DIVERGÊNCIA GENÉTICA EM MUDAS DO CLONE R8 DE *Coffea canephora* COMERCIALIZADOS EM VIVEIROS COMERCIAIS DO ESPÍRITO SANTO

Aline dos Santos Bergamin[1], Viviane Alexia Correia Silva[1], Jônatas Gomes Santos[1], Anamaria Rissi Vargas[1], Pedro Silva de Araujo[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, aline.bergamin@edu.ufes.br, vivianeac.correia@gmail.com, gomesjonatas21@gmail.com, anamaria.vargas@edu.ufes.br, pedro.s.araujo@edu.ufes.br, 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

O café conilon (*Coffea canephora*) é economicamente importante para o Espírito Santo, sendo propagado majoritariamente por via vegetativa, o que exige fidelidade genética entre plantas matrizes e mudas comercializadas. Falhas durante a propagação clonal, podem comprometer essa identidade, com impactos relevantes na cadeia produtiva. Neste estudo 11 *loci* SSR foram usados, via eletroforese capilar, para avaliar a identidade genética de 61 amostras de mudas do clone R8 coletadas em 30 viveiros comerciais do Espírito Santo. As amostras foram comparadas entre viveiros e com uma amostra considerada como referência obtida do Incaper. Observou-se heterozigozidade observada elevada (0.82–1.00) e valores de Fis negativos em todos os viveiros. A AMOVA revelou diferenciação genética significativa entre viveiros (ΦST = 0.301 e p = 0.007), concentrada principalmente nos viveiros 12, 13 e 40, identificados de forma convergente pelas análises de Fst pareado, PCoA e UPGMA. O viveiro 40 apresentou apenas 18.2% de identidade alélica com a referência, evidenciando material propagativo não conforme.

Palavras-chave: Fidelidade clonal. Marcadores microssatélites. Rastreabilidade genética.
Área do Conhecimento: Ciências Agrárias - Agronomia

Introdução

O Espírito Santo é o principal produtor nacional de café conilon (*Coffea canephora*), espécie de grande importância socioeconômica para o estado devido à sua ampla adaptação às condições edafoclimáticas regionais e à participação expressiva na renda de pequenos e médios produtores (CONAB 2026). O estado possui aproximadamente 762 viveiros registrados no MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) como produtores de mudas de *C. canephora*, distribuídos de maneira estratégica por todo o estado, nas regiões produtoras, que movimentam milhões de mudas anualmente. Diante do alto número de viveiros e elevada produção de mudas, há um desafio regulatório, pois o Registro Nacional de Cultivares do MAPA exige a garantia da identidade genética, mas a identificação fenotípica visual nos viveiros é frequentemente inconclusiva, abrindo margem para misturas varietais (Kıraç *et al*., 2022).

A produção comercial da cultura baseia-se predominantemente na propagação vegetativa de clones selecionados, prática que permite a multiplicação em larga escala de genótipos com características agronômicas desejáveis, como produtividade e resistência a pragas e doenças, preservando a fidelidade genética da planta matriz de origem (Espindula *et al*., 2023). Entretanto, a propagação clonal em viveiros comerciais está sujeita a riscos de não conformidade genética, decorrentes de erros de rotulagem, mistura de material propagativo de diferentes origens, ou uso inadequado de estacas de plantas distintas da matriz pretendida. Tais falhas comprometem a rastreabilidade do material genético e podem gerar impactos econômicos relevantes ao longo da cadeia produtiva, uma vez que mudas

geneticamente distintas ao clone declarado podem apresentar desempenho agronômico imprevisível quando estabelecidas em campo.

A produção comercial de mudas foi iniciada em 2005, e no estado do Espírito Santo, o clone é conhecido com R8 para diferenciar de outro clone 08 que é cultivado nas lavouras do estado. As plantas do clone são de porte médio, maturação intermediária e fruto de tamanho grande, comparado aos frutos dos demais clones selecionados pelo viveirista, e apresenta alto vigor inicial, o que reflete em maiores produtividades na primeira safra (Espindula *et al*., 2023).

Nesse contexto, marcadores moleculares SSR (*Simple Sequence Repeats*) constituem uma ferramenta robusta e amplamente validada para a identificação e o controle de qualidade genética de material propagativo. Por serem marcadores codominantes, multialélicos e altamente polimórficos, os SSR são usados em análises de genética forense para a obtenção de perfis genéticos individuais únicos (*fingerprinting*) (Geethanjali *et al*., 2024), possibilitando a confirmação da identidade clonal entre mudas e plantas matrizes e a detecção de divergências genotípicas pontuais, mesmo entre amostras nominalmente pertencentes a um mesmo clone.

Diante disso, o presente trabalho utilizou marcadores SSR e eletroforese capilar para avaliar a conformidade genética de amostras de *C. canephora* do clone R8, coletadas em diferentes viveiros comerciais do Espírito Santo, com o objetivo de identificar divergências genéticas entre e dentro dos viveiros amostrados, contribuindo para a validação da genotipagem molecular como ferramenta de rastreabilidade e controle de qualidade na produção de mudas clonais de café conilon.

Metodologia

Material vegetal e extração de DNA genômico

Foram coletadas 61 amostras do clone R8 de *Coffea canephora*. Trata-se de um clone do grupo Robusta Amazônico e amplamente cultivado no Espírito Santo nos últimos anos. Utilizou-se amostras de folhas jovens e sadias de mudas e plantas matrizes dos jardins clonais de 30 viveiros do estado do Espírito Santo, registrados no MAPA, além de uma amostra utilizada como referência do clone, coletada no Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural (Incaper). Todos os materiais foram identificados e armazenadas em sacos de papel no freezer a -80 ºC por um período de 24 horas. Posteriormente, as amostras foram liofilizadas por aproximadamente 72 horas e maceradas utilizando o MagnaLyser.

A extração foi realizada seguindo o protocolo CTAB, descrito por Doyle e Doyle (1990), adaptado por Zaidan *et al*. (2023) para *C. canephora*. O DNA isolado foi quantificado e avaliado quanto a pureza por espectrofotometria utilizando NanoDrop One UV-Vis, considerando ideal a razão absorbância de 260 a 280 nm (A260/A280) e pureza entre 1.8 e 2.0, e a integridade do DNA avaliada por eletroforese em gel de agarose a 0.8%. As amostras foram diluídas para 20 ng.µL^{-1} e armazenadas a -20 °C. O experimento foi realizado no Laboratório de Genética e Melhoramento e Laboratório de Biometria da Universidade Federal do Espírito Santo, no campus Alegre.

Análise de fragmentos por eletroforese capilar

Para a obtenção dos perfis genéticos multilocus por amostra, foram utilizados 11 microssatélites (SSRs), marcados com fluoróforos na extremidade 5’ do marcador forward e selecionados com base na ótima amplificação e genotipagem consistente, picos definidos, alto sinal fluorescente, distinção clara entre alelos e baixo stutter, a saber: 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 (Silva, 2026). Para as PCRs seguiu-se o protocolo da Sinapse Biotecnologia com volume final de 20 µL, contendo por reação: 20 ng.µL-1 de DNA, 1X PCR Buffer Mg2+ 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 VeritiTM 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 (de acordo com a TA do primer), um minuto a 72 °C; seguido de extensão final de 72 °C por 30 minutos (Silva, 2026). 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.

Análises estatísticas

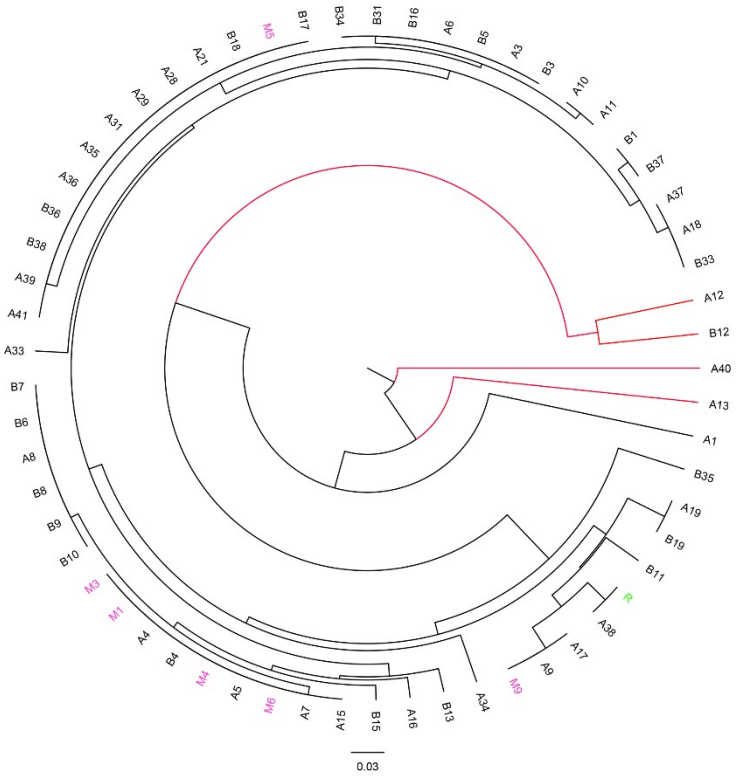
A identificação dos alelos e a visualização dos eletroferogramas foi realizada no software GeneMapper V5.0 (SoftGenetics LLC, State College, PA, EUA). O perfil genético multilocus das amostras foi obtido por genotipagem dos loci SSRs e todos os alelos registrados automaticamente pelo software foram verificados 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.

Todas as análises estatísticas e visualizações gráficas foram conduzidas no software R. Para a comparação entre viveiros, foi utilizada a distância genética de Nei (1972), calculada a partir das frequências alélicas agregadas por viveiro, tornando-se adequada ao pequeno número de indivíduos por população (1 a 3 amostras). Para a análise de agrupamento hierárquico (UPGMA), foi empregada 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. A combinação de duas distâncias, em dois níveis hierárquicos diferentes permite identificar divergências distintas, que não é possível visualizar, com o uso de distâncias isoladas.

Resultados

O agrupamento UPGMA (Figura 1), construído a partir da distância de Prevosti, evidenciou a existência de um grupo predominante de indivíduos geneticamente próximos e a presença de indivíduos dos viveiros 12, 13 e 40, por exemplo, que se conectam ao agrupamento principal em maiores distâncias genéticas. A grande maioria dos indivíduos se agrupa entre 0.20 e 0.28 de distância de Prevosti, não perto de zero, que é o esperado quando se trata de um mesmo clone. Além disso, amostras pertencentes a um mesmo viveiro não se agruparam, com exceção de amostras dos viveiros 4 (incluindo a matriz), 8, 12, 19, 36 e 37.

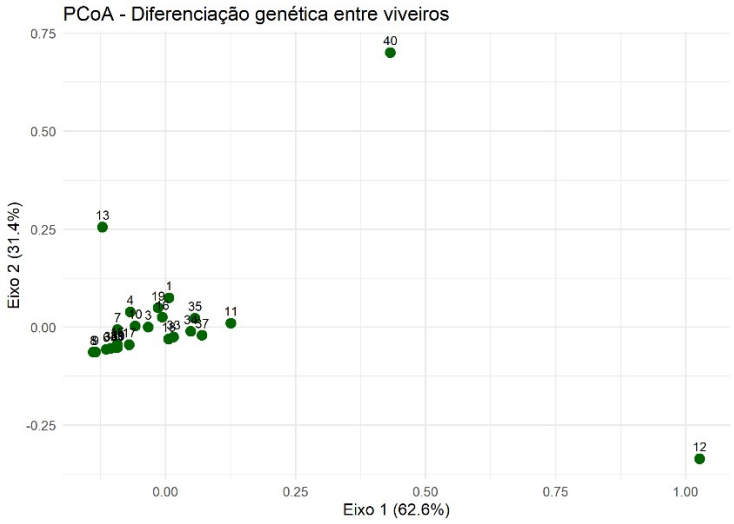
Figura 1 - Dendrograma de agrupamento hierárquico (UPGMA) construído a partir da distância genética de Prevosti entre indivíduos de *Coffea canephora* (clone R8) amostrados em diferentes viveiros do Espírito Santo. Cores e letras indicam o tipo de amostra: referência do clone (R/verde), plantas matrizes dos jardins clonais (M/rosa) e mudas (A-B/preto).



Fonte: elaborado pelo próprio autor.

A análise de coordenadas principais (PCoA) (Figura 2), baseada na distância genética de Nei, revelou que os dois primeiros eixos explicaram conjuntamente 94% da variação genética. A maior parte dos indivíduos apresentou distribuição concentrada em uma região do gráfico, indicando maior similaridade genética entre eles, entretanto, alguns indivíduos apresentaram maior afastamento em relação ao conjunto principal, destacando-se as amostras dos viveiros 12, 13 e 40. A concordância geral entre as duas abordagens indica que o padrão de proximidade e diferenciação genética observado não está restrito a uma única representação dos dados, uma vez que foi identificado utilizando duas medidas de distância genética distintas.

Figura 2 - Análise de Coordenadas Principais (*Principal Coordinate Analysis* – PcoA) comparando os genótipos do clone R8 de 30 viveiros diferentes, cada número indica um viveiro distinto.



Fonte: elaborado pelo próprio autor.

A análise dos *loci* SSR revelou elevada Ho das amostras, com valores de Ho (0.8 a 1.0) superiores aos de He (0.4 a 0.7) e consequente ocorrência de valores negativos de Fis (-0.3 a -1.0) em todos os viveiros avaliados.

A AMOVA demonstrou que 30,07% da variação genética entre os viveiros e 69,93% dentro dos viveiros (ΦST = 0.301 e p = 0.007) (Tabela 1), enquanto a análise de Fst pareado identificou os viveiros 12 e 40 como os mais diferenciados do conjunto amostral (Fst médio de 0.096 e 0.248), corroborando com os resultados do agrupamento e PCoA. Além disso, a contagem média de alelos por locus (Na) mostrou-se relativamente homogênea entre a maioria dos viveiros (1.82 a 2.20), consistente com a hipótese de que todos os materiais pertencem ao mesmo clone e são propagados vegetativamente. Os viveiros 12 e 13 destacaram-se como exceções, com valores de Na abaixo (1.18) e acima (2.64) dessa faixa, respectivamente, indicando, a ausência de heterozigosidade esperada e a presença de alelos não pertencentes ao genótipo de referência, ambos compatíveis com a presença de material geneticamente não conforme.

Além disso, a comparação entre Fst pareado e PCoA corroborou com os resultados da AMOVA, indicando os viveiros 12, 13 e 40 mais isolados, em relação aos demais. No caso do viveiro 13, observa-se na PCoA o reflexo da heterogeneidade interna, devido a divergência genotípica de um único indivíduo e não diferenciação populacional consistente, evidenciando a importância de cruzar múltiplas métricas. Apesar da diversidade dentro dos viveiros, com Ho alto refletindo um padrão clonal, a análise de sensibilidade, excluindo esses três viveiros, demonstrou queda acentuada do Φst (de aproximadamente 0.301 para 0.136) (Tabela 1) e perda de significância estatística (p = 0.077), indicando que a diferenciação genética observada está concentrada nesses três viveiros, enquanto o restante do conjunto amostral apresenta homogeneidade genética compatível com origem em um *pool* clonal comum. Ademais, a comparação direta entre o viveiro 40 e a amostra de referência do clone confirmou identidade em apenas 18,2% dos loci avaliados, evidenciando a presença de material geneticamente não conforme nesse viveiro

Tabela 1 - Análise de sensibilidade da diferenciação genética (Φst) entre viveiros de *Coffea canephora* (clone R8), obtida por Análise de Variância Molecular (AMOVA), com exclusão progressiva dos viveiros mais divergentes identificados nas análises de Fst pareado e PCoA. A significância estatística foi avaliada por teste de permutação de Monte Carlo (999 permutações).

Cenário	Φst	p-valor
Todos os viveiros	0.3007153	0.007
Sem o viveiro 40	0.1806922	0.035
Sem o viveiro 12, 13 e 40	0.1345511	0.077

Fonte: elaborado pelo próprio autor.

Discussão

A formação de diferentes grupos indica a divergência genética das amostras coletadas como o clone R8 nos viveiros do estado, em diferentes regiões. Para a maioria das amostras, ocorreu em uma distância relativamente alta (0.20 a 0.28) para indivíduos que, teoricamente são clones do mesmo genótipo. Esse padrão pode estar associado ao tratamento de dados faltantes na matriz de genotipagem, já que a distância de Prevosti foi calculada sobre os genótipos brutos, sem imputação. Sendo assim, é possível que loci com dados ausentes tenham sido computados como divergência entre pares de amostras, inflacionando de forma relativamente uniforme as distâncias absolutas, achatando a escala e empurrando todo o núcleo homogêneo para mais longe de zero do que deveria estar biologicamente. Apesar dessa limitação técnica não alterar a interpretação dos resultados, já que foram realizadas diferentes análises robustas e complementares, é necessário em estudos futuros, a aplicação de estratégias de imputação de dados faltantes previamente ao cálculo de distâncias individuais.

Como o material avaliado corresponde nominalmente ao mesmo clone comercial (R8), esperava-se ausência de diferenciação genética entre os viveiros amostrados, no entanto, as estimativas de diversidade alélica apresentaram variação, influenciadas principalmente, pelo número de indivíduos amostrados. A maior parte da variação genética encontra-se dentro dos viveiros, porém a análise completa revelou diferenciação significativa entre viveiros, indicando que nem todos os grupos apresentam o mesmo perfil genético, sendo fortemente influenciada por determinados grupos, particularmente os viveiros 12, 13 e 40.

Os valores de Fis negativos observados em praticamente todos os viveiros (-0.3 a -1.0), decorrentes de heterozigosidade observada superior à esperada sob equilíbrio de Hardy-Weinberg, são consistentes com a hipótese de que o material avaliado corresponde, em sua maioria, a um único genótipo clonal (clone R8) (Bona *et al.*, 2019). Esse padrão reflete a fixação da heterozigosidade original do clone pela propagação vegetativa, já esperado quando indivíduos geneticamente idênticos são tratados, no cálculo estatístico, como uma população em panmixia. Além disso, a convergência de múltiplas abordagens metodológicas independentes como Fst pareado, PCoA (nível populacional) e UPGMA (nível individual), permitiu a identificação robusta e reforçada dos viveiros 40, 12 e 13 como os mais divergentes.

Destaca-se, em particular, o caso do viveiro 13, cuja divergência no PCoA refletiu a heterogeneidade interna decorrente de um único indivíduo, e não uma diferenciação populacional consistente, evidenciando a importância de cruzar diferentes métricas e níveis hierárquicos de análise antes de classificar um viveiro com ausência de conformidade. De forma complementar, a comparação direta entre o viveiro 40 e a referência do clone, com apenas 18,2% de identidade alélica e ausência total de alelos compartilhados em cinco dos nove loci divergentes, fornece evidência direta e interpretável de não conformidade genética. Estes resultados demonstram a eficácia da genotipagem por SSR como ferramenta de controle de qualidade e rastreabilidade genética na produção de mudas clonais de *C. canephora*, permitindo identificar, com precisão, viveiros com material propagativo divergente do clone de origem.

Conclusão

Os resultados têm implicações diretas para a cadeia produtiva do café conilon no Espírito Santo, onde a identificação fenotípica visual é frequentemente inconclusiva para a confirmação de identidade do clone. A concentração da diferenciação genética em poucos viveiros específicos, com homogeneidade no restante da amostragem, demonstra que a genotipagem por SSR é capaz de discriminar, com precisão, casos pontuais de não conformidade em meio a um conjunto amostral predominantemente fiel ao clone de origem reforçando seu potencial como ferramenta prática de rastreabilidade e certificação genética, complementar às exigências regulatórias do Registro Nacional de Cultivares.

Referências

BONA, A., KULESZA, U. & JADWISZCZAK, K. A. Clonal diversity, gene flow and seed production in endangered populations of *Betula humilis* Schrk. **Tree Genetics & Genomes** 15, 50 (2019). https://doi.org/10.1007/s11295-019-1357-2

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento de Safra Brasileira - Boletim de Safras Café/ Safra 2026 Primeiro Levantamento**.** Brasília, DF: Conab, 2026. Disponível em: http://www.conab.gov.br. Acesso em: 11 de maio de 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.

ESPINDULA, M. C. et al. Robustas Amazônicos: os cafeeiros cultivados em Rondônia. Brasília, DF: Embrapa, 2023. 144 p. : il. color. ISBN 978-65-89957-25-6. Acesso em: http://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/handle/doc/1152388

GEETHANJALI, S. et al. 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

KIRAÇ, H. et al. 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

QUEIROZ, M. D. M. et al. Microssatellite markers for plant variety protection of clonally propagated forest trees: a case study in teak (*Tectona grandis* Lf). **Silvae Genetica**, v. 72, n. 1, p. 189-199, 2023. https://doi.org/10.2478/sg-2023-0019

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. https://doi.org/10.1007/s11295-023-01594-x

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.