DIVERSIDADE GENÉTICA POR MICROSSATÉLITES DE *Coffea canephora* CULTIVADOS NO ESPÍRITO SANTO

Viviane Alexia Correia Silva, Aline dos Santos Bergamin, Aléxia Gonçalves Pereira, Jônatas Gomes Santos, Adésio Ferreira, Marcia Flores da Silva Ferreira

Universidade Federal do Espírito Santo/Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, Alto Universitário, S/N, Guararema – 29500-000 – Alegre-ES, Brasil, vivianeac.correia@gmail.com, aline.bergamin@edu.ufes.br, alexiagp@gmail.com, gomesjonatas21@gmail.com, adesio.ferreira@ufes.br, marcia.ferreira@ufes.br

Resumo
A caracterização da variabilidade genética de *Coffea canephora* é necessária para a identificação de genótipos geneticamente distintos. Neste estudo, objetivou-se avaliar a diversidade genética presente em genótipos de *C. canephora*. Foram utilizados 17 marcadores microssatélites (SSRs) em 72 genótipos dos grupos Robustas, Híbridos e Conilon. Os SSRs apresentaram elevado polimorfismo, com média de 10,06 alelos por marcador, sendo 15 classificados como altamente informativos (PIC > 0,5). Foi observada variabilidade genética entre os genótipos avaliados, com a formação de agrupamentos e identificação de materiais geneticamente contrastantes. Os resultados demonstram a eficiência dos SSRs na caracterização da diversidade genética de *C. canephora*, podendo auxiliar no direcionamento de cruzamentos em programas de melhoramento genético e na conservação de germoplasma.
Palavras-chave: Café Conilon. Marcadores SSRs. Variabilidade genética.
Área do Conhecimento: Ciências Agrárias – Agronomia

Introdução

O café Conilon, pertencente à espécie *Coffea canephora* Pierre ex Froehner, destaca-se por sua importância comercial, sendo o Espírito Santo o maior estado produtor da espécie no Brasil, responsável por 71% da produção nacional (CONAB, 2026). É uma espécie diploide, alógama e possui autoincompatibilidade gametofítica, características que favorecem altos níveis de heterozigosidade e manutenção da variabilidade genética entre e dentro das populações (Montagnon et al., 2012; Conagin; Mendes, 1961; Ferrão et al., 2019; Silva et al., 2024a).

A presença de variabilidade é uma condição altamente relevante diante dos desafios ambientais impostos pelas mudanças climáticas como o aumento da temperatura e a ocorrência de períodos de déficit hídrico, além da pressão exercida pela presença de pragas e doenças (Kiwuka et al., 2020; Venancio et al., 2020). A diversidade genética é uma medida da variação genética em uma população com relação a um *locus* e fornece aos indivíduos e às populações a capacidade de se adaptar às mudanças ambientais, contribuindo para sua sobrevivência a longo prazo (Bhandari et al., 2017), além de constituir a base para o melhoramento genético (Colodetti et al., 2026).

Sua caracterização é importante para a conservação dos recursos genéticos, permitindo identificar materiais geneticamente semelhantes ou divergentes e auxiliar na definição de estratégias de conservação e utilização do germoplasma (Silva et al., 2025; Silva et al., 2024b). Ainda, a identificação de indivíduos contrastantes e grupos genéticos diferentes em populações de café é essencial para desenvolver novas cultivares, pois auxilia no direcionamento de cruzamentos em programas de melhoramento genético (Sousa et al., 2022), especialmente aqueles que almejam desenvolver materiais resistentes a doenças e às mudanças climáticas (Silva et al., 2025).

A caracterização da diversidade genética pode ser realizada por meio de marcadores moleculares, como os microssatélites ou *Simple Sequence Repeats* (SSRs), que apresentam alta informatividade, polimorfismo, codominância e multialelismo, características que os tornam muito úteis para estudos de diversidade genética (Kiwuka et al., 2020; Souza et al., 2013) e estrutura populacional (Silva et al., 2019) em *C. canephora*.

Dessa forma, a caracterização da diversidade genética de *C. canephora* é essencial para ampliar o conhecimento sobre a variabilidade presente nos materiais cultivados e subsidiar estratégias de conservação e melhoramento. Assim, o objetivo deste trabalho foi caracterizar a diversidade genética presente em 72 indivíduos de *C. canephora* utilizando 17 SSRs.

Metodologia

Material vegetal e extração de DNA

Foram usados 72 genótipos de *C. canephora* (Tabela 1) distribuídos entre os grupos genéticos Robusta, Híbrido e Conilon. Todos os genótipos foram coletados nos bancos ativos de germoplasma (BAG) do Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural (Incaper), localizados na Fazenda Experimental de Marilândia (FEM), em Marilândia (ES) e na Fazenda Experimental Bananal do Norte (FEBN), em Bananal do Norte (ES). O DNA genômico foi extraído a partir das amostras foliares liofilizadas seguindo o protocolo CTAB, descrita por Doyle e Doyle (1990), adaptado por Zaidan et al. (2023) para *C. canephora*. Após a extração, o DNA isolado foi quantificado por espectrofotometria utilizando NanoDrop One UV-Vis e a qualidade do DNA foi verificada em eletroforese em gel de agarose a 0,8%. As amostras foram diluídas para 20 ng.μL^{-1} e armazenadas a -20 °C.

Tabela 1 – Identificação de 72 indivíduos de *Coffea canephora* do banco ativo de germoplasma do Incaper.

Genótipos
IAC01, IAC05, IAC19, IAC21, IAC22, IAC23, IAC27, IAC32, IAC35, IAC38, IAC72, IAC73, IAC74, EP03, EP07, EP13, EP20, EP23, EP35, EP63, A1, V03, V07, R5, R2, 207, 203, BAG 558, BAG 110, BAG 138, BAG 328, BAG 380, R3, R4, R10, V01, 101, 201 (LB1), 301, 309, 407, 406, BAG 320, BAG 367, BAG 93, BAG 319, BAG 127, Sul Bahia 01, Sul Bahia 30, Sul Bahia 10, Sul Bahia 13, Sul Bahia 25, Clone 8 (R8), Clone 25 (R25), G8, R22, AS2, Clone 156, Clone 04, LB15, LB10, LB88, LB80, BG180, Clone 07, Híbrido 15, Híbrido 21, Híbrido 24, Híbrido 27, BRS1216, BRS2336, BRS3213

Fonte: produção do próprio autor.

Genotipagem de SSRs por eletroforese capilar

Para as PCRs, foram utilizados 17 SSRs, marcados com fluoróforos na extremidade 5' do *primer forward*, sendo eles: CC4P5 - (ACT)10; CAM22 - (AT)15; CaEST-002; CCRM14 - (CT)22; CCRM17 - (CT)17; SSR34 - (AC)10 (CA)6; CAM18 - (TC)9; CAM32 - (TA)12; CCRM16 - (TC)26; Mg_257 - (CA)9; CC2P4 - (AT)22; CCRM33 - (CT)12; CAM03 - (AC)11; CC3P6 - (ATA)8; CCRM42 - (GA)13; CAM16 - (TC)11; CCRM37 - (GT)10 (Silva, 2026).

As reações de PCR foram realizadas em volume final de 20 μL, contendo por reação: 20 ng.μL^{-1} de DNA, 1X PCR Buffer Mg^{2+} plus, 1,25 U de Taq DNA Polimerase (Sinapse Biotecnologia), 0,25 μM dos primers *forward/reverse* e 0,2 mM de dNTP. As amplificações foram feitas no termociclador Veriti™ 96-Well Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific) sob as seguintes condições: um ciclo de três minutos a 94°C; 35 ciclos de 40 segundos a 94 °C, um minuto a temperatura de anelamento entre 51 e 61°C, um minuto a 72 °C; seguido de extensão final de 72 °C por 30 minutos. Para confirmar o anelamento dos *primers*, tamanho e amplificação dos fragmentos, os produtos das PCR foram avaliados em gel de agarose a 2%.

Os produtos da PCR foram organizados em bulks de acordo com a fluorescência e tamanho de fragmentos dos SSRs. Para a eletroforese capilar, foi transferido para a placa do sequenciador: 1 uL do bulk, 0,25 μL do *size standart* GeneScan 600 LIZ (Thermo Fisher Scientific) e 8,75 μL de formamida Hi-Di (Thermo Fisher Scientific). A mistura foi desnaturada a 95 °C por 3 minutos no termociclador Veriti 96-Well Thermal Cycler. Após a desnaturação, as amostras foram resfriadas no gelo por 3 minutos e, submetidas à eletroforese capilar no SeqStudio Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific).

Análise dos dados

A identificação dos alelos e a visualização dos eletroferogramas foi realizada no software GeneMapper V5.0 (SoftGenetics LLC, State College, PA, EUA). Foram estimados os parâmetros para cada SSR no software GenAlEx v. 6.503 (Peakall; Smouse, 2012): número de alelos (Na), heterozigosidade observada (Ho) e esperada (He), e coeficiente de endogamia (F). O conteúdo de informação polimórfica (PIC) foi calculado no Cervus (Kalinowski et al., 2007). A análise de agrupamento foi feita no R (R Core Team, 2023), usando matriz de dissimilaridade obtida com o índice ponderado complemento (1-C) e método de agrupamento da Ligação Média Entre Grupos (UPGMA).

O agrupamento foi visualizado e editado no software FigTree v1.4.4 (https://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/) (Rambaut, 2018).

Resultados

De forma geral, todos os 17 SSRs foram polimórficos, apresentando número de alelos variando de 3 (Mg_257) a 17 (CCRM14 e CCRM17), com média geral de 10,06 (Tabela 2). A Ho variou de 0,23 (Mg_257) a 0,97 (CCRM37), enquanto a He variou de 0,27 (Mg_257) a 0,90 (CCRM14), com médias de 0,71 e 0,72, respectivamente. Os valores de PIC variaram de 0,240 (Mg_257) a 0,897 (CAM03), com média de 0,69. Dos 17 SSRs, 15 apresentaram PIC superior a 0,5. O F apresentou média de 0,01, com menor valor detectado de -0,48 (CCRM37) e maior valor de 0,28 (CAM32).

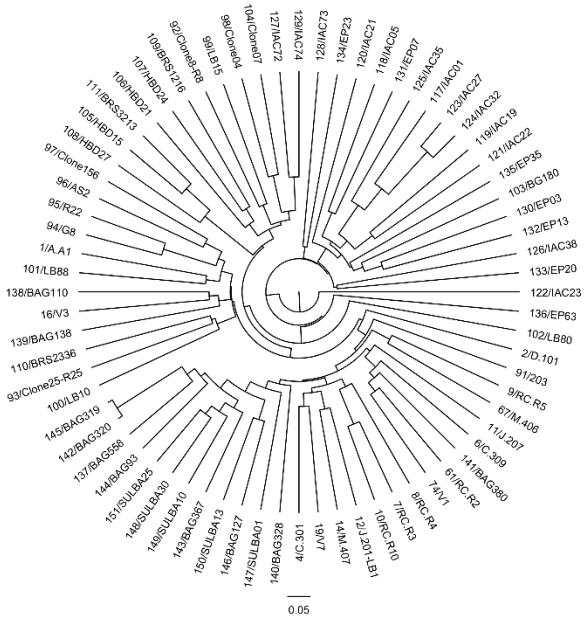
A análise de agrupamento revelou diferentes níveis de similaridade entre os genótipos e permitiu a discriminação entre eles (Figura 1). Foi observado a formação de grupos entre os materiais, com os genótipos de Robusta e Conilon permanecendo, em sua maioria, agrupados conforme sua classificação.

Tabela 2 – Parâmetros de diversidade genética estimados de 17 SSRs avaliados em 72 genótipos de *Coffea canephora.* Na: número de alelos; Ho: heterozigosidade observada; He: heterozigosidade esperada; PIC: conteúdo de informação polimórfica.

	Locus	**Na**	**Ho**	**He**	**F**	**PIC**
1	CCRM14	17	0,91	0,90	-0,01	0,89
2	CCRM16	17	0,59	0,67	0,12	0,66
3	CAM03	16	0,93	0,90	-0,02	0,90
4	CCRM17	14	0,81	0,85	0,04	0,83
5	CAM32	13	0,59	0,82	0,28	0,80
6	CC2P4	12	0,93	0,86	-0,08	0,85
7	CAM22	11	0,89	0,79	-0,11	0,77
8	CaEST-002	11	0,68	0,84	0,19	0,82
9	CCRM33	10	0,75	0,81	0,08	0,79
10	CCRM42	9	0,84	0,66	-0,26	0,63
11	SSR34	8	0,56	0,60	0,06	0,56
12	CC4P5	7	0,36	0,41	0,13	0,39
13	CAM16	7	0,75	0,69	-0,09	0,65
14	CC3P6	6	0,56	0,76	0,27	0,72
15	CAM18	5	0,72	0,70	-0,02	0,65
16	CCRM37	5	0,97	0,65	-0,48	0,59
17	Mg_257	3	0,23	0,27	0,15	0,24
	Média	10,06	0,71	0,72	0,01	0,69

Fonte: produção do próprio autor.

Figura 1 – Agrupamento entre 72 indivíduos de *C. canephora* obtido pelo método UPGMA com base no índice ponderado complemento utilizando 17 SSRs.



Fonte: produção do próprio autor.

Discussão

Os SSRs apresentaram alto nível de polimorfismo, considerando a média de 10,05 alelos em 17 SSRs. Desse total, 15 foram considerados altamente informativos (PIC > 0,5), de acordo com a classificação de Botstein et al. (1980). A presença de múltiplos alelos e os altos valores de PIC indicam que os SSRs são adequado para detectar a variabilidade genética dos materiais avaliados. Ainda, permitiram o agrupamento de diferentes indivíduos com seus respectivos grupos genéticos, o que demonstra sua utilidade na caracterização e diferenciação de acessos de *C. canephora.* Resultados semelhantes foram obtidos em estudos de diversidade genética, nos quais SSRs foram eficientes para identificação de grupos e discriminação de genótipos (Silva et al., 2024b; Sousa et al., 2017; Souza et al., 2013).

De forma geral, foi observada considerável variabilidade genética entre os materiais, evidenciada pelo número de alelos presentes nas populações e pelos níveis de heterozigosidade observados. Em parte dos SSRs, a Ho foi superior a He, resultando em valores negativos de F. Isso indica que há maior frequência de indivíduos heterozigotos em relação ao esperado e pode estar relacionado a alogamia natural e autoincompatibilidade de *C. canephora*, que favorecem a manutenção de altos níveis de heterozigosidade e a variabilidade genética natural (Silva et al., 2024a; Sousa et al., 2022; Ferrão et al., 2019). Em contraste, nos *loci* em que He foi superior a Ho, houve deficiência de heterozigotos em relação ao equilíbrio esperado, resultando em valores positivos de F. Essa variação entre os SSRs pode refletir diferenças na distribuição dos alelos entre os materiais avaliados. Ainda assim, os valores elevados de heterozigosidade em parte dos *loci* é compatível com as características reprodutivas de *C. canephora* e com a manutenção de diversidade genética na espécie.

O panorama observado nesses materiais sugere alto potencial adaptativo, considerando que populações com maior variabilidade genética tendem a apresentar maior capacidade de resposta a pressões ambientais (Kiwuka et al., 2020). A existência de diferentes níveis de diversidade entre os genótipos de *C. canephora*, associada à divergência genética entre eles, pode ser explorada na escolha de cruzamentos entre materiais ou grupos geneticamente contrastantes. Essa diversidade representa uma fonte potencial de variabilidade para programas de melhoramento e para conservação de germoplasma (Sousa et al., 2022; Oliveira et al., 2018; Souza et al., 2013). Além disso, essa variabilidade é muito relevante no contexto de mudanças climáticas, já que representa uma fonte de diversidade que pode ser explorada na seleção de materiais com alto potencial adaptativo.

Conclusão

Os SSRs utilizados nesse estudo apresentaram elevado polimorfismo e alta informatividade, proporcionando caracterização satisfatória da diversidade genética presente em *C. canephora*, indicando que esses genótipos constituem uma importante fonte de variabilidade. A identificação de genótipos e grupos contrastantes pode contribuir para a seleção de materiais de interesse a para o direcionamento de cruzamentos em programas de melhoramento, bem como permite o manejo estratégico de germoplasma de *C. canephora.*

Referências

BHANDARI, H. R. et al. Assessment of genetic diversity in crop plants-an overview. **Advances in Plants & Agriculture Research**, v. 7, n. 3, p. 279-286, 2017.

BOTSTEIN, D. et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American Journal of Human Genetics**, v. 32, n. 3, p. 314–331, 1980.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da safra brasileira de café, Brasília, DF, v.13, n. 1, primeiro levantamento, fevereiro 2026.

CONAGIN, C. H.; MENDES, A. J. T. Cyto-genetical investigations on three species of *Coffea*: Self incompatibility in *Coffea canephora*. **Bragantia**, v. 20, p. 788-804, 1961.

COLODETTI, T. F. et al. Selection of High-Yielding Genotypes of *Coffea canephora* at Transitional Altitude: Adaptability and Stability and Impacts of Water Management. **Horticulturae**, v. 12, n. 2, p. 207, 2026.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Focus**, v. 12, p. 13-15, 1990.

FERRÃO, R. G. et al. **Conilon Coffee: The *Coffea canephora* produced in Brasil.** 3rd Updated and expanded. Vitória, ES: 2019, 974 p.

KALINOWSKI, S. T.; TAPER, M. L.; MARSHALL, T. C. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. **Molecular Ecology**, v. 16, n. 5, p. 1099-1106, 2007.

KIWUKA, C. et al. Genetic diversity of native and cultivated Ugandan Robusta coffee (*Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner): Climate influences, breeding potential and diversity conservation. **PLoS One**, v. 16, n. 2, p. e0245965, 2021.

OLIVEIRA, L. N. L. et al. Selection of *Coffea canephora* parents from the botanical varieties Conilon and Robusta for the production of intervarietal hybrids. Ciência Rural, v. 48, n. 4, p. e20170444, 2018.

OLIVEIRA, R. G. et al. Genomic discrimination of the botanical groups conilon and robusta of *Coffea canephora*. **Scientific Reports**, 2026.

PEAKALL, R.; SMOUSE, P. E. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update. **Bioinformatics**, v. 28, n. 19, p. 2537–2539, 2012.

RAMBAUT, A. FigTree v1.4.4. 2018. Disponível em: http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/.

R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2023.

SILVA, L. de F. et al. *Fingerprinting* Amazonian coffees: assessing diversity through molecular markers. **Euphytica**, v. 220, n. 2, p. 28, 2024b.

SILVA, A. N. R. et al. Self-incompatibility and pollination efficiency in *Coffea canephora* using fluorescence microscopy. **Agronomy**, v. 14, p. 1564, 2024a.

SILVA, A. N. R. et al. Genetic diversity and disease resistance genes profiling in cultivated *Coffea canephora* genotypes via molecular markers. **Plants**, v. 14, n. 17, p. 2781, 2025.

DA SILVA, B. S. R. et al. Population structure and genetic relationships between Ethiopian and Brazilian *Coffea arabica* genotypes revealed by SSR markers. **Genetica**, v. 147, n. 2, p. 205-216, 2019.

SILVA, V. A. C. *Fingerprinting* em *Coffea canephora* Pierre ex Froehner: seleção e validação de microssatélites e obtenção de banco de perfis de DNA para identificação clonal. 2026. 126p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre - ES, 2026.

SOUSA, P. et al. *Coffea canephora:* Heterotic Crosses Indicated by Molecular Approach. **Plants**, v. 11, n. 22, p. 3023, 2022.

SOUSA, T. V. et al. Molecular markers useful to discriminate *Coffea arabica* cultivars with high genetic similarity. **Euphytica**, v. 213, n. 3, p. 75, 2017.

SOUZA, F. F. et al. Molecular diversity in *Coffea canephora* germplasm conserved and cultivated in Brazil. **Crop breeding and applied biotechnology**, v. 13, n. 4, p. 221-227, 2013.

VENANCIO, L. P. et al. Impact of drought associated with high temperatures on *Coffea canephora* plantations: a case study in Espírito Santo State, Brazil. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 19719, 2020.

ZAIDAN, I. R et al. Diversity and structure of *Coffea canephora* from old seminal crops in Espírito Santo, Brazil: genetic resources for coffee breeding. **Tree Genetics & Genomes**, v. 19, n. 2, p. 19, 2023.

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.