 5'-ATACGGCGTC-3', 333: 5'-GAATGCGACG -3', 336: 5'-GCCACGGAGA-3', 337: 5'-TCCCGAACCG-3', 340: 5'-GAGAGGCACC-3', 341: 5'-CTGGGGCCGT-3', 342: 5'-GAATCCCTCC-3', 344: 5'-TGTTAGGCAC-3' y 345: 5'-GCGTGACCCG-3'.

Figura 1. Marcadores de AFLP y RAPD generados en la población de mapeo de *Ilex paraguariensis*. Panel superior: amplificación de AFLP con la combinación de cebadores e40m40. Panel inferior: amplificación de RAPD con el cebador 345. Se muestran los amplicones producidos a partir de los progenitores y una fracción de la población de mapeo. Las amplificaciones correspondientes a los progenitores fueron corridas por duplicado. Las flechas indican los marcadores maternos, paternos y biparentales analizados, respectivamente. PM: marcador de peso molecular, B: tubo blanco de reacción, SI-67: progenitor femenino, SI-49: progenitor masculino. F1: muestra de individuos de la población.



Conclusiones

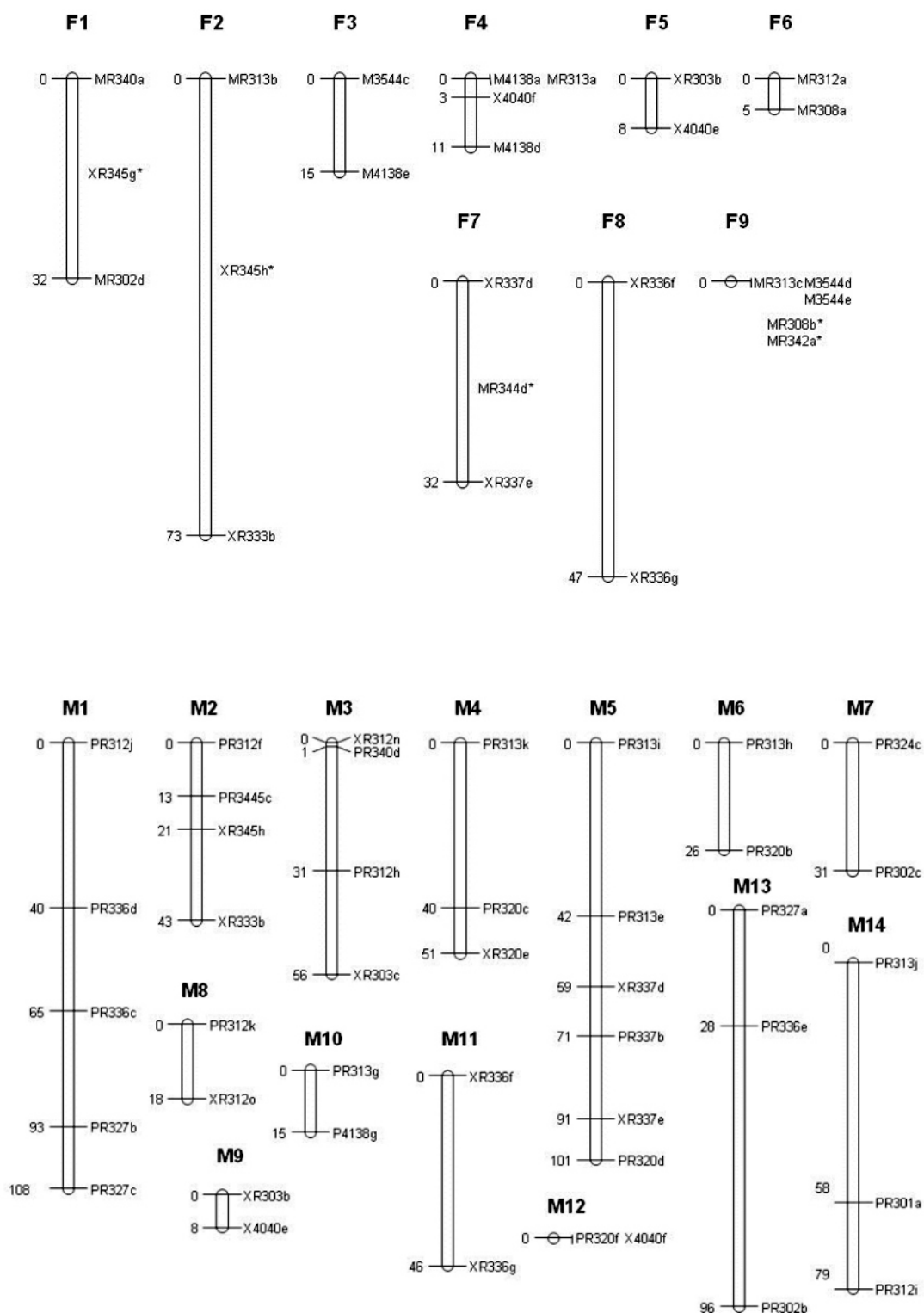
El trabajo realizado permitió generar un primer mapa genético marco para *I. paraguariensis*. El mismo cubre 223 y 678 cM para los genotipos SI-67 (femenino) y SI-49 (masculino), respectivamente. Aunque preliminar, este mapa permitirá iniciar estudios de identificación de marcadores ligados a caracteres de interés agronómico, como el sexo (para posibilitar su identificación

temprana) y la tolerancia a sequía. Los datos presentados aquí servirán de base para el agregado de nuevos marcadores, que incrementarán el número de grupos de ligamiento en cada genotipo y contribuirán a determinar con más precisión la estructura del genoma de la especie.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por el Instituto Nacional de la Yerba Mate (INYM), a través de un proyecto PRASY 2011. Agradecemos al establecimiento Las Marías S.A. por haber cedido gentilmente sus materiales para realizar el estudio. También estamos en deuda con la Dra. Romina Rebozzio por su colaboración en la extracción de ADN genómico. Espasandín F es becario postdoctoral de CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas). Luna C, Sansberro P, Espinoza F, Sartor M, Ortiz JPA, Pessino SC son miembros de la carrera del investigador científico del CONICET.

Figura 2. Mapa de ligamiento marco de *Ilex paraguariensis*. Los grupos nombrados como F y M corresponden a los mapas de los genotipos SI-67 y SI-49, progenitores femenino y masculino de la población segregante de mapeo, respectivamente. Se muestran los grupos de ligamiento para los cuales se logró establecer el orden y/o la distancia de localización de los marcadores. Los marcadores indicados con asteriscos no pudieron asignarse a una única posición. Los nombres de los marcadores se indicaron según el siguiente código: M: materno. P: paterno. X: biparental. Si el marcador es de tipo AFLP, se indica con un número de 4 cifras cuál es la combinación de cebadores utilizada para obtenerlo (3544 se originó con la combinación de cebadores e35m44). Si el marcador es de tipo RAPD se indicó con una R seguida del número de cebador utilizado.



Bibliografía

1. **ACEVEDO RM, MAIALE SJ, PESSINO SC, BOTTINI RA, RUIZ OA, SANSBERRO PA** (2013) A succinate dehydrogenase flavoprotein subunit-like transcript is upregulated in *Ilex paraguariensis* leaves in response to water deficit and abscisic acid, *Plant Physiol Biochem*, 65:48-54.
2. **ADAM-BLONDON AF, SEVIGNAC M, BANNEROTH, DRON M** (1994) SCAR, RAPD and RFLP markers linked to a dominant gene (Are) conferring resistance to anthracnose in common bean. *Theor Appl Genet*, 88:865-870.
3. **AGARWAL M, SHRIVASTAVA N, PADH H** (2008) Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant Cell Rep*, 27:617-631.
4. **ANDRES JM, SAURA F** (1945) Los cromosomas de la yerba mate y otras especies del género *Ilex*. *Publ. Inst. Genét. Fac. Agron. Vet. Buenos Aires*, 2:161-168.
5. **AZEVEDO CORTÉS EFING L** (2008) Compostos bioativos do material resinoso, subproduto do processamento da erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.). Tesis para optar al grado de Doctor en Tecnología de Alimentos. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil.
6. **BELINGHERI DL** (2003) Mejoramiento genético de la yerba mate. Estación Experimental Agropecuaria Cerro Azul, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Buenos Aires, Argentina.
7. **BONIN A, BELLEMAIN E, BRONKEN EIDENSEN P, POMPANON F, BROCHMANN C, TABERLET P** (2004) How to track and assess genotyping errors in population genetics studies. *Mol Ecol*, 13:3261-3273.
8. **CAIRO CA, STEIN J, DELGADO L, GUELMAN SA, BORTOLOTTI S, ORTIZ JPA, MORANDI EN** (2002) Tagging the juvenile locus in soybean (*Glycine max* (L.) Merr. with molecular markers. *Euphytica*, 124:387-395.
9. **CERVIGNI GDL, ORTIZ JPA, FEINGOLD SE** (2010) Construcción de mapas de ligamiento genético, localización de genes y regiones cromosómicas asociadas a caracteres de interés en plantas. En: *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal* (Levitus G, Echenique V, Rubinstein C, Hopp E y Luis Mroginsky, eds). Ediciones INTA, Buenos Aires. Pp. 86-99.
10. **CHOI Y, SERTIC S, KIM H, WILSON E, MICHPOULOS F, LEFEBER A, ERKELENS C, PRAT KRICUN S, VERPOORTE R** (2005) Classification of *Ilex* species based on metabolomic fingerprinting using nuclear magnetic resonance and multivariate data analysis. *J Agr Food Chem*, 53:1237-1245.
11. **COELHO C, DE ARAUJO MT, SCHENKEL E** (2002) Populational diversity on leaf morphology of maté (*Ilex paraguariensis* St. Hil., Aquifoliaceae). *Braz Arch Biol Techn*, 45:47-51.
12. **DE MARIA C, MOREIRAR** (2007) Cafeína: revisão sobre métodos de análise. *Química Nova*, 30:99-105.
13. **DUDONNÉ S, VITRAC X, COUTIÈRE P, WOILLEZ M, MÉRILLON JM** (2009) Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD and ORAC assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57:1768-1774.
14. **EIBL B, FERNANDEZ R, KOZARIK J, LUPI A, MONTAGNINI F, NOZZI D** (2000) Agroforestry systems with *Ilex paraguariensis* (American holly or yerba mate) and native timber trees on small farms in Misiones, Argentina. *Agrofor Syst*, 48:1-8.
15. **GIBERTI C** (1997) Recursos fitogenéticos relacionados con el cultivo y explotación de la yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil., Aquifoliaceae) en el cono sur de América. *Acta Hort*, 500:137-144.
16. **GONZALEZ DE MEJIA E, SONG YS, RAMIREZ-MARES MV, KOBAYASHI H** (2005) Effect of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) tea on topoisomerase inhibition and oral carcinoma cell proliferation. *J Agric Food Chem*, 53:1966-1973.
17. **GORTARI J** (2007) El Instituto Nacional de la Yerba Mate (INYM) como dispositivo político de economía social: mediación intrasectorial en la distribución del ingreso, empoderamiento del sector productivo y desarrollo local en la región yerbatera. IADE. Buenos Aires. *Realidad Económica*, 232:21-31.
18. **GOTTLIEB A, GIBERTI G, POGGIO L** (2005) Molecular analyses of the genus *Ilex* (Aquifoliaceae) in southern South America, evidence from AFLP and its sequence data. *Amer J Bot*, 92:352-369.
19. **GOTTLIEBAM, POGGIOL** (2010) Genomic screening in dioecious "yerba mate" tree (*Ilex paraguariensis* A. St. Hill., Aquifoliaceae) through representational difference analysis. *Genetica*, 138:567-578.
20. **GUPTA M, VERMA B, KUMAR N, CHAHOTA RK, RATHOUR R, SHARMA SK, BHATIA S, SHARMA TR** (2012) Construction of inter-sub-specific molecular genetic map of lentil based on ISSR, RAPD and SSR markers. *J Genet*, 91:279-287.
21. **HAQUE S, ASHRAF N, BEGUM S, SARKAR RH, KHAN H** (2008) Construction of genetic map of jute (*Corchorus olitorius* L.) based on RAPD markers. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, 18:165-172.
22. **HECK CI, DE MEJIA EG** (2007) Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*): a comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. *J Food Sci*, 72:138-151.
23. **HEMMAT M, WEEDEN NF, MANGANARIS AG, LAWSON DM** (1994) Molecular marker linkage map for apple. *J Heredity*, 85:4-11.
24. **JACCARD P** (1908) Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bull Soc Vaud Sci Nat*, 44:223-270.
25. **KISS GB, CSANADI G, KALMAN K, KALO P, OKRESZ L** (1993) Construction of a basic linkage map for alfalfa using RFLP, RAPD, isozyme and morphological markers. *Mol Gen Genet*, 238:129-137.
26. **KOSAMBI DD** (1944) The estimation of map distance from recombination values. *Ann Eugen*, 12:172-175.
27. **LUNCEFORD N, GUGLIUCCI A** (2005) *Ilex paraguariensis* extracts inhibit AGE formation more efficiently than green tea. *Fitoterapia*, 76:419-27.
28. **MARTIN GB, WILLIAMS JGK, TANKSLEY SD** (1991) Rapid identification of markers linked to a *Pseudomonas* resistance gene in tomato by using random primers and near-isogenic lines. *Proc Natl Acad Sci* 88:2336-2340
29. **MARTÍNEZ EJ, HOPP E, STEIN J, ORTIZ JPA, QUARIN CL** (2003) Genetic characterization of apospory in tetraploid *Paspalum notatum* based on the identification of linked molecular markers. *Mol Breed*, 12:319-327.
30. **MENINI T, HECK C, SCHULZE J, DE MEJIA E, GUGLIUCCI A** (2007) Protective action of *Ilex paraguariensis* extract against free radical inactivation of paraoxonase-1 in high-density lipoprotein. *Planta Med*, 73:1141-1147.
31. **MIRANDA DD, ARÇARI DP, PEDRAZZOLI J JR, CARVALHO PDE O, CERUTTI SM, BASTOS DH, RIBEIRO ML** (2008) Protective effects of mate tea (*Ilex paraguariensis*) on H2O2-induced DNA damage and DNA repair in mice. *Mutagenesis*, 23:261-265.
32. **MOSIMANN AL, WILHELM-FILHO D, DA SILVA EL** (2006) Aqueous extract of *Ilex paraguariensis* attenuates the progression of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *Biofactors*, 26:59-70.
33. **NEWCOMBE RG** (1998) Two-Sided Confidence Intervals for the Single Proportion: Comparison of Seven Methods. *Statistics in Medicine*, 17:857-872.
34. **ORTIZ JPA, PESSINO SC, BHAT V, HAYWARD MD, QUARIN CL** (2001) A genetic linkage map of diploid *Paspalum notatum*. *Crop Science*, 41:823-830.
35. **PARAN I, KESSELI R, MICHELMORE R** (1991) Identification of restriction fragment-length polymorphism and random amplified polymorphic DNA markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce, using near isogenic lines. *Genome*, 34:1021-1027.

36. **PERMINGEAT HR, ROMAGNOLI MV, VALLEJOS RH** (1998) A simple method for isolating high yield and quality DNA from cotton (*Gossypium hirsutum* L.) leaves. *Plant Mol Biol Rep*, 16:1-6.
37. **PRADO MARTIN JG, PORTO E, DE ALENCAR SM, DA GLÓRIA EM, CORRÊA CB, RIBEIRO CABRALIS** (2013) Antimicrobial activity of yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) against food pathogens. *Rev Argent Microbiol*, 45: 93-98.
38. **RITTER E, GEBHARDT C, SALAMINI F** (1990) Estimation of recombination frequencies and construction of RFLP linkage maps in plants from crosses between heterozygous parents. *Genetics*, 125:645-654.
39. **SANSBERRO P, MROGINSKI L, BOTTINI R** (2004) Abscisic acid promotes *Ilex paraguariensis* growth by alleviating diurnal water stress. *Plant Growth Regul*, 42: 105-111.
40. **SANSBERRO P, REY H, MROGINSKI L** (1998) In vitro culture of rudimentary embryos of *Ilex paraguariensis*: responses to exogenous cytokinins. *J. Plant Growth Regul*, 17:101-105.
41. **SCHINELLA G, FANTINELLI JC, MOSCA SM** (2005) Cardioprotective effects of *Ilex paraguariensis* extract: evidence for a nitric oxide-dependent mechanism. *Clin Nutr*, 24:360-366.
42. **STEIN J, PESSINO SC, MARTINEZ EJ, RODRIGUEZ MP, SIENA LA, QUARIN CL, ORTIZ JPA** (2007) A genetic map of tetraploid *Paspalum notatum* Flüge (bahiagrass) based on single-dose molecular markers. *Mol Breed* 20:153-166.
43. **STEIN J, QUARIN CL, MARTÍNEZ EJ, PESSINO SC, ORTIZ JPA** (2004) Tetraploid races of *Paspalum notatum* show polysomic inheritance and preferential chromosome pairing around the apospory-controlling locus. *Theor Appl Genet*, 109:186-191.
44. **TORRES AM, WEEDEN NF, MARTINA A** (1993) Linkage among isozyme, RFLP, and RAPD markers. *Plant Physiol* 101:394-452
45. **VAN OOIJEN JW, VOORRIPS RE** (2001) JoinMap Version 3.0 Software for the calculation of genetics linkage maps. *Plant Research International*, Wageningen, The Netherlands.
46. **VOS P, HOGERS R, BLEEKER M, REIJANS M, VAN DE LEE T, HORNES M, FRIJTERS A, POT J, KUIPER M, ZABEAU M** (1995). AFLP: A new concept for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res*, 23:4407-4414.
47. **WILLIAMS JGK, KUBELIK AR, LIVAK KJ, RAFALSKI JA, TINGEY SV** (1991) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *NuclAcids Res*, 18:6531-6535.