

ESTUDO DA COMPATIBILIDADE GAMETOFÍTICA ENTRE CLONES DE *Coffea canephora* USANDO MARCADORES SNPs¹

Nathália Gomes Mattos²; Fernanda de Araújo Carneiro³; Wendel William De Jesus Carneiro⁴; Jéssica Coelho Valeriano⁵; Sinara Oliveira de Aquino⁶; Adriano Delly Veiga⁷; Alan Carvalho Andrade⁸

¹ Trabalho Financiado pelo Consórcio Pesquisa Café

² Doutoranda em Biotecnologia Vegetal, UFLA, Lavras-MG, Brasil, nagm7@hotmail.com

³ Doutora em Biotecnologia Vegetal, UFLA, Lavras-MG, Brasil, fearca14@gmail.com

⁴ Bolsista Consórcio Pesquisa Café, wendelwill11@gmail.com

⁵ Doutoranda em Biotecnologia Vegetal, UFLA, Lavras-MG, Brasil, jessicacoelho_bio@hotmail.com

⁶ Bolsista Pós-Doutorado PNP/CAPES, PhD, UFLA, Lavras-MG, Brasil, saquinobiotec@gmail.com

⁷ Pesquisador, PhD, Embrapa Cerrados, Planaltina-DF, Brasil, adriano.veiga@embrapa.br

⁸ Pesquisador, PhD, Embrapa Café/INOVACAFÉ, Lavras-MG, Brasil, alan.andrade@embrapa.br

RESUMO: *Coffea canephora* é uma planta perene, pertencente à família *Rubiaceae*, diploide ($2n = 2 \times = 22$), alógama, e apresenta alta variabilidade genética, desta forma o uso de clones para a formação da lavoura é o mais indicado. É uma das *commodities* agrícolas mais importantes mundialmente e o Brasil é o maior produtor, com cerca de 30% da produção mundial. 37% da produção mundial e 24% da brasileira corresponde a *C. canephora*. A polinização assegura parte do sucesso da produção. No entanto, a espécie apresenta autoincompatibilidade do tipo gametofítica, onde o grão de pólen não deve compartilhar o mesmo alelo da planta receptora. Desta forma, o presente trabalho estudou a compatibilidade existente entre 12 clones de *C. canephora*, denominados CCEs, utilizando-se de marcadores SNPs, A metodologia com o *Cervus Software* reconstituiu de forma eficiente o pedigree dos clones CCEs, identificando corretamente os parentais e ainda possibilitou inferir sobre a compatibilidade entre os clones testados, no qual o clone CCE07 apresentou compatibilidade com todos os outros CCEs testados, o que poderia indicar um alto potencial produtivo deste clone.

PALAVRAS-CHAVE: Café, SNP, Compatibilidade.

SNPs MARKERS USED TO PERFORME COMPATIBILITY STUDIES BETWEEN *Coffea canephora* CLONES.

ABSTRACT: *Coffea canephora*, is a diploid ($2n = 2 \times = 22$), perennial, allogamous plant with a high genetic variability. The clone production is of great value for the success of crop. Coffee is one of the most important agricultural commodities in the world. Brazil is the largest producer, response by 30% of the world production. 37% of world production and 24% of Brazilian production are *C. canephora*. The succeed of production depends on the success of pollination. This specie has gametophytic self-incompatibility, when haploid pollen matches one of the same allele present in the diploid style causes pollen rejection. Therefore, the objective of this work is study the compatibility between 12 clones of *C. canephora*, denominated CCEs, by SNPs markers. Our methodology was efficient to reconstruct the pedigree of CCEs progenies, identifying correctly the parents. Parental analyzes performed with *Cervus Software* proved to be efficient to inferring the compatibility between all tested cuttings, and the CCE07 was compatible with all other CCEs tested, which could indicate a high productive potential of this clone.

KEY WORDS: Coffe, SNPs, Compatibility.

INTRODUÇÃO

O cafeeiro é uma planta perene, pertencente à família *Rubiaceae*, subfamília *Ixoroideae*, tribo *Coffeae*, a qual é composta por dois gêneros: *Coffea L.* e *Psilanthus Hook f.*. Originário do continente africano, apresenta 126 espécies identificadas, entretanto a produção de café comercial é formada basicamente por *Coffea arabica* e *Coffea canephora* (DAVIS, 2010; DAVIS et al., 2006). *Coffea L.* é caracterizado por plantas dicotiledôneas, de folhas persistentes e flores hermafroditas, porte arbustivo ou arbóreo e caule lenhoso (FAZUOLI et al., 2000). O início da diversificação evolutiva deste gênero ocorreu entre 5 e 25 milhões de anos atrás (CUBRY et al., 2008).

C. canephora, que é diploide ($2n = 2 \times = 22$), alógama, e apresenta alta variabilidade genética, e por consequência, uma lavoura formada a partir de sementes pode apresentar plantas com características muito diversificadas (BERTRAND et al., 2003; ESPINDULA et al., 2011; TEIXEIRA, 2011). O Brasil é o maior produtor, com cerca de 30% da produção mundial (CECAFÉ, 2018). As espécies arábica e conilon, representam cerca de 64,5% e 35,5% da produção mundial, respectivamente. No Brasil a produção de arábica é em torno de 76%, enquanto a de canéfora é de 24% (CECAFÉ, 2018). A produção de mudas clonais é importante para a produção de canéfora conferindo uniformidade nos vários caracteres de interesse (BERGO et al., 2002). As vantagens em relação às sementes são o menor custo de implementação, a maior produtividade, a maior uniformidade de maturação, a melhor qualidade do grão, o ciclo

diferenciado de maturação e a programação escalonada de colheita, proporcionando o sucesso na formação da lavoura (ESPINDULA et al., 2011). Entretanto, o Conilon, apresenta autoincompatibilidade gametofítica, onde o grão de pólen não deve compartilhar o mesmo alelo da planta receptora (LASHERMES et al., 1996; NOWAK et al., 2011). A não fertilização do gametófito feminino ocorre devido à paralisação do desenvolvimento dos tubos polínicos (BERTHAUD, 1980). Na cafeicultura clonal, quando estes, não são compatíveis à produtividade e a qualidade dos grãos devido a menor eficiência da polinização são comprometidas e há um aumento na taxa de grãos do tipo moca (FERRÃO et al., 2007). Tendo em vista esta problemática, o presente trabalho estudou a compatibilidade existente entre os clones de *C. canephora* por meio de marcadores SNPs, o que poderá servir de auxílio em mais estudos sobre a compatibilidade e também em programas de melhoramento que visem uma maior produção, pois a compatibilidade entre os clones possui relação direta com a produtividade.

MATERIAL E MÉTODOS

Os materiais utilizados foram 12 clones de *C. canephora* nomeados CCEs, como parentais e estão localizados em um campo experimental na Embrapa Cerrados, em altitude de 1000m, em Planaltina-DF e progênes de 100 indivíduos meio-irmãos que foram plantadas, em linhas separadas pelo parental feminino, em um campo experimental no município de Unaí-MG. Foram extraídos DNA genômico das folhas conforme o protocolo de Russell et al. 2010 (INGLIS; PAPPAS; GRATAPAGLIA, 2016). Os clones foram genotipados usando-se o chip Axiom® EMBR5SNP Arrays para avaliar os SNPs (ANDRADE et al., 2017). O software Affecron® GeneChip® Command Console (AGCC) foi utilizado para processar os dados brutos de hibridização, clusterização dos dados e para a chamadas dos genótipos. Selecionou-se SNPs que pertenciam às classes "Poly High Resolution" (PHR) ou "No Minor Homozygote" (NMH) de acordo com a análise dos parentais, CCEs. Foram mantidos apenas SNPs que apresentaram alta qualidade e taxa de chamada, "CallRate" de 100%, visando minimizar os erros da genotipagem. Os dados provenientes da análise anterior foram utilizados no Software Cervus, para processamento dos alelos da progênie e possíveis parentais, resultando na análise de Pedigree. No programa Cervus primeiramente calculou-se a frequência alélica com o teste estatístico LOD, e, para isto, foi informado o genótipo dos indivíduos e o número de *loci* utilizados. Logo em seguida foi realizada uma simulação do parentesco com 10.000 indivíduos, neste caso utilizou dados dos 12 candidatos a possíveis parentais paternos, a proporção dos exemplares requerida de 0,99, a proporção de locus mínima de 0,80 e de erros de 0,01 e ainda, os níveis de confiança relaxado foi de 80% e o estrito de 95%. Por último, realizaram-se as análises para encontrar o pedigree com base nos dados prévios obtidos pelo programa. Para as análises de compatibilidade, somente foram considerados parentais identificados com uma taxa de divergência entre os alelos (*mismatch*) menor que 1%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir da seleção dos 580 SNPs, o programa Cervus foi 100% eficiente em encontrar a planta parental materna de todas progênes, conforme estava previamente identificado nos genótipos da progênes. No entanto, em alguns casos foram encontrados divergências (*mismatches*) na identificação do possível parental paterno, sendo que neste caso estas plantas foram excluídas e somente foram considerados aqueles com uma taxa de divergência menor que 1% (< 6 SNPs). De posse dos resultados obtidos foi possível realizar uma análise de frequência de paternidade nas progênes em estudo (Tabela 1). Os dados foram obtidos, calculando-se o percentual do parental paterno de cada CCE em uma determinada progênie de mãe conhecida.

Tabela 1. Frequência de paternidade dos clones CCEs, apresentada em porcentagem (%) dos descendentes analisados.

Mãe/Pai	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C12	C13	Total
C1	0,0	14,3	50,0	1,8	7,1	0,0	12,5	0,0	0,0	7,1	7,1	0,0	100,0
C2	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	0,0
C3	24,4	12,2	0,0	7,3	7,3	7,3	24,4	4,9	2,4	0,0	4,9	4,9	100,0
C4	4,3	48,9	6,4	0,0	2,1	19,1	8,5	2,1	0,0	0,0	8,5	0,0	100,0
C5	14,3	7,1	35,7	0,0	0,0	0,0	42,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0
C6	0,0	34,6	3,8	34,6	3,8	0,0	23,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0
C7	13,6	13,6	4,5	9,1	13,6	0,0	0,0	13,6	13,6	9,1	9,1	0,0	100,0
C8	0,0	23,1	3,8	34,6	7,7	0,0	15,4	0,0	0,0	0,0	15,4	0,0	100,0
C9	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	0,0
C10	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	0,0
C12	7,1	0,0	9,5	2,4	0,0	0,0	31,0	7,1	4,8	31,0	0,0	7,1	100,0
C13	0,0	25,0	10,0	0,0	0,0	0,0	10,0	0,0	0,0	25,0	30,0	0,0	100,0

A Figura 1 apresenta os valores percentuais calculados, na forma de gráfico, conforme a disposição das plantas no campo. Analisando-se os dados apresentados na Figura 1 juntamente com os dados contidos na Tabela 1, pode-se observar que parece haver um efeito da proximidade entre os clones, com a frequência de descendentes observada na progênie. Por exemplo, observa-se uma maior frequência de pólen do parental CCE03 nas progênes de CCE01 e CCE05. Da mesma forma, observa-se uma maior frequência de pólen do parental CCE02, na progênie do clone CCE04.

Figure 1 displays 13 CCEs (CCE01 to CCE13) and their distribution across five categories (01 to 05 and 02 to 06). The distribution is shown as donut charts, with the central number indicating the total count for each category. The legend identifies the CCEs by color.

Category	CCE01	CCE02	CCE03	CCE04	CCE05	CCE06	CCE07	CCE08	CCE09	CCE10	CCE11/04	CCE12	CCE13
01	1	1	4	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0
02	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0
03	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
04	0	1	0	4	0	0	1	0	1	0	0	0	0
05	1	1	2	0	1	0	3	0	0	0	0	0	0
06	0	1	0	3	0	1	1	0	1	0	0	0	0
07	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0
08	0	1	0	2	1	0	1	0	1	0	0	0	0
09	3	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0
10	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	3	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0
13	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0

A partir dos resultados de paternidade, ainda foi possível montar um diagrama de compatibilidade entre os clones estudados (Figura 2). Pode-se observar que os clones com maior taxa de compatibilidade com os demais foram, respectivamente os clones CCE07 e CCE03 (FIGURA 2). Na Figura 2, pode-se observar também que o clone CCE07 apresentou compatibilidade com outros 11 CCEs testados e o clone CCE03 se mostrou compatível com 10 CCEs. A compatibilidade do clone CCE07 foi confirmada em ambas as descendências, com 6 clones testados (CCE01, CCE03, CCE04, CCE05, CCE08 e CCE12) e em pelo menos uma das descendências com 5 clones (CCE02, CCE06, CCE09, CCE10 e CCE13). Vale ressaltar, que dos 5 clones identificados como compatíveis com o CCE07, somente com os clones CCE06 e CCE13 foi possível realizar a análise de compatibilidade em ambas as descendências, pois no caso dos clones CCE02, CCE09 e CCE10, a descendência destes, não foi incluída neste estudo. Já no caso do clone CCE03, observa-se que o mesmo teve a compatibilidade confirmada em ambas as descendências com 8 clones CCEs (CCE01, CCE04, CCE05, CCE06, CCE07, CCE08, CCE12 e CCE13) e, na própria descendência com os clones (CCE02 e CCE09), uma vez que a descendência desses clones (CCE02 e CCE09) não foram analisadas neste estudo. Os clones CCE09, CCE10, CCE06 e CCE13 foram os clones que apresentaram menor taxa de compatibilidade com clones em estudo (FIGURA 2). Entretanto, deve-se ressaltar que o clone CCE09 tinha baixa produção de pólen (somente 1 planta) e também não teve a própria descendência analisada. Também deve-se salientar que não foi analisada a descendência do clone CCE10, podendo interferir na baixa taxa de compatibilidade. Por outro lado, pode-se observar que os clones CCE06 e CCE13, apresentaram os maiores valores de compatibilidade testada e não confirmada em ambas as descendências (4 comparações cada). Neste sentido, o clone CCE06 não se mostrou compatível com os clones CCE01, CCE08, CCE12 e CCE13, mesmo com testes realizados em ambas as descendências. Já no caso do clone CCE13, este não se mostrou compatível com os clones CCE01, CCE04, CCE06 e CCE08, mesmo com a análise realizada em ambas as descendências (Figura 2). Estes dados sugerem que os clones CCE06, CCE09, CCE10 e CCE13 podem apresentar as menores taxas de compatibilidade com os clones CCEs testados nesse estudo.

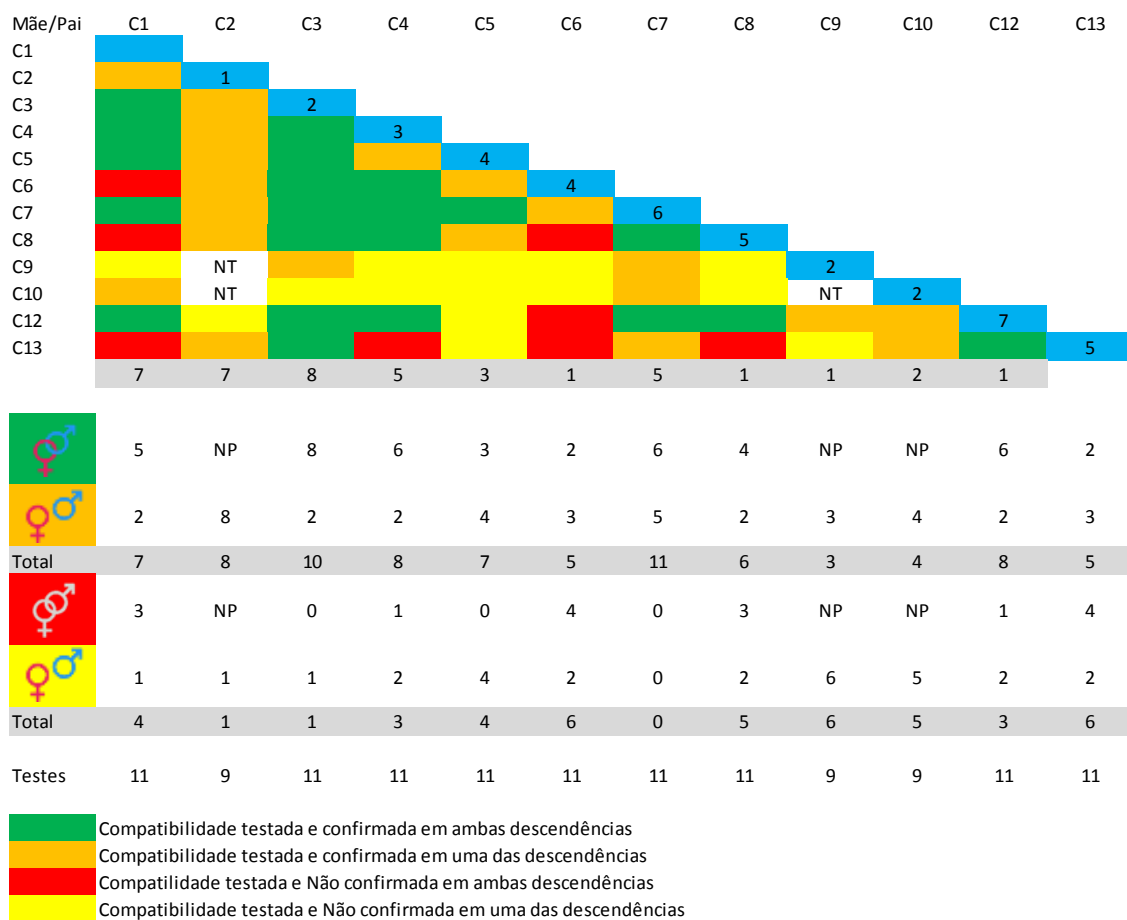


Figura 2. Diagrama indicando a compatibilidade entre os clones CCEs.

A compatibilidade entre clones está diretamente associada à produção de grãos. Desta forma, foi verificada a produtividade dos clones em estudo. Observa-se nos dados apresentados na Tabela 2, que o clone CCE07 que apresentou uma maior taxa de compatibilidade entre os clones em estudo, também apresentou uma produção superior entre todos os clones observados (Tabela 2). Já os clones CCE03 e CCE06 por apresentarem uma menor taxa de compatibilidade, também apresentaram produção inferior (Tabela 2).

Tabela 2. Produtividade em litros por planta dos clones CCEs entre os anos de 2014 e 2017

Clones	2014	2015	2016	2017	Média
CCE01	11,0	7,5	11,3	7,3	9,3
CCE03	9,0	10,3	11,8	10,0	10,3
CCE04	7,3	10,5	11,3	15,4	11,1
CCE05	6,6	8,3	11,0	16,5	10,6
CCE06	2,4	6,3	8,0	11,3	7,0
CCE07	10,5	11,8	22,5	16,5	15,3
CCE08	6,0	11,8	12,3	11,3	10,3
CCE12	9,5	9,5	15,0	12,2	11,6
CCE13	7,8	12,3	3,0	0,0	7,7

Legenda: Rosa: Clones que apresentaram as menores produtividades. Azul: Clone que apresentou a maior produtividade.

As análises realizadas neste estudo, por meio de marcadores moleculares do tipo SNP, foram altamente eficientes, possibilitando reconstruir o Pedigree dos clones analisados e assim observar se houve compatibilidade entre eles. Vale ressaltar que, a escolha de SNPs de qualidade e polimórficos para os possíveis parentais, é de extrema importância, de maneira a permitir que o programa consiga reconhecê-los de maneira eficiente e com a menor taxa de erro possível. Nota-se também que, na maioria dos casos, houve uma maior polinização entre as plantas que estão mais próximas. Todavia, foi possível constatar que tiveram descendentes entre CCE01 e CCE12 nos dois sentidos e visto que eles estão em opostos no campo experimental, sendo que desta forma, a distância entre as plantas não foi fator limitante para ambos.

CONCLUSÃO

1. A metodologia utilizando-se de marcadores moleculares SNPs, mostrou-se eficiente na reconstrução do pedigree de progênes de 9 clones CCEs, identificando corretamente o parental materno e sugerindo o parental paterno.
2. As análises de parentais realizadas com o programa Cervus, também se mostrou eficiente em inferir acerca da compatibilidade entre os clones testados, indicando que o clone CCE07 foi o que apresentou uma maior taxa de compatibilidade, se mostrando compatível com todos os clones CCEs testados. Isto poderia indicar um alto potencial produtivo deste clone, o que foi confirmado com dados reais de produção avaliados em campo, onde o clone CCE07 se apresentou como o clone mais produtivo de todos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, A. C. et al. 'Towards GWAS and Genomic Prediction in Coffee: Development and Validation of a 26K SNP Chip for *Coffea canephora*', In XX INTERNATIONAL PLANT AND ANIMAL GENOME CONFERENCE, p. W173. Anais eletrônicos... Disponível em: <<https://pag.confex.com/pag/xxv/webprogram/Paper23677.html>> Acesso em: 08 de ago. de 2017
- BERGO, C. L., et al. Produção de mudas de Cafeeiros por Sementes e Estacas. Circular Técnica 44. EMBRAPA, 2002.
- BERTHAUD, J., et al. Incompatibility in *Coffea canephora* - Test method and genetic control. *Cafe Cacao The*, v.24, n.4, p.267-274, 1980.
- BERTRAND, B. et al. Impact of the *Coffea canephora* gene introgression on beverage quality of *C. arabica*. *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, v. 107, n. 3, p. 387-394, ago. 2003
- CECAFE - Conselho dos Exportadores de Café do Brasil. Disponível em: <www.cecafe.com.br/dados-estatisticos/exportacoes-brasileiras/> Acesso em 28 de jan. de 2018
- CUBRY, P. et al. Diversity in coffee assessed with SSR markers: structure of the genus *Coffea* and perspectives for breeding. *Genome*, Ottawa, v. 51, n. 1, p. 50-63, Jan. 2008.
- DAVIS, A. P. Six species of *Psilanthus* transferred to *Coffea* (*Coffeae*, *Rubiaceae*). *Phytotaxa*, v. 10, n. 1, p. 41-45, out. 2010.
- DAVIS, A. P. et al. An annotated taxonomic conspectus of the genus *Coffea* (*Rubiaceae*). *Botanical Journal of the Linnean Society*, London, v. 152, n. 4, p. 465-512, dez. 2006.
- ESPINDULA, M. C. et al. Vantagens do uso de clones no cultivo de cafeeiros canéfora (*Conilon* e *Robusta*). Porto Velho, RO: Embrapa Rondônia, 2011.
- FAZUOLI, L. C. et al. Seleção antecipada e sua eficiência no café Icatu. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PESQUISAS DOS CAFÉS DO BRASIL, 1., 2000, Campinas. Anais... Campinas: IAC, 2000. p. 576-582.
- FERRÃO, R. G. et al. Melhoramento genético do *Coffea canephora*. In: FERRÃO, R.G. et al. (Ed.). *Café Conilon*. Vitória-ES: Incaper, p.121-173, 2007.
- INGLIS, P. W.; PAPPAS, M. de C. R.; GRATAPAGLIA, D. Protocolo de extração de DNA e RNA de alta qualidade para espécies ricas em compostos secundários. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia-Comunicado Técnico (INFOTECA-E), 2016. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/156501/1/comunicado-tecnico-204.pdf>> Acessado em: 05 de maio de 2017
- LASHERMES, P. Inheritance and genetic mapping of self: incompatibility in *Coffea canephora* Pierre. *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, v. 93, n. 3, p. 458-462, jan. 1996.
- NOWAK, M. D. et al. Expression and trans-specific polymorphism of self-incompatibility RNases in *Coffea* (*Rubiaceae*). *PloS One*, v. 6, n. 6, p. e21019, 2011.
- RUSSELL, A. et al. Phylogenetics and cytology of a pantropical orchid genus *Polystachya* (*Polystachyinae*, *Vandae*, *Orchidaceae*): evidence from plastid DNA sequence data. *Taxon*, v. 59, n. 2, p. 389-404, 2010.
- TEIXEIRA, A. L.; ROCHA, R. B.; RAMALHO, A. R. Melhoramento genético, registro e proteção de cultivares de *Coffea canephora* para o Estado de Rondônia. Embrapa Rondônia-Documents (INFOTECA), Porto Velho-RO, 2011.