

IDENTIDADE GENÉTICA POR MARCADORES MICROSSATÉLITES DO CLONE LB80 DE *Coffea canephora*

Aline dos Santos Bergamin¹, Carolina Oliveira Bernardes¹, Viviane Alexia Correia Silva¹, Lidiane dos Santos Gomes Oliveira¹, Inorbert Melo Lima², Adésio Ferreira¹, Marcia Flores da Silva Ferreira¹

¹Universidade Federal do Espírito Santo, Alto Universitário, S/N Guararema, 29500-000 - Alegre-ES, Brasil, alinebergamin258@hotmail.com, carolinabernardes84@yahoo.com.br, vivianeac.correia@gmail.com, lidianegomes31@gmail.com, adesio.ferreira@ufes.br, mfloressf@gmail.com.

²Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural (Incaper), Estação Experimental de Linhares, Rodovia BR 101, Km 151, Norte, Linhares - ES. inorbert@incaper.es.gov.br

Resumo

O *Coffea canephora*, especialmente o conilon, possui grande relevância socioeconômica para o Espírito Santo, sendo cultivado amplamente por sua alta produtividade e adaptação. A propagação clonal é prática consolidada, mas a ausência de ferramentas moleculares confiáveis compromete a identidade genética das mudas, favorecendo erros e fraudes. A caracterização morfológica é limitada, reforçando a necessidade do uso de marcadores moleculares, como os microsatélites (SSR), que são precisos e reprodutíveis. Neste estudo utilizamos um conjunto de SSRs selecionados aplicados ao clone LB80, revelando divergências genéticas entre amostras comercializadas oriundas de diferentes viveiros, o que indica falhas na fidelidade clonal e riscos à uniformidade produtiva. Os resultados confirmam a eficiência dos SSRs como ferramenta de certificação, destacando a necessidade de políticas de controle genético para garantir autenticidade, rastreabilidade e sustentabilidade da cafeicultura capixaba.

Palavras-chave: Café Conilon. Microsatélites. Polimorfismo. SSR.

Área do Conhecimento: Ciências Agrárias (Agronomia)

Introdução

O *Coffea canephora* é uma das espécies de maior importância econômica para o Brasil, e apresenta grande relevância socioeconômica para o Espírito Santo (CONAB, 2021), sendo majoritariamente cultivado em diferentes regiões e responsável por significativa parcela da produção nacional, sendo responsável por expressiva geração de emprego e renda. Entre suas variedades botânicas, destacam-se o conilon e o robusta, amplamente cultivados em função de sua rusticidade, elevada produtividade e adaptação às condições locais.

No atual cenário da cafeicultura capixaba, a propagação clonal é uma prática consolidada e amplamente utilizada para garantir uniformidade, produtividade e qualidade (Silva et al., 2023). Entretanto, a ausência de ferramentas moleculares padronizadas para a verificação da identidade genética dos clones favorece a ocorrência de erros e fraudes na produção e comercialização de mudas, comprometendo a sustentabilidade da cadeia produtiva.

A caracterização morfológica, embora útil, apresenta limitações devido à influência do ambiente e à semelhança fenotípica que clones geneticamente distintos podem apresentar (Kıraç et al., 2022), dificultando a certificação e a rastreabilidade de materiais clonais, representando um desafio para o setor. Sendo assim, torna-se essencial o desenvolvimento de métodos complementares, robustos e independentes do ambiente, capazes de assegurar a correta identificação genética desses materiais. O uso de marcadores moleculares de DNA surge como uma ferramenta estratégica, por serem independentes do ambiente, reprodutíveis e capazes de fornecer informações detalhadas sobre a identidade genética dos indivíduos. Dentre os diferentes tipos de marcadores, os marcadores microsatélites (SSR) que constituem uma ferramenta molecular de alta precisão, destacando-se por

A Ciência do NANO e seu impacto transformador no MACRO

se apresentarem altamente polimórficos, serem multialélicos, codominantes e locus-específicos, possibilitando a confiabilidade na geração de perfis moleculares individuais (fingerprints) (Geethanjali, et al., 2024; Sulistyawati et al., 2024).

Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi testar e validar um conjunto de marcadores SSR, altamente polimórficos e reprodutíveis para comparar o perfil molecular de alelos do clone comercial de *C. canephora* LB80, oriundo de 13 viveiros e jardins clonais do estado do Espírito Santo. Os resultados obtidos subsidiarão análises de diversidade genética, determinação de relações de parentesco, detecção de misturas e caracterização de grupos varietais, contribuindo para maior segurança na produção, certificação, fiscalização e comercialização de mudas clonais no Espírito Santo.

Metodologia

Material Vegetal e extração do DNA

Foram coletadas 32 mudas amostras do clone LB80 de *C. canephora*, incluindo um material clonal de referência fornecido pelo Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural (INCAPER), mudas e matrizes de jardins clonais de 13 viveiros no estado do Espírito Santo (Tabela 1). As amostras coletadas foram armazenadas no freezer a -80°C por aproximadamente 24 horas, e em seguida liofilizadas por 72 horas e maceradas. Para extração de DNA foi utilizado o protocolo CTAB, com modificações (Zaidan et al., 2023), no qual utilizou-se 80 a 100 mg de tecido vegetal macerado. Em seguida, o DNA foi ressuspensão em 40 μL de TE com RNase (40 $\mu\text{g/mL}$) e deixado em banho-maria a 37°C por 30 minutos.

As amostras de DNA foram quantificadas por espectrofotômetro, no NanodropTM 2000, e adotou-se o parâmetro de pureza com relação de absorbância de 260 a 280 nm (A_{260}/A_{280}), considerando a faixa ideal entre 1,8 até 2,0. A avaliação de integridade do DNA foi realizada através da eletroforese com gel de agarose a 0,8% corado com GelRed®, e as amostras extraídas foram diluídas para a concentração final de 20 ng μL^{-1} de DNA e armazenadas em freezer a -20°C para serem utilizadas nas análises moleculares por SSRs.

Tabela 1. Listagem dos viveiros, região onde se encontram e identificação das amostras oriundas de cada um dos viveiros. Os viveiros que possuem jardim clonal, as amostras seguem: duas primeiras amostras são mudas e a terceira amostra a matriz do jardim clonal. Os viveiros sem jardim, as amostras são constituídas por 2 mudas.

Viveiro	Região	Jardim clonal	Identificação das plantas
Incaper	Sul	Referência	1
Viveiro 1	Noroeste	Sim	2, 3 e 4
Viveiro 2	Noroeste	Sim*	5 e 6
Viveiro 3	Serrana	Não/ Lavoura	7, 8 e 9
Viveiro 4	Serrana	Sim	10, 11 e 12
Viveiro 5	Serrana	Sim	13, 14 e 15
Viveiro 6	Serrana	Não	16 e 17
Viveiro 7	Serrana	Não	18 e 19
Viveiro 8	Noroeste	Sim	20, 21 e 22
Viveiro 9	Nordeste	Não	23 e 24
Viveiro 10	Nordeste	Não	25 e 26
Viveiro 11	Nordeste	Não	27 e 28
Viveiro 12	Nordeste	Não	29 e 30
Viveiro 13	Nordeste	Sim*	31 e 32

Fonte: os autores.

*Os viveiros 2 e 13 possuem jardim clonal, entretanto não se obteve amostras das matrizes clonais.

Genotipagem por marcadores SSR

Foram utilizados sete SSR para a análise de polimorfismo nos 32 indivíduos, sendo eles: CAM 16 ((TC)11), CAM 22 ((AT)15), CAM 33 ((A)13 -5bp (AG)18), CC2P4 ((AT)22), CaEST-002 e SSR34 ((AC)10 (CA)6) (Hendre, 2008; Ogutu et al., 2016; De Faria Silva et al., 2024). As reações de PCR foram feitas com um volume final de 20 μ L, contendo: 20 ng/ μ L de DNA, 1 X de PCR Buffer, 1 U Taq DNA polimerase, 0,5 mM de cada primer F/R, 0,2 mM de dNTP e 1,5 mM de MgCl₂ (Genbiotech). Para as amplificações foram utilizadas as mesmas condições no termociclador Veriti™ 96-Well Thermal Cycler (ThermoScientific®), alterando apenas as temperaturas de anelamento de cada marcador de acordo com as referências de desenvolvimento deles. A reação seguiu por 1 ciclo de três minutos, a 94 °C, 35 ciclos com 30 segundos, a 94 °C, 30 segundos a 55°C (CAM 16, CaEST-002 e SSR34), a 53°C (CC2P4), a 58°C (CAM 22 e CAM 33) e um minuto a 72 °C, com extensão final de dez minutos, a 72 °C. A análise dos produtos de PCR e análise do polimorfismo inicial foi feita através de eletroforese em gel de poliácridamida (10%) corado com GelRed®, com géis fotodocumentados.

Análise Estatística

A análise de agrupamento utilizando a matriz de distância euclidiana e similaridade, e o heatmap de polimorfismo a partir da genotipagem, foram feitos utilizando os pacotes readr, dplyr, pheatmap, RColorBrewer e o programa RStudio (Posit team, 2025), combinado com o ambiente R (R Core Team, 2024).

Resultados

O agrupamento através da matriz de similaridade genética (Figura 1) indica que as amostras não são geneticamente idênticas. A amostra utilizada como referência fornecida pelo INCAPER deveria agrupar-se com as demais amostras. Entretanto, há formação de ramos distintos entre e dentro dos viveiros, mostrando a divergência genética, sugerindo que parte das mudas comercializadas como LB80 não corresponde de fato ao clone original.

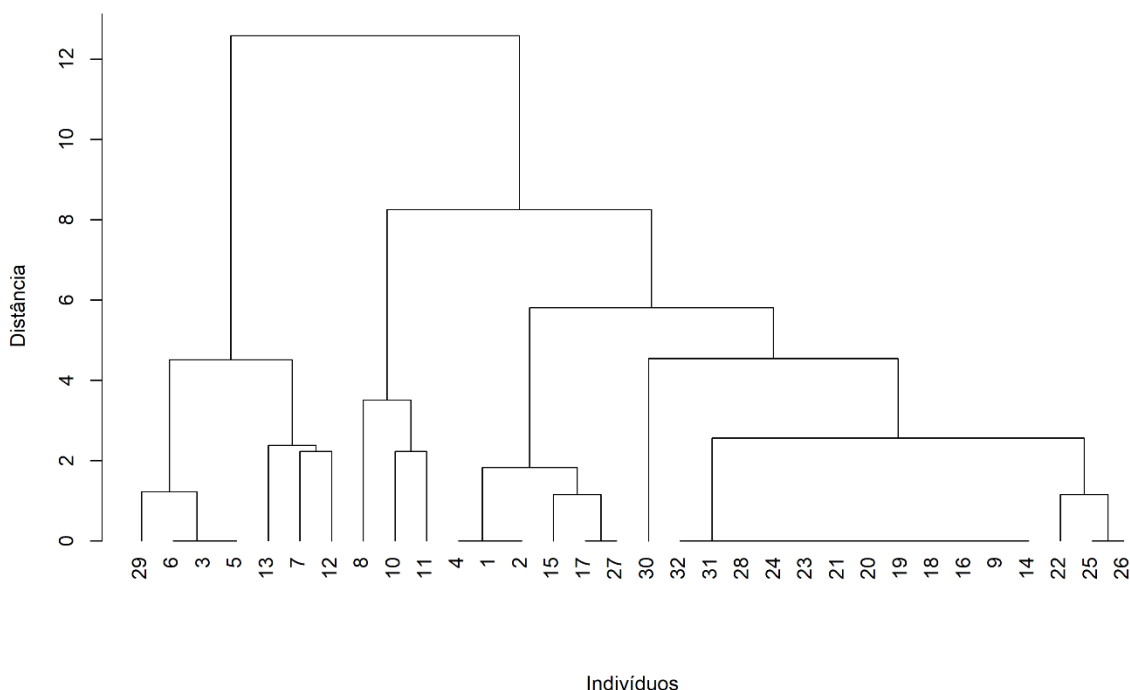


Figura 1. Dendrograma de similaridade genética de 32 amostras do clone LB80 de *Coffea canephora* de 13 viveiros do Espírito Santo, incluindo material de referência fornecido pelo INCAPER. A análise

A Ciência do NANO e seu impacto transformador no MACRO

foi realizada a partir de sete SSR, revelando a formação de grupos distintos e a presença de polimorfismo entre mudas. Fonte: os autores.

Além disso, foi observado a presença de polimorfismo entre os marcadores, isto é, diferenças no padrão alélico entre os 32 indivíduos. A presença de diferentes padrões de cor na Figura 2 indica que nem todas as amostras compartilham o mesmo perfil genético esperado do LB80. Esse resultado confirma que apenas parte dos viveiros mantém a identidade genética, demonstrando que a divergência genética encontrada pode comprometer a uniformidade, produtividade e a qualidade do café produzido.

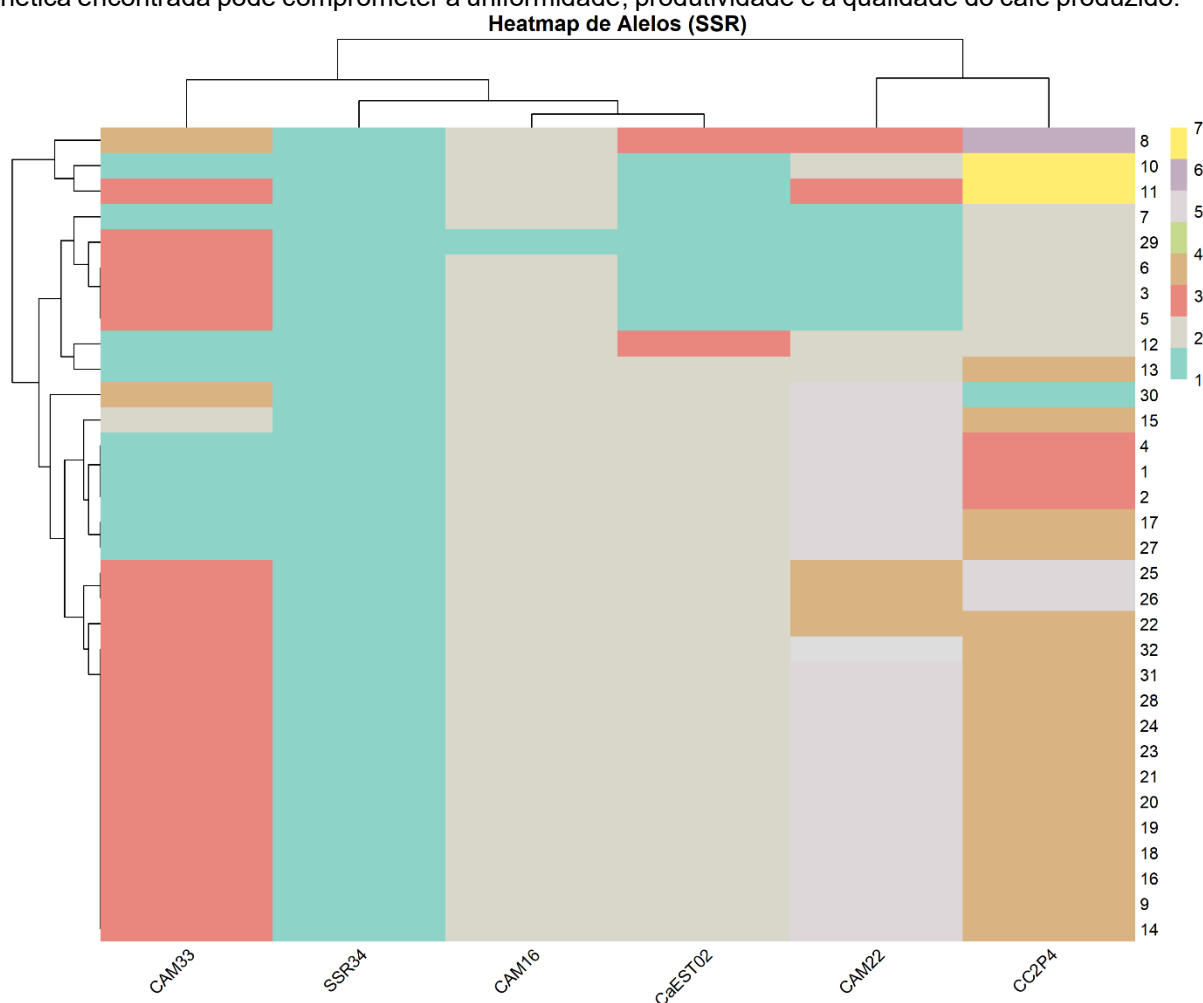


Figura 2. Heatmap da distribuição de alelos obtidos a partir de sete marcadores SSR em 32 amostras do clone LB80 de *Coffea canephora*, incluindo material de referência do INCAPER e indivíduos de 13 viveiros do Espírito Santo. A variação de cores representa diferenças no perfil alélico entre os genótipos, evidenciando a presença de polimorfismo e a formação de padrões heterogêneos. Fonte: os autores.

Discussão

A análise de identidade genética entre mudas e matrizes do clone LB80 utilizando sete SSR permitiu identificar variações genéticas relevantes entre mudas comercializadas, provenientes de diferentes viveiros do Espírito Santo. O dendrograma revelou a formação de grupos distintos, demonstrando que nem todas as plantas comercializadas como LB80 compartilham o mesmo perfil genético do material de referência fornecido pelo INCAPER.

Essa divergência indica que parte das mudas em circulação não correspondem fielmente ao clone original, refletindo falhas no processo de produção de mudas, seja na rastreabilidade e/ou distribuição

das mudas, ou ainda mutações genéticas pontuais e naturais que podem ocorrer durante a propagação vegetativa. De acordo com Hofmeister e colaboradores (2020), o acúmulo de mutações somáticas pode levar à divergência genética e, ocasionalmente, também fenotípica entre linhagens vegetativas dentro de um mesmo indivíduo e entre indivíduos. Essas mutações podem surgir de erros durante a replicação ou de danos ao DNA causados por mutagênicos exógenos ou reações endógenas a qualquer momento durante o crescimento celular (Gao et al., 2016).

Os heatmaps de alelos confirmam esse cenário, uma vez que evidenciam a ocorrência de polimorfismo entre os indivíduos analisados. Enquanto algumas amostras apresentaram padrões alélicos homogêneos e compatíveis com o clone de referência, outras mostraram variação significativa, sugerindo a presença de materiais geneticamente distintos. Essa heterogeneidade pode resultar tanto de mutações, quanto da introdução acidental de plantas oriundas de sementes, de erros de identificação nos viveiros ou até mesmo da comercialização de clones diferentes sob a mesma denominação de LB80.

Do ponto de vista agrônomo, essas discrepâncias são preocupantes, uma vez que a propagação clonal visa assegurar uniformidade e estabilidade produtiva. Estudos anteriores reforçam esse alerta, destacando a importância do controle genético rigoroso para garantir a autenticidade de clones em programas de melhoramento e sistemas de produção de mudas (Ferrão et al., 2019; Zaidan et al., 2023).

Ademais, os resultados obtidos evidenciam a eficiência dos SSRs na detecção de variação genética entre indivíduos do mesmo clone em *C. canephora*, corroborando sua aplicabilidade como ferramenta de certificação e rastreabilidade. A implementação de análises moleculares rotineiras nos viveiros pode contribuir para assegurar a identidade genética dos materiais clonais disponibilizados ao produtor, fortalecendo a cadeia produtiva e evitando perdas associadas à utilização de mudas geneticamente inconsistentes.

Conclusão

Os resultados demonstram que há variação significativa entre materiais de LB80 de diferentes viveiros, evidenciando problemas relacionados a fidelidade clonal na cadeia de produção de mudas de *C. canephora* no Espírito Santo. Sendo assim, destacando-se a necessidade de políticas de certificação genética e uso de marcadores moleculares, associando à transferência de tecnologia e conscientização dos viveiristas para garantir a pureza e a autenticidade do material comercializado, sendo fundamentais para a consolidação da cafeicultura sustentável, garantindo a qualidade e competitividade do café conilon no cenário nacional e internacional.

Referências

De Faria Silva, L., Leichtweis, B. G., Silva, A. C. A., Rocha, R. B., Teixeira, A. L., & Caixeta, E. T. Fingerprinting Amazonian coffees: assessing diversity through molecular markers. *Euphytica*, v. 220, n. 2, p. 28, 2024. <https://doi.org/10.1007/s10681-023-03274-2>

Ferrão, R. G.; Fonseca, A. F. A. DA.; Ferrão, M. A. G.; DE Muner, L. H. Conilon Coffee: The coffea canephora produced in Brasil. 3rd Updated and expanded. Vitória, ES: 2019, 974 p.

Gao, Z., Wyman, M. J., Sella, G., & Przeworski, M. Interpreting the dependence of mutation rates on age and time. *PLoS biology*, v. 14, n. 1, p. e1002355, 2016. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002355>

Geethanjali, S., Kadirvel, P., Anumalla, M., Hemanth Sadhana, N., Annamalai, A., & Ali, J. Streamlining of simple sequence repeat data mining methodologies and pipelines for crop scanning. *Plants*, v. 13, n. 18, p. 2619, 2024. <https://doi.org/10.3390/plants13182619>

Hendre, P. S., Phanindranath, R., Annapurna, V., Lalremruata, A., & Aggarwal, R. K. Development of new genomic microsatellite markers from robusta coffee (*Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner) showing broad cross-species transferability and utility in genetic studies. *BMC plant biology*, v. 8, n. 1, p. 51, 2008. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-8-51>

A Ciência do NANO e seu impacto transformador no MACRO

Hofmeister, B. T., Denkena, J., Colomé-Tatché, M., Shahryary, Y., Hazarika, R., Grimwood, J., ... & Schmitz, R. J. A genome assembly and the somatic genetic and epigenetic mutation rate in a wild long-lived perennial *Populus trichocarpa*. **Genome biology**, v. 21, n. 1, p. 259, 2020. <https://doi.org/10.1186/s13059-020-02162-5>

Kıraç, H., Dalda Şekerci, A., Coşkun, Ö. F., & Gülşen, O. Morphological and molecular characterization of garlic (*Allium sativum* L.) genotypes sampled from Turkey. *Genetic Resources and Crop Evolution*, v. 69, n. 5, p. 1833-1841, 2022. <https://doi.org/10.1007/s10722-022-01343-4>

Ogutu, C., Fang, T., Yan, L., Wang, L., Huang, L., Wang, X., ... & Han, Y. Characterization and utilization of microsatellites in the *Coffea canephora* genome to assess genetic association between wild species in Kenya and cultivated coffee. *Tree Genetics & Genomes*, v. 12, n. 3, p. 54, 2016. <https://doi.org/10.1007/s11295-016-1014-y>

Silva, J. A. D., Esposti, M. D. D., Senra, J. F. D. B., Comério, M., Conceição, A. O. D., Zacarias, A. J., ... & Raimundo, E. G. Morphophysiological responses of Conilon coffee matrix plants in a super-dense clonal garden. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 58, p. e03078, 2023. <https://doi.org/10.1590/S1678-3921.pab2023.v58.03078>

Sulistyawati, P., Indrioko, S., Widiyatno, & Widyatmoko, A. Y. P. B. C. Characterization of *Intsia* spp. from Indonesia using microsatellite markers. *Forest Science and Technology*, v. 20, n. 4, p. 401-409, 2024. <https://doi.org/10.1080/21580103.2024.2409215>

Zaidan, I. R., Ferreira, M. F. D. S., Noia, L. R., de Arruda, V. C., Pereira do Couto, D., Moro, G. L. J., ... & Ferreira, A. Germplasm characterization of half-sib families from seminal matrices of *Coffea canephora*. *Agronomy Journal*, v. 115, n. 1, p. 108-122, 2023.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES) – projeto número 290/2024, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), à Secretaria de Estado da Agricultura, Abastecimento, Aquicultura e Pesca (SEAG), à Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) e aos Laboratórios de Biometria e de Genética da UFES por todo o apoio.