

## CONSTRUÇÃO DE UM MAPA GENÉTICO A PARTIR DE UMA POPULAÇÃO F<sub>2</sub> DERIVADA DO CRUZAMENTO ENTRE *Coffea arabica* E *C. canephora* E SUA UTILIDADE PARA QUALIDADE DE BEBIDA

Regina H G Priolli<sup>2a</sup>; Luis Carlos S Ramos<sup>3</sup>, David Pot<sup>4</sup>, Milene Moller<sup>2c</sup>, Paulo B Gallo<sup>5</sup>; Maria M Pastina<sup>6</sup>; Antonio A F Garcia<sup>6</sup>; Paula Y Yamamoto<sup>2d</sup>; Sérgio D Lannes<sup>2b</sup>, Luiz G E Vieira<sup>7</sup>, Lucia P Ferreira<sup>2b</sup>, Paulo Mazzafera<sup>9</sup>; Luiz Filipe P Pereira<sup>7,8</sup>; Carlos A Colombo<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup> Trabalho financiado pelo Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café – CBP&D/Café

<sup>2a</sup> Bolsista Pós-Doc CAPES, IAC (Instituto Agrônômico), Campinas, SP

<sup>2b</sup> Bolsista CBP&D/Café, IAPR, Londrina, PR

<sup>2c</sup> Bolsista Iniciação Científica FAPESP, IAC (Instituto Agrônômico), Campinas, SP

<sup>2d</sup> Bolsista CBP&D/Café, IAC, Campinas, SP

<sup>3</sup> IAC (Instituto Agrônômico), Centro de Recursos Genéticos Vegetais, Campinas-SP

<sup>4</sup> CIRAD, UMR DAP, Montpellier, França

<sup>5</sup> APTA-Pólo Regional Nordeste do Estado de São Paulo

<sup>6</sup> ESALQ/USP, Departamento de Genética, Piracicaba-SP

<sup>7</sup> IAPAR (Instituto Agrônômico do Paraná), Londrina, PR

<sup>8</sup> Embrapa Café, LBI/IAPAR Londrina PR

<sup>9</sup> UNICAMP - Fisiologia Vegetal, Campinas, SP

\* autor para correspondência: ccolombo@iac.sp.gov.br

**RESUMO:-** Mapas genéticos com base em marcadores moleculares têm sido desenvolvidos em grande número de plantas como uma estratégia eficaz para seleção assistida pelo marcador. No presente estudo, marcadores AFLP e SSR foram utilizados para construção de um mapa genético em uma população F<sub>2</sub> criada a partir da autofecundação do híbrido F<sub>1</sub> do cruzamento entre *Coffea arabica* e *Coffea canephora*. Foram identificados 349 marcadores AFLP e 50 alelos SSR segregantes em 90 plantas F<sub>2</sub>. Para construção do mapa, apenas marcas em dose única e segregação 3:1 no F<sub>2</sub> foram consideradas (248 marcadores AFLP e SSR 27 alelos, ou 68,9% dos marcadores polimórficos). Cento e sessenta e nove marcadores foram mapeados (155 AFLP e 14 SSR). Trinta e sete grupos ligação correspondentes a um total de 1011 cM foram obtidos, com uma distância média entre as marcas de 5,98 cm e 4,6 marcadores por grupo de ligação. Quarenta e seis marcadores associados a características agrônômicas de interesse foram encontrados, dos quais, dezenove foram associados com teor de açúcar, oito de cafeína, oito para CGA, um para a cafeína e CGA e dez para a produção total por planta. A análise baseada em marcadores de dose única permitiu obter informação de QTL putativo associado à qualidade de bebida do café e produtividade. Marcadores adicionais serão incluídos a este trabalho para maior cobertura do genoma café.

**Palavras-chave:** café, melhoramento genético, seleção assistida, marcador molecular

### CONSTRUCTION OF A GENETIC MAP FROM A POPULATION DERIVED FROM F<sub>2</sub> CROSS BETWEEN *COFFEA ARABICA* AND *C. CANEPHORA* AND USEFULNESS FOR CUP QUALITY

**ABSTRACT:** Genetic maps based on molecular markers have been developed in a large set of plants and this strategy has proven its efficiency towards the identification of tools for marker assisted selection. In the present study, AFLP and SSR markers were used to build a genetic map of an interspecific F<sub>2</sub> population between *Coffea arabica* and *Coffea canephora*. It was identified 349 AFLP markers and 50 SSR alleles segregating in 90 F<sub>2</sub> plants from forty four AFLP combinations and 19 SSR loci. For the map construction, only single dose markers segregating 3:1 in the F<sub>2</sub> were considered (248 AFLP markers and 27 SSR alleles, standing for to 68.9% of the polymorphic markers). The genetic map was build and one hundred and sixty nine markers were mapped, corresponding to 155 AFLP markers and 14 SSR loci. Thirty seven linkage groups corresponding to a total map length of 1011 cM were obtained, with an average distance between the markers of 5.98 cM and an average of 4.58 markers per linkage group. Forty-six marker trait associations were found; of which, nineteen were associated with sugar content, eight for caffeine, eight for CGA, one for caffeine and CGA and ten for total production per plant. Only four single markers associations were detected at both years of determinations. The single markers analysis for QTL detection allowed us to obtain previous information of putative QTL association for coffee quality and productivity. Additional markers are being added to this working linkage map for more complete coverage of the coffee genome.

**Key-words:** coffee, breeding, assisted selection, molecular marker

## INTRODUÇÃO

*C. arabica* L., a única espécie auto-fértil tetraplóide do gênero *Coffea* ( $2n = 4x = 44$ ), é caracterizada por baixa diversidade genética, atribuída à sua origem alotetraplóide, sua biologia reprodutiva e domesticação recente. Em contraste, espécies diplóides do gênero *Coffea* ( $2n = 2x = 22$ ) são alógamas e apresentam elevada diversidade genética. Estas espécies constituem valioso reservatório de genes para diferentes características agrônômicas (Carvalho, 1991). A transferência de genes desejáveis de *C. canephora* para *C. arabica* por meio de cruzamentos interespecíficos é uma das estratégias de sucesso adotadas por melhoristas (Berthaud, 1978; Owuor e Van der Wossen, 1981). No caso da introgressão de genes de uma espécie para outra, marcadores moleculares vêm sendo utilizados em atividades de seleção assistida permitindo rastrear precocemente parte de genomas ou genes de interesse, reduzindo o tempo necessário para obtenção de genótipos elite (Lashermes et al., 1997). Em cafeeiros, Lashermes et al. (2001) construíram um mapa genético relativamente bem saturado em *C. canephora*, enquanto que mapas parciais foram obtidos em cruzamentos interespecíficos envolvendo espécies diplóides, a exemplo de *C. pseudozanguebarie* x *C. liberica* (Ky et al., 2000) e *C. canephora* x *C. heterocalyx* (Coulibaly et al., 2003). Estudos de identificação de QTLs permitiram localizar dois marcadores ligados a genes relacionados ao controle do florescimento (Akaffou et al., 2003) e três marcadores associados com viabilidade do pólen (Coulibaly et al., 2003). Em *C. arabica*, em razão do baixo nível de polimorfismo e ao caráter poliplóide, a estratégia consiste na construção de mapas genéticos parciais (Pearl et al. 2004; Teixeira-Cabral et al., 2004) com posterior integração dos mesmos. No presente estudo, marcadores AFLP e SSR foram utilizados para construção de um mapa genético a partir de uma população  $F_2$  de híbridos interespecíficos entre *C. arabica* e *C. canephora* e a associação do mapa com características agrônômicas, com ênfase para a qualidade de bebida.

## MATERIAL E MÉTODOS

O material vegetal foi composto de 90 plantas  $F_2$  derivadas da autofecundação de uma planta  $F_1$  tetraplóide a partir do cruzamento entre *Coffea arabica* L. var. Bourbon Vermelho e *Coffea canephora* var. Robusta 4x (tetraplóide artificial), obtida por Mendes (1947). A população  $F_2$  segregante é constituída por cerca de 500 plantas e encontra-se em cultivo desde 1996 no município de Mococa (SP). As amostras de folhas e frutos maduros foram colhidos em dois anos consecutivos (2005 e 2006). Os frutos foram utilizados para análises do teor de cafeína, ácidos clorogênicos e açúcares. Para as análises moleculares, o DNA genômico total foi extraído como descrito por Ky et al. (2000) de folhas secas liofilizadas, dos pais, híbridos  $F_1$  e  $F_2$ . Dezenove locos SSR polimórficos entre *C. arabica* e *C. canephora* descritos por Lashermes et al. (2001) e Combes et al. (2000) foram testados na população  $F_2$ . Para obtenção dos AFLPs, foi adotado protocolo adaptado de Vos et al. (1995). A pré-amplificação foi realizada utilizando iniciadores *foward* e *reverse* sem nucleotídeos seletivos na extremidade 3' e para a amplificação final foram adotados três nucleotídeos seletivos nos dois iniciadores da reação de PCR. O produto das amplificações, tanto SSR como AFLP, foram lidos a partir de eletroforese em gel poliacrilamida e coloração com sais de prata. Para a análise dos dados (SSR e AFLP), apenas marcadores polimórficos entre os pais e presentes na  $F_1$  foram considerados e como marcadores dominantes. A distorção de segregação 3:1 esperada para dose única foi analisada pelo teste qui-quadrado e adotada a correção de Bonferroni. A construção do mapa de ligação foi efetuado utilizando Joinmap versão 3.0 (Stam, 1993). Os grupos de ligação foram estabelecidos utilizando dois pontos de análise, com valores 4 de LOD e fração de recombinação de 0,50. A função de Kosambi foi utilizada para a conversão da fração de recombinação em mapa de distâncias. Associações entre os marcadores e as características analisadas (açúcares totais, açúcares redutores, sacarose, cafeína, ácidos clorogênicos conteúdo e produção) foram analisadas por ANOVA. Associação significativa foram considerada para P inferior a 0,001 e sugestiva quando o valor de P variou de 0,001 a 0,005.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para construção do mapa de ligação, 50 alelos SSR e 349 marcadores AFLP apresentaram polimorfismo na população  $F_2$ , sendo que 275 (69%) segregaram na razão esperada de 3:1. Destes, 169 foram mapeados (155 AFLP e 14 SSR). Dos marcadores mapeados, 68% vieram da espécie *C. arabica*, 29% do parental *C. canephora* 4x e 3% de ambos os pais. Este resultado sugere que a divergência entre os dois genomas ancestrais de *Coffea arabica* (*C. canephora* e *C. eugenioides*) é duas vezes maior do que entre os dois haplótipos do *C. canephora* utilizados como pai para criar o híbrido  $F_1$ . Resultados similares foram observados por Pearl et al (2004), que encontraram em uma pseudo população  $F_2$  derivada do cruzamento entre cultivares de *C. arabica*, 68% dos marcadores AFLP foram do cv. Catimor, 30% do cv. Mokka híbrido e 2% foram codominantes. Trinta e sete grupos ligação correspondentes a um total de 1011 cM de

comprimento do mapa genético foram obtidos, com uma distância média entre os marcadores de 5,98 cM e 4,6 marcadores por grupo de ligação (Figura 1). Vinte grupos de ligação foram formados por apenas 2 marcadores.

A análise de marcador de dose única para detectar associações com as características fenotípicas do estudo indicou associação significativa ( $P$  valor  $<0,001$ ) e sugestiva ( $0,001 < P < 0,005$ ), conforme resumido na Tabela 1. No total, 46 marcadores foram identificados com associação (39 AFLP e 7 SSR). A porcentagem da variância fenotípica explicada por cada marcador variou de 10,62 (E3M1\_118 marcador) para 20,69% (E3M3\_170 marcador). Em relação ao conteúdo bioquímico, dez associações foram encontradas para açúcar total, sete para a redução de açúcar, onze para sacarose, nove para cafeína e nove para CGA. Para o caráter produção, dez marcadores sugestivos e apresentando efeito significativo foram detectados. Nove marcadores foram associados a açúcares totais e sacarose, mas apenas dois desses marcadores apresentou efeitos significativos ou sugestivos nos dois anos analisados (E3M8\_250 e E5M1\_308). O marcador E4M3\_330 também apresentou associação com o teor de cafeína nos dois anos consecutivos, mesmo efeito observado para a estabilidade de produção no caso do marcador E3M8\_146.

Foi observada associação de um mesmo marcador com características distintas, como no caso do marcador E2M5\_342 para cafeína e GCA conteúdo. A mesma observação foi feita para marcadores que apresentaram associações com o conteúdo de sacarose e açúcares totais (E3M8\_250 e E5M1\_308). No entanto, esta associação era esperada, pois o teor de sacarose foi derivado do conteúdo de açúcar total e açúcares redutores.

## CONCLUSÕES

O mapa genético revelado no presente estudo é parcial e novos marcadores (SNPs derivados de ESTs do genoma café) e em maior número de indivíduos (155) encontram-se em fase de obtenção. A análise de associação entre marcadores e componentes bioquímicos envolvidos na qualidade de bebida do café, assim como com a produção, nos permitiu obter informações preliminares do papel putativo de QTL para estas características. A confirmação desses dados a partir do aumento de marcas e indivíduos, bem como maior número de anos de observação, poderá confirmar o uso dos mesmos em programas de melhoramento por meio da seleção assistida, a curto prazo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akaffou D.S., Ky C. L., Barre P., Hamon S., Louarn J., Noirot M. 2003. Identification and mapping of a major gene (Ft1) involved in fructification time in the interspecific cross *Coffea pseudozanguebariae* X *C. liberica* var. Dewevrei: impact on caffeine content and seed weight *Theor Appl Genet* (2003) 106:1486-1490
- Berthaud J. 1978. L'hybridation interspécifique entre *Coffea arabica* L. et *Coffea canephora* Pierre. Obtention et comparaison des hybrides triploïdes arabusta et hexaploïdes. *Café Cacao Thé* 22:87-109
- Carvalho A, Medina Filho HP, Fazuoli LC, Guerreiro O, Lima MMA (1991) Aspectos genéticos do cafeeiro *Rev Bras Genet* 14:135-183
- Combes MC, Andrzejewski S, Anthony F, Bertrand B, Rovelli P, Graziosi G, Lashermes P. 2000. Characterization of microsatellite loci in *Coffea arabica* and related species. *Mol Ecol* 9: 1178-1180.
- Coulibaly I, Revol B, Noirot M, Poncet V, Lorieux M, Carasco-Lacombe C, Minier J, Dufour M, Hamon P. 2003. AFLP and SSR polymorphism in a *Coffea* interspecific backcross progeny [(*C. heterocalyx* x *C. canephora*)]. *Theor Appl Genet* 107: 1148-1155.
- Ky C-L, Barre P, Lorieux M, Trouslot P, Akaffou S, Louarn J, Charrier A, Hamon S, Noirot M. 2000. Interspecific genetic linkage map, segregation distortion and genetic conversion in coffee (*Coffea* sp.) *Theor Appl Genet* 101:669-676.
- Lashermes, P., Combes, M.C., Trouslot, P., Charrier, A. 1997. Phylogenetic relationships of coffee-trees species (*Coffea* L.) as inferred from ITS sequences of nuclear ribosomal DNA. *Theor. Appl. Genet.* 94: 947 - 955.
- Lashermes P, Combes MC, Pratah NS, Trouslot P, Lorieux M, Charrier A. 2001. Genetic linkage map of *Coffea canephora*: effect of segregation distortion and analysis of recombination rate in male and female meiosis *Genome* 44:589-596
- Mendes AJT. 1947. Observações citológicas em *Coffea*: Métodos de tratamento pela colchicina. *Bragantia* 7:221-230.
- Owuor JBO and Van der Vossen HAM. 1981. Interspecific hybridization between *Coffea arabica* L. and tetraploid *Coffea canephora* Pierre: I: Fertility in F1 hybrids and backcrosses to *C. arabica*. *Euphytica* 30:861-866.
- Pearl HM, Nagai C, Moore PH, Steiger DL, Osgood RV, Ming R. (2004) Construction of a genetic map for arabica coffee. *Theor Appl Genet* 108:829-835.
- STAM, P. 1993. Construction of integrated genetic linkage maps by means of a new computer package: JoinMap. *The Plant Journal*, 5:739-744.
- Teixeira-Cabral TA, Sakiyama NS, Zambolim L, Pereira AA, Schuster I. 2004. Single-locus inheritance and partial linkage map of *Coffea arabica* L. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 4:416-421.
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijmans M, van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23: 4407-4414.

