AVALIAÇÃO DA IDENTIDADE GENÉTICA POR MICROSSATÉLITES DO CLONE CM1 (*Coffea canephora*) COMERCIALIZADO EM VIVEIROS DO ESPÍRITO SANTO

Pedro Silva de Araujo[1], Anamaria Rissi Vargas[1], Aline dos Santos Bergamin[1], Viviane Alexia Correria Silva[1], Jônatas Gomes Santos[1], Fabiano Tristão Alixandre[2], Inorbert Melo Lima[3], Adésio Ferreira[1], Marcia Flores da Silva Ferreira[1].

Universidade Federal do Espírito Santo, Alto Universitário, S/N Guararema, 29500-000 - Alegre-ES, Brasil, pedro.s.araujo@edu.ufes.br, anamaria.vargas@edu.ufes.br, aline.bergamin@edu.ufes.br, vivianeac.correia@gmail.com, gomesjonatas21@gmail.com, adesio.ferreira@ufes.br, marcia.ferreira@ufes.br

[2]Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural (Incaper), Av. José Matinozo, 246, Centro – Casa do Agricultor – Brejetuba/ ES. fabianotristao@incaper.es.gov.br

[3]Instituto 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

A espécie *Coffea canephora* é importante para o Espírito Santo, sendo amplamente cultivada por sua produtividade e adaptação local. O Clone CM1 é um Conilon capixaba e apresentou alta frequência de ocorrência nos viveiros do estado em 2025. Apesar da prática de propagação clonal consolidada, a falta de ferramentas moleculares padronizadas compromete a autenticidade das mudas, levando a erros e fraudes. Este estudo desenvolveu uma metodologia de análise genética usando marcadores SSR para verificar a similaridade de clones comerciais no estado. Foram coletadas amostras de viveiros nas diferentes regiões, realizando a extração de DNA e genotipagem. Os resultados mostraram divergências genéticas entre amostras com o mesmo nome de clone, indicando falhas na fidelidade clonal, e confirmaram a eficácia dos marcadores SSR como ferramenta de certificação. Conclui-se que é necessário implementar políticas de controle e rastreabilidade para assegurar a autenticidade e sustentabilidade da produção de café no Espírito Santo.

Palavras-chave: Café. Perfil genético multilocus. Polimorfismo. SSR. Viveiros.
Área do Conhecimento: Ciências Agrárias

Introdução

A cultura do café possui papel histórico e estratégico na economia brasileira, sendo o Brasil o maior exportador mundial do produto e um dos principais produtores de *Coffea canephora* (CONAB, 2025). No Espírito Santo, a espécie é cultivada por milhares de propriedades, sendo responsável por parte expressiva do Produto Interno Bruto agrícola do estado e pela geração de milhares de empregos diretos e indiretos, consolidando-se como uma das principais fontes de renda rural da região (INCAPER, 2024)

Geneticamente, *C. canephora* é uma espécie diploide (2n = 2x = 22), de reprodução alógama e autoincompatibilidade gametofítica, características que resultam em populações naturalmente heterozigotas e geneticamente variáveis (Ramalho et al., 2016; Moraes et al., 2020). E o clone CM1 pertence ao grupo Conilon, sendo selecionado por produtor no estado do Espírito Santo. Se por um lado essa variabilidade constitui um recurso valioso para o melhoramento genético, por outro ela inviabiliza a obtenção de lavouras uniformes quando a multiplicação ocorre por sementes, razão pela qual a propagação vegetativa de clones selecionados se firmou como principal estratégia para garantir uniformidade e produtividade às lavouras (Rocha et al., 2015; Ferrão et al., 2017).

Apesar de consolidada, a cadeia de produção e comercialização de mudas clonais no estado ainda necessita de mecanismos formais de certificação genética. A combinação entre demanda crescente por mudas e fiscalização insuficiente abre espaço para que materiais sejam comercializados com identidade genética incerta, gerando prejuízos diretos à produtividade das lavouras e à confiança do produtor quanto à origem do material adquirido (PEDEAG 4, 2023).

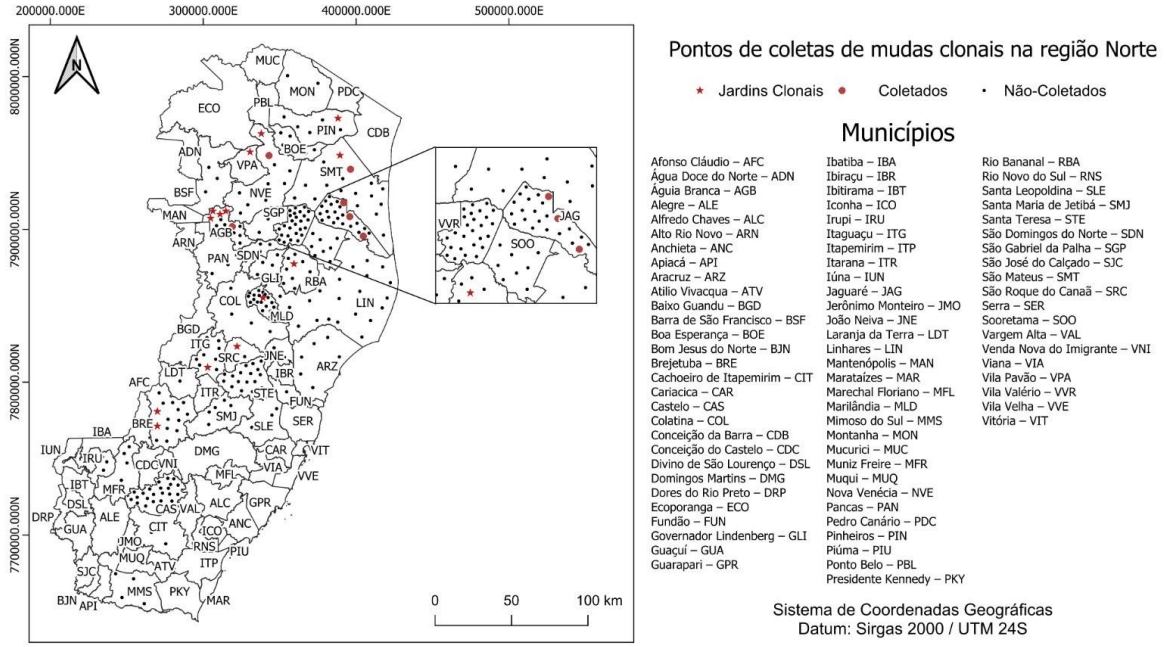
Diante dessas limitações, marcadores moleculares, como os microssatélites (SSR) vêm se firmando como alternativa mais confiável para a certificação genética de plantas, por serem codominantes, multialélicos, altamente polimórficos e não sofrerem interferência do ambiente (Powell et al., 1996; Sousa et al., 2017). Trabalhos conduzidos anteriormente no estado já identificaram divergências genéticas entre plantas matrizes e mudas comerciais de *C. canephora* (Gonçalves, 2023), assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a similaridade genética das mudas e matrizes do clone comercial CM1, coletados em diferentes viveiros do Espírito Santo.

Metodologia

Material vegetal e extração de DNA genômico

Realizou-se um levantamento em viveiros comerciais de *Coffea canephora* no estado do Espírito Santo, conduzido por meio de entrevistas para categorizá-los por porte e selecionar estabelecimentos representativos, em parceria com o Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural (Incaper). De 71 clones amostrados nos 41 viveiros da pesquisa, o clone CM1 ocorreu em 27 viveiros sendo um dos mais frequentes. Assim, foram coletadas as 56 amostras de mudas clonais de CM1, incluindo mudas e 6 plantas matrizes dos jardins clonais, em 27 viveiros diferentes.

Figura 1 **–** Distribuição de viveiros comerciais de *Coffea canephora* registrados no MAPA do estado do Espírito Santo. O estado conta com 762 viveiros registrados, demonstrando a importância da atividade na região.



Fonte: Elaborado pelo autor (2026).

O DNA genômico foi obtido a partir de amostras de folhas jovens e saudáveis de mudas e plantas matrizes dos jardins clonais (dos viveiros com jardim clonal). As folhas foram armazenadas a -80 ºC por 24 horas, em seguida, liofilizadas por 72 horas e maceradas no Magnalizer até atingir a forma de pequenas partículas. Depois, foi adicionado o tampão CTAB a 65 ºC por 30 minutos, foram realizadas sucessivas lavagens com clorofórmio (CIA), precipitação com isopropanol e acetato de amônio, lavagem do pellet com etanol 70% e ressuspensão em tampão TE contendo RNAse. A qualidade e integridade do DNA foi avaliado em espectrofotômetro Nanodrop, considerando a relação A260/A280 entre 1,8 e 2,0.

Análise de fragmentos por eletroforese capilar

A identidade genética foi avaliada por 10 *loci* microssatélites (SSR), pré-selecionados: CAM 16 (TC)11, CAM 22 (AT)15, CaEST-002 (-), CCRM14 (CT)22, CCRM17 (CT)17, SSR34 (AC)10 (CA)6,

CAM18 (TC)9, CAM32 (TA)12, Mg_257 (CA)9, CC2P4 (AT)22, CCRM33 (CT)12, SSR 84 (TC)16 CT(TC)3, CCRM16 (TC)26 (Silva 2026). Em termociclador Veriti 96-Well, empregando desnaturação inicial a 94 ºC por 3 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94 ºC por 40 segundos, anelamento dos primers entre 55 e 60 ºC por 1 minuto e extensão a 72 ºC por 30 minutos.
O anelamento dos primers, tamanho e amplificação dos fragmentos, foram confirmados utilizando os produtos das reações de PCR em gel de agarose a 1.2%, corado com GelRed, a 80V por 40 minutos. Os produtos de PCR foram organizados em bulks e submetidos à análise de fragmentos por eletroforese capilar, conduzida no sequenciador automático SeqStudio Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific). Foram transferidos para a placa do sequenciador: 1 uL do bulk, juntamente com 0.25 µL do size standart GeneScan 600 LIZ (Thermo Fisher Scientific) e 8.75 µL de formamida Hi-Di (Thermo Fisher Scientific). O mix, no bulk foi desnaturado a 95 °C por 3 minutos no termociclador Veriti 96-Well Thermal Cycler, e após a desnaturação, as amostras foram resfriadas no gelo por cerca de 5 minutos e, em seguida, submetidas à eletroforese capilar.

Análise estatística

A identificação dos alelos e a visualização dos eletroferogramas foi realizada no software GeneMapper V5.0 (SoftGenetics LLC, State College, PA, EUA). O perfil genético multilocus das amostras foi obtido por genotipagem dos *loci* SSRs e todos os alelos registrados automaticamente pelo software foram verificados manualmente para corrigir possíveis erros de processamento. Utilizou-se o limite mínimo de 600 unidades de fluorescência relativa (Relative fluorescence units – RFU) nos picos para evitar o registro de ruídos, e os dados resultantes foram organizados em uma tabela, diferenciando cada viveiro ao qual as amostras pertenciam.

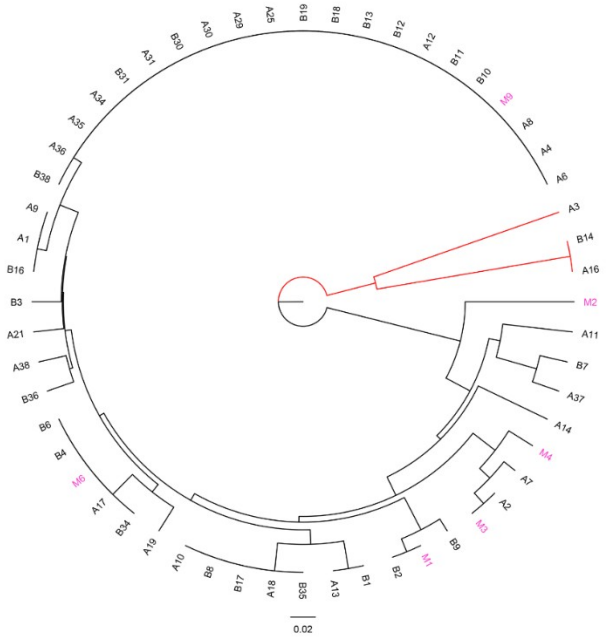
Os perfis genéticos foram organizados em matrizes de genotipagem para análises de agrupamento hierárquico (UPGMA), empregadando-se a distância de Prevosti (Prevosti et al. 1975), definida a nível individual, permitindo identificar divergências genotípicas específicas entre amostras, inclusive dentro de um mesmo viveiro. Todas as análises estatísticas e visualizações gráficas foram conduzidas no software R.

Resultados

O agrupamento hierárquico mostrou oito grupos com pelo menos duas amostras idênticas, sendo o maior grupo com 21 das 56 amostras, que incluiu apenas uma planta matriz. Nenhuma das seis plantas consideradas matriz, coletadas em jardim clonal foram idênticas geneticamente, evidenciando possíveis erros na identificação de plantas do próprio jardim clonal (Figura 3).

As plantas matrizes (M1, M2, M3, M4, M6 e M9) distribuíram-se em diferentes subgrupos, intercaladas entre as amostras oriundas dos diferentes viveiros, sem formar um subgrupo distinto. Entretanto, as amostras A3, B14 e A16 foram altamente divergentes das demais amostras, apresentando distâncias genéticas consideravelmente maiores em relação às demais, e não se agruparam com o material de referência nem com as demais mudas e matrizes.

Figura 3 **–** Identidade e divergência genética entre mudas comercializadas do clone CM1 (indicadas pelas letras A e B), plantas matrizes mantidas pelos viveiros em jardins clonais (indicadas pela letra M) de diferentes viveiros do estado do Espírito Santo (indicados pelos números) visualizada em agrupamento hierárquico UPGMA utilizando a distância de Prevosti.



Fonte: elaborada pelos autores (2026).

Discussão

Os resultados obtidos indicam grupos divergentes entre genótipos idênticos, mostrando que há problemas na identificação correta das mudas do clone CM1 comercializadas independentemente do viveiro de origem. Apesar dos subgrupos, a formação de um agrupamento principal coeso de 21 amostras idênticas, indica concordância em alguns viveiros e manutenção da identidade genética do material comercializado.

Entretanto, a alta divergência genética observada nas amostras A3, B14 e A16 em relação as demais, indica mais claramente material genético distinto do clone CM1. Esse tipo de discrepância pode ter origem em diferentes etapas da cadeia de produção, como falhas de rastreabilidade, mistura ou erros de identificação de materiais, além do acúmulo de mutações somáticas durante sucessivos ciclos de propagação vegetativa, fenômeno já observado em plantas perenes (Hofmeister, 2020).

Esses resultados evidenciam a importância da caracterização molecular como ferramenta complementar aos processos de fiscalização e certificação de viveiros de *C. canephora* no Espírito Santo. Considerando que o estado possui um número expressivo de viveiros registrados no MAPA, a ocorrência de divergência genética em amostras comercializadas como clone CM1, ainda que em proporção reduzida na amostragem avaliada, indica um risco real de circulação de material geneticamente não correspondente ao rotulado. Esse cenário reforça a necessidade de monitoramento da identidade clonal do material propagativo, de modo a assegurar a qualidade genética das mudas fornecidas aos cafeicultores e a integridade dos programas de melhoramento e clonagem que sustentam a cafeicultura conilon capixaba.

Conclusão

O clone CM1 apresentou identidade genética de 21 amostras em 56 avaliadas. Estas 21 amostras indicam 27 viveiros amostrados no estado. Causas da divergência genética entre as mudas seja na produção, identificação, ou as baixas frequências de mutação somática neste sistema devem ser exploradas, para ampliar a certificação de mudas comercializadas no estado , reforçando a importância do monitoramento genético como ferramenta de apoio à certificação e à fiscalização de viveiros de *Coffea canephora* no Espírito Santo.

Referências

BARBOSA, M. H. P. *Extração e purificação de DNA em plantas*. Viçosa: UFV, 1998.

CONAB – COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. *Primeiro levantamento da safra 2023 de café indica uma produção de 54,94 milhões de sacas*. Brasília: CONAB, 2022. Disponível em: https://www.conab.gov.br. Acesso em: 15 jun. 2026.

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.

FERRÃO, R. G.; FONSECA, A. F. A.; FERRÃO, M. A. G. *Melhoramento do café Conilon*. 3. ed. Vitória: INCAPER, 2017.

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.

GONÇALVES, A. A. *Seleção de marcadores microssatélites para determinação de perfil genético de Coffea canephora*. 2023. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, 2023.

HOFMEISTER, B. T.; DENKENA, J.; COLOMÉ-TATCHÉ, M.; SHAHRYARY, Y.; HAZARIKA, R.; GRIMWOOD, J. et al. 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.

INCAPER – INSTITUTO CAPIXABA DE PESQUISA, ASSISTÊNCIA TÉCNICA E EXTENSÃO RURAL. *Cafeicultura Conilon*. Vitória: INCAPER, 2024. Disponível em: https://incaper.es.gov.br/cafeicultura-conilon. Acesso em: 2 jul. 2026.

KAMVAR, Z. N.; TABIMA, J. F.; GRÜNWALD, N. J. Poppr: an R package for genetic analysis of populations with clonal, partially clonal, and/or sexual reproduction. *PeerJ*, v. 2, p. e281, 2014.

MORAES, M. A. S. et al. Variabilidade genética do café. *Revista Brasileira de Cafeicultura*, v. 45, n. 2, p. 67–75, 2020.

PEDEAG 4. *Plano Estratégico de Desenvolvimento da Agricultura Capixaba 2023/2032*. Vitória: SEAG, 2023.

POSIT TEAM. *RStudio: Integrated Development Environment for R*. Boston: Posit Software, 2025.

POWELL, W. et al. The utility of SSRs for molecular characterization of plant genotypes. *Euphytica*, v. 92, p. 135–142, 1996.

PREVOSTI, A.; OCAÑA, J.; ALONSO, G. Distances between populations of *Drosophila subobscura*, based on chromosome arrangement frequencies. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 45, n. 6, p. 231 –241, 1975.

RAMALHO, A. R. et al. Progresso genético da produtividade com seleção de clones de *Coffea canephora*. *Revista Ciência Agronômica*, v. 47, p. 516–523, 2016.

ROCHA, R. B. et al. Mudas clonais de café. *Revista de Agricultura Tropical*, v. 31, n. 1, p. 45–50, 2015.

SOUSA, T. V. et al. Marcadores moleculares no melhoramento do café. *Journal of Agricultural and Environmental Sciences*, v. 5, n. 2, p. 67–78, 2017.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (Fapes)/SEAG – Processo: 281/2024 - P: 2024-88LGZ. Além disso, os autores agradecem ao Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural (Incaper), 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.