

DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO MOLECULAR PARA A IDENTIFICAÇÃO DE VARIEDADES CLONAIS DE *Coffea canephora* POR MEIO DE PCR¹

Nathália Gomes Mattos², Fernanda de Araújo Carneiro³, Wendel Willian De Jesus Carneiro⁴, Jéssica Coelho Valeriano⁵, Sinara Oliveira de Aquino⁶, Aymbiré F. Almeida da Fonseca⁷, Gabriel Ferreira Bartholo⁸, Alan Carvalho Andrade⁹

¹ Trabalho financiado pelo Consórcio Pesquisa Café e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES

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, UFLA, Lavras-MG, Brasil, wendelwill11@gmail.com

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

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

⁷ Pesquisador, Dr, Embrapa Café/INCAPER, Vitória-ES, aymbire.fonseca@embrapa.br

⁸ Pesquisador, Dr, Embrapa Café, Brasília - DF, gabriel.bartholo@embrapa.br

⁹ Pesquisador, PhD, Embrapa Café, Lavras-MG, alan.andrade@embrapa.br

RESUMO: O café Conilon, espécie *Coffea canephora*, é uma planta perene, diploide ($2n = 2 \times = 22$), alógama, resultando em alta variabilidade genética. Desta forma, a lavoura quando formada a partir de sementes pode resultar em plantas com características muito discrepantes. Neste cenário, a produção de mudas é de grande valia para que a lavoura seja implantada de forma homogênea. Uma variedade clonal, com mudas provenientes de um trabalho prévio de seleção de plantas matrizes, apresentam as seguintes vantagens em relação à de sementes: menor custo de implementação, maior produtividade, maior uniformidade de maturação, melhor qualidade do grão, ciclo diferenciado de maturação e programação escalonada de colheita, proporcionando sucesso na formação da lavoura. O Brasil é um importante produtor de café e o desenvolvimento de novas variedades faz-se necessário para manter e/ou aumentar sua eficiência na produção. A legislação brasileira regulamenta a comercialização de novas sementes e mudas no mercado, e que envolve os conceitos de registro e proteção de cultivares. A Lei no 10.711, de 05 de agosto de 2003 e a Lei no 9.456, de 25 de abril de 1997 e suas regulamentações dispõem sobre o Sistema Nacional de Sementes e Mudanças e institui o direito de proteção de cultivares respectivamente. O registro de uma cultivar, no Registro Nacional de Cultivares permite a produção, o beneficiamento e a comercialização de sementes e mudas; Por outro lado, a proteção da cultivar no Serviço Nacional de Proteção de Cultivares dá o direito à propriedade intelectual ao seu obtentor. Este registro e/ou proteção são baseados apenas em características morfológicas, sendo que o melhorista responsável pelo desenvolvimento da variedade assegura a descrição, fato este, que pode não ser preciso no diagnóstico precoce dos clones, visto que as características morfológicas só podem ser analisadas após o desenvolvimento da planta. Desta forma, o objetivo do presente trabalho visou desenvolver um método molecular que pode ser utilizado para a identificação de variedades clonais de *C. canephora*, registradas e/ou protegidas no Brasil. Os clones componentes dessas variedades clonais, foram genotipados utilizando-se a plataforma Coffee Axiom chip – 26K desenvolvido pela Embrapa, a partir do genoma de referência, contendo cerca de 25 mil SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*). Como resultado desta genotipagem foram obtidos 25.456 SNPs, destes 22.889 marcadores (89,88%) foram classificados com alta resolução, dos quais 20.424 (80,23%) foram polimórficos para o conjunto de indivíduos das variedades analisadas. Os SNPs foram analisados e 8 deles foram selecionados para serem possíveis candidatos no uso da distinção alélica para a possível identificação dos clones de Conilon que compõem as variedades registradas e/ou protegidas no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2017).

PALAVRAS-CHAVE: *Coffea canephora*, SNPs, Variedades Clonais, Identificação molecular

IDENTIFICATION OF 'POTENTIAL SNPs TO DISCRIMINATE CLONES OF *Coffea canephora* VARIETIES BY PCR

ABSTRACT: Conilon coffee belongs to the species *Coffea canephora*, which is a diploid ($2n = 2 \times = 22$), perennial, allogamous plant with a high genetic variability. Consequently, a plantation established from seeds will likely have plants with highly diversified characteristics. Accordingly, the production of seedlings is of great value for the success of crop implementation. Using clones produced from superior genotypes instead of seeds has some advantages such as lower implementation costs, higher productivity, higher uniformity of maturation, better grain quality, differentiated cycle of maturation and staggered harvest scheduling. Brazil is an important coffee producer, and the development of new varieties is important to maintain or even increase its production. Trading new seeds and seedlings, which involves the concepts of registration and protection of cultivars, depends on Brazilian legislation. Law No. 10.711 of August 5, 2003 and Law No. 9,456 of April 25, 1997 and their regulations on the National System of Seeds and Cuttings and regulates the right of protection of cultivars, respectively. Registering a cultivar in the National Register of Cultivars allows the production, processing and marketing of seeds and cuttings. Conversely, the protection of a cultivar in the National Service of Protection of Cultivars gives right to the intellectual property to its owner. The registration and

protection are based only on morphological characteristics, which are described and assured by the breeder, which can not be prior diagnosis of the clones, since morphological characteristics only can be analyzed after the development of the plant. Therefore, the objective of this work is to develop a molecular method for the identification of the different clones of *C. canephora*, registered and/or protected in Brazil. The clones that compose those varieties were genotyped, using the Coffee Axiom chip – 26K developed by Embrapa based on the reference genome, containing around 25,000 SNPs (Single Nucleotide Polymorphism). As a result of this genotyping we had 25,456 SNPs, while 22,889 markers (89.88%) were classified with high resolution, of which 20,424 (80.23%) were polymorphic for set of individuals of the varieties analysed. The SNPs were analyzed and 8 of them were selected as potential candidates for the allelic distinction during the identification of Conilon clones that compose all varieties that are registered and/or protected in Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply (2017).

KEY WORDS: *Coffea canephora*, SNPs, Clonal Varieties, Molecular Identification

INTRODUÇÃO

O cafeeiro pertencente à família *Rubiaceae*, subfamília *Ixoroideae*, tribo *Coffeae*, a qual é constituída por dois gêneros: *Coffea* L. e *Psilanthus* Hook f.. É uma planta perene, tem origem no continente africano, apresenta 126 espécies identificadas, é diploide ($2n = 2 \times = 22$) e alógama (BERTRAND et al., 2003; ESPINDULA et al., 2011; TEIXEIRA, 2011). Devido a alogamia, a lavoura é, normalmente, formada a partir de mudas de variedades clonais. A garantia das variedades de mudas de café que o agricultor adquire é assegurada pelo MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). A certificação é concedida após algumas análises, como certificação de sua variedade, qualidade fisiológica, física e fitossanitária. O melhorista responsável pelo desenvolvimento da variedade assegura características morfológicas, as quais o registro e/ou proteção são baseados (BRASIL, 2019).

Sendo assim, o objetivo do presente trabalho visa desenvolver um método molecular para a identificação de variedades clonais de *C. canephora*, registradas e protegidas no Brasil. Os clones componentes dessas variedades foram genotipados utilizando-se a plataforma Coffee Axiom chip – 26K (Affymetrix) desenvolvido pela Embrapa, contendo cerca de 25 mil SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*) (ANDRADE et al, 2017). Com base nesses resultados, o presente trabalho identificou e selecionou SNPs capazes de diferenciar os diferentes clones componentes das variedades clonais. Com base nesses SNPs, um conjunto de *primers* capaz de diferenciar os diferentes clones componentes das variedades clonais em estudo está sendo validado.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras foliares das diferentes variedades clonais comerciais registradas (TABELA 1) e/ou protegidas (TABELA 2) a serem estudadas, foram coletadas, dessecadas em sílica gel e enviadas ao Laboratório de Genética Molecular, localizado no prédio da Agência de Inovação do Café (InovaCafé), na Universidade Federal de Lavras, onde os experimentos foram realizados.

Tabela 1. Cultivares registradas no MAPA que foram analisadas no projeto.

Variedades	Clones	
EMCAPA 8111	EMC 8111 - Cl. 02/86	EMC 8111 - Cl. 36/86
	EMC 8111 - Cl. 03/86	EMC 8111 - Cl. 104B/86
	EMC 8111 - Cl. 26/86	EMC 8111 - Cl. 104A/86
	EMC 8111 - Cl. 110B/86	EMC 8111 - Cl. 29/86
	EMC 8111 - Cl. 154/86	
EMCAPA 8121	EMC 8121 - Cl. 07/86	EMC 8121 - Cl. 132/86
	EMC 8121 - Cl. 11/86	EMC 8121 - Cl. 128/86
	EMC 8121 - Cl. 16/86	EMC 8121 - Cl. 46/86
	EMC 8121 - Cl. 116/86	EMC 8121 - Cl. 109A/86
	EMC 8121 - Cl. 110A/86	EMC 8121 - Cl. 149/86
	EMC 8121 - Cl. 100/86	EMC 8121 - Cl. 201/86
	EMC 8121 - Cl. 120/86	EMC 8121 - Cl. 14/86
EMCAPA 8131	EMC 8131 - Cl. 153/86	EMC 8131 - Cl. 49/86
	EMC 8131 - Cl. 19/86	EMC 8131 - Cl. 45/86
	EMC 8131 - Cl. 139/86	EMC 8131 - Cl. 32/86
	EMC 8131 - Cl. 99/86	EMC 8131 - Cl. 143/86
	EMC 8131 - Cl. 106/86	

Variedades	Clones	
EMCAPA 8141 - ROBUSTÃO CAPIXABA	RB 8141 - Cl. 02/86	RB 8141 - Cl. 14/86
	RB 8141 - Cl. 03/86	RB 8141 - Cl. 75/87/1
	RB 8141 - Cl. 07/86	RB 8141 - Cl. 24/93
	RB 8141 - Cl. 19/86	RB 8141 - Cl. 74/87/1
	RB 8141 - Cl. 120/86	RB 8141 - Cl. 23/93
VITÓRIA – INCAPER 8142	VT 8142 - Cl. 67/87/1 - 1V	VT 8142 - Cl. 23/93 - 8V
	VT 8142 - Cl. 73/87/1 - 2V	VT 8142 - Cl. 24/93 - 9V
	VT 8142 - Cl. 83/87/1 - 3V	VT 8142 - Cl. 31/93 - 10V
	VT 8142 - Cl. 77/87/1 - 4V	VT 8142 - Cl. 32/93 - 11V
	VT 8142 - Cl. 76/87/1 - 5V	VT 8142 - Cl. 02/86 - 12V
	VT 8142 - Cl. 48/89 - 6V	VT 8142 - Cl. 153/86 - 13V
	VT 8142 - Cl. 22/93 - 7V	

Tabela 2. Cultivares protegidas no MAPA que foram utilizadas no projeto.

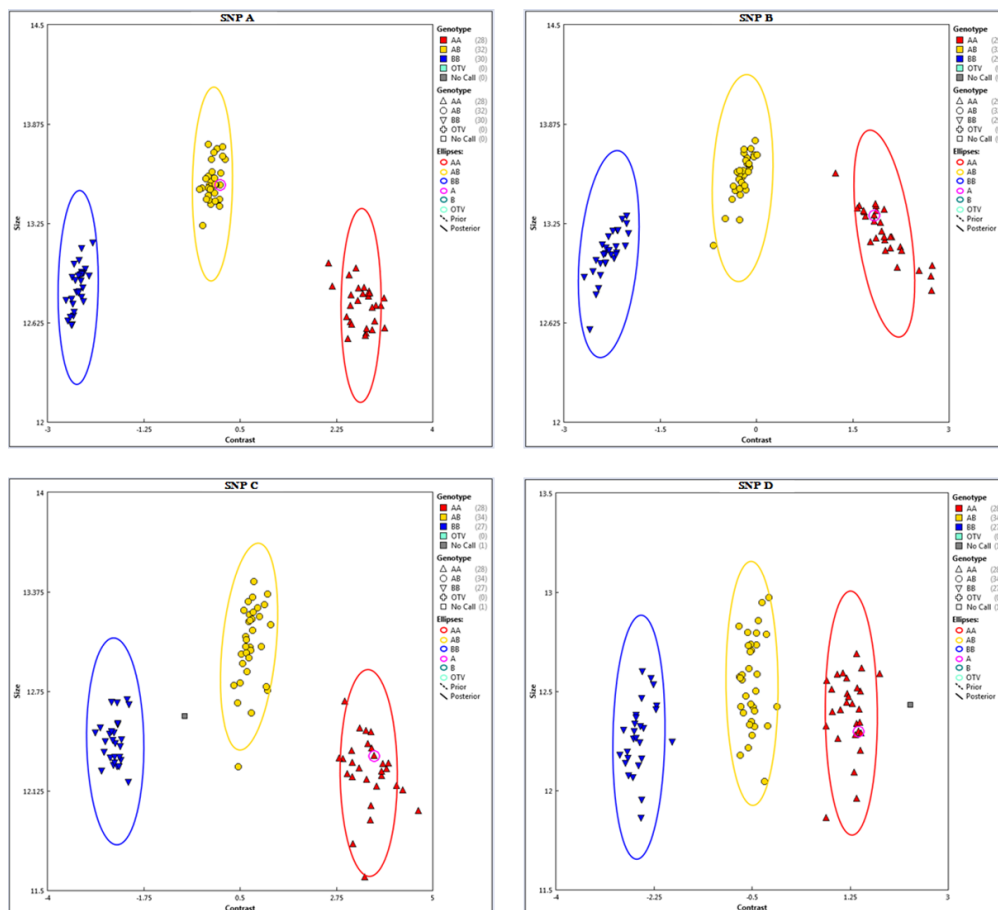
Variedades	Clones	
DIAMANTE INCAPER 8112	DMT 8112- Cl. 101	DMT 8112- Cl. 106
	DMT 8112- Cl. 102	DMT 8112- Cl. 107
	DMT 8112- Cl. 103	DMT 8112- Cl. 108
	DMT 8112- Cl. 104	DMT 8112- Cl. 109
	DMT 8112- Cl. 105	
JEQUITIBÁ INCAPER 8122	JEQ 8122 - Cl. 201	JEQ 8122 - Cl. 206
	JEQ 8122 - Cl. 202	JEQ 8122 - Cl. 207
	JEQ 8122 - Cl. 203	JEQ 8122 - Cl. 208
	JEQ 8122 - Cl. 204	JEQ 8122 - Cl. 209
	JEQ 8122 - Cl. 205	
CENTENÁRIA INCAPER 8132	CEN 8132 - Cl. 301	CEN 8132 - Cl. 306
	CEN 8132 - Cl. 302	CEN 8132 - Cl. 307
	CEN 8132 - Cl. 303	CEN 8132 - Cl. 308
	CEN 8132 - Cl. 304	CEN 8132 - Cl. 309
	CEN 8132 - Cl. 305	
BRS OURO PRETO	BRS OP-RD1	BRS OP-RD9
	BRS OP-RD2	BRS OP-RD10
	BRS OP-RD3	BRS OP-RD11
	BRS OP-RD4	BRS OP-RD12
	BRS OP-RD5	BRS OP-RD13
	BRS OP-RD6	BRS OP-RD14
	BRS OP-RD7	BRS OP-RD15
	BRS OP-RD8	

Vale ainda ressaltar que alguns clones pertencem a mais de uma variedade clonal, desta maneira foram utilizados apenas um dos clones para se realizar as análises. O DNA genômico foi extraído pelo método de Russell et al. 2010 (INGLIS; PAPPAS; GRATTAPAGLIA, 2016). Os clones de *C. canephora* em estudo 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. Amostras com um valor controle de qualidade <0,82 e taxa de chamada de amostra <0,97 foram excluídas da análise adicional da genotipagem. Executando-se o guia de genotipagem (“Axiom Best Practices Genotyping Workflow”), os SNPs foram classificados em seis classes de qualidade de acordo com seu desempenho de agrupamento em relação a várias medidas de controle de qualidade. Estas classes são: (1) "Poly High Resolution" (PHR), que são polimórficos e passam no controle de qualidade (QC); (2) "No Minor Homozygote" (NMH), que passam no QC, mas apenas dois clusters são observados; (3) "Off-Target Variant" (OTV), que possui um cluster adicional de baixa intensidade resultante de ligeiros desajustes entre a sonda e as sequências para esse grupo de indivíduos; (4) "Mono High Resolution" (MHR), o qual o QC é obtido, mas são monomórficos; (5) "CallRate Below Threshold" (CRBT), onde a taxa de chamada de genótipos é inferior a 97%; e (6) "Other", onde o padrão de cluster SNP resultante não se enquadra em nenhuma das classes anteriores. Foram selecionados os SNPs que melhor separassem os clones, os quais pertenciam à classe PHR, dando prioridade para os homozigotos e que apresentem o maior valor de “Minor Allele Frequency” (MAF), o qual corresponde à frequência do segundo menor alelo. Foram mantidos apenas SNPs que apresentaram alta qualidade, (GQ>98). Sendo que, também, foram descartados os SNPs com alta proporção de valores faltantes e aqueles que apresentarem a MAF a 0,01, de maneira, que fosse minimizado o impacto de erros da genotipagem.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As análises de bioinformática possibilitaram a escolha de 8 SNPs que no conjunto de seus resultados foram capazes de separar todos os clones das diferentes variedades em estudo. Os SNPs, que separam os clones em sua maioria, são resultados das combinações entre os SNPs A, B, C, D (FIGURA 1), os demais separam algumas particularidades.

Figura 1. Resultado dos SNPs A, B, C e D selecionados com o guia de genotipagem (“Axiom Best Practices Genotyping Workflow”)



De posse destes resultados foram desenhados primers para possibilitar a distinção alélica, compondo o perfil genotípico de cada clone componente das variedades clonais, de maneira que cada um seja identificado com um resultado único. Estudos validação e avaliação da eficiência destes primers para a discriminação alélica por PCR em tempo real estão em andamento, o que proporcionará um método molecular para a identificação dos clones que se encontram registrados e protegidos.

CONCLUSÃO

Um método molecular para a identificação de clones componentes das variedades de *C. canephora* registradas e protegidas no MAPA está em fase final de desenvolvimento e validação.

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
- 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

BRASIL, MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento Disponível em:

<<http://www.agricultura.gov.br/>> Acesso em 01 de ago. 2019

ESPINDULA, M. C. et al. Vantagens do uso de clones no cultivo de cafeeiros canéfora (Conilon e Robusta). Porto Velho, RO: Embrapa Rondônia, 2011.

INGLIS, P. W.; PAPPAS, M. de C. R.; GRATTAPAGLIA, 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

RUSSELL, A. et al. Phylogenetics and cytology of a pantropical orchid genus *Polystachya* (Polystachyinae, Vandaeae, 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-Documentos (INFOTECA), Porto Velho-RO, 2011.