

C A F É:

EXPLORANDO A DIVERSIDADE
GENÉTICA EM *Coffea Canephora*
POR MEIO DE MARCADORES
MOLECULARES



Priscila Gonçalves Figueiredo de Sousa

C A F É:
EXPLORANDO A DIVERSIDADE
GENÉTICA EM *Coffea Canephora*
POR MEIO DE MARCADORES
MOLECULARES



Priscila Gonçalves Figueiredo de Sousa

Editora chefe

Profª Drª Antonella Carvalho de Oliveira

Editora executiva

Natalia Oliveira

Assistente editorial

Flávia Roberta Barão

Bibliotecária

Janaina Ramos

Projeto gráfico

Camila Alves de Cremo

Ellen Andressa Kubisty

Luiza Alves Batista

Nataly Evilin Gayde

Thamires Camili Gayde

Imagens da capa

iStock

Edição de arte

Luiza Alves Batista

2024 by Atena Editora

Copyright © Atena Editora

Copyright do texto © 2024 Os autores

Copyright da edição © 2024 Atena

Editora

Direitos para esta edição cedidos à Atena Editora pelos autores.

Open access publication by Atena Editora



Todo o conteúdo deste livro está licenciado sob uma Licença de Atribuição *Creative Commons*. Atribuição-Não-Comercial-NãoDerivativos 4.0 Internacional (CC BY-NC-ND 4.0).

O conteúdo do texto e seus dados em sua forma, correção e confiabilidade são de responsabilidade exclusiva da autora, inclusive não representam necessariamente a posição oficial da Atena Editora. Permitido o *download* da obra e o compartilhamento desde que sejam atribuídos créditos a autora, mas sem a possibilidade de alterá-la de nenhuma forma ou utilizá-la para fins comerciais.

Todos os manuscritos foram previamente submetidos à avaliação cega pelos pares, membros do Conselho Editorial desta Editora, tendo sido aprovados para a publicação com base em critérios de neutralidade e imparcialidade acadêmica.

A Atena Editora é comprometida em garantir a integridade editorial em todas as etapas do processo de publicação, evitando plágio, dados ou resultados fraudulentos e impedindo que interesses financeiros comprometam os padrões éticos da publicação. Situações suspeitas de má conduta científica serão investigadas sob o mais alto padrão de rigor acadêmico e ético.

Conselho Editorial

Ciências Agrárias e Multidisciplinar

Prof. Dr. Alexandre Igor Azevedo Pereira – Instituto Federal Goiano

Profª Drª Amanda Vasconcelos Guimarães – Universidade Federal de Lavras

Prof. Dr. Arinaldo Pereira da Silva – Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará

Prof. Dr. Antonio Pasqualetto – Pontifícia Universidade Católica de Goiás

Profª Drª Carla Cristina Bauermann Brasil – Universidade Federal de Santa Maria

Prof. Dr. Cleberton Correia Santos – Universidade Federal da Grande Dourados
Profª Drª Diocléa Almeida Seabra Silva – Universidade Federal Rural da Amazônia
Prof. Dr. Écio Souza Diniz – Universidade Federal de Viçosa
Prof. Dr. Edevaldo de Castro Monteiro – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Prof. Dr. Fábio Steiner – Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul
Prof. Dr. Fágner Cavalcante Patrocínio dos Santos – Universidade Federal do Ceará
Profª Drª Girlene Santos de Souza – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Prof. Dr. Guilherme Renato Gomes – Universidade Norte do Paraná
Prof. Dr. Jael Soares Batista – Universidade Federal Rural do Semi-Árido
Prof. Dr. Jayme Augusto Peres – Universidade Estadual do Centro-Oeste
Prof. Dr. Júlio César Ribeiro – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Profª Drª Lina Raquel Santos Araújo – Universidade Estadual do Ceará
Prof. Dr. Pedro Manuel Villa – Universidade Federal de Viçosa
Profª Drª Raissa Rachel Salustriano da Silva Matos – Universidade Federal do Maranhão
Prof. Dr. Renato Jaqueto Goes – Universidade Federal de Goiás
Prof. Dr. Ronilson Freitas de Souza – Universidade do Estado do Pará
Profª Drª Talita de Santos Matos – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Prof. Dr. Tiago da Silva Teófilo – Universidade Federal Rural do Semi-Árido
Prof. Dr. Valdemar Antonio Paffaro Junior – Universidade Federal de Alfenas

Café: explorando a diversidade genética em *Coffea Canephora* por meio de marcadores moleculares

Diagramação: Ellen Andressa Kubisty
Correção: Yaiddy Paola Martinez
Indexação: Amanda Kelly da Costa Veiga
Revisão: A autora
Autora: Priscila Gonçalves Figueiredo de Sousa

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)	
S725	<p>Sousa, Priscila Gonçalves Figueiredo de Café: explorando a diversidade genética em <i>Coffea Canephora</i> por meio de marcadores moleculares / Priscila Gonçalves Figueiredo de Sousa. – Ponta Grossa - PR: Atena, 2024.</p> <p>Formato: PDF Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader Modo de acesso: World Wide Web Inclui bibliografia ISBN 978-65-258-2278-5 DOI: https://doi.org/10.22533/at.ed.785242401</p> <p>1. Cultivo de café. I. Sousa, Priscila Gonçalves Figueiredo de. II. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDD 633.73</p>
Elaborado por Bibliotecária Janaina Ramos – CRB-8/9166	

Atena Editora
Ponta Grossa – Paraná – Brasil
Telefone: +55 (42) 3323-5493
www.atenaeditora.com.br
contato@atenaeditora.com.br

DECLARAÇÃO DA AUTORA

A autora desta obra: 1. Atesta não possuir qualquer interesse comercial que constitua um conflito de interesses em relação ao conteúdo publicado; 2. Declara que participou ativamente da construção dos respectivos manuscritos, preferencialmente na: a) Concepção do estudo, e/ou aquisição de dados, e/ou análise e interpretação de dados; b) Elaboração do artigo ou revisão com vistas a tornar o material intelectualmente relevante; c) Aprovação final do manuscrito para submissão.; 3. Certifica que o texto publicado está completamente isento de dados e/ou resultados fraudulentos; 4. Confirma a citação e a referência correta de todos os dados e de interpretações de dados de outras pesquisas; 5. Reconhece ter informado todas as fontes de financiamento recebidas para a consecução da pesquisa; 6. Autoriza a edição da obra, que incluem os registros de ficha catalográfica, ISBN, DOI e demais indexadores, projeto visual e criação de capa, diagramação de miolo, assim como lançamento e divulgação da mesma conforme critérios da Atena Editora.

DECLARAÇÃO DA EDITORA

A Atena Editora declara, para os devidos fins de direito, que: 1. A presente publicação constitui apenas transferência temporária dos direitos autorais, direito sobre a publicação, inclusive não constitui responsabilidade solidária na criação dos manuscritos publicados, nos termos previstos na Lei sobre direitos autorais (Lei 9610/98), no art. 184 do Código Penal e no art. 927 do Código Civil; 2. Autoriza e incentiva os autores a assinarem contratos com repositórios institucionais, com fins exclusivos de divulgação da obra, desde que com o devido reconhecimento de autoria e edição e sem qualquer finalidade comercial; 3. Todos os e-book são *open access*, *desta forma* não os comercializa em seu site, sites parceiros, plataformas de *e-commerce*, ou qualquer outro meio virtual ou físico, portanto, está isenta de repasses de direitos autorais aos autores; 4. Todos os membros do conselho editorial são doutores e vinculados a instituições de ensino superior públicas, conforme recomendação da CAPES para obtenção do Qualis livro; 5. Não cede, comercializa ou autoriza a utilização dos nomes e e-mails dos autores, bem como nenhum outro dado dos mesmos, para qualquer finalidade que não o escopo da divulgação desta obra.

DEDICO

Aos meus pais Edmilson e Celma,

Aos meus irmãos Lucas e Sara.

A Deus por ter me concedido a graça da realização desse sonho e por tudo que Ele faz em minha vida;

Aos meus pais Edmilson e Celma por não medirem esforços para realização dos nossos sonhos, por estarem sempre presentes mesmo a distância, pelas infinitas orações, pelo apoio, incentivo e conselhos a cada dia;

Aos meus irmãos Lucas e Sara pela amizade e companheirismo a cada dia;

A toda minha família pelos ótimos momentos desfrutados juntos nos períodos de férias em casa;

Ao meu orientador Henrique Duarte Vieira por ter acreditado em mim, pelos ensinamentos, conselhos e orientação durante todos esses anos;

Aos professores Coorientadores, Alexandre Pio Viana, Fábio Luiz Partelli e Daniela Barros de Oliveira por serem sempre solícitos em ajudar e orientar e também pelo apoio na execução dos experimentos;

A Eileen, pela amizade e por ter pego na minha mão por diversas vezes para ajudar nos experimentos e na escrita dos artigos, por me acalmar em momentos de tensão e dizer que vai dar tudo certo, minha eterna gratidão!

Às técnicas de laboratório Marcela Boechat e Sílvia Menezes de Faria Pereira, por toda ajuda com os equipamentos do laboratório durante a execução dos experimentos, foram fundamentais para que tudo fosse feito de maneira correta;

A Universidade Estadual Norte Fluminense, pela oportunidade de realização de um sonho;

Ao CNPq pela concessão da bolsa;

A FAPES pela parceria junto a Universidade Federal do Espírito Santo juntamente com o professor Fábio Luiz Partelli;

Ao pessoal da UFES pela ajuda na coleta do material vegetal para a realização dos experimentos;

Ao pessoal do laboratório de sementes pela ótima convivência;

Aos amigos da UENF pelos bons momentos vividos fora da Universidade;

A Ruth, amiga-irmã, obrigada pela convivência maravilhosa que tivemos durante esse período, pela amizade que só aumentou, pela parceria de sempre, pelo apoio em tudo e por estar sempre perto e presente;

Aos amigos de Imperatriz que mesmo longe estão sempre presentes;

Agradeço a cada um que se envolveu, participou e me amparou na realização desse sonho.

Graduou-se em Engenharia Agrônômica pela Universidade Estadual do Maranhão (2014), concluindo seu mestrado em Produção Vegetal com ênfase em Tecnologia e Produção de Sementes e Grãos em 2016, seguido pelo doutorado em 2023, ambos pela Universidade Estadual Norte Fluminense UENF.

Experiência acadêmica inclui período como professora substituta na Universidade Estadual do Maranhão - UEMA, onde ministrou disciplinas como Olericultura, Fruticultura, Sistemas de Produção de Arroz, Feijão, Soja e Milho, além de Produção Orgânica de Hortaliças. Atuou no Instituto Estadual do Maranhão - IEMA, lecionando disciplinas de Meio Ambiente e Manejo de Solos. No Instituto Federal do Tocantins - IFTO, ministrou disciplinas como Tecnologia de Sementes, Culturas Anuais, Avicultura, Piscicultura, Equinocultura e Construções Rurais.

Atualmente, é membro como pesquisadora do grupo de pesquisas e difusão de tecnologia em *Coffea Canephora* da Universidade Federal do Espírito Santo UFES. E desempenha o papel de professora substituta na Universidade Estadual da Região Tocantina (UEMASUL).

É com grande entusiasmo que apresentamos este trabalho, dedicado a desvendar os intrincados mistérios da diversidade genética em clones de *Coffea canephora*, um dos pilares da economia mundial e orgulho do Brasil como principal produtor de café.

No vasto universo dos cafés, tanto o nobre Arábica (*Coffea arabica*) quanto o robusto conilon (*Coffea canephora*) desempenham papéis fundamentais. Este livro mergulha profundamente na análise genético-molecular de clones de *C. canephora*, focalizando a rica variedade genética e suas implicações no desenvolvimento de futuras gerações de plantas.

A intrínseca peculiaridade do *C. canephora*, uma planta alógama, revela-se na sua autoincompatibilidade e notável variabilidade genética. Em programas de melhoramento, a presença dessa variabilidade é crucial para alcançar ganhos genéticos por meio da seleção cuidadosa. Neste contexto, a identificação da diversidade genética entre genótipos emerge como uma ferramenta essencial, fornecendo os parâmetros necessários para discernir os mais promissores.

O cerne desta pesquisa reside na utilização de marcadores moleculares, especialmente microssatélites, para realizar uma caracterização genético-molecular abrangente. Avaliando 44 genótipos de *C. canephora*, juntamente com um exemplar de *C. arabica*, provenientes do município de Nova Venécia/ES, a análise empregou 21 primers.

A quantificação da diversidade genética é essencial, e para tal, foram aplicados diversos parâmetros, como número de alelos, índice de informação, heterozigosidade e coeficiente de endogamia. Os resultados revelaram uma notável variedade, com 61 alelos identificados na população. A média de 2,9 alelos por loco sugere uma diversidade substancial.

O índice de informação, com uma média de 0,58, atesta um elevado nível de polimorfismo nos marcadores analisados. A heterozigosidade observada e esperada, respectivamente 0,35 e 0,34, indicam uma rica diversidade genética na população. Surpreendentemente, o coeficiente de endogamia revelou um valor negativo (-0,035), sugerindo um equilíbrio entre homozigotos e heterozigotos, com endogamia praticamente inexistente.

A análise de diversidade genética entre os acessos, através do método UPGMA, resultou em seis grupos distintos. Abordando ainda a perspectiva bayesiana, a inferência da estrutura genética apontou para $K = 3$, indicando agrupamentos prováveis.

Este trabalho não apenas desvenda a intrincada tapeçaria genética de *C. canephora*, mas também identifica genótipos divergentes, apontando para futuros cruzamentos que promoverão a manutenção da variabilidade genética.

Concluimos, assim, que este estudo não apenas oferece uma visão aprofundada da diversidade genética em clones de *Coffea canephora*, mas também serve como guia para a preservação e expansão desse tesouro genético, abrindo caminho para novas fronteiras no mundo do café.

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 <i>Coffea canephora</i> : Importância, produção e usos	3
2.2 Origem, dispersão e botânica.....	4
2.3 Melhoramento genético do <i>Coffea canephora</i>	6
2.4 Diversidade genética de <i>Coffea canephora</i>	8
2.5 Marcadores moleculares microssatélites	8
Referências bibliográficas.....	10
3. ARTIGO	15
RESUMO.....	15
ABSTRACT	16
INTRODUÇÃO.....	17
METODOLOGIA	18
RESULTADOS E DISCUSSÕES	24
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38

INTRODUÇÃO

Coffea canephora, conhecida popularmente como Conilon ou Robusta, é a segunda espécie de café mais produzida no mundo (ICO, 2022), e o Brasil é o segundo maior produtor desta espécie, representando cerca de 20% da produção mundial (CONAB, 2022). O café Conilon ainda possui um grande espaço a ocupar, pois o mesmo pode apresentar uma bebida diferenciada, com características sensoriais próprias ao invés de atuar apenas na produção de blends (Vignoli; Bassoli; Benassi, 2011).

A produção e demanda do *C. canephora* tem aumentado significativamente nos últimos anos, pois além de sua maior participação nos blends ainda confere à bebida maior teor de sólidos solúveis, maior rendimento industrial e oferece uma bebida mais encorpada (Ivoglio et al., 2008; Lima Filho et al., 2012, 2015; Teixeira et al., 2016), essa mistura diminui os custos e pode compor até 60% dos blends, atualmente essa cultura corresponde por 1/3 do comércio global de café (ICO, 2018; Davis et al., 2019).

E, para que seja ofertado um produto com maior qualidade é necessário observar o conjunto de processos que vão desde o desenvolvimento e melhoramento das variedades, manejo, cuidados com a colheita e pós-colheita e características de grãos.

C. canephora é uma espécie que se reproduz por alogamia obrigatória devido à sua característica de autoincompatibilidade gametofítica (Moraes et al., 2018). Portanto há alta variabilidade genética, resultando em plantas com diferentes potenciais (Ramalho et al., 2016; Bergo et al., 2020).

Em programas de melhoramento genético a presença de variabilidade genética é condição básica e necessária para se obter ganhos genéticos com seleção (Babova et al., 2016), visto que os estudos de diversidade genética podem guiar a escolha de genitores para a composição de variedades clonais (Marcolan e Espíndula., 2015).

Sendo assim, o estudo da variabilidade genética é essencial em um programa de melhoramento, já que os cruzamentos envolvendo pais geneticamente divergentes podem induzir a maiores efeitos heteróticos e maior variabilidade, permitindo a construção de populações com uma base genética mais ampla e assim proporcionando maiores ganhos (Cecon et al., 2008; Cruz et al., 2012).

Para estimar a variabilidade genética pode utilizar tanto descritores morfológicos quanto marcadores moleculares. E para ter acesso a informações precisas sobre o nível de DNA, são utilizados os marcadores moleculares, visto que os mesmos são de grande utilidade para o melhoramento genético (Ferrão et al., 2015), pois não são influenciados pelo ambiente e não se alteram durante o ciclo de vida do indivíduo (Collard e Mackill, 2008). Diversos estudos podem ser auxiliados por meio dos marcadores moleculares em café, como de diversidade genética, resistência a doenças, direcionamento de cruzamentos e certificação de cruzamentos de interesse para o melhoramento (Caixeta et al., 2016).

Entre as diferentes classes de marcadores moleculares, os microssatélites SSR (*Simple Sequence Repeat*), são os preferidos para aplicações e estudos genéticos no melhoramento de plantas, principalmente devido a sua natureza multialélica, herança codominante e transferibilidade entre espécies (Decroocq et al., 2003), facilidade de detecção pela PCR, abundância relativa e cobertura extensiva do genoma (Li et al., 2002).

Com isso, o objetivo desse trabalho foi realizar a caracterização genético-molecular com base em marcadores microssatélites de 43 genótipos de *C. canephora*.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *COFFEA CANEPHORA*: IMPORTÂNCIA, PRODUÇÃO E USOS

O gênero *Coffea* possui mais de 124 espécies (Davis et al. 2011), mas o comércio global de café depende, principalmente, de duas espécies: Arábica (*Coffea arabica*) compreendendo 64% do café comercializado e Conilon ou robusta (*Coffea canephora*), os 37% restantes (ICO, 2022).

O Brasil é reconhecido mundialmente como o maior produtor de café, e a cafeicultura desempenha um papel crucial na geração de empregos e renda no país. Os estados de Minas Gerais, São Paulo e Espírito Santo se destacam como os maiores produtores nacionais desse grão (CONAB, 2022).

Em 2021, o Brasil manteve sua posição como maior produtor mundial de café, com um total de 47,72 milhões de sacas beneficiadas (60 kg). Essa commodity é de grande importância nas transações internacionais, e o Brasil continua liderando as exportações mundiais do grão. A região sudeste do país é responsável por mais da metade da produção nacional, com cerca de 40,52 milhões de sacas beneficiadas. No Estado do Espírito Santo, a produção em 2021 foi de 14,17 milhões de sacas beneficiadas, com uma área de cultivo de 400.442 hectares (CONAB, 2022).

O café é conhecido como uma das bebidas mais populares ao redor do mundo e além disso é uma mercadoria comercial muito importante, ficando atrás apenas do petróleo em relação ao valor e à quantidade comercializada em todo o mundo (Sunarharum et al., 2014). O cultivo do café gera cerca de 80 bilhões de dólares por ano e envolve cerca de 125 milhões de pessoas em todo o mundo em sua cadeia de produção. Ao redor do mundo são consumidas cerca de 600 bilhões de xícaras de café anualmente, tornando-se a segunda bebida mais consumida no mundo, ficando atrás apenas da água (Bliska et al., 2007; ICO 2017).

É indiscutível a importância do café na economia mundial, pois ele é um dos produtos primários mais valiosos comercializados (Sakiyama et al., 2015). A cafeicultura é uma atividade agrícola importante na geração de empregos, distribuição de renda e exportação, sendo assim fundamental para a economia brasileira (Belan et al., 2011).

Abordar o termo cafeicultura é contextualizar seus números em nível global, os quais colocam o Brasil como protagonista principal. É falar de um produto que contribuiu para o desenvolvimento nacional desde 1727, quando as primeiras mudas de café foram plantadas no país; é também destacar que o café gera em torno de oito milhões de empregos diretos e indiretos; e que, por força desses números, o Brasil é o maior produtor, maior exportador e segundo maior consumidor mundial da bebida.

O *C. canephora* é bastante utilizado na indústria de café solúvel devido ao maior teor de sólidos solúveis, porém sofre discriminação por parte dos setores de café torrado, moído e expresso, pois no Brasil, acredita-se que o mesmo apresenta baixa qualidade

inerente à espécie e difícil de ser modificada (Brige et al., 2019). Apesar disso, a constante mudança de preços na cafeicultura está fazendo com que este café seja cada vez mais utilizado pelas torrefadoras em *blends* (mistura) com o arábica (Zeferino et al., 2010). De acordo com estudos realizados por Mendes (2005), foi constatado que *blends* contendo até 50% de *C. canephora* de boa qualidade não comprometem a qualidade final desejada pelo consumidor.

Com o aumento da demanda pelo *C. canephora*, o ambiente favorável, a tecnologia aliada à grande diversidade genética e a adaptabilidade são fatores que sugerem que pode ser feita uma seleção de materiais de alta qualidade adaptados aos diferentes ambientes (Fonseca, 2006). Desse modo, devido a busca constante por qualidade, o setor cafeeiro vem se reinventando intensamente, agregando valor ao produto oferecido com base na qualidade e análise sensorial.

2.2 ORIGEM, DISPERSÃO E BOTÂNICA

O gênero *Coffea* pertence à família *Rubiaceae*, possui mais de 124 espécies, e as que se destacam são *C. arabica* e *C. canephora*, especialmente por seu uso comercial (Davis et al., 2006).

O *C. canephora* é uma espécie perene, de porte arbustivo, possui caules lenhosos, chegando a atingir 5 m de altura em locais de clima quente e úmido. Suas folhas são elípticas, lanceoladas, com bordas bem onduladas e nervuras bem salientes. As flores são brancas, em grande quantidade por inflorescência e por axila foliar. Suas inflorescências são formadas a partir das gemas seriadas localizadas de forma aleatória nas axilas das folhas de ramos laterais, que se formam na estação de crescimento do ano corrente, de forma que a floração depende estritamente dos ramos plagiotrópicos (Mota et al., 1997).

Os frutos, apresentam coloração verde quando imaturos e podem ser vermelhos ou amarelos quando amadurecidos (Belan et al., 2011). São derivados de um ovário e caracterizados como uma drupa elipsoide, carnoso, com duas lojas e duas sementes, apresentando epicarpo, que é a casca propriamente dita, mesocarpo carnoso e rico em mucilagem (pectinas e açúcares) e endocarpo (ou pergaminho) fibroso e lignificado no final de sua formação, na fase de expansão durante o crescimento do fruto (Melo, 2011).

As sementes do cafeeiro são do tipo recalcitrante, com tamanho, casca e peso inferior ao do café arábica. Possuem duas lojas no ovário, que podem ou não ser fertilizados. Se apenas um óvulo é fertilizado o mesmo ocupará todo o volume do fruto, formando as sementes classificadas como moça que apresentam formato arredondado. O endosperma da semente do café é córneo (duro), esverdeado claro, encoberto com um envoltório delicado, conhecido como película prateada (pergaminho) (Carvalho e Monaco, 1965). O embrião é pequeno, possuindo cerca de 2 mm, fica localizado na base do endosperma, sendo constituído por duas folhas cotiledonares (Carvalho e Monaco, 1965).

O *C. canephora* apresenta produção bienal, pois a emissão de inflorescências e frutificação são descritas em dois anos consecutivos, sendo que no primeiro ano ocorre a formação vegetal, seguida da indução e maturação das gemas florais e no segundo ano fenológico ocorre a florada, formação de chumbinhos e expansão dos frutos até a maturação (De Camargo, 2001).

A diversidade dessa espécie foi descrita por Berthaud em (1986), em que foi dividida em dois grupos de acordo com seus centros de diversidade. O grupo Guineano em que compreende os genótipos do oeste africano e o grupo Congolês que compreende os genótipos da região central da África. O grupo Congolês durante o processo de domesticação e melhoramento foi levado para outros locais e estruturado em cinco subgrupos denominados SG1, SG2, B, C e mais recentemente o grupo UW, composto por acessos selvagens da Uganda (Musoli et al., 2009), justificando assim a maior variabilidade genética presente nessa espécie.

O subgrupo SG1 contempla os genótipos que ocorrem do Benin ao Gabão, denominados de café Conilon, que se destacam por ser o subgrupo de melhor adaptação no Brasil e está presente nas principais variedades desenvolvidas no país. O subgrupo SG2 (oriundos da região da República Democrática do Congo), B (República Centro-Africana) e C (Camarões), compreendem os genótipos conhecidos como café robusta. Esses cafeeiros possuem plantas mais altas, vigorosas, folhas e frutos maiores, resistência à ferrugem do café e apresentam maior sensibilidade à seca (Marraccini et al. 2012).

O *C. arabica* é uma planta alotetraploide ($2n = 4x = 44$), e o *C. canephora* é uma espécie alógama, diploide com $2n = 22$ cromossomos, que compõe populações com grande variabilidade, sendo sua polinização realizada preferencialmente pelo vento e também realizada por insetos em menor intensidade, a fecundação cruzada ocorre entre indivíduos geneticamente não relacionados. A autoincompatibilidade de *C. canephora* está associada a um único *locus* identificado pela letra S do inglês “Sterility locus”, possuidor de uma série alélica composta por três genes, que interagem em um sistema gametofítico, controlando o crescimento do tubo polínico. Quando o fator S tanto do pólen quanto do estilo são iguais, não há compatibilidade, e o tubo polínico não penetra no ovário, não ocorrendo a fertilização (Conagin; Mendes, 1961; Berthaud, 1980; Lashermes et al., 1996).

Uma planta é considerada como autoincompatível, quando a mesma é fértil, porém, de alguma maneira, rejeita o próprio pólen, evitando assim consanguinidade (Asquini et al., 2011). Esta reação está relacionada com o não desenvolvimento do tubo polínico ao longo do estilete, pois este possui o mesmo alelo do pólen. Esta paralisação no crescimento é devido à ação de ribonucleases que degradam o RNA ribossômico impedindo o crescimento do tubo polínico (Castric e Vekemans, 2004).

Diante disso, o plantio de genótipos não compatíveis pode aumentar a taxa de grãos tipo moça e diminuir a produtividade de grãos. Na cafeicultura clonal, quando há o plantio de clones não compatíveis, a produtividade e a qualidade dos grãos da lavoura podem

ser comprometidas devido ao isolamento de plantas não compatíveis. Na composição de uma cultivar clonal, os clones devem ser selecionados considerando sua capacidade de polinização (Ferrão et al., 2007). De acordo com estudos realizados por Ferrão et al. (2008), observaram em campo, de maneira prática que os clones de *C. canephora* que amadurecem nos meses de abril, maio e junho são denominados de clones de ciclo precoce, intermediário e tardio, respectivamente.

Para o seu bom desenvolvimento, a temperatura ideal está entre 22 e 26°C (Damatta e Ramalho, 2006), podendo ainda tolerar temperaturas entre 37°C durante o dia e 30°C à noite, sendo que temperaturas superiores a 42°C de dia e 34°C à noite causam efeitos deletérios irreversíveis na fotossíntese dessas plantas (Martins et al., 2016; Rodrigues et al., 2016).

Na região de origem ou de alta diversidade genética das espécies de café a precipitação é superior a 2.000 mm e bem distribuída, com uma estação seca de dois a três meses, alta umidade relativa, temperaturas médias anuais em torno de 26°C, com temperatura máxima e mínima variando entre 30°C e 21°C (Coste, 1992).

2.3 MELHORAMENTO GENÉTICO DO *COFFEA CANEPHORA*

Os programas de melhoramento de plantas buscam a seleção de indivíduos promissores, de forma sustentável e ecologicamente equilibrada. Porém, para alcançar o sucesso, é necessário possuir informações básicas a respeito da espécie de interesse (biologia floral, forma de reprodução e propagação, número de cromossomos, entre outros), além disso é necessário um planejamento para a execução da pesquisa (estrutura física, recursos financeiros e humanos). Os programas de melhoramento buscam na maioria das vezes resultados rápidos e satisfatórios.

O *C. canephora* é uma planta tipicamente alógama, que apresenta autoincompatibilidade gametofítica e florescimento sincronizado, que são mecanismos que favorecem a polinização cruzada (Berthaud, 1980).

Essa espécie apresenta uma alta variabilidade genética natural e polinização cruzada entre gerações devido à alta diversidade entre plantas de uma mesma lavoura que é uma característica marcante dessa espécie (Ferrão et al., 2008).

Em programas de melhoramento genético a presença de variabilidade genética é condição básica e necessária para se obter ganhos genéticos com seleção (Babova et al., 2016).

Nos programas de melhoramento, os indivíduos eram selecionados por meio de marcadores morfológicos, porém os mesmos são influenciados pelo ambiente, e para as diversas características analisadas, apresentam baixo ganho com seleção (Toppa e Jadoski, 2013). Com o aperfeiçoamento das técnicas de biologia molecular, o uso de marcadores moleculares possibilitou significativos avanços na seleção de indivíduos superiores por permitir a detecção de polimorfismo ao nível do DNA (Sousa et al., 2017; Alkimim et al., 2017).

Os programas de melhoramento genético estão sempre em busca de novos métodos e novas estratégias que permitam avaliar em menos tempo um maior número de materiais, auxiliando assim no aumento da capacidade de manipulação da variabilidade genética (Rocha et al., 2015). Os ensaios de competição clonal, têm sido uma das estratégias adotadas e objetivam a identificação de genótipos de maior produtividade de grãos que possam reunir características favoráveis, como menor bienalidade, maturação uniforme, grãos maiores, tolerância a estresses bióticos (ferrugem, nematoides, broca do café) e abióticos (baixa altitude, temperaturas elevadas com déficit hídrico anual acima de 150 a 200 mm) (Ramalho et al., 2016).

Em um programa de melhoramento, é fundamental o conhecimento sobre a diversidade genética entre populações das espécies visando auxiliar na conservação e nas estratégias de usos dos recursos genéticos. A diversidade genética entre um grupo de progenitores tem por objetivo identificar as combinações híbridas de maior efeito heterótico e maior heterozigose (Cruz et al., 2014). Os autores Borém e Miranda (2009) definem a heterose ou vigor híbrido, como o aumento do vigor decorrente do cruzamento entre genótipos contrastantes, com a possibilidade de reunir na mesma planta as melhores características de cada um dos genitores.

Nos programas de melhoramento de *C. canephora*, os estudos de diversidade genética podem guiar a escolha de genitores para a composição de variedades clonais (Marcolan e Espíndula, 2015).

Um dos objetivos dos programas do melhoramento do cafeeiro é introgridir os genes de resistência junto com outras características de interesse agrônomo como alta produtividade, vigor, uniformidade de maturação, resistência a outras doenças e pragas e também a qualidade do grão e da bebida. A transferência de alelos de resistência para o cafeeiro pode ser facilitada pelo uso de marcadores moleculares que estão localizados próximos aos genes de resistência. O mapeamento genético consiste em uma das estratégias mais eficazes para a realização de estudos avançados de genética, permitindo o entendimento da herança, a identificação e o isolamento de genes ou locus de interesse (Yuan et al., 2015).

Especificamente, para *C. canephora*, os programas de melhoramento têm buscado melhorar diversas características agrônomicas, como produtividade, estabilidade das culturas, resistência aos principais problemas fitossanitários, qualidade da bebida e tolerância à seca (Ferrão et al., 2004; Carvalho; 2008), e além disso têm sido realizados diversos estudos sobre a diversidade genética dessa cultura baseado em características morfoagronômicas e anatômicas foliares, marcadores moleculares, características estomáticas e peso e volume de frutos maduros (Silva et al, 2023; Sousa et al, 2022; Dubberstein et al, 2021; Partelli et al. 2021).

2.4 DIVERSIDADE GENÉTICA DE *COFFEA CANEPHORA*

A espécie *C. canephora* possui floração gregária, muito comum em espécies autoincompatíveis, essa floração acontece em sincronia nos indivíduos de determinada região. No café a florada ocorre geralmente 6 a 10 dias após as chuvas (pelo menos 10 mm de água) ou do retorno da irrigação após um período de estiagem (Ferrão et al., 2007).

A heterogeneidade genética e fenotípica das plantas de *C. canephora* é de grande valor para os programas de melhoramento genético, visto que serve como fonte de genes que podem ser utilizados para criar novos clones. Porém, para os cafeicultores, essa heterogeneidade fenotípica da lavoura é totalmente indesejada, pois os tratos culturais tornam-se difíceis de ser executados devido às variações entre vigor, porte, arquitetura, maturação, diferença de produtividade entre as plantas. Essas características geralmente são encontradas em cafezais obtidos a partir de sementes (Ivoglio, 2007).

Visando amenizar essa diferença fenotípica entre as plantas de uma lavoura gerada a partir de sementes e sua desuniformidade é comum a formação de lavouras com variedades clonais propagadas por estacas a partir de clones “elites” (Melo, 2011). É importante lembrar que no caso do *C. canephora* essas lavouras devem ser compostas por várias cultivares compatíveis geneticamente para a lavoura produzir.

A utilização de cultivares clonais e a necessidade do plantio de diferentes cultivares geneticamente compatíveis reforçam a necessidade dos estudos genéticos em *C. canephora* (Alekevetch et al., 2013).

Para isso são feitos estudos utilizando os marcadores moleculares. O uso dos mesmos para detectar polimorfismo ao nível de DNA é um dos desenvolvimentos mais significativos nas técnicas de biologia molecular. Os marcadores moleculares são mais vantajosos que os fenotípicos, pois apresentam maior ganho nas características de interesse e também por não apresentarem influência do meio ambiente, e o fato de poder ser feito em qualquer estágio de desenvolvimento da planta (Gartner et al., 2013).

O estudo da variabilidade genética é essencial em um programa de melhoramento, já que os cruzamentos envolvendo pais geneticamente divergentes podem induzir a maiores efeitos heteróticos e maior variabilidade, permitindo a construção de populações com uma base genética mais ampla e assim proporcionando maiores ganhos (Cecon et al., 2008; Cruz et al., 2012).

2.5 MARCADORES MOLECULARES MICROSSATÉLITES

Os marcadores moleculares são de grande utilidade para o melhoramento genético, pois permitem o acesso a informações precisas ao nível de DNA (Ferrão et al., 2015) Springer Science+Business Media Dordrecht. Microsatellite markers (SSR, não são influenciados pelo ambiente e não se alteram durante o ciclo de vida do indivíduo (Collard e Mackill, 2008).

Diversos estudos podem ser auxiliados por meio dos marcadores moleculares em café, como o de diversidade genética, resistência a doenças, direcionamento de cruzamentos e certificação de cruzamentos de interesse para o melhoramento (Caixeta et al., 2016).

Os marcadores moleculares são uma ferramenta rápida e eficaz para estudos genômicos, pois detectam o polimorfismo diretamente ao nível do DNA sem influência ambiental (Souza, 2001). Com base nesse polimorfismo, é possível fazer inferências sobre as relações entre o genótipo e o fenótipo dos indivíduos, o que em última análise permite aumentar a eficiência dos programas de melhoramento.

O uso de marcadores moleculares no estudo da biotecnologia e do DNA recombinante propiciou um avanço muito significativo para a agricultura. A partir do momento que se pode estudar e melhorar as cultivares não só no aspecto fenotípico, mas também no seu genótipo, o conhecimento da estrutura genotípica possibilitou estudos mais acurados junto com o melhoramento de espécies tradicionais, permitindo desenvolver plantas cada vez mais adaptadas às diferentes regiões (Ramalho e Furtini, 2009).

Os tipos de marcadores moleculares disponíveis diferenciam-se pela metodologia empregada na análise. Atualmente os marcadores moleculares mais expressivos são classificados em dois grupos de acordo com a metodologia seguida para identificá-los. Portanto, existem os marcadores baseados em hibridização e baseados na amplificação por PCR (Polymerase Chain Reaction) de DNA (Martins et. al., 2003; Milach, 1998b).

Os marcadores identificados por hibridização são os marcadores RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorfism*). Já aqueles marcadores baseados em amplificação por PCR são os do tipo RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), AFLP (*Amplified Fragment Length 10 Polymorfism*), Microsatélites ou SSR (*Simple Sequence Repeats*) e ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*) (Martins et. al., 2003; Milach, 1998).

Deve-se ressaltar que cada marcador tem suas características peculiares que devem ser levadas em consideração na escolha do qual utilizar em uma análise. Os Marcadores RAPD são os mais simples e baratos para serem utilizados, no entanto apresentam problemas sérios de repetibilidade. Os Marcadores AFLP são extremamente robustos revelando grande quantidade de *locus* e com alta repetibilidade, no entanto são extremamente elaborados e com custo elevado. Os marcadores microsatélites, uma vez que existam primers disponíveis, são de alta repetibilidade, no entanto o processo para obtenção dos primers é laborioso e caro (Milach, 1998a). Os marcadores ISSR combinam a facilidade do RAPD com a robustez dos marcadores AFLP e SSR, sendo assim recomendado para trabalhos que requerem confiabilidade sem alto custo para as análises.

Marcadores moleculares de DNA têm sido utilizados para marcação de genes de resistência a doenças, insetos e pragas, avaliação e caracterização de germoplasma, melhoramento de genitores, introgressão gênica e seleção assistida por marcadores. Apresentam-se como ferramentas muito úteis em testes de pureza genética, seleção de resistência a patógenos exóticos ainda inexistentes em determinada região, associação

com caracteres quantitativos, estudos de interação genótipo-ambiente, processos legais, entre outros (Milach, 1998b).

Entre as diferentes classes de marcadores moleculares, os microsatélites, também denominadas SSR (*Simple Sequence Repeat*), são os preferidos para aplicações e estudos genéticos no melhoramento de plantas, principalmente devido a sua natureza multialélica, herança codominante e transferibilidade entre espécies (Decroocq et al., 2003), facilidade de detecção pela PCR, abundância relativa e cobertura extensiva do genoma (Li et al., 2002) e necessidade de quantidades pequenas de DNA para dar início às reações (Powell et al., 1996). Além disso, também exibem altas taxas de mutação (Vigoroux et al., 2002) e associação preferencial com regiões não repetitivas do genoma (Morgante et al., 2002).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alekcevetch, J. C. (2013) Estudo da diversidade genética, por meio de marcadores moleculares de uma população de *Coffea canephora* var. Conilon. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 92 p.

Alkimim, E. R.; Caixeta, E. T.; Sousa, T. V.; Pereira, A. A.; de Oliveira, A. C. B.; Zambolim, L.; Sakiyama, N. S. (2017) Marker-assisted selection provides arabica coffee with genes from other *Coffea* species targeting on multiple resistance to rust and coffee berry disease. *Molecular Breeding*. 37:6. DOI: 10.1007/s11032-016-0609-1.

Asquini, E.; Gerdol, M.; Gasperini, D.; Igic, B.; Graziosi, G.; Pallavicini, A. (2011) S-RNase-like Sequences in Styles of *Coffea* (*Rubiaceae*). Evidence for S-RNase Based Gametophytic Self-Incompatibility. *Tropical Plant Biology* 4: 237–249.

Babova, O.; Occhipinti, A.; Maffei, M. E. (2016) Chemical partitioning and antioxidant capacity of green coffee (*Coffea arabica* and *Coffea canephora*) of different geographical origin. *Phytochemistry* 123: 33–39. DOI: 10.1016/j.phytochem.2016.01.016

Belan, L. L.; Silva, K. G. da.; Tomaz, M. A.; Jesus Junior, W. C. de.; Amaral, J. A. T. do.; Amaral, J. F. T. do. (2011) Aspectos Fisiológicos Do Cafeeiro Conilon: Uma Abordagem Sistemática. *Nucleus* 8: 225–240.

Berthaud, J. (1980) Incompatibility in *Coffea Canephora*: test method and genetic determinism. *Cafe Cacao The*, v. 24, n. 4, p. 267-274.

Berthaud, J. (1986) Les ressources génétiques pour l'améliorations des caféiers africains diploides. Evaluation de la richesse génétique des populatons sylvestres et de ses mécanismes organisateurs. Conséquences pour l'application. Paris: ORSTOM, 379p.

Brige, F. A. A.; Celestino, S. M. C.; Amabile, R. F.; Fagioli, M.; Delvico, F. M. dos S.; Montalvão, A. P. L.; Sala, P. I. A. L. (2019) Genetic variability in conilon coffee related to grain attributes in an irrigated crop in the Cerrado. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. doi: 10.1590/s1678-3921.pab2019.v54.00358

Caixeta, E. T. et al. (2016) Tipos de marcadores moleculares. *Marcadores Moleculares*. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, p. 9–93.

- Carvalho, A.; Monaco L. C. (1965) Natural cross polination in *Coffea arábica*. In: International Horticultural Congress, 26, Brussels. Proceedings. Toronto: International Horticultural Congress Society, v. 20, p. 787-804.
- Carvalho, C. D.; Fazouli, L. C.; Carvalho, G. R.; et al. (2008) Cultivares de café arábica de porte baixo. In: C. H. S. Carvalho (Ed.), Cultivares de café: origem, características e recomendações. p.157–226. Brasília: Embrapa Café.
- Castric, V.; Vekemans, X. (2004) Plant self-incompatibility in natural populations: A critical assessment of recent theoretical and empirical advances. *Molecular Ecology* 13: 2873–2889.
- Cecon, P. R.; Silva, F. F.; Ferreira, A.; Ferrão, R. G.; Carneiro, A. P. S.; Detmann, E.; Faria, P. N.; Morais, T. S. D. S. (2008) Análise de medidas repetidas na avaliação de clones de café “Conilon.” *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 43: 1171–1176.
- Collard, B. C. Y.; Mackill, D. J. (2008) Marker-assisted selection: An approach for precision plant breeding in the twenty-first century. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 363: 557–572.
- Companhia Nacional De Abastecimento - CONAB. Acompanhamento da safra brasileira de café – Safra 2021. 2021. Brasília. Available in: . Access in: Mar, 24, 2022.
- Conagin, C. H. T. M.; Mendes, A. J. T. (1961) Pesquisas citológicas e genéticas em três espécies de *Coffea*. Auto-incompatibilidade em *Coffea canephora* Pierre ex Froehner. *Bragantia*, v.20, n.34, p.787-804.
- Coste, R. (1992) *Coffea: the plant and the product*. London: Macmillan, 328 p.
- Cruz, C. D.; Carneiro, P. C. S.; Regazzi, A. J. (2014) Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético. 3. ed. rev. ampl. Viçosa: UFV, 2014. 668p.
- Cruz, C. D.; Regazzi, A. J.; Carneiro, P. C. S. (2012) Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético. Viçosa: Ed. da UFV, 514p.
- Davis, A. P.; Govaerts, R.; Bridson, D. M.; Stoffelen, P. (2006) An annotated taxonomic conspectus of the genus *Coffea* (*Rubiaceae*). *Botanical Journal of the Linnean Society* 152: 465–512.
- Davis, A. P., Tosh, J., Ruch, N. (2011) Growing coffee: *Psilanthus* (*Rubiaceae*) subsumed on the basis of molecular and morphological data; implications for the size, morphology, distribution and evolutionary history of *Coffea*. *Botanical Journal of the Linnean Society*, v.167, n.4, p.357-377.
- Damatta, F. M.; Ramalho, J. D. C. (2006) Impacts of drought and temperature stress on coffee. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 18: 55–81.
- De Camargo, Â. P.; De Camargo, M. B. P. (2001) Definição e Esquematização das Fases Fenológicas do Cafeeiro Arábica nas Condições Tropicais do Brasil. *Bragantia* 60: 65–68.
- Decroocq, V.; Favé, M. G.; Hagen, L.; Bordenave, L.; Decroocq, S. (2003) Development and transferability of apricot and grape EST microsatellite markers across taxa. *Theoretical and Applied Genetics* 106: 912–922.

Dubberstein D., Lidon F.C., Rodrigues A.P., Semedo J.N., Marques I, Rodrigues W.P., Gouveia D., Armengaud J, Semedo M.C, Martins S, Simões-Costa M.C, Moura I, Pais I.P, Scotti-Campos P, Partelli F.L, Campostrini E, Ribeiro-Barros A.I., DaMatta F.M and Ramalho J.C (2020) Resilient and Sensitive Key Points of the Photosynthetic Machinery of *Coffea* spp. to the Single and Superimposed Exposure to Severe Drought and Heat Stresses. *Front. Plant Sci.* 11:1049.

Ferrão, L. F. V.; Caixeta, E. T.; Pena, G.; Zambolim, E. M.; Cruz, C. D.; Zambolim, L.; Ferrão, M. A. G.; Sakiyama, N. S. (2015) New EST–SSR markers of *Coffea arabica*: transferability and application to studies of molecular characterization and genetic mapping. *Molecular Breeding*. doi: 10.1007/s11032-015-0247-z.

Ferrão, M. A. G.; Ferrão, R. G.; Fonseca, A. F. A.; Verdim Filho, A. C.; Volpi, P.S. (2007) Origem, dispersão geográfica, taxonomia e diversidade genética de *Coffea canephora*. In: Ferrão, R. G., Fonseca, A. F. A., Bragança, S. M., Ferrão, M. A. G., De Muner, L. H. Ed. *Café conilon*. Vitória: Incaper, 702p.

Ferrão, R. G. (2004) Biometria aplicada ao melhoramento genético do café conilon. Tese de doutorado – Universidade Federal de Viçosa/MG.

Ferrão, R. G.; Cruz, C. D.; Ferreira, A.; Cecon, P. R.; Ferrão, M. A. G.; Fonseca, A. F. A.; Carneiro, P. C. de S.; Silva, M. F. da. (2008) Parâmetros genéticos em café Conilon Genetic parameters in Conilon coffee. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 43: 61–69.

Fonseca, A. F. A.; Sediya, T.; Cruz C. D.; Sakiyama N. S.; Ferrão, M. A. G.; Ferrão, R. G.; Bragança, S. M. (2006) Divergência genética em café conilon. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 41: 599-605.

Gartner, G. A. L.; Mccouch, S. R.; Moncada, M. D. P. (2013) A genetic map of an interspecific diploid pseudo testcross population of coffee. *Euphytica*, v. 192, p. 305-323. DOI: 10.1007/s10681-013-0926-y.

ICO - INTERNATIONAL COFFEE ORGANIZATION. *Trade statistic tables*. Disponível em :< http://www.ico.org/trade_statistics.asp>. Acesso em: 5 set. 2022.

Ivoglo, M. G.; Fazuoli, L. L. C.; Oliveira, A. C. B.; Gallo, P. B.; Mistro, J. C.; Silvarolla, M. B.; Braghini, M. T. (2008) Divergência genética entre progênies de café robusta. *Bragantia*, v. 67, n. 4, p. 823-831.

Lashermes, P.; Couturon, E.; Moreau, N.; Paillard, M.; Loarn, J. (1996) Inheritance and genetic mapping of self-incompatibility in *Coffea canephora* Pierre. *Theoretical and Applied Genetics*, v.93, n.3, p.458-462.

Li, Y. C.; Korol, A. B.; Fahima, T.; Beiles, A.; Nevo, E. (2002) Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Molecular Ecology*, Osford, v.11, p.2453- 2465.

Marcolan, A. L.; Espindula, M. (2015) *Café na Amazônia*. 1 ed. Brasília, DF: Embrapa, p. 474.

Marracini, P.; Vinecky, F.; Alves, G. S. C.; Ramos, H. J. O.; Elbelt, S.; Vieira, N. G.; Carneiro, F. A.; Suji, P. S.; Alekcevetch, J. C.; Silva, V. A.; Damatta, F. M.; Ferrão, M. A. G.; Leroy, T.; Pot, D.; Vieira, L. G. E.; Silva, F. R.; Martins, C. M.; Xavier, G. R.; Rumjanek, N. G. (2003) Utilização de RAPD como marcador molecular em plantas. *Embrapa Agrobiologia. Documentos*, 166, Seropédica, 39 p.

Martins, M. Q.; Rodrigues, W. P.; Fortunato, A. S.; Leitão, A. E.; Rodrigues, A. P.; Pais, I. P.; Martins, L. D.; Silva, M. J.; Reboledo, F. H.; Partelli, F. L.; Campostrini, E.; Tomaz, M. A.; Scotti-Campos, P.; Ribeiro-Barros, A. I.; Lidon, F. J. C.; Damatta, F. M.; Ramalho, J. C. (2016) Protective response mechanisms to heat stress in interaction with high [CO₂] conditions in *coffea* spp. *Frontiers in Plant Science*. doi: 10.3389/fpls.2016.00947

- Melo, B. de.; Sousa, L. B. de. (2011) Biologia da reprodução de *Coffea arabica*. L. e *Coffea canephora*. Revista Verde, Limoeiro, v. 6, n. 2, p. 1-7.
- Milach, S. C. K. (1998a) Uso de marcadores moleculares na caracterização de cultivares. In: Borém, A. et al. Biossegurança, proteção de cultivares, acesso aos recursos genéticos e propriedade industrial na agropecuária. Viçosa: Ed. UFV, 43-58p.
- Milach, S. C. K. (1998b) Marcadores moleculares em plantas. Porto Alegre, 141p.
- Mota, J. W. S.; Da Mata, F. M.; Barros, R. S.; Maestri, M. (1997) Vegetative growth in *Coffea arabica* L. as affected by irrigation, daylength and fruiting. Tropical Ecology, v.38, p.73-79.
- Morgante, M.; Hanafey, M.; Powell, W. (2002) Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes. Nature Genetics 30: 194–200. DOI: 10.1038/ng822.
- Musoli, P.; Cubry, P.; Aluka, P.; Billot, C.; Dufour, M.; De Bellis, F.; Pot, D.; Bieysse, D.; Charrier, A.; Leroy, T. (2009) Genetic differentiation of wild and cultivated populations: Diversity of *Coffea canephora* Pierre in Uganda. Genome 52: 634–646.
- Partelli, F. L.; Oliosi, G.; Dalazen, J. R.; Silva, C. A.; Vieira, H. D.; Espíndula, M. C. (2021) Proportion of ripe fruit weight and volume to green coffee: Differences in 43 genotypes of *Coffea canephora*. Agronomy Journal. 113:1050–1057. DOI: 10.1002/agj2.20617.
- Powell, W.; Machray, G. C.; Proven, J. (1996) Polymorphism revealed by simple sequence repeats. Trends in Plant Science 1: 215–222.
- Ramalho A. R.; Rocha R. B.; Souza F. F.; Veneziano W. et al. (2016) Genetic gain in the productivity of processed coffee from the selection of clones of 'Conilon' coffee. Revista Ciencia Agronomica 47(3):516-523. DOI:10.5935/1806-6690.20160062
- Ramalho, M. A. P.; Furtini, I. V. (2009) Técnicas biotecnológicas aplicadas ao melhoramento vegetal: alcance e limites. Revista Ceres, n. 56, v. 4, pag. 473-479.
- Rocha, R. B.; Teixeira, A. L.; Ramalho, A. R.; Souza, F. F. (2015) Café na Amazônia. Brasília, Df: Embrapa, 474p.
- Rodrigues, W. P.; Vieira, H. D.; Teodoro, P. E.; Partelli, F. L.; Barbosa, D. H. S. G. (2016) Assessment of genetic divergence among coffee genotypes by Ward-MLM procedure in association with mixed models. Genetics and Molecular Research. doi: 10.4238/gmr.15027889
- Sakiyama, N.; Martinez, E.; Tomaz, M.; Borém, A. (2015) Café arábica do plantio a colheita. Viçosa: Editora UFV, 316p.
- Sousa, P., Vieira, H., Santos, E., Viana, A., Boaechat, M., Partelli, F. *Coffea canephora*: Heterotic Crosses Indicated by Molecular Approach (2022) Plants, 11, 3023.
- Sousa, T. V.; Caixeta, E. T.; Alkimim, E. R.; de Oliveira, A. C. B.; Pereira, A. A.; Zambolim, L.; Sakiyama, N. S. (2017) Molecular markers useful to discriminate *Coffea arabica* cultivars with high genetic similarity. Euphytica. doi: 10.1007/s10681-017-1865-9. DOI 10.1007/s10681-017-1865-9

Sunarharum, W. B.; Williams, D. J.; Smyth, H. E. (2014) Complexity of coffee flavor: A compositional and sensory perspective. *Food Research International* 62: 315–325.

Toppa, E. V. B.; Jadoski, C. J. (2013) O Uso dos Marcadores Moleculares no Melhoramento Genético de Plantas. *Scientia Agraria Paranaensis* 12:1, p.1-5, 2013. DOI: 10.18188/1983-1471/sap.v12n1p1-5.

Yuan, Y.; Miao, J.; Tao, Y.; Ji, C.; Du, P.; Wang, J.; Wang, Z.; Chen, D.; Gong, Z.; Yi, C.; Zhu, J.; Dong, G.; Gu, M.; Zhou, Y.; Liang, G. (2015) Identification and fine mapping of qPH6, a novel major quantitative trait locus for plant height in rice. *Molecular Breeding* 35: 1–11.

Zeferino, L. B.; Saraiva, S. H.; Cesar Da Silva, L.; José, L.; Teixeira, Q.; Maria, S.; Lucia, D. (2010) Efeito da concentração de sólidos solúveis do extrato de café conilon no índice d refração, na densidade e na viscosidade do extrato. *Enciclopédia Biosfera* 6: 1–8

RESUMO

É indiscutível a importância do café na economia mundial, pois ele é um dos produtos primários mais valiosos comercializados, é cultivado em mais de 80 países, e o Brasil se destaca como o maior produtor mundial de café, onde são cultivados tanto o Arábica (*Coffea arabica*) quanto o Robusta (*Coffea canephora*). A espécie *C. canephora* é bastante utilizada na indústria de café solúvel devido ao maior teor de sólidos solúveis. O *C. canephora* é uma planta alógama, que apresenta autoincompatibilidade e alta variabilidade genética, e em programas de melhoramento a presença da variabilidade genética é necessária para se obter ganhos genéticos com a seleção, pois os estudos de diversidade genética entre genótipos são importantes para identificar a variabilidade genética existente, proporcionando parâmetros para identificar genótipos promissores. E para avaliarmos a diversidade genética em nível molecular são utilizados marcadores moleculares. Com isso o objetivo desse trabalho foi realizar a caracterização genético-molecular com base em marcadores microsatélites. Foram avaliados 44 genótipos de *C. canephora* e um genótipo de *C. arabica* que se encontram no município de Nova Venécia/ES, e foram usados 21 primers para caracterização genético-molecular. Para o estudo da diversidade genética em populações de plantas é indispensável sua quantificação, e para isso, foram utilizados alguns parâmetros como número de alelos, índice de informação, heterozigosidade e coeficiente de endogamia. Esses 21 primers identificaram 61 alelos na população e o número de alelos por *loco* variou de 2 a 5 alelos, e apresentou um número médio de 2,9 alelos. Quanto maior o número de alelos presentes em uma população, maior é a sua diversidade. O Índice de informação apresentou um valor médio de 0,58, e esse valor indica alto nível de polimorfismo para os marcadores analisados. A heterozigosidade observada foi de 0,35 e a esperada foi de 0,34 e esses valores mostram alta diversidade genética na população. Para o coeficiente de endogamia a média geral da população foi de -0,035. O coeficiente de endogamia mede o balanço entre homozigotos e heterozigotos nas populações, e o valor encontrado nesse estudo foi de -0,035 e indicando que há excesso de heterozigotos e que a endogamia para essa população é nula. A diversidade genética entre os acessos também foi avaliada utilizando-se o método da ligação média entre grupos (UPGMA), e o mesmo possibilitou a formação de seis grupos após o corte com base no método de Mojena. No que se refere à abordagem bayesiana os alelos foram usados para realizar inferências sobre a estrutura genética dos genótipos de *C. canephora*, desse modo, apontou $K = 3$ como o número mais provável de agrupamentos. Com isso foi possível observar que existe diversidade genética entre os 45 genótipos estudados, indicando existência de variabilidade genética e alto potencial para seleção em futuras ações de melhoramento. É possível indicar os genótipos mais divergentes geneticamente, com isso, recomenda-se cruzamentos entre os indivíduos dos grupos I, II, III e IV, a fim de manter a variabilidade genética da população.

PALAVRAS-CHAVE: Marcadores de DNA; café; marcadores SSR

ABSTRACT

The importance of coffee in the world economy is indisputable, as it is one of the most valuable primary products traded, it is grown in more than 80 countries, and Brazil stands out as the world's largest coffee producer, where both Arabica (*Coffea arabica*) and Robusta (*Coffea canephora*). The species *C. canephora* is widely used in the soluble coffee industry due to the higher content of soluble solids. *C. canephora* is an allogamous plant, which presents self-incompatibility and high genetic variability, and in breeding programs the presence of genetic variability is necessary to obtain genetic gains with selection, as studies of genetic diversity between genotypes are important to identify the existing genetic variability, providing parameters to identify promising genotypes. And to assess genetic diversity at the molecular level, molecular markers are used, as they have been used to estimate the genetic diversity of species. Thus, the objective of this work was to carry out the genetic-molecular characterization based on microsatellite markers. Forty-four *C. canephora* genotypes and one *C. arabica* genotype found in Nova Venécia/ES were evaluated, and 21 primers were used for genetic-molecular characterization. For the study of genetic diversity in plant populations, its quantification is essential, and for that, some parameters such as number of alleles, information index, heterozygosity and inbreeding coefficient were used. These 21 primers identified 61 alleles in the population and the number of alleles per locus ranged from 2 to 5 alleles, and presented an average number of 2.9 alleles. The greater the number of alleles present in a population, the greater its diversity and, therefore, the greater the chance of finding favorable genotypic combinations from the point of view of genetic improvement. The Information Index presented an average value of 0.58, and this value indicates a high level of polymorphism for the analyzed markers. The observed heterozygosity was 0.35 and the expected one was 0.34 and these values show high genetic diversity in the population. For the inbreeding coefficient, the general average of the population was -0.035. The inbreeding coefficient measures the balance between homozygotes and heterozygotes in populations, and the value found in this study was -0.035, indicating that there is an excess of heterozygotes and that inbreeding for this population is null. The genetic diversity among the accessions was also evaluated using the method of average linkage between groups (UPGMA), which allowed the formation of six groups after cutting based on the Mojena method. Regarding the Bayesian approach, the alleles were used to make inferences about the genetic structure of the *C. canephora* genotypes, thus, pointing $K = 3$ as the most likely number of clusters. With this, it was possible to observe that there is genetic diversity among the 45 genotypes studied, indicating the existence of genetic variability and high potential for selection in future improvement actions. It is possible to indicate the most genetically divergent genotypes, that is, those that are in different groups to be used in future crosses. Therefore, crosses between individuals in groups I, II, III and IV are recommended in order to maintain the genetic variability of the population.

KEYWORDS: DNA Markers; Coffee; SSR Markers

INTRODUÇÃO

O gênero *Coffea* pertence à família Rubiaceae, possui mais de 100 espécies, e as que se destacam são *C. arabica* e *C. canephora*, especialmente por seu uso comercial (Davis et al., 2006), e o comércio global de café depende dessas duas espécies: Arábica (*Coffea arabica*) compreendendo 60% do café comercializado e robusta (*Coffea canephora*), os 40% restantes (ICO, 2018).

É indiscutível a importância do café na economia mundial, pois ele é um dos produtos primários mais valiosos comercializados (Sakiyama et al., 2015). A cafeicultura é uma atividade agrícola importante na geração de empregos, distribuição de renda e exportação, sendo assim fundamental para a economia brasileira (Belan et al., 2011).

O Brasil é o maior produtor e exportador de café no mundo, e o segundo maior consumidor, colaborando de forma considerável para o crescimento e desenvolvimento da economia do país (CONAB, 2020). A produção mundial de café entre os anos 2019 e 2020 foi de aproximadamente 169,347 milhões de sacas beneficiadas (60 kg), sendo que mais de 50 milhões foram produzidas pelo Brasil (ICO, 2020).

O *C. canephora* é uma espécie caracterizada por maior produtividade e maior quantidade de cafeína, melhor crescimento em altitudes mais baixas e tolerância a pragas, doenças e secas (DaMatta et al., 2006), é bastante utilizado na indústria de café solúvel devido ao maior teor de sólidos solúveis (Brige et al., 2019), e está sendo cada vez mais utilizado pelas torrefadoras em *blends* (mistura) com arábica, com a finalidade de redução de custos, já que o Conilon apresenta menor valor de mercado (Zeferino et al., 2010).

O *C. canephora* é uma planta alógama, que apresenta autoincompatibilidade gametofítica, florescimento sincronizado, alta variabilidade genética natural e polinização cruzada entre gerações devido à alta diversidade entre plantas de uma mesma lavoura, característica marcante dessa espécie (Ferrão et al., 2008).

Em programas de melhoramento genético a presença de variabilidade genética é condição básica e necessária para se obter ganhos genéticos com seleção (Babova et al., 2016), visto que os estudos de diversidade genética podem guiar a escolha de genitores para a composição de variedades clonais (Marcolan e Espíndula., 2015).

Nos programas de melhoramento os indivíduos eram selecionados por meio de marcadores morfológicos, porém os mesmos são influenciados pelo ambiente, e para as diversas características analisadas, apresentam baixo ganho com seleção (Toppa e Jadoski, 2013). Com o aperfeiçoamento das técnicas de biologia molecular, o uso de marcadores moleculares possibilitou significativos avanços na seleção de indivíduos superiores por permitir a detecção de polimorfismo ao nível do DNA (Sousa et al., 2017; Alkimim et al., 2017).

Para termos acesso a essas informações precisas ao nível de DNA, são utilizados os marcadores moleculares, visto que os mesmos são de grande utilidade para o

melhoramento genético (Ferrão et al., 2015), pois não são influenciados pelo ambiente e não se alteram durante o ciclo de vida do indivíduo (Collard e Mackill, 2008).

Entre as diferentes classes de marcadores moleculares, os microssatélites SSR (Simple Sequence Repeat), são os preferidos para aplicações e estudos genéticos no melhoramento de plantas, principalmente devido a sua natureza multialélica, herança codominante e transferibilidade entre espécies (Decroocq et al., 2003), facilidade de detecção pela PCR, abundância relativa e cobertura extensiva do genoma (Li et al., 2002).

O uso de marcadores moleculares associados a alguns métodos de melhoramento pode possibilitar e até fomentar o ganho genético em alguma etapa de sua execução, pois através do estudo de divergência genética é possível identificar os genótipos mais divergentes, realizar combinações entre eles e manter uma adequada variabilidade genética. A utilização de técnicas moleculares oferece uma elevada precisão, pois acessa a variabilidade diretamente ao nível de DNA e permite a obtenção de descritores não influenciados pelo meio ambiente (Serafim et al., 2002).

Os cultivares clonais do café Conilon devem ser constituídos por uma combinação de genótipos geneticamente divergentes a fim de aumentar a eficiência da fecundação e garantir o sucesso da produção, por isso a diversidade genética é essencial para manter a produtividade, a qualidade e também uma maior capacidade de resposta às mudanças bióticas e abióticas (Ferrão et al. 2019). Dessa forma a caracterização genética de clones de café Conilon é essencial para o planejamento de estratégias de recombinação entre genótipos e composição de novas cultivares, sendo os marcadores SSR técnica eficaz nessas avaliações. Com isso o objetivo desse trabalho foi: i) estimar a distância genética entre os indivíduos/ou/clones ii) realizar a caracterização genética, para a quantificação e estruturação da variabilidade genética entre os genótipos; e iii) identificar indivíduos divergentes para uso como genitores no programa de melhoramento do café.

METODOLOGIA

Área Experimental

O experimento foi conduzido em uma lavoura composta por 43 genótipos de *C. Canephora*, e a maioria foi selecionada por cafeicultores da região. O plantio foi realizado em abril de 2014 no município de Nova Venécia, região norte do Espírito Santo, Brasil, em propriedade particular localizada a uma latitude 18°66'23" sul e longitude 40°43'07" oeste, altitude de 50 metros, temperatura média anual é de 23°C. A região possui clima tropical, caracterizado pelo verão quente e úmido, e inverno seco, classificado como Aw, de acordo com a classificação de Köppen (Alvares et al., 2013). O solo do local é classificado como Latossolo Vermelho-Amarelo, distrófico e com textura argilosa, com relevo ondulado (Santos et al., 2018).

Os genótipos foram dispostos em um delineamento experimental de blocos ao acaso, possuindo três repetições, e cada tratamento foi constituído pelos diferentes genótipos, e cada unidade experimental por sete plantas. O plantio foi realizado no espaçamento de 3 metros entre linhas e 1 metro entre plantas (3x1), o que equivale a 3.333 plantas por hectare. Os 44 genótipos (Tabela 1) foram propagados por estaquia e foram conduzidos com quatro hastes por planta, foi utilizado também um genótipo de *Coffea arabica* cultivar (Catucaí 2SL) como controle, totalizando 45 genótipos.

Os tratos culturais foram feitos conforme as orientações técnicas para cultura e consistiram basicamente no controle de plantas daninhas com herbicidas e roçadeira, manejo fitossanitário preventivo, calagem, adubação e irrigação por gotejamento.

Tabela 1: Identificação dos genótipos de *Coffea canephora* e *Coffea arabica* utilizados na avaliação molecular.

Número da amostra	Nome	Número da amostra	Nome
1	AP	24	Controle 1
2	Ouro negro 2	25	Z40
3	18	26	CH1
4	Ouro negro 1	27	Emcapa 143
5	Graudão HP	28	Verdim R
6	Peneirão	29	Tardio C
7	Ouro Negro	30	Controle 2
8	Z18	31	700
9	Clementino	32	Z29
10	Beira Rio 8	33	Emcapa 02
11	Verdim D	34	Pirata
12	Z39	35	A1
13	Bamburral	36	Z36
14	P2	37	Z37
15	Imbigudinho	38	B01
16	AT	39	Tardio V
17	Emcapa 153	40	Z21
18	Bicudo	41	Z35
19	Alecrim	42	LB1
20	Z38	43	L80
21	122	44	P1
22	Sementes	45	Arábica
23	Valcir P		

Coleta do material vegetal

Foram coletadas cinco folhas de coloração verde claro do ápice de cada genótipo, sendo coletado de uma planta por genótipo. As amostras foram imediatamente envoltas em embalagens de papel alumínio devidamente identificadas e acondicionadas em nitrogênio líquido, após a coleta as amostras foram armazenadas em ultra-freezer -80°C até a extração de DNA. O transporte das amostras foi feito em gelo seco.

Extração do DNA

A extração e quantificação do DNA genômico foram realizadas no Setor de Marcadores de DNA no Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (LMGV/CCTA/UENF), Campos dos Goytacazes – RJ.

As amostras congeladas foram maceradas com nitrogênio líquido em cadinhos com auxílio de pistilo e armazenadas em microtubos de 2,0 mL, e a extração do DNA genômico foi feita utilizando-se o método proposto por Diniz et al. (2005), com adaptações.

Após a extração do DNA, o mesmo foi quantificado por análise em gel de agarose a 1% com tampão TAE 1X (Tris, Acetato de sódio, EDTA, pH 8,0), utilizando o marcador Lambda (λ) de 100 pb (100 ng/ μ L⁻¹) (Invitrogen, USA) e foram coradas utilizando a mistura de Gel RedTM e Blue Juice (1:1). As imagens foram capturadas pelo sistema de fotodocumentação Mini Bis Pro (Bio-Imaging Systems). Baseada nas imagens obtidas, a concentração de DNA foi estimada em comparação com o marcador de 100 pb e as amostras de DNA foram diluídas para a concentração de trabalho de 10 ng/ μ L⁻¹.

Triagem dos primers

Foram utilizados primers microssatélites e genômicos, selecionados por serem polimórficos em cultivares de cafeeiros (Souza et al., 2013).

Objetivando testar as condições da reação em cadeia de polimerase (PCR), um total de 58 pares de primers foram testados e projetados para amplificar loci SSR e EST em *Coffea canephora* e *Coffea arabica*, e os mesmos tiveram gradiente de temperatura variando de 50°C a 60°C. Após triagem, foram selecionados um conjunto de 21 pares de primers para as reações de amplificação (Tabela 2).

Tabela 2. Sequência dos 21 pares de primers microssatélites utilizados na análise dos 44 genótipos de *Coffea canephora* e 1 genótipo de *Coffea arabica*.

LOCUS	SEQUENCE (5'3')	TA	REFERÊNCIA
CaEST-010	F: CTTCTTCATCCAACAACACG R: TGCCATTCCACTGTGTCCT	54 °C	Souza et al. 2013
SSR-08 ¹	F: CACTGGCATTAGAAAGCACC R: GGCAAAGTCAATGATGACTC	55 °C	Souza et al. 2013
SSR-30 ³	F: ATGGGGGCCAACTGAATATG R: CAGGGCATCTATCTACTTCTCTTT	55 °C	Souza et al. 2013
SSR-34 ³	F: GGAGACGCAGGTGGTAGAAG R: TCGAGAAGTCTTGGGGTGT	55 °C	Souza et al. 2013
SSR-35 ³	F: CTGGCATTAGAAAGCACCTTG R: GCTTGGCTCACTGTAGGACTG	54 °C	Souza et al. 2013
SSR-37 ³	F: CAACACTATCTCTTGATTTTTCACT R: CGTGCAAGTCACATACTTTACTAC	53 °C	Souza et al. 2013
SSR-43 ³	F: TTTTCTGGGTTTTCTGTGTTCTC R: TAACTCTCCATTCCCGCATT	50 °C	Souza et al. 2013
SSR-46 ³	F: AATGAAGAAGAGGGTGGTG R: CGAGGGTATTGTTTTCCAG	53 °C	Souza et al. 2013
SSR-48 ²	F: AGCAAGTGGAGCAGAAGAAG R: CGGTGAATAAGTCGCAGTC	56 °C	Souza et al. 2013
SSR-49 ³	F: TGGAGAAGGCTGTTGAAACC R: GGCGTGAAGCAAAAAGGTAT	56 °C	Souza et al. 2013
SSR-55 ²	F: GCAGGTATTTGAAGGATGAACC R: GTGTAGGTGGTGCGATGTGT	56 °C	Souza et al. 2013
SSR-59 ³	F: CCAGCTCTCCTCACTCTTTTCA R: GGTGGTGGAGGGTAATAGG	58 °C	Souza et al. 2013
SSR-70 ⁴	F: GTAACCACCACCTCCTCTGC R: TGGAGGTAACGGAAGCTCTG	59 °C	Souza et al. 2013
SSR-71 ⁴	F: GCTAAGTTCAATTGCCCTGT R: GGGTTAATTGATTGCGTGA	55 °C	Souza et al. 2013
SSR-74 ⁴	F: TGGGGAAAAGAAGGATATAGACAAGAG R: GAGGGGGGCTAAGGGAATAACATA	59 °C	Souza et al. 2013
SSR-84 ⁵	F: AAGTAGATTGGTGAAGGGAAGC R: TCCTTCATTTTCTCCTCTTGTT	57 °C	Souza et al. 2013
SSR-87 ⁵	F: ATTCGACGACTCCAAAGCATA R: CCTTGCTGGCCCTTCTCT	58 °C	Souza et al. 2013
SSR-100 ⁵	F: ACCCTTTACTACTTATTTACTCTC R: ACATCCCCTTGCCATTTCTTC	50 °C	Souza et al. 2013
SSR-106 ¹	F: CCCTCCCTCTTTCTCCTCTC R: TCTGGGTTTTCTGTGTTCTCG	56 °C	Souza et al. 2013

SSR-114 ⁶	F: TAACAGAAGCACCAAACC R: TCTAAACCCACCTCACAAAC	53 °C	Souza et al. 2013
SSR-119 ³	F: TTGCCATCATCGTTCATTCT R: GCATAGTGTCTCGGTTGTGTTGTT	56 °C	Souza et al. 2013

Reação em cadeia da polimerase (PCR)

As amplificações por PCR foram feitas em termocicladores da Applied Biosystems/Veriti 96 well, em um programa de 35 ciclos, obedecendo às seguintes temperaturas e tempo: 94 °C durante 4 minutos (desnaturação inicial); 94 °C por 2 minutos (desnaturação cíclica); temperatura específica de cada iniciador, em °C, por 1 minuto (anelamento); 72 °C por 2 minutos (extensão cíclica); 72 °C por 10 minutos (extensão final); e 4 °C forever. O volume final foi de 13 µL de cada amostra, sendo 2µL de DNA (5 ng/µL), 1.50 µL de Tampão 10X (NH₄SO₄), 1.5 µL de MgCl₂ (25 mM), 1.5 µL de dNTPs (2 mM), 1 µL de iniciador (R+F) (5 µM) e 0.12 µL de Taq-DNA polimerase (5 U/µL) (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA).

Os produtos da PCR foram diluídos numa relação de 6µl de amostra para 18 µl de Buffer E do kit DNF 900 e submetidos a um sistema de eletroforese capilar (Fragment Analyzer - AATI), no qual fragmentos amplificados de 35 a 500pb foram separados com uma resolução de aproximadamente 2bp. Cada corrida teve duração de 2h e 20min sob uma voltagem de 8 kw.

Análise estatística das variáveis moleculares

As observações obtidas pela amplificação dos 21 marcadores SSR e EST foram convertidas em código numérico para cada alelo por loco. Tal matriz numérica foi desenvolvida atribuindo-se valores de 1 até o máximo de alelos por loco, como descrito a seguir: para um *loco* que apresenta três alelos, tem-se a representação 11, 22 e 33 para as formas homozigotas (A1A1, A2A2 e A3A3) e 12, 13 e 23 para as heterozigotas (A1A2, A1A3 e A2A3). A partir dessa matriz numérica, foram testados três índices: índice não-ponderado, índice ponderado e o índice de *Smouse Peakall* (Peakall and Smouse, 2012). Com base na maior correlação cofenética, o índice utilizado foi o ponderado, e as análises foram obtidas pelo programa GENES (Cruz, 2013).

$$\sum_{j=1}^L p_j c_j$$

Em que:

$p_j = \frac{a_j}{A}$: peso associado ao *loco* j, determinado por:

a_j : número total de alelos no *loco* j

A: número total de alelos estudados

Sendo $\sum_{j=1}^L p_j = 1$

c_j : número de alelos comuns entre os pares de acessos i e i' .

O índice trata de medidas de similaridade e em análises de agrupamento o recomendado é utilizar medidas de dissimilaridade, definidas por:

$$D = 1 - S$$

Após obter a matriz de distância, a observação de agrupamento via dendrograma foi feita por meio do método UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method Average*), com auxílio do programa Mega versão 6 (Kumar et al., 2009), o número ótimo de marcadores foi estimado com o auxílio do programa GENES (Cruz, 2013) e o gráfico foi plotado com auxílio do *software* SigmaPlot.

A distribuição da variabilidade genética dos 45 genótipos foi estimada, com o auxílio do programa Genalex 6.5 (Peakall e Smouse, 2012), tendo por base os seguintes parâmetros: número de alelos por loco polimórfico (NA), heterozigosidade observada (H_o), heterozigosidade esperada (H_e), índice de informação (I) e índice de fixação (f).

O índice de informação pode ser calculado por:

$$I = -1. \sum [P_i. \ln(P_i)]$$

Em que:

P_i : frequência alélica para cada um dos alelos em questão.

A H_o é a proporção de indivíduos heterozigotos observados em uma população estudada, sendo calculado por:

$$H_o = \frac{Nx}{N}$$

Onde:

H_o : heterozigosidade observada;

Nx : número de heterozigotos;

N : número total de indivíduos da amostra.

A H_e pode ser definida como um somatório estimado de todos os indivíduos que poderiam ser heterozigóticos de um *loco*.

$$H_e = 1 - \sum P_i^2$$

Em que:

H_e : heterozigosidade esperada;

P_i : frequência do alelo do i -ésimo alelo.

O índice de fixação (F) exibe valores que variam de -1 a +1 e estima o coeficiente médio de endogamia por meio de:

$$F = \frac{He - Ho}{He}$$

Onde:

Ho: heterozigosidade observada, que é a proporção de N amostras que são heterozigotas em um dado *locus*.

He: proporção de heterozigosidade esperada sob acasalamento aleatório.

Análise da estrutura genética da população

Para acessar a estrutura dos 45 genótipos, foi utilizado um método baseado em algoritmos de agrupamento bayesiano, com o uso do *software STRUCTURE* versão 2.3.4 (Pritchard et al., 2000). Para tanto, empregou-se o modelo “*no admixture model*” e frequências alélicas independentes, usando-se um “*Burning Period*” de 250.000, seguido de uma extensão (*Markov Chain Monte Carlo*) de 750.000 repetições. Foram efetuadas 20 simulações com k variando de 1 a 10.

O teste estatístico Δk foi realizado usando o aplicativo “*Structure Harvester*” baseado no critério de Evanno et al. (2005). Este critério baseia-se na média e no desvio padrão do $\ln P(D)$ estimado em cada uma das 10 interações por k. Os valores de Δk_i foram estimados através da fórmula: $\Delta k_i = \text{ABS}(k_{i+1} - (2 \cdot k_i) + k_{i-1}) / \text{desvio padrão de } K_i$.

Onde:

i: corresponde ao número de grupos simulados, indo de $i = 1$ até $i = 10$.

ABS = corresponde ao módulo.

Esse valor de Δk é estimado para cada k, sendo selecionado o que apresentar maior valor. Após escolhido o Δk ótimo, escolhe-se a simulação de menor valor de $\ln P(D)$, dentre as 10 simulações feitas para a obtenção do mesmo. Cada cor do gráfico gerado representa um possível grupo de indivíduos estruturados.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Para o estudo da diversidade genética em populações de plantas é indispensável sua quantificação. E para isso, a maioria dos estudos tem utilizado os seguintes parâmetros: número de alelos por loco (N_a), Índice de informação (I), heterozigosidade observada (H_o), heterozigosidade esperada (H_e) e Índice de fixação (F), que podem ser encontrados na Tabela 3.

Tabela 3. Parâmetros genéticos para os 20 marcadores SSR e 1 marcador EST nos 44 genótipos analisados. Sendo NA: número de alelos; I: índice de informação; He: heterozigiosidade esperada; Ho: heterozigiosidade observada; e F: índice de fixação. UENF, Campos dos Goytacazes, RJ, 2021.

Locus	Na	I	Ho	He	F
CaEST-010	2	0,413	0,289	0,247	-0,169
SSR-08 ¹	3	0,987	0,5	0,588	0,15
SSR-30 ³	4	0,45	0,211	0,196	-0,076
SSR-34 ³	2	0,474	0,273	0,298	0,083
SSR-35 ³	2	0,65	0,024	0,457	0,947
SSR-37 ³	3	0,625	0,394	0,363	-0,085
SSR-43 ³	2	0,625	0,636	0,434	-0,467
SSR-46 ³	5	0,882	0,512	0,487	-0,05
SSR-48 ²	4	0,869	0,571	0,477	-0,198
SSR-49 ³	3	0,516	0,2	0,284	0,296
SSR-55 ²	3	0,184	0,075	0,073	-0,03
SSR-59 ³	2	0,264	0,148	0,137	-0,08
SSR-70 ⁴	2	0,528	0,395	0,344	-0,148
SSR-71 ⁴	2	0,253	0,14	0,13	-0,075
SSR-74 ⁴	3	1,003	1	0,609	-0,643
SSR-84 ⁵	4	1,038	0,432	0,553	0,219
SSR-87 ⁵	3	0,482	0,25	0,257	0,029
SSR-100 ⁵	5	0,462	0,093	0,195	0,522
SSR-106 ¹	2	0,611	0,6	0,42	-0,429
SSR-114 ⁶	3	0,333	0,178	0,164	-0,086
SSR-119 ³	2	0,619	0,619	0,427	-0,448
Média	2,904	0,584	0,359	0,34	-0,035

Para esse estudo, um total de 48 primers entre SSR e EST foram testados para verificar os indivíduos mais divergentes dentro dessa população de *Coffea Canephora* e assim analisar a diversidade genético molecular da mesma.

Na análise de diversidade genética na população estudada, dos 48 primers testados, 21 produziram fragmentos de DNA amplificados, os quais foram selecionados pois apresentaram polimorfismo.

Estudos realizados por Baltazar e Fabella (2020), para avaliar a diversidade genética de acessos de *C. arabica* em várias áreas das Filipinas, numa coleção conservada ex situ, utilizaram 19 marcadores SSR, e 15 foram considerados polimórficos, ou seja, apresentaram um alto grau de polimorfismos. Como pode ser observado, os marcadores utilizados nesse estudo também apresentaram alto nível de polimorfismo, ou seja, os mesmos têm potencial para detectar diferenças entre os genótipos estudados com base em suas relações genéticas.

Esses 21 primers detectaram 61 alelos na população, e o número de alelos por *loco* variou de 2 a 5 alelos, os *locos* SSR-46³ e SSR-100⁵ apresentaram cinco alelos, demonstrando maior diversidade em relação aos demais. A população em estudo apresentou uma média de 2,9 alelos considerando todo o conjunto de dados (Tabela 3). O baixo número de alelos observados nesse trabalho pode estar associado à propagação clonal dessa população e também ao tamanho reduzido da população.

Quanto maior o número de alelos presentes em uma população, maior é a sua diversidade e, portanto, maior é a chance de se encontrar combinações genotípicas favoráveis do ponto de vista do melhoramento genético (Petit et al., 1998).

Porém a estimativa é fortemente influenciada pela quantidade de indivíduos presentes na população, tendendo a aumentar quanto maior for o tamanho amostral. Isso ocorre porque em amostras grandes há maior chance de se detectar alelos raros, ou seja, alelos que são encontrados em baixa frequência na população (Zucchi et al., 2003; Caballero et al., 2010).

Kiwuka et al. (2021), estudaram a influência climática, o potencial de reprodução e a conservação da diversidade genética em *C. canephora* nativo e cultivado de Uganda e encontraram uma média de 4,7 alelos por *loco* em populações nativas, e as coleções de materiais cultivados, quando comparadas às populações nativas tiveram um maior número de alelos detectados. A diversidade alélica relativamente baixa encontrada na população nativa pode ser devido ao fluxo gênico restrito entre as populações mais próximas, isolamento por fragmentação, deriva genética, distúrbios antrópicos nessas florestas ou mortalidade devido a estresse local. Esses resultados são esperados, visto que foram estudadas diferentes populações e coleções de germoplasmas, e no presente trabalho foi avaliado apenas uma população clonal de *C. canephora* e por isso foi encontrado baixo número de alelos na mesma.

Sánchez et al. (2020), ao realizar a triagem digital de DNA via marcadores microssatélites em germoplasma de *Coffea sp.*, conservado na Costa Rica encontraram uma média de 4 alelos em café arábica e 3,5 alelos em café não arábica (*C. canephora*, *C. excelsa* e *C. liberica*), sendo que eles avaliaram 46 genótipos de café arábica e 3 genótipos de café não arábica e relataram que o número médio de alelos foi influenciado pelo número de amostras, sua base genética, número de microssatélites empregados e o nível de polimorfismo de cada microssatélite. Esse resultado é semelhante ao encontrado nesse estudo, pois o baixo número de alelos encontrados pode ser devido ao baixo número de genótipos presentes nessa população.

Da Silva et al. (2019), estudando a estrutura populacional e as relações genéticas entre 33 genótipos de *C. arabica* e de três espécies diplóides de *Coffea* (*C. canephora*, *C. eugenoides* e *C. racemosa*) do Brasil e Etiópia, usando 30 marcadores SSR, encontraram um total de 206 alelos, com média de 6,9, esse resultado indica a presença de alta riqueza alélica, e em comparação ao presente estudo em que foi observado menor número

de alelos, os mesmos ainda assim podem ser fonte potencial de novos alelos a serem explorados por programas de melhoramento do café.

Observando os resultados do Índice de informação (I), dos 21 locos microsatélites analisados nesse estudo, 12 (57%) locos apresentaram valores maiores que 0,5, além disso, o maior valor encontrado foi 1,038 para o locos SSR-84⁵, ao passo que o menor valor encontrado foi 0,184 para o locos SSR-55², e o valor médio de todos os locos foi 0,58 (Tabela 3).

De acordo com estudos de Botstein et al. (1980), um loco pode ser classificado como altamente informativo quando o valor de I for $>$ do que 0,5, moderadamente informativo quando o valor varia de 0,5 a 0,25 e não informativo quando o seu valor é menor que 0,25. Esse valor médio encontrado indica alto nível de polimorfismo para os marcadores SSR-EST's analisados.

Baltazar e Fabella (2020), analisaram a diversidade genética de café arábica nas Filipinas usando marcadores SSR com o objetivo de observar as possibilidades no melhoramento e seleção do café para garantir a autenticidade das variedades de café encontraram valores de Índice de informação variando de 0,140 a 0,609 e citam que a maioria dos marcadores utilizados foram de moderado a altamente informativo, indicando sua eficácia na avaliação da diversidade genética da coleção, assim como foi observado no presente estudo, onde mais de 50% dos locos foram considerados altamente informativos, sendo assim possível quantificar o polimorfismo de cada loco dessa população, sendo que esse índice pode ser afetado pelo número de alelos e a frequência do alelo no loco.

A heterozigidade observada (H_o) variou de 0,093 no locos SSR-100⁵ a 1 no locos SSR-74⁴, com uma média de 0,359. A heterozigidade observada é uma medida de frequência de heterozigotos encontrados na amostra estudada e demonstra a existência de variação genética na população, uma vez que cada heterozigoto apresenta diferentes alelos para um determinado gene, e a frequência de heterozigotos tende a ser maior com o aumento da diversidade genética (Felipe e Sánchez, 2008).

A heterozigidade esperada (H_e) segundo as expectativas de Hardy-Weinberg variou de 0,073 no locos SSR-55² a 0,588 no locos SSR-08¹, com uma média de 0,34. A heterozigidade esperada é medida a partir das frequências alélicas encontradas na amostra, partindo do pressuposto de que a população esteja em equilíbrio.

A heterozigidade ou diversidade genética é a medida mais importante e a mais utilizada para estimar a variabilidade genética e é também menos sensível às variações no tamanho da amostra (Brown e Weir, 1983).

A heterozigidade observada foi maior que a esperada em 17 (80%) locos. Quando a heterozigidade observada é maior que a esperada pode sugerir excesso de heterozigotos na população em relação ao modelo de equilíbrio de Hardy-Weinberg (De Moura et al., 2009). Se há excesso de heterozigotos significa que há alta diversidade genética na população.

Labouisse et al. (2020), estudando a estrutura genética e a diversidade de *C. canephora* na Alta Guiné encontraram o grupo Congolês mais diverso que o Guineense, com maior heterozigidade esperada e observada com média de $He = 0,67$ e média $Ho = 0,51$ para Congolese enquanto média $He = 0,48$ e média $Ho = 0,34$ para Guineense. Quanto maior o número de alelos encontrados em uma população, maior a probabilidade de eles estarem em heterozigose, e a quantidade de alelos encontrados nesse estudo, apesar de não ter sido tão alta, os mesmos podem estar contribuindo para manutenção da alta diversidade encontrada nessa população.

De acordo com Hamrick e Godt, (1996), espécies alógamas e autoincompatíveis, tendem a apresentar elevadas taxas de diversidade genética, pois apresentam grande longevidade se comparada às espécies anuais e além disso apresentam mecanismos eficientes de dispersão de pólen. E isso pode ser observado nesse estudo, pois a espécie *C. canephora* é uma espécie alógama e autoincompatível que tende a receber pólen de outras populações, tanto pelo vento quanto pelos insetos, fazendo com que se mantenha essa alta diversidade.

Alves et al. (2021), analisaram a atividade antioxidante e radicais estáveis livres em genótipos de café verde Robusta e os autores citam que a reprodução natural das espécies de Robusta gera indivíduos altamente heterozigotos e populações com alta variabilidade genética, e por isso a caracterização e exploração da variabilidade genética dentro dessa espécie pode revelar recursos genéticos valiosos para sistemas de produção quanto para uso em programas de melhoramento.

Anagbogu et al. (2019), estudaram a diversidade genética de *C. canephora* do sudeste da Nigéria por meio de genotipagem por sequenciamento de nucleotídeo único SNPs e compararam com os genótipos conservados em banco de germoplasma e com cultivares de café utilizadas por produtores, com objetivo de verificar a diversidade genética entre os genótipos. Os autores observaram um maior número de alelos heterozigotos em *C. arabica*, e atribuíram isso à natureza poliplóide de *C. arabica* e a presença de polimorfismos existentes entre os loci dos dois genomas homeólogos e tetraploide de *C. arabica*. Além disso os autores citam que as variedades de *C. canephora* identificadas são de origem congolese e assim representam um pool genético muito estreito. Como os autores trabalharam com os marcadores SNPs é esperado que o polimorfismo seja maior do que se comparado aos marcadores SSR que foram utilizados nesse trabalho.

Analisando os valores para o índice de fixação (F) ou coeficiente de endogamia dessa população em estudo, os maiores valores de F foram encontrados nos locos SSR-35³ e SSR-100⁵, apresentando valores de 0,947 e 0,522. No entanto, a maioria dos valores encontrados foram mais baixos e negativos em 14 locos (66%), e a média geral da população foi de -0,035.

O índice de fixação é um dos parâmetros mais importantes em genética de populações, por mensurar o balanço entre homozigotos e heterozigotos nas populações, e o mesmo

pode apresentar valores na faixa de -1 a +1. Valores próximos a zero indicam cruzamentos ao acaso, valores negativos indicam excesso de heterozigiosidade e a endogamia para aquele loco é nula na população estudada, e, valores elevados positivos indicam elevada endogamia (Peakall e Smouse, 2012), fazendo com que a frequência de homozigotos seja maior do que o esperado sob equilíbrio de H.W. Quando houver excesso de homozigotos na população há indicativo de que há endogamia e deriva genética ocorrendo.

De acordo com os resultados obtidos, um loco apresentou valor muito próximo a 1 (0,947), que pode estar relacionado com a presença de alelos nulos nesse loco, causados por falha na amplificação de um dos alelos, ou pode também indicar a presença de endogamia nos mesmos. Cruz et al. (2011), ressaltam que o principal efeito da endogamia é diminuir a heterozigiosidade na população, quando houver excesso de homozigotos na população há um indicativo de que há endogamia e deriva genética acontecendo, e um dos principais efeitos da endogamia na população é a diminuição na frequência de genótipos heterozigotos nas próximas gerações.

A deriva genética refere-se às flutuações casuais que ocorrem devido a amostragem aleatória de gametas em cada geração, decorrentes de restrições nos tamanhos populacionais. A longo prazo, a tendência é que ocorra a redução de heterozigotos e aumento de homozigotos, onde os alelos podem ser fixados e perdidos na população. Outro fator que pode ter levado a encontrar esse valor mais alto no índice de fixação pode estar ligado ao menor número de alelos encontrado nesse loco, pois de acordo com Morgante et al. (2002), os locos que apresentam menor número de alelos estão provavelmente localizados em regiões do genoma onde ocorre menor taxa de transcrição em comparação com as demais regiões.

Ainda analisando o Índice de Fixação, observa-se que a maioria dos valores encontrados foram mais baixos e negativos, indicando excesso de heterozigose nesses locos, e a média geral da população foi de -0,035, demonstrando que a endogamia para esta população é nula. Outro fator que pode ser analisado é que os locos com valores negativos são os mesmos que apresentaram heterozigiosidade observada maior que a esperada, e isso indica que os alelos para esses locos não estão sendo fixados por endogamia.

Esses dados mostram que a espécie estudada apresenta altas taxas de polinização cruzada e ocorrência de ampla diversidade genética entre os clones estudados. Por ser uma espécie auto-incompatível ela recebe pólen de diversas outras plantas de café ao seu entorno, fazendo com que se mantenha essa alta heterozigiosidade e endogamia nula, e com isso diminuindo os riscos de deriva genética e perda de alelos na população. Esse resultado é extremamente interessante do ponto de vista produtivo, pois a partir dele espera-se obter progênies homogêneas em relação às características de produtividade e qualidade. Ao mesmo tempo, espera-se uma diversidade entre as progênies, de forma que as melhores possam ser selecionadas e clonadas para produtividade e qualidade do produto final.

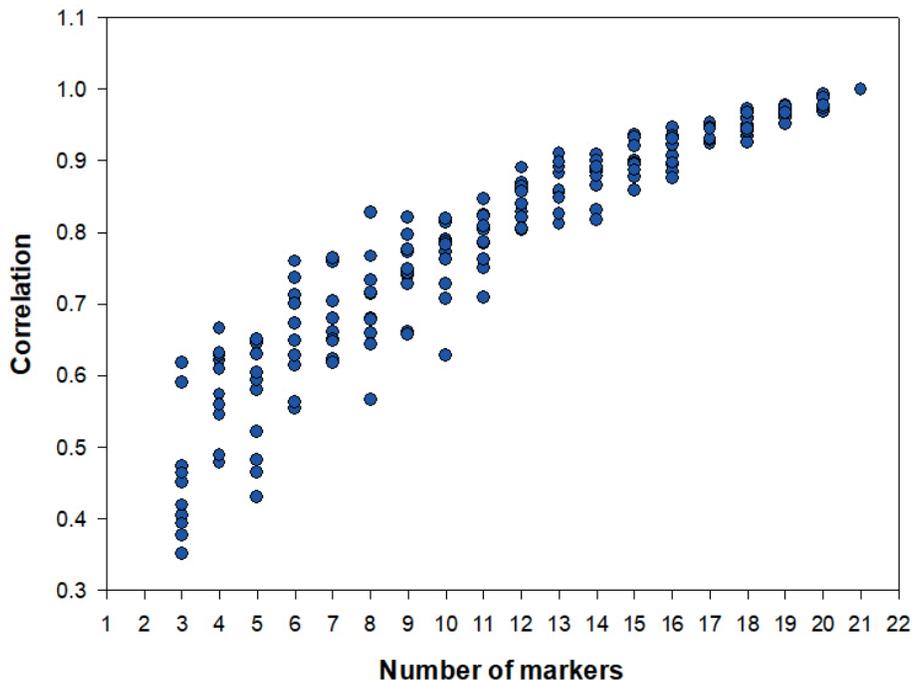


Figura 1. Número ótimo de marcadores microsatélites analisados em 43 genótipos de *Coffea canephora* e 1 genótipo de *Coffea arabica*. UENF, Campos dos Goytacazes, RJ, 2021.

Dentre os 21 locos microsatélites analisados nesse trabalho, 13 seriam suficientes para realizar as análises desse trabalho (Figura 1). O baixo número de marcadores necessário pode ser devido ao fato dessa população em estudo apresentar alta diversidade genética.

O conjunto de locos utilizados apresentaram um desempenho adequado para a caracterização molecular e permitiu avaliar uma parte da diversidade genética de *C. canephora* e os mesmos revelaram um alto grau de polimorfismo.

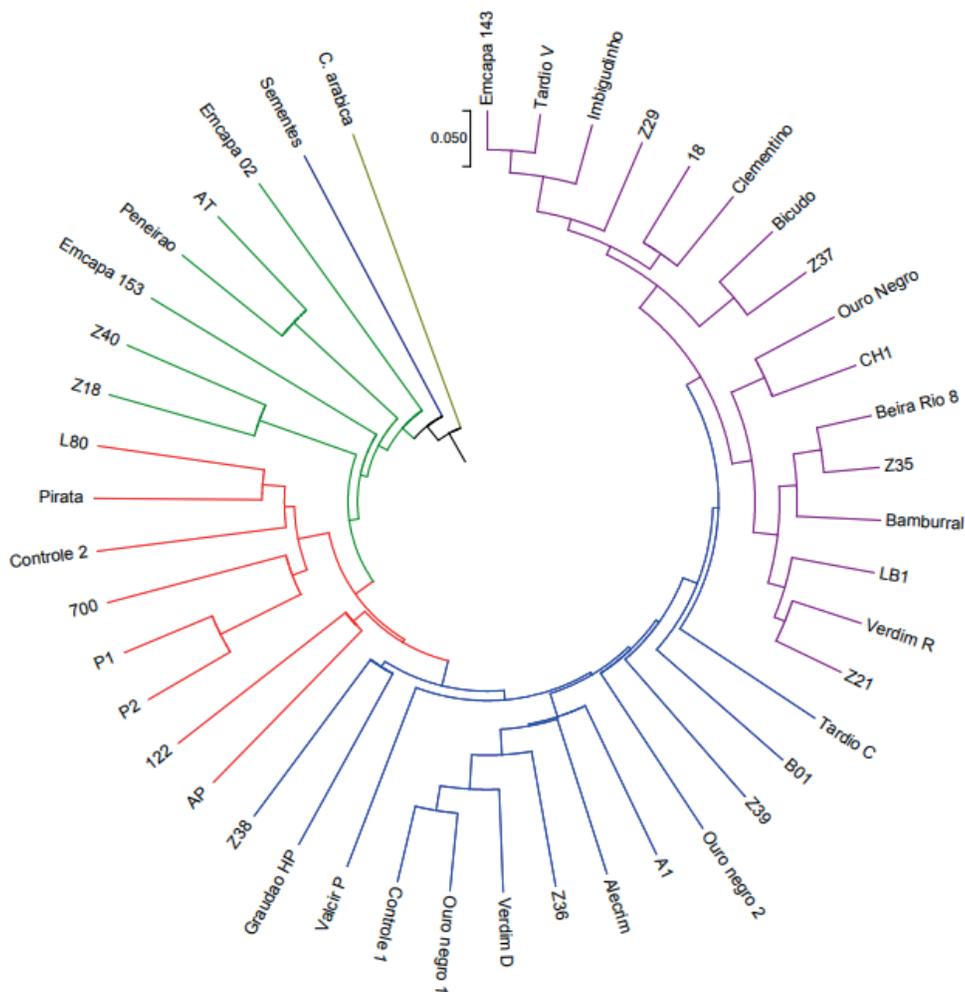


Figura 2. Dendrograma de dissimilaridade genética entre 44 genótipos de *Coffea canephora* e 1 genótipo de *Coffea arabica*, obtido pelo método UPGMA, via marcadores SSR e EST. UENF, Campos dos Goytacazes, RJ, 2021.

A diversidade genética entre os acessos foi avaliada utilizando-se o método da ligação média entre grupos (UPGMA), e o mesmo possibilitou a formação de seis grupos após o corte com base no método de Mojena (1977).

Em estudos de diversidade genética com marcadores microsatélites, o método de agrupamento mais utilizado é o UPGMA, esse método maximiza o coeficiente de correlação cofenética e traz maior confiabilidade nos dados.

O índice de correlação cofenética encontrado nessa análise foi de 0,83, indicando forte correlação entre a matriz de distâncias cofenéticas obtidas a partir do dendrograma. A estimativa de correlação cofenética varia de 0 a 1, e quanto maior for o valor obtido para este coeficiente, maior a representatividade do dendrograma em relação à matriz de distâncias genéticas. A

diversidade pôde ser verificada pela formação de grupos contendo genótipos similares nas análises de agrupamento pelo método hierárquico UPGMA (Figura 2).

O grupo I reuniu o maior número de indivíduos, totalizando 16 indivíduos (35,55%). O grupo II contém 13 indivíduos (28,88%), o grupo III foi constituído por 8 indivíduos (17,77%), o grupo IV incluíram 6 indivíduos (13,33%) e os grupos V e VI, apresentaram um indivíduo em cada (2,22% cada grupo), essa quantidade de genótipos no mesmo grupo indica que esses indivíduos compartilham o maior número de alelos para os locos avaliados

O genótipo formado por semente e o *C. arabica* formaram isoladamente o quinto e sexto grupo respectivamente, apresentando variabilidade suficiente para não se enquadrar em nenhum dos demais grupos, e a formação de grupos com apenas um genótipo evidencia que estes sejam os mais divergentes em relação aos demais, e vale ressaltar que ambos foram usados como um tipo de controle. Em relação ao *C. arabica*, o mesmo foi inserido nesse estudo para servir como controle, e é esperado que ele tenha características genéticas divergentes que o mantenham isolado dos demais genótipos de *C. canephora*. Outro fator que pode ser levado em consideração em relação ao *C. arabica*, é que o fato de ele ter formado um grupo isolado pode confirmar a eficácia dos primers SSR – EST que também são usados para distinguir diferentes espécies do gênero *Coffea*.

A detecção de genótipos divergentes em populações de *C. canephora* é essencial para um programa de melhoramento genético dessa cultura, pois possibilita identificar grupos heteróticos distintos geneticamente e que possam ser utilizados em programas de obtenção de novas cultivares. Os genótipos que apresentam maior dissimilaridade genética podem ser selecionados para a realização de futuros cruzamentos visando um programa de melhoramento, pois ao recomendar um conjunto de genótipos com maiores distâncias genéticas, os problemas de autoincompatibilidade genética presentes na espécie são evitados.

A maior dissimilaridade encontrada foi entre os genótipos 122 e arábica (0,71), que tiveram 13 alelos em comum em 16 dos 21 locos analisados, porém o arábica não vai ser utilizado nos cruzamentos, pois foi utilizado como controle nesse trabalho.

O genótipo Emcapa 02 apresentou maior dissimilaridade com alguns genótipos como o Z40 que apresentou 0,64 de dissimilaridade e 16 alelos em comum, com o genótipo 700 a dissimilaridade foi de 0,63 e 15 alelos em comum, e com o genótipo P1 a dissimilaridade foi de 0,61 e 16 alelos em comum.

Os genótipos Peneirão e 122 apresentaram dissimilaridade de 0,63 e 16 alelos em comum, e os genótipos Ouro Negro 2 e AT apresentaram dissimilaridade de 0,61 e 19 alelos em comum.

Os genótipos Emcapa 143 e Tardio V, foram os menos dissimilares, ou seja, os mais próximos, com 0,06 de dissimilaridade e 39 alelos em comum. A maioria dos genótipos apresentaram distâncias menores, provavelmente devido a forma que esses clones foram selecionados, pois os mesmos foram selecionados por agricultores que buscavam

as mesmas características agronômicas na planta, seja ela produtiva, porte da planta, resistência, entre outras, e com isso a variabilidade pode ter sido reduzida, e assim os clones podem apresentar algum grau de similaridade. Porém os possíveis cruzamentos serão propostos entre os indivíduos dos diferentes grupos e com base na maior dissimilaridade entre eles.

Dubberstein et al. (2021), estudaram a diversidade de características estomáticas foliares em *C. canephora*, sendo os mesmos genótipos utilizados nesse estudo e obtiveram resultados com ampla variabilidade morfológica que revelaram seis grupos pelo método UPGMA e os genótipos foram separados principalmente pelo número de células epidérmicas e número e tamanho dos estômatos, refletindo alta heterogeneidade genética dentro dos grupos. Esses resultados são semelhantes ao encontrado nesse trabalho em relação ao número de grupo formados na mesma população, porém neste estudo os grupos foram separados pelos dados moleculares de 21 locos.

Dalcomi et al. (2015), avaliaram a divergência genética entre clones de café Conilon após poda programada e verificaram que os 22 genótipos estudados foram separados em cinco grupos diferentes, e os autores afirmam que esse resultado é relevante pois os cruzamentos realizados entre os clones de diferentes grupos apresentam maior heterose. Assim como foi observado neste trabalho, a formação de diferentes grupos dentro dessa população de clones de *C. canephora* é importante para guiar programas de melhoramentos futuros, podendo ser proposto cruzamentos de genótipos de grupos diferentes, buscando assim aumentar a variabilidade dessa população e também buscar aliar os cruzamentos às características agronômicas desses clones.

Os genótipos que estão presentes no mesmo grupo apresentam similaridade genética, evidenciando um certo padrão entre a maioria dos genótipos do mesmo grupo, e essa similaridade pode ser observada nos grupos I, II, III e IV, pois mesmo essa população de genótipos apresentando alta diversidade como já foi observada nos resultados anteriores, há alguns genótipos que apresentam um certo grau de similaridade genética e por isso foram reunidos no mesmo grupo.

Essa similaridade entre esses genótipos pode ser explicada por conta de algum evento de deriva genética ocorrida no início da introdução do conilon no país, pois embora ele apresente uma alta diversidade, de acordo com Ferrão et al. (2007a) e Fazuoli et al. (2009), uma grande quantidade de sementes de poucas plantas foram importadas para compor as primeiras plantações brasileiras na região Sudeste, então a diversidade observada ainda é uma amostra pequena da diversidade natural da espécie, além disso, essa variabilidade pode estar em risco devido a intensa seleção praticada por agricultores ao longo dos anos.

De acordo com Cruz et al. (2014) e Carmona et al. (2015), o estudo da divergência genética entre acessos de uma determinada cultura é primordial para conhecer e entender a variabilidade genética existente na mesma, produzindo informações úteis para preservação

e uso dos acessos, visto que os parâmetros fornecidos permitem identificar materiais geneticamente distintos e promissores, possibilitando o agrupamento desses materiais através de alguns procedimentos estatísticos, de forma que se obtenha homogeneidade dentro dos grupos e heterogeneidade entre os grupos.

Da Silva et al. (2021), estudaram a diversidade genética dos mesmos genótipos de *C. canephora* desse estudo e analisaram a concentração de nutrientes nas folhas em diferentes períodos (pré-floração e enchimento de grãos) e fizeram agrupamento UPGMA, usando a distância generalizada de Mahalanobis e observaram a formação de quatro grupos, sendo o primeiro grupo formado apenas pelo genótipo 122 que apresentou as maiores concentrações para S e Cu. Martins et al. (2019), também observaram a formação de grupos divergentes de genótipos de *C. canephora* para características nutricionais.

Os resultados encontrados neste trabalho poderão ser utilizados para conduzir futuros cruzamentos, de forma que se espera que o cruzamento entre genótipos mais divergentes resulte em maior ganho genético. As análises de divergência genética poderão ser utilizadas para guiar a seleção de genitores a serem cruzados. O cruzamento entre genitores mais divergentes pode, potencialmente, maximizar a heterozigosidade e heterose da progênie, aumentando assim as chances de seleção de plantas elites superiores. Clones com maior dissimilaridade genética podem ser selecionados para a formação de populações, pois ao recomendar um conjunto de híbridos com maiores distâncias genéticas, os problemas da autoincompatibilidade genética presentes na espécie são minimizados.

Dubberstein et al. (2020), estudaram as características biométricas como ferramenta para identificação e melhoramento de 43 genótipos de *C. canephora*, sendo os mesmos genótipos utilizados no presente estudo, e tiveram o objetivo de avaliar a diversidade genética por meio de características morfológicas e biométricas de folhas e ramos. A análise de agrupamento realizada pelo método hierárquico UPGMA resultou na formação de cinco grupos e as estimativas dos parâmetros genéticos indicaram a existência de variabilidade genética e potencial reprodutivo entre os genótipos de café Conilon.

Giles et al. (2018), estudaram a diversidade de clones de café conilon com base em variáveis morfo-agronômicas e observaram ampla diversidade genética nessa população, indicando que os clones apresentam potencial para uso em futuras ações de melhoramento.

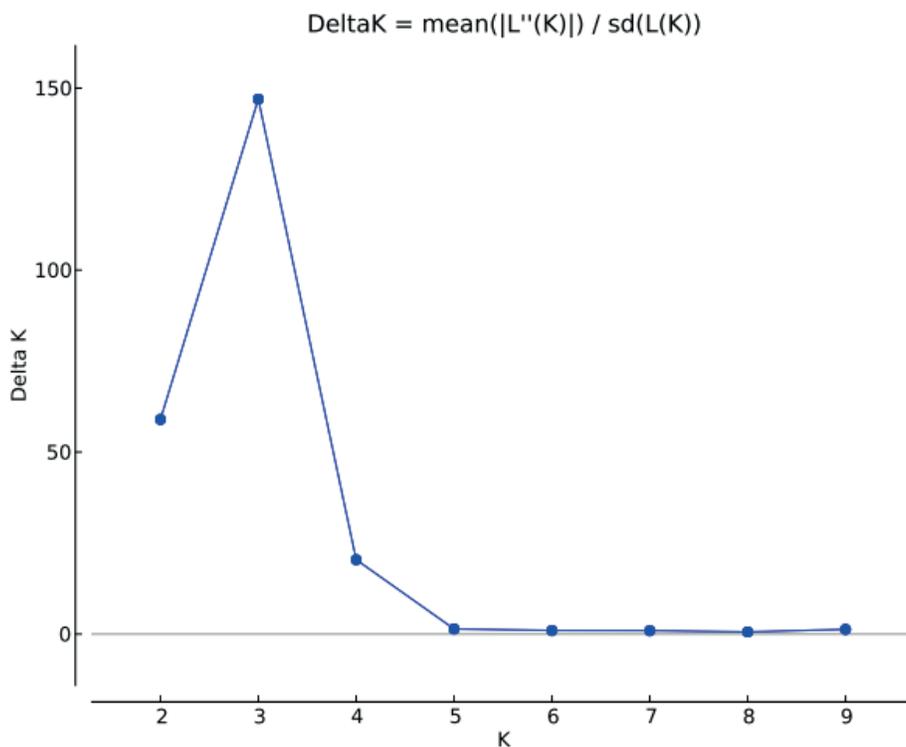


Figura 3. Gráfico de pico do ΔK indicando o número ótimo de *clusters* genéticos para a análise bayesiana obtida pelo programa *Structure* 2.3.4. UENF, Campos dos Goytacazes, RJ, 2021.

No que se refere à abordagem bayesiana baseada no critério DK descrito por Evanno et al. (2005), os alelos foram usados para realizar inferências sobre a estrutura genética dos genótipos de *C. canephora*, desse modo, apontou $K = 3$ como o número mais provável de agrupamentos. Labouisse et al. (2020), analisando a estrutura genética e a diversidade de *C. canephora* na Alta Guiné ao realizar a análise bayesiana encontraram $K = 5$.

Foi utilizada uma probabilidade de adesão de 70% para cada genótipo pertencer a um determinado grupo. Os 45 genótipos avaliados foram agrupados da seguinte forma: 25 genótipos para o grupo I (vermelho), 4 genótipos para o grupo II (verde) e 16 genótipos para o grupo III (azul) (Figura 4). Alguns indivíduos apresentam probabilidades mistas, ou seja, possuem alelos em comum, que fazem parte dos três grupos.

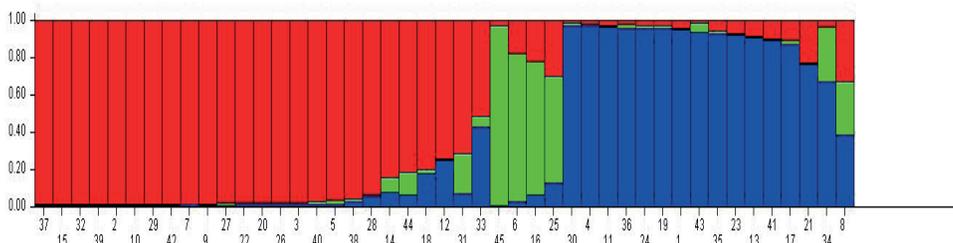


Figura 4. Agrupamentos pela inferência bayesiana de 44 genótipos de *Coffea canephora* e 1 genótipo de *Coffea arabica*. Os genótipos são representados na linha horizontal, e cada grupo genético é representado por uma cor. UENF, Campos dos Goytacazes, RJ, 2021.

Os genótipos 37, 15, 32, 39, 2, 10, 29, 42, 7, 9, 27, 22, 20, 26, 3, 40, 5 e 28 do grupo vermelho apresentam 100% de adesão ao grupo. Os genótipos 30, 4, 11, 36, 24, 19, 1, 43, 35 e 23 do grupo azul apresentam 100% de adesão ao grupo. Essa organização significa que o grupo vermelho e azul e verde possui um conjunto de alelos que os diferenciam para o conjunto de marcadores utilizados.

Os indivíduos 33, 16, 25, 34 e 8 apresentam característica dos três grupos, ou seja, possuem menos de 70% de adesão a qualquer grupo. Sendo assim, alguns indivíduos apresentam probabilidade de adesão maior ao grupo vermelho, ou ao grupo azul, e esse fato pode significar que esses indivíduos estão compartilhando alelos. Considerando os diferentes genótipos estudados, de diferentes localidades, os marcadores SSR usados demonstraram eficiência em diferenci-los segundo sua variabilidade genética. A presença de genótipos com probabilidades mistas pode ser explicada pela estrutura genética da população, que é formada por um pequeno número de genótipos que compartilham alelos com os diferentes genótipos devido a sua forma de reprodução.

Verifica-se que a análise Bayesiana evidencia a distinção dos grupos no que diz respeito aos locos analisados, uma vez que essa análise nos informa quais indivíduos podem compartilhar as mesmas regiões genômicas analisadas. A formação desses grupos é satisfatória para ajudar no direcionamento de cruzamentos entre os genótipos de *C. canephora* que estão localizados em grupos diferentes, por serem mais distantes geneticamente. É importante aliar esses dados com os dados agrônômicos desses genótipos, selecionando os indivíduos com maior potencial agrônômico.

CONCLUSÕES

Os marcadores SSR utilizados nesse estudo foram eficientes em discriminar os genótipos de *Coffea canephora* e auxiliar novas etapas para o melhoramento do café Conilon.

O Índice de Informação indicou que os primers utilizados no estudo foram eficientes para estimar a divergência genética da população, sendo esta altamente diversificada.

Foi possível observar que houve variabilidade na população avaliada, sendo esta estruturada em seis grupos distintos pelo método UPGMA e em três grupos pela análise bayesiana.

É possível indicar os genótipos mais divergentes geneticamente, ou seja, aqueles que se encontram em grupos distintos para serem utilizados em futuros cruzamentos. Com isso, recomenda-se cruzamentos entre os indivíduos dos grupos I, II, III e IV, a fim de manter a variabilidade genética da população.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alkimim, E.R., Caixeta, E.T., Sousa, T.V., Pereira, A.A., de Oliveira, A.C.B., Zambolim, L., Sakiyama, N.S. (2017) Marker-assisted selection provides arabica coffee with genes from other *Coffea* species targeting on multiple resistance to rust and coffee berry disease. *Mol Breed*. doi: 10.1007/s11032-016-0609-1.
- Alves, A.L., Leitão, A.E.B., Souza, P.E.N. de., Santos, M. de F.P. dos., Moscon, P.S., Pessoa, M.S., Pinheiro, C.A., Morais, P.C., Partelli, F.L. (2021) Antioxidant Activity and Stable Free Radicals in Robusta Green Coffee Genotypes/ Atividade antioxidante e Radicais Estáveis Livres em Genótipos de Café Verde Robusta. *Brazilian J Dev* 7: 37312–37330.
- Anagbogu, C.F., Bhattacharjee, R., Ilori, C., Tongyoo, P., Dada, K.E., Muiyiwa, A.A., Gepts, P., Beckles, D.M. (2019) Genetic diversity and re-classification of coffee (*Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner) from South Western Nigeria through genotyping-by-sequencing-single nucleotide polymorphism analysis. *Genet Resour Crop Evol* 66: 685–696.
- Babova, O., Occhipinti, A., Maffei, M.E. (2016) Chemical partitioning and antioxidant capacity of green coffee (*Coffea arabica* and *Coffea canephora*) of different geographical origin. *Phytochemistry* 123: 33–39.
- Baltazar, M.D., Fabella, J.M.A.O. (2020) Assessment of the genetic diversity of Philippine Arabica coffee (*Coffea Arabica* L.) using SSR markers. *Philipp J Sci* 149: 993–1003.
- Belan, L.L., Silva, K.G. da., Tomaz, M.A., Jesus Junior, W.C. de., Amaral, J.A.T. do., Amaral, J.F.T. do. (2011) Aspectos Fisiológicos Do Cafeeiro Conilon: Uma Abordagem Sistemática. *Nucleus* 8: 225–240.
- Botstein, D., White, R.L., Skolnick, M., Davis, R.W. (1980) Botstein. *Am J Hum Gen* 32: 314–331.
- Brige, F.A.A., Celestino, S.M.C., Amabile, R.F., Fagioli, M., Delvico, F.M. dos S., Montalvão, A.P.L., Sala, P.I.A.L. (2019) Genetic variability in conilon coffee related to grain attributes in an irrigated crop in the Cerrado. *Pesqui Agropecuária Bras*. doi: 10.1590/s1678-3921.pab2019.v54.00358.
- Brown, A. H. D., Weir, B. S. Measuring genetic variability in plant populations. In: Tanksley, S. D.; Orton, T. J. (Eds.). *Isozymes in plant genetics and breeding. Part A*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1983. p.73-86.
- Caballero, A., Rodríguez-Ramilo, S.T., Ávila, V., Fernández, J. (2010) Management of genetic diversity of subdivided populations in conservation programmes. *Conserv Genet* 11: 409–419.
- Carmona, P. A. O., Peixoto, J. R., Amaro, G. B., Mendonça, M. A. Divergência genética entre acessos de batata-doce utilizando descritores morfoagronômicos das raízes. *Horticultura Brasileira*, v.33, n.2, p.241-250, 2015.
- Collard, B.C.Y., Mackill, D.J. (2008) Marker-assisted selection: An approach for precision plant breeding in the twenty-first century. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 363: 557–572.
- Conab. Conab—Safras. Available online: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras> (accessed on 19 October 2021).
- Cruz, C. D., Ferreira, F. M., Personi, L. A. *Biometria Aplicada ao Estudo da Diversidade Genética*. 1 Ed. Viçosa. Produção Independente, 2011.

- Cruz, C. D. *Genes: A Software Package for Analysis in Experimental Statistics and Quantitative Genetics*. *Acta Scientiarum*, 35 (3, 271-276, 2013).
- Cruz, C. D., Carneiro, P. C. S.; Regazzi, A. J. *Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético*. 3. ed. rev. ampl. Viçosa: UFV, 2014. 668p.
- DaMatta, F. M., Ramalho, J. D. C. (2007) Impacts of drought and temperature stress on coffee physiology and production: a review. *Braz J Plant Physiol*. 18:55-81.
- Da Silva, B.S.R., Sant'Ana, G.C., Chaves, C.L., Godoy Androcioli, L., Ferreira, R.V., Sera, G.H., Charmetant, P., Leroy, T., Pot, D., Domingues, D.S., Pereira, L.F.P. (2019) Population structure and genetic relationships between Ethiopian and Brazilian *Coffea arabica* genotypes revealed by SSR markers. *Genetica* 147: 205–216.
- Dalcom, J.M., Vieira, H.D., Ferreira, A., Lima, W.L., Ferrão, R.G., Fonseca, A.F.A., Ferrão, M.A.G., Partelli, F.L. (2015) Evaluation of genetic divergence among clones of conilon coffee after scheduled cycle pruning. *Genet Mol Res* 14: 15417–15426.
- Davis, A.P., Govaerts, R., Bridson, D.M., Stoffelen, P. (2006) An annotated taxonomic conspectus of the genus *Coffea* (Rubiaceae). *Bot J Linn Soc* 152: 465–512.
- De Moura, T.M., Sebbenn, A.M., Chaves, L.J., Coelho, A.S.G., Oliveira, G.C.X., Kageyama, P.Y. (2009) Diversidade e estrutura genética espacial em populações fragmentadas de *Solanum* spp. do Cerrado, estimadas por meio de locos microssatélites. *Sci For Sci* 143–150.
- Decroocq, V., Favé, M.G., Hagen, L., Bordenave, L., Decroocq, S. (2003) Development and transferability of apricot and grape EST microsatellite markers across taxa. *Theor Appl Genet* 106: 912–922.
- Diniz, L. E. C., Sakiyama, N. S., Lashermes P., Caixeta, E. T., Oliveira, A. C. B., Zambolim, E., Loureiro, M. E., Pereira, A. A., Zambolim L. Analysis of AFLP marker associated to the Mex-1 resistance locus in Icatu progenies. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 5: 387-393, 2005.
- Dubberstein, D., Oliveira, M.G., Aoyama, E.M., Guilhen, J.H., Ferreira, A., Marques, I., Ramalho, J.C., Partelli, F.L. (2021) Diversity of leaf stomatal traits among coffee *canephora* pierre ex A. Froehner genotypes. *Agronomy*. doi: 10.3390/agronomy11061126
- Dubberstein, D., Partelli, F.L., Guilhen, J.H.S., Rodrigues, W.P., Ramalho, J.C., Ribeiro-Barros, A.I. (2020) Biometric traits as a tool for the identification and breeding of coffee *canephora* genotypes. *Genet Mol Res* 19: 1–17.
- Felipe, C., Sánchez, B. (2008) Diversidade Entre e Dentro de Populações Simuladas Sob Deriva Genética. 1–85.
- Evanno, G., Regnaut, S., Goudet, J. (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Molecular Ecology* 14:2611- 2620.
- Fazuoli, L. C., Mistro, J. C., Braghini, M.T. Melhoramento de café robusta no Instituto Agrônomico de Campinas. pp.201-247 In: Zambolim, L. (Ed.) *Tecnologia para produção do café conilon*. Viçosa-MG: Universidade Federal de Viçosa. 2009.

Ferrão, M. A. G., Ferrão, R. G., Fonseca, A. F. A., Verdin Filho, A. C., Volpi, P.S. Origem, dispersão, taxonomia e diversidade genética de *Coffea canephora*. pp.64-91 In: Ferrão, R. G., Fonseca, A. F. A., Bragança, S. M., Ferrão, M. A. G., De Muner, L. H. (Eds.) *Café conilon*. Vitória-ES: Incaper. 2007a.

Ferrão, R. G., Fonseca, A. F. A., Ferrão, M. A. G., Bragança, S. M., Verdin Filho, A. C., Volpi, P.S. Cultivares de café conilon. pp.204-225 In: Ferrão, R.G., Fonseca, A. F. A., Bragança, S. M., Ferrão, M. A. G., De Muner, L.H. (Eds.) *Café conilon*. Vitória-ES: Incaper. 2007b.

Ferrão, R.G., Cruz, C.D., Ferreira, A., Cecon, P.R., Ferrão, M.A.G., Fonseca, A.F.A., Da., Carneiro, P.C. de S., Silva, M.F. da. (2008) Parâmetros genéticos em café Conilon Genetic parameters in Conilon coffee. *Pesqui Agropecu Bras* 43: 61–69.

Ferrão, L.F. V., Caixeta, E.T., Pena, G., Zambolim, E.M., Cruz, C.D., Zambolim, L., Ferrão, M.A.G., Sakiyama, N.S. (2015) New EST–SSR markers of *Coffea arabica*: transferability and application to studies of molecular characterization and genetic mapping. *Mol Breed*. doi: 10.1007/s11032-015-0247-z.

Ferrão, M. A. G., Ferrão, R. G., Fonseca, A. F. A., Verdin Filho, A. C., Volpi, P. S. (2019) Origin, geographical dispersion, taxonomy and genetic diversity of *Coffea canephora*. In Ferrão RG, Fonseca AFA, Ferrão MAG and DeMuner LH (eds) *Conilon coffee*. Incaper, Vitória, p. 85-110.

Giles, J.A.D., Partelli, F.L., Ferreira, A., Rodrigues, J.P., Oliosi, G., E Silva, F.H.L. (2018) Genetic diversity of promising 'conilon' coffee clones based on morpho-agronomic variables. *An Acad Bras Cienc* 90: 2437–2446.

Hamrick, J. L., Godt, M. J. W. Conservation genetics of endemic plant species. In: Avise, J. C., Hamrick, J. C. (Ed.). *Conservation genetics: case histories from nature*. New York: Chapman & Hall, 1996. Cap. 9, p. 281-304.

ICO. International Coffee Organization (2018) Dados históricos. Available at: <<http://www.ico.org/prices/po-production.pdf>>. Accessed at: 26 set. 2021.

ICO. International Coffee Organization (2020) Dados históricos. Available at: <<http://www.ico.org/prices/po-production.pdf>>. Accessed at: 21 out. 2021.

Kiwuka, C., Goudsmit, E., Tournebize, R., De Aquino, S.O., Douma, J.C., Bellanger, L., Crouzillat, D., Stoffelen, P., Sumirat, U., Legnate, H., Marraccini, P., De Kochko, A., Andrade, A.C., Mulumba, J.W., Musoli, P., Anten, N.P.R., Poncet, V. (2021) Genetic diversity of native and cultivated Ugandan Robusta coffee (*Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner): Climate influences, breeding potential and diversity conservation. *PLoS One* 16: 1–19.

Kumar, C., Kumar, R., Singh, S. K., Goswami, A. K., Nagaraja, A., Paliwal, R., Singh, R. Development of novel g-SSR markers in guava (*Psidium guajava* L.) cv. Allahabad Safeda and their application in genetic diversity, population structure and cross species transferability studies. *PLoS ONE*, v. 15, n. 8, 2020.

Labouisse, J.P., Cubry, P., Austerlitz, F., Rivallan, R., Nguyen, H.A. (2020) New insights on spatial genetic structure and diversity of *coffea canephora* (Rubiaceae) in upper guinea based on old herbaria. *Plant Ecol Evol* 153: 82–100.

Li, Y. C., Korol, A. B., Fahima, T., Beiles, A., Nevo, E. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Molecular Ecology*, Osford, v.11, p.2453- 2465, 2002.

Marcolan, A. L., Espindula, M. C. *Café na Amazônia*. 1. ed. Brasília, DF:EMBRAPA Rondônia, 2015.

Martins, M. Q., Partelli, F. L., Ferreira, A., Bernardes, C. O., Golynski, A., Vieira, H. D., Freitas, M. S. M., Ramalho, J. C. 2019b. Genetic variability on nutrient contents in *Coffea canephora* genotypes cultivated at 850 meters of altitude in two crop seasons. *Functional Plant Breeding Journal*. 1(1): 1-12. DOI: 10.35418/2526-4117/v1n1a6.

Mojena R. 1977. Hierarchical grouping methods and stopping rules: an evaluation. *The Computer Journal* 20: 359-363.

Morgante, M., Hanafey, M., Powell, W. (2002) Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes. *Nat Genet* 30: 194–200.

Peakall, R., Smouse, P. E. GenAIEx 6, 5: genetic analysis in Excel, Population genetic software for teaching and research an update. *BMC Bioinformatics*, 28: 2537-2539, 2012.

Petit, R.J., Mousadik, A.E.L., Pons, O. (1998) Identifying populations for conservation on the basis of genetic markers. *Conserv Biol* 12: 844–855.

Pritchard, J. K., Stephens, M., Donnelly, P. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. *Genetics*, v. 155, n. 2, p. 945–959, 1 jun. 2000.

Sakiyama, N., Martinez, E., Tomaz, M., Borém, A. Café arábica do plantio a colheita. Viçosa: Editora UFV, 2015. 316p.

Sánchez, E., Solano, W., Gatica-Arias, A., Chavarría, M., Araya-Valverde, E. (2020) Microsatellite DNA fingerprinting of *Coffea* sp. Germplasm conserved in Costa Rica through singleplex and multiplex PCR. *Crop Breed Appl Biotechnol* 20: 1–9.

Sousa, T.V., Caixeta, E.T., Alkimim, E.R., de Oliveira, A.C.B., Pereira, A.A., Zambolim, L., Sakiyama, N.S. (2017) Molecular markers useful to discriminate *Coffea arabica* cultivars with high genetic similarity. *Euphytica*. doi: 10.1007/s10681-017-1865-9.

Souza, F. F., Eveline Teixeira Caixeta, E. T., Ferrão, L. F. V., Ferreira Pena, G. F., Sakiyama, N. S., Zambolim, E. M., Zambolim, L., Cruz, C. D. (2013) Molecular diversity in *Coffea canephora* germplasm conserved and cultivated in Brazil. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 13: 221-227 2013.

Toppa, E.V.B., Jadoski, C.J. (2013) O Uso dos Marcadores Moleculares no Melhoramento Genético de Plantas. *Sci Agrar Parana* 12: 1–5.

Zeferino, L.B., Saraiva, S.H., Cesar Da Silva, L., José, L., Teixeira, Q., Maria, S., Lucia, D. (2010) Efeito da concentração de sólidos solúveis do extrato de café conilon no índice de refração, na densidade e na viscosidade do extrato. *Enciclopédia Biosf* 6: 1–8.

Zucchi, M.I., Pereira, R., Brondani, V., Siqueira, A., Coelho, G., Vencovsky, R. (2003) *Eugenia dysenterica*. *Mol Ecol Notes* 457: 449–457.

C A F É:
EXPLORANDO A DIVERSIDADE
GENÉTICA EM *Coffea Canephora*
POR MEIO DE MARCADORES
MOLECULARES

 www.atenaeditora.com.br

 contato@atenaeditora.com.br

 @atenaeditora

 www.facebook.com/atenaeditora.com.br

 Atena
Editora

Ano 2024

C A F É:
EXPLORANDO A DIVERSIDADE
GENÉTICA EM *Coffea Canephora*
POR MEIO DE MARCADORES
MOLECULARES

 www.atenaeditora.com.br

 contato@atenaeditora.com.br

 @atenaeditora

 www.facebook.com/atenaeditora.com.br

 Atena
Editora

Ano 2024