FIDELIDADE GENÉTICA DE PLANTAS DO CLONE A1 DE *Coffea canephora*, ORIUNDOS DE DIFERENTES VIVEIROS DO ESPÍRITO SANTO

Anamaria Rissi Vargas[1], Aline dos Santos Bergamin[1], Pedro Silva de Araujo[1], Viviane Alexia Correia 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, anamaria.vargas@edu.ufes.br, aline.bergamin@edu.ufes.br, pedro.s.araujo@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 identificação genética de mudas clonais de *Coffea canephora* é importante para garantir a fidelidade dos materiais utilizados na propagação clonal da espécie. Este trabalho teve como objetivo avaliar a identidade genética de mudas comercializadas como clone A1 provenientes de 39 viveiros comerciais do Espírito Santo, comparando-as com uma matriz de referência. Foram analisadas 71 amostras provenientes de 39 viveiros, utilizando 10 *loci* microssatélites (SSR) e análise de agrupamento. Os resultados evidenciaram variação genética entre as mudas, plantas matrizes e a referência, indicando que a similaridade genética não esteve diretamente relacionada ao viveiro de origem. Materiais provenientes de diferentes estabelecimentos apresentaram proximidade genética, enquanto amostras de um mesmo viveiro foram distribuídas em diferentes agrupamentos. Esses resultados reforçam a importância dos marcadores SSR como ferramenta auxiliar na avaliação da identidade genética e no controle de qualidade durante a produção de mudas clonais de *C. canephora*.

Palavras-chave: Identidade genética. Marcadores SSR. Variabilidade genética. Mudas clonais.

Área do Conhecimento: Ciências Agrárias

Introdução

Originário da Etiópia, o café está entre as bebidas mais populares do mundo e foi introduzido no Brasil por volta de 1830, expandindo-se por diversos estados e tornando-se uma das atividades de maior importância no agronegócio brasileiro (EMBRAPA 2021), destacando-se atualmente o Espírito Santo como maior produtor de *Coffea canephora* do país, cuja área cultivada apresentou crescimento de 6,8% em relação a 2025, segundo estimativa da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB 2026).

A expansão da cafeicultura no estado também está relacionada à utilização de materiais propagativos selecionados. A multiplicação de plantas por meio de clones possibilita a manutenção de características de interesse agronômico, porém, exige cuidados quanto à origem e à identificação dos materiais utilizados na produção das mudas (Vieira; Kobayashi 2000). Dessa forma, a garantia da identidade genética dos genótipos comercializados constitui um aspecto relevante para a obtenção de lavouras com características compatíveis com aquelas esperadas pelos produtores.

O clone A1 pertence a diferentes cultivares como Tributun (37808/2017); Andina (39441/2018); Plena (50300/2022); Caxixe (60869/2026); Aimorés (60407/2026) e Diamante ES8112(31002/2013), e adaptado a ampla variação de ambientes de diferentes regiões de cultivo do estado, portanto um

clone sempre presente nos viveiros do estado e com alta demanda de mudas (Cruz et al. 2026; Oliveira et al. 2026).

Nesse contexto, a caracterização molecular constitui uma alternativa para verificar a identidade genética dos materiais utilizados na produção de mudas. Por possibilitarem identificar diferenças presentes no material genético dos indivíduos, os marcadores moleculares constituem uma ferramenta útil para a caracterização da identidade genética, sem efeitos ambientais e independentemente da idade da planta. Os microssatélites (SSR) apresentam elevado potencial polimórfico devido a variações no número de repetições de suas sequências, permitindo a identificação de diferentes alelos por meio da amplificação dessas regiões pela técnica de PCR (Kalia et al. 2011; Pinheiro, 2021). Além de apresentarem natureza codominante e elevado número de alelos por loco, esses marcadores são considerados informativos para a comparação genética entre indivíduos e populações, apresentando ainda uma relação favorável entre capacidade informativa e custo de aplicação (Pinheiro, 2021).

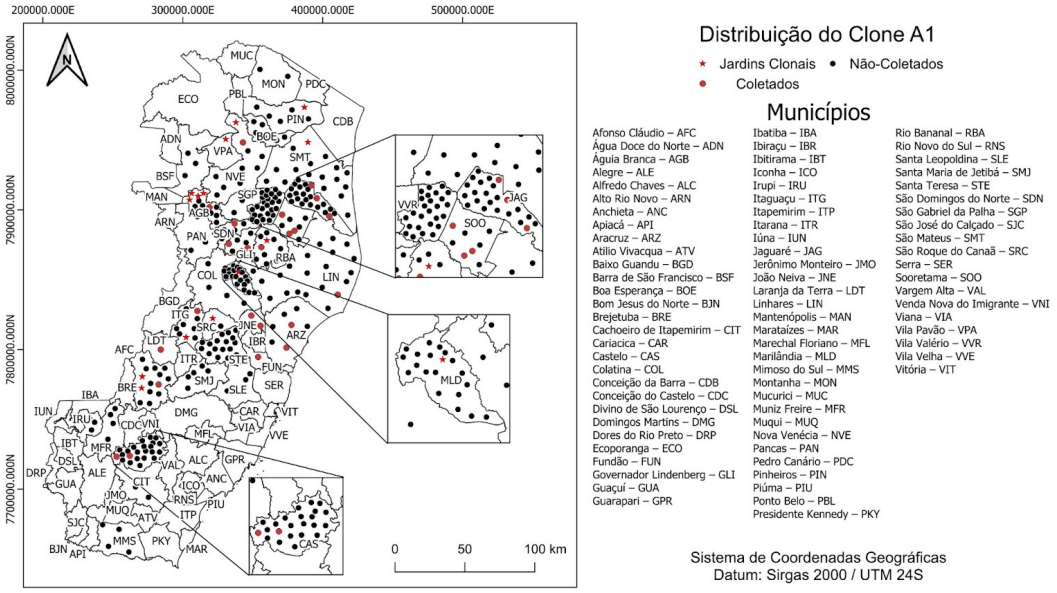
O uso dessas ferramentas moleculares pode contribuir para maior segurança à identificação dos materiais clonais utilizados na cafeicultura. Nesse sentido, os marcadores SSR apresentam potencial para esse tipo de avaliação em *C. canephora*, por permitirem a detecção de variações genéticas entre os materiais analisados (Ferrão et al. 2019). Diante disso, este trabalho teve como objetivo avaliar a identidade genética de mudas e plantas matrizes dos jardins clonais do clone A1 de *C. canephora* provenientes de viveiros comerciais do Espírito Santo, por meio de marcadores microssatélites, comparando os perfis genéticos obtidos com uma matriz de referência.

Metodologia

Material vegetal e extração de DNA genômico

Realizou-se um levantamento técnico de viveiros comerciais de *Coffea canephora* em diferentes regiões do estado do Espírito Santo e conduzido por meio de entrevistas para categorizá-los por porte e selecionar estabelecimentos representativos, nos quais foram coletadas as 71 amostras do genótipo clonal A1, em 39 viveiros diferentes e a planta referência do clone, presente no Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural (Incaper). O estado conta com 762 viveiros cadastrados no Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA) (MAPA 2026),o que mostra uma importância significativa da atividade na região.

Figura 1 – Distribuição de viveiros comerciais de *Coffea canephora* registrados no MAPA do estado do Espírito Santo.



Fonte: elaborado pelo próprio autor.

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, foi feito lavagens sucessivas 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

Para análise de identidade genética foram utilizados 10 *loci* microssatélites (SSR) (Silva, 2026), descritos na tabela 1. 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.

Tabela 1 **–** Marcadores microssatélites utilizados na caracterização genética de *Coffea canephora*, seus motivos de repetição, tamanho de fragmentos, temperatura de anelamento, fluorescência e sequência dos primers.

Locus	Motivo	Tam (pb)	Sequência F e R (5' → 3')
CAM 16	(TC) 11	199	F: AAGGCAGCTGAAGCGGGACAAA R: TGGGGAGAGCTGCAGTTGGAGG
SSR 84	(TC) 16 CT (TC) 3	----	F: AAGTAGATTGGTGAAAGGGAAGC R: TCCTTCATTTTCTCCTCTTGGTT
CAM 22	(AT) 15	113	F: GGAGACGCAGGTGGTAGAAG R: TCGAGAAGTCTTGGGGTGTT

SSR 34	(TC) 10 (CA) 6	294	F: CCGACTTGGACTGATGCGAAATTGA R: AAAGCAAAAACCAGAAAACACGAAGA
CAM 18	(TC) 9	181	F: GGAGACGCAGGTGGTAGAAG R: TCGAGAAGTCTTGGGGTGTT
CAM 32	(TA) 12	204	F: CCGACTTGGACTGATGCGAAATTGA R: AAAGCAAAAACCAGAAAACACGAAGA
CCRM 16	(TC) 26	223	F: TCCTATAGCAGAAACACAAATGACACA R: GGTTTTTGGGTTCTTTTTAGCATATACA
Mg 257	(CA) 9	103	F: GACCATTACATTCACACAC R: GCATTTTGTTGCACACTGTA
CC2P4	(AT) 22	----	F: TAGCAGCAAACACTCTTCGC R: GCTTCTGACGGACTTGAGGA
CCRM 33	(CT) 12	118	F: ACAGCCGTTGAACTTATGGGATTACA R: ACAAAGGGATGGAGAGGATGGAATATAC

Fonte: elaborado pelo próprio autor.

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.

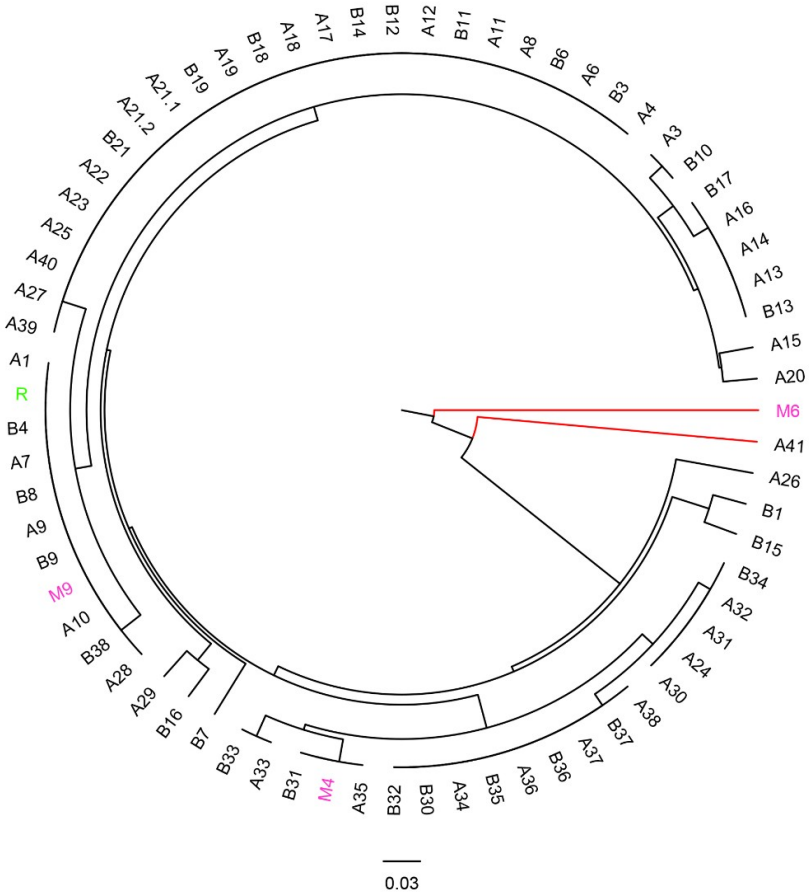
Resultados

A análise de agrupamento pelo método UPGMA (Figura 2) permitiu avaliar as diferenças de similaridade genética entre as mudas e plantas matrizes dos diversos viveiros. A maioria das amostras de mudas e as matrizes M9 e M4 aguparam-se no maior cluster (0.20 a 0.28) e a referência R está próxima se agrupando com amostras A39/A1/B4. Sugerindo que a maior parte do material amostrado é geneticamente compatível com a referência, e pertencentes ao clone A1.

É possível observar que materiais provenientes de diferentes viveiros apresentam proximidade genética, enquanto amostras oriundas de um mesmo viveiro foram distribuídas em diferentes posições do dendrograma, indicando que a origem dos viveiros não foi suficiente para explicar a diferenciação genética obtida.

A muda A1, proveniente do viveiro 1, apresentou identidade genética com a muda de referência (R), e amostras individuais de diferentes viveiros como A4, B3 e A6 permaneceram agrupados. Plantas matrizes de diferentes viveiros plantas apresentam diferentes padrões de similaridades entre si (M9, M4, M6) e em relação às mudas comercializadas no próprio viveiro, destacando-se M4, que se agrupou próxima a materiais como A35 e B33, e M9, que apresentou maior proximidade com o agrupamento contendo a referência. Em contraste, A41 e M6 apresentam maior distância genética em relação à maioria dos materiais avaliados, indicando maior divergência genética. A amostra M6 se separa com a maior distância genética do dendrograma (próximo de 0.30), junto com A26 e A41, mas ainda mais isolado que eles.

Figura 2 – Identidade e divergência genética entre mudas comercializadas do clone A1 (indicadas pelas letras A e B), plantas matrizes, mantidas pelos viveiros em jardins clonais (indicadas pela letra M) e a amostra referência mantidapelo INCAPER (indicada pela letra R) de diferentes viveiros do estado do Espírito Santo (indicados pelos números), visualizada em agrupamento hierárquico UPGMA utilizando a distância de Prevosti.



Fonte: elaborado pelo próprio autor.

Discussão

A análise de agrupamento evidenciou a variação genética entre as mudas comercializadas como A1, plantas matrizes e a referência, demonstrando a eficiência dos marcadores SSR na detecção de polimorfismo e na avaliação da identidade genética (Ferrão et al. 2007).

A similaridade genética das amostras não foi necessariamente é associada a região de coleta de mudas os viveiros, visto que materiais de diferentes locais estão ocupando o mesmo agrupamento, enquanto amostras de um mesmo viveiro foram distribuídos em diferentes agrupamentos. Esse padrão pode estar relacionado à origem dos materiais propagativos ou a possíveis inconsistências na manutenção da identidade clonal, destacando a importância do controle de plantas matrizes e de todas as demais etapas durante a produção de mudas (Vieira; Kobayashi, 2000).

A ocorrência de materiais geneticamente idênticos entre diferentes viveiros pode estar relacionada à ampla distribuição de genótipos de *C. canephora* entre propriedades e municípios, enquanto a presença de materiais distintos dentro de um mesmo viveiro pode estar associada à utilização de materiais propagativos de diferentes origens e à elevada variabilidade genética da espécie (Caixeta et al., 2025). Além disso, amostras como a da planta matriz M6, de maior divergência genética, indica não correspondência genética, em relação ao clone A1 de referência e as demais, sendo necessário a investigação necessária investigar erros de rotulagem, troca de muda no viveiro, ou se de fato trata-se de outro genótipo mantido sob o mesmo nome comercial.

Os resultados reforçam a importância da caracterização molecular como ferramenta auxiliar na verificação da identidade genética e no controle de qualidade de mudas clonais de *C. canephora*.

Conclusão

Há divergência genética entre as mudas comercializadas, plantas matrizes e a referência do clone A1 em diferentes viveiros do estado. A distribuição dos materiais no agrupamento demonstrou que a similaridade genética não foi diretamente associada ao local dos viveiros. Ressalta-se a importância da caracterização molecular como uma ferramenta auxiliar para a avaliação da identidade genética e do controle de qualidade de mudas clonais.

Referências

CAIXETA, E. T.; TEIXEIRA, A. L.; SILVA, A. C. A.; FERRÃO, M. A. G.; ESPINDULA, M. C.; ROCHA, R. B. Origem, diversidade genética e cultivares de *Coffea canephora* do Brasil. *In*: ALVES, E. A.; ROCHA, R. B.; TEIXEIRA, A. L. (ed.). **Café canéfora**: ciência, sabor e identidade. Brasília, DF: Embrapa, 2025. p. 15-35.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (Conab). **Acompanhamento da safra brasileira de café**: safra 2026, segundo levantamento. Brasília, DF: Conab, 2026.

CRUZ, L. M. da; OLIOSI, G.; SILVA, F. A. da; VIEIRA, H. D.; VIANA, A. P.; TOMAZ, M. A.; PARTELLI, F. L. Genetic gain and yield performance of 42 genotypes of *Coffea canephora* in Brazil. **Agronomy Journal**, v. 118, n. 4, e70510, 2026.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (Embrapa). **Café**. Brasília, DF: Embrapa, 2021. Agência de Informação Tecnológica.

FERRÃO, M. A. G.; FERRÃO, L. F. V.; MOTTA, L. B.; FONSECA, A. F. A.; FERRÃO, R. G.; RIVA-SOUZA, E. M. Biotechnology applied to *Coffea canephora*. *In*: FERRÃO, R. G.; FONSECA, A. F. A.; FERRÃO, M. A. G.; DE MUNER, L. H. (ed.). **Conilon coffee**. 3. ed. Vitória, ES: Incaper, 2019. p. 223-253.

FERRÃO, M. A. G.; FONSECA, A. F. A.; FERRÃO, R. G.; OLIVEIRA, A. A. de; BARBOSA, W. M.; D'ISEP, M. S. P.; BARBOSA, R. P. Técnicas moleculares e biotecnológicas aplicadas ao café. *In*: FERRÃO, R. G.; FONSECA, A. F. A. da; BRAGANÇA, S. M.; FERRÃO, M. A. G.; DE MUNER, L. H. (ed.). **Café Conilon**. Vitória, ES: Incaper, 2007. p. 177-201.

KALIA, R. K.; RAI, M. K.; KALIA, S.; SINGH, R.; DHAWAN, A. K. Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. **Euphytica**, v. 177, n. 3, p. 309-334, 2011.

OLIVEIRA, R. G.; ALMEIDA, F. A. N.; ZAIDAN, I. R.; SENRA, J. F. B.; SILVA, M. A.; FERREIRA, A.; FERREIRA, M. F. S. Genomic discrimination of the botanical groups conilon and robusta of *Coffea canephora*. **Scientific Reports**, v. 16, art. 5584, 2026.

PINHEIRO, J. P. C. **Diversidade genética de espécies de café a nível global**: implicações para a sustentabilidade do setor cafeeiro. 2021. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agronómica) – Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa, Lisboa, 2021.

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.

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. 126 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, 2026.

VIEIRA, L. G. E.; KOBAYASHI, A. K. Micropropagação do cafeeiro. *In*: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 1., 2000, Poços de Caldas. **Anais** [...]. Brasília, DF: Embrapa Café, 2000. p. 10-14.

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.