



NATHÁLIA GOMES MATTOS

**DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO MOLECULAR
PARA IDENTIFICAÇÃO DE CLONES DE VARIEDADES DE
*Coffea canephora***

**LAVRAS – MG
2024**

NATHÁLIA GOMES MATTOS

**DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO MOLECULAR PARA IDENTIFICAÇÃO
DE CLONES DE VARIEDADES DE *Coffea canephora***

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, área de concentração em Biotecnologia Vegetal para a obtenção do título de Doutora.

Dr. Alan Carvalho Andrade
Orientador

**LAVRAS – MG
2024**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Mattos, Nathália Gomes.

Desenvolvimento de um método molecular para a identificação
de clones de variedades de *Coffea canephora* / Nathália Gomes

Mattos. - 2024.

80 p.

Orientador(a): Alan Carvalho Andrade.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2023.

Bibliografia.

1. Café. 2. SNPs. 3. Distinção de clone. I. Andrade, Alan Car-
valho. II. Título.

NATHÁLIA GOMES MATTOS

**DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO MOLECULAR PARA IDENTIFICAÇÃO
DE CLONES DE VARIEDADES DE *Coffea canephora***

**DEVELOPMENT OF A MOLECULAR METHOD FOR IDENTIFICATION OF
CLONES OF *Coffea canephora* VARIETIES**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, área de concentração em Biotecnologia Vegetal para a obtenção do título de Doutora.

APROVADA em 28 de fevereiro de 2023.

Dr. Pierre Marraccini – CIRAD

Dr. Adriano Delly Veiga – EMBRAPA Cerrados

Dr. Marcelo Curitiba Espíndula – EMBRAPA Café

Dr. Luciano Vilela Paiva –UFLA

Dr. Alan Carvalho Andrade
Orientador

**LAVRAS – MG
2024**

À minha família que sempre me apoiou incondicionalmente,
confiando em mim, até mesmo quando eu chegava a duvidar
da minha força e capacidade.
Dedico.

AGRADECIMENTOS

À Deus por sempre iluminar meus caminhos e por fazer com que mais esse sonho se realizasse.

Aos meus pais, familiares e amigos, que mesmo a distância, me deram o suporte necessário para continuar.

Ao meu Orientador Dr. Alan Carvalho Andrade, por toda a paciência e ensinamento.

A todos os meus amigos do Laboratório de Genética Molecular e também aos meus amigos do programa de Biotecnologia Vegetal e do Setor de Cafeicultura.

Ao programa de Pós-graduação em Biotecnologia Vegetal, por todo o suporte fornecido.

A todos os professores que me auxiliaram nesta caminhada, dentro e fora da sala de aula.

À Universidade Federal de Lavras, por nos proporcionar um estudo de excelência, tornando-nos profissionais de qualidade.

Aos colaboradores deste projeto Consórcio Pesquisa Café, INCT-Café (CNPq/Fapemig), CAPES.

Ao Setor de Cafeicultura da UFLA, por nos proporcionar a instalação para que o nosso trabalho fosse realizado, e a todos os seus funcionários.

Aos contribuintes que pagam os impostos para que a nossa Universidade seja mantida.

A todos que de maneira direta ou indireta contribuíram para que esse trabalho fosse realizado.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

O presente trabalho foi realizado com apoio do Consórcio Pesquisa Café – Fundação de Apoio a Pesquisa – FUNAPE.

MUITO OBRIGADA!

*Ninguém é suficientemente perfeito, que não possa aprender com o outro e,
ninguém é totalmente estruído de valores que não possa ensinar algo ao
seu irmão.*

São Francisco de Assis

RESUMO

Os recentes avanços em genômica do cafeeiro, tem possibilitado o desenvolvimento de diversas ferramentas moleculares para a identificação e caracterização do germoplasma disponível para utilização nos programas de melhoramento genético da espécie, assim como o desenvolvimento de métodos moleculares para auxiliar na identificação e diferenciação de materiais genéticos. Neste sentido, o presente trabalho teve por objetivo o desenvolvimento de um método molecular, rápido e de baixo custo, para a identificação de clones de *Coffea canephora*. Primeiramente foram selecionados SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) que estavam inseridos no sítio de corte da enzima *EcoRI* e que apresentavam diferenças alélicas. Foram desenhados *primers* que flanqueavam a região, foram realizadas PCRs, o produto destas passaram por corte enzimático com a *EcoRI* e depois foi realizada a eletroforese, as bandas obtidas foram comparadas com o controle de genoma conhecido e assim foram descritos os alelos. Os resultados obtidos demonstram que o método desenvolvido, foi eficiente em diferenciar geneticamente, diversos clones componentes do Sistema Nacional de Proteção de Cultivares do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).

Palavras-chave: café; SNPs; distinção de clones.

ABSTRACT

Recent advances in coffee genomics have enabled the development of several molecular tools for the identification and characterization of the available germplasm for genetic improvement of coffee, as well as allowed the development of molecular methods for the identification and differentiation of genetic materials. Therefore, the objective of this work was to develop a fast and low-cost molecular method for the identification of *Coffea canephora* clones. First, we selected SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) that were inserted into the cutting site of *EcoRI* restriction enzyme and that had allelic discrimination. Primers flanking this region were designed, PCRs were performed, and the amplification products were enzymatically cut with *EcoRI*. After performing electrophoresis, the resulting bands were compared with those of the control genome, allowing the identification and description of the alleles. Our results show that the developed method was efficient in the genetic discrimination of several coffee clones from varieties present in the National Cultivar Protection System of the Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply (MAPA).

Keywords: coffee; SNPs; discrimination of coffee clone.

Impactos sociais, tecnológicos, econômicos e culturais

O presente trabalho teve por objetivo o desenvolvimento de um método molecular, rápido e de baixo custo, para a identificação de clones de *Coffea canephora*. Isto porque, as cultivares de café canéfora que são protegidas pelo Programa de Proteção de Cultivares do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) são baseadas apenas em características fenológicas, o que muitas vezes acabam dificultando esse processo de proteção, pois as plantas apresentam as características de fenótipos parecias, além desses marcadores fenológicos serem baseados em características do *Coffea arabica*. Assim, foi desenvolvido um método molecular para a identificação desses clones baseados em SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) e no corte da enzima *EcoRI*, onde os clones apresentam diferenças alélicas e permitem identificar cada um deles. Os resultados obtidos demonstraram que o método desenvolvido, foi eficiente em diferenciar geneticamente, diversos clones componentes do Sistema Nacional de Proteção de Cultivares do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Por meio desta ferramenta, viveiristas e produtores poderão realizar este teste para assegurar que os clones que estão trabalhando são correspondentes ao clone previamente desejado. Além disto, o teste pode ser realizado em mudas pequenas, isso porque apenas uma pequena folha é o suficiente para fazer a extração do DNA e a análise dos SNPs, reduzindo assim o tempo, pois para que fosse feita a identificação fenológica faz-se necessário que as plantas estejam em produção, pois os frutos também são analisados, o que na cultura do café demora anos.

Social, technological, economic and cultural impacts

The objective of this work was to develop a fast and low-cost molecular method for the identification of *Coffea canephora* clones. The canephora coffee cultivars are protected by the Cultivar Protection Program of the Ministry of Agriculture, Livestock and Supply (MAPA) based only on phenological characteristics, which often make this protection process difficult. This happens because these phenotypic characteristics are not only similar between clones but also based on characteristics of *Coffea arabica*. A molecular method was developed to identify these clones based on SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) and the *EcoRI* enzyme cutting site. Thus, clones presenting allelic distinctions can be readily identified. Our results demonstrate that the developed method was efficient in the genetic differentiation of several clones that are components of the National System of Cultivar Protection from the Ministry of Agriculture, Livestock and Supply (MAPA). Using this tool, greenhouse workers and agricultural workers will be able to identify which clones they are working with and if they correspond to the previously desired clone. Furthermore, this test can be carried out on small seedlings, given that just one small leaf is enough for DNA extraction and further SNPs analysis, enabling an earlier phenological identification.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	13
2.	REFERENCIAL TEÓRICO.....	14
2.1.	Café no Brasil e sua importância econômica	14
2.2.	Taxonomia e características de <i>Coffea</i>	15
2.3.	Cultivares Registradas e Protegidas	18
2.4.	Projeto Genoma Brasileiro do Café.....	22
2.5.	Sequenciamento.....	22
2.6.	Marcadores moleculares.....	23
2.7.	Sequenciamento de Nova Geração (NGS – Next Generation Sequencing).....	25
2.8.	SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms).....	25
2.9.	Genotipagem	26
3.	MATERIAL E MÉTODOS.....	29
3.1.	Material vegetal.....	29
3.2.	Extração de DNA	29
3.3.	Seleção de SNPs candidatos com o programa de bioinformática Axiom™ Analysis Suite 2.0.....	30
3.4.	Definição dos SNPs a serem utilizados.....	31
3.5.	Desenho de <i>primers</i>	31
3.6.	Reação da Polimerase em Cadeia (PCR)	34
3.7.	Corte enzimático com <i>EcoRI</i>	34
3.8.	Genotipagem	35
4.	RESULTADOS e DISCUSSÃO	35
4.1.	Confirmação da eficiência da extração de DNA	35
4.2.	Definição dos controles utilizados	36
4.3.	Eletroforese dos <i>amplicons</i> após passarem por digestão enzimática	43
4.4.	Genotipagem	47
5.	CONCLUSÃO	65
	REFERÊNCIAS	66

ANEXO A – Informações sobre os <i>amplicons</i>	73
---	----

1. INTRODUÇÃO

No cenário mundial, o café é uma das mais importantes *commodities* agrícolas, sendo o segundo produto primário a ser comercializado em valor, perdendo apenas para o petróleo, afirmando assim sua importância para a economia mundial (Baker et al., 2001; Tolessa et al., 2019). O Brasil tem grande participação, sendo o maior produtor com cerca de 30,5% da produção mundial e também o segundo maior consumidor (CONAB, 2023; ICO, 2023).

A produção comercial mundial é atrelada às espécies arábica (*Coffea arabica*) e canéfora (*Coffea canephora*), que representam, respectivamente, 52,6% e 47,4%, de acordo com os dados obtidos no ICO (*International Coffee Organization*). Para a safra 2021/2022, no Brasil, a produção foi de 50,92 milhões de sacas, sendo 32,72 milhões de café arábica e 18,20 de canéfora (CONAB, 2023; ICO, 2023). Na próxima safra, espera-se que haja um incremento de cerca de 14% na produção de café arábica, devido a um aumento de área em produção e uma estimativa de melhor produtividade. No entanto, espera-se uma redução de produção do café canéfora, devido ao fato de 2022 ter sido um ano de safra recorde, e pelo Espírito Santo, estado maior produtor, ter enfrentado intercorrências climáticas negativas, que atingiram a lavoura em fase inicial. (CONAB, 2023; ICO, 2023).

No estado de Rondônia, o acréscimo esperado na produção de canéfora é de cerca de 5,1%, devido a condições climáticas favoráveis atrelada a uma renovação da lavoura que está entrando em produção. Essa renovação ocorreu pela substituição das lavouras oriundas de sementes por lavouras provenientes de cultivares clonais, que são mais produtivas e mais resistentes às doenças e às adversidades climáticas com temperatura elevada (CONAB, 2023).

Desta forma, a produção de mudas por estacas se apresenta como um dos fatores de grande importância para a produção de *C. canephora*, pois permite uma cópia semelhante à planta mãe, garantindo uma uniformidade nos vários caracteres de interesse (Bergo et al., 2002).

Quando se implanta uma lavoura proveniente de uma cultivar clonal, onde as mudas são oriundas de um trabalho prévio de seleção de plantas matrizes, estas apresentam as seguintes vantagens em relação à de sementes: menor custo de implementação, maior produtividade, maior uniformidade de maturação, melhor qualidade do grão, ciclo diferenciado de maturação e programação escalonada de colheita, proporcionando o sucesso na formação da lavoura (Espindula, 2011).

A garantia das variedades de mudas de café que o agricultor adquire para implantar a sua lavoura é assegurada pelo MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento).

São certificadas aquelas que passam por todas as análises exigidas, desde a certificação de sua variedade, bem como sua qualidade fisiológica, física, fitossanitária (MAPA, 2023).

O registro e/ou proteção são baseados apenas em características morfológicas, as quais são descritas e asseguradas pelo melhorista responsável pelo desenvolvimento da cultivar clonal, fato este, que pode não ser preciso no diagnóstico precoce dos clones, visto que as características morfológicas só podem ser analisadas após o desenvolvimento da planta.

Sendo assim, o objetivo do presente trabalho foi desenvolver um método molecular utilizando marcadores SNPs polimórficos para a identificação de cultivares clonais de *C. canephora*, registradas e protegidas no Brasil, que fosse de execução rápida, apresentasse acurácia na identificação e um preço acessível, podendo ser utilizado como garantia no comércio das cultivares clonais.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Café no Brasil e sua importância econômica

Nativo do continente africano e introduzido no Brasil no ano de 1723, o cafeeiro brasileiro teve origem de mudas provenientes da Guiana Francesa. O Maranhão foi o primeiro estado a implantar a cultura, que, posteriormente, propagou-se para os estados vizinhos em pequenas proporções. O estado da Bahia iniciou o plantio apenas no ano de 1773. Concomitantemente, algumas sementes foram transportadas do estado do Maranhão para o estado do Rio de Janeiro, o que permitiu a instalação da cultura na Serra do Mar (Alonso-Salces et al., 2009). Em 1825, as plantações alcançaram o Vale do Paraíba e também os estados de Minas Gerais e São Paulo. Consequentemente, a produção estendeu-se para o centro-sul, encontrando condições climáticas altamente favoráveis e ao norte do Rio de Janeiro e Espírito Santo em 1920.

A cadeia produtiva do café se destaca na história econômica e social do país desde a época colonial. No entanto, a exportação de café passou por momentos de instabilidade, próximo ao ano de 1930, com um período de decréscimo em virtude do surgimento das crises econômicas internacionais (Alonso-Salces et al., 2009). Atualmente, o café é uma das *commodities* agrícolas mais importantes no mundo, sendo responsável por quase metade do total das exportações dos produtos tropicais. Além disso, é o segundo maior no mercado mundial de produtos naturais, situando-se apenas atrás do petróleo, representando a maior fonte de renda para muitos países em desenvolvimento (Brasil, 2022).

A estimativa da produção mundial no ano cafeeiro de 2021/22 foi de 167,2 milhões de sacas de 60kg, apresentando uma redução de 2,1% em relação à safra anterior. Desta produção, cerca de 94 milhões de sacas foram de café arábica e 73 milhões de sacas de canéfora. No entanto, o consumo foi estimado em 170,3 milhões de sacas, excedendo, assim, a produção (CONAB, 2023; ICO, 2023).

Enquanto o café arábica sofreu com as adversidades climáticas e não teve um incremento na produtividade, embora fosse um ano considerado de bienalidade positiva, a produtividade do café canéfora foi favorecida pelo clima na maioria das regiões produtoras. As boas precipitações, aliadas a temperaturas ideais, entre 22 e 26 graus, favoreceram o aumento da produtividade em 7,9% em relação à safra 2020/2021 (CONAB, 2023; ICO, 2023).

O Brasil é o maior produtor de café, sendo responsável por cerca de 51 milhões de sacas no ano de 2022. Para o ano de 2023 está estimado um aumento na produção, que deve ser em torno de 32,7 milhões de sacas de café arábica e 18,2 milhões de sacas para a produção de canéfora (CONAB, 2023; ICO, 2023).

O estado do Espírito Santo, maior produtor nacional de canéfora, é responsável por 68% da produção e teve um incremento na produtividade de 5,7%. Entretanto, o estado de Rondônia teve um incremento de produtividade de 21,1%, que se deu ao fato de além de ter registrado boas condições climáticas, também realizou a substituição das lavouras antes implementadas via semente, por lavouras com clones selecionados e com melhor padrão tecnológico (CONAB, 2023).

2.2 Taxonomia e características de *Coffea*

O cafeeiro pertence à ordem *Gentianales*, família *Rubiaceae*, subfamília *Ixoroideae* e tribo *Coffea*, a qual é composta pelo gênero *Coffea* L. e possui aproximadamente 124 espécies (Davis et al., 2011). As duas espécies de maior importância comercial no gênero *Coffea* são *C. arabica* e *C. canephora* (Combes et al., 2015). Na classificação botânica, as plantas de *Coffea* são dicotiledôneas, possuem folhas persistentes e flores hermafroditas, apresentam porte arbustivo ou arbóreo e caule lenhoso (Fazuoli et al., 2000). O início do processo de diversificação deste gênero, evolutivamente, ocorreu por volta de 5 a 25 milhões de anos atrás (Cubry et al., 2008).

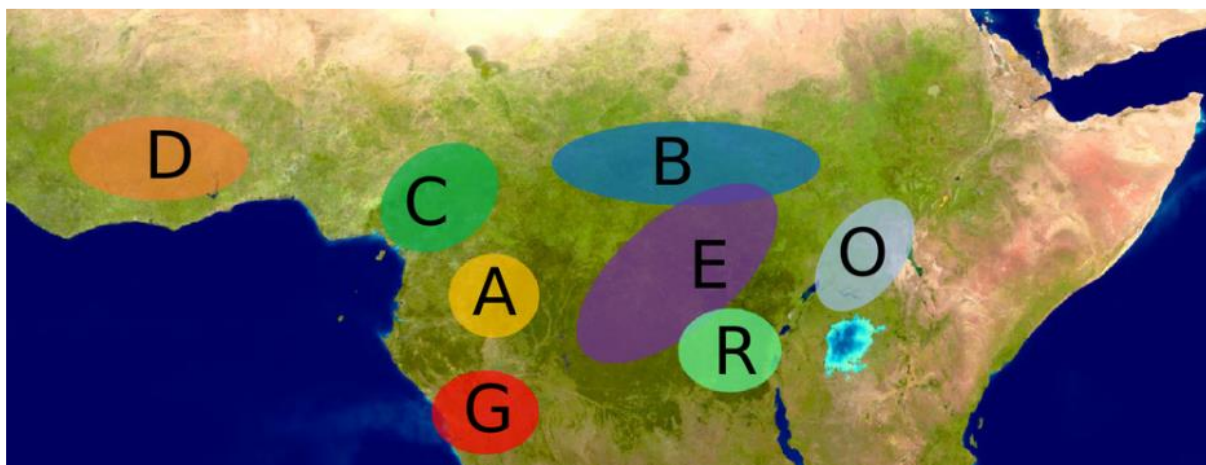
As plantas que compõem a espécie *C. canephora* são diploides ($2n = 2 \times = 22$) e alógamas, o que proporciona uma alta taxa de variabilidade genética, levando assim a uma

maior capacidade de se adaptar às mais variadas condições climáticas, se adequando muito bem às planícies equatoriais, onde o ambiente é quente e úmido (Bertrand et al., 2003).

A primeira análise de diversidade genética em *C. canephora* foi utilizando isoenzimas e foram descritos dois grupos Guineano e Congolês, de acordo com o cálculo da distância genética (Berthaud; 1986). Posteriormente, ainda com isoenzimas, o grupo Congolês foi dividido em dois subgrupos, denominados SG1 e SG2, (Montagnon et al., 1992). Musoli et al. (2009) com o uso de marcadores SSR inseriu um novo subgrupo de diversidade ao grupo Congolês, intitulado grupo C e também criou o grupo de Uganda (Ug). Uma nova análise realizada por Gomez et al. (2009) utilizando marcadores SSR e RFLP resultou em cinco grupos genéticos bem distintos que foram denominados em grupos representados por letras de A até E, onde o Grupo A corresponde ao subgrupo SG1, B e E são uma subdivisão do subgrupo SG2, O Grupo D corresponde ao grupo Guineano e o Grupo C permaneceu com o mesmo nome. Estas divisões já haviam sido definidas por Dussert et al. (1999).

Essas análises anteriores resultaram em algum acordo de grupos genéticos e origem geográfica, no entanto, cada trabalho independente deu nomes diferentes aos grupos genéticos, causando uma confusão para a comunidade cafeeira, sugerindo a importância de definir com precisão uma nomenclatura geral (Merot-L'anthoene et al. 2019). Merot-L'anthoene et al. (2019) realizaram uma caracterização dos grupos genéticos de *C. canephora* realizada por meio de marcadores SNPs, confirmando assim a existência de todos os grupos de diversidade anteriormente mencionados, sendo eles Grupo A (originário do norte do Congo e do sul de Camarões), Grupo B (originário do Leste da República Centro Africana), Grupo C (originário do Oeste da República Centro Africana), Grupo D (originário de Guiné e da Costa do Marfim), Grupo E (originário da República Democrática do Congo), e Grupo O (originário da Uganda e do sul do Sudão). Além disso, também identificou e incluiu dois novos grupos de indivíduos com diversidade genética distinta das anteriores, os quais foram denominados de Grupo G (Angola) e R (originário do sul da República Democrática do Congo), conforme Figura 1.

Figura 1 – Origem geográfica dos principais grupos genéticos de *C. canéfora*.



Legenda: Grupo A (Norte do Congo e do Sul de Camarões), Grupo B (Leste da República Centro Africana), Grupo C (Oeste da República Centro Africana), Grupo D (Guiné e da Costa do Marfim), Grupo E (República Democrática do Congo), e Grupo O (Uganda e do sul do Sudão), Grupo G (Angola) e R (Sul da República Democrática do Congo),

Fonte: Merot-L'anthoene et al. (2019).

O grupo Congolês apresenta vários subgrupos dentre os quais existem dois de maior importância: o subgrupo SG1 (correspondente ao atual Grupo A) que apresenta como característica a tolerância a seca e está localizado na região mais litorânea da bacia do rio Congo; e o subgrupo SG2 (corresponde aos atuais Grupos B e E) que apresenta sensibilidade à seca e está localizado na floresta equatorial, a qual apresenta índices pluviométricos elevados e bem distribuídos ao longo do ano (Montagnon, 2000; Fazuoli et al., 2007).

Estudos de filogenia mostram que as plantas de canéfora presentes no Brasil são geneticamente semelhantes àsquelas do subgrupo SG1 (atual Grupo A) (Lambot et al., 2008). Nesta variedade, é possível encontrar plantas tolerantes à seca, pois essas plantas apresentam um mecanismo de maior controle sobre o seu sistema de transpiração (Damatta; Ramalho, 2006) e também são plantas altamente resistentes ao fungo *Hymeleia vastatrix*, causador da ferrugem das folhas (Carvalho et al., 2001). Assim, as plantas de canéfora são plantas adaptadas às regiões de baixa altitude, que possuem temperaturas médias anuais elevadas (de 22°C a 26°C), e, principalmente, em regiões com um período seco mais prolongado (Fazuoli, 1986).

No que diz respeito à qualidade, anteriormente, a bebida preparada a partir dos grãos de *C. canephora* resultava em um café neutro, de fraco sabor, ocasionalmente, com um amargor forte e pronunciado (Leroy et al., 2006). No entanto, as novas cultivares desenvolvidas estão priorizando também a qualidade dos frutos e, conseqüentemente, o sabor

da bebida (Alves et al., 2020; Ferrão, 2019; Teixeira et al., 2019). O seu valor de cafeína varia entre 1,51 a 2,64% de acordo com os clones e são de grande importância para a produção de cafés solúveis (Fonseca et al., 2011).

2.3 Cultivares Registradas e Protegidas

O Brasil é um importante produtor de café, demandando assim o desenvolvimento de novas cultivares para manter ou aumentar sua eficiência na produção. O processo que visa a comercialização de novas sementes e mudas no mercado, e que envolve os conceitos de registro e proteção de cultivares, depende da legislação brasileira. A Lei no 10.711, de 05 de agosto de 2003 e a Lei no 9.456, de 25 de abril de 1997 e suas regulamentações dispõem sobre o Sistema Nacional de Sementes e Mudas e institui o direito de proteção de cultivares, respectivamente (MAPA, 2023).

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), por meio do Sistema Nacional de Sementes e Mudas, é o órgão competente, responsável pelo Registro Nacional de Cultivares (RNC), que tem por objetivo garantir a identidade e qualidade do material de multiplicação e de reprodução vegetal produzido, comercializado e utilizado em todo o território nacional (MAPA, 2023).

Para que se possa realizar a produção, o beneficiamento e a comercialização de sementes e mudas faz-se necessário uma prévia inscrição da respectiva cultivar no RNC. Por meio deste registro, a pessoa física ou jurídica se torna o mantenedor daquela cultivar, ou seja, passa a ser o responsável pela disponibilização de um estoque mínimo do material que conserve sua pureza e suas características de identidade genética. Desta maneira, a inscrição de uma cultivar de domínio público no RNC poderá ser requerida por qualquer pessoa que mantenha disponível um estoque mínimo de material de propagação. Por conseguinte, para que se possa produzir, beneficiar e comercializar sementes e mudas, uma das exigências legais, é o registro da cultivar no RNC. Estas podem ter ou não a sua proteção requerida, de acordo com a origem do material vegetal em questão (MAPA, 2023).

No que diz respeito à proteção de uma cultivar, esta refere-se aos direitos relativos à propriedade intelectual e se aplica mediante a concessão de Certificado de Proteção de Cultivar ao seu obtentor. Portanto, essa proteção assegura a seu titular o direito à reprodução comercial no território brasileiro, ficando vedados a terceiros, durante o prazo de proteção, a produção com fins comerciais, o oferecimento à venda ou a comercialização do material de propagação da cultivar, sem sua autorização. Atualmente, no Brasil, o prazo de proteção para

a maioria das espécies vegetais é de 15 anos, no caso do café, este prazo é de 18 anos, contados a partir da data da concessão do Certificado Provisório de Proteção (MAPA, 2023).

A proteção de cultivares no Brasil compete ao Serviço Nacional de Proteção de Cultivares (SNPC). Para se requerer a proteção de uma nova cultivar, esta não pode ter sido oferecida à venda no Brasil há mais de 12 meses em relação à data do pedido de proteção, e que a mesma apresente características distintas, homogêneas e estáveis. Segundo a legislação, a definição de uma cultivar distinta, é quando se pode distinguir claramente a mesma de qualquer outra, cuja existência na data do pedido de proteção seja reconhecida; homogênea, quando utilizada em plantio, em escala comercial, apresente variabilidade mínima quanto aos descritores que a identifiquem, estável, quando reproduzida em escala comercial, e que mantenha a sua homogeneidade por meio de gerações sucessivas (MAPA, 2023).

Os procedimentos para condução dos testes de distinguibilidade, homogeneidade e estabilidade (DHE) são definidos pelo MAPA e publicados no Diário Oficial da União. Atualmente, há mais de 130 instruções para execução de testes de DHE que contemplam espécies agrícolas, florestais, forrageiras, frutíferas, olerícolas e ornamentais (MAPA, 2023).

Vale a pena ressaltar, que registro e proteção de cultivares são procedimentos distintos, e não se faz necessário que uma cultivar seja registrada para que a mesma possa ser protegida. Para o registro são utilizadas informações sobre o grupo técnico, a parte agrônômica e as principais características morfológicas, biológicas e/ou fisiológicas e para a proteção há um formulário específico para o gênero *Coffea* que contém trinta e oito descritores morfológicos. Em síntese, o registro da cultivar no RNC permite a produção, o beneficiamento e a comercialização de sementes e mudas; no entanto, a proteção da cultivar no SNPC dá o direito à propriedade intelectual ao seu obtentor. Nas Tabelas 1 e 2 a seguir tem-se as cultivares de *C. canephora* registradas e protegidas no MAPA respectivamente (MAPA, 2023).

Tabela 1 – Variedades de *C. canephora* registradas no MAPA (Continua)

Data de Registro	Cultivar	Mantenedor
04/11/1999	Apoatã IAC 2258	IAC
28/06/2000	Conilon	INCAPER
28/06/2000	EMCAPA - 8111 – Precoce	INCAPER
28/06/2000	EMCAPA – 8131	INCAPER
28/06/2000	EMCAPA 8121	INCAPER
21/08/2000	EMCAPA 8141 Robustão Capixaba	INCAPER
21/08/2000	EMCAPER - 8151 Robusta Tropical	INCAPER

Tabela 1 – Variedades de *C. canephora* registradas no MAPA (Conclusão)

Data de Registro	Cultivar	Mantenedor
28/08/2000	Verdebrás G30/G35	Wanderlino Medeiros Bastos
05/09/2000	EMCAPER 8151 - Robusta Tropical	INCAPER
10/03/2006	Vitória Incaper 8142	INCAPER
19/10/2009	Ipiranga 501	Francisco Luis Da Silva Felner
05/08/2010	SV 2010	José Jânio Bizi
05/04/2012	BRS Ouro Preto	EMBRAPA
29/08/2013	Centenária ES8132	INCAPER
29/08/2013	Diamante ES8112	INCAPER
29/08/2013	ES8122	INCAPER
10/06/2015	Colatina PR6	FUNDAÇÃO PROCAFÉ
17/10/2017	Marilândia ES8143	INCAPER
04/12/2017	Tributun	UFES
30/11/2018	Andina	IF - Campus Morrinho /UFES
25/01/2019	BRS 2314	EMBRAPA
28/01/2019	BRS 1216	EMBRAPA
28/01/2019	BRS 2336	EMBRAPA
28/01/2019	BRS 3137	EMBRAPA
28/01/2019	BRS 3210	EMBRAPA
28/01/2019	BRS 3213	EMBRAPA
28/01/2019	BRS 3220	EMBRAPA
25/10/2019	BRS 2299	EMBRAPA
25/10/2019	BRS 2357	EMBRAPA
25/10/2019	BRS 3193	EMBRAPA
19/11/2019	ES8152	INCAPER
15/05/2020	Monte Pascoal	UFES
27/01/2021	BRS Primalta	EMBRAPA
27/01/2021	BRS Primalta 20	EMBRAPA
27/01/2021	BRS Primalta 30	EMBRAPA
27/01/2021	BRS Primalta 40	EMBRAPA
27/01/2021	BRS Primalta 50	EMBRAPA
27/01/2021	BRS Primalta 60	EMBRAPA
27/01/2021	BRS Primalta 70	EMBRAPA
27/01/2021	BRS Primalta 80	EMBRAPA
27/01/2021	BRS Primalta 90	EMBRAPA
21/02/2021	Salutar	UFES
23/11/2021	ES8161 Goytacá	INCAPER
21/12/2021	Forte Guarani	UFES
17/03/2022	Plena	UFES
19/08/2022	IAC Herculândia	IAC

Fonte: MAPA (2023)

Tabela 2 – Variedades de *C. canephora* protegidas no MAPA.

Início da proteção	Término da proteção	Cultivar	Mantenedor
09/10/2012	09/10/2030	BRS Ouro Preto	EMBRAPA
13/12/2013	13/12/2031	Centenária ES8132	INCAPER
13/12/2013	13/12/2031	Diamante ES8112	INCAPER
13/12/2013	13/12/2031	ES8122	INCAPER
06/07/2020	06/07/2038	BRS 2336	EMBRAPA
06/07/2020	06/07/2038	BRS 3137	EMBRAPA
28/12/2020	28/12/2038	BRS 1216	EMBRAPA
28/12/2020	28/12/2038	BRS 2314	EMBRAPA
28/12/2020	28/12/2038	BRS 3213	EMBRAPA
28/12/2020	28/12/2038	BRS 3220	EMBRAPA
22/03/2021	22/03/2039	BRS 3210	EMBRAPA
18/03/2022	18/03/2040	BRS Primalta	EMBRAPA
18/03/2022	18/03/2040	BRS Primalta 50	EMBRAPA
18/03/2022	18/03/2040	BRS Primalta 60	EMBRAPA
02/02/2023	Provisória	BRS Primalta 20	EMBRAPA
02/02/2023	Provisória	BRS Primalta 90	EMBRAPA

Fonte: MAPA (2023)

A EMBRAPA e o INCAPER são duas instituições, que como pode ser observado nas Tabelas 1 e 2, tem grande importância no desenvolvimento, registro e proteção de cultivares clonais, dentre essas cultivares estão as que foram utilizadas neste estudo.

- DIAMANTE - ES8112: é composta por nove clones compatíveis, os quais apresentam maturação precoce e uniforme, concentrando assim a colheita no mês de maio. Possui a bebida com qualidade considerada superior/prêmio. Possui moderada resistência à ferrugem e tolerância à seca (Ferrão et al., 2015).

- JEQUITIBÁ ES8122: essa variedade é formada por nove clones compatíveis e de maturação intermediária, o que faz a colheita acontecer no mês de junho. Sua bebida foi classificada como superior/prêmio. Possui moderada resistência à ferrugem e tolerância ao déficit hídrico (Ferrão et al., 2015).

- CENTENÁRIA ES8132: os nove clones que compõem essa variedade são compatíveis e de maturação tardia, assim a colheita é realizada no mês de julho. A qualidade da bebida foi classificada como superior/prêmio. Possui tolerância à seca e moderada resistência à ferrugem (Ferrão et al., 2015).

As cultivares clonais citadas acima e que foram utilizadas neste estudo estão protegidas, e essa proteção ela foi realizada na forma de variedade clonal, ou seja, a proteção é feita para o conjunto de clones e não individualmente para cada clone (MAPA, 2023).

2.4 Projeto Genoma Brasileiro do Café

O CBP&D-Café (Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café), a FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, e outras instituições federais realizaram uma parceria com o objetivo de anotar e caracterizar detalhadamente as funções dos milhares de genes ligados aos diferentes processos biológicos, ao desenvolvimento e aos metabólitos das plantas de café. Como resultado dessa parceria, surgiu a iniciativa pioneira do Projeto Genoma Brasileiro do Café (Brasil, 2022). Foram obtidas ESTs (*Expressed Sequence Tags*) pelos pesquisadores, sendo 130.792 de *C. arabica*, 12.381 de *C. canephora* e 10.566 de *C. racemosa*, as quais resultaram em 17.982 *contigs* e em 32.155 *singlets* (Vieira et al., 2006).

A partir destes resultados criou-se uma plataforma de dados que possibilitou a identificação de mais de 35 mil genes distintos e permitiu a realização de vários outros estudos moleculares em café (Denoeud et al., 2014; Lemos et al., 2020). De um modo geral, o projeto fortaleceu a capacidade de pesquisa em diversas áreas, entre elas a biologia estrutural (Vieira et al., 2006), a genômica (Barreto et al., 2011), e a bioinformática (Lima et al., 2011).

2.5 Sequenciamento

O sequenciamento completo do genoma de *C. canephora* foi publicado em uma parceria entre 11 países – Brasil, França, Itália, Canadá, Alemanha, China, Espanha, Indonésia, Austrália, Índia e Estados Unidos (Denoeud et al., 2014).

O mapeamento genético de alta densidade abrangeu aproximadamente 64% da montagem (364 Mb) e 86% dos genes anotados foram ancorados nos 11 cromossomos de *C. canephora*. Ainda foram anotados 25.574 genes codificadores de proteínas, 92 microRNAs precursores e 2.573 genomas de transferências de organelas para o núcleo. Aproximadamente

50% do genoma foi representado por elementos transponíveis, dos quais 85% são retrotransposons de repetição terminal longa (LTR) (Denoëud, et al. 2014).

Os primeiros resultados do Projeto de Sequenciamento do Genoma do *Coffea arabica*, uma parceria liderada pelas empresas Illycaffè e Lavazza, juntamente com o Istituto di Genomica Applicata, o IGA Technology Services, a DNA Analytica e as Universidades de Trieste, Udine, Padova e Verona, foi divulgado em 2018. Cromossomos artificiais bacterianos foram utilizados para clonar os 36.864 fragmentos genômicos e estes foram sequenciados em 96 conjuntos de 384 clones. Foram produzidos 488 bilhões de pares de bases, correspondendo a 132 equivalentes de genoma. Uma análise de k-mers estimou o tamanho do genoma em 1,3 Gb. Foram geradas 96 montagens independentes usando os programas de software ABySS e SSPACE, e depois mescladas para gerar um arquivo multifasta. A sequência contém 1,51 bilhão de pares de base, que estão divididos em 164.254 scaffolds. E foram previstos e funcionalmente anotados 78.311 genes em *C. arabica* (World Coffee Research, 2020)

2.6 Marcadores moleculares

Marcadores moleculares são pontos de referência nos cromossomos que apresentam variabilidade em seu DNA, os quais podem ser detectados por meio de tecnologias distintas (Ferreira; Grattapaglia, 1998). De posse destas marcas, pesquisadores que trabalham no melhoramento genético podem utilizá-las como recurso para melhor acurácia no processo de seleção, tendo um aliado juntamente com as características fenotípicas (Kumar, 1999). Eles podem ser utilizados em praticamente todas as etapas do programa de melhoramento e atualmente tem grande aplicabilidade na caracterização de germoplasmas, onde são utilizados para a determinação da variabilidade genética disponível, no cálculo de distância entre os genitores possibilitando desta maneira a escolha dos genitores para os cruzamentos, e formação de populações (Caixeta; Pestana; Pestana, 2015).

Diversas classes de marcadores moleculares vêm sendo aplicados no melhoramento genético vegetal. Isso porque os marcadores de DNA são versáteis e apresentam vantagens quando comparados aos marcadores fenotípicos convencionais, pois estão presentes em maior número, são estáveis em todos os estádios de desenvolvimento da planta e não variam de acordo com o ambiente (Resende et al., 2012).

Estudos nas áreas de análises de divergência genética (Cattaneo, 2001), mapeamento genético (Rafalski, 2002), filogenia (Gehrig; Rosicker; Kluge, 1997) e melhoramento genético (Santos, 2000) vem utilizando-se de marcadores de DNA nas suas diversas finalidades. Eles

buscam identificar variações que estão presentes nas sequências genômicas que possam ser relacionadas com o fenótipo previamente observado. Concomitantemente, visam minimizar problemas associados aos métodos de melhoramento clássico, como o trabalho longo no campo, o tempo e os custos de produção, principalmente no caso de culturas perenes (Gehrig; Rosicker; Kluge, 1997; Rafalski, 2002; Santos, 2000).

Todos os marcadores moleculares têm como objetivo revelar a variabilidade no nível do DNA. No entanto, eles se diferenciam de acordo com o método utilizado, consequentemente variando no custo, na facilidade de uso, e na reprodutibilidade. Entretanto, para que possam ser utilizados, faz-se necessário que se encontre um polimorfismo entre os indivíduos (Borém; Caixeta, 2009). Para a detecção de polimorfismos ainda podem ser utilizados outros dois tipos de marcadores: os SNPs (“Single Nucleotide Polymorphism”) e os microsatélites (SSR: “Simple Sequence Repeat”), marcadores que são altamente polimórficos e que permitem uma cobertura ampla sobre o genoma do organismo (Santos et al., 2005). Ainda, as novas gerações de sequenciamento, estão servindo de base para o desenvolvimento de novos métodos para descobrir, sequenciar e genotipar uma grande quantidade de marcadores em praticamente qualquer genoma de interesse em uma única etapa, mesmo em populações com pouca ou nenhuma informação genética disponível (Davey et al., 2011).

Em cafeeiro, há vários trabalhos com relação a marcadores moleculares, identificando SNPs por meio de bibliotecas ESTs (*Expressed Sequence Tag*) (Mondego et al., 2011; Vidal et al., 2010; Vieira et al., 2006;). Esses trabalhos estudaram a expressão dos diferentes alelos do gene que codifica a subunidade menor da ribulose1,5-bis-fosfatocarboxilase (Rubisco), em folhas de *C. arabica* e *C. canephora*, utilizando-se de INDELS, (Marraccini et al., 2011), e também analisaram a expressão dos genes homólogos de nsLTP durante a maturação de frutos de *C. arabica* (Cotta et al. 2014).

A montagem do genoma do café teve o auxílio de Marcadores RADseq, que foram utilizados para saturar o mapa genético de uma população de *C. canephora* da ICRI-Indonésia (Denoëud et al., 2014). Marcadores DArTseq (Cruz; Kilian; Dierig, 2013), foram utilizados para estudo da diversidade genética de *C. canephora* (Garavito et al., 2016). Além disso, a técnica de genotipagem nextRAD permitiu caracterizar a diversidade genética de indivíduos de uma população de *C. canephora* do Brasil, onde foram encontrados 5.412 SNPs e o cromossomo 2 obteve a maior densidade de sondas mapeadas e mais de 60% dos SNPs identificados estavam inseridos em regiões gênicas (Carneiro et al., 2019).

2.7 Sequenciamento de Nova Geração (NGS – Next Generation Sequencing)

O NGS ou também conhecido como sequenciamento de alto rendimento é caracterizado pelo conjunto de diversas técnicas mais avançadas para a identificação de amostras biológicas. Tecnologia essa que possibilitou avanços na caracterização e quantificação de genomas, epigenomas e transcriptomas, isso porque apresentam alto rendimento, velocidade, sensibilidade e um custo reduzido (Freitas; Pinto, 2021; Li et al., 2018)

Juntamente, o NGS proporcionou o desenvolvimento de metodologias que combinam a descoberta de polimorfismo e a genotipagem em um único passo (Andrade et al., 2017; Baird et al., 2008; Huang et al., 2009; Elshire et al., 2011). Assim, essas metodologias detectam e genotipam os SNPs, e a partir destes dados realizam uma seleção dos SNPs que serão utilizados na análise com base no conjunto de critérios de interesse. As metodologias citadas (Andrade et al., 2017; Baird et al., 2008; Huang et al., 2009; Elshire et al., 2011) geram uma alta quantidade de marcadores, amplamente distribuídos ao longo do genoma, além de poderem ser aplicadas em pools ou grupos de amostras

2.8 SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms)

Os SNPs, devido à sua alta frequência ao longo do genoma, tem se tornado escolha principal entre os pesquisadores. São polimorfismos que podem ser detectados por análises de ESTs disponíveis (análises in sílico) ou por sequências de DNA genômico (gDNA). Os SNPs mais comuns são os de transição, onde uma pirimidina é substituída por outra pirimidina (C ↔ T) ou uma purina é substituída por outra purina (A ↔ G), ou ainda pode ser de transversão, no qual uma base purínica é substituída por uma pirimídica ou vice-versa (Vignal et al., 2002)

As formas de variação mais abundantes encontradas no genoma são os SNPs. O que possibilita a sua utilização em análises de: diversidade genética e caracterização de recursos genéticos, filogenia, diagnóstico e identificação de cultivares e construção de mapas que apresentam alta densidade de marcadores e ainda no melhoramento, a partir do uso da seleção assistida por marcadores (Rafalski, 2002). A seleção assistida por marcadores (SAM) pode proporcionar uma aceleração nos processos de desenvolvimento de novas cultivares de café (Andrade, 2007).

Marcadores convencionais, tais como os polimorfismos de fragmentos de restrição (RFLPs), os DNA polimórficos amplificados ao acaso (RAPDs), os polimorfismos amplificados a partir do tamanho do fragmento (AFLPs) e sequências de repetições simples (SSRs), geralmente não se localizam em uma sequência codante dos genes de interesse. No entanto, os SNPs, por apresentarem uma alta cobertura ao longo do genoma, podem ser encontrados em regiões gênicas, que são de grande utilidade em programas de seleção assistida (Andersen; Lübberstedt, 2003). SNPs que refletem em alterações no aminoácido codificado, são chamados não sinônimos, e podem trazer modificações estruturais e funcionais nas proteínas. Entretanto, SNPs inseridos nas regiões codantes, mas que não alteram o aminoácido a ser codificado são classificados como sinônimos. E ainda, os SNPs das regiões não codantes são chamados de anônimos (Rafalski, 2002).

Após a identificação dos SNPs, os mesmos devem ser validados, ou seja, sua frequência deve ser determinada em um grupo de indivíduos, para que desta maneira seja comprovada sua natureza polimórfica (Barker et al., 2003).

As novas tecnologias NGS revolucionaram o cenário da genômica de plantas cultivadas fornecendo uma infinidade de informações com melhorias em cobertura, tempo e custo (Bevan; Uauy, 2013). Um exemplo foi o sequenciamento do genoma de referência do *C. canephora* que propiciou recursos para que Andrade et al., em 2017, desenvolvesse um chip (26K Axiom SNP (Affymetrix)), com SNPs encontram-se distribuídos ao longo de todo o genoma. Esta ampla coleção de SNPs validados constituem uma importante ferramenta para estudos de biologia molecular e genética de populações com espécies de café, isso porque tem um baixo custo, apresenta uma alta densidade de marcadores, possui polimorfismo e velocidade de geração de dados, além de a plataforma proporcionar alta precisão e reprodutibilidade. Sua validação resultou na identificação de mais de 25 mil SNPs, dos quais cerca de 87% foram classificados como de alta resolução, dos quais 81,4% eram polimórficos.

2.9 Genotipagem

Os dois principais componentes para a genotipagem de germoplasma são: a descoberta de polimorfismos de sequência de DNA e a avaliação desse conjunto de marcadores em um grupo de material. O estudo se dá basicamente em duas etapas, primeiro o marcador é descoberto e em seguida é realizado o desenho do ensaio e a genotipagem. Quando se utiliza da metodologia de genotipagem baseada em sequenciamento (GBS) a descoberta do marcador e a genotipagem são concluídas ao mesmo tempo, o que facilita explorações posteriores, além

de permitir que os dados brutos possam ser reanalisados, principalmente por meio de ferramentas de bioinformática levando assim a um aumento dos dados para o genoma de referência, o que agrega informação aos dados brutos (Poland; Rife, 2012).

Quando se fala em ensaios de genotipagem por SNPs, eles podem ser por hibridização alelo-específica (*Allele Specific Oligonucleotide Hybridization - ASH*), por extensão de *primer* (*Primer Extension*) e por ligação de oligonucleotídeos (*Oligonucleotide Ligation*).

Uma das maneiras de se realizar o sistema de hibridização alelo-específica é pelo desenho de duas sondas alelo-específicas de forma que a base polimórfica fique no centro do oligonucleotídeo. Apenas as sondas com hibridização completa são estáveis durante o anelamento ao DNA alvo, já os híbridos não perfeitos não são estáveis, e consequentemente não irão se anelar, possibilitando então a detecção do polimorfismo. Dentre os sistemas que utilizam esse mecanismo, um dos mais utilizados e com maior capacidade de multiplexagem é o sistema *TaqMan* (THERMO FISHER, 2023). Nessa metodologia, a discriminação alélica ocorrerá por duas sondas alelo-específicas, marcadas com um corante fluorescente sonda-específico e com um sequestrador (quencher). Durante a amplificação das sequências flanqueadoras do SNP, as sondas perfeitamente complementares ao DNA alvo são clivadas pela 5'-exonuclease da Taq polimerase, e assim ocorre a emissão de fluorescência. Os genótipos são atribuídos através da análise da intensidade da fluorescência dos dois corantes. Bonants et. al (2019) utilizou-se de dois sistemas de Taqman que já eram sensíveis e acrescentou ainda um controle interno para criar um triplex para o diagnóstico de *Xylella fastidiosa* em plantas.

A segunda opção, por extensão de primer, ou também conhecida como mini sequenciamento, um iniciador é anelado adjacente ao SNP alvo e a detecção do nucleotídeo polimórfico é feita por meio da fluorescência emitida pela incorporação do nucleotídeo. O sistema *SNaPshot* (THERMO FISHER, 2023) envolve uma marcação fluorescente diferente para cada nucleotídeo, permitindo assim a identificação do nucleotídeo incorporado. Tso et. al (2022) usaram *SNaPshot* como uma das metodologias para distinguir um grupo de *Plasmodiophora brassicae*, patógeno que gera prejuízo a algumas culturas, como a canola.

Há ainda, uma metodologia baseada na capacidade da enzima DNA ligase juntar dois oligonucleotídeos hibridizados em sítios próximos um do outro. Para esse mecanismo faz-se necessário a construção de três sondas: duas alelo-específicas e uma comum aos dois alelos. A sonda comum irá se anelar imediatamente após o SNP. Cada uma das duas sondas alelo específicas possui na posição final 3' uma base complementar a cada um dos alelos analisados. Sendo assim, apenas as sondas que se anelam perfeitamente ao sítio do SNP serão

ligadas à sonda comum. Nesse caso, a discriminação alélica é feita com uma marcação diferencial com corante para cada alelo. Dos diversos sistemas comercialmente disponíveis com essa metodologia, dois se destacam: *SNPlex* (Tobler et al., 2005) e *GoldenGate* (Fan et al., 2003). E a diferença entre eles está centrada basicamente nos corantes utilizados e no método de detecção da fluorescência.

A tecnologia *GoldenGate* da Illumina (GGGT – GoldenGate Genotyping Technology) utiliza o mecanismo molecular de ligação dos oligonucleotídeos para discriminar os alelos. Existem dois sistemas de genotipagem comercializados pela Illumina: (1) *GoldenGate assay*, composto por arranjos de pequena a média densidade, podendo variar de 48 a 3.072 SNPs por ensaio; (2) o *Infinium array*, que permite ensaios de alta densidade, podendo chegar até 1 milhão de marcadores por arranjo. Hyten et.al (2009) utilizou a tecnologia *GoldenGate* para realizar seleção assistida por marcador para resistência à ferrugem asiática na cultura da soja.

O desenvolvimento de plataformas de genotipagem de alto rendimento para a aplicação na prática dentro do melhoramento de plantas ainda tem um longo caminho a percorrer e por esta razão, a comunidade científica tem feito grandes investimentos no desenvolvimento de recursos genômicos e sistemas inteligentes de apoio à decisão que provavelmente reduziriam a lacuna genótipo-fenótipo e forneceriam as ferramentas eficazes para desenvolver cultivares de próxima geração (Batley; Edwards, 2016).

A diminuição nos custos de sequenciamento tem permitido um rápido desenvolvimento e o avanço de tecnologias de genotipagem em larga escala. Metodologias eficientes em custo e velocidade de genotipagem de um grande número de amostras são recentes. As metodologias que integram conjuntos de marcadores SNP para construção de painéis ou arranjos que permitem a detecção de genótipos em centenas (RT-PCR, Sequenom MassARRAY, Illumina GoldenGate) ou até dezenas de milhares de marcadores SNPs (Affymetrix, Agilent) e apresentam custos cada vez menores. Porém, o custo unitário de cada amostra genotipada pode ainda não ser acessível à maioria dos programas de melhoramento genético.

Diferentes plataformas de genotipagem de SNPs foram desenvolvidas para aplicações em cafeeiro (Carneiro et al., 2019, Ferrão et al., 2017; Sousa et al., 2017), com destaque para os *chips* de DNA, com alta densidade de SNPs. Que são uma ferramenta para o melhoramento molecular e a investigação genética de populações dentro de espécies de café (Andrade et al., 2017; Merot-L'anthoene et al., 2019), visto que são de fácil utilização, apresentam um custo reduzido na geração e análise de dados de genotipagem, possuem alta precisão e reprodutibilidade.

Pode ser observado que diversas metodologias de genotipagem de SNPs foram desenvolvidas baseadas nas variadas técnicas de discriminação alélica e diferentes plataformas de detecção. Com a rápida e contínua evolução dos métodos, torna-se difícil identificar a melhor metodologia a ser utilizada, visto que a melhor opção depende de diversas variáveis, como a espécie estudada, o nível de informação genômica, o custo, a natureza do ensaio, entre outras variáveis. No entanto, não existe um método mais indicado para a genotipagem de SNPs, porém o ideal seria que o método escolhido apresentasse alguns quesitos, como: capacidade de multiplex, o que possibilitaria a genotipagem de vários SNPs ao mesmo tempo e genotipagem simultânea de diferentes amostras, alta acurácia na detecção de polimorfismo, rapidez na obtenção de dados e um baixo custo operacional.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material vegetal

Amostras foliares dos clones de *C. canephora* componentes das cultivares clonais Diamante ES8112, Jequitibá ES8122 e Centenária ES8132 utilizadas neste estudo foram coletados na Embrapa Cerrados, localizada em Planaltina - DF (latitude 17°35'03", longitude 47°42'30" e altitude de 1100 m). Foram coletadas de duas a três folhas grandes e colocadas para desidratar em um envelope de papel contendo sílica gel, de maneira que o material genético fosse preservado íntegro e o material foi levado ao Laboratório de Genética Molecular situado no Setor de Cafeicultura da Universidade Federal de Lavras para as próximas análises.

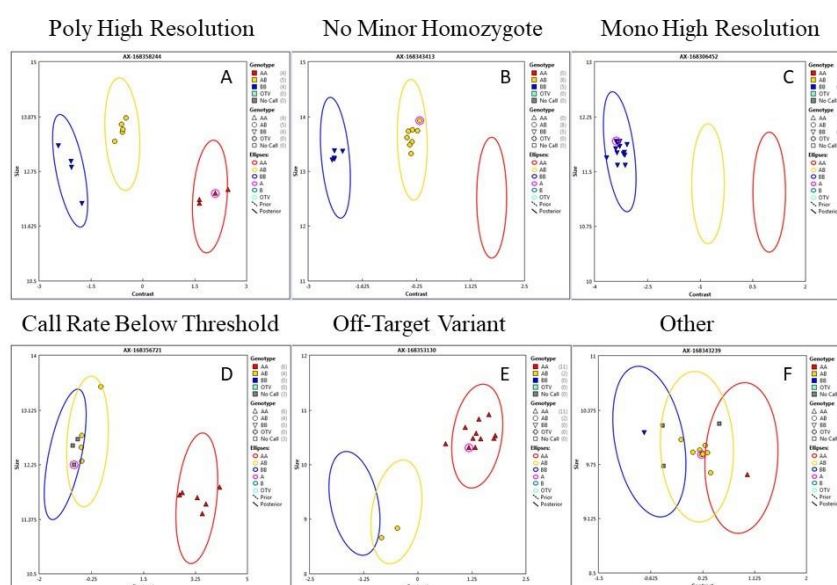
3.2 Extração de DNA

O DNA genômico foi extraído, conforme descrito por Russel et al., (2010). A quantificação do DNA foi analisada usando um espectrofotômetro de microplaca (MultiskanGO - Thermo Scientific). A integridade foi confirmada por eletroforese, onde o gel de agarose 1% foi corado com brometo de etídio (1.0 mg/L) e a corrida foi a uma voltagem de 110V por 45 min.

3.3 Seleção de SNPs candidatos com o programa de bioinformática Axiom™ Analysis Suite 2.0

Os dados brutos de hibridização e clusterização foram processados e as chamadas dos genótipos foram efetuadas com o software Affecron® GeneChip® Command Console (AGCC). Amostras com controle de qualidade $<0,82$ e taxa de chamada de amostra $<0,97$ foram excluídas da análise adicional da genotipagem. O guia de genotipagem (“Axiom Best Practices Genotyping Workflow”) foi utilizado para classificar os SNPs em seis possíveis classes de qualidade, de acordo com seu desempenho de agrupamento em relação às medidas de controle de qualidade. Estas classes são: (A) "Poly High Resolution" (PHR), que passaram no controle de qualidade (QC) e são polimórficos; (B) "No Minor Homozygote" (NMH), que passaram no QC, no entanto apenas dois clusters são observados um homozigoto e um heterozigoto; (C) "Off-Target Variant" (OTV), que possui um cluster adicional de baixa intensidade resultante de ligeiros desajustes entre a sonda e as sequências para esse grupo de indivíduos; (D) "Mono High Resolution" (MHR), no qual o QC é obtido, mas são monomórficos; (E) "CallRate Below Threshold" (CRBT), onde a taxa de chamada de genótipos é inferior a 97%; e (F) "Other", onde o padrão de cluster SNP resultante não pode ser enquadrado em nenhuma das classes anteriores Figura 2.

Figura 2 – Classificação dos SNPs segundo o guia “Axiom Best Practices Genotyping Workflow”.



Fonte: Adaptado de Axiom Best Practices Genotyping Workflow (2023)

3.4 Definição dos SNPs a serem utilizados

Por meio de uma busca nas cerca de 25456 sondas componentes do chip Axiom® EMBR5SNP Arrays, foram identificados SNPs que estivessem contidos dentro do sítio de corte da enzima *EcoRI* (GAATTC). Dessa forma, foram identificadas 20 sondas com a sequência NAATTC, 27 sondas com a sequência GNATTC, 27 sondas contendo GANTTC, 15 sondas com a sequência GAANTC, 13 sondas contendo GAATNC e outras 28 sondas, contendo GAATTN sendo N a posição dos SNPs, perfazendo um total de 130 SNPs em potencial. Em uma segunda filtragem, foi verificado se um dos alelos correspondiam aos nucleotídeos de reconhecimento da enzima *EcoRI*, ou seja, no caso da sequência NAATTC, um dos alelos na genotipagem teria que necessariamente ser um G, no caso de GNATTC (A), GANTTC (A), GAANTC (T), GAATNC (T) e GAATTN (C), respectivamente. Após essa filtragem, restaram 68 sondas potenciais para utilização neste trabalho.

Na Figura 3, apresenta-se um exemplo das sondas do chip Axiom® EMBR5SNP Arrays.

Figura 3 – Exemplo de uma sonda do chip Axiom® EMBR5SNP Arrays.



Fonte: Da autora (2023)

3.5 Desenho de *primers*

Todas as sondas do chip Axiom® EMBR5SNP Arrays tem a posição conhecida no genoma de referência de *C. canephora* e desta forma, foi possível recuperar sequências de aproximadamente 1000 pares de bases, sendo 500 pb flanqueando cada lado do local das sondas para utilização no desenho dos *primers*. Inicialmente foram selecionadas 10 sondas para a utilização neste trabalho, as quais já eram suficientes para distinguir os diferentes clones de *C. canephora*.

A Tabela 3 descreve os pares de *primers* desenhados com o uso do programa *PrimerSelect* do pacote *DNAStar* (Lazergene), bem como a sua sequência, a sua temperatura de melting (T_m), o seu peso molecular e o seu número de moles, após a síntese realizada pela empresa IDT (Integrated DNA Technologies).

Tabela 3 – Especificações dos *primers* (Continua)

<i>Primer</i>	Sequência	T_m (°C)	Peso Molecular (g/mol)	nmoles
AX-168299000-F	5' TTTTGGCATTACATTGAGAAGACT 3'	53,0	7381,9	30,2
AX-168299000-R	5' AAAAAGAATCATATAACGCAAATC 3'	48,4	7354,9	24,0
AX-168357315-F	5' TTCCCTAGTAGCATTTCATAAAAG 3'	50,2	7006,6	26,3
AX-168357315-R	5' TTCCCAGAGTCATAAAATAACG 3'	50,3	6711,4	27,0
AX-168355029-F	5' GATTTCAGCTGCGTTCTT 3'	53,3	5760,8	30,3
AX-168355029-R	5' GCAGCCTCAAATCCGTCTATG 3'	55,9	6366,2	29,1
AX-168353739-F	5' CAAGGCAAATGAAGAACTC 3'	49,1	5838,9	23,7
AX-168353739-R	5' GTGGAAAAATGGGCTGTGGAT 3'	56,0	6590,3	30,3
AX-168358942-F	5' TTTTGAAGGCCATAGGAAT 3'	49,6	6171,1	33,0
AX-168358942-R	5' TGTAATAGCACGCCAACCA 3'	54,3	5765,8	25,9
AX-168301877-F	5' CAGACTGCCACTCATTGTAT 3'	52,2	6052,0	33,2
AX-168301877-R	5' ATTGTTGGCACTGCTCCTTTATTA 3'	55,0	7299,8	29,0
AX-168358614-F	5' CGGCTTGCAAATTTCTGTTCTC 3'	55,1	6667,4	30,2
AX-168358614-R	5' GTCGGTGGGGTGTTGTAATGTC 3'	58,1	6868,5	29,0

Fonte: Da autora (2023)

Tabela 3 – Especificações dos *primers* (Conclusão)

<i>Primer</i>	Sequência	T _m (°C)	Peso Molecular (g/mol)	nmoles
AX-168342832-F	5' TAATTCATCCTCCCTCCATCTCTG 3'	55,6	7149,7	31,5
AX-168342832-R	5' AGGCCTACCCATCAAGCAACA 3'	58,9	6353,2	27,1
AX-168309736-F	5' GGGGAATGACCAGGAAAATGAT 3'	55,1	6881,5	30,4
AX-168309736-R	5' GGAGGCCCGGTCTGAAGTAAAT 3'	57,1	6231,1	26,0
AX-168341083-F	5' GGCTGGAGGGGCAAATCATCT 3'	59,8	6511,3	35,8
AX-168341083-R	5' CAGGGCCCAAACCTACGCTTCA 3'	60,0	6360,2	25,4

Fonte: Da autora (2023)

E na Tabela 4 estão descritos os tamanhos esperados para cada *amplicon* de acordo com as instruções recebidas pelo fabricante (ANEXO A).

Tabela 4 – Tamanho esperado de cada *amplicon*.

Nome dado ao <i>primer</i>	<i>Primer</i>	Tamanho do <i>amplicon</i> (bp)
P00	AX-168299000	554
P15	AX-168357315	443
P29	AX-168355029	502
P39	AX-168353739	507
P42	AX-168358942	612
P77	AX-168301877	484
P14	AX-168358614	676
P32	AX-168342832	556
P36	AX-168309736	746
P83	AX-168341083	661

Fonte: Da autora (2023)

3.6 Reação da Polimerase em Cadeia (PCR)

Os ciclos de PCR foram definidos a partir dos *primers* descritos anteriormente (Tabela 3), visando otimizar o tempo e dar praticidade a técnica, foram definidos dois padrões de temperatura de anelamento, um a 50°C e outro a 55°C, no primeiro grupo foram enquadrados seis conjuntos de *primers*: AX-168299000, AX-168357315, AX-168355029, AX-168353739, AX-168358942 e AX-168301877. Enquanto que no segundo grupo foram enquadrados quatro conjuntos de *primers*: AX-168358614, AX-168342832, AX-168309736 e AX-168341083.

Para a montagem das reações de PCR foram utilizados, por reação, 10 µL do 5x tampão de reação GoTaq®, 4 µL de MgCl₂, 1 µL de dNTP, 0,5 µL de enzima DNA Polimerase, 0,5 do *primer F*, 0,5 do *primer R*, 28,5 µL de água livre de nuclease e 5 µL do DNA genômico, na concentração de 200 ng/ µL.

As PCRs foram realizadas no termociclador BIORAD, para os *primers* separados no primeiro grupo de 50°C foram realizadas as seguintes ciclagens: estágio 1 (95°C por 4min), estágio 2 (95°C por 30s, 45°C por 30s e 72°C por 45s) esse estágio foi repetido por mais 5x, estágio 3 (95°C por 30s, 50°C por 30s e 72°C por 45s) esse estágio foi repetido por mais 35x, estágio 4 (4°C por tempo infinito) a PCR era mantida neste estágio até ser retirada do termociclador. Para o grupo de 55°C foram realizadas as seguintes ciclagens: estágio 1 (95°C por 4min), estágio 2 (95°C por 30s, 50°C por 30s e 72°C por 45s) esse estágio foi repetido por mais 5x, estágio 3 (95°C por 30s, 55°C por 30s e 72°C por 45s) esse estágio foi repetido por mais 35x, estágio 4 (4°C por tempo infinito) a PCR era mantida neste estágio até ser retirada do termociclador.

3.7 Corte enzimático com *EcoRI*

Para se obter os dados da distinção alélica, foi realizado o corte enzimático do produto da PCR anterior, para isso foi utilizado 17 µL do produto de PCR, 2 µL do tampão de reação da enzima e 1 µL da enzima *EcoRI*, que corta conforme podemos observar,

G▼AATT C

C TTAA▲G

As amostras contendo as reações foram incubadas a uma temperatura de 37°C por 90min, para que a enzima realizasse a reação de corte.

Dependendo do resultado, o clone em estudo foi classificado como homozigoto para um ou outro alelo ou ainda heterozigoto.

3.8 Genotipagem

O produto do corte enzimático foi observado por meio de eletroforese, com gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídio (1.0 mg/L). Tampão TAE (Tris/Acetato/EDTA), 110V, 45min.

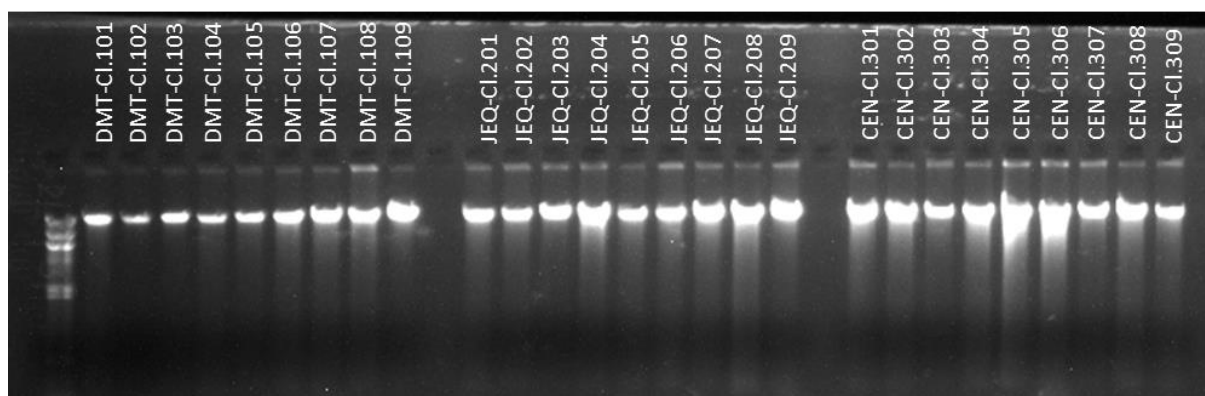
Para as leituras do produto dos cortes enzimáticos foram utilizados controles, os quais se tinha o conhecimento da genotipagem, e a partir da comparação dos *amplicons* das amostras com os respectivos controles pôde ser realizada a genotipagem. Esta foi feita manual, por comparação entre os *amplicons* de cada clone com os *amplicons* do padrão, o qual possuía os genótipos conhecidos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Confirmação da eficiência da extração de DNA

Bandas de DNA genômico, que comprovam a eficiência da extração e a integridade dos DNAs das variedades Diamante ES8112, Jequitibá ES8122 e Centenária ES8132, puderam ser observadas no gel de agarose 1% corado com brometo de etídio (Figura 4).

Figura 4 – Gel de agarose 1% com amostras de DNA genômico das cultivares clonais Diamante ES8112, Jequitibá ES8122 e Centenária ES8132.

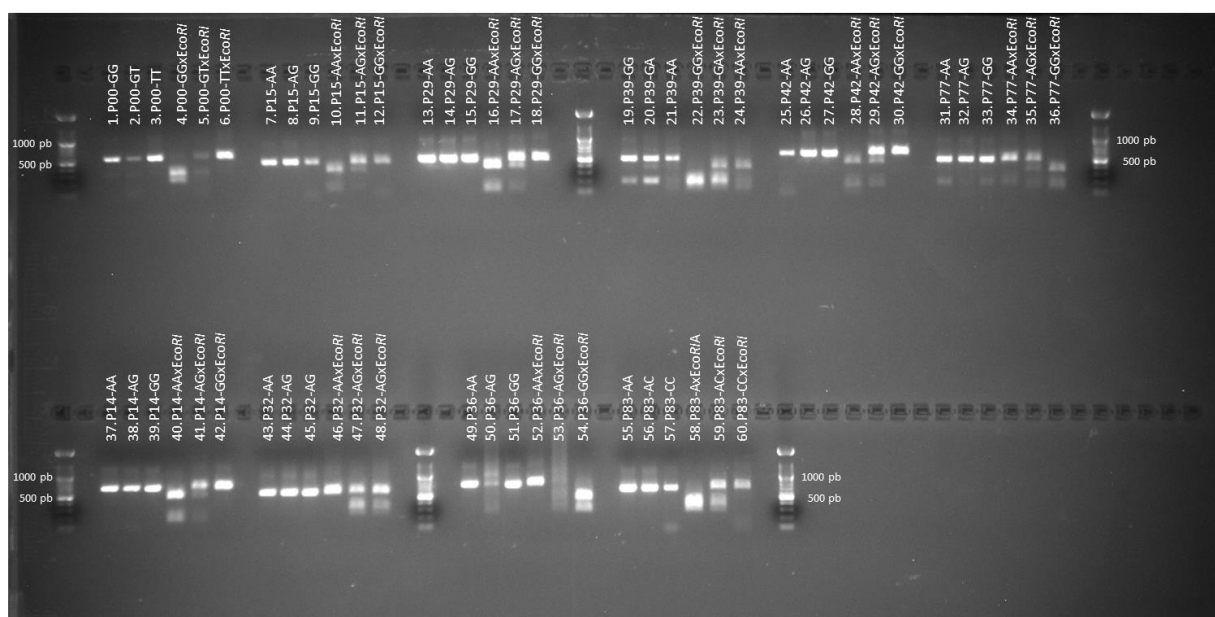


Fonte: Da autora (2023)

4.2 Definição dos controles utilizados

Para que fosse possível atestar as amplificações por PCR das variedades clonais e também a digestão enzimática foi realizada uma eletroforese com reações controles, dos quais a genotipagem com o chip (26K Axiom SNP (Affymetrix)) já era conhecida (CARNEIRO et al., 2019). Assim, na Figura 5, pode-se observar as reações de controle de PCR, seguidas das reações de digestão enzimática dos mesmos, para todos os *primers* utilizados neste estudo, atestando que as reações foram eficientes, com exceção da reação que comprovaria o heterozigoto AG com o *primer* P36, o qual o processo de amplificação por PCR falhou e foi repetido.

Figura 5 - Reações controle de PCR e de digestão enzimática para todos os *primers* em estudo.



Fonte: Da autora (2023)

Para cada grupo de seis amostras, as três primeiras reações correspondem as amplificações de PCR do controle no *primer* indicado e em seguida estes mesmos *amplicons* após passarem pela digestão enzimática (Figura 5). Na parte superior estão as reações para os *primers* P00, P15, P29, P39, P42 e P77, sendo as amostras de 1 até 36, enquanto que na parte inferior estão as reações para os *primers* P14, P32, P36 e P83, que são as amostras de 37 até 60.

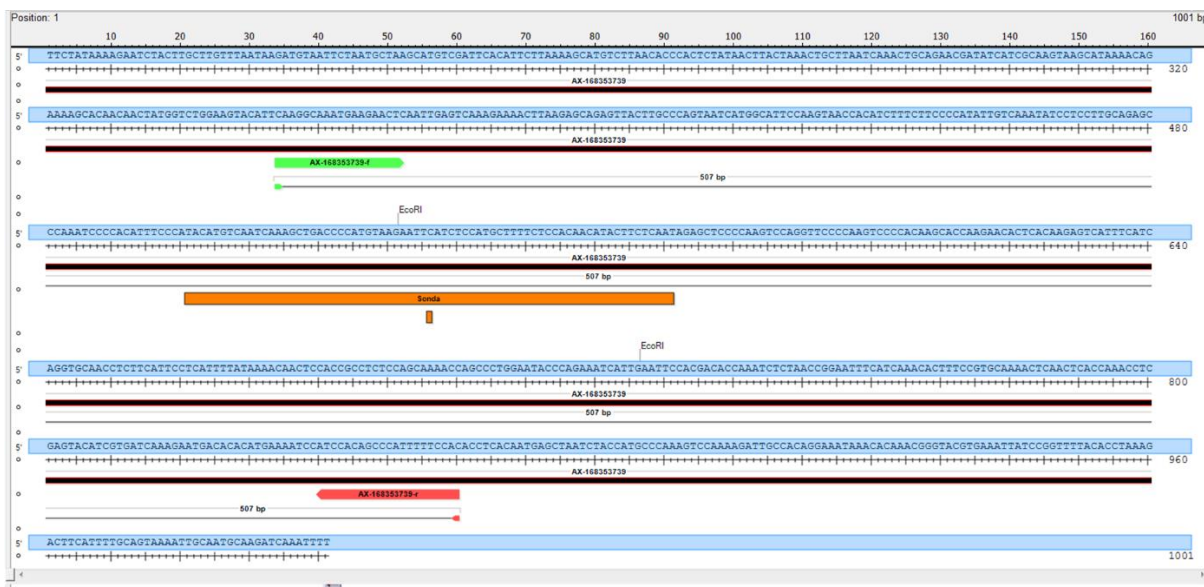
Com o auxílio do marcador molecular 100 pb (Merck), pôde-se observar que todos os *amplicons* obtidos com as reações utilizando-se o *primer* P00 (amostras de 1 a 3) migraram na faixa esperada de aproximadamente 554 pb, indicando a ampliação do *locus* esperado. Já as amostras de 4 a 6 são os *amplicons* que passaram por digestão enzimática com *EcoRI*. No caso do genótipo com o alelo G em homozigose, que tem um G no local do sítio de restrição da enzima, o *amplicon* foi cortado durante a digestão enzimática, então o genótipo GG, apresenta duas bandas de tamanho menor que o *amplicon* (amostra 4). O alelo T apresenta a banda do mesmo tamanho do *amplicon*, pois este não foi cortado durante a digestão enzimática, permanecendo assim do mesmo tamanho do produto da PCR (amostra 6). Já no caso do genótipo GT em heterozigose, observa-se a presença de três bandas, sendo duas menores, produto do corte enzimático ocasionada pelo alelo G e uma do tamanho do produto de PCR ocasionada pelo alelo T (amostra 5). As amostras 2 e 4, que são, respectivamente, a amplificação por PCR e o produto do corte enzimático do P00-GT, apresentaram-se com uma intensidade baixa no gel, então, as mesmas foram repetidas e serão observadas mais a frente, na Figura 7.

As amostras de 7 a 9, apresentadas na Figura 5, são o produto da PCR do P15. Observa-se nessas amostras, que os *amplicons* resultantes são um pouco menores quando comparados às amostras de 1 a 3 (554 pb), corroborando com o tamanho esperado de 443 pb para os produtos de PCR resultantes do P15 (Tabela 4). Já as amostras de 10 a 12 (Figura 5) são os *amplicons* que passaram por digestão enzimática com a enzima *EcoRI*. Neste caso, a amostra 10 contém o alelo A em homozigose no local do sítio de restrição da enzima, sendo, portanto, cortado durante a digestão enzimática, apresentando então, duas bandas de tamanho menor que o *amplicon*. Já a amostra 12 (Figura 5) contém o alelo G em homozigose (GG) e, portanto, apresenta uma única banda do mesmo tamanho do *amplicon*, pois este não foi cortado durante a digestão enzimática, permanecendo assim do mesmo tamanho do produto da PCR. Já na amostra 11 (Figura 5), que apresenta o genótipo heterozigoto AG, observa-se três bandas, sendo uma do tamanho do produto da PCR ocasionada pelo alelo G e duas menores, produto do corte enzimático ocasionada pelo alelo A.

As amostras de 13 a 15 (Figura 5) são o produto da PCR do P29. Neste caso, o *amplicon* esperado era de 502 pb (Tabela 4) e pode-se observar na Figura 5, com auxílio do marcador molecular que este tamanho é correspondente, indicando uma amplificação correta do *locus* desejado. No caso, das amostras de 16 a 18 (Figura 5) estão apresentados os *amplicons* do P29 que passaram por digestão enzimática com *EcoRI*. A amostra 16 (Figura 5) corresponde ao alelo homozigoto (AA) no local do sítio de restrição da enzima, o qual é

cortado durante a digestão enzimática apresentando duas bandas de tamanho menor que o *amplicon*. A amostra 18 corresponde ao alelo alternativo G em homozigose (GG) e desta forma, apresenta a banda do mesmo tamanho do *amplicon*, pois este não foi cortado durante a digestão enzimática. O genótipo AG (amostra 17, Figura 5) apresentou três bandas, sendo duas menores, produto do corte enzimático ocasionada pelo alelo A e uma do tamanho do produto de PCR ocasionada pelo alelo G.

Os produtos da PCR do P39, correspondem às amostras de 19 a 21 apresentadas na Figura 5. Neste caso, pode-se observar que além do *amplicon* com o tamanho esperado de 507 bp (Tabela 4), também houve uma amplificação secundária de aproximadamente 200 pb, principalmente nas amostras 19 e 20 (Figura 5). As amostras de 22 a 24 (Figura 5) correspondem aos *amplicons* que passaram por digestão enzimática com *EcoRI*. O alelo homozigoto (amostra 22) que tem um GG no local do sítio de restrição da enzima é cortado durante a digestão enzimática, apresentando então, duas bandas de tamanho menor que o *amplicon*. Pode-se observar que a amplificação secundária observada na amostra 19, não afetou a leitura após a digestão enzimática (amostra 22). Já a amostra 24 (Figura 5) que apresenta o alelo AA deveria apresentar a banda do mesmo tamanho do *amplicon*, pois este não é cortado durante a digestão enzimática. No entanto, a figura do gel mostra que houve uma migração um pouco mais abaixo da linha do fragmento do produto de PCR da amostra 21, indicando que poderia haver mais um sítio de restrição para corte enzimático no *amplicon* desse *primer*, fato que foi comprovado após análise da sequência do *amplicon* (Figura 6). Sendo assim, no genótipo GG (amostra 22) foram observadas duas bandas menores resultantes do produto de corte enzimático, enquanto no genótipo AA (amostra 24) observou-se uma única banda de tamanho um pouco inferior ao do *amplicon* da PCR. Já o genótipo AG (amostra 23) apresentou três bandas, sendo uma do tamanho um pouco inferior ao do produto da PCR ocasionada pelo alelo A e duas menores, produtos do corte enzimático ocasionado pelo alelo G.

Figura 6 – *Amplicon do primer P39.*

Fonte: Da autora (2023)

Na Figura 6 podemos observar o *amplicon* produzido pelo *primer* P39, e os dois sítios de restrição para a enzima *EcoRI*, estando um no sítio do SNP e um mais para frente, produzindo assim, os dois cortes enzimáticos quando o alelo é um G e um corte enzimático quando o alelo é um A.

As amostras de 25 a 27, da Figura 5 são o produto da PCR do P42. Pode-se observar que os *amplicons* migraram na altura esperada de 612 pb. No caso das amostras de 28 a 30 são os *amplicons* que passaram por digestão enzimática, o alelo homozigoto AA (amostra 28) foi cortado no local do sítio de restrição da enzima no processo de digestão enzimática apresentando, assim duas bandas de tamanho menor que o *amplicon*. Já para o alelo GG (amostra 30), observa-se uma única banda, pois este não é cortado durante a digestão enzimática. Por outro lado, o genótipo AG (amostra 29) apresentou três bandas, sendo duas menores, produto do corte enzimático ocasionada pelo alelo A e uma do tamanho do produto de PCR ocasionada pelo alelo G.

As amostras de 31 a 33 (Figura 5), são o produto da PCR do P77. Observa-se que os *amplicons* gerados, correspondem ao tamanho esperado de 484 pb (Tabela 4), sendo menores quando comparados com as amostras 25 a 27. As amostras de 34 a 36 são os *amplicons* que passaram por digestão enzimática com *EcoRI*, sendo que o alelo homozigoto AA no local do sítio de restrição da enzima não foi cortado durante a digestão enzimática apresentando uma banda de tamanho correspondente ao do *amplicon*. Já no alelo homozigoto GG (amostra 36),

a digestão enzimática resulta em duas bandas de tamanho inferior ao do *amplicon* não digerido (amostra 33). Assim o genótipo GG apresentou duas bandas menores resultantes do produto do corte enzimático, enquanto o genótipo AG apresentou três bandas (amostra 35), duas menores, produto do corte enzimático ocasionada pelo alelo G e uma do tamanho do produto de PCR ocasionada pelo alelo A. Por último o genótipo AA (amostra 34) apresentou uma única banda do mesmo tamanho do *amplicon* da PCR.

Iniciando na parte de baixo da Figura 5 temos as amostras de 37 a 39, que são o produto da PCR do P14. Observa-se que as reações de PCR foram eficientes em amplificar produtos com tamanho esperado de cerca de 700 pb, quando comparados ao marcador molecular (Figura 5). Nas amostras de 40 a 42 estão apresentados os *amplicons* que passaram por digestão enzimática com a enzima *EcoRI*. Na amostra 40, está apresentado o alelo homozigoto AA no local do sítio de restrição da enzima, o que produz após a digestão enzimática duas bandas de tamanho menor que o *amplicon* do produto de PCR (amostra 37). Já para o alelo GG (amostra 42), observa-se que a digestão enzimática resulta em uma única banda do mesmo tamanho do *amplicon* não digerido (amostra 39). Dessa forma, o genótipo AA (amostra 40) apresentou duas bandas menores, resultado do produto do corte enzimático, enquanto o genótipo AG apresentou três bandas (amostra 41), duas menores, produto do corte enzimático ocasionada pelo alelo A e uma do tamanho do produto de PCR ocasionada pelo alelo G. Já o genótipo GG (amostra 42) apresentou uma única banda do mesmo tamanho do *amplicon* da PCR.

As amostras de 43 a 45 (Figura 5) são o produto da PCR do P32, sendo que as reações de PCR produziram bandas que migram na região esperada de 556 pb, indicando a amplificação correta do *locus* desejado. Já as amostras de 46 a 48 são os *amplicons* que passaram por digestão enzimática com *EcoRI*. O alelo que tem um A (amostra 46) em homozigose (AA) no local do sítio de restrição da enzima não foi cortado durante a digestão enzimática, apresentando uma única banda do tamanho do *amplicon* correspondente não digerido (amostra 43). No caso do *amplicon* homozigoto (GG), eram esperadas duas bandas de tamanho inferior ao do *amplicon*, fato que não ocorreu (amostra 48) e assim o teste com um novo controle foi repetido e será discutido na Figura 7. Entretanto, o genótipo AG, após a digestão enzimática (amostra 47), apresentou três bandas, sendo duas menores, produto do corte enzimático ocasionada pelo alelo G e uma do tamanho do produto de PCR ocasionada pelo alelo A (Figura 5).

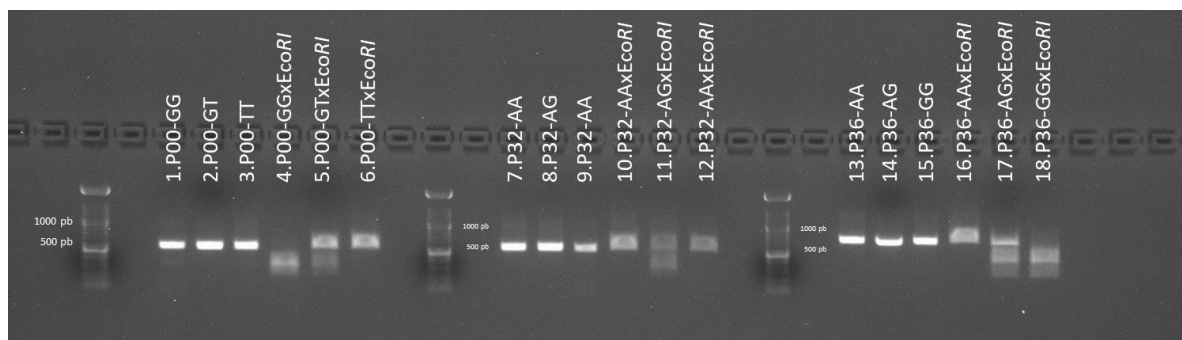
Os produtos da PCR resultantes do P36 são as amostras de 49 e 51 e correspondem com os maiores *amplicons* esperados (746 pb). Já os *amplicons* que passaram por digestão

enzimática correspondem às amostras de 52 e 54. Sendo que, a amostra 54 corresponde ao alelo que apresenta um G no local do sítio de restrição da enzima em homozigose, produzindo, portanto, após a digestão enzimática, duas bandas de tamanho menor que o *amplicon* correspondente não digerido (amostra 51). No caso do alelo A, em homozigose (amostra 52), observa-se que após a digestão enzimática, uma única banda do mesmo tamanho do *amplicon* não digerido (amostra 49), pois a enzima *EcoRI* não reconhece o sítio (Figura 5). Porém pode-se observar que devido a uma falha nas amostras 50 e 52, não foi possível obter o controle heterozigoto para o P36, que também será descrito na Figura 7.

Por último, as amostras de 55 até 57 são o produto da PCR do P83, onde pode-se observar que as reações de PCR realizadas foram eficientes em amplificar produtos com o tamanho esperado de 661 pb, correspondentes ao *locus* desejado (Figura 5). Já as amostras de 58 a 60 são os *amplicons* que passaram por digestão enzimática. O alelo homozigoto AA (amostra 58), o qual apresenta um A no local do sítio de restrição da enzima, é cortado durante a digestão enzimática, apresentando duas bandas de tamanho menor que o *amplicon* não digerido (amostra 55). Após a digestão enzimática, uma única banda do mesmo tamanho do *amplicon* não digerido (amostra 57), é observada para o genótipo CC, pois a enzima *EcoRI* não reconhece mais o sítio neste caso e, portanto, o *amplicon* não é cortado durante a digestão enzimática. Desta forma, o genótipo AA (amostra 58) apresentou duas bandas menores resultantes do produto do corte enzimático, enquanto o genótipo AC (amostra 59) apresentou três bandas, sendo duas menores, produto do corte enzimático ocasionada pelo alelo A e uma do tamanho do produto de PCR ocasionada pelo alelo C. O genótipo CC (amostra 60) apresentou uma única banda do mesmo tamanho do *amplicon* da PCR.

A Figura 7 representa uma repetição dos controles para os *primers* P00, P32 e P36, onde foi possível observar a eficiência de todas as reações de PCR e do processo de corte enzimático, evidenciada pela observação das bandas no gel de agarose 2% corado com brometo de etídio.

Figura 7 – Controle utilizado para os *primers* P00, P32 e P36.



Fonte: Da autora (2023)

As amostras de 1 a 6 da Figura 7 são das amostras controle para o P00, onde as amostras 1,2 e 3 são os produtos de PCR, e as amostras 4, 5 e 6 são estes mesmos controles após passarem pelo processo de digestão enzimática. Assim a amostra que apresentou o genótipo GG (amostra 4) sofreu corte enzimático em ambos os alelos e com isso puderam ser observadas duas bandas de tamanho inferior ao *amplicon* da PCR. O genótipo TT (amostra 6) apresentou apenas uma banda do tamanho do *amplicon*, por não sofrer corte enzimático, enquanto o genótipo GT (amostra 5) apresentou três bandas, sendo duas resultantes do alelo G e uma do alelo T.

As amostras 7,8 e 9 são o produto da PCR do *primer* 32, e as amostras 10, 11 e 12 são estes mesmos controles após passarem pelo processo de digestão enzimática. A amostra correspondente ao genótipo AA (amostra 10), apresentou apenas uma banda, isso porque não sofreu corte enzimático, enquanto a amostra com genótipo AG (amostra 11) apresentou três bandas, sendo uma maior que representa o alelo A e duas menores que são processo de corte enzimático representado pelo alelo G. No entanto, esperava-se que a amostra 9, após a digestão chamada amostra 12, fosse homozigota para o alelo GG, no entanto ela foi homozigota também para o alelo AA, sendo assim não foi possível, dentro das plantas disponíveis no acervo do laboratório, obter um controle positivo de homozigoto GG para o nosso estudo. Embora esse fato tenha ocorrido, o estudo não foi prejudicado, pois tínhamos o genótipo homozigoto AA e o heterozigoto AG e as plantas em estudo também não apresentaram o genótipo GG.

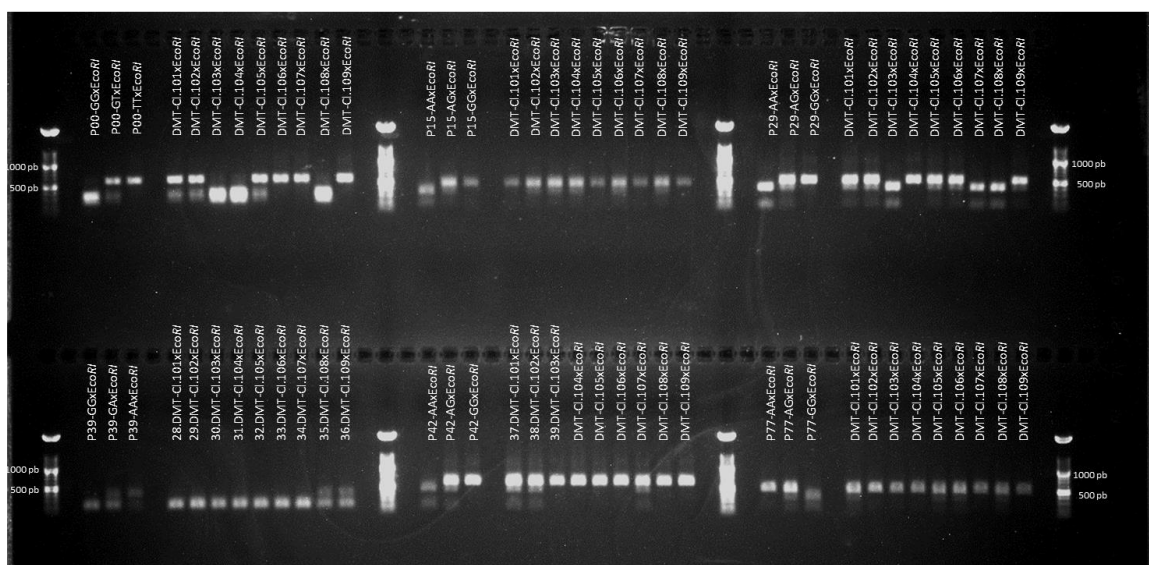
As amostras de 13, 14 e 15 são produtos da PCR do P36 e os *amplicons* que passaram por digestão enzimática são as amostras de 16, 17 e 18. O genótipo que apresenta um A no SNP se apresenta com apenas uma banda do mesmo tamanho do *amplicon*, isso porque este não é cortado durante o processo. Já o alelo que apresenta um G, no local do sítio de restrição

da enzima, foi cortado durante a digestão enzimática apresentando assim, duas bandas de tamanho menor que o *amplicon*. Desta forma, o genótipo AA (amostra 16) apresentou uma única banda do mesmo tamanho do *amplicon* da PCR, enquanto que o genótipo GG (amostra 18) apresentou duas bandas menores resultantes do produto do corte enzimático. E ainda, o heterozigoto AG (amostra 17) apresentou três bandas, sendo a maior correspondente ao alelo A e as duas menores correspondentes ao alelo G.

4.3 Eletroforese dos *amplicons* após passarem por digestão enzimática

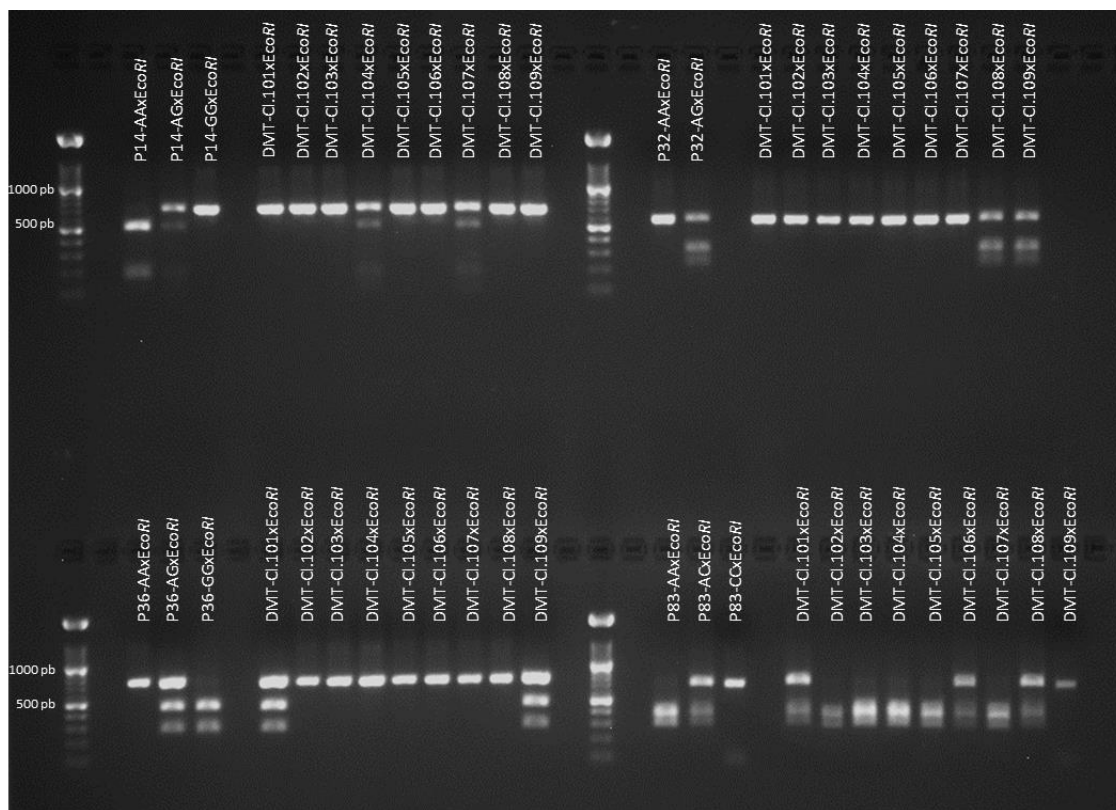
De posse destes controles estabelecidos foram realizadas as PCRs para as variedades clonais em estudo. Nas Figuras 8 e 9, observamos o produto das reações da PCR após passarem pelo processo de corte enzimático com a enzima *EcoRI* da variedade clonal Diamante ES8112.

Figura 8 – Eletroforese dos *amplicons* dos *primers* P00, P25, P29, P39, P42 e P77 da variedade Diamante ES8112 após serem digeridos com a enzima de restrição *EcoRI*.



Fonte: Da autora (2023)

Figura 9 – Eletroforese dos *amplicons* dos *primers* P14, P32, P36 e P83 da variedade Diamante ES8112 após serem digeridos com a enzima de restrição *EcoRI*.

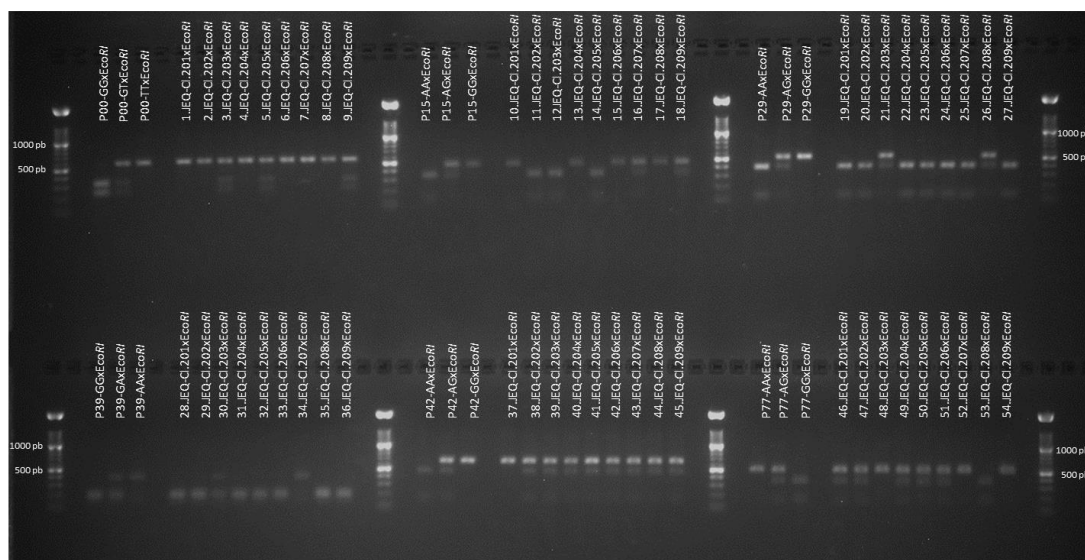


Fonte: Da autora (2023)

Nas Figuras 8 e 9 observamos que tanto a reação da PCR quanto o processo de digestão enzimática com a *EcoRI* foram eficientes para todos os *primers* e todos os clones componentes da variedade Diamante ES8112. Isso porque, por meio da eletroforese no gel de agarose, podemos observar a migração dos *amplicons* para as regiões esperadas. Foram observados fragmentos para todos os clones e principalmente para todos os controles, assegurando-nos desta forma que as reações foram todas eficientes.

Nas Figuras 10 e 11, observamos o produto das reações da PCR da variedade clonal Jequitibá ES8122, os quais passaram pelo processo de digestão enzimática com a enzima *EcoRI*.

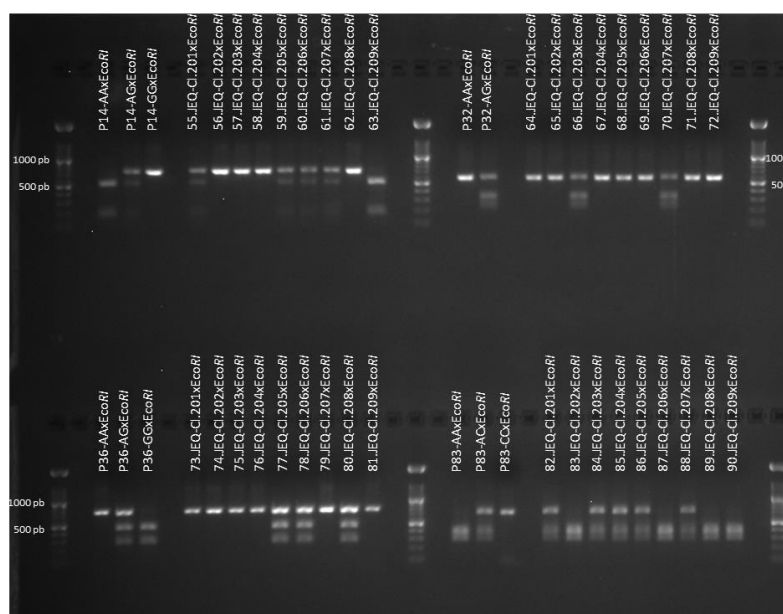
Figura 10 - Eletroforese dos *amplicons* dos *primers* P00, P25, P29, P39, P42 e P77 da variedade Jequitibá ES8122 após serem digeridos com a enzima de restrição *EcoRI*.



Fonte: Da autora (2023)

A Figura 10 evidencia que as amplificações realizadas por meio da técnica de PCR mostraram-se eficientes para os *primers* P00, P15, P29, P39, P42 e P77, isso porque foi possível observar amplificações para todos os clones da cultivar Jequitibá ES8122 e assim como para todos os controles.

Figura 11 - Eletroforese dos *amplicons* dos *primers* P14, P32, P36 e P83 da cultivar Jequitibá ES8122 após serem digeridos com a enzima de restrição *EcoRI*.

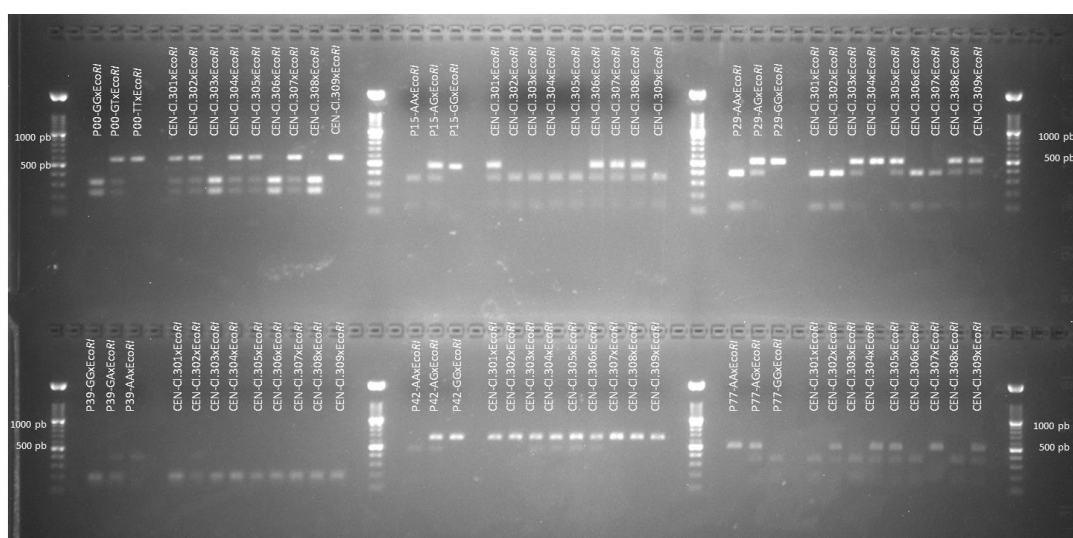


Fonte: Da autora (2023)

Da mesma forma, houve ampliações para todos os clones que compõem a cultivar Jequitibá ES8122 com os *primers* P14, P32, P36 e P83, assegurando que a técnica é efetiva (Figura 11).

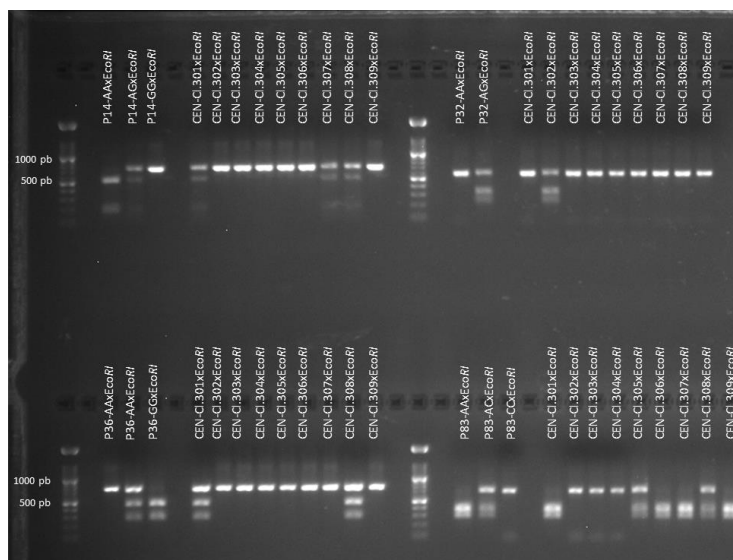
Nas Figuras 12 e 13, observamos o produto das reações da PCR após passarem pelo processo de digestão enzimática com a enzima *EcoRI* da variedade clonal, Centenária ES8132.

Figura 12 - Eletroforese dos *amplicons* dos *primers* P00, P25, P29, P39, P42 e P77 da variedade Centenária ES8132 após serem digeridos com a enzima de restrição *EcoRI*.



Fonte: Da autora (2023)

Figura 13 - Eletroforese dos *amplicons* dos *primers* P14, P32, P36 e P83 da variedade Centenária ES8132 após serem digeridos com a enzima de restrição *EcoRI*.



Fonte: Da autora (2023)

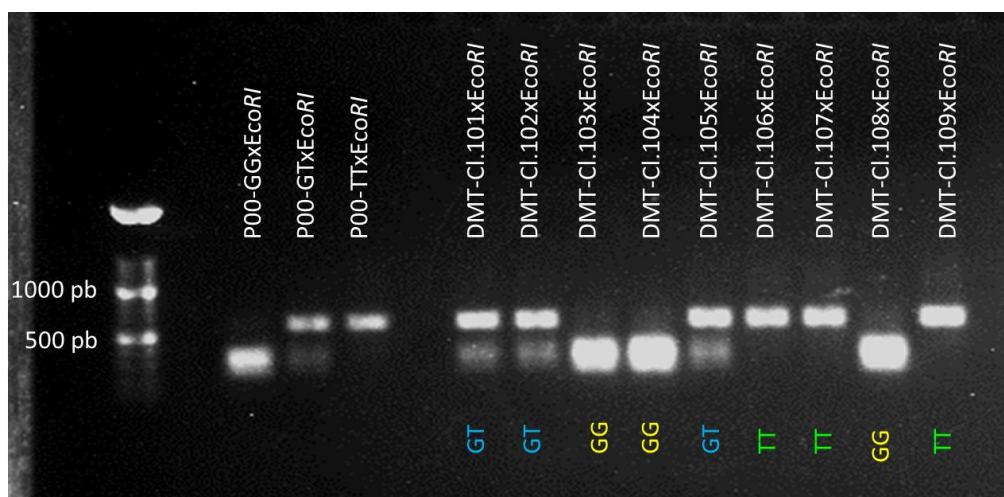
As reações dos *primers* P00, P15, P29, P39, P42 e P77 (Figura 12), e, dos *primers* P14, P32, P36 e P83 (Figura 13), para os clones componentes da variedade Centenária ES8132 e para os controles dos respectivos *primers* após passarem pelo processo de digestão enzimática com a *EcoRI*, evidenciam que tanto a reação da PCR quanto o processo de digestão enzimática foram eficientes. Isso porque através da eletroforese podemos observar a migração dos *amplicons* no gel de agarose para as regiões esperadas. Vemos fragmentos para todos os clones e principalmente para todos os controles, assegurando-nos desta forma que as reações foram todas eficientes.

4.4 Genotipagem

Após a realização de todas as eletroforeses das amostras que passaram por digestão enzimática pôde ser realizada a genotipagem com base nos controles, os quais foram sempre incluídos em todas as reações.

Na Figura 14 pode-se observar como foi realizada a genotipagem dos clones componentes da cultivar Diamante ES8112 para o *primer* P00.

Figura 14 – Genotipagem da cultivar Diamante ES8112 realizada com o *primer* P00.

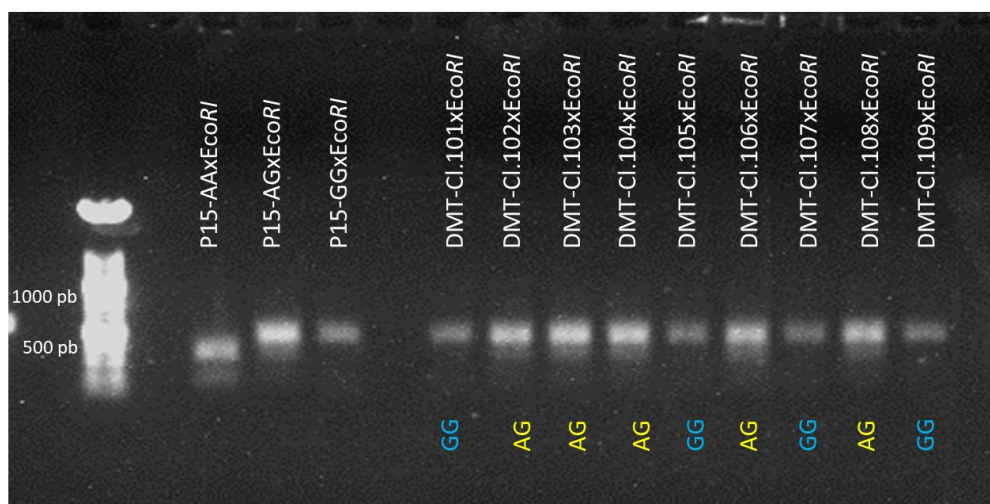


Fonte: Da autora (2023)

Desta forma, temos que a genotipagem para o *primer* P00 dos clones componentes da cultivar Diamante ES8112, apresentou os seguintes genótipos: os clones 103, 104 e 108 apresentaram genótipo GG, os clones 101, 102 e 105 apresentaram o genótipo GT e os clones 106, 107 e 109 apresentaram o genótipo TT (Figura 14).

Na Figura 15 observa-se que a genotipagem realizada para o *primer* P15 dos clones componentes da cultivar Diamante ES8112 apresentou os seguintes genótipos: os clones 101, 105, 107 e 109 apresentaram genótipo GG e os clones 102, 103, 104, 106 e 108 apresentaram o genótipo AG, nenhum clone desta variedade apresentou o genótipo AA.

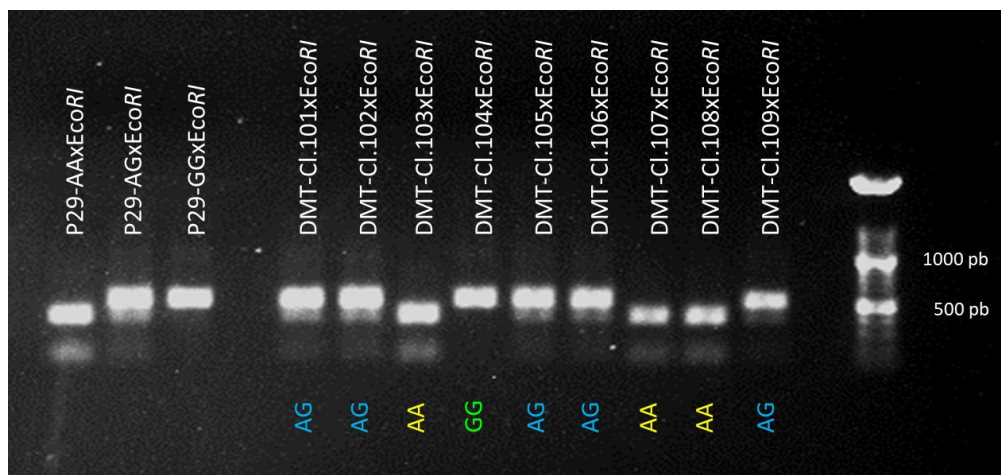
Figura 15 - Genotipagem da cultivar Diamante ES8112 realizada com o *primer* P15.



Fonte: Da autora (2023)

A genotipagem para o *primer* P29 dos clones componentes da cultivar Diamante ES8112, descrita na Figura 16 apresentou os seguintes genótipos: os clones 101, 102, 105, 106, e 109 apresentaram genótipo heterozigoto AG, os clones 103, 107 e 108 apresentaram o genótipo AG e apenas o clone 104 apresentou o genótipo GG.

Figura 16 - Genotipagem da cultivar Diamante ES8112 realizada com o *primer* P29.



Fonte: Da autora (2023)

Os dados observados na Figura 17 demonstraram que pela genotipagem para o *primer* P39 os clones 101 102, 103, 104, 105, 106 e 107 apresentaram o genótipo GG e os clones 108 e 109 apresentaram o genótipo heterozigoto AG. Nenhum clone desta variedade apresentou o genótipo AA.

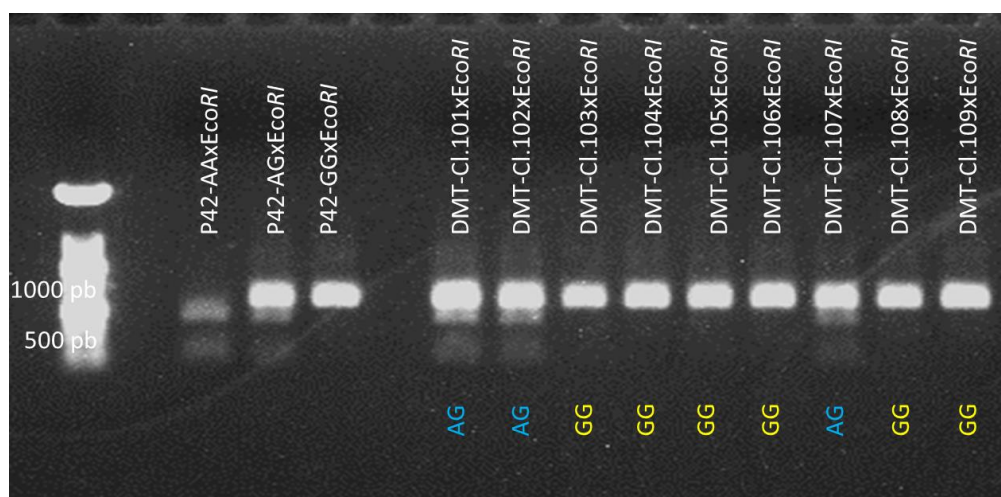
Figura 17 - Genotipagem da cultivar Diamante ES8112 realizada com o *primer* P39.



Fonte: Da autora (2023)

Na Figura 18 pode-se observar que a genotipagem para o *primer* P42 da cultivar Diamante ES8112 apresentou os seguintes genótipos: os clones 101, 102 e 107 apresentaram genótipo AG, os clones 103, 104, 105, 106, 108 e 109 apresentaram o genótipo homozigoto GG e nenhum clone desta variedade apresentou o genótipo AA.

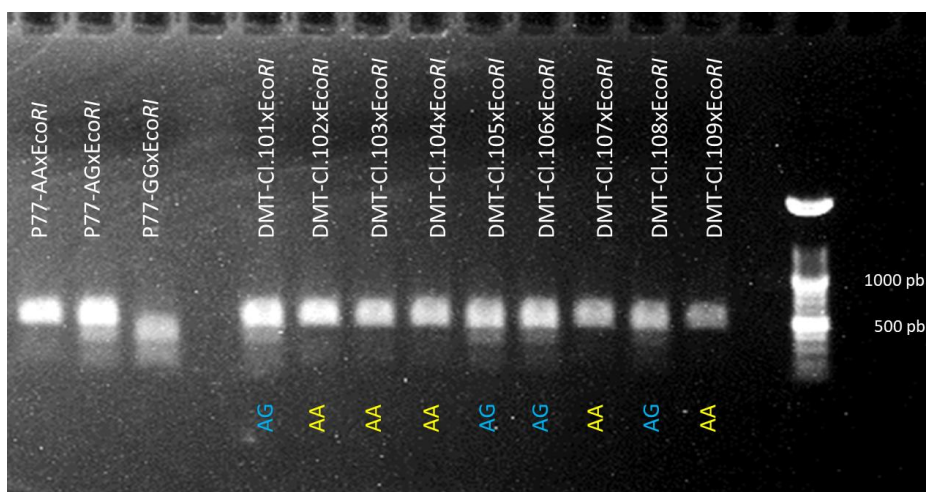
Figura 18 - Genotipagem da cultivar Diamante ES8112 realizada com o *primer* P42.



Fonte: Da autora (2023)

A genotipagem para o *primer* P77 da cultivar Diamante ES8112 apresentada na Figura 19 resultou nos seguintes genótipos: os clones 101, 105, 106 e 108 apresentaram genótipo AG, os clones 102, 103, 104, 107 e 109 apresentaram o genótipo AA e nenhum clone desta variedade apresentou o genótipo GG.

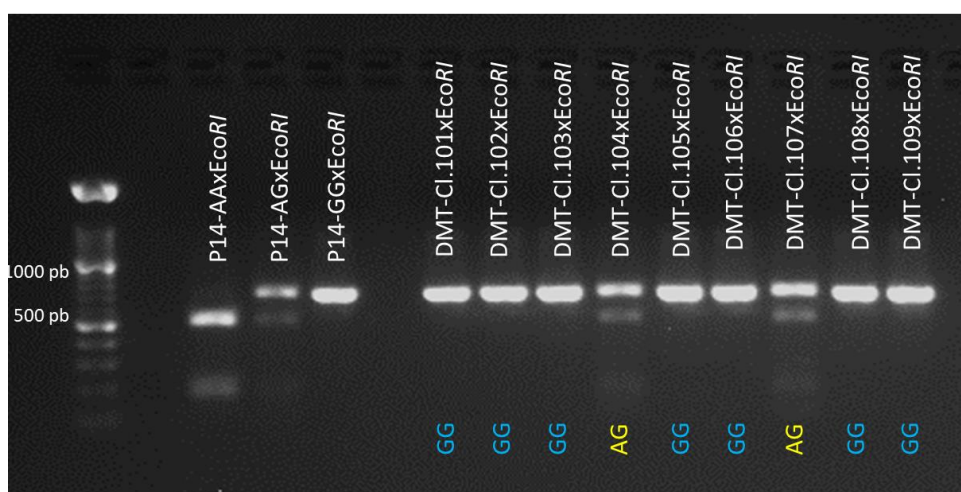
Figura 19 – Genotipagem da cultivar Diamante ES8112 realizada com o *primer* P77.



Fonte: Da autora (2023)

Na Figura 20 pode-se observar que a genotipagem para o P14 da cultivar Diamante ES8112 apresentou os seguintes genótipos: os clones 101, 102, 103 105, 106, 108 e 109 apresentaram genótipo GG, os clones 104 e 107 apresentaram o genótipo AG e nenhum clone desta variedade apresentou o genótipo AA.

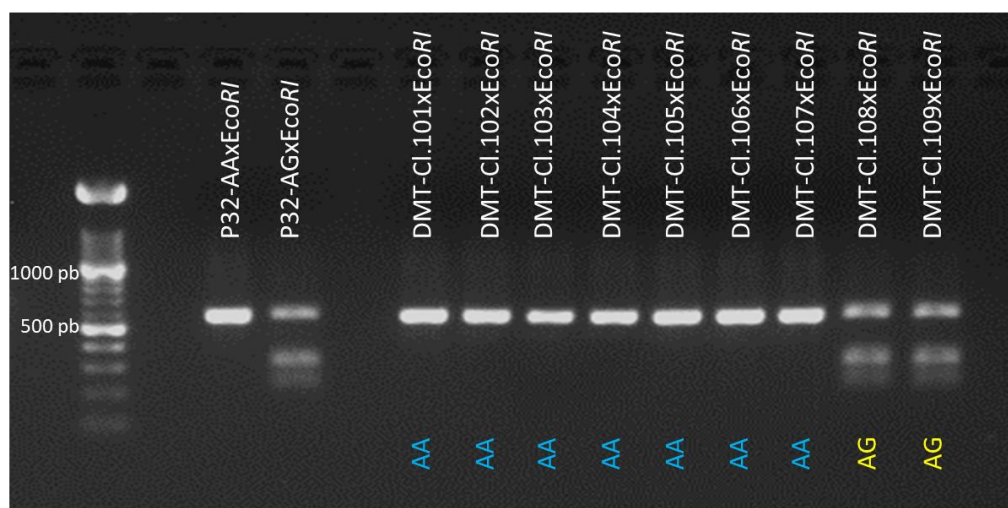
Figura 20 – Genotipagem da cultivar Diamante ES8112 realizada com o *primer* P14.



Fonte: Da autora (2023)

De acordo com a genotipagem realizada para o P32 da cultivar Diamante ES8112 os clones 101, 102, 103, 104, 105, 106 e 107 apresentaram o genótipo AA e os clones 108 e 109 apresentaram o genótipo heterozigoto AG. Nessa cultivar, nenhum dos clones apresentaram o alelo GG para o primer P32 (Figura 21).

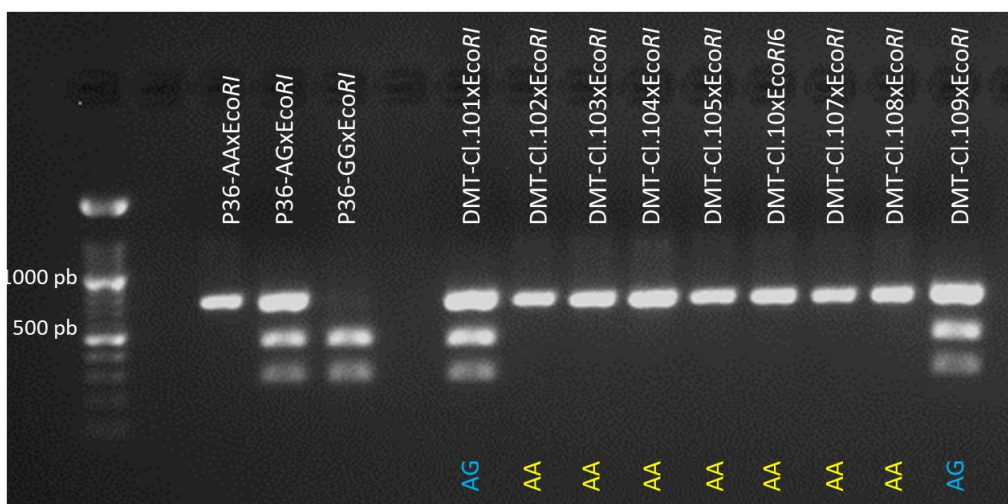
Figura 21 – Genotipagem da cultivar Diamante ES8112 realizada com o *primer* P32.



Fonte: Da autora (2023)

Na Figura 22 pode-se observar que pela genotipagem para o *primer* P36 da cultivar Diamante ES8112 os clones, 102, 103, 104, 105, 106, 107 e 108 apresentaram genótipo AA, os clones 101 e 109 apresentaram o genótipo AG e nenhum clone desta variedade apresentou o genótipo GG.

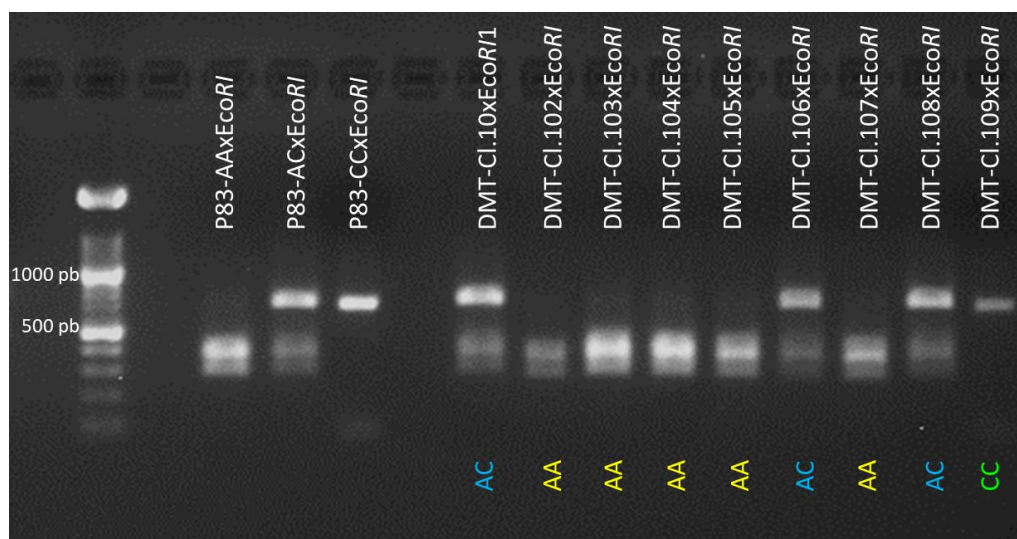
Figura 22 - Genotipagem da cultivar Diamante ES8112 realizada com o *primer* P36.



Fonte: Da autora (2023)

A genotipagem realizada para o P83 da cultivar Diamante ES8112 mostrou que os clones 101, 106 e 108 apresentaram genótipo AC, os clones 102, 103, 104, 105 e 107 apresentaram o genótipo AA e apenas o clone 109 desta cultivar apresentou o genótipo CC (Figura 23).

Figura 23 – Genotipagem da cultivar Diamante ES8112 realizada com o *primer* P83.



Fonte: Da autora (2023)

De posse de todos os dados de genotipagem disponíveis foi possível confeccionar a Tabela 5, sendo possível constatar que os clones componentes da cultivar clonal Diamante ES8112 puderam ser distinguidos entre si com a metodologia de genotipagem realizada.

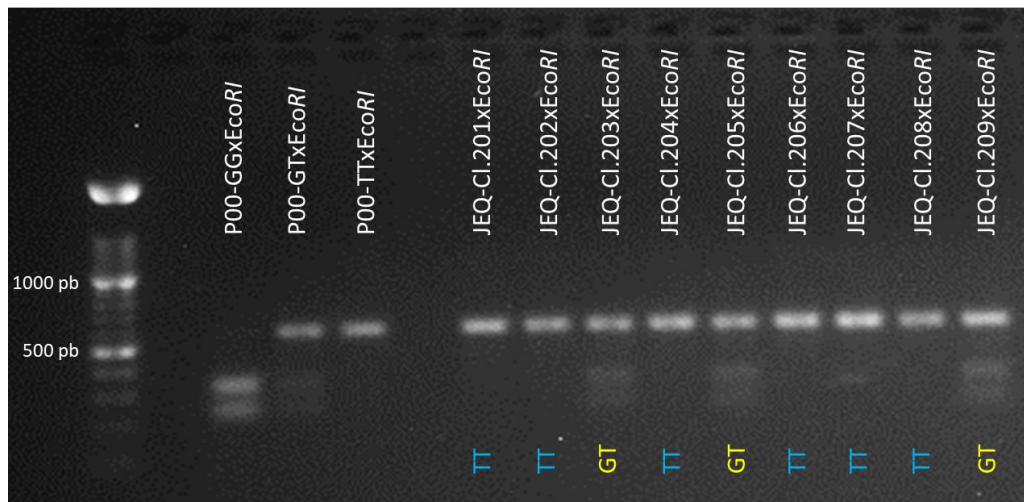
Tabela 5 – Resultado da genotipagem da cultivar clonal Diamante ES8112.

Clones	P00	P15	P29	P39	P42	P77	P14	P32	P36	P83
DMT8112-Cl.101	GT	GG	AG	GG	AG	AG	GG	AA	AG	AC
DMT8112-Cl.102	GT	AG	AG	GG	AG	AA	GG	AA	AA	AA
DMT8112-Cl.103	GG	AG	AA	GG	GG	AA	GG	AA	AA	AA
DMT8112-Cl.104	GG	AG	GG	GG	GG	AA	AG	AA	AA	AA
DMT8112-Cl.105	GT	GG	AG	GG	GG	AG	GG	AA	AA	AA
DMT8112-Cl.106	TT	AG	AG	GG	GG	AG	GG	AA	AA	AC
DMT8112-Cl.107	TT	GG	AA	GG	AG	AA	AG	AA	AA	AA
DMT8112-Cl.108	GG	AG	AA	AG	GG	AG	GG	AG	AA	AC
DMT8112-Cl.109	TT	GG	AG	AG	GG	AA	GG	AG	AG	CC

Fonte: Da autora (2023)

Na Figura 24 observar-se que pela genotipagem dos clones pertencentes a cultivar Jequitibá ES8129 com o uso do *primer* P00, os clones 201, 202, 204, 206, 207 e 208 apresentaram genótipo TT e os clones 203, 205 e 209 apresentaram o genótipo GT. Não houve nenhum clone desta cultivar com o genótipo GG.

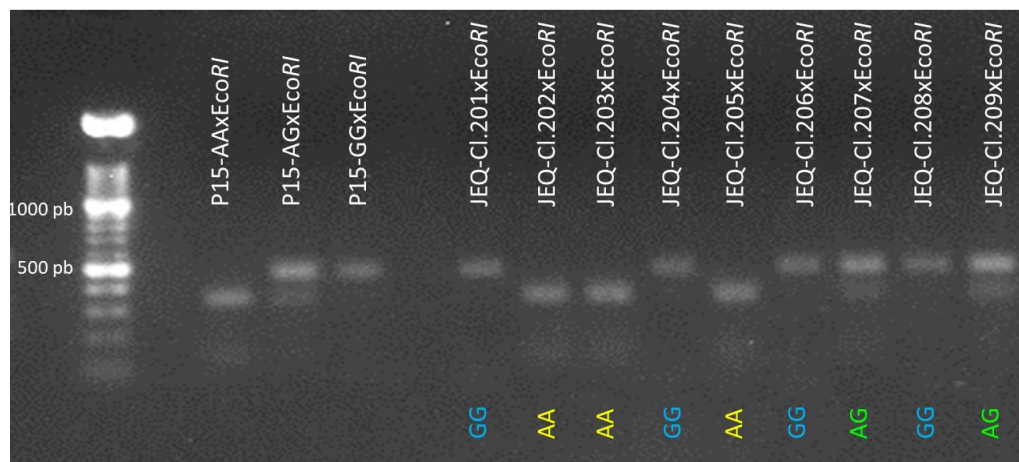
Figura 24 – Genotipagem da cultivar Jequitibá ES8122 realizada com o *primer* P00.



Fonte: Da autora (2023)

A genotipagem para o *primer* P15 da cultivar Jequitibá ES8122 apresentada na Figura 25 demonstrou que os clones 201, 204, 206 e 208 apresentaram genótipo GG, os clones 202, 203 e 205 apresentaram o genótipo AA e os clones 207 e 209 apresentaram o genótipo AG.

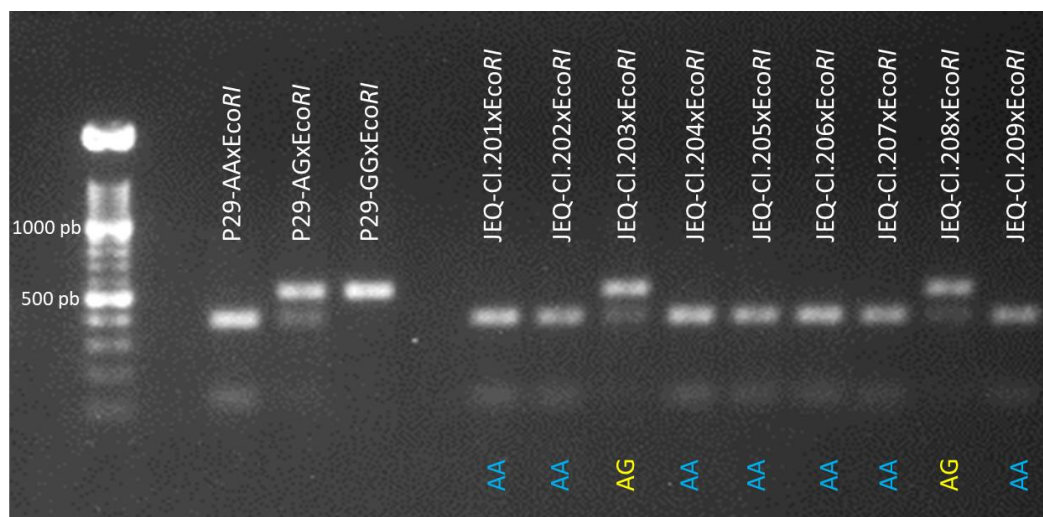
Figura 25 – Genotipagem da cultivar Jequitibá ES8122 realizada com o *primer* P15.



Fonte: Da autora (2023)

Na Figura 26 temos a genotipagem que foi realizada para o *primer* P29 da cultivar Jequitibá ES8122. Utilizando *primer* P29, a genotipagem da cultivar Jequitibá ES8122 demonstrou que os clones 201, 202, 204, 205, 206, 207 e 209 apresentaram genótipo AA, enquanto que, os clones 203 e 208 apresentaram o genótipo AG (Figura 26). Nenhum clone desta cultivar apresentou o genótipo GG.

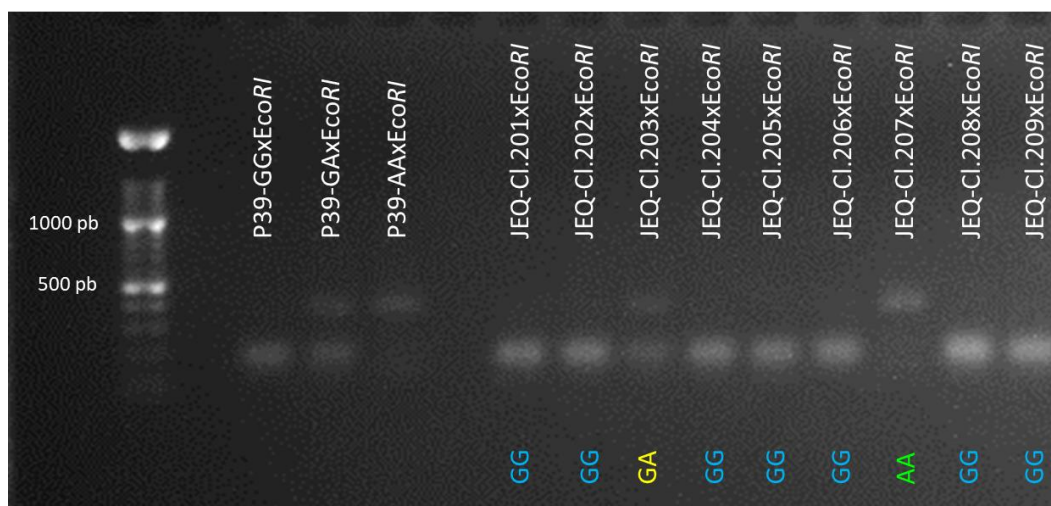
Figura 26 – Genotipagem da cultivar Jequitibá ES8122 realizada com o *primer* P29.



Fonte: Da autora (2023)

A genotipagem para o *primer* P39 da cultivar Jequitibá ES8122 demonstrada na Figura 27 classificou os clones 201, 202, 204, 205, 206, 208 e 209 com o genótipo GG, o clone 203 com o genótipo GA e o clone 207 com o genótipo AA (Figura 27).

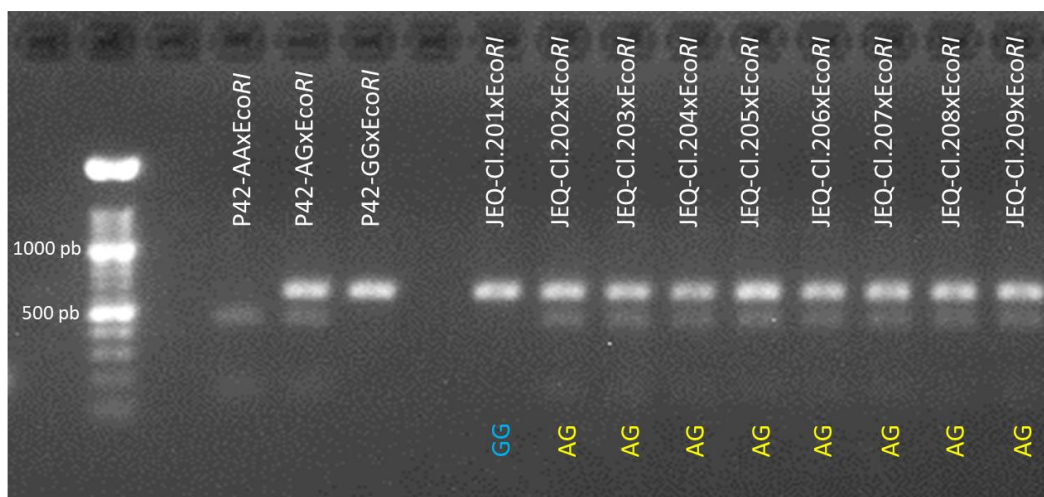
Figura 27 – Genotipagem da variedade Jequitibá ES8122 realizada com o *primer* P39.



Fonte: Da autora (2023)

Na genotipagem para o *primer* P42 da cultivar Jequitibá ES8122 (Figura 28) temos que apenas o clone 201 apresentou o genótipo GG e todos os demais clones (202, 203, 204, 205, 206, 207, 208 e 209) apresentaram o genótipo AG. Assim, para esta variedade, nenhum clone apresentou o genótipo AA.

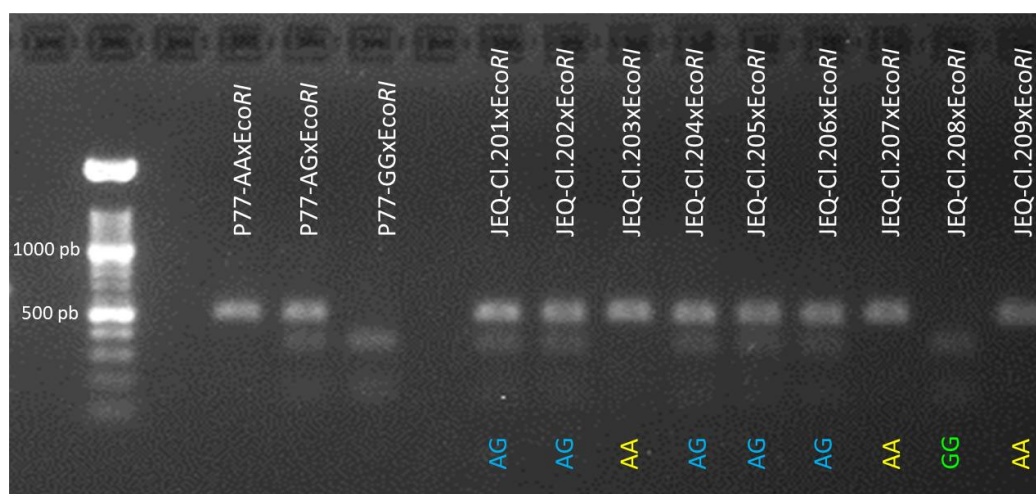
Figura 28 - Genotipagem da cultivar Jequitibá ES8122 realizada com o *primer* P42.



Fonte: Da autora (2023)

A genotipagem para o *primer* P77 da cultivar Jequitibá ES8122 demonstrada na Figura 29 classificou os clones 201, 202, 204, 205 e 206 com o genótipo AG, os clones 203, 207 e 209 com o genótipo AA e apenas o clone 208 com o genótipo GG.

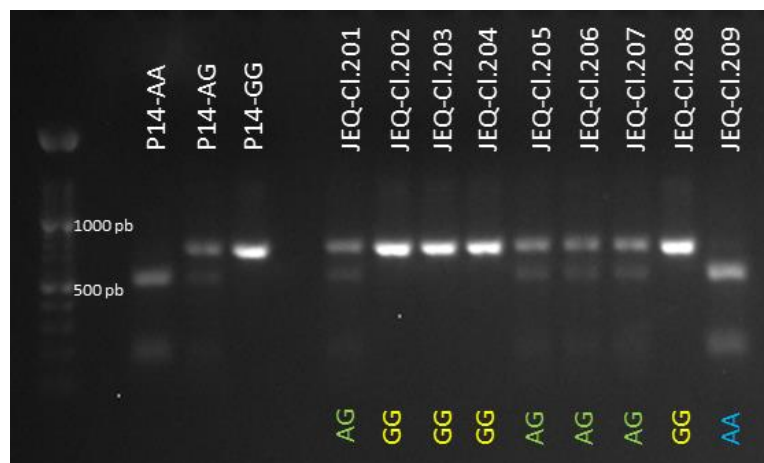
Figura 29 - Genotipagem da cultivar Jequitibá ES8122 realizada com o *primer* P77.



Fonte: Da autora (2023)

Na Figura 30 observa-se que pela genotipagem para o *primer* P14 da cultivar Jequitibá ES8122 os clones 201, 205, 206 e 207 apresentaram o genótipo AG, os clones 202, 203, 204 e 208 apresentaram o genótipo GG e apenas o clone 209 apresentou o genótipo AA.

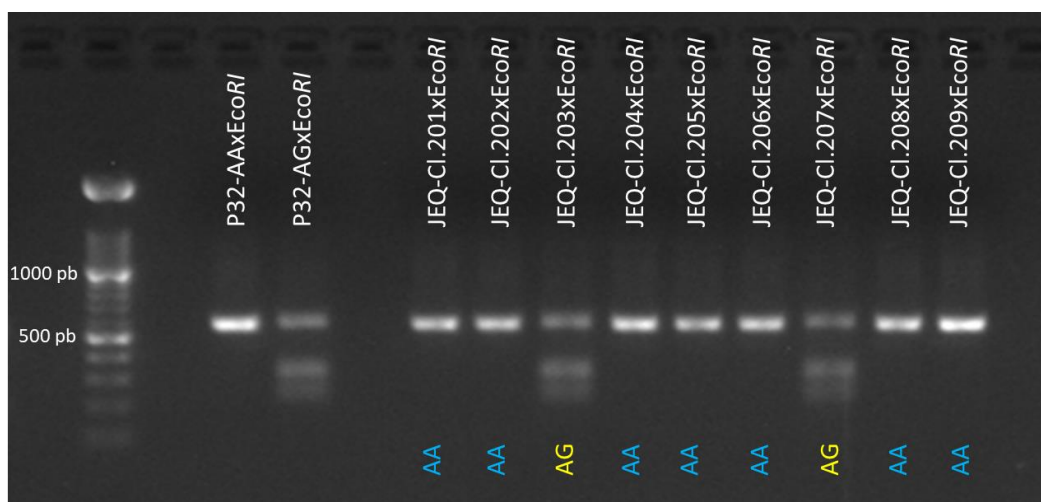
Figura 30 – Genotipagem da cultivar Jequitibá ES8122 realizada com o *primer* P14.



Fonte: Da autora (2023)

A genotipagem para o *primer* P32 da variedade Jequitibá ES8122, apresentada na Figura 31 demonstrou que os clones 201, 202, 204, 205, 206, 208 e 209 apresentaram o genótipo AA, enquanto que os clones 203 e 207 apresentaram o genótipo AG. Nenhum clone desta variedade apresentou o genótipo GG.

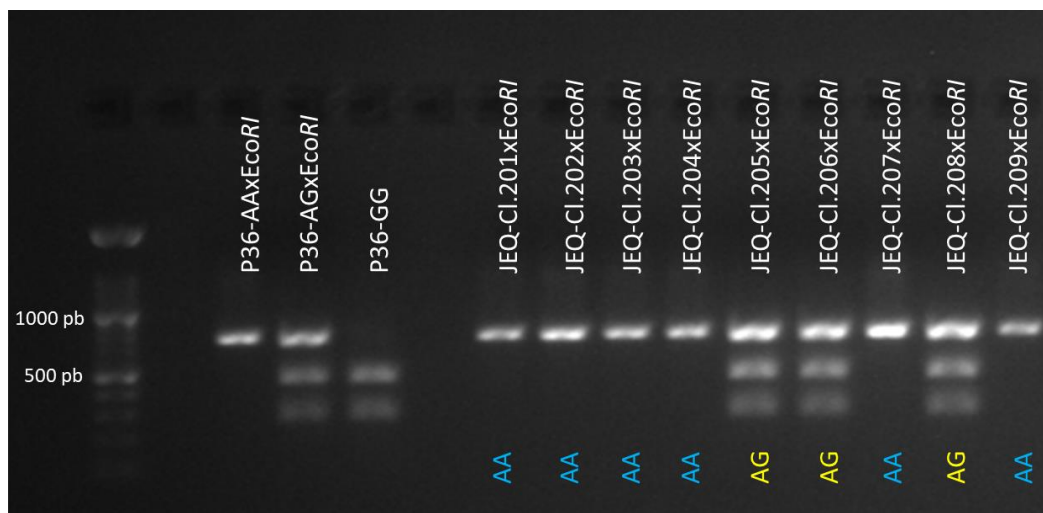
Figura 31 - Genotipagem da cultivar Jequitibá ES8122 realizada com o *primer* P32.



Fonte: Da autora (2023)

A genotipagem para o *primer* P36 da variedade Jequitibá ES8122 classificou os clones 201, 202, 203, 204, 207 e 209 com o genótipo AA e os clones 205, 206 e 208 com o genótipo AG. Nenhum clone desta variedade apresentou o genótipo GG (Figura 32).

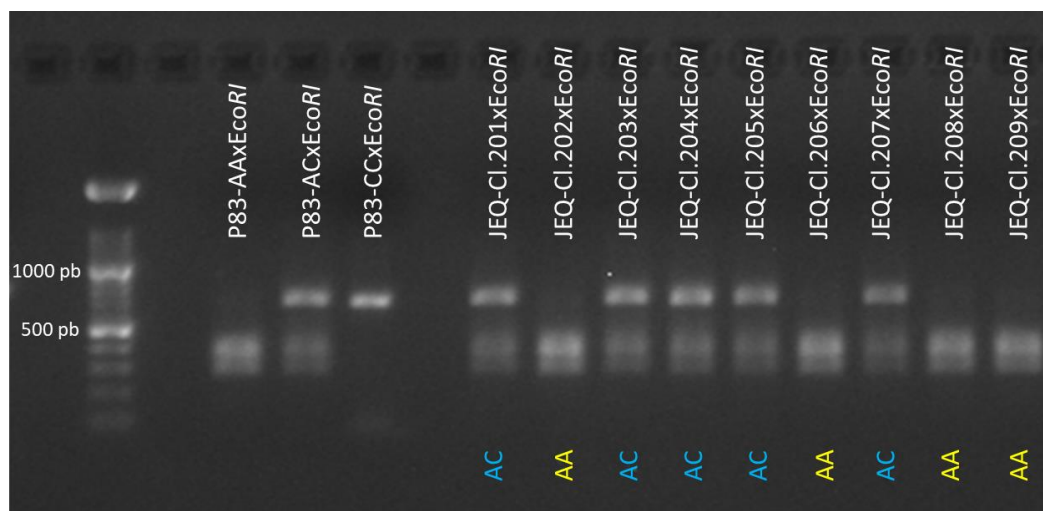
Figura 32 - Genotipagem da cultivar Jequitibá ES8122 realizada com o *primer* P36.



Fonte: Da autora (2023)

Na Figura 33 observa-se que pela genotipagem da cultivar Jequitibá ES8122 para o *primer* P83, os clones 201, 203, 204, 205 e 207 apresentam o genótipo AC e os clones 202, 206, 208 e 209 apresentam o genótipo AA. Nenhum clone desta variedade apresentou o genótipo CC.

Figura 33 - Genotipagem da cultivar Jequitibá ES8122 realizada com o *primer* P83.



Fonte: Da autora (2023)

Com os dados obtidos na genotipagem de todos os clones da variedade Jequitibá ES8122, para os dez marcadores em estudo, foi possível observar que todos os clones diferem entre si para esses marcadores (Tabela 6).

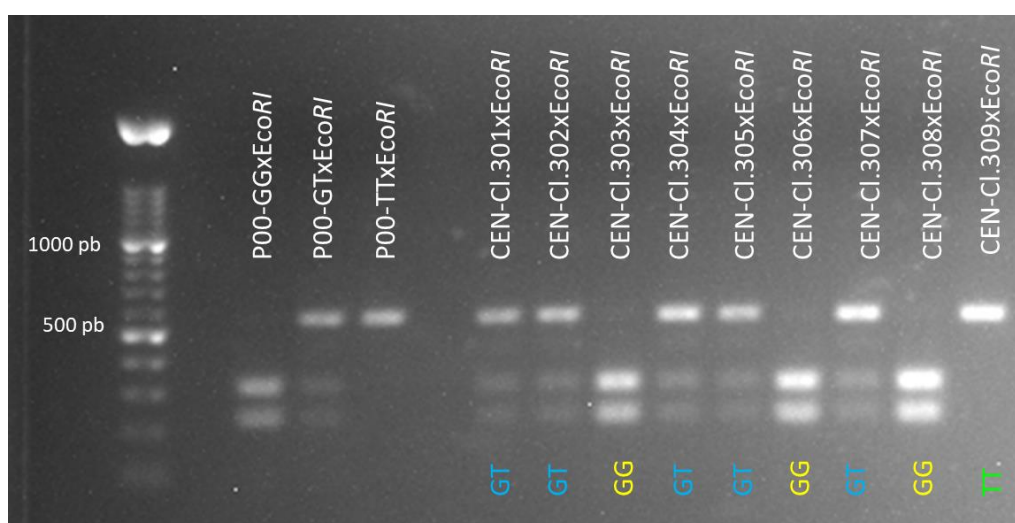
Tabela 6 – Resultado da genotipagem da variedade clonal Jequitibá ES8122.

Clones	P00	P15	P29	P39	P42	P77	P14	P32	P36	P83
JEQ8122-Cl.201	TT	GG	AA	GG	GG	AG	AG	AA	AA	AC
JEQ8122-Cl.202	TT	AA	AA	GG	AG	AG	GG	AA	AA	AA
JEQ8122-Cl.203	GT	AA	AG	AG	AG	AA	GG	AG	AA	AC
JEQ8122-Cl.204	TT	GG	AA	GG	AG	AG	GG	AA	AA	AC
JEQ8122-Cl.205	GT	AA	AA	GG	AG	AG	AG	AA	AG	AC
JEQ8122-Cl.206	TT	GG	AA	GG	AG	AG	AG	AA	AG	AA
JEQ8122-Cl.207	TT	AG	AA	AA	AG	AA	AG	AG	AA	AC
JEQ8122-Cl.208	TT	GG	AG	GG	AG	GG	GG	AA	AG	AA
JEQ8122-Cl.209	GT	AG	AA	GG	AG	AA	AA	AA	AA	AA

Fonte: Da autora (2023)

Analisando a cultivar Centenária ES8132, na Figura 34 é apresentada a genotipagem com o *primer* P00, em que os clones 301, 302, 304, 305 e 307 apresentaram o genótipo GT, os clones 303, 306 e 308 apresentaram o genótipo GG e apenas o clone 309 apresentou o genótipo TT.

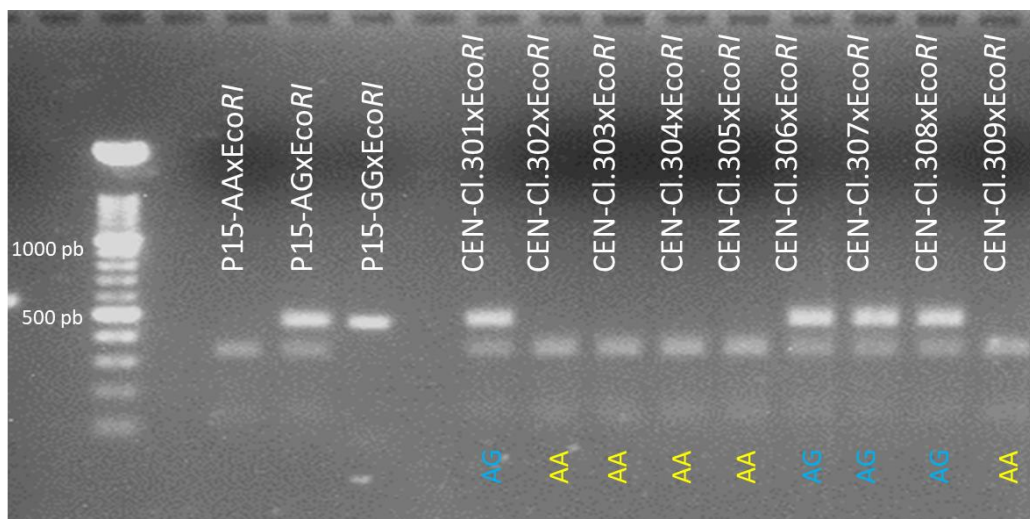
Figura 34 – Genotipagem da cultivar Centenária ES8132 realizada com o *primer* P00.



Fonte: Da autora (2023)

A genotipagem do *primer* P15 para a cultivar Centenária ES8132 identificou os clones 301, 306, 307 e 308 com o genótipo AG e os clones 302, 303, 304, 305 e 309 com o genótipo AA. Não houveram clones desta variedade com o genótipo GG (Figura 35).

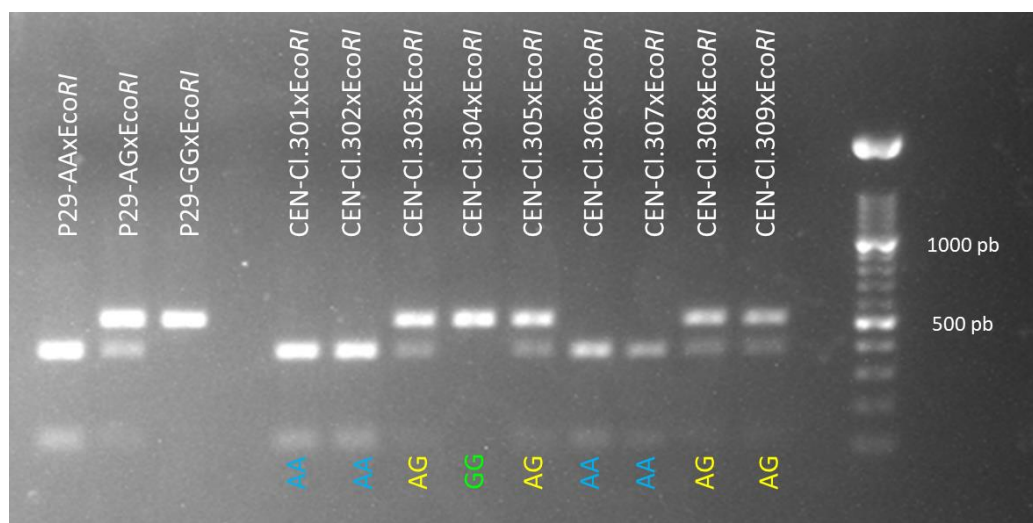
Figura 35 – Genotipagem da cultivar Centenária ES8132 realizada com o *primer* P15.



Fonte: Da autora (2023)

Na Figura 36 observa-se a genotipagem do *primer* P29 para a cultivar Centenária ES8132 a qual identificou os clones 301, 302, 306 e 307 com o genótipo AA, os clones 303, 305, 308 e 309 com o genótipo AG e apenas o clone 304 com o genótipo GG.

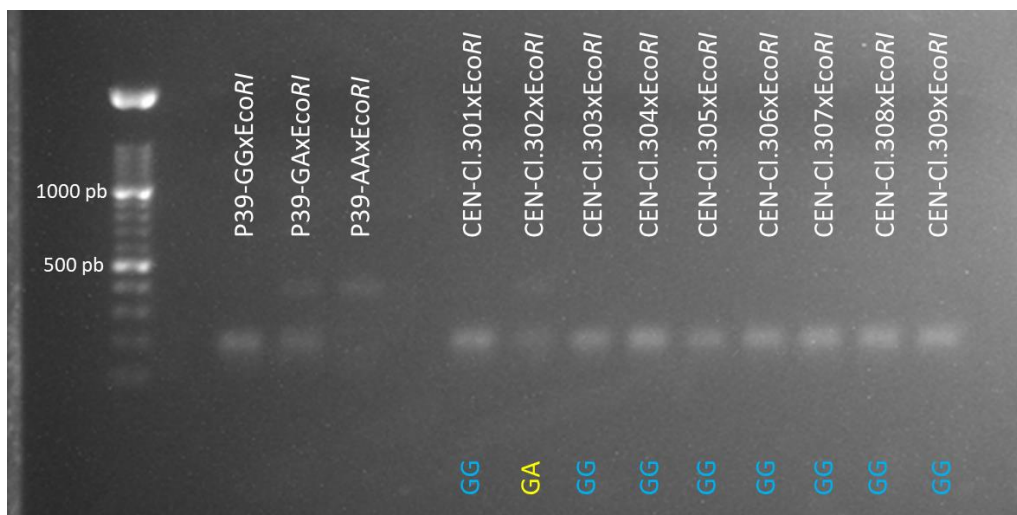
Figura 36 – Genotipagem da cultivar Centenária ES8132 realizada com o *primer* P29.



Fonte: Da autora (2023)

A genotipagem da cultivar Centenária ES8132 descrita na Figura 37 para o *primer* P39, identificou apenas o clone 302 com o genótipo GA. Todos os demais clones da variedade, (301, 303, 304, 305, 306, 307, 308 e 309) apresentam o genótipo GG.

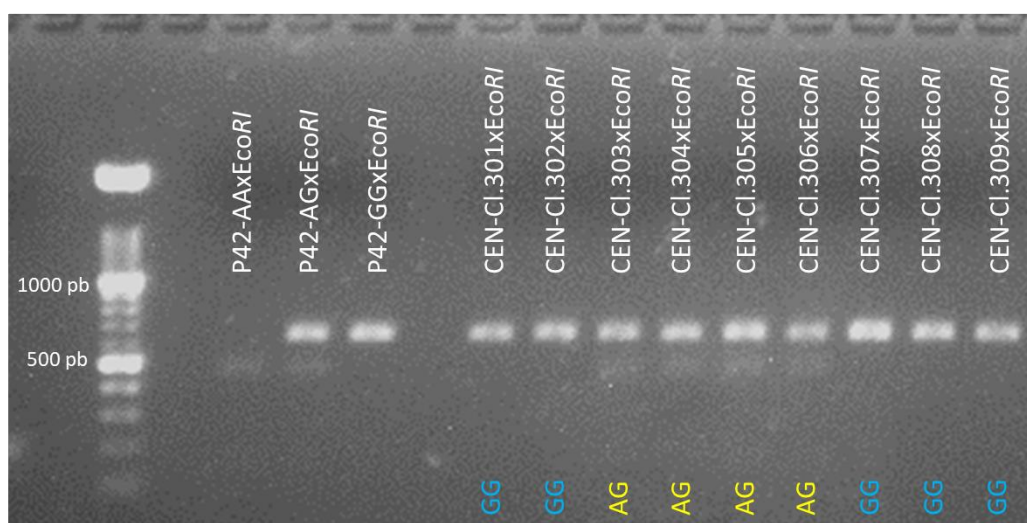
Figura 37 – Genotipagem da cultivar Centenária ES8132 realizada com o *primer* P39.



Fonte: Da autora (2023)

Na Figura 38 observa-se que na genotipagem da cultivar Centenária ES8132 para o *primer* P42, os clones 301, 302, 307, 308 e 309 apresentam o genótipo GG, enquanto os clones 303, 304, 305 e 306 apresentam o genótipo AG. Não houve clone, nesta variedade com o genótipo AA.

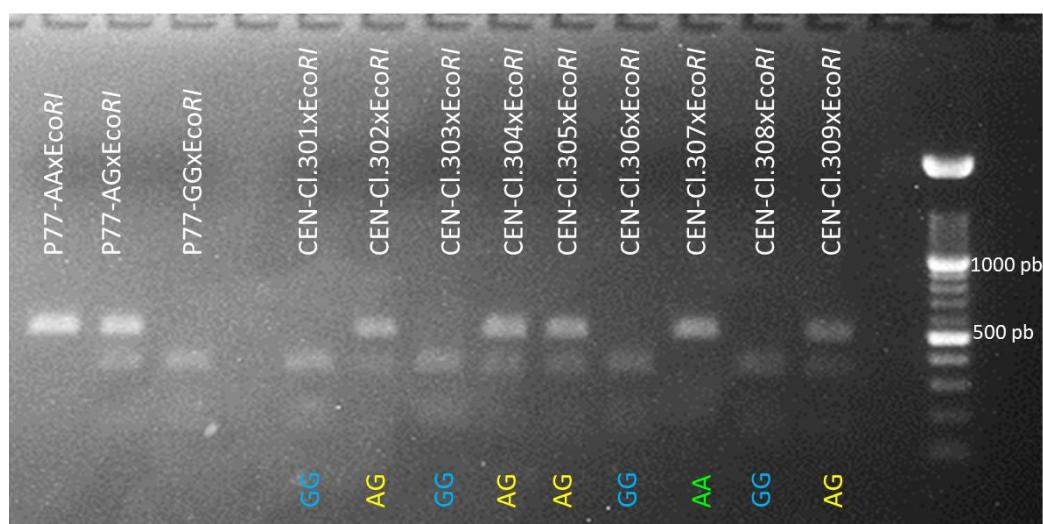
Figura 38 - Genotipagem da cultivar Centenária ES8132 realizada com o *primer* P42.



Fonte: Da autora (2023)

A genotipagem da variedade Centenária ES8132 com o *primer* P77 mostrou que os clones 301, 303, 306 e 308 foram identificados com o genótipo GG, os clones 302, 304, 305 e 309 com o genótipo AG e apenas o clone 307 com o genótipo AA (Figura 39).

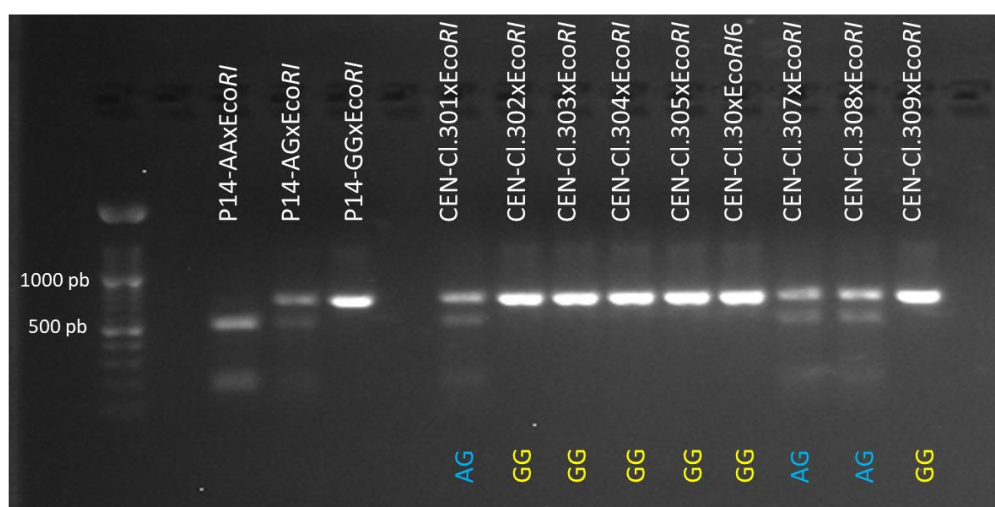
Figura 39 – Genotipagem da cultivar Centenária ES8132 realizada com o *primer* P77.



Fonte: Da autora (2023)

A Figura 40 apresenta a genotipagem do *primer* P14 para a cultivar Centenária ES8132 que classificou os clones 301, 307 e 308 com o genótipo AG e os clones 302, 303, 304, 305, 306 e 309 com o genótipo GG. Nenhum clone desta variedade apresentou o genótipo AA.

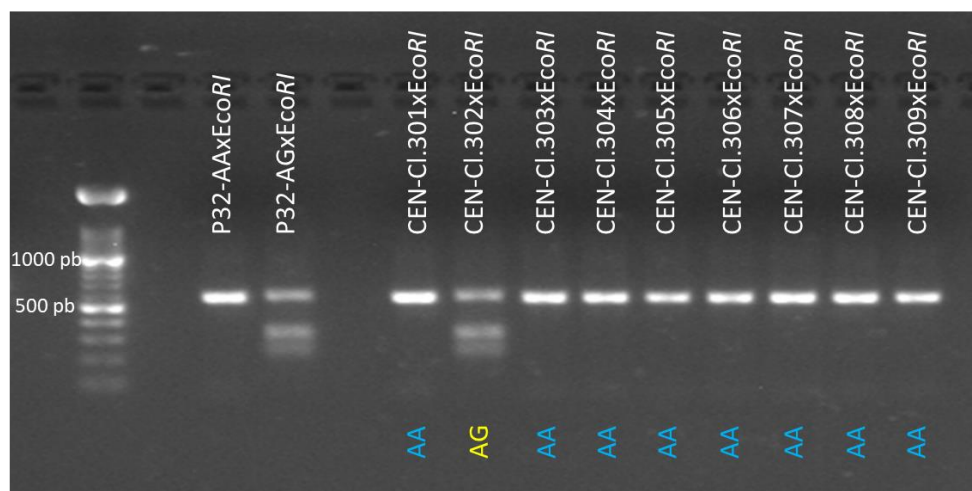
Figura 40 – Genotipagem da cultivar Centenária ES8132 realizada com o *primer* P14.



Fonte: Da autora (2023)

Por meio da genotipagem da cultivar Centenária ES8132 para o *primer* P32, apenas o clone 302 apresentou o genótipo AG e todos os demais clones (301, 303, 304, 305, 306 307, 308 e 309) apresentaram o genótipo AA. Nenhum clone desta variedade apresentou o genótipo GG (Figura 41).

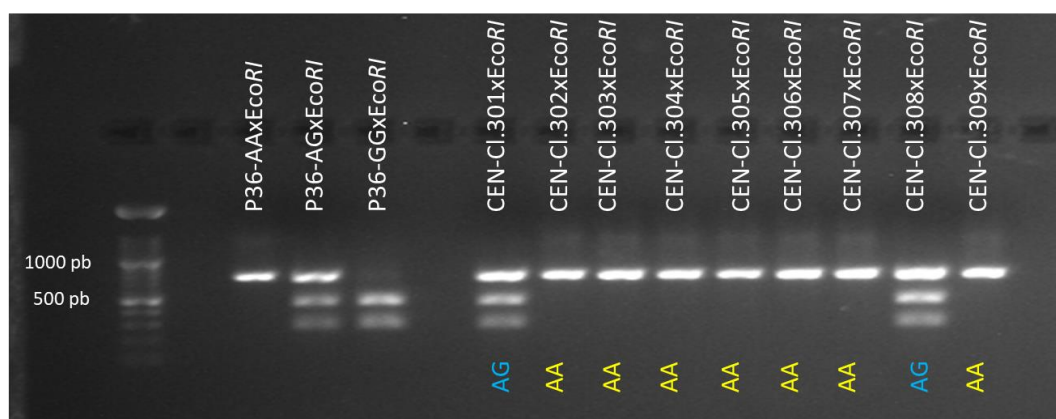
Figura 41 - Genotipagem da cultivar Centenária ES8132 para o *primer* P32.



Fonte: Da autora (2023)

A genotipagem da cultivar Centenária ES8132 para o *primer* P36 mostrou que os clones 301 e 308 apresentaram o genótipo AG e todos os demais clones (302, 303, 304, 305, 306 307 e 309) apresentam o genótipo AA. Nenhum clone desta cultivar apresentou o genótipo GG (Figura 42).

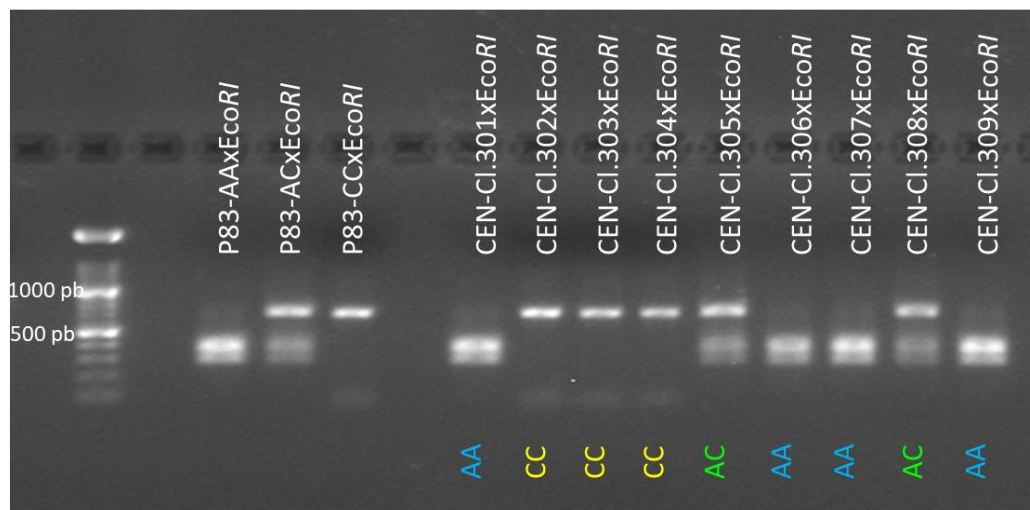
Figura 42 - Genotipagem da cultivar Centenária ES8132 realizada com o *primer* P36.



Fonte: Da autora (2023)

Na Figura 43 a genotipagem do *primer* P83 para a cultivar Centenária ES8132 mostrou que os clones 301, 306, 307 e 309 apresentaram o genótipo AA, os clones 302, 303 e 304 apresentam o genótipo CC e os clones 305 e 308 apresentaram o genótipo AC.

Figura 43 - Genotipagem da variedade Centenária ES8132 realizada com o *primer* P83.



Fonte: Da autora (2023)

De posse de todos os dados da genotipagem realizada com a cultivar Centenária ES8132 foi possível concluir que todos os clones se diferenciaram entre si para os dez marcadores utilizados nessa genotipagem (Tabela 7).

Tabela 7 – Resultado da genotipagem da cultivar clonal Centenária ES8132.

Clones	P00	P15	P29	P39	P42	P77	P14	P32	P36	P83
CEN8132-Cl.301	GT	AG	AA	GG	GG	GG	AG	AA	AG	AA
CEN8132-Cl.302	GT	AA	AA	GA	GG	AG	GG	AG	AA	CC
CEN8132-Cl.303	GG	AA	AG	GG	AG	GG	GG	AA	AA	CC
CEN8132-Cl.304	GT	AA	GG	GG	AG	AG	GG	AA	AA	CC
CEN8132-Cl.305	GT	AA	AG	GG	AG	AG	GG	AA	AA	AC
CEN8132-Cl.306	GG	AG	AA	GG	AG	GG	GG	AA	AA	AA
CEN8132-Cl.307	GT	AG	AA	GG	GG	AA	AG	AA	AA	AA
CEN8132-Cl.308	GG	AG	AG	GG	GG	GG	AG	AA	AG	AC
CEN8132-Cl.309	TT	AA	AG	GG	GG	AG	GG	AA	AA	AA

Fonte: Da autora (2023)

Sendo assim, os dados de genotipagem de todos os clones das variedades Diamante ES8112, Jequitibá ES8122 e Centenária ES8132 foram analisados em conjunto e assim foi construída a Figura 44. Para cada *primer* foram utilizadas três cores distintas entre si, para que facilitar a visualização dos diferentes genótipos. Com base nos resultados, foi possível observar que o método desenvolvido foi eficaz tanto em genotipar os clones em estudo, como também em diferenciá-los, visto que, nenhum dos clones apresentou genotipagem semelhante ao do outro, no conjunto dos 10 pares de *primers* estudados.

Figura 44 – Genotipagem das cultivares Diamante ES8112 e Jequitibá ES8122 e Centenária ES8132.

Clones	P00	P15	P29	P39	P42	P77	P14	P32	P36	P83
CEN8132-CI.303	GG	AA	AG	GG	AG	GG	GG	AA	AA	CC
DMT8112-CI.108	GG	AG	AA	AG	GG	AG	GG	AG	AA	AC
CEN8132-CI.306	GG	AG	AA	GG	AG	GG	GG	AA	AA	AA
DMT8112-CI.103	GG	AG	AA	GG	GG	AA	GG	AA	AA	AA
CEN8132-CI.308	GG	AG	AG	GG	GG	GG	AG	AA	AG	AC
DMT8112-CI.104	GG	AG	GG	GG	GG	AA	AG	AA	AA	AA
CEN8132-CI.302	GT	AA	AA	AG	GG	AG	GG	AG	AA	CC
JEQ8122-CI.205	GT	AA	AA	GG	AG	AG	AG	AA	AG	AC
JEQ8122-CI.203	GT	AA	AG	AG	AG	AA	GG	AG	AA	AC
CEN8132-CI.305	GT	AA	AG	GG	AG	AG	GG	AA	AA	AC
CEN8132-CI.304	GT	AA	GG	GG	AG	AG	GG	AA	AA	CC
JEQ8122-CI.209	GT	AG	AA	GG	AG	AA	AA	AA	AA	AA
CEN8132-CI.307	GT	AG	AA	GG	GG	AA	AG	AA	AA	AA
CEN8132-CI.301	GT	AG	AA	GG	GG	GG	AG	AA	AG	AA
DMT8112-CI.102	GT	AG	AG	GG	AG	AA	GG	AA	AA	AA
DMT8112-CI.101	GT	GG	AG	GG	AG	AG	GG	AA	AG	AC
DMT8112-CI.105	GT	GG	AG	GG	GG	AG	GG	AA	AA	AA
JEQ8122-CI.202	TT	AA	AA	GG	AG	AG	GG	AA	AA	AA
CEN8132-CI.309	TT	AA	AG	GG	GG	AG	GG	AA	AA	AA
JEQ8122-CI.207	TT	AG	AA	AA	AG	AA	AG	AG	AA	AC
DMT8112-CI.106	TT	AG	AG	GG	GG	AG	GG	AA	AA	AC
DMT8112-CI.107	TT	GG	AA	GG	AG	AA	AG	AA	AA	AA
JEQ8122-CI.204	TT	GG	AA	GG	AG	AG	GG	AA	AA	AC
JEQ8122-CI.206	TT	GG	AA	GG	AG	AG	AG	AA	AG	AA
JEQ8122-CI.201	TT	GG	AA	GG	GG	AG	AG	AA	AA	AC
DMT8112-CI.109	TT	GG	AG	AG	GG	AA	GG	AG	AG	CC
JEQ8122-CI.208	TT	GG	AG	GG	AG	GG	GG	AA	AG	AA

Fonte: Da autora (2023)

Desta forma, podemos constatar que o método tem potencial para genotipar e diferenciar os clones de *C. canephora*, componentes das variedades registradas e protegidas no MAPA.

5. CONCLUSÃO

A seleção dos SNPs e o desenho dos *primers* foram eficazes, visto que houve a amplificação dos fragmentos no tamanho esperado pela PCR.

O processo de corte enzimático com *EcoRI* foi realizado para todos os clones em estudo e apresentou o resultado conforme os controles, comprovando assim que foi efetivo.

A genotipagem pôde ser realizada comparando-se o resultado do processo de digestão enzimática entre os clones em estudo e os controles.

O método desenvolvido foi eficiente em genotipar e diferenciar os clones pertencentes as cultivares clonais em estudo, de maneira rápida e de baixo custo. Desta forma, apresenta-se como um potencial método para servir de marcador molecular e auxiliar o MAPA em seu programa de proteção de cultivares de *C. canephora*.

REFERÊNCIAS

- ALONSO-SALCES, R. M. et al. Botanical and geographical characterization of green coffee (*Coffea arabica* and *Coffea canephora*): chemometric evaluation of phenolic and methylxanthine contents. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 57, n. 10, p. 4224-4235, mar. 2009.
- ALVES E. A., et al. Efeito da fermentação sobre qualidade da bebida do café robusta (*Coffea canephora*) cultivado na Amazônia Ocidental. **Revista Ifes Ciência**. Dec 23;6(3):159-70. 2020.
- ANDERSEN, J. R.; LÜBBERSTEDT, T. Functional markers in plants. **Plant Science**, Denmark, v. 8, n. 11, p. 554-560, nov. 2003
- ANDRADE, A. C. Projeto genoma café: uma ferramenta para acelerar o melhoramento de variedades. **Irrigação e Tecnologia Moderna**, Belo Horizonte, v. 73, p. 19-20, mar. 2007.
- ANDRADE, A. C. et al. 'Towards GWAS and Genomic Prediction in Coffee: Development and Validation of a 26K SNP Chip for *Coffea canephora*', In XX INTERNATIONAL PLANT AND ANIMAL GENOME CONFERENCE, p. W173. 2017, San Diego. **Anais eletrônicos [...]** Disponível em: <https://pag.confex.com/pag/xxv/webprogram/Paper23677.html> Acesso em: 20 de jan 2022
- AXIOM BEST PRACTICES GENOTYPING WORKFLOW (2023) **Axiom Genotyping Solution Data Analysis User Guide** (Pub. No. MAN0018363 C.0) Disponível em: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/axiom_genotyping_solution_analysis_guide.pdf (thermofisher.com). Acesso em: 20 de jan 2023
- BAIRD, N. et al. Rapid SNP discovery and genetic mapping using sequenced RAD markers. (J. C. Fay, Ed.) PloS one, 3(10), e3376. **Public Library of Science**. DOI:10.1371/journal.pone.0003376 Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0003376> Acesso em: 20 jan 2022
- BAKER, P. et al. The coffee smallholder. In: BAKER, P. S. (Ed.). **Coffee futures: a source book of some critical issues confronting the coffee industry**. Chinchina: CABI-Federacafe,. P. 26-43. 2001
- BARKER, G. et al. Redundancy based detection of sequence polymorphisms in expressed sequence tag data using autoSNP. **Bioinformatics**, v. 19, n. 3, p. 421-422, 2003.
- BARRETO, H. G. et al. In silico and quantitative analyses of the putative FLC-like homologue in coffee (*Coffea arabica* L.) **Plant Molecular Biology Reporter**, Athens, v. 30, p. 29-35, 2011.
- BATLEY J, EDWARDS D. The application of genomics and bioinformatics to accelerate crop improvement in a changing climate. **Current opinion in plant biology**. Apr 1;30:78-81. 2016

BERGO, C. L., et al. Produção de mudas de Cafeeiros por Sementes e Estacas. **Circular Técnica 44**. EMBRAPA, 2002.

BERTHAUD, J. **Les ressources genetiques pour l'amelioration des cafeires africains diploides**. Vol. 188. Paris: Orstom, 1986.

BERTRAND, B. et al. Impact of the *Coffea canephora* gene introgression on beverage quality of *C. arabica*. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 107, n. 3, p. 387-94, 2003.

BEVAN M.W., UAUY C. Genomics reveals new landscapes for crop improvement. **Genome biology**. Jun;14(6):1-1. 2013.

BONANTS, P. et al. Development and evaluation of a triplex taqman assay and next-generation sequence analysis for improved detection of *Xylella* in plant material. **Plant disease**. Apr 18;103(4):645-55. 2019.

BORÉM, A.; CAIXETA, A. **Marcadores moleculares**. 2. ed. Viçosa, MG: Folha de Viçosa, p.374 2009.

BRASIL. Governo do Brasil. **Biblioteca Internacional**. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/18134351/projeto-genoma-cafe-sera-disponibilizado-em-biblioteca-internacional>. Acesso em: 10 out. de 2022.

CAIXETA, E. T.; PESTANA, K. N.; PESTANA, R. K. N. Melhoramento do cafeeiro: ênfase na aplicação dos marcadores moleculares. **Embrapa Café-Capítulo em livro científico (ALICE)**, 2015. Disponível em:<<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/1041498/1/Melhoramentodocafeeiro.pdf>>. Acesso em: 15 jan. 2020

CARNEIRO, Fernanda de Araújo. **Validação de uma plataforma de genotipagem (Coffee Axiom Chip - 26K) com aplicação em seleção genômica ampla e GWAS, em Coffea canephora**. 2019. 172 p. Tese (Doutorado em Biotecnologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2019.

CARVALHO, L. M. de et al. Aspectos morfofisiológicos das cultivares 27 de cafeeiro Catuaí-Vermelho e Conilon. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 3, p. 411-416, mar. 2001.

CATTANEO, Laércio Francisco. **Avaliação da divergência genética e análise de gerações em mamoeiro (Carica papaya L.)**. 2001. 95 p. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Campos dos Goytacazes - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro-UENF, 93p., 2001.

COMBES, M. C. et al. Regulatory divergence between parental alleles determines gene expression patterns in hybrids. **Genome Biology and Evolution**, v. 7, n. 4, p. 1110-1121, 2015.

CONAB - **Companhia Nacional de Abastecimento**. Disponível em: www.conab.gov.br/> Acesso em: 5 de fev. de 2023.

COTTA, M. G. et al. Lipid transfer proteins in coffee: isolation of *Coffea* orthologs, *Coffea arabica* homeologs, expression during coffee fruit development and promoter analysis in transgenic tobacco plants. **Plant Molecular Biology**, v. 85, n. 1-2, p. 11-31, 2014.

CRUZ, V. M. V., KILIAN, A., & DIERIG, D. A. (2013). Development of DArT marker platforms and genetic diversity assessment of the US collection of the new oilseed crop *lesquerella* and related species. **PloS one**, 8(5), e64062.

CUBRY, P. et al. Diversity in coffee assessed with SSR markers: structure of the genus *Coffea* and perspectives for breeding. **Genome**, v. 51, n. 1, p. 50-63, 2008.

DAMATTA, F.; RAMALHO, J. Impacts of drought and temperature stress on coffee physiology and production: a review. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v. 18, n. 1, p. 55-81, jan./mar. 2006

DAVEY, J. W. et al. Genome-wide genetic marker discovery and genotyping using next-generation sequencing. **Nature Reviews Genetics**, v. 12, n. 7, p. 499-510, 2011.

DAVIS, A. P. et al. 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**, London, v. 167, n. 4, p. 357-377, dez. 2011.

DENOEUDE, F. et al. The coffee genome provides insight into the convergent evolution of caffeine biosynthesis. **Science**, New York, v. 345, n. 6201, p. 1181-1184, 2014.

DUSSERT, D. et al. Le caféier, *Coffea canephora*. In: HAMON, P. et al. (Ed.). **Diversité génétique des plantes tropicales cultivées**. Montpellier: Cirad, p. 175-194, 1999.

ELSHIRE, R. J., et al. (2011). A Robust, Simple Genotyping-by-Sequencing (GBS) Approach for High Diversity Species. (L. Orban, Ed.) **PloS one**, 6(5), e19379. **Public Library of Science**. doi:10.1371/journal.pone.0019379 Acesso em: 20 jan 2022.

ESPINDULA, M. C. et al. Vantagens do uso de clones no cultivo de cafeeiros canéfora (Conilon e Robusta). Porto Velho, RO: **Embrapa Rondônia**, 2011.

Fan, J.-B., et al. Highly Parallel SNP Genotyping. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, 68(1), 69-78. doi:10.1101/sqb.2003.68.69 Acesso em: 20 jan 2022.

FAZUOLI, L. C. et al. Cultivares de café arábica do IAC: um patrimônio da cafeicultura brasileira. **O Agrônomo**, Campinas, v. 59, n. 1, p. 12-15, 2007.

FAZUOLI, L. C. et al. Seleção antecipada e sua eficiência no café Icatu. In: **I Simpósio De Pesquisa Dos Cafés Do Brasil**. 2000, Poços de Caldas. p.576-584.

FAZUOLI, L. C. Genética e melhoramento do cafeeiro. In: RENA, A. B. et al. (Ed.). **Cultura do cafeeiro: fatores que afetam a produtividade**. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, 1986. p. 87-113.

FERRÃO, R. G. et al. 'DIAMANTE ES 8112', 'ES 8122 – JEQUITIBÁ' e 'CENTENÁRIA ES 8132': novas cultivares clonais de café conilon com qualidade de bebida para o espírito santo. In: IX SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 2015, Curitiba. **Anais [...]**. Curitiba: SPCB 9, 2015.

FERRÃO, R. G., DE MUNER, L. H., da FONSECA, A. F. A., & Ferrão, M. A. G. **Café Conilon**. Vitória, ES: Incaper, p. 786, 2017

FERRÃO, R. G., et al. "Marilândia ES 8143, cultivar clonal de café Conilon tolerante à seca para p Estado do Espírito Santo." **X Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil**. 2019.

Ferreira, M., & Grattapaglia, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética (Documentos., p. 220p). **EMBRAPA-CENARGEN**. 1998.

FONSECA, A. F. A. et al Composição química de café conilon (*Coffea canephora*). **VII Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil**, 2011.

FREIRE L. P., et al. Análise da expressão do gene da manose 6 fosfato redutase em cafeeiros submetidos ao déficit hídrico no campo. **Coffee Science** v.8, n.1, p 17–23 2013.

FREITAS, A. S.; PINTO, H.B. Sequenciamento NGS: Status e Perspectivas. **BIOINFO - Revista Brasileira de Bioinformática e Biologia Computacional**, Jul, 2021. DOI: 10.51780/978-6-599-275326-0 Acesso em 21 jan 2022.

GARAVITO, A. et al. Identification by the DArTseq method of the genetic origin of the *Coffea canephora* cultivated in Vietnam and Mexico. **BMC Plant Biology**, v. 16, p. 242-254, 2016.

GEHRIG, H. H.; RÖSICKER, H.; KLUGE, M. Detection of DNA polymorphisms in the genus *Kalanchoë* by RAPD-PCR fingerprint and its relationships to infrageneric taxonomic position and ecophysiological photosynthetic behaviour of the species. **Plant Science**, Berlin, v. 125, n. 1, p. 41-45, jun 1997.

GOMEZ, C., et al. "Current genetic differentiation of *Coffea canephora* Pierre ex A. Froehn in the Guineo-Congolian African zone: cumulative impact of ancient climatic changes and recent human activities." **BMC evolutionary biology** 9.1: p. 1-19. 2009.

HUANG, X., et al. "High-throughput genotyping by whole-genome resequencing." **Genome research** 19.6 p.1068-1076. 2009.

HYTEN, D. L., et al. "Bulked segregant analysis using the GoldenGate assay to locate the Rpp3 locus that confers resistance to soybean rust in soybean." **Crop Science** 49.1, p. 265-271. 2009

ICO – International Coffee Organization. Disponível em: <<http://www.ico.org/>>. Acesso em: 5 fev. 2023.

ICO – International Coffee Organization - Relatório sobre o Mercado de Café (2022/23) (ico.org). Disponível em: <<https://www.ico.org/pt/Market-Report-22-23-p.asp/>>. Acesso em: 5 fev. 2023.

KUMAR, L. S. DNA markers in plant improvement: an overview. **Biotechnology Advances**, New Delphi, v. 17, n. 2-/3, p. 143-182, set. 1999.

LAMBOT, C. et al. Evaluation of Conilons for genetic diversity, cup quality and biochemical composition. In: **International conference on Coffee Science**, 22., 2008, Switzerland. Anais...Switzerland: ASIC, 2008, p. 14-19.

LEMOS, S. M. C. et al. Genome-wide screening and characterization of non-coding RNAs in *Coffea canephora*. **Non-coding RNA**, v. 6, n. 3, 2020.

LEROY, T. et al. Genetics of coffee quality. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v. 18, n. 1, p. 229-242, jan./mar. 2006.

LI, C. et al. Genome sequencing and assembly by long reads in plants. **Genes**, v. 9, n. 1, 2018.

LIMA, A. A. et al. In silico characterization of putative members of the coffee (*Coffea arabica*) ethylene signaling pathway. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 10, n. 2, p. 1277-1289, Jun 2011.

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br> Acesso em 7 de fev. 2023.

MARRACCINI, P., et al. "RBCS1 expression in coffee: *Coffea* orthologs, *Coffea arabica* homeologs, and expression variability between genotypes and under drought stress." **BMC Plant Biology** 11 p. 1-24, 2011

MEROT-L'ANTHOENE, V. et al. "Development and evaluation of a genome-wide Coffee 8.5 K SNP array and its application for high-density genetic mapping and for investigating the origin of *Coffea arabica* L." **Plant biotechnology journal** 17.7 p. 1418-1430, 2019

MONDEGO, J. M. C. et al. An EST-based analysis identifies new genes and reveals distinctive gene expression features of *Coffea arabica* and *Coffea canephora*. **BMC Plant Biology**, v. 11, 2011.

MONTAGNON, Christophe. **Optimisation des gains génétiques dans le schéma de sélection récurrente réciproque de *Coffea canephora* Pierre**. 2000. 42 p. Tese doutorado Montpellier University 2000.

MONTAGNON, C.; LEROY, T.; YAPO, A. Diversité génotypique et phénotypique de quelques groupes de caféiers (*Coffea canephora* Pierre) en collection. Conséquences sur leur utilisation en sélection. **Café, Cacao,Thé**, v. 36, n. 3, p. 187-198, 1992.

MUSOLI, P. et al. Genetic differentiation of wild and cultivated populations: diversity of *Coffea canephora* Pierre in Uganda. **Genome**, v. 52, n. 7, p. 634-646, 2009.

POLAND J.A, RIFE T.W. Genotyping-by-sequencing for plant breeding and genetics. **The plant genome**. Nov;5(3). 2012

RAFALSKI, J. A. Novel genetic mapping tools in plants: SNPs and LD-based approaches. **Plant Science**, Shannon, v. 162, n. 3, p. 329-333, mar. 2002.

RESENDE, M. D. V. et al. Genomic selection for growth and wood quality in Eucalyptus: capturing the missing heritability and accelerating breeding for complex traits in forest trees. **New Phytologist**, v. 194, n. 1, p. 116-128, 2012.

RUSSELL, A. et al. Phylogenetics and cytology of a pantropical orchid genus *Polystachya* (*Polystachyinae*, *Vandaeae*, *Orchidaceae*): evidence from plastid DNA sequence data. **Taxon**, v. 59, n. 2, p. 389-404, 2010

SANTOS, Amauri da Silva. **Marcadores de DNA no melhoramento genético do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) visando resistência à *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli***. 2000. 140 p. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) Campos dos Goytacazes - Universidade Estadual do Norte Fluminense, 2000.

SANTOS, R. C. et al. Assesment of genetic diversity on a sample of cocoa accessions resistant to witches' broom disease based on RAPD and pedigree data. **Bragantia**, Campinas, v. 64, n. 3, p. 361-368, jun. 2005.

SOUSA, T. V. et al. "Population structure and genetic diversity of coffee progenies derived from Catuaí and Híbrido de Timor revealed by genome-wide SNP marker." **Tree genetics & genomes** 13 (2017): 1-16.

TEIXEIRA A.L, et al. Robustas Amazônicas: novas cultivares híbridas de café canéfora para a amazônia ocidental. **Anais [...]**. In: X Simpósio De Pesquisa Dos Cafés Do Brasil, 2019, Vitória.

THERMOFISHER - <https://www.thermofisher.com/> (2002). Acesso em 12 jan 2023.

TOBLER, A. R., et al. "The SNPlex genotyping system: a flexible and scalable platform for SNP genotyping." **Journal of biomolecular techniques: JBT** 16.4 (2005): 398.

TOLESSA, K., et al. "Biochemical composition of Ethiopian coffees (*Coffea arabica* L.) as influenced by variety and postharvest processing methods." **African Journal of Food Science** 13.2 (2019): 48-56.

TSO, H. H., et al. "Protocol: rhPCR and SNaPshot assays to distinguish *Plasmodiophora brassicae* pathotype clusters." **Plant Methods** 18.1 (2022): 1-17.

VIDAL, R. O. et al. A high-throughput data mining of single nucleotide polymorphisms in *Coffea* species expressed sequence tags suggests differential homeologous gene expression in the allotetraploid *Coffea arabica*. **Plant Physiology**, v. 154, n. 3, p. 1053-1066, 2010.

VIEIRA, L. G. E. et al. Brazilian coffee genome project: an EST-based genomic resource. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v. 18, n. 1, p. 95-108, jan/mar. 2006.

VIGNAL, A. et al. "A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics." **Genetics selection evolution** 34.3 (2002): 275-305.

WORLD COFFEE RESEARCH. Disponível em:
<<https://worldcoffeeresearch.org/work/cofea-arabica-genome/>>. Acesso em 10 nov. 2022.

ANEXO A – INFORMAÇÕES SOBRE OS AMPLICONS

- *Primer P00.*

Amplification summary: Primers from AX-168299000.pcr
segunda-feira, 23 de maio de 2022 16:00

		
Upper Primer:	24-mer	5' TTTTGGCATTACATTGAGAAGACT 3'
Lower Primer:	24-mer	5' AAAAAGAATCATATAACGCAAATC 3'
DNA 250 pM, Salt 50 mM	Upper Primer	Lower Primer
Primer Tm	51.9 °C	49.1 °C
Primer Overall Stability	-41.5 kcal/mol	-41.4 kcal/mol
Primer Location	216..239	769..746
Product Tm - Primer Tm	23.7 °C	
Primers Tm Difference	2.8 °C	
Optimal Annealing Temperature	50.7 °C	
Product Length	554 bp	
Product Tm (%GC Method)	72.7 °C	
Product GC Content	34.3%	
Product Tm at 6xSSC	94.3 °C	

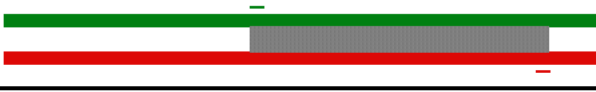
- *Primer P15.*

Amplification summary: Primers from AX-168357315.pcr
segunda-feira, 23 de maio de 2022 15:56

		
Upper Primer:	23-mer	5' TTCCCTAGTAGCATTCAAAAAG 3'
Lower Primer:	22-mer	5' TTCCCAGAGTCATAAAATAACG 3'
DNA 250 pM, Salt 50 mM	Upper Primer	Lower Primer
Primer Tm	47.6 °C	48.4 °C
Primer Overall Stability	-39.4 kcal/mol	-38.6 kcal/mol
Primer Location	209..231	651..630
Product Tm - Primer Tm	24.6 °C	
Primers Tm Difference	0.8 °C	
Optimal Annealing Temperature	49.9 °C	
Product Length	443 bp	
Product Tm (%GC Method)	72.2 °C	
Product GC Content	33.6%	
Product Tm at 6xSSC	93.8 °C	

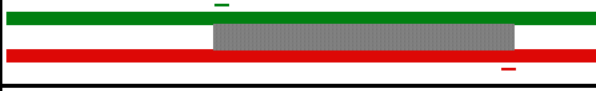
- *Primer P29.*

Amplification summary: Primers from AX-168355029.pcr
segunda-feira, 23 de maio de 2022 16:01

		
Upper Primer:	19-mer	5' GATTTCCAGCTGCGTTCTT 3'
Lower Primer:	21-mer	5' GCAGCCTCAAATCCGTCTATG 3'
DNA 250 pM, Salt 50 mM	Upper Primer	Lower Primer
Primer Tm	49.4 °C	53.9 °C
Primer Overall Stability	-36.7 kc/m	-40.3 kc/m
Primer Location	417..435	918..898
Product Tm - Primer Tm	23.8 °C	
Primers Tm Difference	4.5 °C	
Optimal Annealing Temperature	51.2 °C	
Product Length	502 bp	
Product Tm (%GC Method)	73.3 °C	
Product GC Content	35.9%	
Product Tm at 6xSSC	94.9 °C	

- *Primer 39.*

Amplification summary: Primers from AX-168353739.pcr
segunda-feira, 23 de maio de 2022 15:54

		
Upper Primer:	19-mer	5' CAAGGCAAATGAAGAACTC 3'
Lower Primer:	21-mer	5' GTGGAAAAATGGGCTGTGGAT 3'
DNA 250 pM, Salt 50 mM	Upper Primer	Lower Primer
Primer Tm	44.5 °C	55.2 °C
Primer Overall Stability	-33.9 kc/m	-41.1 kc/m
Primer Location	354..372	860..840
Product Tm - Primer Tm	31.8 °C	
Primers Tm Difference	10.7 °C	
Optimal Annealing Temperature	51.8 °C	
Product Length	507 bp	
Product Tm (%GC Method)	76.3 °C	
Product GC Content	43.2%	
Product Tm at 6xSSC	97.9 °C	

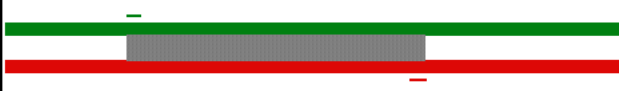
- *Primer P42*

Amplification summary: Primers from AX-168358942.pcr
segunda-feira, 23 de maio de 2022 16:02

		
Upper Primer:	20-mer	5' TTTTGAAGGCCATAGGAAT 3'
Lower Primer:	19-mer	5' TGTATAGCACGCCAACCA 3'
DNA 250 pM, Salt 50 mM	Upper Primer	Lower Primer
Primer Tm	48.4 °C	49.9 °C
Primer Overall Stability	-37.9 kc/m	-36.5 kc/m
Primer Location	87..106	698..680
Product Tm - Primer Tm	25.6 °C	
Primers Tm Difference	1.5 °C	
Optimal Annealing Temperature	51.4 °C	
Product Length	612 bp	
Product Tm (%GC Method)	74.0 °C	
Product GC Content	37.1%	
Product Tm at 6xSSC	95.6 °C	

- *Primer P77*

Amplification summary: Primers from AX-168301877.pcr
segunda-feira, 23 de maio de 2022 15:57

		
Upper Primer:	20-mer	5' CAGACTGCCACTCATTGTAT 3'
Lower Primer:	24-mer	5' ATTGTTGGCACTGCTCCTTTATTA 3'
DNA 250 pM, Salt 50 mM	Upper Primer	Lower Primer
Primer Tm	44.5 °C	54.1 °C
Primer Overall Stability	-33.5 kc/m	-43.6 kc/m
Primer Location	199..218	682..659
Product Tm - Primer Tm	30.0 °C	
Primers Tm Difference	9.5 °C	
Optimal Annealing Temperature	50.6 °C	
Product Length	484 bp	
Product Tm (%GC Method)	74.5 °C	
Product GC Content	39.0%	
Product Tm at 6xSSC	96.1 °C	

- *Primer P14.*

Amplification summary: Primers from AX-168358614.pcr
segunda-feira, 23 de maio de 2022 16:01

		
Upper Primer:	22-mer	5' CGGCTTGCAAATTTCTGTTCTC 3'
Lower Primer:	22-mer	5' GTCGGTGGGGTGTGTAATGTC 3'
DNA 250 pM, Salt 50 mM	Upper Primer	Lower Primer
Primer Tm	55.6 °C	55.4 °C
Primer Overall Stability	-42.6 kcal/mol	-41.0 kcal/mol
Primer Location	41..62	716..695
Product Tm - Primer Tm	20.6 °C	
Primers Tm Difference	0.2 °C	
Optimal Annealing Temperature	55.0 °C	
Product Length	676 bp	
Product Tm (%GC Method)	76.1 °C	
Product GC Content	41.9%	
Product Tm at 6xSSC	97.7 °C	

- *Primer P32.*

Amplification summary: Primers from AX-168342832.pcr
segunda-feira, 23 de maio de 2022 15:59

		
Upper Primer:	24-mer	5' TAATTCATCCTCCCTCCATCTCTG 3'
Lower Primer:	21-mer	5' AGGCCTACCCATCAAGCAACA 3'
DNA 250 pM, Salt 50 mM	Upper Primer	Lower Primer
Primer Tm	55.3 °C	56.0 °C
Primer Overall Stability	-43.0 kcal/mol	-41.5 kcal/mol
Primer Location	216..239	771..751
Product Tm - Primer Tm	19.9 °C	
Primers Tm Difference	0.7 °C	
Optimal Annealing Temperature	54.3 °C	
Product Length	556 bp	
Product Tm (%GC Method)	75.2 °C	
Product GC Content	40.3%	
Product Tm at 6xSSC	96.8 °C	

- *Primer P36.*

Amplification summary: Primers from AX-168309736.pcr
segunda-feira, 23 de maio de 2022 15:56

		
Upper Primer: 22-mer 5' GGGGAATGACCAGGAAAATGAT 3' Lower Primer: 20-mer 5' GGAGGCCGGTCGAAGTAAAT 3'		
DNA 250 pM, Salt 50 mM	Upper Primer	Lower Primer
Primer Tm	55.6 °C	54.6 °C
Primer Overall Stability	-42.4 kcal/mol	-41.2 kcal/mol
Primer Location	75..96	820..801
Product Tm - Primer Tm	21.1 °C	
Primers Tm Difference	0.9 °C	
Optimal Annealing Temperature	54.5 °C	
Product Length	746 bp	
Product Tm (%GC Method)	75.7 °C	
Product GC Content	40.8%	
Product Tm at 6xSSC	97.3 °C	

- *Primer P83.*

Amplification summary: Primers from AX-168341083.pcr
segunda-feira, 23 de maio de 2022 15:58

		
Upper Primer: 21-mer 5' GGCTGGAGGGGCAAATCATCT 3' Lower Primer: 21-mer 5' CAGGGCCCAACTACGCTTCA 3'		
DNA 250 pM, Salt 50 mM	Upper Primer	Lower Primer
Primer Tm	58.9 °C	58.7 °C
Primer Overall Stability	-43.6 kcal/mol	-43.6 kcal/mol
Primer Location	248..268	908..888
Product Tm - Primer Tm	16.9 °C	
Primers Tm Difference	0.1 °C	
Optimal Annealing Temperature	55.7 °C	
Product Length	661 bp	
Product Tm (%GC Method)	75.6 °C	
Product GC Content	40.8%	
Product Tm at 6xSSC	97.2 °C	