

LAURA MARITZA SAAVEDRA TOBAR

**PIRAMIDAÇÃO DE ALELOS DE RESISTÊNCIA A PATÓGENOS EM CAFEEIROS
ARÁBICA UTILIZANDO SELEÇÃO RECORRENTE ASSISTIDA POR MARCADORES
MOLECULARES**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do Programa de Pós-
Graduação em Fitotecnia para obtenção do título de
Doctor Scientiae.

VIÇOSA
MINAS GERAIS- BRASIL
2019

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

S112p
2019

Saavedra Tobar, Laura Maritza, 1984-

Piramidação de alelos de resistência a patógenos em
cafeeiros arábica utilizando seleção recorrente assistida por
marcadores moleculares / Laura Maritza Saavedra Tobar. –
Viçosa, MG, 2019.

x, 58 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Aluizio Borém de Oliveira.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 51-58.

1. Café - Melhoramento genético. 2. Café -Seleção.
3. Marcadores moleculares. 4. *Coffea arabica* - Doenças e
pragas. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Fitotecnia. Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia. II. Título.

CDD 22. ed. 633.732

LAURA MARITZA SAAVEDRA TOBAR

**PIRAMIDAÇÃO DE ALELOS DE RESISTÊNCIA A PATÓGENOS
EM CAFEEIROS ARÁBICA UTILIZANDO SELEÇÃO
RECORRENTE ASSISTIDA POR MARCADORES MOLECULARES**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do Programa de Pós-
Graduação em Fitotecnia para obtenção do título de
Doctor Scientiae

APROVADA: 22 de abril de 2019.



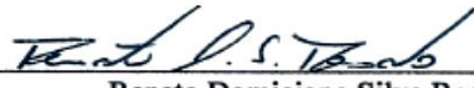
Eveline Teixeira Caixeta
(Coorientadora)



Antonio Carlos Baião de Oliveira



Jose Eustaquio de Souza Carneiro



Renato Domiciano Silva Rosado



Aluizio Borém de Oliveira
(Orientador)

*Dedico a Deus que sempre está do meu lado
Abençoando meu caminho. E a Meu lindo Anjo
com todo meu amor. ;Você é a luz divina que
Deus colocou no céu para iluminar nossa
Vida! Te amo e você sempre estará
em minha mente e em meu coração.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por sempre me acompanhar ao longo da minha vida, sendo minha luz e fortaleza em todo momento; por ter me dado uma vida cheia de aprendizagem e experiências que tem enriquecido meu existir. Sem Deus na minha vida nada disto teria sentido.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia. Obrigada pela oportunidade de realizar meu doutorado em tão prestigiosa universidade que se destaca não só pela sua excelência no ensino, mas também pela sua beleza.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior CAPES pela concessão de bolsa de estudo.

Agradeço a professora Eveline Teixeira Caixeta por ter me dado a oportunidade de fazer parte da sua equipe de trabalho, pela ajuda, paciência e ensinamentos ao longo destes anos.

Agradeço ao professor Borém pela confiança, os ensinamentos, o apoio e disposição para me ajudar no transcurso destes anos.

Aos professores Moysés Nascimento e Cosme Damião Cruz pelos conhecimentos e sugestões.

Ao Drs. Antônio Carlos Baião de Oliveira, Jose Eustáquio de Souza e Renato Domiciano Silva Rosado, por participar da minha banca de defesa de tese e por compartilharem seus conhecimentos.

Aos meus queridos pais, Rosa e José, pelo amor, as palavras de fortaleza que sempre me deram, pelo apoio e os ensinamentos dados ao longo da minha vida.

As minhas irmãs Viviana e Camila e meus sobrinhos Valentina e Mateo. Só escutar a voz de vocês meu coração sempre enche de alegria, vocês são sempre minha motivação. Amo vocês!

A família BioCafé pelo ótimo ambiente de trabalho, pela amizade e os bons momentos compartilhados. Em especial agradeço a Fran, Ruane e Dênia por dedicarem parte do seu tempo para me ajudar.

A Cleves pela ajuda, o apoio incondicional e todos os bons momentos vividos ao longo destes anos. Muito obrigada!!

Agradeço a Yurani, pela ajudada, seu bom trabalho e pela confiança e tranquilidade que sempre me fez sentir.

Aos amigos que a UFV me proporcionou ao longo deste tempo, em especial a Julia, Juan, Brenda, Tatiana, Eliana, Francisco, Adriana, Juliana, Edil, Cecilia...

BIOGRAFIA

Laura Maritza Saavedra Tobar, filha de José Domingo Saavedra e Rosa Evelia Tobar, nasceu no dia 22 de julho de 1984 em Bogotá D.C. Colômbia.

Em março de 2010, diplomou-se como Engenheira Agrônoma na Universidade de Cundinamarca, Fusagasugá, Colômbia.

Em março de 2012 iniciou o curso de mestrado no programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, área de concentração Melhoramento de Plantas, Recursos Genéticos e Biotecnologia na Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa-MG, sob orientação do Prof. Moacil Alves de Souza. Em dezembro de 2013 obteve o título de *Magister Scientiae*.

Em agosto de 2014, iniciou o curso de doutorado no Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, área de concentração Melhoramento de Plantas, Recursos Genéticos e Biotecnologia, na Universidade Federal de Viçosa (UFV), sob orientação do Dr. Aluizio Borém e coorientação da Dra. Eveline Teixeira Caixeta, pesquisadora da Embrapa Café, submetendo-se a defesa de tese em abril de 2019.

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Coffea arabica: origem e importância socioeconômica	3
2.2. Melhoramento genético de <i>Coffea arabica</i>	4
2.2.1. Melhoramento genético de <i>Coffea arabica</i> visando resistência a <i>Hemileia vastatrix</i> e a <i>Colletotrichum kahawae</i>	4
2.3. Marcadores Moleculares	7
2.4. Seleção assistida por marcador molecular	9
2.5. Seleção recorrente no melhoramento de plantas	11
3. OBJETIVOS	14
3.1. Objetivo Geral	14
3.2. Objetivos Específicos	14
4. MATERIAL E MÉTODOS	15
4.1. Material Genético	15
4.2. Avaliações Moleculares	19
4.2.1. Certificação de Cruzamentos e Análises de Diversidade Genética	19
4.2.2. Seleção assistida com marcadores moleculares (SAM)	21
4.3. Avaliações fenotípicas	26
4.3.1 Estimativas de parâmetros genéticos a partir dos dados fenotípicos	27
4.3.2 Índice de seleção	28
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
5.1. Certificação de cruzamentos	28
5.2. Diversidade genética	31
5.3. Seleção assistida por marcadores moleculares.	35
5.3.1. Seleção assistida para o gene <i>S_{H3}</i> que confere resistência a <i>H. vastatrix</i>	35
5.3.2. Seleção assistida para QTL de resistência as raças I, II e patótipo 001 de <i>H. vastatrix</i> usando marcadores SCAR, CAP e SSR	37
5.3.3. Seleção assistida para o gene <i>Ck-1</i> que confere resistência a <i>C. kahawae</i>	40
5.4. Estimativas de parâmetros genéticos a partir dos dados fenotípicos	42
5.4.1. Índice de seleção	43

6. CONCLUSÕES.....	50
7. BIBLIOGRAFIA.....	51

RESUMO

SAAVEDRA, Laura Maritza, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, abril de 2019. **Piramidação de alelos de resistência a patógenos em cafeeiros arábica utilizando seleção recorrente assistida por marcadores moleculares.** Orientador: Aluizio Borém de Oliveira. Coorientadores: Eveline Teixeira Caixeta e Laércio Zambolim.

A piramidação de alelos de resistência a doenças é a estratégia mais eficiente, de amplo espectro e durável para implementar no melhoramento genético do cafeeiro (*Coffea arabica*). Uma vez que esta cultura é acometida por doenças que apresentam alta variabilidade genética associada a suplantação da resistência. Nesse contexto, na incorporação de alelos de resistência a doenças em cultivares em desenvolvimento a seleção assistida por marcador molecular (SAM) é amplamente eficiente. Com o uso da SAM é possível anular o efeito do ambiente, eliminar genótipos indesejáveis nas primeiras gerações de seleção, além de permitir a seleção na ausência do patógeno. Assim o objetivo deste trabalho foi piramidar alelos de resistência as principais doenças do cafeeiro (ferrugem alaranjada - *Hemileia vastatrix* e antracnose dos frutos (CBD) - *Colletotrichum kahawae*) por meio da seleção recorrente assistida por marcadores moleculares. Para tanto, foram extraídos DNAs de 144 híbridos F₁ originados de cruzamentos entre oito genitores (cultivares comerciais e acessos do programa de melhoramento genético do cafeeiro). Realizou-se a certificação dos respectivos cruzamentos e estudo de diversidade genética utilizando marcadores moleculares microssatélites distribuídos aleatoriamente no genoma. Para resistência a ferrugem, foram usados quatro marcadores associados ao gene *SH3* e quatro marcadores ligados a dois QTL que correspondem a genes maiores de resistência as raças I, II e patótipo 001. Além, de dois marcadores que se encontram flanqueando o gene *Ck-1* de resistência CBD. Também, baseado em dados fenotípicos foi calculado o índice de seleção por meio do *rank*-médio de Mulamba e Mock (1978) e após a classificação foram estimados os ganhos com a seleção. Na certificação de cruzamentos foram identificados 10 híbridos contaminantes que foram retirados do programa de melhoramento. No estudo da diversidade genética, a AMOVA determinou diversidade entre e dentro das populações, sendo de 75,5 e 24,5% respectivamente. Na análise de agrupamento observou-se a formação de três grupos principais, permitindo evidenciar a diversidade entre e dentro das populações híbridas. 31 indivíduos (25,6%) foram identificados como heterozigotos portadores do alelo do gene *SH3*, 106 indivíduos (87%) como portadores dos locos de resistência as raças I, II e patótipo 001 de *H. vastatrix* e 70 indivíduos (57,8%) apresentaram o gene *Ck-1* que confere a resistência a *C. kahawae*. Foram identificados 11 cafeeiros com a piramidação dos genes

de resistência a *H. vastatrix* e *C kahawae*. Enquanto ao ganho com a seleção, este foi superior a 50%, exercendo uma intensidade de seleção de 30%. Alguns dos indivíduos selecionados pelo índice de seleção encontram-se também, distribuídos nos três diferentes grupos que foram formados no dendrograma da análise de diversidade. Portanto, estes híbridos ressaltam pela sua superioridade com o ganho com a seleção, por apresentar divergência genética e ainda possuir a piramidação de alelos de resistência a *H. vastatrix* e *C kahawae*. Esse resultado é de grande importância, pois esses híbridos constituem um importante recurso genético para dar início ao programa de seleção recorrente já que poderão ser utilizados como fonte de resistência em diferentes cruzamentos por ter a piramidação de genes.

ABSTRACT

SAAVEDRA, Laura Maritza, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, April, 2019. **Piramidation of alleles of resistance to pathogens in Arabica Coffee using recurrent selection assisted by molecular markers.** Advisor: Aluizio Borém de Oliveira. Co-advisors: Eveline Teixeira Caixeta and Laércio Zambolim

The pyramiding of disease resistance alleles is the most efficient, broad - spectrum and durable strategy to implement in coffee breeding (*Coffea arabica*). Since this culture is affected by diseases that present high genetic variability associated with the supplanting of the resistance. In this context, molecular marker assisted selection (SAM) is widely efficient in the incorporation of disease resistance alleles into developing cultivars. With the use of SAM, it is possible to eliminate the effect of the environment, undesirables genotypes in the first generations of selection, and allow selection in the absence of the pathogen. Thus, the objective of this work was to identify resistance alleles to the main diseases of coffee (rust - *Hemileia vastatrix* and fruit anthracnose (CBD) - *Colletotrichum kahawae*) through recurrent selection assisted by molecular markers. For this, DNAs were extracted from 144 F1 hybrids originating from crosses between eight parents (commercial cultivars or accessions of the coffee breeding program). A certification of crosses and genetic diversity study was performed using microsatellite markers randomly distributed in the genome. For resistance to rust, four markers associated with the *S_{H3}* gene and four markers linked to two QTLs corresponding to major resistance genes I, II and pathotype 001 were used. In addition, two markers flanking the *Ck-1* gene of resistance CBD. Also, based on phenotypic data, the selection index was calculated through the mean rank of Mulamba and Mock (1978) and after the classification were estimated the gains with the selection. In the certification of crosses were identified 10 hybrids contaminants that were removed from the breeding program. In the study of genetic diversity, AMOVA determined diversity among and within populations, being 75.5 and 24.5% respectively. In the cluster analysis the formation of three main groups was observed, allowing to show the diversity among and within the hybrid populations. 31 individuals (25.6%) were identified as heterozygous carriers of the *S_{H3}* gene allele, 106 individuals (87%) as carriers of the resistance loci of the *H. vastatrix* I, II and 001 pathotype breeds and 70 individuals (57.8%) showed the *Ck-1* gene conferring resistance to *C. kahawae*. Eleven coffee trees were identified with the pyramiding of resistance genes to *H. vastatrix* and *C. kahawae*. While to the gain with the selection, this was superior to 50%, exerting an intensity of selection of 30%. Some of the individuals selected by the selection index are also distributed in the three different groups that were formed in the diversity analysis dendrogram. Therefore, these hybrids stand out for their

superiority with the gain with the selection, because they present genetic divergence and also possess the pyramiding of resistance genes to *H. vastatrix* and *C. kahawae*. This result is of great importance because these hybrids constitute an important genetic resource to initiate the recurrent selection program since they can be used as a source of resistance in different crosses by having the gene pyramiding.

1. INTRODUÇÃO

O café arábica (*Coffea arabica* L.) tem grande importância na economia mundial por ser uma das commodities agrícolas mais comercializadas no mercado internacional. Essa importância tem levado a investimentos em tempo e recursos para obtenção de cultivares melhoradas em diferentes programas de melhoramento, visando explorar ao máximo o potencial genético do cafeeiro. No entanto, estes programas enfrentam limitações que dificultam a seleção de plantas, como a baixa diversidade genética associada à autogamia, origem e domesticação desta espécie (DONINI *et al.*, 2007; GELETA *et al.*, 2012; HERRERA *et al.*, 2002; LASHERMES *et al.*, 2000; LASHERMES *et al.*, 1999; LASHERMES *et al.*, 2016). Além disso, diferentes doenças acometem as lavouras, sendo *Hemileia vastatrix* causador da ferrugem alaranjada e *Colletotrichum kahawae* agente causal da antracnose dos frutos (*Coffee Berry Disease* – CBD), as principais doenças que ocasionam redução na sua produção e aumenta em mais de 30% os custos da lavoura devido ao controle químico, (NYRO & SPREY, 1986; GICHURU, 2008). Vale ressaltar que a CBD, apesar de não estar presente na América Latina e na Ásia, sua introdução nestas regiões constitui-se em um grande risco para a cafeicultura mundial. Por isso, o manejo preventivo mediante o uso de cultivares resistentes permite desde agora o acúmulo destes genes na ausência do patógeno.

Entre outras limitações que dificulta a seleção, somasse-se o fato do cafeeiro ser uma espécie perene e de ciclo longo, portando o desenvolvimento de cultivares melhoradas pode levar de 25 a 30 anos (SANTOS e ZANETTINI, 2002; MORENO 2004).

Diante destas limitações, o uso da seleção assistida por marcador molecular (SAM) apresenta-se como uma alternativa que associada ao método de seleção recorrente, permite o aumento da frequência de alelos favoráveis e a piramidação de genes de interesse em uma cultivar. A SAM pode potencializar a eficiência dos programas de melhoramento, agilizando e reduzindo o número de gerações, facilitando o rápido progresso genético e aumentando a eficiência da seleção, visto que as avaliações podem ser realizadas em estádios iniciais da planta (LASHERMES, P. *et al.*, 1996; OROZCO-CASTILLO *et al.*, 1994)

A SAM é realizada de forma indireta, com marcadores que estão ligados às características de interesse, permitindo a escolha de indivíduos superiores com base no genótipo. Diferentes trabalhos foram conduzidos com o objetivo de desenvolver marcadores moleculares ligados a genes de resistência em *C. arabica* (ALMEIDA., 2019; DE BRITO *et al.*, 2010; MAHÉ *et al.*, 2008;

PESTANA *et al.*, 2015; PRAKASH *et al.*, 2004). Assim, atualmente, existem eficientes marcadores moleculares (BA-48-21-f, Sat244, BA-124-12K-f e Sp-M16- S_{H3}) ligados ao gene S_{H3} que confere resistência durável à ferrugem do cafeeiro (MAHÉ *et al.*, 2008), marcadores associados a QTL localizados nos grupos de ligação 2 e 5 do mapa genético (SSR16, CaRHv8, CaRHv9 e CaRHv10-CAP) que conferiram resistência à raça I, raça II, e patotipo 001 de *H. vastatrix* (ALMEIDA., 2019) e marcadores ligados ao o gene *Ck-1* (CBD-Sat235 e CBD-Sat207) que confere resistência à CBD.

A seleção recorrente assistida por marcador molecular (MARS) tem sido implementada nos programas de melhoramento de milho, permitindo acelerar os processos de seleção, incrementando satisfatoriamente a frequência de alelos favoráveis nas populações a cada geração, sem redução da variabilidade genética. Abdulmalik *et al.* (2017) constataram que a associação da seleção recorrente com marcadores moleculares permite a otimização do monitoramento da variabilidade genética dentro e entre populações de milho, favorecendo a recombinação entre progênies mais divergentes (ABDULMALIK *et al.*, 2017; BANKOLE *et al.*, 2017; BEYENE; SEMAGN; MUGO; *et al.*, 2016).

Nesse contexto, a MARS pode ser implementada para assistir os programas de melhoramento de *C. arabica*, com potencial para acelerar e otimizar os processos de seleção de plantas com características agronômicas desejáveis e competitivas frente aos diferentes desafios que afronta a cafeicultura.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. *Coffea arabica*: origem e importância socioeconômica

O café é a segunda bebida mais consumida no mundo e um produto básico de grande importância na economia mundial, portanto, uma das commodities agrícolas mais comercializadas no mercado internacional. É plantado em mais de 70 países distribuídos entre América latina, África e Ásia, sendo importante fonte de emprego e ingressos de divisas. O Brasil é o maior produtor, seguido pelo Vietnã e pela Colômbia, além do maior exportador (International Coffee Organization, 2016).

Na sua classificação taxonômica, o café pertence à família Rubiaceae, subfamília Ixoroideae, tribo Coffea DC e gênero *Coffea* L. (DAVIS *et al.*, 2006). O gênero *Coffea* L. de acordo com Fazuoli (2006), tem 104 espécies. Sendo café arábica (*Coffea arabica* L.) e o café robusta (*Coffea canephora*), as espécies de maior importância econômica, com aproximadamente 70% e 30% do café negociado no mundo, respectivamente. As outras espécies também são de grande importância por serem utilizadas em programas de melhoramento em virtude das características agrônômicas que possuem (FAZUOLI, 2006).

C. arabica é a única espécie alotetraploide do gênero *Coffea*, que se originou de uma hibridação entre *C. canephora* e *C. eugenioides*; possui 44 cromossomos, sendo 11 seu número básico e apresenta a segregação genética típica de diploide para a maioria dos locos estudados. Essa espécie é autocompatível e autógama, ou seja, se reproduz predominantemente por autofecundação, que ocorre em aproximadamente 90% das flores (CUBRY *et al.*, 2008). Esta espécie é nativa do sudoeste da Etiópia, sudeste do Sudão e norte do Quênia (BRIDSON, 1982).

O cultivo expandiu-se na América do Sul e América Central com base em cultivares que tiveram as suas origens genéticas nas variedades Típica e Bourbon. Os Híbrido de Timor e Icatu, derivados do cruzamento de *C. arabica* com *C. canephora*, também contribuíram para a base genética dos cultivares modernos de café arábica plantadas atualmente (SETOTAW *et al.*, 2010). Vários estudos mostram que a diversidade genética do café arábica é baixa quando comparada ao café robusta, devido à sua estreita base genética associada à autogamia, origem e domesticação (DONINI *et al.*, 2007; GELETA *et al.*, 2012; HERRERA *et al.*, 2002; LASHERMES, P. *et al.*, 2000; LASHERMES, P *et al.*, 1999; LASHERMES, *et al.*, 2016; PALOMINO *et al.*, 2014).

Dessa forma, a cafeicultura brasileira tornou-se uma atividade de grande importância econômica no cenário agrícola do país. A área total plantada de café arábica e café robusta é de 2,23 milhões de hectares; desse total 1,78 milhões de hectares (79,9%), correspondem ao café arábica, tendo sua maior concentração em Minas Gerais com 1,20 milhões de hectares, equivalente a 67,8% da área ocupada em nível nacional (CONAB, 2017).

Basicamente, os cultivares utilizados de café arábica no Brasil são derivados das cultivares botânicas Típica e Bourbon, por meio de cruzamentos destas duas variedades entre si ou delas com híbridos interespecíficos, como o Híbrido de Timor e Icatu. Estes cultivares têm grande potencial de produção, além de excelente qualidade de bebida, característica de grande importância para sua comercialização nos mercados internacionais. No entanto, o café arábica é altamente susceptível a pragas e doenças, condição que repercute negativamente no manejo da cultura. (ZAMBOLIM, 2016).

2.2. Melhoria genética de *Coffea arabica*

Em geral, as estratégias implementadas pelos programas de melhoria do cafeeiro têm apresentado resultados ao longo dos anos, tanto na melhoria das características agrônomicas como na obtenção de variedades mais produtivas (MORAIS *et al.*, 2006). Porém, o tempo e recurso requerido para o desenvolvimento de novas variedades é uma das principais limitações destes programas sendo necessários aproximadamente 25 anos (MORENO, 2004), dado a natureza perene, ciclo longo, além da autogamia desta espécie. Além disso, a reduzida diversidade genética presente na maioria das cultivares (LASHERMES *et al.*, 1999; SETOTAW *et al.*, 2010) e a ocorrência de diferentes estresses bióticos e abióticos que repercutem significativamente no desenvolvimento da planta e na sua produção estão somados as limitações que o melhoria genética precisa ultrapassar.

2.2.1. Melhoria genética de *Coffea arabica* visando resistência a *Hemileia vastatrix* e a *Colletotrichum kahawae*.

Entre os estresses, as doenças têm sido consideradas como as principais limitantes que afetam o desenvolvimento do cafeeiro, portanto, os programas de melhoria genética disponibilizam grande parte de seus recursos e esforços no desenvolvimento de cultivares resistentes as principais doenças. A ferrugem alaranjada do cafeeiro, causada por *Hemileia vastatrix* e a antracnose dos

frutos (*Coffee Berry Disease* – CBD), por *Colletotrichum kahawae* ocasionam significativa redução na produção (DINIZ *et al.*, 2019; GICHURU *et al.*, 2008). O uso de fungicidas tem sido uma das principais medidas de controle, no entanto, esta prática de manejo aumenta consideravelmente os investimentos na lavoura, chegando a ser responsável por mais de 30% dos custos de produção, (GICHURU *et al.*, 2008; ZAMBOLIM, 2016). Esse custo resulta em considerável prejuízo na rentabilidade do produtor, além do risco de causar impacto ambiental e humano (GICHURU *et al.*, 2008).

Em todos os países produtores de café arábica, com exceção de Hawaí e Austrália, *Hemileia vastatrix* é o principal limitante na produção. Esta doença causa perdas em torno de um e dois bilhões de dólares anuais em todo o mundo (DER VOSSSEN, 2009). Os sinais da doença se apresentam como grandes massas de esporos alaranjadas na superfície inferior da folha, gerando a queda prematura destas e a posterior seca dos ramos produtivos antes da época de florescimento. Dessa forma, essa doença afeta o desenvolvimento dos frutos, ocasionando redução da produção e da vida útil da lavoura.

Colletotrichum kahawae está restrito ao continente africano onde é considerada, juntamente com *H. vastatrix*, uma das doenças mais limitantes e devastadoras que afeta significativamente a produção sustentável e econômica do café arábica (MOHAMMED, 2015). Esta doença corresponde a uma antracnose, no qual o patógeno ataca todos os estágios de desenvolvimento das plantas desde flores a frutos maduros e ocasionalmente as folhas (ALEMU *et al.*, 2016). Seu controle químico pode representar até 45% do custo anual de produção (DINIZ *et al.*, 2019; GICHURU *et al.*, 2008; TALHINHAS *et al.*, 2017) CBD é considerada a maior ameaça à produção de café arábica na África, levando a até 50-80% das perdas de safra, em anos de epidemias severas sem nenhuma medida de controle (DINIZ *et al.*, 2019).

O uso de cultivares resistentes é a estratégia mais eficiente e durável para se implementar no melhoramento genético do cafeeiro (MOHAMMED, 2015; SILVA *et al.*, 2018; TALHINHAS *et al.*, 2017). No entanto, o desenvolvimento de cultivares resistentes, principalmente a *H. vastatrix*, tem sido um grande desafio para os melhoristas de *C. arabica* devido, principalmente, ao surgimento de novas raças e conseqüentemente a suplantação da resistência. (CARVALHO *et al.*, 2011).

Em um programa de melhoramento visando a resistência a doenças é indispensável ter o conhecimento das raças fisiológicas do patógeno e os genes que condicionam a resistência as

diferentes raças; principalmente das que são predominantes na região onde se pretende introduzir determinado tipo de resistência (TALHINHAS *et al.*, 2017; VÁRZEA *et al.*, 2009). Até o momento, mais de 50 raças fisiológicas foram identificadas no mundo, principalmente no Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro (CIFC) em Oeiras, Portugal (RODRIGUES *et al.*, 2003; TALHINHAS *et al.*, 2017; ZAMBOLIM, 2016). A raça II (v5) é considerada a raça mais comum e difundida no mundo, adquirindo uma ocorrência generalizada, provavelmente como consequência do *background* uniforme da maioria das cultivares de *C. arabica* em todo o mundo (RODRIGUES *et al.*, 2003; VÁRZEA *et al.*, 2009; ZAMBOLIM, 2016).

A resistência à ferrugem, parece ser determinada por pelo menos nove genes de resistência dominantes, identificados como S_{H1} a S_{H9} , os quais encontram-se isoladamente ou em combinação nos diferentes genótipos. Seguindo a teoria gene-a-gene de Flor (RODRIGUES *et al.*, 2003; TALHINHAS *et al.*, 2017), os correspondentes genes de virulência de ferrugem são referidos como v1 a v9 (MAHÉ *et al.*, 2008; RODRIGUES; *et al.*, 2003). Os genes de resistência derivados de *C. arabica* S_{H1} , S_{H2} , S_{H4} e S_{H5} juntamente com o S_{H3} (derivado de *C. liberica*) estão correlacionados com os genes de virulência v1 a v5.

Além disso, os acessos de Híbrido de Timor (HDT), que correspondem a híbridos naturais entre *C. arabica* e *C. canephora*, apresentam resistência aos genes de virulência v6 a v9, esta resistência é atribuída aos genes derivados de *C. canephora*, (S_{H6} , S_{H7} , S_{H8} , S_{H9}) (MAHÉ *et al.*, 2008; PRAKASH *et al.*, 2004; RODRIGUES *et al.*, 2003). O Híbrido de Timor é um híbrido interespecífico natural identificado na Ilha do Timor em 1927. As progênes deste Híbrido têm sido usadas mundialmente como fonte de resistência a várias doenças, incluindo CBD, ferrugem do café e nematóides (GICHURU *et al.*, 2008), e atualmente este híbrido é o recurso genético mais utilizado como doador de resistência a ferrugem (SILVA *et al.*, 2018)

O CIFC começou, em 1960, um programa de melhoramento desenvolvendo cultivares de *C. arabica* resistentes a *H. vastatrix*. Nesse programa, o objetivo era transferir a resistência do HDT para cultivares melhoradas. Algumas destas plantas (F_1 e F_2) selecionadas contendo a resistência as raças conhecidas, foram disponibilizadas de forma livre para diferentes instituições de pesquisa nos diferentes países produtores de café. Os híbridos Caturra x HDT CIFC832/1 e Villa Sarchi x HDT CIFC832/2, gerados no CIFC, deram lugar às populações de catimor e Sarchimor respetivamente. Estas populações e outras desenvolvidas no Brasil (Catuaí x HDT CIFC2570) e na colômbia (Caturra x HDT CIFC1343) foram as fontes da maioria das variedades resistentes a

ferrugem (CASTRO *et al.*, 2013; VALENCIA *et al.*, 2017) obtidas até o momento. Estas populações combinam a resistência obtida do HDT com as boas características agrônômicas das variedades comerciais (RODRIGUES *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2018).

Para a resistência a CBD, (VAN DER VOSSSEN *et al.*, 1980), baseados em estudos de herança, identificaram um loco (denominado de T) para resistência à CBD no Híbrido de Timor. Posteriormente, AGWANDA *et al.* (1997) determinou que a resistência à CBD é controlada por pelo menos três genes, que estão nas variedades Rume Sudan (genes R e k), Híbrido de Timor e Catimor (gene T) e K7 (gene k). Mais recentemente, Gichuru *et al.* (2008) designaram *Ck-1* como o loco de resistência a CBD, onde eles sugerem que esse loco é semelhante ao loco T descrito por Van Der Vossen e Walyaro (1980).

Diante do exposto, observa-se a necessidade de nos programas de melhoramento do cafeeiro serem adotadas novas estratégias e tecnologias que permitam conhecer, explorar e aproveitar a identificação destes genes de resistência visando a obtenção de cultivares altamente produtivas e resistentes. Nesse contexto, os marcadores moleculares apresentam-se como uma promissora ferramenta para auxiliar programas de melhoramento genético. Os marcadores moleculares podem ser utilizados para analisar todo o genoma dos acessos e estudar a diversidade entre eles, bem como para identificar e monitorar os genes de resistência. Para a resistência, inicialmente são detectados marcadores associados aos genes e, então, são utilizados para seleção precoce de genótipos resistentes e, conseqüentemente, redução do tempo necessário para o desenvolvimento e manipulação de grandes populações (CAIXETA *et al.*, 2009).

2.3. Marcadores Moleculares

Os marcadores moleculares são uma ferramenta útil para detectar variações no genoma, aumentando o poder da análise genética, uma vez que não são afetados pelo ambiente e não se alteram durante o ciclo de vida do indivíduo (COLLARD e MACKILL, 2008; COSTA *et al.*, 2014; MASOJĆ, 2002). Vários marcadores moleculares estão disponíveis para auxiliar no melhoramento de plantas, entre eles os microssatélites e os SCAR - *Sequence Characterized Amplified Regions* (BRUNELLI *et al.*, 2002; YU *et al.*, 1994). O uso dos marcadores SCAR destaca-se principalmente em estudos relacionados a identificação dos genes que codificam para a resistência a patógenos e na seleção assistida no melhoramento. Esses marcadores são obtidos, em geral, por meio da conversão de marcadores RAPD - *Randomly Amplified Polymorphic DNA* ou AFLP - *Amplified*

Fragment Length Polymorphisms – que amplificam várias regiões do DNA, em SCAR, que são específicos de um único loco. Portanto, o SCAR passa a ser específico, estável, precisos e representam locos únicos (CAIXETA *et al.*, 2016), sendo de grande utilidade para seleção assistida por marcadores.

Os microssatélites ou SSR (*Sequence Simple Repeats*) constituem em marcadores que amplificam sequência repetidas em *tandem* que variam de um a seis pares de bases (KALIA *et al.*, 2011; TAUTZ, 1989). Cada marcador microssatélite constitui-se em um loco genético altamente variável, multialélico, de grande conteúdo informativo, o qual combinado com a especificidade e rapidez da tecnologia da PCR (*Polimerase Chain Reaction*) faz desses marcadores uma eficiente ferramenta (ALZATE *et al.*, 2005). São altamente polimórficos, sendo importante para espécies com base genética estreita, estão bem dispersos e distribuídos ao acaso no genoma e são codominantes o que permite diferenciar genótipos homozigotos e heterozigotos. (AKKAYA *et al.*, 1992; BUSÓ *et al.*, 2003).

Os programas de melhoramento de café arábica podem ser auxiliados por esses marcadores moleculares, na certificação de cruzamentos, no estudo de diversidade e na seleção assistida visando resistência a doenças. Os marcadores uma vez que estão ligados aos genes de resistência, facilitam a piramidação desses genes em cultivares comerciais de interesse agrônomico, minimizando o tempo e recurso para a obtenção de novas cultivares. (ALZATE-MARIN *et al.*, 2005).

Na certificação de cruzamentos, os marcadores moleculares revelam a contribuição genética de cada genitor na sua progênie (COLLARD e MACKILL, 2008). Em espécies autógamas, por exemplo, a hibridação é realizada manualmente e a polinização deve ocorrer quando o estigma já está próximo à abertura floral (SAKIYAMA *et al.*, 1999). Não obstante, nesse momento já pode ter ocorrido a autofecundação e a progênie resultante não corresponder ao híbrido de interesse. Assim, os marcadores moleculares permitem a identificação de plantas oriundas de hibridação ou autofecundação (COSTA *et al.*, 2014). Esta estratégia gera grande economia de tempo, mão de obra e recursos financeiros, principalmente para o melhoramento genético de espécies perenes e de ciclo longo.

Na avaliação da diversidade genética os marcadores moleculares são implementados com grande potencial, por proporcionar uma ampla capacidade de amostragem do genoma e permitir identificar o polimorfismo nas populações em estudo. No melhoramento de espécies perenes, a

identificação e seleção de genitores superiores é dificultado principalmente pelo tempo requerido para a obtenção de uma nova cultivar melhorada. Diante disso, o estudo de diversidade genética contribui para o direcionamento de cruzamentos entre os indivíduos mais contrastantes de forma antecipada, por permitir a estimação das distancias entre e dentro das populações de interesse. Além de auxiliar na obtenção de cultivares superiores em menor tempo (COLLARD e MACKILL, 2008).

2.4. Seleção assistida por marcador molecular

Na condução de um programa de melhoramento são enfrentadas diferentes limitações como seleção simultânea de várias características ou vários genes para a mesma característica; seleção fenotípica de alto custo e demorada; necessidade de condições ambientais específicas; baixa herdabilidade da característica tornando a seleção fenotípica menos eficiente; entre outras que dificultam a seleção de plantas. (MASOJĆ, 2002).

Portanto, a SAM está sendo cada vez mais implementada como parte da rotina dos programas de melhoramento, pois, contribui para melhorar a eficiência das atuais técnicas de seleção. Essa estratégia permite aumentar os ganhos genéticos em menor tempo proporcionando maior certeza e confiabilidade nos resultados, além de acelerar e otimizar o desenvolvimento das novas cultivares. (ALZATE *et al.*, 2005; BEARZOTI e VENCOVSKY, 2002; BRUMLOP e FINCKH, 2011; MASOJĆ, 2002).

Na transferência de alelos de resistência, a SAM é amplamente eficiente, por permitir a seleção na ausência do patógeno, anular o efeito do ambiente e permitir a eliminação dos genótipos indesejáveis nas primeiras gerações de seleção (OLIVEIRA *et al.*, 2007).

Visando a transferência de alelos de resistência no cafeeiro, diferentes trabalhos já foram conduzidos com o objetivo de desenvolver marcadores moleculares ligados a genes de resistência. Estes marcadores têm sido identificados e disponibilizados, contribuindo satisfatoriamente no avanço dos programas de melhoramento. Prakash *et al.*, (2004) identificaram 21 marcadores de DNA do tipo AFLP ligados ao gene *S_{H3}* originado de seleções da Índia (híbridos naturais entre *C. liberica* e *C. arabica*), que confere resistência durável à ferrugem do cafeeiro. Posteriormente, Mahé *et al.*, (2008) transformaram quatro desses marcadores AFLP, em SCAR e, juntamente com outros três marcadores SCAR provenientes de extremidade de BAC (Bacterial artificial chromosome) e três SSR, formaram dois pequenos grupos de ligação (5,7 cM e 5,9 cM) contendo o gene de resistência *S_{H3}*. Nesse trabalho, avaliaram a eficiência desses marcadores genéticos

associados ao gene S_{H3} , selecionando apenas os mais próximo ao gene (BA-48-21-f, Sat244, BA-124-12K-f e Sp-M16- S_{H3}) (MAHÉ *et al.*; 2008)

Brito *et al.* (2010), identificaram três marcadores AFLP ligados ao gene do cafeeiro que confere resistência a raça II de *H. vastatrix* ($S_H?$) provenientes de um acesso de Híbrido de Timor (UFV 427-15). Em seguida, Diola *et al.*, (2011) construíram um mapa genético saturado com 25 marcadores AFLP que possibilitou desenvolver um mapa genético de alta densidade com seis marcadores SCAR delimitando uma região cromossômica de 9,45 cM e flanqueando o gene de resistência a 0,7 e 0,9 cM.

Pestana *et al.* (2015), obtiveram um mapa genético de ligação com 111 marcadores moleculares (RAPD, AFLP e SSR), que compreendeu 976,8 cM do genoma, com uma distância genética média de 9,7 cM. Nesse mapa, foram identificados pelo menos dois genes maiores (considerados como QTL- *Quantitative Trait loci*), localizados nos grupos de ligação 2 e 10 que conferiram resistência à raça I, raça II, e patótipo 001 de *H. vastatrix*. Em continuação ao trabalho, Almeida. (2019) converteu quatro desses marcadores AFLP em marcadores SCAR e CAPS (CaRHv7, CaRHv8, CaRHv9 e CaRHv10-CAP), sendo estes disponibilizados para ser usados em seleção de cultivares com resistência a *H. vastatrix*.

Do mesmo modo, marcadores moleculares ligados ao gene que confere resistência à CBD, também foram disponibilizados. Gichuru *et al.*, (2008) identificaram e mapearam oito marcadores AFLP e dois microssatélites (CBD-Sat235 e CBD-Sat207) ligados ao gene designado *Ck-1*, localizado em um segmento de 11 cM. Segundo os autores, este gene provavelmente é semelhante ao gene T previamente descrito por Van der Vossen e Walyaro (1980). Nesse trabalho, foram considerados como fontes de resistência o Catimor 88 e Catimor 127.

Apesar do CBD não estar presente na América Latina e na Ásia, a introdução dessa doença nessas regiões constitui-se em grande problema para a cafeicultura mundial. Uma das estratégias do manejo integrado de doenças é o controle preventivo mediante o uso de cultivares resistentes. Portanto, a disponibilidade desses marcadores gera uma vantagem aos programas de melhoramento, permitindo desde agora o acúmulo destes genes na ausência do patógeno, atividade que só é possível de ser utilizada por meio de seleção assistida por marcador.

Neste sentido, visando o desenvolvimento de cultivares com resistência duradoura e de amplo espectro a SAM apresenta-se como suporte aos programas de melhoramento, sendo uma estratégia que permite a introgressão de mais de um gene de resistência facilitando sua piramidação em uma

cultivar. A SAM é mais efetiva quanto mais próximo o marcador molecular estiver do loco de interesse, reduzindo assim a possibilidade de ocorrer uma recombinação entre os mesmos. Segundo Prakash *et al.*, (2004), a resistência durável às raças específicas de *H. vastatrix* pode perdurar por apenas algumas décadas, mas a piramidação de genes em genótipos elites por meio de marcador molecular auxilia na diminuição deste efeito.

Um método de melhoramento associado com marcadores moleculares que tem apresentado resultados satisfatórios, é a seleção recorrente assistida por marcadores moleculares (MARS). Esta estratégia permite a piramidação de alelos de resistência; explorar e manter a diversidade genética da população; além da obtenção de consideráveis ganhos na seleção. Destaca-se também, por gerar maior certeza nos resultados obtidos, facilitar o rápido progresso genético e aumentar a eficiência da seleção (MASOJC, 2002).

2.5. Seleção recorrente no melhoramento de plantas

A seleção recorrente baseia-se num processo cíclico de seleção e recombinação de indivíduos ou progênies superiores, que iniciam em uma população base geneticamente heterogênea. Sua finalidade é o aumento da frequência de alelos favoráveis (RAMYA, *et al.*, 2016), associado a melhor expressão do caráter sob seleção. O procedimento consiste na obtenção das progênies, avaliação e seleção das superiores, finalizando com a recombinação destas, para a formação de uma nova população que será utilizada para iniciar um novo ciclo de seleção, e assim sucessivamente. Este processo é dinâmico, contínuo e repetido várias vezes. A seleção será finalizada quando as progênies obtidas alcançarem níveis satisfatórios, ou seja, mostrarem o desempenho desejado e/ou atingirem a exaustão da variabilidade genética. (CORDEIRO, *et al.*, 2003; CORDEIRO, 2012; RAMALHO, *et al.*, 2005).

Em geral, este método é utilizado em programas de melhoramento a meio e a longo prazo que visam o aumento contínuo e progressivo da frequência de alelos favoráveis, além de diminuir os riscos da vulnerabilidade genética (FEHR, 1987; KRAUSE *et al.*, 2012).

Resultados na literatura mostram a eficiência da seleção recorrente tanto em espécies alógamas como em autógamias. Destacam-se estudos realizados em Milho (CUNHA *et al.*, 2012; PAIVA *et al.*, 2009; RANGEL *et al.*, 2008; RANGEL *et al.*, 2011; RIBEIRO *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2013), eucalipto (RESENDE *et al.*, 2008), maracujá (SILVA *et al.*, 2012), e *Coffea canephora* (BARADAT *et al.*, 1995; CUBRY *et al.*, 2013; FERRÃO *et al.*, 2008; FONSECA *et al.*, 2006; LEROY *et al.*, 1993, 1994; LEROY *et al.*, 1991; MISTRO *et al.*, 2007; MISTRO *et al.*, 2004;

MONTAGNON *et al.*, 1992). Em espécies autógamas com o uso da seleção recorrente se tem constatado resultados satisfatórios quanto a eficiência, nos ganhos na seleção. Ramya *et al.*, (2016), visando aumentar rendimento de grãos e a tolerância a seca em trigo, após três ciclos de seleção em condições de estresse hídrico, comparou as progênies obtidas de meios irmãos, com a população base, obtendo como resultado uma considerável redução da temperatura do dossel, além de aumento do rendimento (17,1%) e no índice de colheita.

Na cultura do feijão, Alves *et al.*, (2015) obtiveram um ganho genético no rendimento de grãos de 8,6% após um ciclo de seleção e identificaram famílias com potencial para gerar linhas superiores. Estes autores argumentaram a possibilidade de dar continuidade ao programa de seleção recorrente predizendo grande sucesso nos subseqüentes ciclos de seleção, devido a variabilidade genética presente na população.

Visando seleção de progênies com resistência ao mofo branco (*Sclerotinea sclerotiorum*) e arquitetura de planta Leite *et al.*, (2016) obtiveram um progresso genético de cerca de 11% para a resistência ao mofo branco e cerca de 15% para a arquitetura da planta, ao ano. Menezes *et al.* (2013), após dois ciclos de seleção, obtiveram o progresso genético de 7,5% para produtividade de grãos, 7% para o aspecto de grãos, 33,4% para resistência a ferrugem e 13,2% para resistência a mancha angular. Sendo, portanto este método eficiente na seleção quanto a resistência a doenças. Destacam-se outros trabalhos, principalmente nas culturas do arroz (CORDEIRO, *et al.*, 2003; CORDEIRO e RANGEL, 2012; MORAIS *et al.*, 2015; RANGEL *et al.*, 2007), aveia (DE KOEYER *et al.*, 1993; DE KOEYER *et al.*, 1998; HOLLAND *et al.*, 2000), cevada (MAROCCO *et al.*, 1992), ervilha (LEWIS; GRITTON, 1992), soja (POSADAS *et al.*, 2014) e trigo (ARIEF *et al.*, 2010; DELZER *et al.*, 1995; WIERSMA *et al.*, 2001).

A seleção recorrente assistida por marcadores é um método que objetiva o aumento dos ganhos com a seleção por unidade de tempo (BERNARDO, 2008; EATHINGTON *et al.*, 2007). A MARS baseia-se no melhoramento populacional, suportado em dados fenotípicos e moleculares, seguido por ciclos sucessivos de seleção auxiliados em marcadores moleculares. Trabalhos efetuados com simulação tem mostrado que esta estratégia contribui com respostas superiores quando comparado com a seleção fenotípica sozinha, principalmente no acúmulo de alelos favoráveis em genótipos ao longo dos ciclos de seleção, apesar de ser mais indicada para caracteres de média a alta herdabilidade (VAN BERLOO *et al.*, 2001).

Trabalhos realizados com milho tem mostrado a superioridade da MARS no melhoramento de populações como fontes de linhagem para ambientes propensos ao estresse a seca, em comparação com outros métodos de melhoramento (ABDULMALIK *et al.*, 2017; BEYENE; SEMAGN; CROSSA; *et al.*, 2016; BEYENE; SEMAGN; MUGO; *et al.*, 2016). Berilli *et al.*, (2011), estudando o uso de marcadores moleculares na seleção recorrente recíproca de milho, inferiram que esta metodologia permite a otimização do monitoramento da variabilidade genética dentro e entre populações, favorecendo a recombinação entre progênies mais distantes e que também aumentam os efeitos de heterose e a longevidade do programa de melhoramento.

Nesse contexto, a implementação da seleção recorrente assistida por marcadores moleculares propõe-se como uma nova estratégia no melhoramento de *Coffea arabica*, para contribuir na otimização dos processos de seleção de plantas com características agronômicas desejáveis e competitivas frente aos diferentes desafios. Além de alcançar a piramidação de alelos de interesse com maior eficiência para o desenvolvimento de novas cultivares.

3. OBJETIVOS

3.1. *Objetivo Geral*

Piramidar alelos de resistência a *Hemileia vastatrix* e *Colletotrichum kahawae* em cafeeiro (*Coffea arabica*) por meio da seleção recorrente assistido por marcadores moleculares.

3.2. *Objetivos Específicos*

✓ Certificar a ocorrência de hibridação em doze populações de híbridos originados de cruzamentos entre oito genitores com características agronômicas de interesse, por meio de marcadores moleculares microssatélites.

✓ Estimar a diversidade genética existente entre e dentro das populações híbridas, por meio de marcadores moleculares distribuído aleatoriamente no genoma, visando a identificação dos indivíduos mais contrastantes para direcionar futuros cruzamentos.

✓ Implementar a Seleção Assistida por Marcadores para identificar indivíduos que apresentem os genes *Ck-1* de resistência a *C. kahawae*; *SH3* e dois QTL que equivalem a genes de efeito maior que conferem resistência a diferentes raças de *H. vastatrix*.

✓ Escolher indivíduos superiores que reúnam várias características de interesse agronômico por meio do índice de seleção, para a obtenção de maiores ganhos com a seleção.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material Genético

Foram avaliados oito genitores de interesse agrônômico que correspondem a cultivares comerciais ou acessos do programa de melhoramento genético do cafeeiro desenvolvido pela Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG) em parceria com a Universidade Federal de Viçosa (UFV) e a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA Café) (Tabela 1). Para cada genitor foram analisadas quatro plantas, totalizando 32 cafeeiros.

Foram realizados 12 cruzamentos com os genitores relacionados na Tabela 1, gerando 12 progênies híbridas com 12 indivíduos cada, obtendo um total de 144 híbridos F₁ (Tabela 2). Os cruzamentos foram realizados em um modelo de dialelo circulante (Figura 1). Estes 144 indivíduos se encontram no campo experimental do Departamento de Fitopatologia da UFV (DFT-Fundão) em um delineamento experimental em blocos casualizados, com quatro repetições e três plantas por parcela. Os tratamentos correspondem aos 12 híbridos F₁ e os oito genitores, totalizando 20 tratamentos.

	1 ¹	2	3	4	5	6	7	8
1				(C1T) ²	(C2T)	(C3T)		
2					(C4T)	(C5T)	(C6T)	
3						(C7T)	(C8T)	(C9T)
4							(C10T)	(C11T)
5								(C12T)
6								
7								
8								

Figura 1. 1: Progenitores: 1 = Paraíso MG H419-1, 2 = Catiguá MG2, 3 = Oeiras MG 6851, 4 = H484-2-18-12, 5 = UFV 311-63, 6 = Arara, 7 = Acauã Novo, 8 = Siriema. 2: Os números (CnT) que correspondem aos códigos dos cruzamentos descritos na Tabela 2. (Medeiros, 2016)

Foram coletadas 176 amostras foliares para extração de DNA (folhas jovens, vigorosas, verde brilhante e completamente expandidas), sendo 32 amostras dos genitores (quatro plantas de cada genitor do dialelo) e 144 correspondentes aos híbridos de cada cruzamento.

Tabela 1. Características dos genitores utilizados nos cruzamentos, provenientes do programa de melhoramento genético do cafeeiro desenvolvido pela Epamig/UFV/Embrapa.

Genitor	Localização	Principais Características
Paraíso MG H 419-1	CETP*	Originada do cruzamento artificial entre a cultivar Catuaí Amarelo IAC 30 e Híbrido de Timor UFV 445-46. Altamente resistente à ferrugem (<i>H. vastatrix</i>) e aos nematoides da espécie <i>M. exigua</i> . Cultivar de porte baixo; frutos amarelos, oblongos com maturação média; apresenta alta produtividade e boa qualidade de bebida.
Catiguá MG 2	CETP	Cultivar originada do cruzamento artificial entre a cultivar Catuaí Amarelo IAC 86 e o Híbrido de Timor UFV 440-10. Obtida pela progênie da planta H 514-7-16-3. Resistentes às raças prevaletentes de ferrugem. Porte baixo; frutos vermelhos, alta qualidade bebida, baixa exigência em nutrientes e tolerante a seca.
Oeiras MG 6851	CETP	Originou-se do cruzamento entre Caturra Vermelho CIFC 19/1 e Híbrido de Timor CIFC 832/1. Moderadamente resistente às raças de <i>H. vastatrix</i> , que predominam no estado de Minas Gerais. Excelente arquitetura de plantas; porte baixo; frutos vermelhos, graúdos e alongados; possui maturação precoce e uniforme; alta produtividade e boa qualidade de bebida.
H484-2-18-12	CETP	Progênie F ₃ do cruzamento da cultivar Mundo Novo x Híbrido Timor, de elevada produtividade; alto vigor vegetativo e resistente à ferrugem.
UFV 311-63	CETP	Planta da geração F ₃ portadora do gene <i>S_{H3}</i> de resistência à ferrugem. Originada do cruzamento artificial entre CIFC H227/1 = Caturra Amarelo (CIFC 426/2) x S.333 (CIFC 254/14). Possui também os genes <i>SH2</i> e <i>SH5</i> .
Arara	Procafé	Cultivar do grupo Sarchimor, frutos graúdos e amarelos; elevada produtividade e resistência à ferrugem.
Acauã Novo (broto verde) – Ensaio 3-45, cova 432	Procafé	Originada do cruzamento entre Mundo Novo IAC 388-17 e Sarchimor IAC 1668. Apresenta resistência à ferrugem, Tolerância à seca e maturação tardia.
Siriema – clone 12	Procafé	Originada do cruzamento e retrocruzamentos entre <i>C. arabica</i> com <i>C. racemosa</i> , resistente ao bicho mineiro; maturação muito precoce; tolerante à seca e resistência parcial à ferrugem.

*CETP - Campo Experimental de Três Pontas/Epamig; Procafé - Fazenda Experimental de Varginha/Fundação Procafé.

A coleta foi realizada em papel de jornal úmido, devidamente identificado e mantido em caixa de isopor para manutenção da sua umidade, evitando a oxidação das folhas coletadas. Posteriormente, o material vegetal foi conduzido ao laboratório de biotecnologia do cafeeiro (BioCafé) na UFV. As folhas foram lavadas com água corrente, secadas em papel toalha,

acondicionadas em tubos Falcon devidamente identificados e armazenadas em freezer a -80°C . Posteriormente, as amostras foram liofilizadas e após três dias foram maceradas em cadinhos com auxílio de pistilo e armazenadas em microtubos de 2,0 ml. O DNA foi extraído conforme a metodologia descrita por Diniz et al. (2005), com adaptações.

Tabela 2. Representação dos híbridos obtidos após realizados os cruzamentos direcionados.

Cruzamento	Código	Híbrido	Código	Híbrido	Código
Paraíso MG H419-1 x H484-2-18-2	C1T	C1T-B1-P1-E1	C1-1	C1T-B3-P1-E1	C1-7
		C1T-B1-P2-E1	C1-2	C1T-B3-P2-E1	C1-8
		C1T-B1-P3-E1	C1-3	C1T-B3-P3-E1	C1-9
		C1T-B2-P1-E1	C1-4	C1T-B4-P1-E1	C1-10
		C1T-B2-P2-E1	C1-5	C1T-B4-P2-E1	C1-11
		C1T-B2-P3-E1	C1-6	C1T-B4-P3-E1	C1-12
Paraíso MG H419-1 x UFV 311-63 planta F ₃	C2T	C2T-B1-P1-E1	C2-1	C2T-B3-P1-E1	C2-7
		C2T-B1-P2-E1	C2-2	C2T-B3-P2-E1	C2-8
		C2T-B1-P3-E1	C2-3	C2T-B3-P3-E1	C2-9
		C2T-B2-P1-E3	C2-4	C2T-B4-P1-E1	C2-10
		C2T-B2-P2-E1	C2-5	C2T-B4-P2-E1	C2-11
		C2T-B2-P3-E1	C2-6	C2T-B4-P3-E1	C2-12
Paraíso MG H419-1 x Arara	C3T	C3T-B1-P1-E1	C3-1	C3T-B3-P1-E1	C3-7
		C3T-B1-P2-E3	C3-2	C3T-B3-P2-E1	C3-8
		C3T-B1-P3-E3	C3-3	C3T-B3-P3-E3	C3-9
		C3T-B2-P1-E3	C3-4	C3T-B4-P1-E1	C3-10
		C3T-B2-P2-E1	C3-5	C3T-B4-P2-E1	C3-11
		C3T-B2-P3-E1	C3-6	C3T-B4-P3-E1	C3-12
Catiguá MG2 x UFV 311-63 planta F ₃	C4T	C4T-B1-P1-E1	C4-1	C4T-B3-P1-E1	C4-7
		C4T-B1-P2-E1	C4-2	C4T-B3-P2-E1	C4-8
		C4T-B1-P3-E1	C4-3	C4T-B3-P3-E1	C4-9
		C4T-B2-P1-E1	C4-4	C4T-B4-P1-E1	C4-10
		C4T-B2-P2-E1	C4-5	C4T-B4-P2-E1	C4-11
		C4T-B2-P3-E1	C4-6	C4T-B4-P29-E3	C4-12
Catiguá MG2 x Arara	C5T	C5T-B1-P1-E1	C5-1	C5T-B3-P1-E1	C5-7
		C5T-B1-P2-E1	C5-2	C5T-B3-P2-E1	C5-8
		C5T-B1-P3-E1	C5-3	C5T-B3-P3-E1	C5-9
		C5T-B2-P1-E1	C5-4	C5T-B4-P1-E1	C5-10
		C5T-B2-P2-E1	C5-5	C5T-B4-P2-E1	C5-11
		C5T-B2-P3-E1	C5-6	C5T-B4-P3-E1	C5-12
Catiguá MG2 x Acauã Novo	C6T	C6T-B1-P1-E1	C6-1	C6T-B3-P1-E1	C6-7
		C6T-B1-P2-E1	C6-2	C6T-B3-P2-E1	C6-8
		C6T-B1-P3-E1	C6-3	C6T-B3-P3-E1	C6-9
		C6T-B2-P1-E1	C6-4	C6T-B4-P1-E1	C6-10
		C6T-B2-P2-E1	C6-5	C6T-B4-P2-E1	C6-11
		C6T-B2-P3-E1	C6-6	C6T-B4-P3-E1	C6-12

Tabela 2. Continuação

Cruzamento	Código	Híbrido	Código	Híbrido	Código
Oeiras MG 6851 x Arara	C7T	C7T-B1-P1-E1	C7-1	C7T-B3-P1-E1	C7-7
		C7T-B1-P2-E1	C7-2	C7T-B3-P2-E1	C7-8
		C7T-B1-P3-E1	C7-3	C7T-B3-P3-E1	C7-9
		C7T-B2-P1-E1	C7-4	C7T-B4-P1-E1	C7-10
		C7T-B2-P2-E1	C7-5	C7T-B4-P2-E1	C7-11
		C7T-B2-P3-E1	C7-6	C7T-B4-P3-E1	C7-12
Oeiras MG 6851 x Acauã Novo	C8T	C8T-B1-P1-E1	C8-1	C8T-B3-P1-E1	C8-7
		C8T-B1-P2-E1	C8-2	C8T-B3-P2-E1	C8-8
		C8T-B1-P3-E1	C8-3	C8T-B3-P3-E1	C8-9
		C8T-B2-P1-E1	C8-4	C8T-B4-P1-E1	C8-10
		C8T-B2-P2-E1	C8-5	C8T-B4-P2-E1	C8-11
		C8T-B2-P3-E1	C8-6	C8T-B4-P3-E1	C8-12
Oeiras MG 6851 x Siriema	C9T	C9T-B1-P1-E1	C9-1	C9T-B3-P1-E1	C9-7
		C9T-B1-P2-E1	C9-2	C9T-B3-P2-E1	C9-8
		C9T-B1-P3-E1	C9-3	C9T-B3-P3-E1	C9-9
		C9T-B2-P1-E1	C9-4	C9T-B4-P1-E1	C9-10
		C9T-B2-P2-E1	C9-5	C9T-B4-P2-E1	C9-11
		C9T-B2-P3-E1	C9-6	C9T-B4-P3-E1	C9-12
H484-2-18-2 x Acauã Novo	C10	C10T-B1-P1-E1	C10-1	C10T-B3-P1-E1	C10-7
		C10T-B1-P2-E1	C10-2	C10T-B3-P2-E1	C10-8
		C10T-B1-P3-E1	C10-3	C10T-B3-P3-E1	C10-9
		C10T-B2-P1-E1	C10-4	C10T-B4-P1-E1	C10-10
		C10T-B2-P2-E1	C10-5	C10T-B4-P2-E1	C10-11
		C10T-B2-P3-E1	C10-6	C10T-B4-P3-E1	C10-12
H484-2-18-12 x Siriema	C11	C11T-B1-P1-E1	C11-1	C11T-B3-P1-E1	C11-7
		C11T-B1-P2-E1	C11-2	C11T-B3-P2-E1	C11-8
		C11T-B1-P3-E1	C11-3	C11T-B3-P3-E1	C11-9
		C11T-B2-P1-E1	C11-4	C11T-B4-P1-E1	C11-10
		C11T-B2-P2-E1	C11-5	C11T-B4-P2-E1	C11-11
		C11T-B2-P3-E1	C11-6	C11T-B4-P3-E1	C11-12
UFV 311-63 planta F ₃ x Siriema	C12	C12T-B1-P1-E1	C12-1	C12T-B3-P1-E1	C12-7
		C12T-B1-P2-E1	C12-2	C12T-B3-P2-E1	C12-8
		C12T-B1-P3-E1	C12-3	C12T-B3-P3-E1	C12-9
		C12T-B2-P1-E1	C12-4	C12T-B4-P1-E1	C12-10
		C12T-B2-P2-E1	C12-5	C12T-B4-P2-E1	C12-11
		C12T-B2-P3-E1	C12-6	C12T-B4-P3-E1	C12-12

4.2. Avaliações Moleculares

4.2.1. Certificação de Cruzamentos e Análises de Diversidade Genética

Foram utilizados 20 marcadores moleculares microssatélites, dos quais selecionaram-se 11 marcadores que se mostraram polimórficos (Tabela 3).

Os marcadores moleculares microssatélites foram utilizados inicialmente para certificar se os 144 potenciais híbridos F_1 , correspondiam a verdadeiros híbridos ou se houve autofecundação durante o cruzamento artificial realizado. Dessa forma, todos os genitores foram genotipados junto com seus respectivos supostos híbridos. Os indivíduos que apresentaram as bandas presentes em ambos os seus genitores foram considerados como híbridos e os indivíduos que apresentarem as bandas apenas do genitor feminino, foram considerados como produtos de autofecundação. Além disso, foi analisada a possibilidade de ocorrência de mistura nas populações, identificando os indivíduos que apresentaram alelos (bandas) que não estavam presentes em nenhum dos seus genitores. Essa ferramenta foi utilizada para o descarte de material contaminante no programa de melhoramento.

Na realização da reação de PCR, foram utilizados 50 ng de DNA, 1 U de Taq DNA polimerase, tampão 1X da enzima, 1 mM de $MgCl_2$, 150 μM de cada dNTP (dGTP, dTTP, dCTP, dATP) e 0,1 μM de cada *primer*, completando com água milli-Q para um volume final de 20 μL . As amplificações foram efetuadas em termocicladores PTC-200 (MJ Research) e Veriti (Applied Biosystems), sendo constituída por 3 etapas, desnaturação, anelamento e extensão. A reação foi iniciada com desnaturação a 94°C por 2 min, seguido por 10 ciclos de *touchdown* PCR, constituídos de 94°C por 30 segundos (seg), temperatura de anelamento decrescendo 1°C a cada ciclo (de 66°C até 57°C) por 30 seg e extensão de 72°C por 30 seg. Posteriormente, foram realizados mais 30 ciclos de desnaturação a 94°C, anelamento a 57°C e extensão a 72°C, com 30 seg cada etapa. A extensão final foi realizada a 72°C, por 8 min.

Os produtos resultantes da reação de PCR foram separados em eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante 6% e visualizados por meio de coloração com nitrato de prata, conforme protocolo descrito por Brito et al. (2010).

Para a avaliação dos géis, cada banda foi tratada como um caráter único, sendo avaliada a presença da banda como 1 (um) e a ausência como 0 (zero). Apesar do marcador microssatélite ser codominante, as análises moleculares dos locos foram realizadas baseada na presença ou ausência

de cada fragmento amplificado, devido à natureza poliploide de *C. arabica*. Posteriormente, foi construída uma matriz de 0 e 1.

Tabela 3. Lista de primers SSR utilizados na certificação de cruzamentos e estudo de diversidade temperatura de fusão (Tm) e tamanho dos fragmentos gerados em pares de bases (bp)

Primer	Sequências dos Primers	Tm(°C)	Tam.
CaEST-002	F: GAAGGGACAAAGACGCCTAA R: CGACAGATGCAGGAATAAACTG	57,3	184
CaEST-006	F: CAGAATTGTTGTGGAGGGAAC R: CGACAGATGCAGGAATAAACTG	57,9	227
CaEST- 029	F: AGGAGATGCCTGTGACGAAC R: GGACGGAAAGATTCTGGCTTT	53,7	199
CaEST- 030	F: CCCATGAAGACTTGCCAATA R: GGGAAATACAAGTGTTGCTG	54,2	171
CaEST- 045	F: GCATCCTACCGAGTACATACAA R: TCCATCAACAACAACCGAAG	52,9	259
CaEST- 048	F: TGAGACAAGCTATGGAGGAGGA R: AACCAGATCAACAGGGTAGGG	54,7	151
CaEST- 071	F: ATGGAGAGGAAGACGCAACA R: CCTTATTGAAGACGCCCAA	51,7	155
CaEST- 072	F: TTGCTTGCTCCGCATCCTAC R: ATCGCTTCCAAGAGGCTTTC	53,7	197
CaEST- 089	F: GTGAACCTCCCTTTCCTTG R: ACTGGTCTCTCGTCTGTGAA	59,4	152
CaEST- 102	F: GCTTCCTTACTTCCTTCCCTGA R: GGTTGCGTCAAACAAGTCAA	60,3	208
CaEST- 088	F: CGCGTGGGAGATATTGAAGT R: AAGCGGCAGAAATCAGTGG	51,7	226

A análise de diversidade genética foi realizada a partir dos dados obtidos dos 11 marcadores moleculares microssatélites (Tabela 3), e outros quatro marcadores (SP-M16- *S_H3*, BA-124-12KF, BA-48-21O-f e Sat244) que foram utilizados na fase de seleção assistida (Tabela 4). A diversidade genética foi avaliada pela distância genética euclidiana média entre os híbridos.

A matriz de dissimilaridade (ou similaridade) genética foi obtida pelo complemento aritmético do índice ponderado. A representação simplificada das distâncias genéticas foram efetuadas por meio de um dendrograma utilizando a metodologia de agrupamento UPGMA (método da ligação média não-ponderada entre grupos). Para quantificar a variação genética entre e dentro das populações, foi realizada uma análise de variância molecular (AMOVA). Todas as análises foram executadas no *software* GENES (CRUZ, 2013).

4.2.2. Seleção assistida com marcadores moleculares (SAM)

Na análise de seleção assistida de híbridos F₁ que apresentam alelos que conferem resistência para as principais doenças de *C. arabica*, foram utilizados 10 marcadores moleculares de marca específica, previamente identificados como ligados a genes que conferem resistência a *H. vastatrix* e a *C. kahawae* (Tabela 4).

Para facilitar a análise dos dados gerados pelos marcadores moleculares ligados aos genes de resistência e a identificação dos alelos de resistência presentes nos indivíduos avaliados, no presente estudo estes marcadores representam os diferentes locos de resistência a ferrugem e a CBD. Neste sentido, os quatro marcadores moleculares ligadas ao gene *S_H3* (SP-M16-*S_H3*, Sat244, BA-48-21OR e BA-124-12K-f) (Tabela 4) representaram o loco A de resistência. Os marcadores ligados a dois QTL, que correspondem a genes de efeito maior que conferem resistência às raças I, II e ao patótipo 001 de *H. vastatrix* (SSR 016, CaRHv8) representaram o loco B e os marcadores (CaRHv9 e CaRHv11_CAP) o loco C (Tabela 4). Finalmente os marcadores CBD-Sat235 e CBD-Sat207 ligados ao gene Ck-1 representaram o loco D (Tabela 4).

Tabela 4. Marcadores moleculares ligados a genes que conferem resistência a *H. vastatrix* e *C. kahawae*. Sequências, temperaturas de anelamento T(°C) e distância entre o gene e o marcador.

Gene	Loco	Marcador	Sequências dos Primers	T (°C)	Distância do gene (cM)
<i>S_H3</i> : confere resistência a <i>H. vastatrix</i>	A	SP-M16- <i>S_H3</i>	R: ATCTAGCTTTGGAACATCGT F: TTAAGTGGAACTTGGCTTG	49	1,8
		BA-124-12KF	R: TGCAGATTGATGGCACGTTA F: TGATTTGCTTGTGTCGAG	56	0
		BA-48-21O-f	R: ACTTGGCAGGCGTAATTGAA F: ACAGTGAATCCCCAAGCAC	52	0,6
		Sat244	R:GCATACTAAGGAATTATCTGACTGCT F: GCATGTGCTTTTTGATGTCGT	52	0
Dois QTL que conferem resistência as raças I, II e patótipo 001 de <i>H. vastatrix</i>	B	SSR 016	F:ACCCGAAAGAAAGAACCAAG R: CCACACAACCTCTCCTCATT	65	3,7
		CaRHv8	R: CTTAGCGCCATGAATAGCCA F: CCTTCTAGTGTTACCGAGGA	65	3
	C	CaRHv9	R:GTCTAAGACCAGAATCAGATGG F: TGATGAAGAAGAGCGCATAGC	65	2,3
		CaRHv11_CAP	R: TTTGGCCAGATTCGCTTCAC F: TGTGGCGAGGGATGAATTTG	65	22,4
<i>Ck-1</i> : confere resistência a <i>C. kahawae</i> (CBD)	D	CBD-Sat235	R: GCAAATCATGAAAATAGTTGGTG F: TCGTTCTGTCAATAAATCGTCAA	50	0
		CBD-Sat207	R: CAATCTCTTTCCGATGCTCT F: GAAGCCGTTTCAAGCC	50	17,2

4.2.2.1. Seleção assistida com marcadores moleculares ligados ao gene S_{H3} que confere resistência à *H. vastatrix*

Foram genotipados 134 híbridos com quatro marcadores moleculares SP-M16- S_{H3} , Sat244, BA-48-21OR e BA-124-12K-f (Tabela 4), identificados por Mahé *et al.* (2008), que estão ligados ao gene S_{H3} que confere resistência a *H. vastatrix* e representam o loco A. Estes indivíduos foram analisados como portadores ou não do alelo de resistência do gene S_{H3} , sendo considerados indivíduos resistentes apenas os que apresentaram os quatro marcadores moleculares ligados ao gene (Tabela 4, Figura 2).

Como controle utilizaram-se três genótipos portadores do alelo de resistência do gene S_{H3} (CIFC H147/1, CIFC H153/2 e S.288/23) e dois genótipos suscetíveis (Caturra Vermelho - CIFC 19/1 e Catuaí amarelo IAC 64 - UFV 2148/57). Os genótipos CIFC H147/1 e CIFC H153/2 são híbridos resultantes dos cruzamentos entre Seleção Indiana S.353-4/5 (CIFC 34/13) com S4 Agaro (CIFC 110/5) e entre Seleção Indiana S.288/23 (CIFC 33/1) com Geisha (CIFC 87/1), respectivamente.

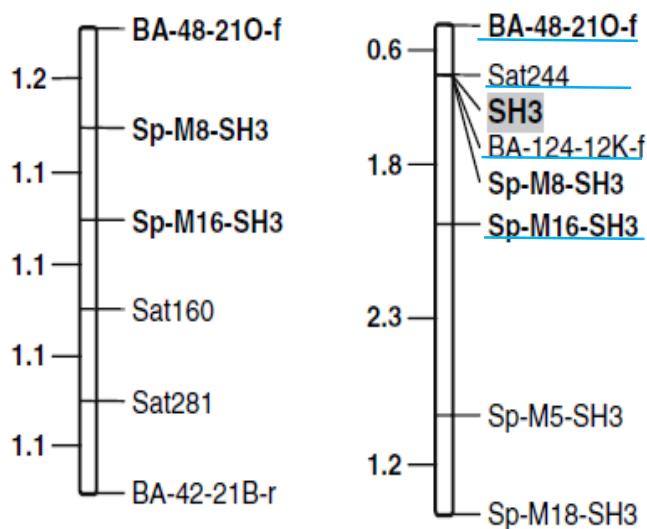


Figura 2. Mapa de ligação baseado na análise da população F_2 (Matari \times S.288) dos marcadores ligados em acoplamento (à direita) ou em repulsão (esquerda) com o gene S_{H3} (em negrito). Nomes de marcadores moleculares estão à direita, enquanto as distâncias de mapa estimadas em cM são mostradas à esquerda (MAHÉ *et al.*, 2008). Marcadores utilizados estão com linha azul.

As amplificações por PCR foram realizadas em um volume final de 25 μ l, contendo 50 ng de DNA, tampão de reação de PCR 1X, 2,0 mM de $MgCl_2$, 0,1 mM de cada dNTP, 0,4 μ M de cada *primer*, 0,5 unidade de Taq DNA polimerase, completando o volume com água milli-Q estéril. As reações foram conduzidas em termocicladores PTC-200 (*MJ Research*) e Veriti (*Applied*

Biosystems) e consistiram em uma fase inicial de desnaturação a 95°C por 5 minutos; 35 ciclos a 94°C por 45 segundos, temperaturas de anelamento específico para cada *primer* (Tabela 4) por 45 segundos, seguido de extensão de 72°C por 45 segundos e extensão final a 72°C por 10 minutos. Os produtos resultantes da reação de PCR foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante 6% e visualizados por meio de coloração com nitrato de prata (BRITO *et al.* 2010).

4.2.2.2. Seleção assistida com marcadores moleculares SCAR, SSR E CAP ligados aos genes QTL que conferem resistência as raças I, raça II e patótipo 001 de *H. vastatrix*

Visando identificar indivíduos que apresentem resistência a outras raças de *H. vastatrix*, foram implementados quatro marcadores moleculares (SSR 016, CaRHv8, CaRHv9 e CaRHv11_CAP) ligados a dois QTL, que correspondem a genes de efeito maior que conferem resistência às raças I, II e ao patótipo 001 de *H. vastatrix*. Os marcadores SSR16 e CaRHv8 (Figura 3) estão ligados ao QTL do grupo de ligação 2. No presente trabalho estes marcadores representam o loco B de resistência. O SSR16 apresenta um padrão codominante, identificando-se os indivíduos BB, Bb e bb. O CaRHv8 se comporta como marcador dominante, ligado em repulsão, marcando só o alelo recessivo (b), portanto, são identificados na população os indivíduos que apresentam o genótipo bb e Bb, porém, não é possível diferenciá-los. A análise em conjunto do CaRHv8 e o SSR16 permite a identificação dos heterozigotos (Bb). Os indivíduos que não possuem a banda foram considerados resistentes e homozigotos (BB) (Figura 3).

Os marcadores CaRHv9 e CaRHv10_CAP estão ligados ao QTL do grupo de ligação 5 (Figura 3) e no presente trabalho representam o loco C de resistência, esses comportam-se como marcadores dominantes e acoplados, sendo identificados na população os indivíduos com genótipos C_ e cc (ALMEIDA, 2019).

Foram utilizados como controles o genótipo Híbrido de Timor UFV 443-03, resistente a *H. vastatrix*, a cultivar Catuaí Amarelo IAC 64 (UFV 2148/57) suscetível. Esses genótipos foram utilizados por constituírem os parentais da população na qual foram identificados os QTL associados à resistência a *H. vastatrix*.

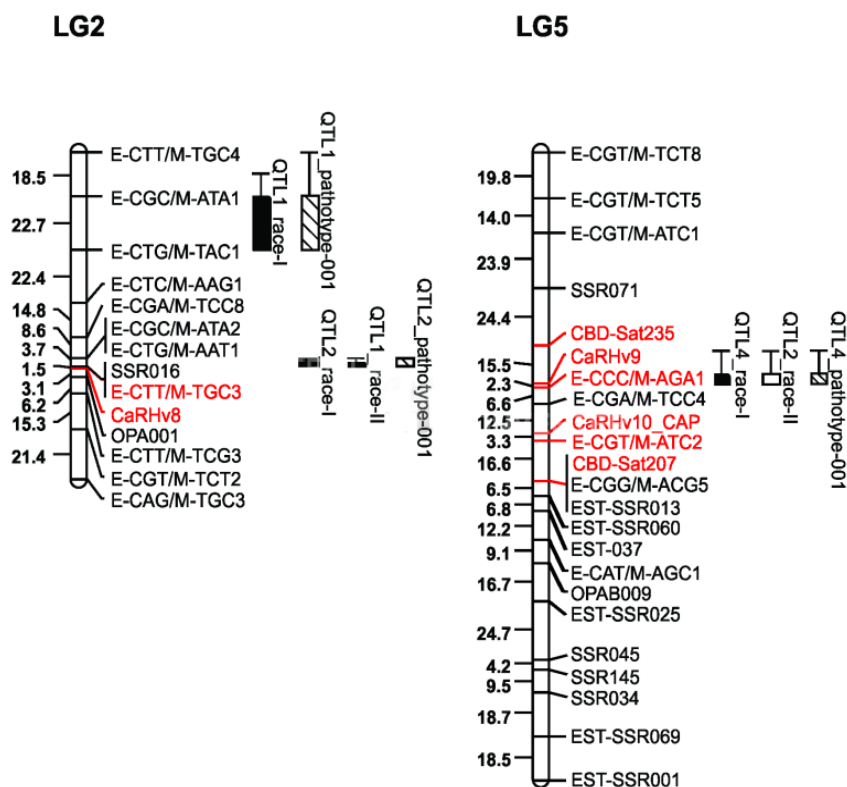


Figura 3. LG2 = Grupo de Ligação 2 do Mapa de ligação para *C. arabica* contendo o marcador SSR16 e CaRHv8₂₇₂ (vermelho). LG5 = Grupo de Ligação 5 do Mapa de ligação para *C. arabica* contendo o marcador CaRHv9₁₆₁ e CaRHv11_{340_CAP} e os CBD-Sat207 e CBD-Sat235 (vermelho). À direita da barra estão os nomes dos marcadores moleculares e à esquerda, as distâncias em cM. (ALMEIDA, 2019)

A amplificação por PCR para os *primers* CaRHv8, CaRHv9 e CaRHv11_CAP foi realizada em um volume final de 20 µl, contendo 50 ng de DNA genômico, tampão de reação de PCR 1X, 2,0 mM de MgCl₂, 0,15 mM de cada dNTP; 0,1 µM de cada *primer*, 1 unidade de Taq DNA polimerase, completando o volume com água milli-Q estéril. As reações foram conduzidas em termocicladores PTC-200 (*MJ Research*) e Veriti (*Applied Biosystems*) e consistiram em uma fase inicial de desnaturação a 94°C por 5 minutos; 32 ciclos de 94°C 30 segundos, 65°C 30 segundos e 72°C 1 minuto; extensão final de 72°C por 10 minutos. Os produtos da reação de PCR foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante 6% e visualizados por meio de coloração com nitrato de prata (BRITO *et al.* 2010).

O marcador CaRHv11 foi clivado com a enzima de restrição RsaI (*Thermos Life*), seguindo recomendação do fabricante, derivando o marcador CaRHv11_CAP. O marcador CaRHv11_CAP

foi utilizado somente nos indivíduos que apresentaram a marca de resistência para o marcador CaRHv9.

A amplificação por PCR para o *primer* SSR 016 foi realizada em um volume final de 20 µl, contendo 50 ng de DNA genômico, tampão de reação de PCR 1X, 1,0 mM de MgCl₂, 0,15 mM de cada dNTP, 0,1 µM de cada *primer*, 0,6 unidade de Taq DNA polimerase, completando o volume com água milli-Q estéril. As reações foram conduzidas em termocicladores PTC-200 (*MJ Research*) e Veriti (*Applied Biosystems*) e consistiram em uma fase inicial de desnaturação a 94°C por 2 minutos; 10 ciclos de *touchdown* PCR a 94°C por 30 segundos, temperatura de anelamento decrescendo 1°C a cada ciclo (de 66°C até 57°C) durante 30 segundos, e extensão a 72°C por 30 segundos; seguidos por mais 30 ciclos de desnaturação a 94°C, anelamento a 57°C e extensão a 72°C, com 30 segundos cada etapa. A extensão final foi realizada a 72°C por 8 minutos. Os produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante 6% e visualizados por meio de coloração com nitrato de prata (BRITO *et al.* 2010).

4.2.2.3. Seleção assistida com marcadores moleculares SSR ligados ao gene Ck-1 que confere resistência a Colletotrichum kahawae

Foram utilizados os marcadores moleculares CBD-Sat235 e CBD-Sat207 (Tabela 4) ligados ao gene *Ck-1* que confere resistência a *C. kahawae*, representam o loco gênico (D) de resistência no presente estudo. Esses marcadores foram identificados e mapeados por (GICHURU *et al.*, 2008) (Figura 4) e validados por (ALKIMIM *et al.*, 2017).

Como indivíduos controle foram usados três genótipos portadores do gene *Ck-1* (Híbridos de Timor UFV 377-15 e UFV 440-10 e a cultivar MGS Catiguá 3) e dois genótipos suscetíveis (Caturra Vermelho - CIFC 19/1 e Catuaí Amarelo IAC 64 - UFV 2148-57).

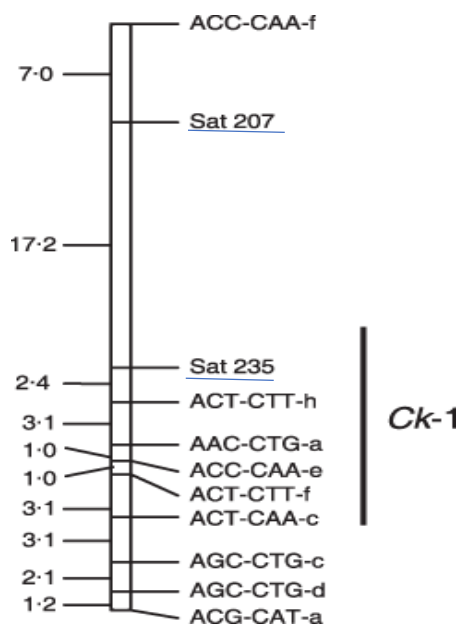


Figura 4. Mapa de ligação genética de marcadores encontrados associados à resistência do cafeeiro a *C. kahawae* construído com base na população F₂ de *C. arabica* (SL28 × Catimor 88). Os valores à esquerda indicam as distâncias entre os marcadores em cM. A direita segmento que contém o loco *Ck-1* de resistência ao CBD (GICHURU *et al.*, 2008).

A amplificação por PCR foi realizada em um volume final de 25 µL, contendo 50 ng de DNA, tampão de reação de PCR 1X, 2,0 mM de MgCl₂, 0,1 mM de cada dNTP, 0,4 µM de cada *primer* e 0,5 U de Taq DNA polimerase, completando o volume com água milli-Q estéril. As reações de amplificação foram realizadas em termocicladores PTC-200 (*MJ Research*) e Veriti (*Applied Biosystems*) e consistirão em uma fase de desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos; 35 ciclos a 94°C por 45 segundos, com temperatura de anelamento 50°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 45 segundos; e a extensão final a 72°C por 10 minutos. Os produtos resultantes da reação de PCR foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante 6% e visualizados por meio de coloração com nitrato de prata (BRITO *et al.* 2010).

Para a obtenção dos resultados, as leituras dos géis foram realizadas com base na presença ou ausência da banda de resistência. Utilizou-se o padrão de bandas apresentados pelos controles resistentes e suscetíveis comparando-os com as bandas dos híbridos F₁.

4.3. Avaliações fenotípicas

Foram avaliadas nove características morfoagronômicas dos cafeeiros nos anos de 2016 e 2017 (Tabela 5).

Tabela 5. Descrição das características fenotípicas avaliadas nos anos de 2015 e 2016 no campo experimental do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa. DFP-Fundão,

Características		Descrição
Produção	(PRO)	Litros de café recém colhido por planta
Vigor vegetativo	VIG	Avaliado por notas de 1 a 10. 1: Planta totalmente depauperada. 10: Planta considerada com vigor máximo
Uniformidade de maturação dos frutos	(UMT)	Notas de 1 a 4. 1 = uniforme; 2 = medianamente uniforme; 3 = medianamente desuniforme; 4 = desuniforme.
Tamanho dos frutos maduros	(TF)	Avaliado por notas de 1 a 3. Nota 1 = pequeno, 2 = médio, 3 = grande.
Altura de Planta (cm)	(API)	Medida da ramificação ortotrópica mais desenvolvida, do nível do solo até o último ponto apical do cafeeiro com o auxílio de uma trena métrica afixada em uma haste de madeira
Severidade Ferrugem	(FER)	Notas de 1 a 5. 1 = ausência de pústulas e reações de hipersensibilidade; 2 = poucas folhas com pústulas sem esporos (“flecks”) e com reações de hipersensibilidade; 3 = poucas pústulas por folha com alta produção de esporos e pouco distribuídas; 4 = média quantidade de pústulas por folha, distribuídas na planta com alta produção de esporos; 5 = alta quantidade de pústulas com alta produção de esporos e alta desfolha da planta. OBS: Plantas com nota 1 ou 2 = Resistentes; 3 a 5 = Suscetíveis.
Severidade Cercosporiose	(CER)	Notas de 1 a 5. Nota 1: sem cercóspora; 2 a 5: folhas com cercóspora. OBS.: 2 =baixa incidência e 5 =alta incidência
Infestação de Bicho-Mineiro	(BM)	Notas de 1 a 5. Nota 1: sem Bicho-Mineiro; 2 a 5: com Bicho-Mineiro.
Nº de pares de ramos plagiotrópicos	(NRP)	Número de pares de ramos plagiotrópicos na haste principal

4.3.1 Estimativas de parâmetros genéticos a partir dos dados fenotípicos

As análises dos dados fenotípicos foram realizadas considerando os modelos lineares mistos (REML/BLUP), por meio do *software* Selegen-REML/BLUP (RESENDE, 2016), cujos componentes de variância são estimados pelo método da máxima verossimilhança restrita (REML) e os valores genotípicos preditos pela melhor predição linear não viesada (BLUP).

Foi realizada análise de deviance (ANADEV) para nove características fenotípicas avaliadas. A ANADEV foi realizada considerando modelo completo e o efeito entre híbridos. A estimação da razão de verossimilhança foi obtida pela diferença entre as estimativas dos valores de deviance no modelo reduzido (sem o efeito testado) e o modelo completo. A significância do efeito foi verificada pelo teste da razão de máxima verossimilhança (LRT) por meio do teste de qui-quadrado, aos níveis de 1% e 5% de probabilidade, com 1 grau de liberdade.

A estimação dos parâmetros genéticos foi realizada pela análise individual das nove características utilizando o seguinte modelo genético-estatístico:

$$y = X_m + Z_g + W_p + T_s + e$$

y: é o vetor de dados,

m: é o vetor dos efeitos das combinações medição-repetição (assumidos como fixos) somados à média geral,

g: é o vetor dos efeitos genotípicos (assumidos como aleatórios),

p: é vetor dos efeitos de parcela (aleatórios),

s: é vetor dos efeitos de ambiente permanente (aleatórios),

e: é o vetor de erros ou resíduos (aleatórios).

As letras maiúsculas representam as matrizes de incidência para os referidos efeitos. O vetor m contempla todas as medições em todas as repetições e ajusta simultaneamente para os efeitos de repetições, medição e interação repetição x medição.

4.3.2 Índice de seleção

Todas as características significativas pela análise de deviance foram consideradas no cálculo do índice de seleção, realizadas no *software* Selegen-REML/BLUP (RESENDE, 2016). Para o cálculo do índice de seleção, foi utilizado a metodologia do índice de *rank*-médio de Mulamba e Mock (1978), com adaptações. Este índice consistiu em classificar os indivíduos em ordem favorável ao melhoramento para cada característica analisada. Após a classificação, foi calculada a média dos *ranks* e estimados os ganhos com a seleção.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Certificação de cruzamentos

Por meio da análise de certificação de cruzamentos, foram identificados 134 descendências híbridas (93%) que apresentaram os alelos dos seus respectivos genitores (Tabela 6). Este resultado certificou que ocorreu a hibridação correspondente aos cruzamentos de interesse realizados pelo programa de melhoramento (Figura 5). Por outro lado, quatro indivíduos (3%), C1-3, C1-6, C1-7 e C1-8, apresentaram apenas a banda do genitor feminino, sendo, portanto, considerados indivíduos resultantes de autofecundação. Os seis cafeeiros C5-6, C8-6, C9-3, C11-5, C12-11 e C12-12 (4%)

não corresponderam a nenhum dos cruzamentos realizados, portanto foram classificados como mistura (4%) (Tabela 6). Na figura 5 e 6 são apresentados os indivíduos dos cruzamentos C9T e C11T identificados como híbridos, autofecundação e mistura, obtidos por meio da amplificação utilizando o primer SSR95.

Tabela 6. Certificação de cruzamentos de híbridos F₁ de interesse para o melhoramento genético do cafeeiro, utilizando marcadores SSR.

Cruzamento	Nº Híbridos	Autofecundação	Mistura
C1T: Paraíso MG H 419-1 x H484-2-18-2	8	4	-
C2T: Paraíso MG H 419-1 x UFV 311-63	12	-	-
C3T: Paraíso MG H 419-1 x Arara	12	-	-
C4T: Catiguá MG2 x UFV 311-63 planta F3	12	-	-
C5T: Catiguá MG2 x Arara	11	-	1
C6T: Catiguá MG2 x Acauã Novo	12	-	-
C7T: Oeiras MG 6851 x Arara	12	-	-
C8T: Oeiras MG 6851 x Acauã Novo	11	-	1
C9T: Oeiras MG 6851 x Siriema	11	-	1
C10T: H484-2-18-2 x Acauã Novo	12	-	-
C11T: H484-2-18-12 x Siriema	11	-	1
C12T: UFV 311-63 x Siriema	10	-	2
Total	134	4	6
%	93%	3%	4%

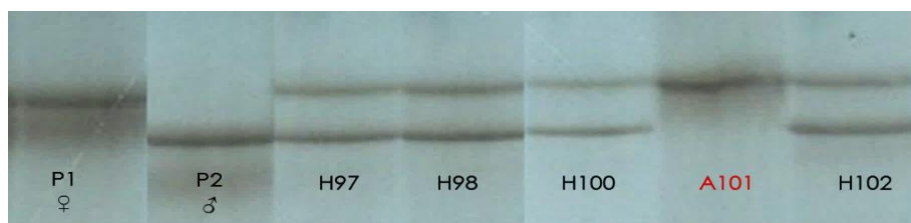


Figura 5. Certificação do cruzamento C9T; Genitores: P1= Oeiras MG 6851 e P2 = Siriema. Híbridos F₁: H97 = C9-1, H98 = C9-2, H100 = C9-4 e H102 = C9-6. Autofecundação 101 = C9-5. Bandas obtidas por meio da amplificação utilizando *primer* SSR95



Figura 6. Certificação do cruzamento C11T, Genitores: P1= H484-2-18-2 e P2 = Siriema. Híbridos: H122 = C11-2, H123=C11-3, H127=C11-7 e H128=C11-8. Mistura: M125. Bandas obtidas por meio da amplificação utilizando *primer* SSR95.

A provável explicação para os indivíduos (C1-3, C1-6, C1-7 e C1-8) que apresentaram apenas a banda do genitor feminino é a ocorrência da autofecundação. Isso pode ter ocorrido devido ao fato de *C. arabica* ser uma espécie autógama e apresentar cleistogamia, ou seja, a fecundação ocorre antes da abertura floral. No melhoramento dessa espécie, o processo de hibridação é realizado manualmente e com emasculação das flores que serão utilizadas como genitor feminino. Apesar de vários cuidados serem tomados, a autofecundação pode ocorrer antes de realizar a emasculação e o cruzamento de interesse.

Valencia *et al.* (2017), objetivando determinar a presença do marcador genético BA-124-Kf associado ao gene *SH3* em uma população F₁ proveniente de cruzamentos a cultivar de café Caturra com os acessos S288/23 e BA-2, identificaram plantas que não apresentaram a banda associada, atribuindo este resultado ao fato de não ter ocorrido a respectiva hibridação. Dessa maneira, ressaltasse a importância da realização da certificação de cruzamentos nos programas para ter a certeza do material genético a ser usado no avanço de gerações.

Os indivíduos que apresentaram marcas diferentes dos seus genitores, possivelmente, foram originados de polinização com pólen externos; misturas de sementes ou um possível erro na identificação na coleta do material vegetal para as análises. Na condição de um programa de melhoramento, podem acontecer mistura de sementes durante o período de colheita devido ao grande número de amostras que geralmente são utilizadas. Portanto, os marcadores moleculares podem ser usados eficientemente para confirmar a verdadeira identidade de plantas individuais. Yashitola *et al.* (2002) utilizaram marcadores SSR e STS para confirmar a pureza genética de híbridos no arroz, concluindo que esta prática é consideravelmente mais simples do que os testes padrão de crescimento que envolvem o desenvolvimento da planta até a maturidade e a avaliação das características morfológicas e florais.

Em programas de melhoramentos, principalmente para *C. arabica* que é uma espécie perene e de ciclo longo, é fundamental identificar desde o início os indivíduos contaminantes (provenientes de autofecundação ou misturas). Esses indivíduos irão comprometer os ganhos nas próximas gerações. Além disso, essa estratégia evita custos financeiros e de tempo para fenotipagem de plantas que não são de interesse para o programa de melhoramento. Portanto, a metodologia de certificação de cruzamentos por marcadores moleculares é uma ferramenta útil para assistir os programas de melhoramento genético desta espécie, por fornecer maior certeza dos genótipos que

está sendo levado para os próximos ciclos de seleção, além de garantir uma redução de tempo, mão de obra e recurso financeiro.

Diante disso, as 10 plantas consideradas contaminantes foram eliminadas e desconsideradas neste estudo. Além disso, para dar continuidade nas demais análises tanto genotípicas como fenotípicas, todos os dados foram padronizados de modo que os indivíduos genotipados foram os mesmos indivíduos avaliados fenotipicamente. Por conseguinte, outros 13 indivíduos foram descartados por não apresentar dados fenotípicos ou estes não coincidirem com os respectivos dados genotípicos. Isto devido a que a planta avaliada fenotipicamente não foi a mesma genotipada ou devido a falhas ocorridas no campo. Desse modo, os resultados referentes as próximas análises genéticas e fenotípicas foram obtidas com base em 121 indivíduos da geração F₁ (Tabela 2).

5.2. Diversidade genética

Os estudos de diversidade genética são importantes para o conhecimento da estrutura e distribuição da variação entre e dentro das populações. E na seleção recorrente, a manutenção dessa diversidade ao longo dos ciclos é essencial para o ganho contínuo de seleção. Neste contexto, marcadores moleculares distribuídos aleatoriamente no genoma de *C. arabica* foram usados para a obtenção da diversidade das populações. Com o resultado da análise de variância molecular (AMOVA) (Tabela 7), demonstrou-se a existência de diversidade genética entre e dentro das populações híbridas estudadas. A quantidade de variação genética obtida mostrou que 75,5% da variabilidade genética encontra-se entre as populações e 24,5% dentro das populações

Tabela 7. Análise de variância molecular (AMOVA) para 121 indivíduos de 12 populações híbridas avaliadas quanto à diversidade genética entre e dentro das populações.

Fonte de Variação	Grau de liberdade	Soma de quadrados	Quadrados médios	Componentes de variância	% da variação
Entre populações	11	118108	10737	0,1033	75,513
Dentro de populações	109	36515	0,0335	0,0335	24,487
Total	120	154623	0,1289		
Estatística ØST = 0,7551					

A matriz de distâncias genética euclidiana média entre os 121 híbridos (Tabela 2) apresentou valores de 0 a 0,676. Os valores iguais a 0 obtidos entre 161 pares de indivíduos indicam que não há distâncias genética entre eles.

A continuação, na descrição dos próximos resultados, os códigos utilizados para descrever os distintos cruzamentos e seus respectivos híbridos se encontram representados na tabela 2.

Foram observadas as maiores distâncias genéticas entre os cruzamentos C5T (Catiguá MG2 x Arara) e os cruzamentos C12T (UFV 311-63 planta x Siriema), C9T (Oeiras MG 6851 x Siriema) e C4T (Catiguá MG2 x UFV 311-63). Mas especificamente as maiores distâncias genéticas foram observadas entre os híbridos C5-2/C12-4 (0,676); C5-2/ C12-3, C12-5, C12-6, C12-10 (0,6470); C5-2/C9-8, C12-9, C9-10, C9-12 (0,617); C5-2/C4-9 (0,6026) e C5-2/C12-2 (0,5882), indicando que esses indivíduos estão mais distantes geneticamente. Por meio da análise de agrupamento UPGMA, foi obtido o dendrograma que separou três grupos principais (Figura 7).

No primeiro grupo foram alocados 25 híbridos F₁ pertencentes aos cruzamentos C3T (Paraíso MG H419-1 x Arara), C4T, C5T e C6T (Catiguá MG2 x Acauã Novo) (Tabela 2). Os indivíduos do cruzamento C3T se distribuíram em dois grupos diferentes, neste primeiro grupo ficaram os híbridos C3-1, C3-5, C3-7, C3-9 e C3-10 (Tabela 2). Para a população C4T apenas o indivíduo C4-7 se alocou neste grupo.

O segundo grupo foi constituído por 31 indivíduos, estes indivíduos compõem as populações C2T (Paraíso MG H419-1 x UFV 311-63), C4T (Catiguá MG2 x UFV 311-63) e C12T (UFV 311-63 x Siriema). O terceiro grupo apresentou 56 indivíduos distribuídos em três subgrupos. O primeiro subgrupo (3a) foi formado por 36 indivíduos que pertencem as populações híbridas C1T (Paraíso MG H419-1 x H484-2-18-2), C3T, C7T (Oeiras MG 6851 x Arara), C10T (H484-2-18-2 x Acauã Novo) e C11T (H484-2-18-12 x Siriema). No entanto, nem todos os indivíduos pertencentes à população C3T e C10T foram alocadas nesse subgrupo. A população C3T foi representada apenas pelos indivíduos C3-8, C3-11 e C3-12. No segundo subgrupo (3b) ficaram alocados as populações híbridas C8T (Oeiras MG 6851 x Acauã Novo) e C10T, contendo 18 indivíduos. O terceiro subgrupo (3c) alocou todos os 11 híbridos da população C9T (Oeiras MG 6851 x Siriema) avaliada.

As três populações (C2T, C4T e C12T), que foram alocados no grupo 2 do dendrograma, tem como genitor comum o acesso UFV 311-63, que possui o gene *SH3* que confere resistência à ferrugem. Este genitor foi originado a partir do cruzamento de híbridos interespecíficos entre *C. arabica* e *C. liberica*, sendo sua resistência proveniente da espécie *C. liberica*. De acordo com as análises de seleção assistida por marcador molecular, as progênies do acesso UFV 311-63 foram as únicas que apresentaram o gene *SH3* (Tabela 7), o que explica o fato destas três populações

estarem alocadas no mesmo grupo. Estes indivíduos podem ser uma fonte importante de resistência uma vez que carregam o alelo do gene *S_{H3}*.

As demais populações estudadas também foram agrupadas conforme os seus genitores em comum, porém, estas não apresentam o gene *S_{H3}*. No entanto, por serem oriundas de cafeeiros do grupo Híbrido de Timor apresentam outros genes de resistência a ferrugem e CBD. As populações C4T, C5T e C6T que ficaram alocadas no grupo 1 são progênies do genitor Catiguá MG 2. Já as populações C1T e C3T tem como genitor comum a cultivar Paraíso MG H 419-1, a população C3T e C7T tem em comum o genitor Arara e foram alocados no grupo 3a, da mesma forma que as populações C10T e C11T que tem como genitor comum o acesso H484-2-18-12. As populações C8T e C10T tem como genitor comum a cultivar Acauã Novo e ficaram alocados no grupo 3b.

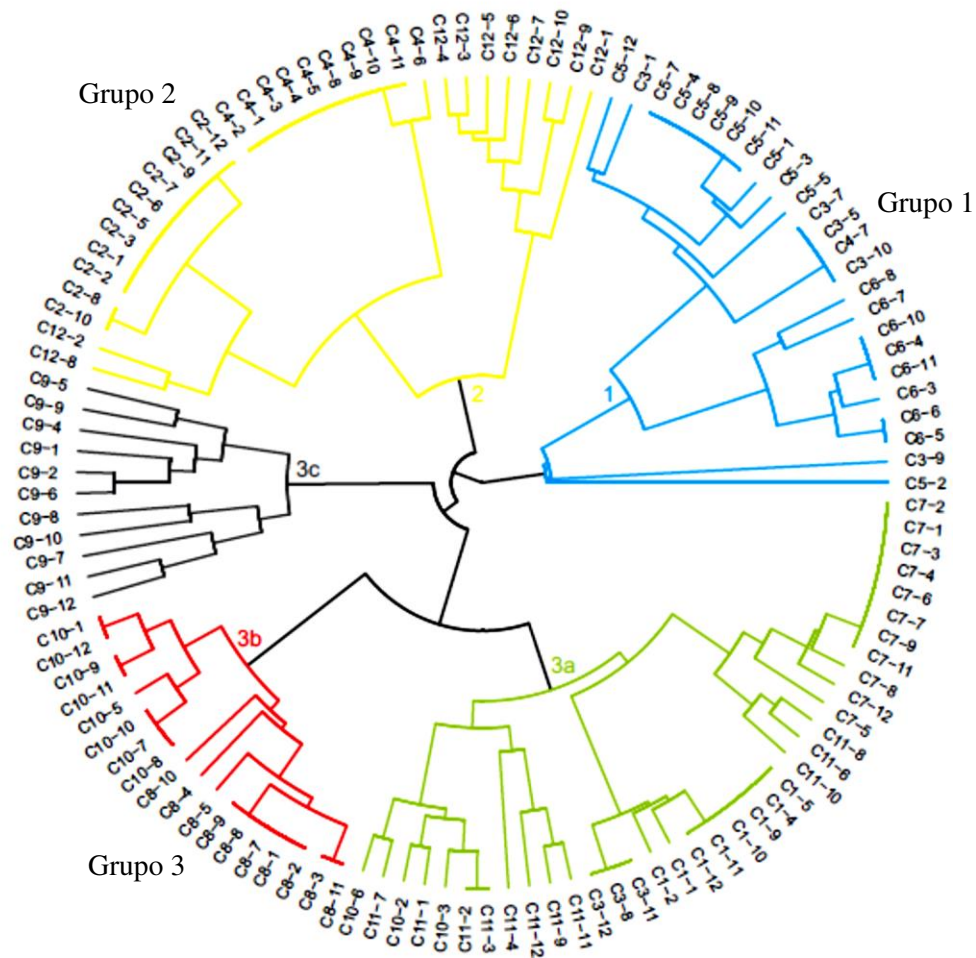


Figura 7. Dendrograma gerado pela análise de 16 marcadores moleculares obtido pela técnica UPGMA, com base na matriz de dissimilaridade no complemento aritmético do índice não ponderado de 121 híbridos de *Coffea arabica*.

Pela distância genética e agrupamento observou-se que a diversidade genética, dentro das populações apresentam variação genética. As populações C1T, C2T, C4T, C6T, C7T e C8T não apresentaram segregação expressiva ou ramificações que distanciaram os híbridos F₁ dentro de cada população apresentando, portanto, menor variabilidade, o que é esperado devido ao fato do café arábica ser uma espécie autógama. As populações C5T, C9T, C10T, C11T e C12T tiveram um comportamento intermediário, pois situaram-se no mesmo grupo que seus respectivos híbridos, mas algumas plantas da mesma população foram alocadas separadamente. Já a população C3T apresentou plantas alocadas em grupos diferentes. Portanto, esta população foi considerada a que apresenta maior variabilidade genética.

Por meio dos resultados obtidos com a análise de diversidade genética no presente estudo, foi possível observar variabilidade entre e dentro das populações híbridas. Esta informação será utilizada para direcionar os futuros cruzamentos, de forma que se espera que o cruzamento entre populações mais divergentes resulte em maior ganho genético. Além disso, é possível identificar a diversidade dentro de cada população e assim selecionar os melhores indivíduos para serem conduzidos nas próximas gerações.

Nesse contexto, os cruzamentos com maior potencial com base na sua diversidade genética são entre os indivíduos da população híbrida C5T com os da população C12T, pois estes apresentaram uma maior distância genética. A análise de diversidade ainda permite identificar dentro das populações os indivíduos mais divergentes e assim direcionar os cruzamentos. Desse modo, o indivíduo C5-2 e o indivíduo C12-4 podem ser cruzados por apresentarem a maior distância genética entre eles.

Por outro lado, foram identificados indivíduos de uma mesma população alocados em grupos diferentes. Esta informação pode ser aproveitada para explorar a diversidade dentro da população e assim direcionar o cruzamento com os indivíduos mais divergentes, além de complementares com respeito as marcas de resistência que estes híbridos possuem. Assim, o cruzamento C3T apresentou a maior diversidade genética dentro da população, e essa pode ser explorada para direcionar o cruzamento entre os indivíduos mais contrastantes, portanto, o híbrido F₁ C3-9 do grupo 1 pode ser cruzado com os híbridos C12-2 e C12-4 do grupo 2 por apresentar as maiores distâncias genéticas entre eles de 0,5735. Os híbridos C3-8 e C3-11 do grupo 3a, podem ser cruzados com os híbridos C12-10, C12-9, C12-7, C4-8 e C4-9 que apresentam uma distância genética entre eles de (0,3676 a 0,2352). É válido salientar que estes cruzamentos se

complementam, já que os indivíduos do cruzamento C3T do grupo 3a possuem o gene de resistência do GL 2 em homozigoses, além do GL5 e o gene *Ck-1* em heterozigoses, por outro lado os híbridos dos cruzamentos C4T e C12T possuem o alelo do gene de resistência *S_{H3}*, além do cruzamento C4T possuir todos os alelos dos genes analisados no presente estudo em heterozigoses.

A espécie *C. arabica* é considerada de base genética estreita, atribuída a sua origem, domesticação, tipo de reprodução (DONINI *et al.*, 2007; GELETA *et al.*, 2012; LASHERMES *et al.*, 2016) e ao baixo número de plantas que foram introduzidas no Brasil. Dessa forma, o uso de marcadores moleculares que permitam identificar a variabilidade dessa espécie é essencial para o sucesso de seu programa de melhoramento genético. Com base no estudo de diversidade genética realizado no presente trabalho, foi possível observar diversidade genética entre e dentro das populações híbridas. Essa variabilidade encontrada poderá ser utilizada para a continuidade do programa de seleção recorrente dessa espécie.

5.3. Seleção assistida por marcadores moleculares.

5.3.1. Seleção assistida para o gene *S_{H3}* que confere resistência a *H. vastatrix*

Dos 121 híbridos analisados, 31 (25,6%) foram identificados como portadores do gene *S_{H3}* (Tabela 7). Foram considerados apenas os indivíduos que apresentaram os quatro marcadores. Estes cafeeiros pertencem aos cruzamentos C2T, C4T e C12T, que têm como genitor comum o acesso UFV 311-63. O genitor UFV 311-63, na sua genealogia, tem como fonte de resistência o gene *S_{H3}* oriundo de seleções indianas que são derivadas dos cafeeiros tetraplóides S.26 e S.31 (*C. arabica* × *C. liberica*) retrocruzados ou não com Kent ou Coorg e transportam os genes *S_{H2}*, *S_{H3}* e *S_{H5}* (ALKIMIM *et al.*, 2017). Isto explica porque somente os cruzamentos realizados com este genitor apresentaram o gene de resistência *S_{H3}*.

Alguns indivíduos não apresentaram todos os marcadores ligados ao gene *S_{H3}*. O híbrido C5-12 amplificou somente os marcadores SP-M16-*S_{H3}* e BA-124-12K-f e o indivíduo C11-5 amplificou apenas o marcador SP-M16-*S_{H3}*. Esse resultado indica que pode ter ocorrido recombinações nestes indivíduos, podendo, portanto, resultar na perda do alelo do gene resistência.

Tabela 7. Relação de híbridos portadores do alelo do gene S_{H3} com os marcadores SP-M16- S_{H3} , Sat244, BA-48-21OR e BA-124-12K-f.

Híbridos portadores do alelo do gene S_{H3}				
C2-1	C2-9	C4-4	C12-1	C12-8
C2-2	C2-10	C4-5	C12-2	C12-9
C2-3	C2-11	C4-6	C12-3	C12-10
C2-5	C2-12	C4-8	C12-4	-
C2-6	C4-1	C4-9	C12-5	-
C2-7	C4-2	C4-10	C12-6	-
C2-8	C4-3	C4-11	C12-7	-

Segundo Mahé et al. (2008), os marcadores SP-M16- S_{H3} e BA-48-210-f flanqueiam o gene S_{H3} , sendo que SP-M16- S_{H3} se encontra ligado a uma distância de 1,8 cM e BA-48-210-f a 0,6 cM. Os marcadores BA-124-12K e Sat244 co-segregam (0 cM) com o gene S_{H3} . No entanto, segundo Alkimin et al. (2017), esta distância pode variar dependendo da população em estudo e do número de indivíduos analisados. O híbrido C5-12 não amplificou o BA-48-210-f e Sat 244, podendo ter ocorrido uma recombinação desse lado do gene, resultando na perda do S_{H3} . O indivíduo C11-5 só amplificou o marcador mais distante, dessa forma, provavelmente não contém alelo do gene de interesse. Portanto, considerou-se que esses dois indivíduos não possuem o gene S_{H3} .

Valencia et al. (2017), avaliaram oito populações F_1 , que tem na sua genealogia os genitores S288/23 e BA-2, que são portadores do gene S_{H3} , utilizando apenas o marcador BA-124-Kf. No presente trabalho foram usados quatro marcadores moleculares ligados e flanqueando o gene S_{H3} para ter maior acurácia da presença do gene em cada indivíduo e foram selecionados como híbridos resistentes apenas os que apresentaram os quatro marcadores ligados ao gene S_{H3} .

Para avanço de geração num programa de melhoramento, o ideal é selecionar genótipos resistentes homocigotos. Três dos quatro marcadores moleculares utilizados (SP-M16- S_{H3} , Sat244 e BA-48-21OR), por serem codominantes, permitiram a análise de homocigose/heterocigose. Observou-se que todos os indivíduos identificados como portadores do gene S_{H3} foram resistentes heterocigotos para estes três marcadores. Sendo obtido o alelo de resistência do genitor UFV 311-63 que é resistente heterocigoto para o gene S_{H3} . Os outros genitores com quem foram realizados os cruzamentos são homocigotos recessivos, por tanto não foi possível obter indivíduos resistentes homocigotos para o gene S_{H3} no presente trabalho. Esses cafeeiros considerados heterocigotos podem ser utilizados no programa de melhoramento.

No entanto, no avanço das próximas gerações, os marcadores moleculares devem ser novamente utilizados para selecionar os indivíduos que apresentem o gene, uma vez que a população poderá apresentar indivíduos com e sem o gene.

Esses marcadores moleculares permitiram analisar apenas a presença do gene originário de *C. liberica* (S_H3). No entanto, as populações em melhoramento podem possuir outros genes que conferem resistência a outras raças de *H. vastatrix* e serem resistentes ao patógeno. As populações de melhoramento também foram formadas com base em outras fontes de resistência, cafeeiros do grupo Híbrido de Timor. Os derivados de Híbrido de Timor são portadores de diferentes combinações dos genes originados de *C. canephora*, sendo eles S_H6 , S_H7 , S_H8 , S_H9 e $S_H?$ (MAHÉ *et al.*, 2008; PRAKASH *et al.*, 2004). Portanto, outros marcadores moleculares foram analisados nessas populações. Essa análise permite inclusive, identificar cafeeiros contendo genes piramidados para diferentes raças de *H. vastatrix*.

5.3.2. Seleção assistida para QTL de resistência as raças I, II e patótipo 001 de *H. vastatrix* usando marcadores SCAR, CAP e SSR

Nesta análise molecular foram identificados 106 indivíduos (87%) como portadores dos locos de resistência as raças I, II e patótipo 001 de *H. vastatrix*. Com os marcadores do grupo de ligação 2 (Tabela 8), obteve-se 67 cafeeiros (55%) resistentes heterozigotos (Bb), e 39 (32%) resistentes homozigotos (BB). Com os marcadores do grupo de ligação 5 obteve-se 48 indivíduos (39.6%) resistentes (C_) (Tabela 9).

Na descrição dos resultados a seguir, a identificação de indivíduos resistentes heterozigotos com o marcador CaRHv8 foi realizada em associação com o marcador SSR16. No cruzamento CT1, 8 híbridos foram resistentes homozigotos para os marcadores do GL2. Entretanto, todos os indivíduos deste cruzamento foram suscetíveis para os dois marcadores do GL5. No cruzamento C2T todos os indivíduos foram resistentes e heterozigotos para os marcadores do GL2, e, seis indivíduos foram resistentes para os marcadores do GL5. O indivíduo C2-12 somente apresentou a banda do marcador CaRHv10_CAP.

Os cruzamentos C3T, C4T e C5T, tiveram todos os indivíduos resistentes e heterozigotos para os dois grupos de ligação, menos os indivíduos C3-3 e C3-6 que foram sucessíveis para os marcadores do GL2, e os indivíduos C4-6 e C5-2 que foram suscetíveis para os marcadores do GL5. Os cafeeiros dos cruzamentos C6T, C8T e C10T foram na sua maioria resistentes

homozigotos para ambos os marcadores do GL2, exceto os indivíduos C6-3 e C10-3 que foram resistente heterozigoto para o marcador SSR16; e os indivíduos C8-12, C10-2 e C10-5, que foram resistentes e heterozigotos com o marcador CaRHv8 associado ao SS16.

Tabela 8. Relação de híbridos portadores de loco/QTL de resistência as raças I, II e patótipo 001 de *H. vastatrix* com os marcadores CaRHv8 e SSR16 que pertencem ao grupo de ligação 2.

Resistentes Homozigotos (BB)						
C1-1	C1-11	C6-8	C8-4	C8-8	C10-7	C11-1
C1-2	C1-12	C6-10	C8-5	C8-9	C10-8	C11-9
C1-4	C6-4	C6-11	C8-7	C8-10	C10-9	C11-11
C1-5	C6-5	C8-1	C9-4	C8-11	C10-10	-
C1-9	C6-6	C8-2	C9-5	C10-1	C10-11	-
C1-10	C6-7	C8-3	C9-10	C10-6	C10-12	-
Resistentes Heterozigotos (Bb)						
C2-1	C2-12	C4-2	C5-1	C5-12	C10-2	C11-12
C2-2	C3-1	C4-3	C5-2	C6-3	C10-3	C12-1
C2-3	C3-5	C4-4	C5-3	C9-1	C10-5	C12-5
C2-5	C3-7	C4-5	C5-4	C9-2	C11-2	C12-7
C2-6	C3-8	C4-6	C5-5	C9-6	C11-3	C12-8
C2-7	C3-9	C4-7	C5-7	C9-7	C11-4	C12-9
C2-8	C3-10	C4-8	C5-8	C9-8	C11-6	C12-10
C2-9	C3-11	C4-9	C5-9	C9-9	C11-7	-
C2-10	C3-12	C4-10	C5-10	C9-11	C11-8	-
C2-11	C4-1	C4-11	C5-11	C9-12	C11-10	-

Tabela 9. Relação de híbridos portadores de loco/QTL de resistência as raças I, II e patótipo 001 de *H. vastatrix* com os marcadores CaRHv9 e CaRHv10_CAP pertencem ao grupo de ligação 5.

Resistentes (C-)						
C2-2	C3-9	C4-5	C5-3	C5-11	C6-8	C7-6
C2-6	C3-10	C4-7	C5-4	C5-12	C6-10	C7-7
C2-8	C3-11	C4-8	C5-5	C6-3	C6-11	C7-8
C2-9	C4-1	C4-9	C5-7	C6-4	C7-1	C7-9
C2-10	C4-2	C4-10	C5-8	C6-5	C7-3	C7-11
C3-1	C4-3	C4-11	C5-9	C6-6	C7-4	C7-12
C3-8	C4-4	C5-1	C5-10	C6-7	C7-5	-

Todos os híbridos dos cruzamentos C6T e C7T foram resistentes (C-), com os marcadores do GL5, com exceção do indivíduo C7-2, que foi suscetível. Os cruzamentos C8T, C9T, C10T, C11T e C12T não apresentaram nenhum indivíduo resistente para os marcadores do GL5. O cruzamento C11T originou seis híbridos resistentes homozigotos e cinco resistentes heterozigotos com o marcador CaRHv8 e para o marcador SSR16 apresentou quatro resistentes e homozigotos e sete

heterozigotos. O cruzamento C12T apresentou seis indivíduos resistente heterozigoto para os marcadores do GL2.

Do total da população de híbridos analisados no presente estudo, foram identificados com o marcador CaRHv8 53 indivíduos resistentes homozigotos (39.5%) e associado ao marcador SSR16 62 resistentes heterozigotos (46.2%). Com o marcador SSR16 identificaram-se 49 resistentes homozigotos (36.6%) e 65 resistentes e heterozigotos (48.5%). Com os marcadores CaRHv9 e CaRHv10_CAP identificaram-se 61 (45.5%) e 64 (47.7%) híbridos resistentes (C-), respectivamente. Das 12 populações avaliadas, destacasse o cruzamento C6T (Catiguá MG2 x Acauã Novo) (Tabela 10), que apresentou toda sua progênie resistente (BBC-) para os quatro marcadores ligados aos dois QTL de resistência às raças I, II e patótipo 001 de *H. vastatrix*. Portanto, estes híbridos constituem-se em um material genético promissor para ser selecionado e conduzido nas próximas gerações.

A resistência dos cafeeiros as raças I, II e patótipo 001 de *H. vastatrix* é conferida por dois locos dominantes independentes (PESTANA et al., 2015). Portanto a presença de um alelo dominante em um dos dois locos é suficiente para que o indivíduo seja resistente e possa ser selecionado para avançar geração (ALMEIDA, 2019). Assim, os indivíduos da tabela 10 apresentaram os dois locos piramidados, mas, foram também identificados indivíduos com genótipos BBcc, Bbcc, bbC- que não apresentaram os dois locos, mas são resistentes e poderão ser selecionados para o avanço de próximas gerações.

Tabela 10. Relação de híbridos resistentes portadores de QTL de resistência as raças I, II e patótipo 001 de *H. vastatrix* com os 4 marcadores CaRHv8, SSR16, CaRHv9 e CaRHv10_CAP pertencentes aos grupos de ligação 2 e 5

Cruzamento C6T Genótipo BBC-			
C6-3	C6-5	C6-7	C6-10
C6-4	C6-6	C6-8	C6-11
Genótipo BbC-			
C2-2	C3-8	C4-5	C5-5
C2-6	C3-9	C4-7	C5-7
C2-8	C3-10	C4-8	C5-8
C2-9	C3-11	C4-9	C5-9
C2-10	C3-12	C4-10	C5-10
C2-12	C4-1	C4-11	C5-11
C3-1	C4-2	C5-1	C5-12
C3-5	C4-3	C5-3	-
C3-7	C4-4	C5-4	-

5.3.3. Seleção assistida para o gene *Ck-1* que confere resistência a *C. kahawae*

Dos 121 cafeeiros analisados com os marcadores CBD-Sat235 e CBD-Sat207, 70 indivíduos (57,8%) apresentaram o gene *Ck-1* que confere a resistência a *C. kahawae*, dos quais 60 indivíduos (49,5%) foram heterozigotos e 10 indivíduos (8,3%) homozigotos para o gene *Ck-1* (Tabela 11).

O cruzamento C1T apresentou sete híbridos resistentes homozigotos com o marcador SAT207 e sete heterozigotos com o marcador SAT235. No cruzamento CT2 identificaram-se 12 indivíduos resistentes heterozigotos com o marcador SAT 207, porém, com o marcador SAT235 somente dois destes indivíduos foram resistentes. Neste cruzamento apenas foram considerados resistentes heterozigotos os dois indivíduos que amplificaram os dois marcadores.

Com o cruzamento C3T, oito híbridos foram resistentes heterozigotos com o marcador SAT 235 e sete foram resistentes homozigotos com o marcador SAT 207. No cruzamento C4T, 10 híbridos foram resistentes heterozigotos para o marcador SAT235, nove híbridos resistentes heterozigotos para o marcador SAT207 e um resistente homozigoto para este mesmo marcador.

Nos cruzamentos C6T, C7T, C10T e C11T todos os 12 híbridos foram resistentes heterozigotos para os dois marcadores e somente o cruzamento C5T (Catiguá MG2 x Arara), destacou-se por apresentar 10 indivíduos resistentes homozigotos para ambos os marcadores.

Tabela 11. Relação de híbridos portadores de gene *Ck-1* que confere resistência à *C. kahawae* com os marcadores(CBD-Sat235 e CBD-Sat207).

Heterozigotos Dd					
C1-2	C3-5	C4-4	C6-5	C7-6	C10-8
C1-4	C3-7	C4-5	C6-6	C7-7	C10-9
C1-5	C3-8	C4-7	C6-7	C7-8	C10-10
C1-9	C3-9	C4-8	C6-8	C7-9	C10-11
C1-10	C3-10	C4-9	C6-10	C7-11	C11-1
C1-11	C3-11	C4-10	C6-11	C7-12	C11-2
C1-12	C3-12	C4-12	C7-1	C10-2	C11-3
C2-8	C4-1	C5-12	C7-2	C10-3	C11-4
C2-10	C4-2	C6-3	C7-3	C10-5	C11-6
C3-1	C4-3	C6-4	C7-4	C10-7	C11-7
Homozigotos DD					
	C5-1	C5-5	C5-8	C5-11	
	C5-2	C5-7	C5-9	-	
	C5-3	C5-4	C5-10	-	

Nesta análise, foram identificados cafeeiros contendo apenas o marcador SAT235 (sete indivíduos) e outros contendo apenas o marcador SAT207 (20 indivíduos), sugerindo recombinações. Segundo Gichuru *et al.* (2008), o marcador SAT207 está a uma distância de 17,2 cM e a eficiência do uso dos marcadores moleculares na seleção assistida é decorrente da distância e orientação dos marcadores em relação ao gene de interesse. Para ter uma alta eficiência é indispensável que a distância entre os marcadores e o gene seja a menor possível, assim se diminui a possibilidade de ocorrer recombinações entre o marcador e o gene de interesse (FRISCH e MELCHINGER 1999).

O marcador SAT235 co-segrega com o gene *Ck-1* (GICHURU *et al.*, 2008), porém foram encontrados cafeeiros contendo apenas o outro marcador, SAT207. Isso pode ser explicado pela ocorrência de recombinação, fazendo com que esses cafeeiros tenham perdido o gene e o marcador que co-segrega com ele. Mas também pode existir uma distância entre o gene e o marcador SAT235 que não foi encontrada no trabalho de Gichuru *et al.* (2008), devido ao tamanho reduzido da população estudada. Nesse caso, pode ter ocorrido recombinação entre o gene e esse marcador. Desta maneira, as plantas que apresentaram apenas um dos marcadores não foram consideradas contendo o gene *Ck-1*.

Na obtenção de indivíduos resistentes homozigotos foram identificados no geral, 39 híbridos resistentes homozigotos (BB) para o grupo de ligação 2, sendo que 10 destes indivíduos também possuem a resistência para o loco/QTL do grupo de ligação 5 (BBC-). Ademais identificaram-se 10 híbridos resistentes homozigotos para o gene *Ck-1* (DD). Conter estes indivíduos nas populações do programa de melhoramento é de grande importância, considerando que o ideal é a obtenção de indivíduos homozigotos resistentes para o avanço de gerações.

Por outro lado, foram identificados 11 híbridos (Tabela 12) dos cruzamentos C2T (Paraíso MG H419-1 x UFV 311-63) e C4T (Catiguá MG2 x UFV 311-63) contendo a piramidação dos diferentes alelos de resistência à ferrugem e a antracnose dos frutos CBD. Constituindo-se estes cafeeiros em um importante recurso para o programa de melhoramento genético que procura o desenvolvimento de cultivares com resistência múltipla e duradora. Assim, estes cafeeiros têm grande potencial de uso nos programas de melhoramento, por apresentar esta piramidação de genes pronta para ser aproveitada nas próximas gerações.

Tabela 12. Relação de híbridos portadores do gene *S_{H3}*, locos/QTL de resistência a raças I, II e patótipo 001 de *H. vastatrix* e o gene *Ck-1* que confere resistência a *C. kahawae* (AaBbC-Dd)

Híbridos resistentes a <i>H. vastatrix</i> e <i>C. kahawae</i>			
C2-8	C4-2	C4-5	C4-10
C2-10	C4-3	C4-8	C4-11
C4-1	C4-4	C4-9	-

5.4. Estimativas de parâmetros genéticos a partir dos dados fenotípicos

As populações de melhoramento foram também avaliadas usando nove características fenotípicas, sendo realizada a análise de deviance (ANADEV) (Tabela 13). Ao avaliar o efeito genético existente entre os híbridos, observou-se as características, produção (PRO), uniformidade de maturação dos frutos (UMT), incidência de Ferrugem (FER), infestação de Bicho-Mineiro (BM), número de pares de ramos plagiotrópicos (NRP) e altura de planta (ALP) não apresentaram efeitos significativos pelo teste da máxima verossimilhança (LRT) para o efeito entre híbridos, indicando ausência de variabilidade genética entre os híbridos para essas características.

O teste LRT apresentou efeito significativo para as características, vigor vegetativo (VIG), tamanho dos frutos maduros (TF) e incidência de cercosporiose (CER). Esse efeito significativo indica existência de variabilidade genética entre as progênes, o que permite um possível ganho de seleção para as características analisadas.

As três características que apresentaram significância são de grande importância para os programas de melhoramento. Segundo Severino *et al.* (2008), selecionar materiais com maior vigor vegetativo também é uma estratégia que pode aumentar a produtividade das cultivares, isso porque, vigor vegetativo tem um efeito direto sobre a produtividade de café (SEVERINO *et al.*, 2016).

Tabela 13. Análise de deviance (ANADEV) e significâncias do teste de razão da verossimilhança (LRT) referentes à análise conjunta de nove características morfológicas medidas nos anos de, 2015 e 2016, em *Coffea arabica*.

Variáveis	DEVIANCE		LRT (X ²)
	Modelo Completo	Efeito entre Híbridos	Efeito entre Híbridos
VIG	329,38	340,99	11,61 **
PRO	551,65	553,19	1,54 ^{ns}
UMT	11,63	12,29	0,66 ^{ns}
TF	-87,97	-78,9	9,07**
FER	-48,14	-47,46	0,68 ^{ns}
CER	136,86	142,79	5,93 *
BM	-99,12	-99,11	0,01 ^{ns}
NRP	1026,73	1026,73	0 ^{ns}
ALP	1638,24	1638,91	0,67 ^{ns}

** e * significativo a 1% e 5% de probabilidade, respectivamente, e ^{ns} não-significativo pelo teste qui-quadrado com 1 grau de liberdade para as características vigor vegetativo (VIG), produção (PRO), uniformidade de maturação dos frutos (UMT), tamanho dos frutos maduros (TF), incidência de ferrugem (FER), Infestação de Bicho-Mineiro (BM), incidência de cercosporiose (CER) em café arábica.

5.4.1. Índice de seleção

Todas as características significativas pela análise de deviance foram consideradas no cálculo do índice de seleção. Por meio do índice de *rank*-médio de Mulamba e Mock (1978) foram classificados os indivíduos em ordem favorável ao melhoramento, podendo identificar os indivíduos com os quais pode-se obter maiores ganhos com a seleção.

Na tabela 14 está apresentada a posição dos *rank*-médios, os ganhos com a seleção simultânea em porcentagem dos 121 híbridos analisados, com base nas características com efeito significativo pelo teste da razão de verossimilhança na análise de deviance (ANADEV), vigor vegetativo (VIG), tamanho dos frutos maduros (TF), incidência de cercosporiose (CER) (Tabela 13) e os genes de resistência a *H. vastatrix* e *C kahawae*, que possui cada híbrido em conjunto ou isoladamente.

Tabela 14. Índice de seleção de 121 híbridos, *rank*, *rank*-médio; ganho de seleção em porcentagem a partir das características VIG, TF, CER; e genes de resistência a *H. vastatrix* e *C kahawae*.

Híbrido	VIG	TF	CER	Rank-Médio	Ganho %	S_{H3}	*GL2	*GL5	<i>Ck-1</i>
C4-10	2	8	3	4,3	92,8	x	x	x	x
C3-9	3	17	9	9,7	84,0	-	x	x	x
C2-12	1	24	4	9,7	84,0	x	x	-	-
C3-8	5	5	25	11,7	80,7	-	x	x	x
C9-4	7	16	21	14,7	75,8	-	xx	-	-
C3-12	28	1	26	18,3	69,7	-	x	x	x
C8-5	54	4	10	22,7	62,5	-	xx	-	-
C12-1	34	29	16	26,3	56,5	x	x	x	-
C10-10	11	29	39	26,3	56,5	-	xx	-	x
C12-6	47	33	6	28,7	52,6	x	-	-	-
C9-6	13	70	5	29,3	51,5	-	x	-	-
C4-6	25	46	18	29,7	51,0	x	-	-	-
C2-10	6	49	36	30,3	49,9	x	x	x	x
C8-7	12	49	31	30,7	49,3	-	xx	-	-
C10-9	14	56	22	30,7	49,3	-	xx	-	x
C11-7	63	7	24	31,3	48,2	-	x	-	x
C5-8	22	32	42	32,0	47,1	-	x	x	xx
C7-3	51	23	24	32,7	46,0	-	-	x	x
C6-11	60	20	18	32,7	46,0	-	xx	x	x
C12-9	9	78	15	34,0	43,8	x	x	-	-
C7-2	26	76	2	34,7	42,7	-	-	-	x
C8-2	4	30	70	34,7	42,7	-	xx	-	-
C3-10	53	14	38	35,0	42,1	-	x	x	x
C4-9	8	34	64	35,3	41,6	x	x	x	x
C9-5	31	32	44	35,7	41,0	-	xx	-	-
C2-5	68	21	21	36,7	39,4	-	x	-	-
C4-7	10	33	67	36,7	39,4	x	x	x	-
C5-5	19	36	57	37,3	38,3	-	x	x	xx
C1-2	96	9	8	37,7	37,7	-	xx	-	-
C3-5	39	31	43	37,7	37,7	-	x	x	x
C5-2	36	40	38	38,0	37,2	-	x	-	xx
C5-9	24	55	35	38,0	37,2	-	x	x	xx
C8-9	27	35	54	38,7	36,1	-	xx	-	-
C1-11	80	37	7	41,3	31,7	-	xx	-	-
C2-9	18	94	13	41,7	31,1	x	x	x	-
C9-10	21	64	40	41,7	31,1	-	xx	-	-
C5-7	48	38	40	42,0	30,6	-	x	x	xx

Negrito: estão destacados indivíduos que apresentam a piramidação de alelos de resistência a *H. vastatrix* e *C kahawae*. *GL2 e *GL5: locos/QTL que correspondem a genes de efeito maior que conferem resistência às raças I, II e ao patótipo 001 de *H. vastatrix*. xx: Resistente homocigoto x: Resistente heterocigoto, -: suscetível.

Tabela 14. Continuação

Híbrido	VIG	TF	CER	Rank-Médio	Ganho %	S_{H3}	GI2	GL5	$Ck-1$
C10-2	50	12	66	42,7	29,5	-	-	-	X
C12-8	45	64	20	43,0	28,9	X	X	-	-
C1-5	12	90	29	43,7	27,8	-	XX	-	-
C10-7	32	57	42	43,7	27,8	-	XX	-	X
C7-8	29	50	53	44,0	27,3	-	-	X	X
C3-1	43	6	85	44,7	26,2	-	X	X	X
C8-3	35	71	28	44,7	26,2	-	XX	-	-
C7-5	44	65	25	44,7	26,2	-	-	X	-
C3-7	73	27	35	45,0	25,6	-	X	X	X
C12-2	30	60	48	46,0	24,0	X	-	-	-
C2-3	38	84	17	46,3	23,4	X	X	-	-
C7-9	17	45	79	47,0	22,3	-	-	X	X
C5-11	64	54	23	47,0	22,3	-	X	X	XX
C4-8	76	39	29	48,0	20,7	X	X	X	X
C3-11	16	73	55	48,0	20,7	-	X	X	X
C9-7	70	28	47	48,3	20,1	-	X	-	-
C10-11	69	42	34	48,3	20,1	-	XX	-	X
C1-1	33	75	39	49,0	19,0	-	XX	-	-
C11-12	42	48	60	50,0	17,4	-	X	-	-
C11-6	56	61	35	50,7	16,3	-	X	-	-
C11-10	37	87	30	51,3	15,2	-	X	-	-
C2-6	59	47	50	52,0	14,0	X	X	X	-
C5-4	79	44	33	52,0	14,0	-	X	X	XX
C4-5	52	26	79	52,3	13,5	X	X	X	X
C4-11	40	92	27	53,0	12,4	X	X	X	X
C7-6	81	25	54	53,3	11,8	-	-	X	X
C10-12	116	44	1	53,7	11,3	-	XX	-	-
C11-8	71	72	19	54,0	10,7	-	X	-	-
C4-3	93	46	25	54,7	9,6	X	X	X	X
C1-4	89	10	65	54,7	9,6	-	XX	-	-
C10-5	87	60	17	54,7	9,6	-	-	-	X
C9-9	101	11	52	54,7	9,6	-	X	-	-
C6-4	83	3	80	55,3	8,5	-	XX	X	X
C11-4	88	2	76	55,3	8,5	-	X	-	X
C2-2	91	15	61	55,7	8,0	X	X	X	-
C6-7	20	85	67	57,3	5,2	-	XX	X	X
C8-11	15	77	80	57,3	5,2	-	XX	-	-
C2-11	118	19	37	58,0	4,1	X	X	-	-
C10-6	57	67	51	58,3	3,6	-	XX	-	-
C1-9	90	18	67	58,3	3,6	-	XX	-	-
C4-2	105	33	39	59,0	2,5	X	X	X	X
C7-12	66	64	48	59,3	1,9	-	-	X	X

Tabela 14. Continuação

Híbrido	VIG	TF	CER	Rank-Médio	Ganho %	S_{H3}	GL2	GL5	$Ck-1$
C12-4	65	46	68	59,7	1,4	x	-	-	-
C8-8	92	64	23	59,7	1,4	-	xx	-	-
C7-4	46	72	63	60,3	0,3	-	-	x	x
C12-5	62	73	46	60,3	0,3	x	x	-	-
C2-8	110	60	11	60,3	0,3	x	x	x	x
C5-1	78	43	61	60,7	-0,3	-	x	x	xx
C11-1	77	57	48	60,7	-0,3	-	xx	-	x
C9-8	108	47	28	61,0	-0,8	-	x	-	-
C6-3	100	24	60	61,3	-1,4	-	x	x	x
C12-3	117	58	14	63,0	-4,1	x	-	-	-
C12-10	83	59	49	63,7	-5,2	x	x	-	-
C6-6	23	95	75	64,3	-6,3	-	xx	x	x
C1-12	58	51	84	64,3	-6,3	-	xx	-	-
C5-10	84	41	68	64,3	-6,3	-	x	x	xx
C7-1	78	45	71	64,7	-6,9	-	-	x	x
C12-7	104	13	77	64,7	-6,9	x	x	-	-
C4-1	41	73	81	65,0	-7,4	x	x	x	x
C10-3	55	83	58	65,3	-8,0	-	-	-	x
C11-9	74	86	37	65,7	-8,5	-	xx	-	-
C7-11	115	19	63	65,7	-8,5	-	-	x	x
C6-5	61	81	56	66,0	-9,1	-	xx	x	x
C8-4	94	59	45	66,0	-9,1	-	xx	-	-
C2-1	67	74	58	66,3	-9,6	x	x	-	-
C10-8	72	53	74	66,3	-9,6	-	xx	-	x
C11-2	106	88	12	68,7	-13,5	-	x	-	x
C8-10	111	22	73	68,7	-13,5	-	xx	-	-
C5-3	75	63	69	69,0	-14,0	-	x	x	xx
C5-12	86	89	32	69,0	-14,0	-	x	x	-
C8-1	95	80	40	71,7	-18,5	-	xx	-	-
C9-12	112	62	41	71,7	-18,5	-	x	-	-
C11-11	103	52	60	71,7	-18,5	-	xx	-	-
C9-2	49	82	85	72,0	-19,0	-	x	-	-
C11-3	85	68	63	72,0	-19,0	-	x	-	x
C1-10	97	62	59	72,7	-20,1	-	xx	-	-
C6-8	113	37	72	74,0	-22,3	-	xx	x	x
C10-1	99	69	78	82,0	-35,5	-	xx	-	-
C4-4	109	59	86	84,7	-39,9	x	x	x	x
C9-1	102	91	62	85,0	-40,5	-	x	-	-
C2-7	98	70	87	85,0	-40,5	x	x	-	-
C7-7	107	66	83	85,3	-41,0	-	-	x	x
C6-10	82	93	82	85,7	-41,6	-	xx	x	x
C9-11	114	79	70	87,7	-44,9	-	x	-	-

Na tabela 15 apresentam-se a seleção dos melhores híbridos segundo o índice de seleção e a posição dos *rank*-médios com uma pressão de seleção de 30%. Estes indivíduos apresentam os alelos de resistência a *H. vastatrix* e *C kahawae*, isolados ou em combinação, além de se encontrar distribuídos entre os três diferentes grupos que foram formados pela análise de diversidade genética e que estão identificados e representados no dendrograma (Figura 7).

Tabela 15. Híbridos superiores selecionados pelo *rank*-médio, ganho com a seleção, grupo de alocação no dendrograma segundo a diversidade genética e genes de resistência a *H. vastatrix* e *C kahawae*. Seleção dos 30% melhores híbridos.

Código Híbrido	Ganho com a seleção %	Grupo do dendrograma	Genes de resistência			
			<i>S_{H3}</i>	*GL2	*GL5	<i>Ck-1</i>
C4-10	92,8	2	Aa	Bb	C-	Dd
C3-9	84,0	1		Bb	C-	Dd
C2-12	84,0	2	Aa	Bb		
C3-8	80,7	3a		Bb	C-	Dd
C9-4	75,8	3c		BB		
C3-12	69,7	3a		Bb		Dd
C8-5	62,5	3b		BB		
C12-1	56,5	2	Aa	Bb		
C10-10	56,5	3b		BB		Dd
C12-6	52,6	2	Aa			
C9-6	51,5	3c		Bb		
C4-6	51,0	2	Aa	Bb		
C2-10	49,9	2	Aa	Bb	C-	Dd
C8-7	49,3	3b		BB		
C10-9	49,3	3b		BB		Dd
C11-7	48,2	3a		Bb		Dd
C5-8	47,1	1		Bb	C-	DD
C7-3	46,0	3a			C-	Dd
C6-11	46,0	1		BB	C-	Dd
C12-9	43,8	2	Aa	Bb		
C7-2	42,7	3a				Dd
C8-2	42,7	3b		BB		
C3-10	42,1	1		Bb	C-	Dd
C4-9	41,6	2	Aa	Bb	C-	Dd
C9-5	41,0	3c		BB		
C2-5	39,4	2	Aa	Bb		
C4-7	39,4	1		Bb	C-	Dd
C5-5	38,3	1		Bb	C-	DD
C1-2	37,7	3a		BB		Dd

Negrito: estão destacados indivíduos que apresentam a piramidação de alelos de resistência a *H. vastatrix* e *C kahawae*. *GL2 e *GL5: locos/QTL que correspondem a genes de efeito maior que conferem resistência às raças I, II e ao patótipo 001 de *H. vastatrix*.

Cabe ressaltar que esse resultado é de grande importância para o avanço dos ciclos de seleção recorrente, pois além destes genótipos possuir superioridade do ganho com a seleção, estes também apresentaram divergência genética e ainda carregam os alelos dos genes de resistência a *H. vastatrix* e *C. kahawae*.

Os resultados obtidos permitiram identificar quais são os melhores híbridos a serem selecionando, identificando os mais contrastantes com base na diversidade genética, além de conterem a piramidação dos alelos dos genes de resistência a *H. vastatrix* e *C. kahawae* e também aqueles com os quais se espera obter o maior ganho com a seleção. Dessa forma, com base neste estudo podem-se realizar o direcionamento dos futuros cruzamentos e recomendar com maior certeza ao programa de seleção recorrente.

Os híbridos C2-10 C4-9 e C4-10, que se encontram entre o 30% dos indivíduos selecionados pelo índice de seleção, foram os únicos que apresentam a piramidação de alelos tanto de a *H. vastatrix* quanto de *C. kahawae*. No entanto, estes híbridos alocaram-se no mesmo agrupamento representado no dendrograma (grupo 2) (Figura 7). Por conseguinte, estes híbridos podem ser utilizados ou direcionados para se cruzar e complementar com outros híbridos que possuam outras características de interesse econômico e que estejam alocados em outros diferentes grupos conforme o apresentado no estudo de diversidade, visando manter a diversidade genética, além de aumentar a piramidação de alelos favoráveis.

Na figura 8 apresenta-se a proposta a se implementar no programa de melhoramento genético do cafeeiro (*Coffea arabica*) utilizando o método de seleção recorrente em conjunto com a seleção assistida por marcador molecular. Desde a obtenção da população base até a obtenção de novas cultivares com a piramidação de alelos de resistência as principais doenças do cafeeiro *H. vastatrix* e *C. kahawae*, além do acúmulo de outras características de importância econômica visando substituir aquelas cultivares atualmente utilizadas pelos cafeicultores.

Com base nos resultados obtidos no presente estudo, serão direcionados os futuros cruzamentos a se realizar no programa de seleção recorrente assistido por marcador molecular. Porém a implementação da SAM nas próximas gerações é indispensável, já que esta ferramenta permitiu o monitoramento dos alelos de resistência, gerando mais segurança em estar transferindo os alelos de resistência para as próximas gerações ou em cada ciclo de seleção e recombinação.

Portanto, a implementação da seleção recorrente assistida por marcadores moleculares no melhoramento de *C. arabica* constitui-se numa ferramenta promissora para a piramidação ou

acúmulo de alelos favoráveis ligados a características de interesse do setor produtivo e do agronegócio do café.

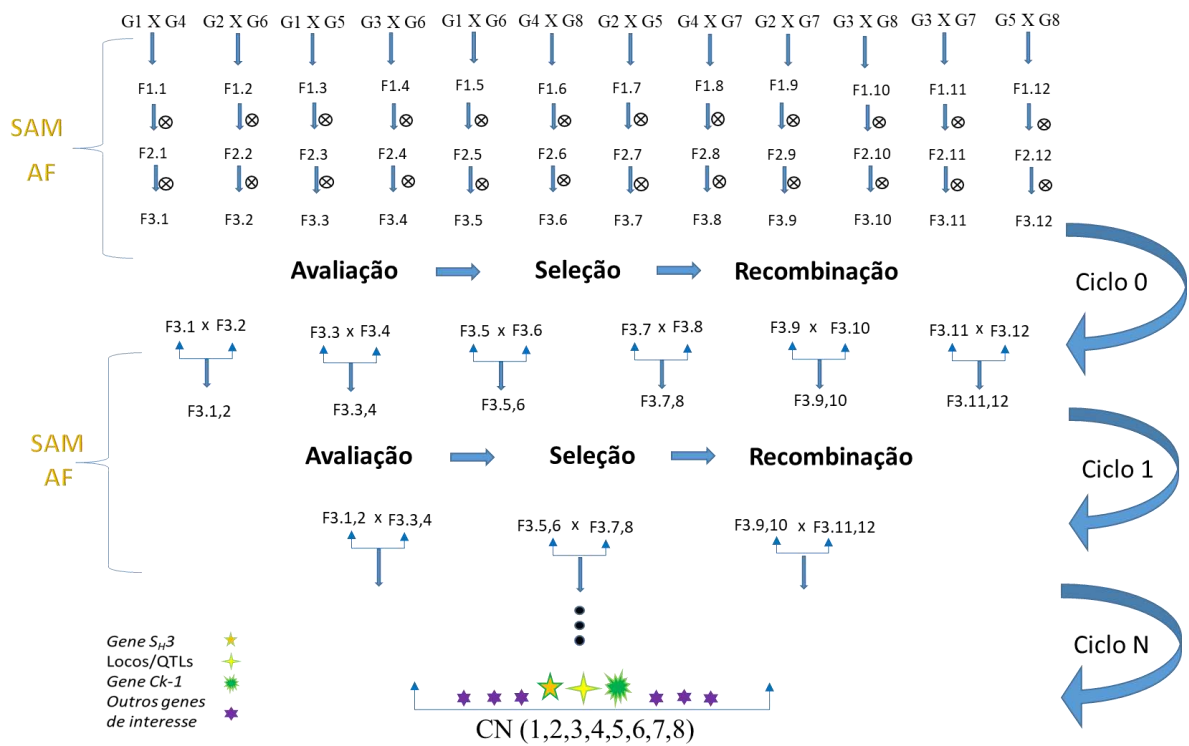


Figura 8. Exemplo de piramidação de genes de resistência a *H. vastatrix* e *C. kahawae* para a formação de uma população base que dará início ao programa de seleção recorrente em *Coffea arabica*. ⊗ = Autofecundação; SAM = seleção assistida por marcador molecular; AF= avaliação fenotípica; CN = número de ciclos.

6. CONCLUSÕES

O uso de marcadores moleculares mostrou-se eficiente para atingir os objetivos do presente trabalho, demonstrando sua eficiência na certificação de híbridos, na estimativa da diversidade genética entre e dentro das populações F_1 e na identificação de indivíduos com a piramidação de alelos de resistência a doenças. Portanto, se evidencia a importância desta ferramenta, sendo indispensável para auxiliar os programas de melhoramento.

Observou-se diversidade genética tanto entre como dentro das populações híbridas F_1 de café arábica, sendo que a maior diversidade se detectou entre as populações híbridas como era de se esperar, esta diversidade presente entre e dentro das populações F_1 permite fazer seleção nesses materiais. A diversidade detectada dentro das populações do café arábica mesmo sendo esta uma espécie autógama, pode-se aproveitar para realizar seleção dos indivíduos mais distantes e assim direcionar os melhores cruzamentos no programa de seleção recorrente.

Com base na seleção assistida por marcador molecular foi possível identificar 11 cafeeiros com a piramidação dos diferentes alelos de resistência a *H. vastatrix* e *C. kahawae*. Assim, essa estratégia se mostrou eficiente na seleção de indivíduos com a piramidação de genes de resistência que são de interesse e para o melhoramento do cafeeiro, além de permitir a piramidação de alelos de resistência para o melhoramento preventivo na ausência do patógeno.

Os indivíduos selecionados pelo índice de seleção encontraram-se distribuídos nos três diferentes grupos representados no dendrograma. Estes cafeeiros além da superioridade do ganho com a seleção, também apresentaram divergência genética e ainda possuem alelos de resistência a *H. vastatrix* e *C. kahawae* piramidados. Dessa forma, esses cafeeiros são de grande importância para ser direcionados nos próximos cruzamentos do programa de seleção recorrente.

Neste trabalho foi evidenciado que mesmo o café arábica sendo uma espécie autógama, pode-se estimar variabilidade genética dentro da mesma população.

7. BIBLIOGRAFIA

ABDULMALIK, REKIYA O. *et al.* Genetic Gains in Grain Yield of a Maize Population Improved through Marker Assisted Recurrent Selection under Stress and Non-stress Conditions in West Africa. **Frontiers in Plant Science** v. 8 , 22 maio 2017.

AGWANDA CO, LASHERMES P, TROUSLOT P, COMBES M-C, CHARRIER A. Identification of RAPD markers for resistance to Coffee Berry Disease, *Colletotrichum kahawae* in Arabica coffee. **Euphytica** **97**, 241–8. 1997

AKKAYA, M. S.; BHAGWAT, A. A.; CREGAN, P. B. Length polymorphisms of simple sequence repeat DNA in soybean. **Genetics** v. 132, n. 4, p. 1131–1139 , 1992.

ALEMU, KUMLACHEW *et al.* Current status of coffee berry disease (*Colletotrichum kahawae* Waller & Bridge) in Ethiopia. **Archives of Phytopathology and Plant Protection** v. 49, n. 17–18, p. 421–433 , 2016.

ALKIMIM, EMILLY RUAS *et al.* Marker-assisted selection provides arabica coffee with genes from other *Coffea* species targeting on multiple resistance to rust and coffee berry disease. **Molecular Breeding** v. 37, n. 1, p. 6 , 4 jan. 2017.

ALMEIDA, DENIA PIRES DE. Clonagem e caracterização de um novo gene putativo de resistência do cafeeiro a *Hemileia vastatrix* e aplicação na seleção assistida. 2019. 52 p. Tese (doutorado em genética e melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, 2019

ALVES, ANATÉRCIA FERREIRA *et al.* Genetic progress and potential of common bean families obtained by recurrent selection. **Crop Breeding and Applied Biotechnology** v. 15, n. 4, p. 218–226 , dez. 2015.

ALZATE-MARIN, ANA LILIA *et al.* Seleção assistida por marcadores moleculares visando ao desenvolvimento de plantas resistentes a doenças, com ênfase em feijoeiro e soja. **Fitopatologia Brasileira** v. 30, n. 4, p. 333–342 , ago. 2005.

ARIEF, VIVI N. *et al.* Genetic gain in yield and protein over two cycles of a wheat recurrent selection program. **Breeding Science** v. 60, n. 3, p. 181–186 , 2010.

BANKOLE, FOLUSHO *et al.* Genetic Gains in Yield and Yield Related Traits under Drought Stress and Favorable Environments in a Maize Population Improved Using Marker Assisted Recurrent Selection. **Frontiers in Plant Science** v. 8 , 17 maio 2017.

BARADAT, PHILIPPE; LABBE, THIERRY; BOUVET, JEAN-MARC. Conception d'index pour la sélection réciproque récurrente. Aspects génétiques, statistiques et informatiques. **Traitements statistiques des essais de sélection**. [S.l.: s.n.], 1995. 3 v. p. 101–150.

BEARZOTI, E; VENCOVSKY, R. Simulation of marker-assisted recurrent selection in autogamous species. **Crop Breeding and Applied Biotechnology** v. 2, n. 1, p. 1–10 , 2002.

BERILLI, A.P.C.G. *et al.* Use of molecular markers in reciprocal recurrent selection of maize increases heterosis effects. **Genetics and Molecular Research** v. 10, n. 4, p. 2589–2596 , 2011.

BERNARDO, REX. Molecular Markers and Selection for Complex Traits in Plants: Learning from the Last 20 Years. **Crop Science** v. 48, n. 5, p. 1649 , 2008.

BEYENE, YOSEPH; SEMAGN, KASSA; CROSSA, JOSE; *et al.* Improving Maize Grain Yield under Drought Stress and Non-stress Environments in Sub-Saharan Africa using Marker-Assisted Recurrent Selection. **Crop Science** v. 56, n. 1, p. 344 , 2016.

BEYENE, YOSEPH; SEMAGN, KASSA; MUGO, STEPHEN; *et al.* Performance and grain yield stability of maize populations developed using marker-assisted recurrent selection and pedigree selection procedures. **Euphytica** v. 208, n. 2, p. 285–297 , 9 mar. 2016.

BRIDSON, DIANE M. Studies in Coffea and Psilanthus (Rubiaceae subfam. Cinchonoideae) for Part 2 of “Flora of Tropical East Africa”: Rubiaceae. **Kew Bulletin** v. 36, n. 4, p. 817 , 1982.

BRUMLOP, SARAH; FINCKH, MARIA R. Applications and potentials of marker assisted selection (MAS) in plant breeding. **Federal Agency for Nature Conservation**, 2011. 178 p.

BUSO, G. S. C.; CIAMPI, A. Y.; MORETZSOHN. M. C.; AMARAL Z. P.de S. **Protocolo para desenvolvimento de marcadores microssatélites**. Circular técnica 20 [S.l: s.n.], 2003.

BRUNELLI, K.R.; SILVA, H.P.; CAMARGO, L.E.A. Mapeamento de genes de resistência quantitativa a Puccinia polysora em Milho. **Fitopatologia Brasileira** 27:134-140. 2002

CAIXETA, EVELINE TEIXEIRA *et al.* Tipos de marcadores moleculares. **Marcadores Moleculares**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2016. p. 9–93.

CARVALHO, CARLOS ROBERTO *et al.* Cryptosexuality and the Genetic Diversity Paradox in Coffee Rust, Hemileia vastatrix. **PLoS ONE** v. 6, n. 11, p. 1–7 , 2011.

CASTRO CAICEDO, BERTHA LUCÍA *et al.* New coffee (*Coffea arabica*) genotypes derived from Coffea canephora exhibiting high levels of resistance to leaf rust and Ceratocystis canker. **Tropical Plant Pathology** v. 38, n. 6, p. 485–494 , 2013.

COLLARD, B. C.Y; MACKILL, D. J. Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences** v. 363, n. 1491, p. 557–572 , 12 fev. 2008.

CONAB: COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos. **Monitoramento agrícola- Safra 2016/2017** v. 3, n. 9, p. 1–174 , 2017.

CORDEIRO, ANTONIO CARLOS CENTENO *et al.* Effect of the number of intercrosses on grain yield in basic rice synthetic populations. **Euphytica** v. 132, n. 79–86 , 2003.

CORDEIRO, ANTONIO CARLOS CENTENO; RANGEL, PAULO HIDEO NAKANO. Avaliação de populações de arroz irrigado conduzidas por seleção recorrente em várzea de

Roraima. **Revista Agro@Mambiente on-Line** v. 5, n. 3, p. 182–187 , 2012.

COSTA, P.M.A. *et al.* Selfing confirmation in sugarcane by using simple sequence repeat markers: an individual reciprocal recurrent selection scheme. **Genetics and Molecular Research** v. 13, n. 4, p. 8962–8970 , 2014.

CRUZ, COSME DAMIÃO. GENES - a *software* package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum. Agronomy** v. 35, n. 3, p. 271–276 , jul. 2013.

CUBRY, PHILIPPE *et al.* An initial assessment of linkage disequilibrium (LD) in coffee trees: LD patterns in groups of *Coffea canephora* Pierre using microsatellite analysis. **BMC Genomics** v. 14, n. 1, p. 10 , 2013.

CUBRY, PHILIPPE *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 , jan. 2008.

CUNHA, K S Da *et al.* Full-sib reciprocal recurrent selection in the maize populations Cimmyt and Piranão. **Genetics and Molecular Research** v. 11, n. 3, p. 3398–3408 , 2012.

DAVIS, AARON P. *et al.* An annotated taxonomic conspectus of the genus *Coffea* (Rubiaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society** v. 152, n. 4, p. 465–512 , dez. 2006.

DE BRITO, GIOVANI GREIGH *et al.* Inheritance of coffee leaf rust resistance and identification of AFLP markers linked to the resistance gene. **Euphytica** v. 173, n. 2, p. 255–264 , 19 maio 2010.

DE KOEYER, D. L. *et al.* Effects of recurrent selection for grain yield on oat kernel morphology. **Crop Science** v. 33, n. 5, p. 924–928 , 1993.

DE KOEYER, D L; STUTHMAN, D D. Continued response through seven cycles of recurrent selection for grain yield in oat (*Avena sativa* L.). **Euphytica** v. 104, n. 1, p. 67–72 , 1998.

DE OLIVEIRA MOULIN CARIAS, C M *et al.* Prediction of genetic gains by mixed models in conilon coffee progenies [Predição de ganhos genéticos via modelos mistos em progênies de café conilon]. **Coffee Science** v. 11, n. 1, p. 39–45 , 2016.

DELZER, B. W.; BUSCH, R. H.; HARELAND, G. A. Recurrent selection for grain protein in hard red spring wheat. **Crop Science** v. 35, n. 3, p. 730–735 , 1995.

DER VOSSEN, H A M. The cup quality of disease-resistant cultivars of arabica coffee (*Coffea arabica*). **Experimental Agriculture** v. 45, n. 3, p. 323–332 , 2009.

DINIZ, I. *et al.* Fungal penetration associated with recognition, signaling and defence-related genes and peroxidase activity during the resistance response of coffee to *Colletotrichum kahawae*. **Physiological and Molecular Plant Pathology** v. 105, p. 119–127 , 2019.

DONINI, PAOLO *et al.* Characterization of *Coffea* chloroplast microsatellites and evidence for the recent divergence of *C. arabica* and *C. eugenioides* chloroplast genomes. **Genome** v. 50, n. 12, p.1112–1129,dez. 2007.

EATHINGTON, SAM R. *et al.* Molecular markers in a commercial breeding program. **Crop Science** v. 47, n. SUPPL. DEC. , 2007.

FAZUOLI, LUIZ CARLOS. Pré-melhoramento do café. **Pré-melhoramento de plantas**. Empresa de ed. Brasília, DF: [s.n.], 2006. p. 614.

FEHR, WALTER R. **Principles of cultivar development: theory and technique**. 2. ed. New York: Macmillan, 1987. 536 p.

FERRÃO, ROMÁRIO GAVA *et al.* Parâmetros genéticos em café Conilon. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** v. 43, n. 1, p. 61–69 , jan. 2008.

FRISCH M, BOHN M AND MELCHINGER AE. Minimum sample size and optimum positioning of flanking markers in marker-assisted backcrossing for transfer of a target gene. **Crop Sci** 39:967-975. 1999

FONSECA, AYMBIRÉ FRANCISCO ALMEIDA Da *et al.* Divergência genética em café conilon. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** v. 41, n. 4, p. 599–605 , abr. 2006.

GELETA, MULATU *et al.* Genetic Diversity of Arabica Coffee (*Coffea arabica* L.) in Nicaragua as Estimated by Simple Sequence Repeat Markers. **The Scientific World Journal** v. 2012, p. 1–11 , 2012.

GICHURU, E. K. *et al.* Identification of molecular markers linked to a gene conferring resistance to coffee berry disease (*Colletotrichum kahawae*) in *Coffea arabica*. **Plant Pathology** v. 57, n. 6, p. 1117–1124 , 2008.

HALLAUER, ARNEL R.; DARRAH, LARRY L. Compendium of recurrent selection methods and their application. **Critical Reviews in Plant Sciences** v. 3, n. 1, p. 1–33 , jan. 1985.

HERRERA, J. C. *et al.* Introgression into the allotetraploid coffee (*Coffea arabica* L.): segregation and recombination of the *C. canephora* genome in the tetraploid interspecific hybrid (*C. arabica* × *C. canephora*). **TAG Theoretical and Applied Genetics** v. 104, n. 4, p. 661–668 , 1 mar. 2002.

HOLLAND, J. B. *et al.* Recurrent selection in oat for adaptation to diverse environments. **Euphytica** v. 113, n. 3, p. 195–205 , 2000.

International Coffee Organization (ICO). Statistics- Historical data on the global coffee trade. 2016

KALIA, RAJWANT K. *et al.* Microsatellite markers: An overview of the recent progress in plants **.Euphytica**. [S.l: s.n.]. , 2011

KRAUSE, WILLIAN *et al.* Ganho de seleção no melhoramento genético intrapopulacional do maracujazeiro-amarelo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** v. 47, n. 1, p. 51–57 , 2012.

LASHERMES, PHILIPPE. *et al.* Genetic diversity for RAPD markers between cultivated and wild accessions of *Coffea arabica*. **Euphytica** v. 87, n. 1, p. 59–64 , 1996.

- LASHERMES, PHILIPPE. *et al.* Molecular analysis of introgressive breeding in coffee (*Coffea arabica* L.). **TAG Theoretical and Applied Genetics** v. 100, n. 1, p. 139–146 , 1 jan. 2000.
- LASHERMES, PHILIPPE *et al.* Molecular characterisation and origin of the *Coffea arabica* L. genome. **Molecular & general genetics : MGG** v. 261, n. 2, p. 259–66 , mar. 1999.
- LASHERMES, PHILIPPE *et al.* Inter-genomic DNA Exchanges and Homeologous Gene Silencing Shaped the Nascent Allopolyploid Coffee Genome (*Coffea arabica* L.). **G3: Genes Genomes Genetics** v. 6, n. 9, p. 2937–2948 , set. 2016.
- LEITE, MONIK EVELIN *et al.* Increasing the resistance of common bean to white mold through recurrent selection. **Scientia Agricola** v. 73, n. 1, p. 71–78 , fev. 2016.
- LEROY, T. *et al.* Reciprocal recurrent selection applied to *Coffea canephora* Pierre. I. Characterization and evaluation of breeding populations and value of intergroup hybrids. **Euphytica** v. 67, n. 1–2, p. 113–125 , jan. 1993.
- LEROY, T *et al.* Reciprocal recurrent selection applied to coffee-canephora pierre .2. estimation of genetic-parameters. **Euphytica** v. 74, n. 1–2, p. 121–128 , 1994.0014-2336.
- LEROY, T; CHARMETANT, P; YAPO, A. Application of reciprocal recurrent selection in coffee (coffee-canephora pierre) - initial results from the cote-divoire program. **Cafe Cacao The** v. 35, n. 2, p. 95–103 , 1991.0007-9510.
- LEWIS, MARK E; GRITTON, Earl T. Use of one cycle of recurrent selection per year for increasing resistance to *Aphanomyces* root rot in peas. **Journal of the American Society for Horticultural Science** v. 117, n. 4, p. 638–642 , 1992.0003-1062.
- MAHÉ, LAETITIA *et al.* Development of sequence characterized DNA markers linked to leaf rust (*Hemileia vastatrix*) resistance in coffee (*Coffea arabica* L.). **Molecular Breeding** v. 21, n. 1, p. 105–113 , 2008.1380-3743.
- MAROCCO, A *et al.* Performance of S-2 Winter Barley Progenies from Original and Improved Populations Developed Via Recurrent Selection. **Plant Breeding** v. 108, n. 3, p. 250–255 , 1992.
- MASOJĆ, PIOTR. The application of molecular markers in the process of selection. **Cellular & molecular biology letters** v. 7, n. 2A, p. 499–509 , 2002.
- MEDEIROS, ALEXSANDRA CORREIA. Diversidade genética e análise dialélica de progenitores no melhoramento genético de *Coffea arabica*. 2016. 59 p. dissertação (mestrado em genética e melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, 2016.
- MENEZES JÚNIOR, JOSÉ ÂNGELO NOGUEIRA DE *et al.* Two cycles of recurrent selection in red bean breeding. **Crop Breeding and Applied Biotechnology** v. 13, n. 1, p. 41–48 , mar. 2013.
- MISTRO, J. C. *et al.* Estimates of genetic parameters in Arabic coffee derived from the Timor hybrid. **Crop Breeding and Applied Biotechnology** v. 7, n. 2, p. 141–147 , jun. 2007.

- MISTRO, JÚLIO CÉSAR *et al.* Estimates of genetic parameters and expected genetic gains with selection in robust coffee. **Crop Breeding and Applied Biotechnology** v. 4, p. 86–91 , 2004.
- MOHAMMED, ABDI. Importance and Characterization of Coffee Berry Disease (*Colletotrichum kahawae*) in Borena and Guji Zones, Southern Ethiopia. **Journal of Plant Pathology & Microbiology** v. 06, n. 09 , 2015.
- MONTAGNON, CHRISTOPHE; 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.
- MORAIS JÚNIOR, ODILON PEIXOTO De *et al.* Genetic progress after cycles of upland rice recurrent selection. **Scientia Agricola** v. 72, n. 4, p. 297–305 , ago. 2015.
- MULAMBA, N. N.; MOCK, J. J. Improvement of yield potential of the Eto Blanco maize (*Zea mays* L.) population by breeding for plant traits. **Egypt Journal of Genetics and Cytology**, v.7, p.40-51, 1978.
- OLIVEIRA, A. C. B.; SAKIYAMA, N. S.; CAIXETA, E. T.; MACIELZAMBOLIM, E.; RUFINO, R. J. N.; ZAMBOLIM, L. Partial map of *Coffea arabica* L. and recovery of the recurrent parent in backcross progenies. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, 7:196-203, 2007
- OROZCO-CASTILLO, C. *et al.* Detection of genetic diversity and selective gene introgression in coffee using RAPD markers. **Theoretical and Applied Genetics** v. 87, n. 8 , mar. 1994.
- RAMYA *et al.* Effect of Recurrent Selection on Drought Tolerance and Related Morpho-Physiological Traits in Bread Wheat. **PLOS ONE** v. 11, n. 6, p. e0156869 , 14 jun. 2016.
- PAIVA, SILVÉRIO De *et al.* Genetic gain prediction on UNB-2U popcorn population under recurrent selection by using different selection indexes. p. 803–814 , 2009.
- PALOMINO, CÉSAR *et al.* Evaluation of the genetic diversity of the coffee (*Coffea arabica* L.) in Villa Rica (Peru). **Ecologia aplicada** v. 13, n. 2, p. 129–234 , 2014.
- PESTANA, KÁTIA NOGUEIRA *et al.* Inheritance study and linkage mapping of resistance loci to *Hemileia vastatrix* in Híbrido de Timor UFV 443-03. **Tree Genetics and Genomes** v. 11, n. 4 , 2015.1614-2942.
- POSADAS, LUIS G.; ESKRIDGE, KENT M.; GRAEF, GEORGE L. Elite performance for grain yield from unadapted exotic soybean germplasm in three cycles of a recurrent selection experiment. **Crop Science** v. 54, n. 6, p. 2536–2546 , 1 nov. 2014.
- PRAKASH, N. S. *et al.* Introgression molecular analysis of a leaf rust resistance gene from *Coffea liberica* into *C. arabica* L. **Theoretical and Applied Genetics** v. 109, n. 6, p. 1311–1317 , 2004.
- RAMALHO, MAGNO ANTONIO PATTO *et al.* Genetic progress after four cycles of recurrent selection for yield and grain traits in common bean. **Euphytica** v. 144, n. 1–2, p. 23–29 , jul. 2005.

RANGEL, PAULO HIDEO NAKANO *et al.* Establishment of the irrigated rice cultivar SCSBRS Tio Taka by recurrent selection. **Crop Breeding and Applied Biotechnology** v. 7, n. 1, p. 103–110, mar. 2007.

RANGEL, R. M. *et al.* Genetic parameters in parents and hybrids of circulant diallel in popcorn. **Genetics and Molecular Research** v. 7, n. 4, p. 1020–1030, 2008.

RANGEL, RAMON MACEDO *et al.* Análise biométrica de ganhos por seleção em população de milho pipoca de quinto ciclo de seleção recorrente. **Revista Ciencia Agronomica** v. 42, n. 2, p. 473–481, 2011.

RESENDE, MARCOS DEON VILELA DE. *Software* Selegen-REML/BLUP: a useful tool for plant breeding. **Crop Breeding and Applied Biotechnology** v. 16, n. 4, p. 330–339, dez. 2016.

RESENDE, MARCOS DEON VILELA; ASSIS, TEOTÔNIO FRANCISCO De. Nota Científica Seleção Recorrente Recíproca entre Populações Sintéticas Multi- Espécies (SRR-PSME) de Eucalipto Reciprocal Recurrent Selection between Synthetic Multi Species Populations (RRS-). **Pesquisa Florestal Brasileira** v. 57, n. 1, p. 57–60, 2008.

RIBEIRO, R.M. *et al.* Genetic progress in the UNB-2U population of popcorn under recurrent selection in Rio de Janeiro, Brazil. **Genetics and Molecular Research** v. 11, n. 2, p. 1417–1423, 2012.

RODRIGUES, C J; BETTENCOURT, A J; RIJO, L. Races of the Pathogen and Resistance to Coffee Rust. **Annual Review of Phytopathology** v. 13, n. 1, p. 49–70, 2003.

SAKIYAMA, NEY SUSSUMU; PEREIRA, T. N. S; PEREIRA, A. A. Hibridação em Café. In: A. BORÉM (Org.). **Hibridação artificial de plantas**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1999. p. 175–189.

SANTOS, ELIANE KALTCHUK; ZANETTINI, MARIA HELENA BODANESE. Androgênese: uma rota alternativa no desenvolvimento do pólen. **Ciência Rural** v. 32, n. 1, fev. 2002.

SETOTAW, TESFAHUN ALEMU *et al.* Breeding potential and genetic diversity of Híbrido do Timor coffee evaluated by molecular markers. **Crop Breeding and Applied Biotechnology** v. 10, p. 298–304, 2010.

SEVERINO, LIV SOARES *et al.* Associações da produtividade com outras características agrônômicas de café. **Acta Scientiarum. Agronomy** v. 24, p. 1467, 2016.

SILVA, MARCELO GERALDO DE MORAIS; VIANA, ALEXANDRE PIO. Alternativas de seleção em população de maracujazeiro-azedo sob seleção recorrente intrapopulacional. **Revista Brasileira de Fruticultura** v. 34, n. 2, p. 525–531, jun. 2012.

SILVA, R. A. *et al.* The Híbrido de Timor germplasm: identification of molecular diversity and resistance sources to coffee berry disease and leaf rust. **Euphytica** v. 214, n. 9, 2018.

SILVA, THIAGO RODRIGUES DA CONCEIÇÃO *et al.* Agronomic performance of popcorn genotypes in Northern and Northwestern Rio de Janeiro State. **Acta Scientiarum. Agronomy** v. 35, n. 1, p. 57–63 , 2013.

TALHINHAS, PEDRO *et al.* The coffee leaf rust pathogen *Hemileia vastatrix*: one and a half centuries around the tropics. **Molecular Plant Pathology** v. 18, n. 8, p. 1039–1051 , 2017.

TAUTZ, DIETHARD. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. **Nucleic Acids Research** v. 17, n. 16, p. 6463–6471 , 25 ago. 1989.

VALENCIA, ANDREA *et al.* Introgression of the SH3 gene resistant to rust (*Hemileia vastatrix*) in improved lines of CASTILLO ® variety (*Coffea arabica L.*). **Journal of Plant Breeding and Crop Science** v. 9, n. August, p. 130–138 , 2017.

VAN BERLOO, R.; STAM, P. Simultaneous marker-assisted selection for multiple traits in autogamous crops. **Theoretical and Applied Genetics** v. 102, n. 6–7, p. 1107–1112 , 2001.

VAN BERLOO, R.; STAM, Piet. Marker-assisted selection in autogamous RIL populations: a simulation study. **TAG Theoretical and Applied Genetics** v. 96, n. 1, p. 147–154 , 23 jan. 1998.

VAN DER VOSSSEN, H. A. M.; WALYARO, D. J. Breeding for resistance to coffee berry disease in *Coffea arabica L.* II. Inheritance of the resistance. **Euphytica**, v. 29, p. 777–791, 1980.

VÁRZEA, VMP M P *et al.* The use of Sarchimor derivatives in coffee breeding resistance to leaf rust. **ASIC 22nd International Conference on Coffee Science** n. March 2009, p. 1424–1429 , 2009.

WIERSMA, JOCHUM J. *et al.* Recurrent selection for kernel weight in spring wheat. **Crop Science** v. 41, n. 4, p. 999–1005 , 2001.

YASHITOLA, J., T; THIRUMURUGAN, R. M; SUNDARAM, M. K; NASEERULLAH, M. S; RAMESHA, N. P. SARMA; AND R. V. SONTI. Assessment of purity of rice hybrids using microsatellite and STS markers. *Crop Sci.* 42:1369-1373. doi:10.2135/cropsci 2002.

YU, Y.G.; SAGHAI MARROF, M.A.; BUSS, G.R.; MAUGHAN, P.J.; TOLIN, S.A. (1994). RFLP and microsatellite mapping of a gene for Soybean mosaic virus resistance. *Phytopathology* 84:60-64.

ZAMBOLIM, LAÉRCIO. Current status and management of coffee leaf rust in Brazil. **Tropical Plant Pathology** v. 41, n. 1, p. 1–8 , 2016.4085801600.