

FRANCIELLE DE MATOS FEITOSA

**ABORDAGENS FENOTÍPICAS E MOLECULARES APLICADAS À SELEÇÃO DE
CAFFEEIROS ARÁBICA COM RESISTÊNCIA MÚLTIPLA A ESTRESSES
BIÓTIPOS**

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

Orientadora: Eveline Teixeira Caixeta

**VIÇOSA – MINAS GERAIS
2022**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

F311e
2022

Feitosa, Francielle de Matos, 1991-
Abordagens fenotípicas e moleculares aplicadas à seleção
de cafeeiros arábica com resistência múltipla a estresse bióticos /
Francielle de Matos Feitosa. – Viçosa, MG, 2022.
1 tese eletrônica (107 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Eveline Teixeira Caixeta.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Fitotecnia, 2022.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2022.318>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Café - Melhoramento genético. 2. Café - Resistência a
doenças e pragas. 3. *Colletotrichum kahawae*. 4. *Hemileia
vastatrix*. I. Caixeta, Eveline Teixeira, 1972-. II. Universidade
Federal de Viçosa. Departamento de Fitotecnia. Programa de
Pós-Graduação em Genética e Melhoramento. III. Título.

CDD 22. ed. 633.732

Bibliotecário(a) responsável: Bruna Silva CRB6/2552

**ABORDAGENS FENOTÍPICAS E MOLECULARES APLICADAS À SELEÇÃO DE
CAFEIROS ARÁBICA COM RESISTÊNCIA MÚLTIPLA A ESTRESSES
BIÓTIPOS**

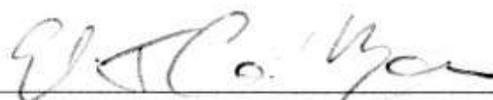
Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 25 de fevereiro de 2022.

Assentimento:



Francielle de Matos Feitosa
Autora



Eveline Teixeira Caixeta
Orientadora

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida, por ser minha fortaleza nos momentos difíceis e por me permitir celebrar com alegria. Sem Deus eu não chegaria aqui.

À minha filha Melissa, que veio ao mundo durante a realização desse trabalho. Depois desse presente de Deus, tudo começou fazer sentido em minha vida. Te amo, minha vida.

Aos meus pais, Francisco e Selma, pelo amor, esforço e conselhos. Por estarem ao meu lado, amo vocês!

Aos meus amados irmãos, Francielma, Francielton (*in memoriam*) e Marcelo, por todo amor, apoio, carinho e amizade.

As minhas sobrinhas Emylly e Valentina pelo amor.

Ao meu esposo Edcássio, a quem amo muito, por estar sempre ao meu lado em toda essa caminhada gratificante, me ajudando, incentivando e acreditando em mim.

Aos meus sogros Ilda e José, em especial minha sogra que sempre me incentivou e esteve ao meu lado. Aos meus cunhados William e Lays pela amizade e carinho.

À Universidade Federal De Viçosa (UFV) e ao Curso de Pós-Graduação em Genética pela oportunidade e pelo ensino de excelência.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos.

À Dra. Eveline Teixeira Caixeta, pela ajuda, apoio, orientação e ensinamentos transmitidos ao longo de todos esses anos. Obrigada por tudo!!!

Aos meus coorientadores Dr. Antonio Carlos Baião de Oliveira e Dr. Moisés Nascimento pela ajuda nos trabalhos e amizade construída.

Aos Drs. Felipe Lopes da Silva, Tiago Vieira Souza e Márcia Regina Costa por aceitarem o convite para participar da banca de tese e por compartilharem seus conhecimentos.

A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) e Empresa de pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG) pelo apoio na pesquisa.

Aos colegas do Laboratório BioCafé, pela eterna amizade e pelos grandes momentos. Em especial aos amigos Carol, Letícia, Alexsandra, Emilly, Tiago, Samilla e Dênia.

Aos amigos de Viçosa, em especial Ciene, Flávia, Mariane, Nathielly e Paola.

Aos amigos da Igreja Presbiteriana de Viçosa (IPV), em especial, Lucas e Marília, Danilo e Viviane, Fernando e Letícia, Elisa e Soninha. Ao Pastor Jhony, pelos conselhos e pregação.

A todos os demais, que de alguma forma, contribuíram com a minha conquista.

RESUMO

FEITOSA, Francielle de Matos, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2022. **Abordagens fenotípicas e moleculares aplicadas à seleção de cafeeiros arábica com resistência múltipla estresses biótipos.** Orientadora: Eveline Teixeira Caixeta.

O café é a segunda principal *commodity* no mercado mundial. A espécie *Coffea arabica* é uma das principais espécies cultivadas no mundo. No entanto, a cultura hospeda uma grande variedade de patógenos e pragas. Os patógenos *Hemileia vastatrix* e *Colletotrichum kahawae* são as doenças mais importantes da cultura, e a praga bicho-mineiro, impacta severamente a produtividade e qualidade de bebida. Assim, como forma de controle, o desenvolvimento de cultivares resistentes, com a utilização de marcadores moleculares auxiliam no progresso de melhoramento genético da cultura. O objetivo do trabalho foi identificar cafeeiros portadores de genes de resistência para as principais doenças do café; determinar a diversidade genética por meio de características morfológicas e estimar os parâmetros genéticos e os ganhos com a seleção utilizando a metodologia de modelos mistos (REML/BLUP). O estudo foi composto por duas populações, a primeira, os cafeeiros em geração F₂ são provenientes do cruzamento entre cultivar resistente a ferrugem e CBD e outra ao bicho-mineiro, enquanto que a segunda, são originados de cruzamentos de cafeeiros arábicas com fontes de resistência (seleção indiana). A identificação de cafeeiros resistentes foi feita fenotipicamente e/ou molecularmente. A análise de diversidade genética foi baseada na distância generalizada de Mahalanobis e a seleção fenotípica, por meio do procedimento REML/BLUP. Ambas populações apresentaram resistência múltipla para as principais doenças com diferentes combinações. Com base nas análises utilizando o método REML/BLUP, foi possível selecionar cafeeiros promissores por serem geneticamente divergentes e complementares pela análise de agrupamento e por proporcionar ganhos com a seleção principalmente para a característica infestação de bicho-mineiro. Além disso, foi possível observar que os materiais em desenvolvimento apresentam superioridade em relação as cultivares comerciais.

Palavras-chave: *Hemileia vastatrix*. *Colletotrichum kahawae*. Melhoramento preventivo. Piramidação de genes.

ABSTRACT

FEITOSA, Francielle de Matos, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2022. **Phenotypic and molecular approaches applied to the selection of arabica coffee plants with multiple resistance to biotic stresses.** Adviser: Eveline Teixeira Caixeta.

Coffee is the second main commodity on the world market. The *Coffea arabica* species is one of the main cultivated species in the world. However, the crop hosts a wide variety of pathogens and pests. The pathogens *Hemileia vastatrix* and *Colletotrichum kahawae* are the most important diseases of the crop, and the leaf miner pest severely impacts productivity and beverage quality. Thus, as a form of control, the development of resistant cultivars, with the use of molecular markers, helps in the progress of genetic improvement of the crop. The objective of this work was to identify coffee plants carrying resistance genes for the main coffee diseases; determine genetic diversity through morphological traits and estimate genetic parameters and selection gains using the mixed model methodology (REML/BLUP). The study was composed of two populations, the first, the coffee trees in the F₂ generation, come from the cross between a cultivar resistant to rust and CBD and the other to the leaf miner, while the second, are originated from crosses of arabica coffee with sources of resistance. (Indian Selection). The identification of resistant coffee trees was made phenotypically and/or molecularly. Genetic diversity analysis was based on generalized Mahalanobis distance and phenotypic selection, using the REML/BLUP procedure. Both populations showed multiple resistance to the main diseases with ivomercial combinations. Based on the analysis using the REML/BLUP method, it was possible to select promising coffee plants because ivome are genetically ivomercialiv and complementary by cluster analysis and because ivome provide gains with selection mainly for the leaf miner infestation characteristic. In addition, it was possible to observe that the materials under development are superior to ivomercial cultivars.

Keywords: *Hemileia vastatrix*. *Colletotrichum kahawae*. Preventive breeding. Gene pyramidation.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	8
REFERÊNCIAS	10
CAPÍTULO 1: SELEÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DE CAFEEIROS ARÁBICA PARA RESISTÊNCIA AO BICHO-MINEIRO, À FERRUGEM E AO CBD	13
MATERIAL E MÉTODOS	16
<i>Material genético</i>	16
<i>Design experimental</i>	19
<i>Características avaliadas</i>	19
<i>Análises genético-estatísticas</i>	20
<i>Avaliações moleculares</i>	21
RESULTADOS	23
<i>Análises fenotípicas</i>	23
<i>Correlação</i>	27
<i>Índice e ganho de seleção</i>	28
<i>Seleção assistida por marcadores para o gene Ck-1 que confere resistência a C. kahawae – Loco A</i>	35
<i>Seleção assistida por marcadores para gene/QTL de resistência as raças I, II e patótipo 001 H. vastatrix – Loco B e Loco C</i>	37
<i>Seleção assistida por marcadores para gene S_H10 de resistência a H. vastatrix – Loco D</i>	38
<i>Piramidação dos genes dos locos A, B, C e D</i>	38
DISCUSSÃO	39
<i>Análises fenotípicas</i>	39
<i>Correlação</i>	41
<i>Índice de seleção</i>	42
<i>Seleção assistida por marcadores para resistência a C. kahawae (CBD)</i>	43
<i>Seleção assistida por marcadores para resistência as raças I, II e patótipo 001 H. vastatrix </i>	44
<i>Seleção assistida por marcadores para gene S_H10 de resistência a H. vastatrix</i>	45
<i>Piramidação de genes de resistência</i>	45
CONCLUSÕES	46
REFERÊNCIAS	46
CAPÍTULO 2: DIVERSIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÃO DE CAFÉ ARÁBICA COM GENES PIRAMIDADOS	53
INTRODUÇÃO	53

MATERIAL E MÉTODOS	55
<i>Material genético</i>	55
<i>Avaliações moleculares</i>	58
<i>Diversidade genética</i>	60
RESULTADOS	61
<i>Caracterização fenotípica da população</i>	61
<i>Diversidade genética</i>	63
<i>Seleção assistida por marcadores moleculares</i>	67
DISCUSSÃO	67
<i>Caracterização fenotípica e diversidade genética da população</i>	67
<i>Seleção assistida por marcadores moleculares</i>	69
CONCLUSÕES	70
REFERÊNCIAS	70
CAPÍTULO 3: CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE CAFEEIROS PORTADORES DO GENE S_{H3} DE RESISTÊNCIA A <i>HEMILEIA VASTATRIX</i> EM POPULAÇÕES DE MELHORAMENTO	75
INTRODUÇÃO	75
MATERIAL E MÉTODOS	77
<i>Material genético</i>	77
<i>Seleção assistida por marcadores para resistência múltipla a doenças</i>	80
RESULTADOS	83
<i>Amplificação de marcadores ligados ao gene S_{H3} de resistência a <i>H. vastatrix</i> (Loco A)</i> ..	83
<i>Amplificação de marcadores ligados aos QTL de resistência as raças I, raça II e ao patótipo 001 de <i>H. vastatrix</i> (Loco B e C)</i>	98
<i>Amplificação de marcador ligado ao gene <i>SH10</i> potencialmente envolvido na resistência a <i>H. vastatrix</i> (Loco D)</i>	98
<i>Amplificação de marcadores ligado ao gene <i>Ck-1</i> de resistência a <i>C. kahawae</i> (Loco E)</i> ..	99
<i>Piramidação dos alelos dos genes de resistência de <i>H. vastatrix</i> e <i>C. kahawae</i></i>	99
DISCUSSÃO	101
CONCLUSÕES	103
REFERÊNCIAS	103
Conclusões gerais	107

INTRODUÇÃO GERAL

O cafeeiro possui mais de 124 espécies descritas, sendo *Coffea arabica* L. e *Coffea canephora* as de maior importância econômica (Davis et al., 2011). A cultura contribui para a economia do país como fonte de emprego e renda para os agricultores e outros agentes econômicos envolvidos no setor cafeeiro (Wahyudi et al., 2018). No Brasil, o café começou a ser cultivado no estado do Pará, chegando a São Paulo no início do século XIX. A cultura se espalhou rapidamente, chegando a ser o principal produto comercial no Brasil (Carvalho et al., 2007; Naritomi et al., 2012; Torres et al., 2021).

Juntamente com a expansão territorial do café pelo país, também houve a disseminação de patógenos e pragas nas lavouras cafeeiras. Os patógenos *Hemileia vastatrix* causador da ferrugem (*Coffee Leaf Rust* -CLR) e *Colletotrichum kahawae* agente causal da antracnose dos frutos (*Coffee Berry Disease* – CBD) são os causadores das doenças mais importantes da cultura. Em condições propícias, CLR e CBD podem causar perdas de rendimento superiores a 75% (McCook et al., 2006; Gichuru et al., 2021) e de 100% (Gimase et al., 2021), respectivamente. No Brasil, as perdas causadas por CLR têm sido relatadas entre 35 a 50% (Zambolim & Caixeta, 2021). Com relação as pragas, o bicho-mineiro do café é a praga chave da cultura, a qual impacta severamente a produtividade e a qualidade do café em todas as regiões produtoras brasileiras (Pantoja-Gomez et al., 2019; Motta et al., 2021).

Em decorrência da importância econômica da cultura e perdas causadas pela presença de patógenos e pragas nas lavouras, vários programas de melhoramento genético têm investido tempo e recursos para obtenção de cultivares melhorados no cafeeiro, com o intuito de explorar ao máximo o potencial genético da cultura. O desenvolvimento de cultivares resistentes às doenças e pragas é um dos principais focos dos trabalhos de melhoramento, uma vez que tem importante papel na estabilização da produtividade e na diminuição dos custos de produção (Freitas et al., 2007).

O desenvolvimento de cultivares resistentes é realizado principalmente pela introgressão de genes de resistência em cultivares comerciais. No cafeeiro, já foram identificadas algumas fontes de resistência para a ferrugem. Nelas foram caracterizados com base na teoria gene-a-gene, pelo menos nove genes dominantes presentes em cafeeiros de diferentes espécies (S_{H1} - S_{H9}) (Noronha-Wagner & Bettencourt, 1967; Bettencourt & Noronha-Wagner, 1971; Bettencourt & Rodrigues, 1988). Os genes S_{H1} , S_{H2} , S_{H4} e S_{H5} foram encontrados em *C. arabica*, os S_{H6} , S_{H7} , S_{H8} e S_{H9} em *C. canephora* e S_{H3} em *C. liberica*. Além desses genes, outros dois genes candidatos foram identificados e caracterizados

molecularmente, sendo um gene da classe dos *nucleotide binding-leucine rich repeat (CC-NBS-LRR)*, e outro pertencente na classe dos *Receptor-like-kinase* (Barka et al., 2020; Almeida et al., 2020).

Para CBD, Van Der Vossen e Walyaro (1980) propuseram a existência de um loco, denominado T, em acesso de Híbrido de Timor, conferindo resistência desse cafeeiro à doença. De acordo com Agwanda et al. (1997) e Silva et al. (2006), a resistência ao CBD é controlada por pelo menos três locos (T, R e K) presentes no Híbrido de Timor e Catimor (gene T), Rume Sudan (genes R e K), e K7 (gene K). Estudo realizado por Gichuru et al. (2008), identificou o loco responsável pela resistência a *C. kahawae* (denominado *Ck-1*). Embora esses autores sugeriram que esse loco seja semelhante ao loco T, descrito por Van Der Vossen e Walyaro (1980), não descartaram a possibilidade da existência de outros locos conferindo resistência.

A resistência ao bicho-mineiro em genótipos de *C. arabica* foi introduzida por um descendente de um cruzamento natural interespecífico entre as espécies *C. racemosa* e *C. arabica* cv. Blue Mountain. Medina Filho et al. (1977) sugeriram que essa resistência é proveniente da espécie *C. racemosa* e determinada por dois genes dominantes e complementares, sendo confirmado por Guerreiro-Filho et al. (1999). As espécies de café foram classificadas como altamente resistentes (*C. stenophylla*, *C. brevipes*, *C. liberica* e *C. salvatrix*), moderadamente resistente (*C. racemosa*, *C. kapakata*, *C. dewevrei* e *C. eugenioides*) e suscetível (*C. congensis*, *C. canephora*, e *C. arabica*) (Guerreiro Filho et al., 1991).

A utilização de cultivares resistentes surge como uma estratégia para o controle eficiente e econômico destas doenças e praga. No entanto, diversas limitações dificultam a seleção de plantas no melhoramento genético, dentre elas estão a baixa diversidade genética associada à autogamia, ciclo longo, origem e domesticação desta espécie. Dessa forma, o desenvolvimento de novos cultivares se torna uma tarefa desafiadora (Herrera et al., 2002; Geleta et al., 2012; Lashermes et al., 2016). Para contornar essas dificuldades, pode-se adotar técnicas que visam aumentar a eficiência dos trabalhos de melhoramento e, conseqüentemente, acelerar o tempo para o lançamento de um novo cultivar.

A seleção assistida por marcadores (SAM) é uma das ferramentas disponíveis para auxiliar a eficiência do melhoramento da cultura e reduzir o período de desenvolvimento de variedades de café (Moncada et al. 2016; Gimase et al., 2019). Por meio da SAM, genes de resistências podem ser identificados e monitorados na presença ou ausência do patógeno no campo (Alkimim et al., 2017). Além disso, essa estratégia reduz o tempo para o lançamento de um novo cultivar, uma vez que as avaliações podem ser realizadas em estágios iniciais das plantas. Os marcadores moleculares podem, ainda, auxiliar efetivamente na identificação de

genótipos que possuem múltiplos genes (piramidação de genes) de resistência na presença de um efeito dominante ou epistático (Alkimim et al., 2017; Almeida et al., 2021), o que permite o desenvolvimento de um novo cultivar contendo múltiplos genes de resistência.

REFERÊNCIAS

- Agwanda CO, Lashermes P, Trouslot P, Combes M, Charrier A (1997). Identification of RAPD markers for resistance to coffee berry disease, *Colletotrichum kahawae*, in arabica coffee. *Euphytica* 97:241–248.
- Almeida DP, Castro ISL, Mendes TADO, Alves DR, Barka GD, Barreiros PRRM, Zambolim L, Sakiyama NS, Caixeta ET (2020) Receptor-Like Kinase (RLK) as a candidate gene conferring resistance to *Hemileia vastatrix* in coffee. *Scientia Agricola*, 78.
- Almeida DP, Caixeta ET, Moreira KF, de Oliveira ACB, de Freitas KNP, Pereira AA, Rosado RDS, Zambolim L, Cruz CD (2021) Marker-Assisted Pyramiding of Multiple Disease Resistance Genes in Coffee Genotypes (*Coffea arabica*). *Agronomy*, 11(9), 1763.
- Barka GD, Caixeta ET, Ferreira SS, Zambolim L (2020) In silico guided structural and functional analysis of genes with potential involvement in resistance to coffee leaf rust: A functional marker based approach. *PloS one*, 15(7), e0222747.
- Bettencourt AJ, Noronha-Wagner M (1971) Genetic factors conditioning resistance of *Coffea arabica* L. to *Hemileia vastatrix* Berk and Br. *Agronomia Lusitana*, 31:285-292.
- Bettencourt A, Rodrigues C (1988) Principles and practice of coffee breeding for resistance to rust and other diseases. *Coffee Agron*, 4:199–234.
- Alkimim ER, Caixeta ET, Sousa TV, Pereira AA, de Oliveira ACB, Zambolim L, Sakiyama NS (2017) Marker-assisted selection provides arabica coffee with genes from other *Coffea species* targeting on multiple resistance to rust and coffee berry disease. *Mol. Breed.*, 2017, 37, 6.
- Carvalho DF (2007) Café, ferrovias e crescimento populacional: O florescimento da região noroeste paulista. *Revista Histórica Online do Arquivo Público do Estado de São Paulo*, 27:10-16.
- Davis AP, Tosh J, Ruch N, Fay MF (2011) Growing coffee: *Psilanthus* (Rubiaceae) subsumed on the basis of molecular and morphological data; implications for the size, morphology, distribution and evolutionary history of *Coffea*. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 167(4), 357-377.

- Freitas ZMTS, Oliveira FJ, Carvalho SP, Santos VF, Santos JP (2007) Avaliação de caracteres quantitativos relacionados com o crescimento vegetativo entre cultivares de café arábica de porte baixo. *Bragantia*, 66:267-275.
- Geleta M et al. (2012) Genetic Diversity of Arabica Coffee (*Coffea arabica* L.) in Nicaragua as Estimated by Simple Sequence Repeat Markers. *The Scientific World Journal*, 2012:1–11.
- Gimase JM, Thagana WM, Omondi CO, Cheserek JJ, Gichuru EK (2021) Genetic relationship and the occurrence of multiple gene resistance to coffee berry disease (*Colletotrichum kahawae*, Waller Bridge) within selected *Coffea arabica* varieties in Kenya. *African Journal of Plant Science*, 15(1):39-48.
- Gimase JM, Thagana WM, Omondi CO, Ithiru JM (2019) Evaluation of coffee berry disease resistance (*Colletotrichum kahawae*) in F₂ populations derived from Arabica coffee varieties Rume Sudan and SL 28. *Journal of Plant Breeding and Crop Science*, 11(9):225-233.
- Gichuru EK, Agwanda CO, Combes MC, Mutitu EW, Ngugi ECK, Bertrand B, Lashermes P (2008) Identification of molecular markers linked to a gene conferring resistance to coffee berry disease (*Colletotrichum kahawae*) in *Coffea arabica*. *Plant Pathol*, 57:1117–1124.
- Gichuru E, Alwora G, Gimase J, Kathurima C (2021) Coffee Leaf Rust (*Hemileia vastatrix*) in Kenya—A Review. *Agronomy*, 11(12), 2590.
- Guerreiro Filho O, Medina Filho HP, Carvalho A (1991) Fontes de resistência ao bicho-mineiro, *Perileucoptera coffeella*, em *Coffea* spp. *Bragantia*, 50(1):45–55.
- Guerreiro Filho O, Silvarolla MB, Eskes AB (1999) Expression and mode of inheritance of resistance in coffee to leaf miner *Perileucoptera coffeella*. *Euphytica*, 105:7-15.
- Herrera JC, Combes MC, Anthony F, Charrier A, Lashermes P (2002) 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*, 104(4):661–668.
- Lashermes P, Hueber Y, Combes M-C, Severac D, Dereeper A (2016) Inter-genomic DNA Exchanges and Homeologous Gene Silencing Shaped the Nascent Allopolyploid Coffee Genome (*Coffea arabica* L.). *Genes Genomes Genetics*, 6(9):2937–2948.
- McCook S (2006) Global rust belt: *Hemileia vastatrix* and the ecological integration of world coffee production since 1850. *J. Glob. Hist.*, 1:177–195.
- Medina Filho HP, Carvalho A, Mônico LC (1977) Melhoramento do cafeeiro: XXXVII—Observações sobre a resistência do cafeeiro ao bicho-mineiro. *Bragantia*, 36:131–137.

- Motta IO, Dantas J, Vidal L, Bílio J, Pujol-Luz JR, Albuquerque ÉV (2021) The coffee leaf miner, *Leucoptera coffeella* (Lepidoptera: Lyonetiidae): identification of the larval instars and description of male and female genitalia. *Revista Brasileira de Entomologia*, 65.
- Naritomi J, Soares RR, Assunção JJ (2012) Institutional development and colonial heritage within Brazil. *The Journal of Economic History*, 72(2):393-422, 2012.
- Noronha-Wagner M, Bettencourt AJ (1967) Genetics study of resistance of coffee spp.
- Pantoja-Gomez LM, Corrêa AS, Oliveira LO, Guedes RNC (2019) Common origin of Brazilian and Colombian populations of the neotropical Coffee Leaf Miner, *Leucoptera coffeella* (Lepidoptera: Lyonetiidae). *J. Econ. Entomol.*, 112:924–931.
- Silva MC, Várzea V, Guerra-Guimarães L, Azinheira HG, Fernandez D, Petitot A, Bertrand B, Lashermes P, Nicole M (2006) Coffee resistance to the main diseases: leaf rust and coffee berry disease. *Braz J Plant Physiol.*, 18:119–147.
- Torres GAL, et al. (2021) *Coffea arabica* L: History, phenology and climatic aptitude of the state of São Paulo, Brazil. *Arquivos do Instituto Biológico*, 88.
- Van Der Vossen HAM & Walyaro DJ (1980) Breeding for resistance to coffee berry disease in *Coffea arabica* L. II. Inheritance of the resistance. *Euphytica*, 29:777–791.
- Wahyudi E, Martini R, Suswatiningsih TE (2018) Perkembangan Perkebunan Kopi di Indonesia J. MASEPI 3.
- Zambolim L, Caixeta ET (2021) An overview of physiological specialization of coffee leaf rust - new designation of pathotypes. *International Journal of Current Research*, 13(01), 1556i4–15575. <https://doi.org/10.24941/ijcr.40600.01.2021>.

CAPÍTULO 1: SELEÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DE CAFEEIROS ARÁBICA PARA RESISTÊNCIA AO BICHO-MINEIRO, À FERRUGEM E AO CBD

RESUMO

O melhoramento genético do cafeeiro tem sido direcionado ao desenvolvimento de variedades produtivas e com qualidade de bebida. No entanto, ambas características são afetadas por pragas e doenças. O desenvolvimento de uma variedade resistente pela abordagem tradicional é demorado e ineficiente. Portanto, é evidente a necessidade de uso de diferentes ferramentas para auxiliar no desenvolvimento de variedades resistentes e produtivas. Diante do exposto, objetivou-se analisar precocemente o comportamento de uma população em melhoramento de café arábica, além de compreender se a piramidação de genes de resistência afeta sua produção. Uma população de 128 cafeeiros F_2 (obtidas a partir da autofecundação do híbrido F_1 H1097-29, derivado do cruzamento entre H514-7-16-3-17 CMS-CEPC e Siriema BM12-CEPCC) e duas testemunhas (Topázio MG1190 e Catuaí Vermelho IAC 144) plantados no campo experimental de Patrocínio/Epamig em Minas Gerais. A população foi avaliada fenotipicamente para estimar os parâmetros genéticos pela metodologia de modelos mistos, além disso, avaliou-se molecularmente quanto a resistência aos fungos *Hemileia vastatrix* e *Colletotrichum kahawae*. A população de café apresentou variabilidade genética para ser explorada, e com grande potencial para seleção de materiais com baixa infestação ao bicho mineiro e cercosporiose, além de apresentar plantas contendo piramidação de genes de resistência aos fungos *H. vastatrix* e a *C. kahawae*. Além disso, as médias dos cafeeiros na fenotipagem indicaram alta resistência a *H. vastatrix*. No índice de seleção, identificou-se cafeeiros com ganho de seleção para todas as características avaliadas e superiores às testemunhas.

INTRODUÇÃO

Café é uma das commodities agrícolas mais importantes em países tropicais. Mais de 124 espécies de café foram descritas (Davis et al., 2011), sendo *Coffea arabica* L. a espécie economicamente mais importante em todo o mundo. No entanto, é suscetível a uma série de pragas e doenças, que não só limitam sua produção, mas prejudicam seu cultivo sustentável (Jingade et al., 2019). Dentre elas, a ferrugem do cafeeiro (*Hemileia vastatrix*), *Coffee Berry Disease* (CBD) (*Colletotrichum kahawae*) e bicho mineiro, são os principais problemas fitossanitários na lavoura.

De forma geral, os programas de melhoramento do cafeeiro têm como principal objetivo desenvolver cultivares produtivos, adaptados, com resistência a pragas e doenças (Krishnan et al., 2021). A resistência à ferrugem do café é conferida por pelo menos nove genes dominantes (S_{H1} a S_{H9}), identificados em *C. arabica* (S_{H1}, 2, 4 e 5), *C. canephora* (S_{H6}, 7, 8 e 9) e *C. liberica* (S_{H3}) (Noronha-Wagner e Bettencourt, 1967; Bettencourt e Noronha-Wagner, 1971; Bettencourt e Rodrigues, 1988). No entanto, os genes identificados em *C. arabica* foram suplantados por diferentes raças do fungo (Cabral et al., 2009; Fernandez et al., 2012; Maia et al. 2013). Dessa forma, os programas de melhoramento visam introgridir genes das outras espécies cafeeiras em *C. arabica*.

Quanto à resistência do cafeeiro a *C. kahawae*, Van der Vossen e Walyaro (1980), por meio de estudo de herança, propuseram a existência de um loco (T) para a resistência ao CBD em Híbrido de Timor (HdT). Agwanda et al. (1997) e Silva et al. (2006), afirmam que a resistência ao CBD é controlada por pelo menos três locos (T, R e K) presentes em HdT e Catimor (gene T), Rume Sudan (genes R e K) e K7 (gene K). Gichuru et al. (2008) identificaram o gene *Ck-1* em cafeeiros derivados de Catimor e sugeriram que esse gene corresponde ao loco T previamente identificado em HdT. Essa doença não foi relada fora da África, porém há preocupações de sua disseminação para outros países produtores como o Brasil.

A cultura do café é também severamente afetada pelo ataque de diferentes insetos, com destaque para o bicho mineiro (*Leucoptera coffeella*), uma das mais importantes pragas do cafeeiro no Brasil (Santiago-Salazar et al., 2021). Diferentes níveis de resistência a esta praga foram observados entre as espécies de *Coffea*. A principal fonte de resistência ao bicho mineiro são plantas derivadas de um cruzamento natural entre *C. arabica* (suscetível) e *C. racemosa* (moderadamente resistente) obtido na década de 1950 (Medina, 1963). Atualmente, existem apenas duas cultivares resistentes a essa praga no Brasil: Siriema VC4 e Siriema AS1 (Dantas et al., 2021). Portanto, essas cultivares são utilizadas nos programas de melhoramento para desenvolvimento de novas variedades.

O melhoramento genético do cafeeiro pela abordagem tradicional, é um processo trabalhoso, caro e demorado (Pinto et al., 2021), portanto, a utilização de modelos mistos juntamente com a genética molecular auxilia os melhoristas no estudo do desenvolvimento de novas cultivares de café.

Nesse sentido, marcadores moleculares associados a resistência a *H. vastatrix* e *C. kahawae* foram identificados. Para resistência a ferrugem, Mahé et al. (2008) identificaram marcadores do tipo *Sequence-Characterized Amplified Region* (SCAR) e *Simple Sequence Repeat* (SSR) co-segregando com o gene de resistência S_{H3}. Almeida et al. (2021) identificaram

marcadores moleculares associado a outros dois locos de resistência a *H. vastatrix*. Nesse trabalho, QTL que conferiram resistência à raça I, II, e patótipo 001 de *H. vastatrix* foram localizados nos grupos de ligação 2 e 5 do mapa genético e os marcadores flanqueando esses QTL foram identificados (SSR16, CaRHv8 e CaRHv9). Um quarto loco de resistência a ferrugem foi identificado por Alvarenga et al. (2010) e detalhadamente caracterizado e clonado por Barka et al. (2020). O gene corresponde a um *Resistance Gene Analog* (RGA), o qual pode ser monitorado pelo marcador molecular CARF005. Por meio da análise do marcador em diferentes cafeeiros constatou-se que o gene clonado corresponde a gene distinto dos genes até então caracterizado, sendo, portanto, denominado de S_H10 (Barka et al., 2020 e Zambolim & Caixeta, 2021). Por meio de mapeamento, Almeida et al. (2021) confirmaram que o S_H10 corresponde a loco distinto dos QTL associado a resistência.

Para resistência a CBD, usando as cultivares Catimor 88 e Catimor 127 como fonte de resistência, Gichuru et al. (2008) identificaram oito marcadores AFLP e dois SSR ligados ao gene para resistência ao CBD. O gene denominado Ck-1 foi encontrado em um segmento de 11 cM, sendo eficiente na seleção assistida por marcadores (SAM) (Alkimim et al., 2017).

A SAM pode acelerar o desenvolvimento de novas cultivares de café (Sousa et al., 2019). Portanto, a adoção da SAM é essencial para o melhoramento genético da espécie, visto que os experimentos envolvem longos períodos e altos custos. Além disso, essa estratégia pode ser usada para acumular vários genes de resistência em um único genótipo (Qi e Ma, 2020), por meio da piramidação de genes. O benefício da piramidação gênica está no aumento da durabilidade da resistência, devido à maior dificuldade do patógeno em suplantar maior número de genes de resistência no hospedeiro (Almeida et al., 2020). Além de buscar o acúmulo de genes de resistência, é necessário melhorar simultaneamente os vários caracteres econômicos que impactam diretamente nos retornos líquidos dos agricultores (Nair, 2021).

Os desafios no melhoramento de *C. arabica*, por ser espécie perene, ainda é maior, pois os dados obtidos estão comumente desequilibrados devido às adversidades no campo ao longo do tempo (Sousa et al., 2019). Portanto, o uso da metodologia de modelos mistos, *Restricted Maximum Likelihood/Best Linear Unbhetic Prediction* (REML/BLUP) (Patterson & Thompson, 1971; Henderson, 1975) buscam minimizar essa limitação e permitem, a partir de informações fenotípicas, a previsão precisa e imparcial dos valores genéticos dos indivíduos (Resende e Thompson, 2004; Viana et al., 2011; Corrêa et al., 2015; Spinelli et al., 2015).

Diante do exposto, objetivou-se analisar precocemente o comportamento de uma população em geração segregante de café arábica, além de compreender se a piramidação de genes de resistência afeta na produção.

MATERIAL E MÉTODOS

Material genético

Foram avaliados 144 cafeeiros, sendo 128 plantas em geração F₂ e 2 testemunhas com 2 plantas por parcela (cultivares Topázio MG1190 e Catuaí Vermelho IAC 144) (Tabela 1). Os cafeeiros F₂ foram obtidos a partir da autofecundação do híbrido F₁ H1097-29, derivado do cruzamento entre H514-7-16-3-17 CMS-CEPC (♀) e Siriema BM12-CEPCC (♂) (Figura 1). O progenitor feminino (H514-7-16-3-17 CMS-CEPC) corresponde a um cafeeiro em geração F₄ derivado do cruzamento entre Catuaí Amarelo IAC 86 x Híbrido de Timor (HdT) UFV 440-10. O HdT 440-10 apresenta em homozigose o gene *Ck-1*, que é responsável pela resistência ao CBD, além de resistência a ferrugem (Silva et al., 2018b). O progenitor masculino Siriema BM12-CEPCC apresenta em sua genealogia a espécie *C. racemosa* e Catimor UFV 417, com resistência ao bicho-mineiro e ferrugem, respectivamente.

Tabela 1. População F₂ (H514-7-16-3-17 CMS-CEPC x Siriema BM12-CEPCC) de cafeeiros arábica analisados.

Cafeeiros	Geração	Descrição campo	Cafeeiros	Geração	Descrição campo
Topázio (T1) ¹	Testemunha	T1	34	F ₂	11B12P32
Catuai (T2) ²	Testemunha	T2	35	F ₂	11B12P33
3	F ₂	11B12P1	36	F ₂	11B12P34
4	F ₂	11B12P2	37	F ₂	11B12P35
5	F ₂	11B12P3	38	F ₂	11B12P36
6	F ₂	11B12P4	39	F ₂	11B12P37
7	F ₂	11B12P5	40	F ₂	11B13P1
8	F ₂	11B12P6	41	F ₂	11B13P2
9	F ₂	11B12P7	42	F ₂	11B13P3
10	F ₂	11B12P8	43	F ₂	11B13P4
11	F ₂	11B12P9	44	F ₂	11B13P5
12	F ₂	11B12P10	45	F ₂	11B13P6
13	F ₂	11B12P11	46	F ₂	11B13P7
14	F ₂	11B12P12	47	F ₂	11B13P8
15	F ₂	11B12P13	48	F ₂	11B13P9
16	F ₂	11B12P14	49	F ₂	11B13P10
17	F ₂	11B12P15	50	F ₂	11B13P11
18	F ₂	11B12P16	51	F ₂	11B13P12
19	F ₂	11B12P17	52	F ₂	11B13P13
20	F ₂	11B12P18	53	F ₂	11B13P14
21	F ₂	11B12P19	54	F ₂	11B13P15
22	F ₂	11B12P20	55	F ₂	11B13P16
23	F ₂	11B12P21	56	F ₂	11B13P17
24	F ₂	11B12P22	57	F ₂	11B13P18
25	F ₂	11B12P23	58	F ₂	11B13P19
26	F ₂	11B12P24	59	F ₂	11B13P20
27	F ₂	11B12P25	60	F ₂	11B13P21
28	F ₂	11B12P26	61	F ₂	11B13P22
29	F ₂	11B12P27	62	F ₂	11B13P23
30	F ₂	11B12P28	63	F ₂	11B13P24
31	F ₂	11B12P29	64	F ₂	11B13P25
32	F ₂	11B12P30	65	F ₂	11B13P26
33	F ₂	11B12P31	66	F ₂	11B13P27

¹8 plantas do cultivar Topázio MG1190; ²8 plantas do cultivar Catuai Vermelho IAC 144.

Tabela 1. Continuação...

Cafeeiros	Geração	Descrição campo	Cafeeiros	Geração	Descrição campo
67	F ₂	11B13P28	99	F ₂	11B14P24
68	F ₂	11B13P29	100	F ₂	11B14P25
69	F ₂	11B13P30	101	F ₂	11B14P26
70	F ₂	11B13P31	102	F ₂	11B14P27
71	F ₂	11B13P32	103	F ₂	11B14P28
72	F ₂	11B13P33	104	F ₂	11B14P29
73	F ₂	11B13P34	105	F ₂	11B14P30
74	F ₂	11B13P35	106	F ₂	11B14P31
75	F ₂	11B13P36	107	F ₂	11B14P32
76	F ₂	11B14P1	108	F ₂	11B14P33
77	F ₂	11B14P2	109	F ₂	11B14P34
78	F ₂	11B14P3	110	F ₂	11B14P35
79	F ₂	11B14P4	111	F ₂	11B14P36
80	F ₂	11B14P5	112	F ₂	11B14P37
81	F ₂	11B14P6	113	F ₂	11B14P38
82	F ₂	11B14P7	114	F ₂	11B15P1
83	F ₂	11B14P8	115	F ₂	11B15P2
84	F ₂	11B14P9	116	F ₂	11B15P3
85	F ₂	11B14P10	117	F ₂	11B15P4
86	F ₂	11B14P11	118	F ₂	11B15P5
87	F ₂	11B14P12	119	F ₂	11B15P6
88	F ₂	11B14P13	120	F ₂	11B15P7
89	F ₂	11B14P14	121	F ₂	11B15P8
90	F ₂	11B14P15	122	F ₂	11B15P9
91	F ₂	11B14P16	123	F ₂	11B15P10
92	F ₂	11B14P17	124	F ₂	11B15P11
93	F ₂	11B14P18	125	F ₂	11B15P12
94	F ₂	11B14P19	126	F ₂	11B15P13
95	F ₂	11B14P20	127	F ₂	11B15P14
96	F ₂	11B14P21	128	F ₂	11B15P15
97	F ₂	11B14P22	129	F ₂	11B15P16
98	F ₂	11B14P23	130	F ₂	11B15P17

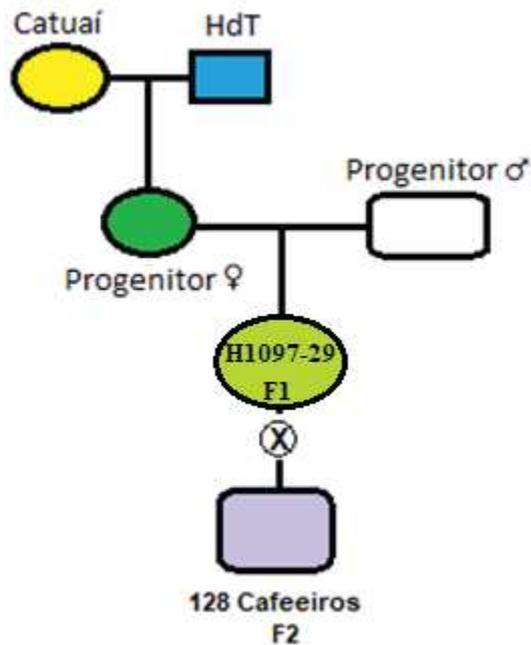


Figura 1. Heredrograma das 128 plantas *C. arabica* em geração F₂ a partir da autofecundação do híbrido H1097-29 (F₁), originado do cruzamento do progenitor ♀ (H514-7-16-3-17 CMS-CEPC) e progenitor ♂ (Siriema BM12-CEPCC).

Design experimental

O experimento foi plantado em 19/02/2016, no Campo Experimental de Patrocínio/Epamig, município de Patrocínio, na região do Alto Paranaíba, no estado de Minas Gerais. Os cafeeiros foram dispostos no delineamento de blocos aumentados (4 blocos, contendo 37 cafeeiros F₂ no bloco 1, 36 no bloco 2, 38 no bloco 3 e 17 no bloco 4) e espaçamento de 3,5 m entre linhas e 0,8 m entre plantas. Como testemunhas utilizou as cultivares Topázio MG1190 e Catuai Vermelho IAC 144, com duas plantas de cada por bloco. A calagem do solo e a adubação do plantio foram realizadas por meio da análise de solo e exigência da cultura. Nenhum método de controle fitossanitário foi utilizado contra ferrugem, cercosporiose e bicho mineiro.

Características avaliadas

Onze características agrônômicas foram avaliadas nos cafeeiros, em 28 de maio de 2019, no estágio de maturação dos grãos, sendo, o vigor vegetativo (VIG), produção (P), altura de plantas (AL), diâmetro de caule (DCA), diâmetro de copa (DCO), comprimento de ramos plagiotrópicos (CRP), ciclo de maturação dos frutos (CM), uniformidade de maturação dos frutos (UM), severidade de cercosporiose (CE), severidade de ferrugem (FE) e infestação de bicho-mineiro (BM) (Tabela 2).

Tabela 2. Características fenotipadas analisadas em população F₂ (H514-7-16-3-17 CMS-CEPC x Siriema BM12-CEPCC) de cafeeiros arábica safra 2019 em Patrocínio - MG.

Características	Sigla	Descrição
Vigor vegetativo	VIG	Avaliado por notas de 1 a 10. 1: Planta totalmente depauperada. 10: Planta considerada com vigor máximo.
Produção	P	Litros de café recém colhido por planta
Ciclo de maturação	CM	1 = precoce; 2 = média para precoce; 3 = média; 4 = média para tardia; 5 = tardia.
Uniformidade de maturação dos frutos	UM	Notas de 1 a 4. 1 = uniforme; 2 = medianamente uniforme; 3 = medianamente desuniforme; 4 = desuniforme.
Diâmetro de copa (cm)	DCO	Medido no sentido transversal à linha de plantio, medindo-se a maior projeção da "saia" do cafeeiro.
Diâmetro de caule (cm)	DCA	Medido com auxílio de um paquímetro digital, na região do coleto da planta, a aproximadamente 5 cm da superfície do solo.
Comprimento do ramo plagiotrópico	CRP	Comprimento de um Ramo Plagiotrópico Representativo da Planta.
Altura de Planta (cm)	AL	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	FE	Notas de 1 a 5. 1 = ausência de pústulas e reações de hipersensibilidade; 2 = poucas folhas com pústulas sem esporos (<i>flecks</i>) 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	CE	Notas de 1 a 5. Nota 1: sem cercospora; 2 a 5: folhas com cercospora. 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.

Análises genético-estatísticas

A estimativa dos componentes de variância e a predição dos valores genéticos foi realizada por meio da metodologia REML/BLUP (Patterson e Thompson, 1971; Henderson, 1973), utilizando o modelo estatístico:

$$Y = X_u + W_b + Z_g + e$$

onde Y é vetor de observações; u é o vetor de efeitos fixos; b é um vetor de efeitos aleatórios de bloco; g é o vetor dos efeitos aleatórios de genótipos; e é o vetor de erros. X , W e Z são matrizes conhecidas que relacionam os elementos de b , u e g com os elementos de Y .

Foi realizada a análise de deviance (ANADEV) para as características fenotípicas. 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.

Os componentes de variância foram estimados via REML de Patterson e Thompson (1971) e a predição de valores genéticos foi pelo BLUP de Henderson (1973), processados no *software* R (R CORE TEAM, 2018).

A relação entre as características foi avaliada por meio da correlação entre os *values* genotípicos (BLUP), para detecção do grau de associação significativamente distintas de zero.

Para classificar os genótipos, foi aplicado índice de seleção de Mulamba e Mock (1978) nos *values* genotípicos dos cafeeiros derivados do BLUP, adotando-se o seguinte modelo $I_{MM} = \sum (R_{ij} \times P)$. O I_{MM} corresponde ao valor do índice para determinado genótipo; o R_{ij} ranque do genótipo e P ao peso econômico atribuído à j-ésima característica. Os ganhos de seleção foram estimados por $GS \% = [(X_s - X_o)/X_o \times 100]$, em que GS % corresponde ao ganho de seleção em porcentagem; X_s a média selecionada dos cafeeiros de menor valor no índice de Mulamba e Mock e X_o a média total dos cafeeiros na característica. Devido à presença de dados perdidos os cafeeiros 7, 59 e 61 não foram incluídos nesta análise. Adotou-se peso diferentes para as características, de acordo com sua importância para o cafeeiro e objetivo do cruzamento realizado no programa de melhoramento. Para as características VIG, CE, FE, AL, DCO, CRP e CM adotou-se peso 1, enquanto que para BM, P, UM e DCA adotou-se pesos 5, 4, 3 e 2, respectivamente.

Avaliações moleculares

Folhas jovens e totalmente expandidas dos cafeeiros F_2 foram coletadas e o DNA genômico extraído usando a metodologia descrita por Diniz et al. (2005). A concentração de DNA foi verificada no NanoDrop 2000 e sua qualidade foi avaliada em gel de agarose a 1%. A concentração de DNA das amostras foi padronizada em $25 \text{ ng.}\mu\text{L}^{-1}$ e armazenadas a -20°C .

O DNA purificado foi amplificado com dois marcadores SSR identificados e mapeados por Gichuru et al. (2008) como associado ao gene *Ck-1* que confere resistência a CBD, CBD-Sat235 (*primer forward* TCGTTCTGTCATTAATCGTCAA e *primer reverse* GCAAATCATGAAAATAGTTGGTG) e CBD-Sat207 (*forward* GAAGCCGTTTCAAGCC e *reverse* CAATCTCTTTCCGATGCTCT). Para a identificação da banda associada a resistência, foram usados genótipos controles, três contendo o alelo de resistência (HdT UFV

377-15, HdT UFV 440-10 e a cultivar MGS Catiguá 3) e dois contendo apenas o alelo de suscetibilidade (Caturra Vermelho - CIFC 19/1 e Catuaí Amarelo IAC 64 - UFV 2148-57).

A amplificação por PCR foi realizada em um volume total de 25 uL contendo 50 ng de DNA genômico; 1X tampão Taq DNA polimerase; 2,0 mM de MgCl₂; 0,1 mM de dNTPs; 0,4 µM de cada *primer*, e 0,5 unidades da enzima Taq DNA polimerase. As reações foram realizadas usando termocicladores PTC-200 (MJ Research) e Veriti (Applied Biosystems). O programa de PCR consistiu em uma etapa inicial de desnaturação a 95°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos a 95°C por 45 segundos, anelamento por 45 segundos em temperaturas específicas para cada *primer*, extensão a 72°C por 45 segundos e uma extensão final a 95°C por 10 minutos (Alkimim et al. 2017).

Os DNAs também foram amplificados com marcadores associados a locos de resistência à ferrugem. Foram utilizados os marcadores moleculares SSR16, CaRHv8 e CaRHv9 (Almeida et al., 2021) ligados aos QTL que conferem resistência as raças I, II e patótipo 001 de *H. vastatrix*. Os marcadores SSR16 e CaRHv8 flanqueiam o QTL do grupo de ligação 2 e o CaRHv9 está associado ao QTL do grupo de ligação 5. Os genótipos HdT UFV 443-03 e Catuaí Amarelo IAC 64 - UFV 2148/57 foram os controles resistente e suscetível, respectivamente. Utilizou-se esses genótipos por serem os parentais da população na qual foram identificados os QTL associados à resistência a *H. vastatrix* (Almeida et al., 2021).

A amplificação por PCR para o primer SSR16 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. Para a amplificação, foi utilizado o procedimento *touchdown* PCR, que consistiu em uma etapa 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.

A amplificação dos marcadores CaRHv8 e CaRHv9 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. A amplificação consistiu em uma etapa 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.

Outro loco de resistência a ferrugem foi analisado usando o marcador CARF005 (*primer forward* GGACATCAACACCAACCTC e *primer reverse* ATCCCTACCATCCACTTCAAC) (Alvarenga et al., 2011; Barka et al., 2020). A reação foi realizada em volume final de 20 μ L, contendo 50 ng de DNA genômico, tampão de reação de PCR 1X, 1 mM de $MgCl_2$, 0,15 mM de cada dNTP; 0,1 μ M de cada *primer*, 1 unidade de Taq DNA polimerase, completando o volume com água milli-Q. A amplificação consistiu em: etapa de desnaturação inicial de 95°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto; extensão final de 72°C por 10 minutos.

Os produtos resultantes da reação de PCR para os marcadores CBD-Sat235, CBD-Sat207, SSR16 e CaRHv8 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 CaRHv9 foi visualizado por eletroforese em gel de agarose e corados em brometo de etídeo e o marcador CARF 005 foi analisado por eletroforese capilar em sequenciador *ABI 3130xl Genetic Analyzer – Applied Biosystems*. Para avaliar a presença dos alelos dos cafeeiros, utilizou o padrão de bandas apresentados pelos genótipos controles, resistentes e suscetíveis. As leituras dos géis foram realizadas com base na presença ou ausência da marca (banda) de resistência. Enquanto que para a eletroforese capilar, verificou-se o padrão de eletroferograma (picos) dos genótipos controles. Para os marcadores codominantes foram avaliados genótipos homozigotos e heterozigotos.

RESULTADOS

Análises fenotípicas

Os cafeeiros F_2 e as testemunhas foram analisados em campo e a partir dos dados fenotípicos foram estimados parâmetros genéticos usando a metodologia do modelo misto REML/BLUP. Houve efeito significativo de genótipos para as características VIG, UM, CE, FE, BM ($p \leq 0,001$) e CM, DCA ($p \leq 0,05$) (Tabela 3).

As estimativas dos parâmetros genéticos para as características dos cafeeiros estão apresentadas na Tabela 3. A variância genética (σ_g) variou de 0,39 (CM) a 17,68 (DCO). As σ_g^2 foram superiores a variância residual (σ_r^2) para as características VIG, P, UM, DCO, DCA, FE, CE e BM, enquanto que para as demais características a σ_r foi superior a σ_g . As características AL e DCO apresentaram alta variância residual.

Tabela 3. Teste da máxima verossimilhança e estimativas de parâmetros genéticos para as características vigor (VIG), produção (P), ciclo de maturação (CM), uniformidade de maturação dos frutos (UM), diâmetro de copa (DCO), diâmetro de caule (DCA), comprimento de ramo plagiotrópicos (CRP), altura de planta (AL), severidade de ferrugem (FE), severidade de cercosporiose (CE), infestação de bicho mineiro (BM) em cafeeiros arábica.

Parâmetros genéticos	VIG	P (L)	CM	UM	DCO (cm)	DCA (cm)	CRP	AL (cm)	FE	CE	BM
LTR	3,63E-14 ^{***}	0,211 ^{ns}	0,0211 [*]	7,231E-7 ^{***}	0,074 ^{ns}	0,02166 [*]	0,140 ^{ns}	0,675 ^{ns}	2,2E-16 ^{***}	1,279E-11 ^{***}	1,75E-04 ^{***}
σ^2g	1,24	1,42	0,39	0,71	17,68	0,61	7,15	7,64	0,45	0,70	1,09
σ^2b	0,53	0,18	0,20	0,19	3,25	0,16	2,14	3,38	0,16	0,39	0,00
σ^2r	0,79	1,23	0,67	0,31	15,99	0,45	8,01	16,96	0,34	0,54	0,46
h^2	0,48	0,50	0,31	0,59	0,48	0,50	0,41	0,27	0,48	0,43	0,71
Média	6,89	3,60	2,07	2,66	125,41	4,6	62,30	137,65	1,31	2,25	2,73
Mínimo	2	0,1	1	1	50	1,3	25	44	1	1	1
Mediana	7	4	2	3	124	4,6	62	140,5	1	2	3
Máximo	9	8	4	4	246	6,5	90	1820	2	4	5

*LTR (*Likelihood Ratio Test*) = teste da máxima verossimilhança, ^{***} $p < 0,001$, ^{*} $p < 0,05$ e ^{ns} = não significativo pelo teste de Qui-quadrado com 1 grau de liberdade; σ^2g = variância genotípica; σ^2b = variância de bloco; σ^2r = variância residual; h^2 = herdabilidade no sentido amplo; Média = média geral.

As herdabilidades individuais no sentido amplo variaram de 0,27 (AL) a 0,71 (BM). A característica de infestação ao bicho mineiro mostrou a maior magnitude de herdabilidade. Além disso, a característica P apresentou alto valor de h^2 (0,50).

A análise de boxplot para as características quantitativas está apresentado na figura 2 e 3. Observou-se que a característica produção apresentou grande variabilidade, sendo que 25% dos cafeeiros da população produziram mais de 5 L (Figura 2). Além disso, a produtividade média da população alcançou 3,6 L, no entanto com grande amplitude, mínimo de 0,1 L e máximo de 8 L (Tabela 3). Variabilidade também foi observada para a característica DCA, no entanto 75% dos cafeeiros dessa população apresentam diâmetro de caule superior a 4,1 cm (Figura 2) e uma média e mediana de 4,6 cm (Tabela 3).

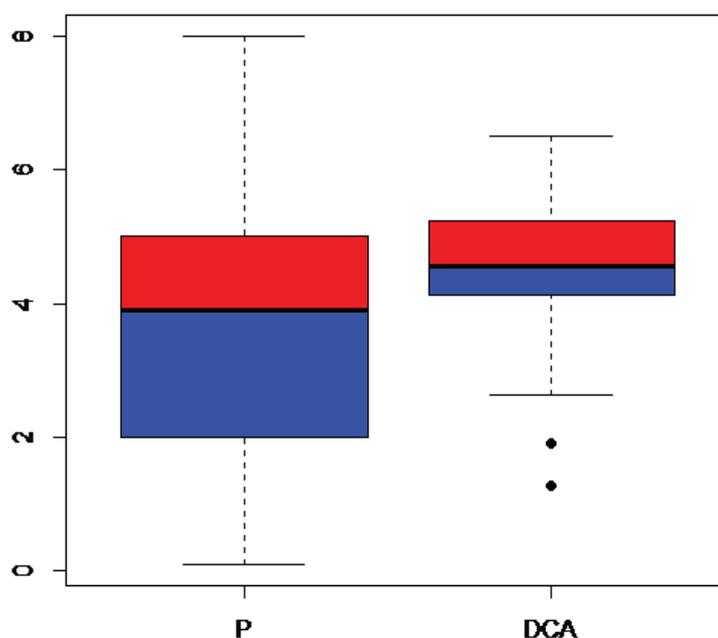


Figura 2. Análise de boxplot para as características quantitativas produção (P) e diâmetro de caule (DCA) em população F_2 de café arábica na safra 2019. Os pontos correspondem a *outliers*. A caixa vermelha corresponde ao terceiro quartil e a azul o segundo quartil.

Analisando a altura das plantas, 75% dos cafeeiros mediram mais de 126 cm de altura (Figura 3). A característica DCO apresentou baixa variabilidade, no qual apenas 25% dos cafeeiros apresentaram diâmetro de copa inferior a 110 cm (Figura 3), porém observou-se grande amplitude, variando entre 50 cm a 246 cm (Tabela 3). O comprimento de ramo plagiotrópico variou entre 25 a 90 cm, com de média 62,30 cm (Tabela 3). Foram observados *outlier* para as três características, AL, DCO e CRP (Figura 3).

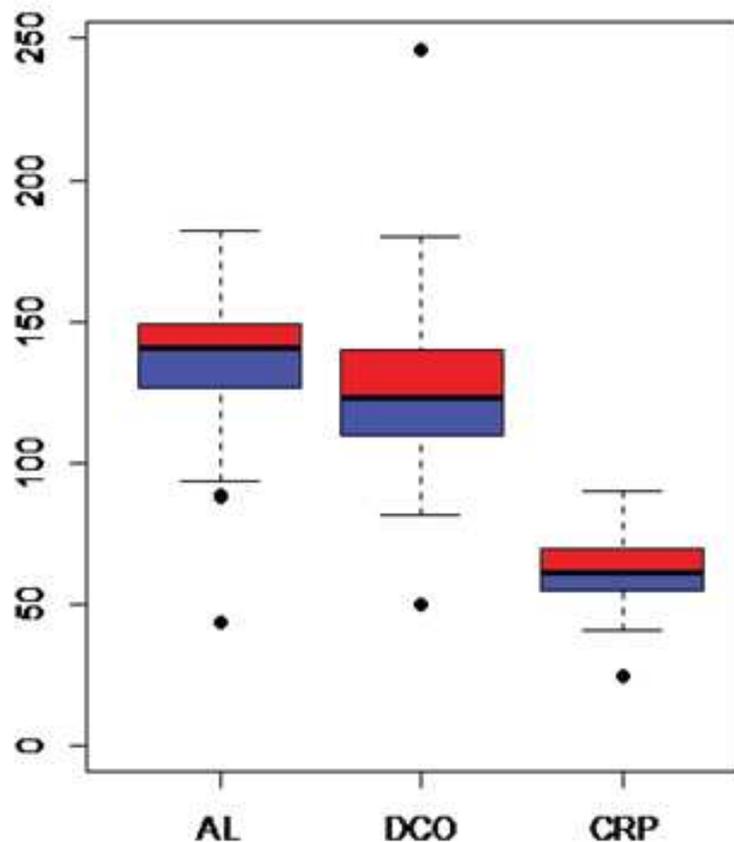
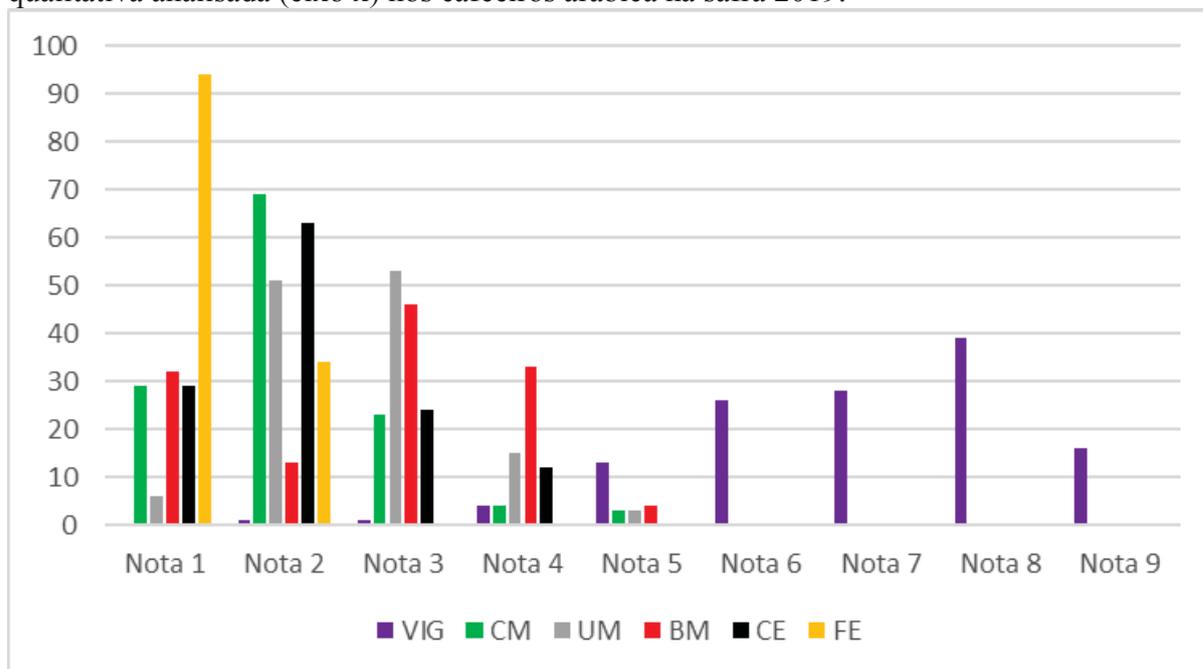


Figura 3. Análise de boxplot para as características quantitativas altura de plantas (AL), diâmetro de copa (DCO) e comprimento de ramo plagiotrópico (CRP) em população F₂ de café arábica safra 2019. Os pontos correspondem a *outliers*. A caixa vermelha corresponde ao terceiro quartil e a azul o segundo quartil.

As características VIG, CM, UM, BM, CE e FE foram analisadas por notas e o resultado está apresentado na Figura 4. Para a característica VIG, as notas variaram de 2 a 9, sendo que cerca de 85% apresentaram notas entre 6 a 9. Para CM mais de 76% da população obteve notas 1 e 2, enquanto para UM as notas 2 e 3 predominaram com mais de 81% dos cafeeiros. Se tratando da fitossanidade da população, para CE a maioria dos cafeeiros obtiveram nota 2. Em relação a BM 3,13% (4 cafeeiros) tiveram nota 5, mas 35,16% tiveram notas entre 1 e 2. Quanto a característica FE, mais de 73% dos cafeeiros tiveram nota 1, com média de 1,3 (Tabela 3).

Figura 4. Gráfico da quantidade de cafeeiros (eixo y) *versus* a nota para cada característica qualitativa analisada (eixo x) nos cafeeiros arábica na safra 2019.



Características: Vigor vegetativo (VIG), Ciclo de maturação (CM), Uniformidade de maturação dos frutos (UM), Infestação de bicho mineiro (BM), Severidade de cercosporiose (CE) e Severidade de ferrugem (FE).

Correlação

A análise de correlação genética entre as 11 características está apresentada na Tabela 4. As maiores correlações positivas foram observadas entre os pares de características: CRP x DCO (0,95) e P x DCA (0,58). Das 55 correlações entre as características, 22 foram negativas e as maiores correlações negativas foram observadas entre os pares de características: CE x VIG (-0,65) e FE x VIG (-0,41). Nenhuma correlação foi encontrada entre as características DCO x BM, DCA x CE e UM x CRP.

Tabela 4. Correlações genéticas entre as onze características morfológicas analisadas em população F₂ de cafeeiros arábica na safra de 2019 em Patrocínio - MG.

Característica ¹	VIG	CE	FE	BM	AL	DCO	DCA	CRP	P	CM	UM
VIG	1	-0,65	-0,41	-0,12	-0,03	0,21	0,29	0,22	-0,05	0,06	-0,13
CE		1	0,37	0,38	0,22	-0,08	0,00	-0,09	0,41	-0,04	0,13
FE			1	0,11	0,12	-0,12	-0,06	-0,13	0,05	0,07	0,10
BM				1	-0,03	0,00	0,01	0,05	0,12	-0,02	0,04
AL					1	0,37	0,42	0,35	0,49	-0,11	-0,16
DCO						1	0,43	0,95	0,22	-0,01	0,02
DCA							1	0,44	0,58	-0,31	-0,21
CRP								1	0,23	-0,02	0,00
P									1	-0,25	-0,23
CM										1	0,53
UM											1

¹Vigor vegetativo (VIG), severidade de cercosporiose (CE), severidade de ferrugem (FE), infestação de bicho mineiro (BM), altura de plantas (AL), diâmetro de copa (DCO), diâmetro de caule (DCA), comprimento dos ramos plagiotrópicos (CRP), produção (P), ciclo de maturação dos frutos (CM) e uniformidade de maturação dos frutos (UM).

Índice e ganho de seleção

Para obter o índice e o ganho de seleção usou-se as variâncias genéticas dos BLUP para seleção de Mulamba e Mock (1978). Na Tabela 5 estão listados os 127 cafeeiros ranqueados para as 11 características, pois três plantas foram excluídas das análises devido a grande quantidade de dados perdidos. As testemunhas Topázio MG1190 e Catuaí Vermelho IAC 144 ficaram nas posições de 124° e 125°, respectivamente, ficando à frente somente dos cafeeiros 64 e 48.

Com a intensidade de seleção de 30%, selecionou-se 38 cafeeiros F₂ superiores por intermédio das somas de ranques de 11 características (Tabela 5). Todos os cafeeiros selecionados foram superiores às cultivares Topázio MG1190 e Catuaí Vermelho IAC 144. Analisando individualmente a característica BM, objetivo principal do cruzamento, observou-se que os seis melhores cafeeiros para esta característica fazem parte da população selecionada. No entanto, desses 38 selecionados para o conjunto de características, 15 não apresentaram resistência ao bicho-mineiro.

Tabela 5. Índice de seleção baseado na soma de ranque com base em pesos para onze características morfoagronômicas em população de café arábica e piramidação de genes a *C. kahawae* (Ck1) e *H. vastatrix* (QTL-GL2, QTL-GL5 e S_H10) por meio de marcadores moleculares.

Rank	ID	VIG*	CE*	FE*	BM*	AL*	DCO*	DCA*	CRP*	P*	CM*	UM*	Ck1**	QTL-GL2**	QTL-GL5**	S _H 10**
1°	87	10	40	7	1	122	39	22	7	2	52	31	+	+	+	+
2°	16	17	19	30	42	97	42	8	10	14	87	48	+	+	+	+
3°	127	92	93	61	20	82	93	38	64	4	42	11	-	-	+	-
4°	120	4	30	55	16	85	3	4	21	56	99	59	+	+	+	-
5°	113	55	55	17	6	106	109	35	89	65	8	3	+	+	+	+
6°	83	2	39	6	46	77	117	58	71	19	2	28	+	-	+	+
7°	24	63	22	37	26	102	34	31	3	32	91	51	+	+	+	+
8°	95	47	44	12	3	42	62	46	62	24	101	88	-	+	-	+
9°	130	73	35	120	21	44	76	32	99	59	1	13	+	+	+	-
10°	4	87	71	19	74	52	14	29	37	10	18	44	+	+	+	+
11°	28	106	83	41	28	116	46	24	15	15	94	52	+	-	+	+
12°	12	58	76	26	23	120	40	23	8	3	117	98	+	+	+	+
13°	121	5	31	56	17	43	16	115	34	88	36	9	+	-	+	-
14°	58	32	63	77	11	80	70	20	67	38	76	71	+	+	+	+
15°	85	79	96	95	48	100	36	12	4	41	3	30	-	+	+	+
16°	49	26	60	69	10	109	29	69	53	72	71	16	-	-	-	+
17°	112	102	54	112	5	91	56	79	51	42	7	43	-	+	+	-
18°	75	39	70	91	15	124	13	15	2	50	82	78	-	-	-	-
19°	90	11	42	98	49	41	79	54	111	21	55	32	-	-	-	+
20°	124	112	92	58	38	81	8	61	25	57	39	10	+	+	+	-
21°	9	88	73	23	41	96	123	36	105	12	19	46	+	-	+	-
22°	118	21	29	53	70	20	21	18	38	16	34	112	-	-	-	-
23°	89	43	41	97	2	118	66	41	118	35	54	85	-	+	-	+
24°	51	28	61	71	109	101	52	1	14	7	72	17	-	+	+	-

<i>Rank</i>	ID	VIG	CE	FE	BM	AL	DCO	DCA	CRP	P	CM	UM	Ck1	QTL-GL2	QTL-GL5	S _{H10}
25°	93	45	99	10	97	110	4	34	24	6	57	34	+	+	+	+
26°	126	23	2	60	19	72	86	59	114	58	41	62	-	+	+	+
27°	84	78	95	94	47	114	101	7	83	20	50	29	+	+	+	-
28°	55	30	10	74	111	121	32	5	47	8	73	19	+	-	+	-
29°	96	48	45	13	51	112	103	45	75	37	58	35	-	-	+	+
30°	91	44	98	99	50	90	125	2	106	36	4	33	+	+	-	+
31°	106	12	4	108	55	19	24	55	43	63	103	39	+	-	+	-
32°	79	40	118	93	92	99	10	9	30	18	48	27	+	+	+	+
33°	6	57	72	21	75	64	5	21	26	11	83	96	-	-	+	-
34°	69	8	68	86	12	89	120	30	96	49	80	75	+	-	-	+
35°	105	52	50	14	4	37	113	105	94	25	124	93	+	+	+	+
36°	21	61	20	34	24	94	33	10	48	66	89	104	+	+	+	-
37°	60	96	108	78	63	73	68	73	121	9	11	21	-	+	-	+
38°***	32	18	26	45	30	35	111	37	92	95	26	54	+	-	+	+
39°	122	72	32	118	18	36	22	62	39	98	37	60	+	+	+	-
40°	73	99	111	90	36	83	15	66	32	40	17	76	+	-	+	-
41°	116	71	115	52	127	84	45	16	56	1	32	7	+	-	+	-
42°	30	107	84	43	29	98	98	90	81	68	25	5	+	+	+	-
43°	71	98	13	88	35	27	107	87	86	106	16	2	+	+	-	+
44°	67	117	110	84	67	47	72	57	69	48	13	23	-	+	+	+
45°	57	31	62	76	113	70	31	44	55	28	75	20	+	+	+	-
46°	26	65	24	39	27	103	49	26	17	86	92	106	+	+	+	+
47°	44	75	106	65	105	39	28	50	52	45	68	1	+	+	+	-
48°	40	93	56	121	7	104	67	91	120	91	67	14	+	+	+	-
49°	11	89	75	25	78	93	6	65	27	13	85	97	-	+	+	-
50°	63	116	109	80	64	63	20	68	36	39	12	72	-	+	-	-
51°	70	118	12	87	13	4	95	96	126	120	15	25	+	+	-	+

<i>Rank</i>	ID	VIG	CE	FE	BM	AL	DCO	DCA	CRP	P	CM	UM	Ck1	QTL-GL2	QTL-GL5	S _H 10
52°	45	25	57	66	9	125	51	92	13	112	69	66	+	-	+	-
53°	78	119	117	2	44	3	9	67	29	61	47	121	-	+	-	+
54°	103	84	48	106	34	18	94	64	66	100	64	37	+	+	+	+
55°	128	6	94	119	116	69	115	56	95	5	43	12	-	+	-	+
56°	22	62	21	35	81	51	110	42	91	67	24	50	-	+	+	-
57°	109	86	52	110	56	30	127	33	108	80	6	42	+	+	+	+
58°	34	19	28	47	43	5	18	71	41	96	96	109	+	+	+	-
59°	46	76	58	123	106	92	47	13	12	26	70	67	+	+	+	-
60°	15	16	18	29	80	15	41	3	9	107	86	100	+	-	+	+
61°	33	69	27	46	86	56	74	40	102	69	27	55	-	-	+	-
62°	68	36	67	85	68	24	61	113	59	93	14	24	-	-	+	+
63°	81	9	38	4	45	66	53	86	19	102	122	81	+	-	-	+
64°	62	33	64	79	125	88	19	48	35	47	77	22	-	-	-	-
65°	76	1	36	1	124	117	26	6	45	60	45	79	+	+	+	+
66°	42	74	6	64	8	16	124	94	100	118	106	65	-	+	+	+
67°	23	90	81	36	25	127	80	108	112	108	90	4	-	-	+	-
68°	14	59	77	28	117	74	38	19	6	84	20	47	+	+	+	+
69°	107	53	51	15	102	23	54	101	20	64	104	40	+	+	+	+
70°	97	81	100	100	52	67	104	104	76	62	59	36	+	-	-	-
71°	3	56	15	18	40	38	105	85	88	82	114	95	+	+	+	+
72°	74	38	69	125	115	126	35	11	1	29	81	77	+	+	+	+
73°	8	103	112	22	76	13	96	70	127	52	84	45	+	-	+	+
74°	123	111	116	57	72	86	108	25	87	17	38	114	+	+	-	-
75°	108	85	104	109	103	60	64	47	113	23	65	41	+	+	+	-
76°	43	113	105	122	104	62	57	82	57	44	9	15	-	+	+	+
77°	37	70	88	50	87	58	50	51	18	74	97	56	+	+	+	-
78°	27	66	82	40	83	115	37	28	5	54	93	107	+	+	+	+

<i>Rank</i>	ID	VIG	CE	FE	BM	AL	DCO	DCA	CRP	P	CM	UM	Ck1	QTL-GL2	QTL-GL5	S _H 10
79°	38	108	89	114	31	45	88	60	74	75	29	110	-	+	+	-
80°	36	91	87	49	123	48	11	97	33	70	28	6	+	-	+	+
81°	99	49	46	102	53	7	63	89	63	89	60	89	-	+	+	+
82°	54	95	9	73	62	21	82	125	78	119	10	18	+	+	+	+
83°	129	7	34	62	39	2	91	107	123	125	44	63	-	-	-	-
84°	82	41	3	5	32	40	100	120	82	110	123	82	-	+	-	+
85°	18	60	79	113	119	65	48	39	16	30	22	102	-	+	+	-
86°	117	123	91	117	69	11	92	80	124	97	33	8	-	+	+	-
87°	80	100	119	3	93	105	116	53	70	34	49	80	-	+	+	+
88°	86	42	97	96	94	113	44	17	11	76	51	83	+	+	+	+
89°	92	80	121	9	96	31	126	78	107	22	56	86	-	-	+	+
90°	104	51	49	107	101	68	55	52	50	101	5	38	+	-	+	+
91°	31	68	85	44	85	25	17	93	40	94	95	53	-	+	+	-
92°	5	13	16	20	22	22	97	99	80	122	115	125	+	+	+	+
93°	72	37	14	89	14	10	121	72	97	121	113	119	+	+	+	+
94°	17	121	78	31	118	79	2	43	23	53	21	101	-	-	+	-
95°	65	34	66	82	65	46	58	83	58	104	79	73	+	+	+	+
96°	114	110	114	51	126	61	25	49	44	55	30	58	+	+	+	-
97°	41	24	5	63	59	9	89	110	115	111	105	64	-	-	+	-
98°	56	115	124	75	112	119	30	14	54	46	74	70	+	+	+	-
99°	125	22	33	59	73	6	75	98	98	124	40	61	+	+	+	-
100°	119	3	1	54	71	108	78	74	109	87	35	113	+	+	-	-
101°	53	29	8	72	61	14	81	116	77	114	111	69	-	+	+	-
102°	10	14	74	24	77	34	77	27	110	83	116	126	+	+	+	+
103°	66	35	11	83	66	50	71	100	68	105	112	74	+	+	+	+
104°	98	120	101	101	33	59	23	109	42	77	102	122	-	+	+	-
105°	39	109	113	115	88	76	69	88	125	33	98	57	+	+	+	-

<i>Rank</i>	ID	VIG	CE	FE	BM	AL	DCO	DCA	CRP	P	CM	UM	Ck1	QTL-GL2	QTL-GL5	S _{H10}
106°	13	15	17	27	79	8	1	119	22	123	118	99	+	+	+	+
107°	77	77	37	92	91	57	112	95	93	99	46	26	+	+	+	+
108°	101	50	102	104	54	26	118	103	72	90	62	91	+	+	+	+
109°	50	27	7	70	108	55	43	81	49	103	109	68	+	+	-	+
110°	115	122	90	116	37	78	12	127	31	109	31	111	+	+	-	-
111°	19	104	80	32	120	53	73	76	101	85	23	49	+	-	+	-
112°	102	83	103	105	100	33	60	63	61	79	63	92	-	-	+	+
113°	111	124	122	111	58	28	27	121	46	81	66	123	+	+	+	-
114°	110	54	53	16	57	1	122	123	103	127	125	94	+	+	+	+
115°	88	101	120	8	95	111	65	126	117	71	53	84	-	+	+	+
116°	29	67	25	42	84	29	85	77	116	117	120	108	+	-	+	-
117°	100	82	47	103	99	71	102	114	84	78	61	90	+	-	+	+
118°	20	105	125	33	121	54	90	106	122	31	88	103	+	+	+	-
119°	47	126	107	67	60	12	114	122	90	92	107	115	-	+	+	-
120°	94	46	43	11	98	87	59	112	60	126	100	87	-	+	-	-
121°	35	20	86	48	122	95	7	102	28	73	121	127	+	+	+	-
122°	25	64	23	38	82	75	87	118	73	116	119	105	-	+	+	-
123°	52	114	123	124	110	17	106	111	85	27	110	117	-	-	-	-
124°	T2	127	127	126	89	123	119	75	104	51	126	124				
125°	T1	125	126	127	90	107	84	117	119	43	127	120				
126°	64	97	65	81	114	32	83	84	79	115	78	118	+	+	+	+
127°	48	94	59	68	107	49	99	124	65	113	108	116	+	+	+	-
Xo****		6,93	2,19	1,31	2,75	138,83	127,05	4,66	63,2	3,66	2,03	2,63				
Xs****		7,45	2,05	1,24	1,97	147,47	135,16	5,16	66,5	5,13	1,89	2,32				
h²****		0,48	0,43	0,48	0,71	0,27	0,48	0,5	0,41	0,5	0,31	0,59				
%GS****		7,48	-6,31	-5,3	-28,1	6,23	6,38	10,78	5,22	40,03	-6,6	-12,11				

*Característica: vigor vegetativo (VIG); severidade de cercosporiose (CE); severidade de ferrugem (FE); infestação de bicho mineiro (BM); altura de plantas (AL); diâmetro de copa (DCO); diâmetro de caule (DCA); comprimento do ramo plagiotrópico (CRP); produção (P); ciclo de maturação dos frutos (CM) e uniformidade de maturação dos frutos (UM).

** *Ck-1*: gene de resistência a CBD; QTL-GL2: um dos QTL de resistência as raças I, II e patótipo 001 de *H. vastatrix*; QTL-GL5 outro QTL de resistência as raças I, II e patótipo 001 de *H. vastatrix*; *S_H10*: gene que corresponde a outro loco de resistência a *H. vastatrix*; (+) presença da marca do alelo de resistência; (-) ausência da marca do alelo de resistência.

*** Cafeeiros ranqueados até a 38^o posição foram selecionados com intensidade de seleção de 30%,

*****X*₀: média inicial da população; *X*_s: média dos cafeeiros selecionados; *h*²: herdabilidade no sentido amplo; %GS: porcentagem do ganho com a seleção.

Em relação ao ganho de seleção dos cafeeiros selecionados, em todas as características observou-se melhoria. Os maiores ganhos positivos foram estimados para produção (40,03%) e diâmetro de caule (10,78%). Enquanto os maiores ganhos estimados para a redução da característica são a infestação de bicho-mineiro (-28,1%) e uniformidade de maturação (-12,11%). Para essas duas características, quanto menor a nota, menor infestação de bicho-mineiro e mais uniforme a maturação.

Seleção assistida por marcadores para o gene Ck-1 que confere resistência a C. kahawae – Loco A

Com o objetivo de realizar o melhoramento preventivo para a doença CBD, marcadores moleculares foram utilizados para detectar cafeeiros contendo alelo do gene de resistência *Ck-1*. A identificação de cafeeiros contendo esse alelo do gene no Brasil só é possível por meio de marcadores moleculares ligado ao gene, pois esta doença ainda não foi detectada no país, apesar de ser uma preocupação caso seja introduzida. Para facilitar a descrição da genotipagem, o loco do gene *Ck-1* foi aqui denominado de loco A e sua presença foi monitorada pela presença dos marcadores moleculares CBD-Sat 207 e CBD-Sat 235 (Gichuru et al. 2008; Alkimim et al. 2017).

Analisando a população com os dois marcadores, observou-se que 82 cafeeiros (64,06%) apresentam o alelo de resistência para ambos os marcadores. Esses marcadores são codominantes, permitindo identificar os cafeeiros homozigotos e heterozigotos. Observou-se que todos esses 82 cafeeiros contêm o gene de resistência em heterozigose (Aa) (Tabela 6).

Dos 46 cafeeiros restantes, 35 (27,34%) não apresentam o alelo de resistência para ambos os marcadores (aa) e 11 (8,59%) apresentaram apenas uma das marcas, sendo, portanto, resultantes de recombinação entre os marcadores. Os cafeeiros 23, 85, 92, 96 e 126 não apresentaram a marca de resistência considerando o marcador CBD-Sat 207 e para o marcador CBD-Sat 235 foram heterozigotos. Os cafeeiros 17, 25, 42, 47, 53 e 128 não apresentaram a marca de resistência CBD-Sat 235 e foram heterozigoto para o outro marcador CBD-Sat 207. Como houve recombinação entre os marcadores que flanqueiam o gene, considerou-se que esses cafeeiros não possuem o gene *Ck-1* e ficaram com o genótipo aa. Essa estratégia evita que alelos de resistência que podem ter sido perdido na recombinação sejam erroneamente considerados.

Tabela 6. Seleção assistida por marcadores moleculares associados a resistência do cafeeiro à CBD (loco A), à ferrugem nos genes QTL-GL2 (loco B) e QTL-GL5 (loco C) as raças I, II e patótipo 001 e S_H10 (loco D).

Cafeeiro	ID Campo	Genótipo									
3	11B12P1	AaBbC_D_	27	11B12P25	AaBbC_D_	51	11B13P12	aaBBC_dd	75	11B13P36	aabbccdd
4	11B12P2	AaBBC_D_	28	11B12P26	AabbC_D_	52	11B13P13	aabbccdd	76	11B14P1	AaBbC_D_
5	11B12P3	AaBbC_D_	29	11B12P27	AabbC_dd	53	11B13P14	aaBbC_dd	77	11B14P2	AaBbC_D_
6	11B12P4	aabbC_dd	30	11B12P28	AaBbC_dd	54	11B13P15	AaBbC_D_	78	11B14P3	aaBBccD_
7	11B12P5	AabbC_D_	31	11B12P29	aaBbC_dd	55	11B13P16	AabbC_dd	79	11B14P4	AaBBC_D_
8	11B12P6	AabbC_D_	32	11B12P30	AabbC_D_	56	11B13P17	AaBBC_dd	80	11B14P5	aaBBC_D_
9	11B12P7	AabbC_dd	33	11B12P31	aabbC_dd	57	11B13P18	AaBbC_dd	81	11B14P6	AabbccD_
10	11B12P8	AaBbC_D_	34	11B12P32	AaBbC_dd	58	11B13P19	AaBbC_D_	82	11B14P7	aaBbccD_
11	11B12P9	aaBBC_dd	35	11B12P33	AaBbC_dd	59	11B13P20	aaBBC_D_	83	11B14P8	AabbC_D_
12	11B12P10	AaBbC_D_	36	11B12P34	AabbC_D_	60	11B13P21	aaBBccD_	84	11B14P9	AaBBC_dd
13	11B12P11	AaBbC_D_	37	11B12P35	AaBbC_dd	61	11B13P22	AaBbC_D_	85	11B14P10	aaBBC_D_
14	11B12P12	AaBbC_D_	38	11B12P36	aaBBC_dd	62	11B13P23	aabbccdd	86	11B14P11	AaBbC_D_
15	11B12P13	AabbC_D_	39	11B12P37	AaBbC_dd	63	11B13P24	aaBbccdd	87	11B14P12	AaBBC_D_
16	11B12P14	AaBbC_D_	40	11B13P1	AaBbC_dd	64	11B13P25	AaBbC_D_	88	11B14P13	aaBbC_D_
17	11B12P15	aabbC_dd	41	11B13P2	aabbC_dd	65	11B13P26	AaBBC_D_	89	11B14P14	aaBbccD_
18	11B12P16	aaBBC_dd	42	11B13P3	aaBbC_D_	66	11B13P27	AaBBC_D_	90	11B14P15	aabbccD_
19	11B12P17	AabbC_dd	43	11B13P4	aaBBC_D_	67	11B13P28	aaBbC_D_	91	11B14P16	AaBbccD_
20	11B12P18	AaBbC_dd	44	11B13P5	AaBbC_dd	68	11B13P29	aabbC_D_	92	11B14P17	aabbC_D_
21	11B12P19	AaBbC_dd	45	11B13P6	AabbC_dd	69	11B13P30	AabbccD_	93	11B14P18	AaBbC_D_
22	11B12P20	aaBbC_dd	46	11B13P7	AaBBC_dd	70	11B13P31	AaBbccD_	94	11B14P19	aaBbccdd
23	11B12P21	aabbC_dd	47	11B13P8	aaBBC_dd	71	11B13P32	AaBbccD_	95	11B14P20	aaBbccD_
24	11B12P22	AaBbC_D_	48	11B13P9	AaBbC_dd	72	11B13P33	AaBBC_D_	96	11B14P21	aabbC_D_
25	11B12P23	aaBBC_dd	49	11B13P10	aabbccD_	73	11B13P34	AabbC_dd	97	11B14P22	Aabbccdd
26	11B12P24	AaBBC_D_	50	11B13P11	AaBBccD_	74	11B13P35	AaBBC_D_	98	11B14P23	aaBbC_dd

Tabela 6. Seleção assistida por marcadores moleculares associados a resistência do cafeeiro à CBD (loco A), à ferrugem nos genes QTL-GL2 (loco B) e QTL-GL5 (loco C) as raças I, II e patótipo 001 e SH10 (loco D).

Cafeeiro	Id Campo	Genótipo	Cafeeiro	ID Campo	Genótipo
99	11B14P24	aaBbC_D_	115	11B15P2	AaBbccdd
100	11B14P25	AabbC_D_	116	11B15P3	AabbC_dd
101	11B14P26	AaBbC_D_	117	11B15P4	aaBbC_dd
102	11B14P27	aabbC_D_	118	11B15P5	aabbccdd
103	11B14P28	AaBBC_D_	119	11B15P6	AaBbccdd
104	11B14P29	AabbC_D_	120	11B15P7	AaBbC_dd
105	11B14P30	AaBbC_D_	121	11B15P8	AabbC_dd
106	11B14P31	AabbC_dd	122	11B15P9	AaBbC_dd
107	11B14P32	AaBbC_D_	123	11B15P10	AaBBccdd
108	11B14P33	AaBbC_dd	124	11B15P11	AaBbC_dd
109	11B14P34	AaBbC_D_	125	11B15P12	AaBbC_dd
110	11B14P35	AaBbC_D_	126	11B15P13	aaBbC_D_
111	11B14P36	AaBbC_dd	127	11B15P14	aabbC_dd
112	11B14P37	aaBbC_dd	128	11B15P15	aaBbccD_
113	11B14P38	AaBbC_D_	129	11B15P16	aabbccdd
114	11B15P1	AaBbC_dd	130	11B15P17	AaBbC_dd

*Seleção assistida por marcadores para gene/QTL de resistência as raças I, II e patótipo 001
H. vastatrix – Loco B e Loco C*

Para verificar a presença de diferentes genes de resistência a *H. vastatrix*, foram analisados três locos associados a diferentes raças desse fungo. Um dos locos está flanqueado pelos marcadores CaRHv8 e SSR16 e corresponde a um gene/QTL presente no grupo de ligação 2 do mapa genético (QTL-GL2). Em trabalho anterior, verificou-se que dois locos correspondem a genes maiores dominantes e independentes que conferem resistência a três patótipo do fungo, raça I, raça II e patótipo 001 (Pestana et al., 2015; Almeida et al. 2021). Um desses locos, o QTL-GL2, ficou aqui denominado de loco B.

O marcador SSR16 apresenta padrão de bandas codominante; enquanto o CaRHv8 comporta-se como marcador dominante em repulsão, ou seja, a presença da marca identifica o alelo recessivo e a ausência da marca caracteriza o genótipo como resistente homocigoto. Portanto, a caracterização dos cafeeiros quanto a presença do alelo de resistência no loco B foi realizada com base na associação do marcador CaRHv8 com o SSR16. Dessa forma, observou-se que 26 cafeeiros (20,3%) apresentam a marca de resistência em homocigose (BB), 62 (48,44%) em heterocigose (Bb) e 36 (28,13%) não possuem a marca de resistência (bb) (Tabela 6). Quatro cafeeiros apresentaram recombinação para esse loco (13, 17, 20 e 118). Os cafeeiros

17 e 118 não apresentaram a marca de resistência para o SSR16, porém apresentaram a marca de resistência em homozigose para CaRHv8. Para evitar erros de recombinação, esses cafeeiros foram genotipados como bb. O cafeeiro 20, apresentou o alelo de resistência em heterozigose para SSR16 e em homozigose para CaRHv8, sendo, portanto, atribuído o genótipo Bb. O cafeeiro 13, apresentou o alelo de resistência em homozigose para SSR16, no entanto, para CaRHv8, apresentou um alelo recessivo, ficando também com o genótipo Bb.

O outro QTL identificado no mapa genético e localizado no Grupo de Ligação 5, QTL-GL5 (Pestana et al., 2015; Almeida et al. 2021), ficou denominado de loco C. O marcador CaRHv9 associado a esse QTL se comporta como dominante em acoplamento. Portanto, não permitiu diferenciar os cafeeiros homozigotos dos heterozigotos.

Na análise molecular dos cafeeiros, identificou-se que 103 cafeeiros (80,47%) são portadores da marca de resistência (C_) e os 25 cafeeiros restantes não apresentam a marca de resistência (cc) (Tabela 6).

*Seleção assistida por marcadores para gene S_H10 de resistência a *H. vastatrix* – Loco D*

Para verificar a presença do terceiro loco de resistência a *H. vastatrix*, utilizou-se o marcador CARF005. Esse marcador amplifica um RGA (*Resistance Gene Analog*), contendo domínios conservados de genes de resistência a patógenos (Alvarenga et al., 2010; Barka et al., 2020) e foi localizado em loco distinto dos dois QTL no mapa genético (Almeida et al. 2021). Esse marcador se comporta como dominante, permitindo a identificação de cafeeiros D_ e dd. Com base nos dados moleculares, observou-se que 68 cafeeiros apresentaram a marca de resistência (D_), não sendo possível distinguir os cafeeiros homozigotos dos heterozigotos (Tabela 6).

Piramidação dos genes dos locos A, B, C e D

Considerando a análise conjunta dos três locos de resistência a ferrugem, e considerando como tendo o alelo de resistência apenas os cafeeiros que não apresentaram recombinação entre os marcadores, observou-se que 122 cafeeiros (95,31%) F₂ são portadores de pelo menos um dos locos de resistência. Os locos de resistência a *H. vastatrix* estão presentes isoladamente ou em associação (Tabela 6). Observou-se que 41 cafeeiros possuem os três locos de resistência piramidados.

Analisando todos os locos de resistência a doenças, identificou-se 32 cafeeiros contendo os quatro locos piramidados (A_B_C_D_), sendo três para resistência a ferrugem e

um para a resistência ao CBD (Tabela 6). Três locos de resistência foram observados em 44 cafeeiros (Tabela 6), sendo, 22 portadores dos alelos dos genes *Ck-1* e os dois QTL (*A_B_C_dd*); nove cafeeiros apresentaram os alelos dos genes *Ck-1*, QTL-GL5 e *S_H10* (*A_bbC_D_*); outros nove os alelos dos dois QTL e *S_H10* (*aaB_C_D_*); e quatro, os alelos dos genes *Ck-1*, QTL-GL2 e *S_H10* (*A_B_ccD_*). Piramidação de dois locos de resistência foi observado em 36 cafeeiros, nos quais 12 apresentam os dois QTL de resistência a *H. vastatrix* (*aaB_C_dd*); nove os alelos dos genes *Ck-1* e QTL-GL5 (*A_bbC_dd*); seis os alelos dos genes QTL-GL2 e *S_H10* (*aaB_ccD_*); quatro os alelos dos genes QTL-GL5 e *S_H10* (*aabbC_D_*); três os alelos dos genes *Ck-1* e QTL-GL2 (*A_B_ccdd*) e dois os alelos dos genes *Ck-1* e *S_H10* (*A_bbccD_*). Ressalta-se que os cafeeiros 52, 62, 75, 118 e 129 não apresentaram nenhum dos genes de resistência analisado pelos marcadores.

Os dados de piramidação dos alelos dos genes de resistência e o índice de seleção com base nas características morfoagronômicas estão apresentados na Tabela 5. Observa-se que o cafeeiro que ficou na primeira posição do *rank* (87) apresentou os quatro alelos piramidados, além de ter ficado bem ranqueado para as características BM e P. O cafeeiro 16, que ficou na segunda posição do *rank*, também possui os quatro genes de resistência. Além disso, dos 38 cafeeiros selecionados, apenas dois (75 e 118) na genotipagem não apresentaram nenhum alelo de resistência avaliado. Nos cafeeiros selecionados, observou-se que 84,2% apresentaram mais de um alelo de resistência, sendo 10 cafeeiros com quatro alelos, 11 com três alelos e 11 com dois alelos.

DISCUSSÃO

Análises fenotípicas

A diferença estatística observada para as características VIG, UM, CE, FE, BM, CM e DCA indica existência de variabilidade genética entre os cafeeiros da população *F₂*. A existência de variabilidade genética entre os genótipos é indispensável para o progresso genético (Rocha et al., 2018). Segundo Capistrano et al. (2021), a existência de variabilidade genética, indica possibilidade de selecionar plantas.

Os resultados dos parâmetros genéticos revelaram, para algumas características (VIG, P, UM, DCO, DCA, FE, CE e BM), superioridade da variância genotípica sob a residual, indicando que a expressão da característica é de predominância genética. Esse resultado foi confirmado para a característica FE, onde a maioria dos cafeeiros foram resistentes no campo

e apresentaram alelos de resistência, isolados ou piramidados, quando analisados com os marcadores moleculares.

Associado a esses resultados, a herdabilidade tem um papel importante nessa seleção. A herdabilidade individual no sentido amplo para as características P, DCA, UM e BM foram altas e moderadas para as demais características, segundo a classificação de Resende (2002). Isso significa que características com herdabilidade alta está principalmente sobre controle genético e a seleção com base no desempenho fenotípico pode ser eficiente (Bitew 2016). A característica BM apresentou alta herdabilidade e diferença estatística entre os cafeeiros. Isso sugere que para esta população, a seleção com base nessa característica pode resultar em plantas resistentes à praga. O uso de cultivares resistentes reduz o uso de produtos químicos e, conseqüentemente, promove uma redução dos custos de produção e da poluição ambiental, além de tornar o alimento mais seguro (Abreu et al. 2017).

Herdabilidade alta também foi verificada para a característica produção. Valores altos de herdabilidade no sentido amplo foram relatados por Silva et al. (2018a) em clones de *C. canephora*, indicando a predominância do componente genético na expressão do rendimento. Esta característica é quantitativa, amplamente influenciada pelas condições do ambiente (Carvalho et al. 2019) e, normalmente, os valores encontrados são baixos. Os altos valores de herdabilidade no estudo, pode estar relacionado a idade das plantas, pois a avaliação em idade precoce é insuficiente para manifestar a expressão total do fenótipo. Segundo Resende et al. (2001), o tamanho reduzido das plantas mascara diferenças que são significativas entre os genótipos, levando os dados a valores de baixa variabilidade genética, evidenciadas no coeficiente de variação genotípica e na herdabilidade ampla das características.

Por meio dos resultados da caracterização morfológica, nota-se que, em média, a população é vigorosa, produtiva, resistente a ferrugem, com baixa incidência de cercosporiose e baixa infestação de bicho mineiro, ciclo de maturação média para precoce e porte baixo e a maturação dos frutos medianamente desuniforme. Santiago-Salazar et al (2021) demonstram em seus estudos que a espécie *C. arabica* com resistência a ferrugem, pode comprometer o desempenho do bicho mineiro por prolongar a duração do estágio de desenvolvimento pupal e reduzir o tamanho dos adultos. Como consequência, a pulpa ficará exposta por mais tempo a fatores de mortalidade e a larva será influenciada na densidade populacional.

Correlação

A análise de correlação genética é uma técnica útil que elabora o grau de associação entre características, pois, conhecer essa associação é importante para selecionar plantas desejáveis no programa de melhoramento (Ahmed et al., 2020). A análise de correlação realizada nesse trabalho revelou que as características DCO e CRP estão altamente correlacionadas (correlação próximo de 1,0). Portanto, quanto maior o comprimento dos ramos plagiotrópicos, maior será o diâmetro de copa. Os ramos plagiotrópicos são os responsáveis pela produção de frutos, portanto, deve-se observar o comprimento desse ramo e na implicação direta na definição do espaçamento adequado para implantação da cultura.

A produção de café apresenta a maior correlação positiva entre DCA e AL. Essas correlações positivas sugerem que quanto maior o diâmetro do caule e altura da planta, maior a produtividade do café. Beksisa et al. (2017) relataram correlações positivas entre essas mesmas características. Porém, a produção da planta é uma característica complexa, herdada quantitativamente e influenciados por efeitos genéticos, bem como pela interação genótipo x ambiente. Por essas razões, as seleções para melhorar diretamente a produção podem ser difíceis e demoradas, especialmente para culturas perenes com um longo período juvenil, como o café (Adepoju et al., 2020). Dessa forma, a identificação e o uso de características positivamente correlacionadas são apropriados.

Observou-se correlação negativa de baixa magnitude entre P x VIG (-0,05), normalmente este tipo de correlação é positiva, pois plantas produtivas tendem a ser plantas vigorosas. Dias et al. (2020) também encontraram correlação genética negativa entre essas duas características. Em virtude de a característica produção apresentar uma complexidade de fatores, nem sempre existe correlação significativa com parâmetros produtivos.

A correlação negativa entre duas características implica que, na seleção, a melhoria de uma característica causará diminuição na outra característica, especialmente se for de alta magnitude. Neste estudo, nota-se correlação entre o VIG com CE (-0,65) e FE (-0,41), portanto o aumento do vigor das plantas ficou correlacionado com a diminuição da incidência a cercospora e ferrugem. Segundo Carvalho et al. (2017), plantas vigorosas refletem em plantas com maior tolerância às pragas e doenças. Além disso, por meio da análise molecular observou-se que 95,3% dos cafeeiros dessa população são portadores de genes de resistência a *H. vastatrix* isoladamente ou em associação, refletindo assim na resposta da planta.

A ausência de correlação entre as características CE X DCA, DCO x BM e CRP x UM indica que a variação genética foi independente. Portanto, a seleção independente deve ser realizada para melhorar cada uma dessas características.

Índice de seleção

Para o melhoramento de plantas, mais de uma variável é medida durante a seleção dos indivíduos. Assim, visando aumentar a confiabilidade dos resultados obtidos, foi utilizado índice com base na média de ranques. Bizari et al. (2017) avaliaram diferentes índices de seleção para as características agronômicas em população de soja e concluíram que o de Mulamba e Mock proporcionou melhores ganhos em seu estudo, portanto, esse mesmo índice foi utilizado no presente trabalho. Se tratando da intensidade de seleção, assumimos 30% devido ao tamanho populacional, a geração da população e a superioridade das plantas em relação às testemunhas. Foram também adotados pesos diferenciados para algumas características. Os pesos foram definidos segundo o objetivo do melhoramento da população em estudo e o grau de importância das diferentes características.

Analisando o ranqueamento obtido e a piramidação de genes de resistência a doenças, observou-se cafeeiros com diferentes números de genes distribuídos ao longo do *rank* (Tabela 5). Na análise de piramidação gênica, foi monitorada a presença de genes de resistência à ferrugem e ao CBD, enquanto no ranqueamento outras características foram observadas. Portanto, na seleção de plantas no melhoramento, essas duas estratégias são complementares e devem ser consideradas em conjunto para seleção eficiente de cafeeiros para compor a nova geração.

Usando as duas estratégias em conjunto, observou-se que a maioria dos cafeeiros carregam alelos importantes de resistência a doenças. Dessa forma, a seleção recorrente intrapopulacional torna-se uma oportunidade, pois as características ligadas a doença são de alta herdabilidade e a população se encontra em geração F₂. Com isso, é possível ter um aumento da frequência de alelos favoráveis (Ramya, et al., 2016), podendo ser assistido por marcadores moleculares. Essa estratégia pode ser aplicada também para avanço de geração, por meio de método genealógico. Nesse caso, a manutenção dos genes de resistência à ferrugem e ao CBD podem ser monitorados por marcadores moleculares.

Os ganhos negativos observados, referem-se às características que são selecionadas com base em sua redução em relação à média; o que reflete em plantas com menor incidência de cercosporiose, bicho mineiro e ferrugem, e plantas mais precoces e uniformes. Esse tipo de

resultado é satisfatório para o melhoramento de plantas, especialmente para o café por se tratar de uma cultura perene. Nesse caso, o desenvolvimento de uma nova variedade leva mais de 25 anos, e, portanto, espera-se que as características melhoradas perdurem por mais tempo, principalmente para resistência a doenças que normalmente é suplantada por novas raças do patógeno (Melese & Kolech, 2021). Nesse contexto, a piramidação de genes é a melhor forma de se obter resistência durável, pois vários locos que conferem resistência a diferentes raças e patógenos são combinados, dificultando a suplantação dos vários genes (Cui et al., 2020).

As características produção e diâmetro de caule apresentaram os maiores ganhos genéticos positivos, demonstrando o desempenho geral da planta. Além disso, essas características tiveram correlação positiva, portanto, a seleção visando o aumento do diâmetro do caule, favorecerá a produção da planta. De acordo com Tassone et al. (2019), plantas com caule de maior diâmetro contribui para reduzir a tendência das plantas a tombar, melhorando assim a condução de árvores de café.

*Seleção assistida por marcadores para resistência a *C. kahawae* (CBD)*

A estratégia de identificar genótipos contendo o gene de resistência a CBD via marcadores moleculares, permite o melhoramento preventivo em regiões como América Latina e Ásia, onde o CBD ainda não ocorre (Gichuru et al. 2008). O Brasil apresenta condições climáticas favoráveis ao desenvolvimento da doença, portanto, a busca pelo controle preventivo é justificada (Silva et al., 2018b).

No melhoramento preventivo, a utilização de marcadores moleculares associados ao gene de resistência ao CBD pode auxiliar no direcionamento de cruzamentos e seleção de genótipos com a presença do alelo. Essa estratégia pode ser utilizada também para o descarte de plantas, que não apresentam os alelos de resistência, em etapas futuras do processo de melhoramento. No entanto, para que a SAM seja eficaz na seleção de plantas contendo os genes-alvo, é necessário identificar marcadores moleculares ligados a esses genes (Viganó et al., 2018). Além disso, usar mais de um marcador molecular, preferencialmente flanqueando o gene, aumenta a eficiência e confiabilidade da seleção assistida (Alkimim et al., 2017). Portanto, no presente trabalho, foram usados dois marcadores e considerou-se a presença do alelo de resistência quando as marcas de resistência estavam presente nos dois marcadores. Essa estratégia evita que sejam selecionados cafeeiros considerando a presença do gene, mas que foram perdidos devido a recombinação da marca e o alelo, aumentando assim a eficiência de seleção (Silva et al., 2018b).

Alguns dos indivíduos analisados apresentaram bandas ligadas ao alelo de resistência de apenas um dos dois marcadores, devido a recombinação genética entre eles. A recombinação observada para CBD-Sat 207 pode ter ocorrido provavelmente porque está ligado ao gene de resistência a uma distância de 17,2 cM (Gichuru et al., 2008). Uma explicação para o evento de recombinação entre o marcador CBD-Sat 235, que co-segrega com o gene de interesse *Ck-1* (Gichuru et al., 2008), pode estar relacionada a diferenças das populações nas quais esses marcadores foram desenvolvidos e a população usada no presente trabalho.

Usando a estratégia de considerar apenas portador do gene de resistência as plantas contendo marcas de resistência para os dois marcadores, 82 cafeeiros da população analisada foram identificados como contendo o gene *Ck-1* (A₋). A presença dessa marca pode ser derivada do progenitor feminino, pois veio de um cruzamento entre Catuaí Amarelo IAC 86 x HdT UFV 440-10. O acesso HdT UFV 440-10 foi caracterizado via marcadores moleculares como resistente contendo o gene *Ck-1*, gene esse responsável pela resistência ao CBD (Silva et al., 2018b).

Seleção assistida por marcadores para resistência as raças I, II e patótipo 001 H. vastatrix

Marcadores moleculares ligados a dois QTL (aqui denominados de loco B e C), que correspondem a genes de efeito maior que conferem resistência às raças I, II e ao patótipo 001 de *H. vastatrix* foram utilizados na triagem da população para selecionar as plantas que carregam as marcas de resistência. A presença das marcas dos QTL nos cafeeiros pode ser derivada do HdT UFV 440-10. Silva et al. (2018b), trabalhando com acessos de HdT da coleção de germoplasma da UFV, caracterizaram fenotipicamente este material como resistente a raça II e a raça XXXIII de *H. vastatrix*.

A mesma estratégia de SAM usada para selecionar plantas resistentes ao CBD foi utilizada para a resistência a ferrugem, ou seja, apenas cafeeiros contendo marcas de resistência para os dois marcadores usados para analisar o loco B foram considerados contendo o alelo de resistência. Foram identificados apenas quatro indivíduos que apresentaram recombinação. O pequeno número de recombinantes pode ser explicado pela menor distância entre os marcadores que flanqueiam esse QTL. Segundo Almeida et al. (2021), os marcadores SSR16 e CaRHv8 estão a uma distância de 1,5 cM.

A grande quantidade de indivíduos resistentes por meio da análise conjunta dos dois QTL se deve a resistência dos cafeeiros as raças I, II e patótipo 001 de *H. vastatrix* ser conferida por dois locos dominantes e independentes (Pestana et al. 2015). Ou seja, 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 et al. 2021). Dessa forma, na população analisada, foram identificados 118 cafeeiros que possuem pelo menos um dos QTL (Tabela 5) e, portanto, é resistente aos três patótipos de *H. vastatrix*. No entanto, deve-se priorizar cafeeiros que contenham os dois locos de resistência, pois a piramidação gênica aumenta a durabilidade da resistência da cultivar em desenvolvimento. Sendo assim, tanto o espectro de proteção contra diferentes raças de patógenos, quanto o grau de resistência pode ser aumentado pela combinação ou pirâmide de genes de resistência na mesma planta (Guo et al., 2015).

*Seleção assistida por marcadores para gene S_{H10} de resistência a *H. vastatrix**

Para obter resistência durável e identificar outro loco de resistência à ferrugem, os cafeeiros também foram analisados com o marcador CARF005. Apesar desse gene já ter sido clonados e caracterizado, não se tem conhecimento de quais raças ele confere resistência. No entanto, esse marcador é eficiente em distinguir cafeeiros resistentes dos suscetíveis a ferrugem (Almeida et al., 2021; Alvarenga et al., 2011; Barka et al., 2020). Além disso, Almeida et al. (2021) comprovaram, por meio de mapeamento, que esse gene está localização em região distinta dos QTL (loco B e C), sendo, portanto, loco distinto dos demais locos de resistência a ferrugem. Foram identificados 68 cafeeiros da população analisada contendo esse gene, isolado ou em combinação com os outros locos de resistência à ferrugem e CBD (Tabela 5).

Piramidação de genes de resistência

Para confirmar a resistência ao *C. kahawae* e a *H. vastatrix*, a população F₂ de 128 cafeeiros foi desenvolvida e analisada molecularmente. A análise da resistência à doença por meio da utilização de marcadores moleculares, revelou que 112 cafeeiros apresentam genes piramidados com diferentes combinações.

A piramidação de genes de resistência pode melhorar o espectro de resistência, portanto, os genes com espectro de resistência complementar podem ser selecionados de tal forma que as pirâmides de genes proporcionam resistência a um amplo conjunto de raças de patógenos (Nelson et al., 2018). Isso devido à baixa probabilidade do patógeno ser capaz de reunir genes de virulência raros e múltiplos por mutação ou recombinação (Qi e Ma, 2020). Estudo realizados por Saifert et al. (2018) afirmam que plantas de videira contendo resistência combinada ao míldio (*Plasmopara viticola*), apresentavam menor infestação do que as plantas com apenas um dos genes de resistência.

Segundo Prakash et al. (2011), o acúmulo de genes em um genótipo é limitado e dificultado por meio da utilização de métodos tradicionais de melhoramento. Assim, uma ferramenta eficiente que pode auxiliar neste procedimento é a utilização de marcadores moleculares, que permitem rápida e eficiente inferência da presença de mais de um gene de resistência em um genótipo hospedeiro (Alkimim et al., 2017). Além disso, quanto mais próximo esse marcador estiver do loco de resistência, maior a eficiência da seleção por diminuir a possibilidade de recombinação entre o marcador e o gene de interesse (Almeida et al., 2021).

Os cafeeiros analisados neste trabalho, contendo piramidação de genes representam um importante recurso genético, no qual podem ser utilizadas como fonte de resistência múltipla em programas de melhoramento para obtenção de cafés com resistência duradoura a ferrugem do cafeeiro, juntamente a resistência preventiva a CBD e fenotipicamente com menor incidência de cercosporiose e infestação de bicho mineiro. Vale ressaltar, que as plantas de café no campo estão expostas a uma grande variedade de raças de *H. vastatrix* que frequentemente superam a resistência, portanto, elas não são imunes ao fungo. Assim, é importante estabelecer uma pirâmide de genes para resistência a patógenos para garantir resistência durável (Alkimim et al., 2017).

CONCLUSÕES

A população segregante de café arábica apresenta variabilidade genética, com potencial para seleção de materiais genéticos com baixa infestação ao bicho mineiro, contendo piramidação de genes (*H. vastatrix* e *C. kahawae*) e ganho de seleção para todas as características avaliadas. A piramidação de genes não afeta a produção, no entanto, nem todos os melhores cafeeiros ranqueados são os mais produtivos e piramidados para os genes de resistência. Além disso, a seleção recorrente intrapopulacional torna-se uma oportunidade para dar continuidade ao programa de melhoramento na população.

REFERÊNCIAS

- Adepoju AF, Adenuga OO, Dada KE, Odey CF, Balogun ST, BabaNitsa M (2020) Association and interrelationship of yield and agronomic characters in coffee (*Coffea* sp L). *Journal of Plant Breeding and Crop Science*, 12(4), 299-309.
- Abreu GB, Toledo MM, Cavallari MM, Araújo JRG, Rodrigues AAC, Melo LGL, Neves Júnior ACV (2017) Estimation of Genetic Parameters of Turiaçu Pineapple Clones and Genetic Correlation between Traits. *Agricultural Sciences*, (8):1253-1262.

- Agwanda CO, Lashermes P, Trouslot P, Combes M, Charrier A (1997) Identification of RAPD markers for resistance to coffee berry disease, *Colletotrichum kahawae*, in arabica coffee. *Euphytica* 97:241–248. doi:10.1023/A:1003097913349
- Ahmed N, Chowdhury AK, Uddin MdS, Rashad MdMI (2020) Genetic variability, correlation and path analysis of exotic and local hybrid maize (*Zea mays L.*) genotypes. *Asian J. Med. Biol. Res*, 6(1):8-15. 10.3329/ajmbr.v6i1.46473
- Alkimim ER, Caixeta ET, Sousa TV, Pereira AA, de Oliveira ACB, Zambolim L, Sakiyama NS (2017) Marker-assisted selection provides arabica coffee with genes from other *Coffea* species targeting on multiple resistance to rust and coffee berry disease. *Molecular breeding*, 37(6). 10.1007/s11032-016-0609-1
- Almeida GQ, Silva JO, Copati MGF, Dias FO, Santos MC (2020) Tomato breeding for disease resistance. *Multi-Science Journal*, 3(3): 8-16. <https://doi.org/10.33837/msj.v3i3.1287>
- Almeida DP, Caixeta ET, Moreira KF, Oliveira ACB, Freitas KNP et al. (2021) Marker-Assisted Pyramiding of Multiple Disease Resistance Genes in Coffee Genotypes (*Coffea arabica*). *Agronomy*, 11(9): 1763. <https://doi.org/10.3390/agronomy11091763>
- Alvarenga, S. M., Caixeta, E. T., Hufnagel, B., Thiebaut, F., Maciel-Zambolim, E., Zambolim, L., & Sakiyama, N. S. (2011). Molecular markers from coffee genome expressed sequences potentially involved in resistance to rust. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, 46(8), 890–898. <https://doi.org/10.1590/s0100-204x2011000800015>
- Alvarenga MS, Caixeta TE, Hufnagel B, Thiebaut F, Maciel-Zambolim E, Zambolim L, et al, (2010) In silico identification of coffee genome expressed sequences potentially associated with resistance to diseases. *Genet Mol Biol.*, 33:795–806.
- Barka GD, Caixeta ET, Ferreira SS, Zambolim L (2020) In silico guided structural and functional analysis of genes with potential involvement in resistance to coffee leaf rust: A functional marker based approach. *Plos one*, 15(9): e0238967. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222747>
- Beksisa L, Ayano A, Benti T (2017) Correlation and path coefficient analysis for yield and yield components in some Ethiopian accessions of Arabica Coffee. *International Journal of Plant Breeding and Crop Science*, 4(2):178-186.
- Bettencourt A, Rodrigues C (1988) Principles and practice of coffee breeding for resistance to rust and other diseases. *Coffee Agron*, 4:199–234.
- Bettencourt AJ, Noronha-Wagner M (1971) Genetic factors conditioning resistance of *Coffea arabica L.* to *Hemileia vastatrix* Berk and Br. *Agronomia Lusitana*, 31:285-292.

- Bitew JB (2016) Estimation of genetic parameters, heritability and genetic advance for yield related traits in upland rice (*Oryza sativa* L. and *Oryza glaberrima* Steud) genotypes in Northwestern Ethiopia. *WSN*, 47(2):340-350.
- Bizari EH, Val BHP, Pereira EM, Di Mauro AO, Unêda-Trevisoli SH (2017) Selection indices for agronomic traits in segregating populations of soybean. *Revista Ciência Agronômica*, 48(1):110 – 117. Doi:10.5935/1806-6690.20170012
- Brito GG, Caixeta ET, Gallina AP, Maciel-Zambolim E, Zambolim L, Diola V, Loureiro ME (2010) Inheritance of coffee leaf rust resistance and identification of AFLP markers linked to the resistance gene. *Euphytica*, 173:255-264.
- Cabral PGC, Zambolim EM, Zambolim L, Lelis TP, Capucho AS, Caixeta ET (2009) Identification of a new race of *Hemileia vastatrix* in Brazil. *Australas Plant Dis Notes* 4:129–130. doi:10.1071/DN09052
- Capistrano MC, Andrade Neto RC, Santos VB, Lessa LS, Resende MDV, Mesquita AGG, Gurgel FL (2021) Use of the REML/BLUP methodology for the selection of sweet orange genotypes. *Genetics – Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 56. <https://doi.org/10.1590/S1678-3921.pab2021.v56.02032>
- Carvalho AM, Cardoso DA, Carvalho GR, Carvalho VL, Pereira AA, Ferreira AD, Carneiro LF (2017) Comportamento de cultivares de cafeeiro sob a incidência das doenças da ferrugem e cercosporiose em dois ambientes de cultivo. *Coffee Science*, 12(1):100 – 107.
- Carvalho HF, Silva FL, Resende MDV, Bhering LL (2019) Selection and genetic parameters for interpopulation hybrids between kouilou and robusta coffee. *Bragantia*, 78(1): 52-59.
- CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (2021) Acompanhamento da safra brasileira café – Safra 2021 3º levantamento. file:///C:/Users/franc/Downloads/E-book_BoletimZdeZSafrasZcafZ-ZsetembroZ21.pdf
- Corrêa TR, Motoike SY, Coser SM, da Silveira G, de Resende MDV, Chia GS (2015) Estimation of genetic parameters for in vitro oil palm characteristics (*Elaeis guineensis* Jacq.) and selection of genotypes for cloning capacity and oil yield. *Ind. Crops Prod.*, 77:1033–1038. doi: 10.1016/j.indcrop.2015.09.066
- Cui, L., Hanika, K., Visser, R. G. F., & Bai, Y (2020). Improving pathogen resistance by exploiting plant susceptibility genes in coffee (*Coffea* spp.). *Agronomy*, 10(12), 1928. <https://doi.org/10.3390/agronomy10121928>
- Dantas J, Motta IO, Vidal LA, Nascimento EFMB, Bilio J, Pupe JM et al. (2021) A Comprehensive Review of the Coffee Leaf Miner *Leucoptera coffeella* (Lepidoptera:

- Lyonetiidae)-A Major Pest for the Coffee Crop in Brazil and Others Neotropical Countries. *Insects*, 12(12):1130 <https://doi.org/10.3390/insects12121130>
- Davis AP, Tosh J, Ruch N, Fay MF (2011) Growing coffee: *Psilanthus* (Rubiaceae) subsumed on the basis of molecular and morphological data: implications for the size, morphology, distribution and evolutionary history of *Coffea*. *Bot J Linn Soc* 167:357–377. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.2011.01177>
- Dias REB, Dias RAA, Botelho CE, Abrahão JCR, Rezende TT, Carvalho GR (2020) Genetic determination of characteristics related to semi-mechanized coffee harvests. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 20(1) e218820116. <https://doi.org/10.1590/1984-70332020v20n1n16>
- Diniz LEC, Sakiyama NS, Lashermes P, Caixeta ET, Oliveira ACB, Maciel-Zambolim E, Loureiro ME, Pereira AA, Zambolim L (2005) Analysis of AFLP markers associated to the Mex-1 resistance locus in Icatu progenies. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, (5):387-393.
- Fernandez D, Tisserant E, Talhinhos P, Azinheira H, Vieira A, Petitot AS, Loureiro A, Poulain J, Da Silva C, Silva Mdo C, Duplessis S (2012) 454-pyrosequencing of *Coffea arabica* leaves infected by the rust fungus *Hemileia vastatrix* reveals in planta-expressed pathogen-secreted proteins and plant functions in a late compatible plant-rust interaction. *Mol Plant Pathol*, 13:17–37. doi:10.1111/j.1364-3703.2011.00723.x
- Gichuru EK, Agwanda CO, Combes MC, Mutitu EW, Ngugi ECK, Bertrand B, Lashermes P (2008) Identification of molecular markers linked to a gene conferring resistance to coffee berry disease (*Colletotrichum kahawae*) in *Coffea arabica*. *Plant Pathol*, 57:1117–1124. doi:10.1111/j.1365-3059.2008.01846.x
- Guo J, Zhang X, Hou Y, et al (2015) High-density mapping of the major FHB resistance gene *Fhb7* derived from *Thinopyrum ponticum* and its pyramiding with *Fhb1* by marker-assisted selection. *Theor Appl Genet*, 128:2301–2316. <https://doi.org/10.1007/s00122-015-2586-x>
- Henderson CR (1973) Sire evaluation and genetic trends. In: *Animal Breeding and Genetics Symposium in Honor of J.Lush*. American Society of Animal Science, Champaign, III, p.10-41.
- Henderson CR (1975) Best linear unbiased estimation and prediction under a selection model. *Biometrics*, 31:423–449. doi: 10.2307/2529430

- Jingade P, Huded AK, Kosaraju B, Mishra MK (2019) Diversity genotyping of Indian coffee (*Coffea arabica* L.) germplasm accessions by using SRAP markers. *Journal of Crop Improvement*. <https://doi.org/10.1080/15427528.2019.1592050>
- Krishnan S, Matsumoto T, Nagai C. et al. (2021) Vulnerability of coffee (*Coffea* spp.) genetic resources in the United States. *Genet Resour Crop Evol*, 68:2691–2710. <https://doi.org/10.1007/s10722-021-01217-1>
- Mahé L, Combes MC, Várzea VMP, Guilhaumon C, Lashermes P (2008) Development of sequence characterized DNA markers linked to leaf rust (*Hemileia vastatrix*) resistance in coffee (*Coffea arabica* L.). *Mol Breed* 21:105–113. doi:10.1007/s11032-007-9112-z
- Maia TA, Maciel-Zambolim E, Caixeta ET, Mizubuti ESG, Zambolim L (2013) The population structure of *Hemileia vastatrix* in Brazil inferred from AFLP. *Australas Plant Pathol*, 42:533–542. doi:10.1007/s13313-013-0213-3
- Medina DM (1963) Microsporogênese em um híbrido tri-plóide de *Coffea racemosa* Lour. x *C. arabica* L. *Bragantia*, 22:299–318.
- Melese YY, Kolech SA (2021) Coffee (*Coffea arabica* L.): Methods, Objectives, and Future Strategies of Breeding in Ethiopia—Review. *Sustainability*, 13(19) 10814; <https://doi.org/10.3390/su131910814>
- Mulamba NN, Mock JJ (1978) Improvement of yield potential of the Eto Blanco maize (*Zea mays* L.) population by breeding for plant traits. *Egyptian Journal of Genetics and Cytology*, 7:40 - 51.
- Nair KP (2021) Coffee. In: *Tree Crops*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-62140-7_6
- Nelson R, Wiesner-Hanks T, Wisser R, Balint-Kurti P (2018) Navigating complexity to breed disease-resistant crops. *Nature Reviews Genetics*, 19(1), 21–33. doi:10.1038/nrg.2017.82
- Noronha-Wagner M, Bettencourt AJ (1967) Genetics study of resistance of *coffea* spp.
- Patterson HD, Thompson R (1971) Recovery of inter-block information when block sizes are unequal. *Biometrika*, 58:545–554. doi: 10.1093/biomet/58.3.545
- Pestana KN, Capucho AS, Caixeta ET, de Almeida DP, Zambolim EM, Cruz CD, et al. (2015). Inheritance study and linkage mapping of resistance loci to *Hemileia vastatrix* in Híbrido de Timor UFV 443-03. *Tree Genet. Genomes* 11:72. doi: 10.1007/s11295-015-0903-9
- Pinto RT, Cardoso TB, Paiva LV, Benedito VA (2021) Genomic and transcriptomic inventory of membrane transporters in coffee: Exploring molecular mechanisms of metabolite accumulation. *Plant Science*, 312. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2021.111018>

- Prakash NS, Muniswamy B, Hanumantha BT, Sreenath HL, Sundaresha KD, Suresh N, Santhosh P, Soumya PR, Asha BM, Bhat SS (2011) Marker assisted selection and breeding for leaf rust resistance in coffee (*Coffea arabica* L.) - some recent leads. *Indian J Genet Plant Breed*, 71:185–189.
- Qi L, Ma G (2020) Marker-Assisted Gene Pyramiding and the Reliability of Using SNP Markers Located in the Recombination Suppressed Regions of Sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Genes*, 11(1), 10. <https://doi.org/10.3390/genes11010010>
- Ramya P, Singh GP, Jain N et al. (2016) Effect of Recurrent Selection on Drought Tolerance and Related Morpho-Physiological Traits in Bread Wheat. *Plos one*, 11(6), e0156869
- R Core Team (2018) R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Áustria. URL: <http://www.R-project.org/>
- Resende MDV. Genética biométrica e estatística no melhoramento de plantas perenes. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2002. 975p.
- Resende MDV, Furlani-Júnior E, Moraes MLT, Fazuoli LC (2001). Estimation of genetic parameters and prediction of genotypic values in coffee breeding by the REML/BLUP method. *Bragantia*, 60(3), 185–193. <https://doi.org/10.1590/s0006-87052001000300005>
- Resende MDV, Thompson R (2004) Factor analytic multiplicative mixed models in the analysis of multiple experiments. *Rev. Matemática e Estatíst.* 22: 1–22.
- Rocha JRASC, Machado JC, Carneiro PCS (2018) Multitrait index based on factor analysis and ideotype-design: proposal and application on elephant grass breeding for bioenergy. *Glob Change Biol Bioenergy* 10:52–60. <https://doi.org/10.1111/gcbb.12443>
- Santiago-Salazar CG, Barrera JF, Rojas JC, Huerta-Palácios G, Escamilla-Prado E (2021) The oviposition preference of *Leucoptera coffeella* is not determined by the cultivar of *Coffea arabica*, but it may influence some traits of its offspring performance. *Arthropod-Plant Interactions*, 15:563-571. <https://doi.org/10.1007/s11829-021-09840-6>
- Saifert L, Sánchez-Mora FD, Assumpção WT, Zanghelini JÁ, Giacometti R, Novak EI, Vesco LLD, Nodari RO, Eibach R, Welter LJ (2018) Marker-assisted pyramiding of resistance loci to grape downy mildew. *Pesquisa agropecuária brasileira*, 53(5):602 – 610. 10.1590/S0100-204X2018000500009
- Silva DO, Ferreira FM, Rocha RB, Espindula MC, Spinelli VM (2018a) Genetic progress with selection of *Coffea canephora* clones of superior processed coffee yield. *Ciência Rural*, 48(3) e20170443. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20170443>

- Silva MC, Várzea V, Guerra-Guimarães L, Azinheira HG, Fernandez D, Petitot A, Bertrand B, Lashermes P, Nicole M (2006) Coffee resistance to the main diseases: leaf rust and coffee berry disease. *Braz J Plant Physiol* 18:119–147. doi:10.1590/S1677-04202006000100010
- Silva R, Zambolim L, Castro ISL, Rodrigues HS, Cruz C, Caixeta ET (2018b) The Híbrido de Timor germplasm: identification of molecular diversity and resistance sources to coffee berry disease and leaf rust. *Euphytica*, 214(153) <https://doi.org/10.1007/s10681-018-2231-2>
- Sousa TV, Caixeta ET, Alkimim ER, Oliveira ACB, Pereira AA, Sakiyama NS, Zambolim L, Resende MDV (2019) Early Selection Enabled by the Implementation of Genomic Selection in *Coffea arabica* Breeding. *Frontiers in Plant Science*, 9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01934>
- Spinelli VM, Dias LAS, Rocha RB, Resende MDV (2015) Estimates of genetic parameters with selection within and between half-sib families of *Jatropha curcas* L. *Ind. Crops Prod.*, 69:355–361. doi: 10.1016/j.indcrop.2015.02.024
- Tassone GAT, Nadaleti DHS, Carvalho GR, Pereira FAC, Andrade VT, Botelho CE (2019) Simultaneous selection in coffee progenies of Mundo Novo by selection indices. *Coffee Science*, 14(1):83-92.
- Van Der Vossen HAM, Walyaro DJ (1980) Breeding for resistance to coffee berry disease in *Coffea arabica* L. II. Inheritance of the resistance. *Euphytica*, 29:777–791. doi:10.1007/BF00023225
- Viana JMS, Faria VR, Fonseca e Silva F, de Resende MDV (2011) Best linear unbiased prediction and family selection in crop species. *Crop Sci.* (51):2371–2381. doi: 10.2135/cropsci2011.03.0153
- Viganó J, Braccini AL, Schuster I, Menezes VMPS (2018) Microsatellite molecular marker-assisted gene pyramiding for resistance to Asian soybean rust (ASR). *Acta Scientiarum. Agronomy*, 40:e39619. <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v40i1.39619>
- Zambolim L & Caixeta ET (2021) An overview of physiological specialization of coffee leaf rust - new designation of pathotypes. *International Journal of Current Research*, 13(01), 1556i4–15575. <https://doi.org/10.24941/ijcr.40600.01.2021>

CAPÍTULO 2: DIVERSIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÃO DE CAFÉ ARÁBICA COM GENES PIRAMIDADOS

RESUMO

A crescente demanda do mercado mundial de café instigam os melhoristas no desenvolvimento de materiais genético produtivos e resistentes às principais pragas e doenças da cultura. Para o desenvolvimento de variedades melhoradas e com resistência múltipla, a existência de variabilidade genética é de primordial importância para auxiliar na definição de estratégias de trabalhos e para aumentar o ganho genético na seleção. Nesse contexto, objetivou-se determinar a diversidade genética por meio de características morfológicas em cafeeiros de população em melhoramento desenvolvida para obtenção de cultivares contendo resistência múltipla à ferrugem (*Hemileia vastatrix*), CBD (*Coffee Berry Disease - Colletotrichum kahawae*) e bicho-mineiro (*Leucoptera coffeella*). Marcadores moleculares foram utilizados como ferramenta auxiliar para monitorar diferentes locos de resistência a ferrugem e ao CBD. Dos 127 cafeeiros analisados, dois são testemunhas (Topázio MG1190 e Catuaí Vermelho IAC 144) e 125 são originados de cruzamentos envolvendo híbridos naturais provenientes de três espécies de *Coffea* (*C. arabica*, *C. canephora* e *C. racemosa*). A análise de divergência genética baseada na distância generalizada de Mahalanobis foi utilizada para avaliar a variabilidade entre os cafeeiros. Os resultados revelaram que os cafeeiros foram alocados em 15 grupos, indicando presença de variabilidade genética. As testemunhas se comportaram de maneira diferente dos demais cafeeiros, ficando em um grupo separado. A variação encontrada pode ser devido a origem da população, já que envolve em sua genealogia três espécies distintas. Por meio do uso de marcadores moleculares associados a alelos que conferem resistência aos fungos *C. kahawae* e *H. vastatrix* foi possível observar piramidação de genes com diferentes combinações nos cafeeiros. Os dados obtidos permitiram concluir que a população é divergente, podendo ser eficientemente explorada pelos melhoristas. A análise complementar com os marcadores moleculares possibilitou, ainda, identificar cafeeiros com resistência múltipla e cafeeiros que podem ser hibridizados para aumentar o número de locos de resistência.

INTRODUÇÃO

A cafeicultura é um setor do agronegócio que se consolidou como uma das principais *commodities* brasileiras, sendo o cafeeiro arábica (*Coffea arabica* L.) uma das principais

espécies de café cultivadas no mundo. Atualmente, 138 cultivares de *C. arabica* estão registradas no Registro Nacional de Cultivares (RNC) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (Brasil 2022).

Apesar de número expressivo de cultivares disponível, o melhoramento genético é um processo contínuo que deve ser desenvolvido para atender as demandas crescentes do mercado (Sousa et al., 2017). Nesse contexto, cultivares contendo resistência múltipla às principais pragas e doenças tem sido um dos objetivos dos programas de melhoramento, em virtude da produção ser afetada pelos estresse bióticos, bem como a busca de diminuição de uso de defensivos agrícolas. Um dos principais problemas enfrentados pelos cafeicultores no mundo são a ferrugem do cafeeiro (*Hemileia vastatrix*), *Coffee Berry Disease* (CBD – *Colletotrichum kahawae*) e bicho-mineiro (*Leucoptera coffeella*).

A ferrugem do cafeeiro está presente em todas as regiões produtoras de café, e no Brasil já foram identificadas 16 raças do fungo (Zambolim, 2016; Zambolim & Caixeta, 2021). Diferentes genes de resistência a *H. vastatrix* já foram identificados e têm sido utilizados nos programas de melhoramento genético. Os genes S_H1, 2, 4 e 5 foram identificados em genótipos de *C. arabica*, no entanto, esses genes já foram suplantados pelas raças existentes no Brasil. Fontes de resistência contendo genes de outras espécies cafeeiras têm sido usadas no melhoramento, por meio de híbridos interespecíficos. S_H3 foi encontrado em genótipos derivados de *C. liberica*; S_H6, 7, 8 e 9 identificados em híbridos originados de *C. canephora* (Zambolim & Caixeta, 2021). Além disso, Barka et al. (2020) e Almeida et al. (2021) caracterizaram molecularmente dois genes S_H candidatos de resistência a *H. vastatrix*, um gene denominado de S_H10 (Zambolim & Caixeta, 2021) e um gene *Receptor LRR Kinase* (RLK), respectivamente.

O fungo *C. kahawae* (Waller & Bridge) é uma das principais doenças que limita a produção de cafeeiros na África (Hindorf & Omondi, 2011; Van Der Vossen et al., 2015; Vieira et al., 2019). Essa doença, apesar de ainda estar restrita à África, constitui em um risco iminente a cafeicultura no mundo. Dessa forma, pesquisadores trabalham no melhoramento preventivo de cultivares resistentes para, caso a doença chegue à América Latina, cultivares resistentes já estejam disponíveis (Alkimim et al., 2017; Alemu et al., 2020; Gimase et al., 2021). A resistência ao CBD é governada por pelo menos três genes identificados nas variedades Rume Sudão (genes R), Híbrido de Timor (gene T) e K7 (gene k). Os genes R e T são dominantes, enquanto k é recessivo (Van Der Vossen e Walyaro, 1980). O gene denominado *Ck-1* foi

identificado em cafeeiros do germoplasma Catimor (Gichuru et al., 2008), no entanto, ele corresponde ao gene T previamente identificado.

Se tratando de insetos que causam prejuízos econômicos à produção de café, o bicho-mineiro (*Leucoptera coffeella*) se destaca como uma das principais espécies de praga do cafeeiro (Pantoja-Gomez et al., 2019). Em geral, cultivares de *C. arabica* são suscetíveis a essa praga, exceto cultivares obtidas a partir do cruzamento interespecífico entre *C. racemosa* e *C. arabica*, que apresentam resistência ou tolerância (Cardoso et al., 2014).

A utilização de cultivares resistentes é uma técnica econômica e ecologicamente correta para o controle de doenças e pragas (Setotaw et al., 2020; Melese & Kolech, 2021). Nesse contexto, a utilização de diferentes fontes de resistência associado a exploração da variabilidade genética consiste em estratégia eficiente para o sucesso nos programas de melhoramento do cafeeiro (Rocha et al., 2013).

No melhoramento, o estudo da diversidade genética é de primordial importância, principalmente, em início de programas para definição de estratégias de trabalhos e de cruzamentos. Informações de diversidade genética permitem a seleção de genótipos superiores e a maximização dos ganhos de seleção (Sousa et al., 2017), uma vez que genótipos com maiores distâncias genéticas podem ser selecionados, evitando cruzamentos de acesso relacionados (Pailles et al., 2017; Spinoso-Castilho et al., 2020).

Aliado ao conhecimento da diversidade genética, marcadores moleculares podem ser utilizados para identificar e monitorar locos específicos presentes nas plantas da população de melhoramento. Marcadores moleculares associados a resistência à ferrugem e ao CBD estão disponíveis e sendo usados para auxiliar os programas de melhoramento do cafeeiro (Alkimim et al., 2017, Almeida et al., 2021).

Nesse sentido, objetivou-se determinar a diversidade genética com base em características agronômicas em cafeeiros derivado de plantas resistentes à ferrugem, ao CBD e ao bicho-mineiro e utilizar marcadores moleculares para verificar a presença e piramidação de locos de resistência à ferrugem e ao CBD.

MATERIAL E MÉTODOS

Material genético

Um total de 127 cafeeiros foram analisados neste estudo (Tabela 1). Destes, dois cafeeiros correspondem às testemunhas Topázio MG1190 e Catuaí Vermelho IAC 144 e 125 são cafeeiros em geração F₂, obtidos a partir da autofecundação do híbrido F₁ H1097-29,

derivado do cruzamento entre H514-7-16-3-17 CMS-CEPC (♀) e Siriema BM12-CEPCC (♂). O progenitor feminino (H514-7-16-3-17 CMS-CEPC) corresponde a um material em geração F₄ derivado do cruzamento entre Catuaí Amarelo IAC 86 x Híbrido de Timor UFV 440-10. O progenitor masculino é a cultivar registrada Siriema BM12-CEPCC, que apresenta em sua genealogia a espécie *C. racemosa* e Catimor UFV 417, com resistência ao bicho-mineiro e ferrugem, respectivamente.

Essas plantas de café fazem parte do programa de melhoramento genético do cafeeiro desenvolvido pela Epamig e instituições parceiras, e foram plantadas em 19 de fevereiro de 2016, no Campo Experimental de Patrocínio/Epamig, localizado no município de Patrocínio, na região do Rio Paranaíba, no estado de Minas Gerais. O delineamento experimental foi em blocos aumentados (4 blocos, sendo 36 plantas no bloco 1, 34 no bloco 2, 38 no bloco 3 e 17 no bloco 4) com duas plantas de cada testemunha por bloco (Topázio MG1190 e Catuaí Vermelho IAC 144), no espaçamento de 3,5 m entre linhas e 0,8 m entre plantas. A calagem do solo e a adubação do plantio foram realizadas por meio da análise de solo e exigência da cultura. Nenhum método de controle fitossanitário foi utilizado contra ferrugem, cercosporiose e bicho mineiro.

Tabela 1. Material genético de *Coffea arabica* avaliado na safra de 2019.

Cafeeiro	Descrição campo	Cafeeiro	Descrição campo	Cafeeiro	Descrição campo	Cafeeiro	Descrição campo
1	Topázio MG1190	35	11B12P33	70	11B13P31	103	11B14P28
2	Catuai Vermelho IAC 144	36	11B12P34	71	11B13P32	104	11B14P29
3	11B12P1	37	11B12P35	72	11B13P33	105	11B14P30
4	11B12P2	38	11B12P36	73	11B13P34	106	11B14P31
5	11B12P3	39	11B12P37	74	11B13P35	107	11B14P32
6	11B12P4	40	11B13P1	75	11B13P36	108	11B14P33
8	11B12P6	41	11B13P2	76	11B14P1	109	11B14P34
9	11B12P7	42	11B13P3	77	11B14P2	110	11B14P35
10	11B12P8	43	11B13P4	78	11B14P3	111	11B14P36
11	11B12P9	44	11B13P5	79	11B14P4	112	11B14P37
12	11B12P10	45	11B13P6	80	11B14P5	113	11B14P38
13	11B12P11	46	11B13P7	81	11B14P6	114	11B15P1
14	11B12P12	47	11B13P8	82	11B14P7	115	11B15P2
15	11B12P13	48	11B13P9	83	11B14P8	116	11B15P3
16	11B12P14	49	11B13P10	84	11B14P9	117	11B15P4
17	11B12P15	50	11B13P11	85	11B14P10	118	11B15P5
18	11B12P16	51	11B13P12	86	11B14P11	119	11B15P6
19	11B12P17	52	11B13P13	87	11B14P12	120	11B15P7
20	11B12P18	53	11B13P14	88	11B14P13	121	11B15P8
21	11B12P19	54	11B13P15	89	11B14P14	122	11B15P9
22	11B12P20	55	11B13P16	90	11B14P15	123	11B15P10
23	11B12P21	56	11B13P17	91	11B14P16	124	11B15P11
24	11B12P22	57	11B13P18	92	11B14P17	125	11B15P12
25	11B12P23	58	11B13P19	93	11B14P18	126	11B15P13
26	11B12P24	60	11B13P21	94	11B14P19	127	11B15P14
27	11B12P25	62	11B13P23	95	11B14P20	128	11B15P15
28	11B12P26	63	11B13P24	96	11B14P21	129	11B15P16
29	11B12P27	64	11B13P25	97	11B14P22	130	11B15P17
30	11B12P28	65	11B13P26	98	11B14P23	-	-
31	11B12P29	66	11B13P27	99	11B14P24	-	-
32	11B12P30	67	11B13P28	100	11B14P25	-	-
33	11B12P31	68	11B13P29	101	11B14P26	-	-
34	11B12P32	69	11B13P30	102	11B14P27	-	-

Avaliações moleculares

Folhas jovens e totalmente expandidas dos 125 cafeeiros F₂ foram coletadas e o DNA genômico foi extraído usando a metodologia descrita por Diniz et al. (2005). A concentração de DNA foi verificada no NanoDrop 2000 e sua qualidade foi avaliada em gel de agarose a 1%. A concentração de DNA das amostras foi padronizada em 25 ng.µL⁻¹ e armazenadas a -20°C. Para as avaliações moleculares, foram utilizados seis marcadores moleculares (Tabela 2), permitindo a avaliação da presença de alelos de resistência para os fungos *C. kahawae* e *H. vastatrix*.

Tabela 2. Descrição dos marcadores moleculares utilizados na genotipagem, que estão ligados a genes que conferem resistência a *H. vastatrix* e a *C. kahawae*.

Fungo	Loco	Gene	Marcador	Sequência	T (°C)	Referência
<i>Colletotrichum kahawae</i>	A	Ck-1	CBD-Sat 207	F: GAAGCCGTTTCAAGCC R:CAATCTCTTTCCGATGCTCT	50	Gichuru et al. (2008)
			CBD-Sat 235	F:TCGTTCTGTCATTAATCGTCAA R:GCAAATCATGAAAATAGTTGGTG		
<i>Hemileia vastatrix</i>	B	QTL-GL2	SSR16	R: CCACACA ACTCTCCTCATTC F:ACCCGAAAGAAAGAACCAAG	65	Combes et al. (2000)
			CaRHv8	F: CCTTCTAGTGTTACCGAGGA R: CTTAGCGCCATGAATAGCCA		
	C	QTL-GL5	CaRHv9	F: TGATGAAGAAGAGCGCATAGC R:GTCTAAGACCAGAATCAGATGG	65	Almeida et al. (2021)
	D	NB-ARC e LRR	CARF005	F:GGACATCAACACCAACCTC R:ATCCCTACCATCCACTTCAAC	60	Alvarenga et al. (2011); Barka et al. (2020)

SSR: Simple sequence repeat; F: Primer Forward; R: Primer Reverse

Para o gene de resistência ao *C. kahawae*, foram utilizando dois marcadores SSR identificados e mapeados por Gichuru et al. (2008), CBD-Sat235 e CBD-Sat207. Como controle foram utilizados três genótipos fenotipados quanto ao CBD pelo CIFC, ou seja, sabidamente portadores do gene *Ck-1* (HdT UFV 377-15 e UFV 440-10 e a cultivar MGS Catiguá MG3) e dois genótipos suscetíveis (Caturra Vermelho - CIFC 19/1 e Catuaí Amarelo IAC 64 - UFV 2148-57). A amplificação por PCR foi realizada em um volume total de 25 μ L contendo 50 ng de DNA genômico; 1 X tampão da Taq DNA polimerase; 2,0 mM de $MgCl_2$; 0,1 mM de dNTPs; 0,4 μ M de cada *primer*, e 0,5 U da enzima Taq DNA polimerase. As reações foram realizadas usando termocicladores PTC-200 (*MJ Research*) e Veriti (*Applied Biosystems*). O programa de PCR consistiu em uma etapa inicial de desnaturação a 95°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos a 95°C por 45 segundos, anelamento a 50°C por 45 segundos, extensão a 72°C por 45 segundos e uma extensão final a 95°C por 10 minutos (Alkimin et al., 2017). As amostras de PCR foram analisadas em gel de poliacrilamida desnaturante 6% e visualizados por meio de coloração com nitrato de prata (Brito et al., 2010).

Para a análise da resistência a *H. vastatrix*, utilizou-se quatro marcadores, sendo SSR16, CaRHv8 e CaRHv9 (Almeida et al., 2021) ligados aos dois QTL que conferem resistência as raças I, II e patótipo 001 de *H. vastatrix* e o marcador CARF 005 ligado a um terceiro loco (Alvarenga et al., 2011 e Barka et al., 2020). Os marcadores moleculares SSR16 e CaRHv8 estão ligados ao QTL do grupo de ligação 2 (QTL-GL2) e o CaRHv9 ao QTL do grupo de ligação 5 (QTL-GL5). Os genótipos Híbrido de Timor UFV 443-03 e Catuaí Amarelo IAC 64 UFV 2148/57 foram utilizados como controles resistente e suscetível, respectivamente. Esses genótipos foram utilizados por constituírem os parentais da população na qual foram identificados os QTL associados à resistência a *H. vastatrix* (Almeida et al., 2021).

A amplificação por PCR do *primer* SSR16 foi realizada em um volume final de 20 μ L, contendo 50 ng de DNA genômico, tampão de reação de PCR 1X, 1,0 Mm de $MgCl_2$, 0,15 Mm de cada dNTP, 0,1 μ M de cada *primer*, 0,6 U da enzima Taq DNA polimerase, completando o volume com água milli-Q. Para a amplificação, foi utilizado o procedimento “*touchdown* PCR”, que consistiu em uma etapa 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

visualizados em gel poliacrilamida desnaturante 6% corado com nitrato de prata (Brito et al., 2010).

Para amplificação dos marcadores CaRHv8 e CaRHv9, a reação 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 U da enzima Taq DNA polimerase, completando o volume com água milli-Q. A amplificação consistiu em uma etapa 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 de PCR resultante da reação com o CaRHv8 foram analisados em gel de poliacrilamida desnaturante 6% e visualizados por meio de coloração com nitrato de prata (Brito et al., 2010). Os fragmentos amplificados com o marcador CaRHv9 foram visualizados em gel de agarose e corados em brometo de etídeo.

A amplificação do DNA por PCR do marcador CARF 005 foi realizada em volume final de 20 µL, contendo 50 ng de DNA genômico, tampão de reação de PCR 1X, 1 mM de MgCl₂, 0,15 mM de cada dNTP; 0,1 µM de cada *primer*, 1 U da enzima Taq DNA polimerase, completando o volume com água milli-Q. A amplificação consistiu em: etapa de desnaturação inicial de 95°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos e 72° C por 1 minuto; extensão final de 72°C por 10 minutos. Os fragmentos amplificados foram analisados por eletroforese capilar em sequenciador ABI 3130xl *Genetic Analyzer – AppliedBiosystems*.

As marcas que correspondem aos alelos de resistência foram identificadas com base no padrão apresentado pelos genótipos controles, resistentes e suscetíveis. Para os marcadores codominantes foram avaliados genótipos homozigotos e heterozigotos.

Diversidade genética

No estágio de maturação dos frutos, em 28 de maio de 2019, os dados de 11 características agrônômicas (Tabela 3) relacionadas a produção e sanidade das plantas, foram coletados. A variabilidade entre os cafeeiros da população foi realizada considerando os valores genéticos estimados por BLUP. Desta forma, foi calculada a matriz de dissimilaridade entre as características, baseada na distância generalizada de Mahalanobis.

$$D^2_p = (X_i - X_j)S^{-1}(X_i - X_j).$$

Onde: D^2_p = a distância entre quaisquer dois cafeeiros; X_i e X_j = os p vetores médios dos cafeeiros i e j , respectivamente; S^{-1} = o inverso da matriz de covariância combinada.

A matriz obtida foi usada para construir um dendrograma pelo método de grupos de pares não ponderados usando médias aritméticas (UPGMA), para a delimitação de genótipos de similaridade. A análise foi processada pelo *software* R (R Core Team, 2018).

Tabela 3. Características fenotípicas analisadas em cafeeiros arábica na safra 2019 em Patrocínio - MG.

Características	Sigla	Descrição
Vigor vegetativo	VI	Avaliado por notas de 1 a 10. 1: Planta totalmente depauperada. 10: Planta considerada com vigor máximo.
Produção	P	Litros de café recém colhido por planta.
Ciclo de maturação	CM	1 = precoce; 2 = média para precoce; 3 = média; 4 = média para tardia; 5 = tardia.
Uniformidade de maturação dos frutos	UM	Notas de 1 a 4. 1 = uniforme; 2 = medianamente uniforme; 3 = medianamente desuniforme; 4 = desuniforme.
Diâmetro de copa (cm)	DCO	Medido no sentido transversal à linha de plantio, medindo-se a maior projeção da "saia" do cafeeiro.
Diâmetro de caule (cm)	DCA	Medido com auxílio de um paquímetro digital, na região do coleto da planta, a aproximadamente 5 cm da superfície do solo.
Comprimento do ramo plagiotrópico	CRP	Comprimento de um Ramo Plagiotrópico Representativo da Planta.
Altura de Planta (cm)	AL	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	FE	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	CE	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.

RESULTADOS

Caracterização fenotípica da população

Valores de máximo, mínimo e média de 11 características morfológicas de 125 cafeeiros são apresentados na Tabela 4, além disso, foi realizado a análise de boxplot para as

características quantitativas (Figuras 1 e 2). Analisando a característica produção (P), apenas 25% dos cafeeiros produziram menos de 2 L e 50% mais de 4 L (Figura 1), apresentando uma faixa ampla de variação de 0,1 a 8 L, com média de 3,56 L. A característica diâmetro de caule não apresentou grande variação (Figura 1), com uma variação de 3,3 a 6,5 cm e média 4,7 cm.

Tabela 4. Caracterização fenotípica da população de cafeeiros arábica safra 2019 em Patrocínio - MG.

	VI	P	CM	UM	CE	FE	BM	AL	DCO	DCA	CRP
Máximo	9	8	4	4	5	4	5	182	246	6,5	90
Média	6,93	3,56	2,03	2,63	2,19	1,31	2,75	138,83	127,05	4,66	63,20
Mínimo	2	0,1	1	1	1	1	1	89	86	3,3	43

Características: vigor vegetativo (VI); produção (P); ciclo de maturação dos frutos (CM); uniformidade de maturação dos frutos (UM); severidade de cercosporiose (CE); severidade de ferrugem (FE); infestação de bicho mineiro (BM); altura de planta (AL- cm); diâmetro de copa (DCO - cm); diâmetro de caule (DCA - cm) e comprimento de ramo plagiotrópico (CRP - cm).

Boxplot de cafeeiros F2

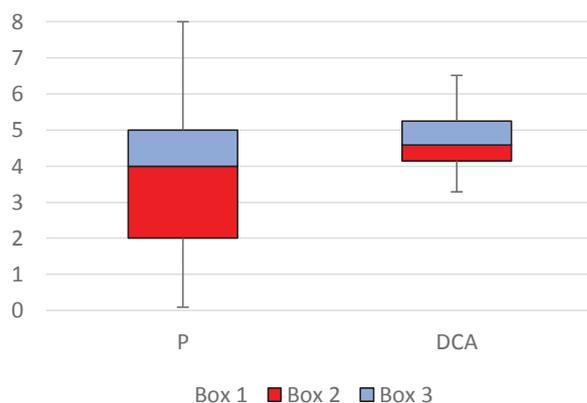


Figura 1. Boxplot das características produção (P) e diâmetro de caule (DCA – cm).

Com relação ao diâmetro de copa (DCO), observa-se uma grande variação de 86 a 246 cm (Tabela 4), no entanto 75% da população mediram menos que 150 cm (Figura 2). Enquanto que a altura das plantas (AL), 25% das plantas atingiram mais 149 cm (Figura 2), no entanto com uma média de 138,8 cm (Tabela 4). Analisando o comprimento de ramo plagiotrópico (CRP), 25% das plantas apresentaram comprimento superior a 71 cm (Figura 2), mas a média foi de 63,2 cm (Tabela 4).

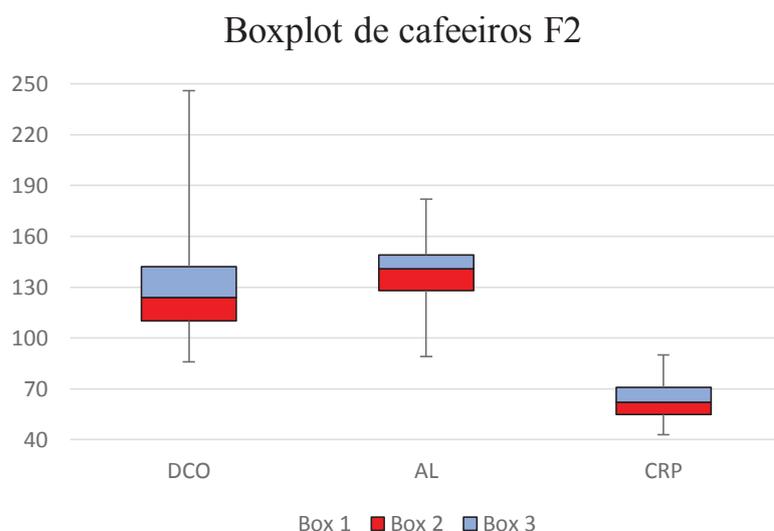


Figura 2. Boxplot das características diâmetro de copa (DCO – cm), altura de plantas (AL – cm) e comprimento de ramo plagiotrópicos (CRP – cm).

Com relação as características relacionadas a sanidade da planta, observou-se que para a cercosporiose e bicho-mineiro a nota variou de 1 a 5, com média 2,2 e 2,8, respectivamente. Enquanto que para a ferrugem houve uma variação de nota de 1 a 4, com média de 1,3.

Diversidade genética

Com base nos dados fenotípicos e no método de agrupamento hierárquico UPGMA, utilizando a distância generalizada de Mahalanobis como medida de dissimilaridade genética, foi obtido o dendrograma que ilustra a distância genética entre os cafeeiros estudados (Figura 3). O coeficiente de correlação cofenética entre os valores da matriz de dissimilaridade e os correspondentes da matriz cofenética foi de 0,93, indicando grande acurácia na representação gráfica das distâncias no dendrograma.

Por meio do dendrograma observou-se a formação de 15 grupos (Figura 3). O cafeeiro 75 (indivíduo 11B13P36) ficou distante de todos os demais, sendo alocado separadamente no Grupo 1. As duas testemunhas Topázio MG1190 (1) e Catuaí Vermelho IAC 144 (2) também foram agrupados separadamente dos cafeeiros da população, ficando no Grupo 2. Os cafeeiros 23 (11B12P21) e 45 (11B13P6) ficaram no Grupo 3 e o 78 (11B14P3) sozinho do Grupo 4 e foram os mais distantes dos demais indivíduos da população F₂. Os Grupos 5 e 6 ficaram com três cafeeiros cada um, o Grupo 7 com quatro e os demais grupos com números maiores de indivíduos distribuídos conforme mostrado na Figura 1.

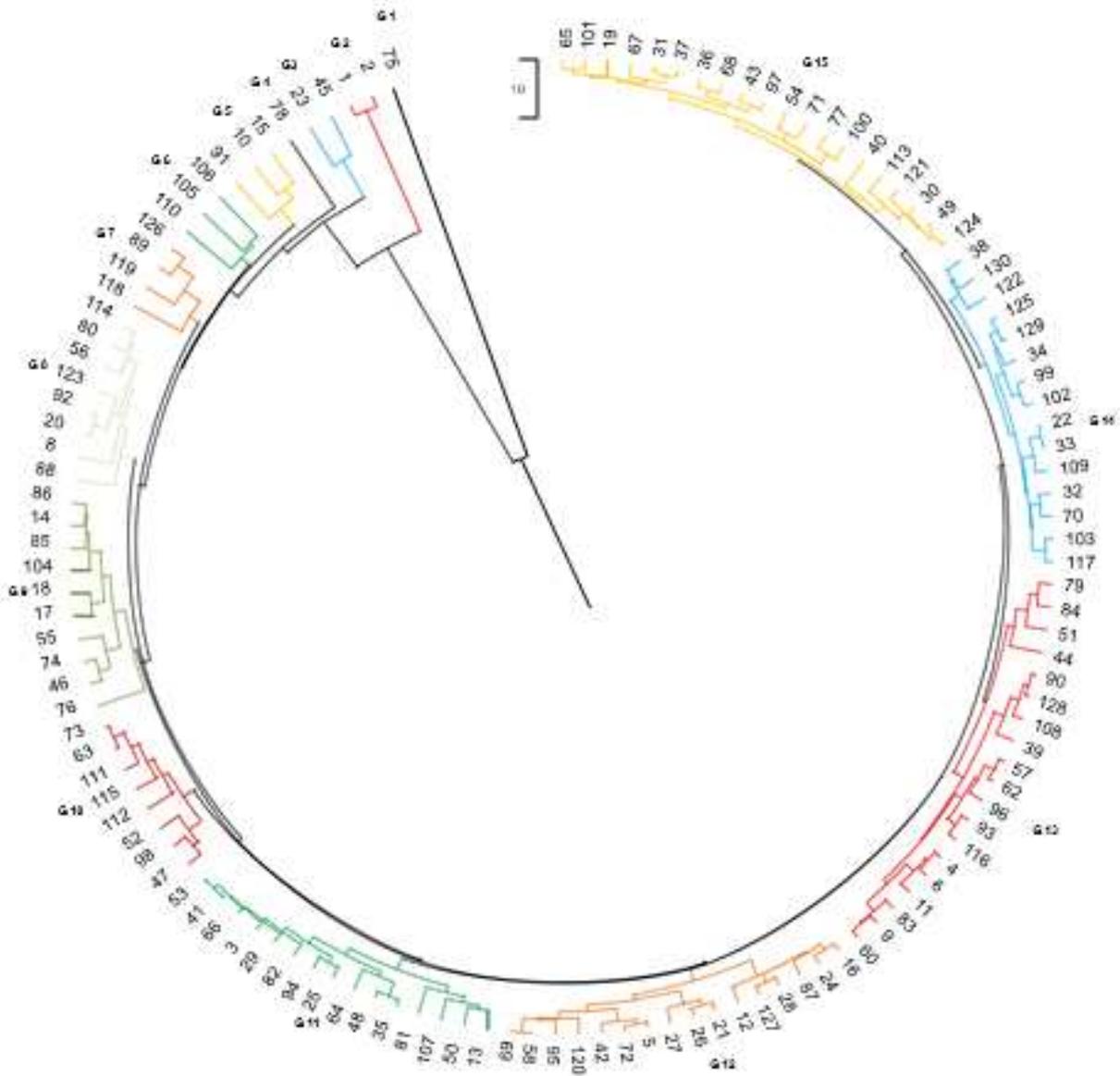


Figura 3. Dendrograma obtido pela técnica UPGMA com base na matriz de dissimilaridade da população composto por 125 cafeeiros F₂ e duas testemunhas Topázio (1) e Catiguá 3 (2), safra 2019 em Patrocínio - MG. G 1: Grupo 1, G 2: Grupo 2, G 3: Grupo 3, G 4: Grupo 4, G 5: Grupo 5, G 6: Grupo 6, G 7: Grupo 7, G 8: Grupo 8, G 9: Grupo 9, G 10: Grupo 10, G 11: Grupo 11, G 12: Grupo 12, G 13: Grupo 13, G 14: Grupo 14, G 15: Grupo 15.

A média de cada um dos 15 grupos, considerando cada característica morfológica (Tabela 5), revelou que a produtividade variou de 1,25 L (Grupo 3) a 5,87 L (Grupo 15). Observou-se que os Grupos 1, 6, 7 e 12 apresentaram características morfológicas semelhantes, com cafeeiros vigorosos, produtivos, medianamente uniforme na maturação dos frutos, resistentes a ferrugem a nível de campo, baixa incidência de cercosporiose e baixa infestação de bicho-mineiro. Os cafeeiros dos grupos 4, 8 e 10 são produtivos e resistentes a ferrugem, no entanto, de baixo vigor, alta incidência de cercosporiose e alta infestação de bicho-mineiro.

Esses grupos foram os que mais se assemelharam ao grupo das testemunhas (Grupo 2), a diferença se deu na suscetibilidade a ferrugem apresentado pelas testemunhas.

Os cafeeiros dos grupos 3 e 13, apesar de não serem produtivos, são vigorosos, com baixa incidência de cercosporiose e ferrugem, baixa infestação de bicho-mineiro e medianamente uniforme na maturação dos frutos. Os indivíduos dos grupos 11 e 14 se assemelham com esses grupos, porém apresentam uma alta infestação de bicho-mineiro. Os cafeeiros dos grupos 5, 9 e 15, apesar de serem produtivos, vigorosos, com baixa incidência de cercosporiose e ferrugem, apresentam alta infestação de bicho-mineiro.

Tabela 5. Média dos cafeeiros resultantes do agrupamento da análise de diversidade.

Grupo	VI	P	CM	UM	CE	FE	BM	AL	DCO	DCA	CRP
1	8,00	4,00	2,00	3,00	2,00	1,00	1,00	166,00	246,00	5,27	82,00
2	3,50	3,91	2,81	3,81	4,13	3,44	3,31	144,06	114,63	4,27	57,31
3	7,50	1,25	2,00	2,00	2,00	1,00	1,00	175,00	127,00	4,11	63,50
4	4,00	4,00	2,00	4,00	4,00	1,00	3,00	106,00	140,00	4,50	70,00
5	8,33	3,00	2,00	3,00	2,00	1,33	3,00	131,00	126,00	6,01	63,00
6	7,33	3,20	3,67	2,67	1,67	1,33	2,33	116,00	119,33	4,12	59,67
7	8,00	4,38	2,00	3,50	1,50	1,25	2,00	146,00	109,50	4,86	54,75
8	5,38	4,69	2,00	3,00	3,88	1,00	3,88	143,88	110,75	4,61	55,38
9	7,30	4,10	1,50	2,60	2,10	1,60	4,00	152,70	155,20	5,37	77,60
10	4,25	3,50	2,00	3,50	3,13	1,63	2,50	134,50	130,50	3,94	65,25
11	7,67	1,47	3,07	3,13	1,40	1,00	3,27	131,67	124,00	4,02	62,00
12	7,88	4,28	2,38	2,81	1,63	1,00	1,19	145,88	140,63	5,15	70,31
13	7,00	2,27	1,53	2,47	1,80	1,53	2,20	121,13	112,80	4,65	56,40
14	6,65	2,75	1,55	1,95	2,15	1,30	2,65	137,85	123,00	4,24	61,50
15	7,26	5,87	1,79	2,05	2,58	1,32	3,53	145,21	123,58	5,06	61,79

Características: vigor vegetativo (VI); produção (P - Litros); ciclo de maturação dos frutos (CM); uniformidade de maturação dos frutos (UM); severidade de cercosporiose (CE); severidade de ferrugem (FE); infestação de bicho mineiro (BM); altura de planta (AL- cm); diâmetro de copa (DCO - cm); diâmetro de caule (DCA - cm) e comprimento de ramo plagiotrópico (CRP - cm).

Seleção assistida por marcadores moleculares

Os 125 cafeeiros fenotipados foram analisados com marcadores moleculares previamente associados a diferentes locos de resistência à ferrugem e ao CBD. Na Tabela 6 encontra-se a genotipagem dos cafeeiros. Ressalta-se que os marcadores SSR16, CBD-Sat 235 e CBD-Sat 207 são codominantes, permitindo distinguir indivíduos homocigotos e heterocigotos e os marcadores CARF005, CaRHv8 e CaRHv9 são dominantes não permitindo, portanto, fazer essa distinção.

Analisando a população com os marcadores CBD-Sat 207 e CBD-Sat 235 (loco A) que detectam e flanqueiam o gene *Ck-1* de resistência ao CBD, verificou-se 80 cafeeiros com a marca do alelo de resistência para ambos os marcadores em heterocigose (Aa). Os outros 45 cafeeiros foram caracterizados como homocigoto recessivo (sem alelo de resistência - aa).

Os marcadores SSR16 e CaRHv8 (loco B), associados ao QTL-GL2 que conferem resistência as raças I e II, e ao patótipo 001 de *H. vastatrix*, revelaram que 26 cafeeiros apresentam o alelo de resistência em homocigose dominante (BB) para os dois marcadores, 62 em heterocigose (Bb) e 37 em homocigose recessiva (bb). O marcador CaRHv9 (loco C), que está associado ao outro QTL que confere resistência as raças I e II, e ao patótipo 001 de *H. vastatrix* (QTL-GL5), permitiu identificar 101 cafeeiros contendo pelo menos um alelo de resistência (C₋), não sendo possível diferenciar homocigotos dos heterocigotos, e 24 em homocigose recessiva (cc).

O outro loco de resistência a ferrugem foi monitorado com o marcador CARF005 (loco D). Foram observados 67 cafeeiros com a presença de pelo menos um alelo de resistência (D₋) e 58 em homocigose recessiva (dd). Como esse marcador é dominante, também não permitiu diferenciar cafeeiros resistentes homocigotos dos resistentes heterocigotos.

Analisando conjuntamente os dados para os quatro locos em estudo, 31 cafeeiros apresentaram pelo menos um alelo de resistência em cada loco (A₋B₋C₋D₋), ou seja, apresentam os quatro locos de resistência piramidados e estão distribuídos em sete grupos (Grupos 6, 9, 11, 12, 13, 14 e 15). Em 42 cafeeiros observou-se a presença de três alelos de resistência e em 36, dois alelos de resistência.

DISCUSSÃO

Caracterização fenotípica e diversidade genética da população

De acordo com as características fenotípicas, em geral, a população é vigorosa, de porte baixo, com ciclo de maturação médio para precoce, maturação dos frutos medianamente

desuniforme, resistente a ferrugem, com baixa incidência de cercosporiose e baixa infestação de bicho-mineiro. Com relação a produtividade, a média da população estudada foi de 3,56 L o que corresponde a 26,48 scs/ha. De acordo com dados da Conab (2020), o rendimento médio da produtividade de *C. arabica* em 2019, ano de avaliação da população, foi de 27,2 scs/ha. Dessa forma, a população, apesar de estar em geração inicial de melhoramento (F_2) e as plantas serem novas (primeira colheita), obteve resultados semelhante à média de produtividade nacional, mostrando o seu potencial produtivo.

A presença de variação entre os valores mínimos e máximos para cada característica morfológica analisada demonstra a existência de variação entre os cafeeiros da população em melhoramento. Essa variabilidade foi, também, comprovada no estudo de diversidade genética, onde 15 grupos foram formados na análise de agrupamento. Presença de variabilidade na população cafeeira é de grande importância para os melhoristas, pois pode ser usada para selecionar cafeeiros com as características de interesse ou recombinar genótipos desejáveis. Dessa forma, acessar a variabilidade genética das populações em melhoramento tem implicações significativas na seleção e no desenvolvimento de cultivares (Ahmed, 2013; Akpertey et al., 2018).

Os estudos de diversidade genética de populações são importantes para o conhecimento da estrutura, distribuição da variação dentro da população e direcionar cruzamentos promissores. Nesse sentido, no processo de seleção de plantas voltadas para o melhoramento é muito importante selecionar materiais bons para que possam ser selecionados para avanço de geração ou hibridação. A análise da diversidade usando características morfológicas é, portanto, relevante para avaliação de recursos genéticos no contexto de programas de melhoramento (Akpertey et al., 2018).

Na análise de agrupamento, observou-se que as testemunhas foram alocadas em um grupo a parte, demonstrando que os cafeeiros da população de melhoramento são diferentes das testemunhas. Os grupos 1, 6, 7 e 12 se destacaram por apresentarem características favoráveis, em especial a baixa infestação por bicho-mineiro, um dos principais objetivos do melhoramento nessa população estudada. Dessa forma, o avanço de gerações de alguns desses cafeeiros pode ser considerado no programa de melhoramento. Outros grupos apresentaram apenas algumas características importantes e podem ser utilizados em cruzamentos, considerando a complementariedade das características e divergência entre indivíduos e grupos, pois, o cruzamento de indivíduos divergentes pode levar ao aumento de ganho de seleção.

A obtenção de variabilidade genética e, conseqüentemente, o sucesso do melhoramento genético reside na identificação e incorporação eficiente da diversidade de várias fontes genéticas de plantas, incluindo cultivares atualmente cultivadas, material genético selvagens e próximos das cultivares e coleções de germoplasma (Swarup et al., 2021). A população analisada no presente trabalho envolve diferentes materiais genéticos em sua genealogia, justificando, portanto, a variação observada. A população foi obtida por cruzamentos entre acessos de Catuaí (*C. arabica*), acessos de Híbrido de Timor (derivado de *C. canephora*) e a cultivar Siriema (derivado de *C. racemosa*).

O grupo Catuaí consiste em cafeeiro contendo apenas a espécie *C. arabica* em sua genealogia e apresenta menor variabilidade. No entanto, o Híbrido de Timor é derivado de cruzamento natural entre *C. arabica* e *C. canephora*, apresentando, portanto, maior variabilidade. Silva et al. (2018) caracterizaram molecularmente o germoplasma de Híbrido de Timor e verificaram considerável variabilidade desses materiais. Setotaw et al. (2013) relataram que a introdução do Híbrido de Timor no melhoramento de cultivares brasileiras desempenhou importante função na diversificação da base genética das cultivares. Além disso, para a formação da população em estudo, foi realizado cruzamento com a cultivar Siriema. Essa cultivar foi desenvolvida por meio do cruzamento de uma planta derivada de híbrido natural entre *C. arabica* e *C. racemosa* retrocruzada com *C. arabica*. Na sua genealogia também tem cruzamento com Híbrido de Timor (Carvalho et al., 2008).

A escolha de qual método de melhoramento a ser utilizado vai depender do objetivo do melhorista, portanto, para auxiliar o avanço de geração e escolha de novos cruzamentos, além de fornecer a informação de diversidade genética, no presente trabalho, os cafeeiros fenotipados foram analisados com marcadores moleculares ligados a resistência a doenças. Essa análise complementar permite a seleção de cafeeiros assistida por marcadores.

Seleção assistida por marcadores moleculares

A seleção assistida por marcador (SAM) compreende a seleção indireta de características agrônômicas importantes por meio de marcadores ligados aos genes associados à característica (Dormatey et al., 2020). Nesse sentido, marcadores moleculares foram utilizados para avaliar a combinação de múltiplos genes de resistência a *H. vastatrix* e *C. kahawae* em cafeeiros.

Esforços de melhoramento são continuamente necessários para introduzir vários genes de resistência a doenças em um único genótipo (piramidação gênica), visando reduzir o

desenvolvimento de novas raças do patógeno (Khannetah et al., 2021) e aumentar a durabilidade da resistência. A análise de diversidade juntamente com resultados da SAM, permite selecionar indivíduos e grupos contrastantes a serem usados em futuros cruzamentos, bem como eliminar indivíduos. O cafeeiro 75 (Grupo 1) é o mais divergente de acordo com análise de diversidade, produtivo, resistente a bicho-mineiro, ferrugem e baixa incidência de cercosporiose. No entanto, não apresentou nenhum alelo de resistência para os locos analisados. Nesse sentido, para explorar as características desse material, ele pode ser cruzado com outros cafeeiros que apresentam essas mesmas características, mais os alelos de resistência, como por exemplo, o cafeeiro 12 (Grupo 12). Cafeeiros pertencentes a grupos distintos e que possuem complementariedade de alelos podem ser selecionados para novos cruzamentos, como os cafeeiros 105 (Grupo 6) e 113 (Grupo 14). Uma outra forma de explorar a população, é por meio do avanço de geração de cafeeiros promissores. O cafeeiro 87 é um material promissor pois é produtivo, vigoroso, com baixa incidência de cercosporiose, resistente a ferrugem e bicho-mineiro e ainda apresenta os quatro genes piramidados. Segundo Nonato et al. (2021), no cafeeiro, o bicho-mineiro e a ferrugem são considerados os problemas fitossanitários mais importantes e, existem dois cultivares resistente às duas doenças.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nesse trabalho demonstram a variabilidade e potencial da população para melhorar diferentes características morfoagronômicas de interesse para o setor cafeeiro. Além disso, os dados fenotípicos associados aos moleculares (SAM) revelam que a população pode servir como fonte potencial de genes de resistência para as principais doenças do cafeeiro.

REFERÊNCIAS

- Ahmed S (2013) Study on genetic diversity in maize (*Zea mays* L.) inbred lines for the development of hybrids, PhD Thesis, Department of Genetics and Plant Breeding, Bangladesh Agricultural University, Banglade.
- Akpertey A, Anim-Kwapong E, Ofori A (2018) Assessment of genetic diversity in robusta coffee using morphological characters. *International Journal of Fruit Science*, 19(3):276 – 299. <https://doi.org/10.1080/15538362.2018.1502723>

- Alemu K, Adugna G, Lemessa F, Muleta D (2020) Variation among colletotrichum isolates associated with coffee berry disease in Ethiopia. *Cogent Biology*, 6(1), 1740537. <https://doi.org/10.1080/23312025.2020.1740537>
- Alkimim ER, Caixeta ET, Sousa TV, Pereira AA, de Oliveira ACB, Zambolim L, Sakiyama NS (2017). Marker-assisted selection provides arabica coffee with genes from other *Coffea* species targeting on multiple resistance to rust and coffee berry disease. *Molecular Breeding*, 37(1), 6. <https://doi.org/10.1007/s11032-016-0609-1>
- Almeida DP, Castro ISL, Mendes TAO, Alves DR, Barka GD, Barreiros PRRM, Zambolim L, Sakiyama NS, Caixeta ET (2021) Receptor-like kinase (Rlk) as a candidate gene conferring resistance to *Hemileia vastatrix* in coffee. *Scientia Agricola*, 78(6), 1–9. <https://doi.org/10.1590/1678-992x-2020-0023>
- Alvarenga SM, Caixeta ET, Hufnagel B, Thiebaut F, Maciel-Zambolim E, Zambolim L, Sakiyama NS (2011) Molecular markers from coffee genome expressed sequences potentially involved in resistance to rust. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, 46(8), 890–898. <https://doi.org/10.1590/s0100-204x2011000800015>
- Barka GD, Caixeta ET, Ferreira SS, Zambolim L (2020) In silico guided structural and functional analysis of genes with potential involvement in resistance to coffee leaf rust: A functional marker based approach. *Plos One*, 15(7), e0222747. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222747>
- Brito GG, Caixeta ET, Gallina AP, Zambolim EM, Zambolim L, Diola V, Loureiro ME (2010) Inheritance of coffee leaf rust resistance and identification of AFLP markers linked to the resistance gene. *Euphytica*, 173(2), 255–264. <https://doi.org/10.1007/s10681-010-0119-x>
- Brasil (2022) Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. In: Registro Nacional de Cultivares – RNC. https://sistemas.agricultura.gov.br/snpc/cultivarweb/cultivares_registradas.php Acessado 19 jan. 2022
- Cardoso DC, Martinati JC, Giachetto PF, Vidal RO, Carazzolle MF, Padilha L, Guerreiro-Filho O, Maluf MP (2014) Large-scale analysis of differential gene expression in coffee genotypes resistant and susceptible to leaf miner-toward the identification of candidate genes for marker assisted-selection. *BMC Genomics* 15:66. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-66>

- Combes MC, Andrzejewski S, Anthony F, Bertrand B, Rovelli P, Graziosi G, Lashermes P (2000) Characterization of microsatellite loci in *Coffea arabica* and related coffee species. *Molecular Ecology*, 9(8), 1178–1180. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2000.00954-5.x>
- Diniz LEC, Sakiyama NS, Lashermes P, Caixeta ET, Oliveira ACB, Loureiro ME, Pereira AA, Zambolim L (2005) Analysis of AFLP markers associated to the Mex-1 resistance locus in Icatu progenies. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 5, 387–393.
- Dormatey R, Sun C, Ali K, Coulter JA, Bi Z, Bai J. (2020) Gene Pyramiding for Sustainable Crop Improvement against Biotic and Abiotic Stresses. *Agronomy*. 10(9):1255. <https://doi.org/10.3390/agronomy10091255>
- Gichuru EK, Agwanda CO, Combes MC, Mutitu EW, Ngugi ECK, Bertrand B, Lashermes P (2008) Identification of molecular markers linked to a gene conferring resistance to coffee berry disease (*Colletotrichum kahawae*) in *Coffea arabica*. *Plant Pathology*, 57(6), 1117–1124. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2008.01846.x>
- Gimase MJ, Thagana WM, Omondi CO, Cheserek JJ, Gichimu BM, Gichuru EK, Ziyomo C, Sneller CH (2021) Genome-Wide Association Study identify the genetic loci conferring resistance to Coffee Berry Disease (*Colletotrichum kahawae*) in *Coffea arabica* var. Rume Sudan. *Springer*, 216:86, 85–87. <https://doi.org/10.1007/s10681-020-02621-x>
- Hindorf H & Omondi CO (2011) A review of three major fungal diseases of *Coffea arabica* L. in the rainforests of Ethiopia and progress in breeding for resistance in Kenya. *Journal of Advanced Research*, 2(2), 109-120. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2010.08.006>
- Khannetah KR, Ramchander S, Leon MTAP, et al. (2021) Genetic diversity analysis in indigenous rice (*Oryza sativa* L.) germplasm for bacterial leaf blight (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) (BB) using resistance genes-linked markers. *Euphytica* 217, 145. <https://doi.org/10.1007/s10681-021-02862-4>
- Melese YY & Kolech SA (2021) Coffee (*Coffea arabica* L.): Methods, Objectives, and Future Strategies of Breeding in Ethiopia—Review <https://doi.org/10.3390/su131910814>
- Nonato JVA, Carvalho HF, Borges KLR et al (2021) Association mapping reveals genomic regions associated with bienniality and resistance to biotic stresses in arabica coffee. *Euphytica* 217, 190. <https://doi.org/10.1007/s10681-021-02922-9>
- Pantoja-Gomez, L.M., Corrêa, A.S., Oliveira, L.O. & Guedes, R.N.C. (2019) Common origin of Brazilian and Colombian populations of the Neotropical coffee leaf miner, *Leucoptera*

- coffeella* (Lepidoptera: Lyonetiidae). Journal of Economic Entomology, 112, 924–931
<https://doi.org/10.1093/jee/toy416>
- Pailles Y, Ho S, Pires IS, Tester M, Negrão S, Schmöckel SM (2017) Genetic diversity and population structure of two tomato species from the Galapagos Islands. Front Plant Sci 8:138
- R Core Team. (2018). R: A Language and environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, 16. <https://doi.org/10.1016/j.dendro.2008.01.002>
- Rocha RB, Vieira DS, Ramalho AR, Teixeira AL (2013) Caracterização e uso da variabilidade genética de Banco Ativo de Germoplasma de *Coffea canephora* Pierre ex Froehner. Coffee Science, 8(4), 478-485.
- Setotaw TA, Caixeta ET, Pereira AA, de Oliveira ACB, Cruz CD, Zambolim EM, Zambolim L, Sakiyama NS (2013) Coefficient of Parentage in *Coffea arabica* L. Cultivars Grown in Brazil. Crop Science, 53.
- Setotaw TA, Caixeta ET, Zambolim EM, Sousa TV, Pereira AA, Baião AC, Cruz CD, Zambolim L, Sakiyama NS (2020) Genome Introgression of Híbrido de Timor and Its Potential to Develop High Cup Quality C. arabica Cultivars. Journal of Agricultural Science, 12(4), 64. <https://doi.org/10.5539/jas.v12n4p64>
- Silva R, Zambolim L, Castro ISL, Rodrigues HS, Cruz C, Caixeta ET (2018) The Híbrido de Timor germplasm: identification of molecular diversity and resistance sources to coffee berry disease and leaf rust. Euphytica, 214(153) <https://doi.org/10.1007/s10681-018-2231-2>
- Sousa TV, Caixeta ET, Alkimim ER, et al. (2017) Molecular markers useful to discriminate *Coffea arabica* cultivars with high genetic similarity. Euphytica 213, 75. <https://doi.org/10.1007/s10681-017-1865-9>
- Swarup S, Cargill EJ, Crosby K, Flagel L, Kniskern J, Glenn KC (2021) Genetic diversity is indispensable for plant breeding to improve crops. Crop Science, 61(2), 839-852.
- Van Der Vossen HAM, Walyaro DJ (1980) Breeding for resistance to coffee berry disease in *Coffea arabica* L. II. Inheritance of the resistance. Euphytica, 29(3), 777–791. <https://doi.org/10.1007/BF00023225>
- Van der Vossen H, Bertrand B, Charrier A (2015) Next generation variety development for sustainable production of arabica coffee (*Coffea arabica* L.): a review. Euphytica, 204(2), 243–256. <https://doi.org/10.1007/s10681-015-1398-z>

- Vieira A, Diniz I, Loureiro A, Pereira AP, Silva MC, Várzea V, Batista D (2019) Aggressiveness profiling of the coffee pathogen *Colletotrichum kahawae*. *Plant Pathology*, 68(2), 358–368. <https://doi.org/10.1111/ppa.12950>
- Zambolim L (2016) Current status and management of coffee leaf rust in Brazil. *Tropical Plant Pathology*, 41(1), 1–8. <https://doi.org/10.1007/s40858-016-0065-9>
- Zambolim L & Caixeta ET (2021) An overview of physiological specialization of coffee leaf rust - new designation of pathotypes. *International Journal of Current Research*, 13(01), 15564–15575. <https://doi.org/10.24941/ijcr.40600.01.2021>

CAPÍTULO 3: CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE CAFEIROS PORTADORES DO GENE S_{H3} DE RESISTÊNCIA A *HEMILEIA VASTATRIX* EM POPULAÇÕES DE MELHORAMENTO

RESUMO

O café arábica por ser uma cultura perene hospeda uma grande variedade de patógenos, em que os causadores da ferrugem e da antracnose dos frutos (CBD) são os que trazem maiores prejuízos. O controle é feito pelo método químico, porém gera custos, prejuízos ao meio ambiente e ao homem. Assim, o uso de cultivares resistentes é o método adequado para o controle e, com auxílio de marcadores moleculares, é possível selecionar e descartar plantas, diminuindo o tempo de obtenção da cultivar melhorada. Dessa forma, objetivou-se, por meio da seleção assistida por marcadores, identificar plantas portadoras de genes de resistência para as principais doenças do café. Foram avaliados 313 indivíduos (24 grupos de cruzamentos de cafés arábica x seleções indianas) e quatro cultivares comerciais, com 11 marcadores moleculares associados a cinco locos diferente de resistência à ferrugem e ao CBD. Foram identificados indivíduos portadores dos alelos de resistência para os cinco locos avaliados, além de indivíduos contendo a piramidação de genes com diferentes combinações para os locos. As informações geradas neste trabalho são úteis para o melhoramento genético do cafeeiro no desenvolvimento de cultivares com múltipla resistência, em especial para o melhoramento preventivo para CBD.

INTRODUÇÃO

O café é a segunda principal *commodity* no mercado mundial depois do petróleo. O gênero *Coffea* apresenta mais de 124 espécies caracterizadas (Davis et al., 2011). Apesar da diversidade deste gênero, apenas duas espécies, *Coffea arabica* L. e *Coffea canephora* são de importância econômica, contribuindo com cerca de 70 e 30% da participação total do mercado mundial, respectivamente (Setotaw et al., 2020). Por ser uma cultura perene, o cafeeiro hospeda uma grande variedade de patógenos e pragas.

A ferrugem do cafeeiro causada pelo fungo *Hemileia vastatrix* Berk. & Br. consiste em uma séria ameaça para a sustentabilidade da lavoura de café arábica (Avelino et al., 2015; Talhinhos et al., 2017) e é uma das doenças que tem causado maiores perdas na cultura. Caso nenhum método de controle para essa doença seja utilizado e cultivares suscetíveis sejam plantadas, perdas de produção de mais de 50% podem ocorrer (Zambolim & Caixeta, 2021).

A antracnose dos frutos (*Coffee Berry Disease* - CBD), causada pelo fungo *Colletotrichum kahawae* (Waller & Bridge) (Waller et al., 1993), é uma doença extremamente importante, pois em epidemias pode destruir 50 a 80% (Van Der Vossen e Walyaro, 2009; Diniz et al., 2017) e às vezes até 100% (Giddisa, 2016) da lavoura. Esta doença está restrita a África, no entanto, o risco de sua introdução nos principais países produtores de Arábica (na América e na Ásia) faz com que este seja um patógeno de quarentena (Cabral et al., 2020).

O controle mais comum de ambas doenças é realizado por meio da utilização de fungicidas; no entanto, produtos químicos devem ser aplicados racionalmente para evitar danos às culturas e ao meio ambiente (Zambolim, 2016). Assim, o uso de cultivares resistentes é o método mais adequado para o controle dessas doenças (Gimase et al. 2021; Talhinhos et al., 2017).

Algumas fontes genéticas de resistência a ferrugem já foram identificadas. Pelo menos nove genes dominantes presentes em diferentes espécies de café foram caracterizados (S_H1 a S_H9) (Talhinhos et al. 2017; Bettencourt & Noronha-Wagner, 1971; Bettencourt & Rodrigues, 1988). Os genes de resistência S_H1 , 2, 4 e 5 foram identificados em *C. arabica*; S_H6 , 7, 8 e 9 em *C. canephora*; e S_H3 em *C. liberica*. Além disso, Barka et al. (2020) e Almeida, et al. (2021) clonaram e caracterizaram molecularmente dois genes candidatos de resistência a *H. vastatrix*, um gene *Nucleotide Binding site-ARC* (NB-ARC) denominado de S_H10 (Zambolim & Caixeta, 2021) e um gene *Receptor LRR Kinase* (RLK), respectivamente. A resistência ao CBD é governada por pelo menos três genes, os quais foram identificados nas variedades Rume Sudan (genes R), Híbrido de Timor (T gene) e K7 (gene k) onde R e T são dominantes, enquanto k é recessivo (Van Der Vossen & Walyaro, 1980). Em um estudo realizado por Gichuru et al. (2008), o loco identificado como responsável pela resistência a *C. kahawae* foi denominado *Ck-1*, podendo ser o mesmo loco T, previamente identificado no Híbrido de Timor.

Para viabilizar a introgressão de genes de outras espécies em cafeeiros de *C. arabica*, híbridos interespecíficos têm sido utilizados nos programas de melhoramento genético. Nesse sentido, acessos de Híbrido de Timor e Seleções Indianas, que são híbridos naturais e plantas tetraplóides, são usados para facilitar a introgressão de genes de interesse de espécies com níveis de ploidia (*C. canephora* e *C. liberica*) que diferem do de *C. arabica* (Alkimim et al., 2017).

Apesar da importância do melhoramento genético e uso de híbridos interespecíficos nos cruzamentos, a obtenção de cultivar contendo resistência a doenças pode levar até 30 anos, devido as características de ciclo longo e perenidade do cafeeiro. Esse longo período pode ser

reduzido significativamente utilizando a seleção assistida por marcadores moleculares (SAM) (Gimase et al, 2020). Marcadores moleculares ligados a genes de resistência a *H. vastatrix* e *C. kahawae* foram desenvolvidos e tem auxiliado na seleção e descarte de plantas (Alkimim et al., 2017; Almeida et al., 2021). Para resistência a *H. vastatrix*, Mahé et al. (2008) desenvolveram quatro marcadores associado ao gene S_H3 (gene originado de *C. liberica*) e Almeida et al. (2021) desenvolveram marcadores ligados a dois genes\QTL de efeito maior que conferem resistência às raças I, II e patótipo 001 de *H. vastatrix*, identificados em Híbrido de Timor (gene de *C. canephora*). Outro marcador, CARF005, associado a gene presente no Híbrido de Timor foi desenvolvido (Alvarenga et al., 2011; Barka et al., 2020) e o gene caracterizado. Além disso, esse gene corresponde a um loco distinto dos dois genes maiores identificados por Almeida et al. (2021). Para o CBD, Gichuru et al. (2008) identificaram marcadores ligados e flanqueando o gene de resistência *Ck-1*. Assim, esses marcadores podem ser usados em SAM para monitorar e piramidar genes de resistência, com diferentes espectros de resistência contra um único patógeno ou múltiplos patógenos (Jaber et al., 2020).

O objetivo desse estudo foi identificar e selecionar cafeeiros portadores de diferentes genes de resistência a *H. vastatrix* e *C. kahawae* por meio de marcadores moleculares em populações derivadas de cruzamentos envolvendo híbridos interespecíficos de *C. arabica* x *C. liberica*.

MATERIAL E MÉTODOS

Material genético

Foram analisadas 313 plantas de café, correspondentes a 24 cruzamentos (tratamentos) e quatro cultivares (Catiguá MG2, MGS Ametista, Catuaí Vermelho – IAC 144 e MGS Paraíso 2) (Tabela 1). As plantas dos cruzamentos foram obtidas de cultivares de porte baixo e de porte alto de interesse agrônômico cruzadas com cafeeiros potencialmente resistentes contendo o gene S_H3 . As fontes do gene S_H3 utilizadas incluiu as Seleções Indianas S.333, S.353 e S.795. Os cafeeiros S.333 e S.353 são derivadas dos híbridos interespecíficos (*C. arabica* × *C. liberica*) tetraplóides S.26 e S.31 retrocruzados ou não com Kent ou Coorg e carregam além do S_H3 os genes S_H2 e S_H5 (Alkimim et al., 2017). Essas plantas correspondem a gerações avançadas de cafeeiros que estão plantados no campo de adaptação e seleção da área experimental do Fundão, Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa-MG. As gerações anteriores dessas plantas foram submetidas a seleção fenotípica, e algumas por SAM por Alkimim et al. (2017). Esses materiais estão instalados no Campo Experimental de Três Pontas, Epamig em MG.

Tabela 1. Genealogia dos 313 indivíduos de café analisados no estudo.

Trat	ID campo	Material genético	Cruzamento de origem	G
1	B4-III-3PB+	UFV409-47	CIFC H315/4=Mundo Novo CIFC 1535/181 x S.795 CIFC 1344/19	F ₄
2	B4-III-5PB+			
3	B9-II-5PB	UFV315-08	CIFC H315/2 = Mundo Novo (CIFC 1535/181) x S.795 (CIFC 1344/19)	F ₄
4	B10-I-1PB	UFV480-11	CIFC H101/? = S.333 (CIFC 254/14) x Dilla & Alghe (CIFCX 128/2)	F ₄
5	1-II-6PB	UFV337-29	CIFC H526 = Catuaí Vermelho (CIFC 2481/1) x CIFC H257/3 [Caturra Vermelho CIFC 19/1 x S.795 (CIFC 1344/19)]	F ₃
6	6-I-6PB	UFV337-18		
7	6-II-1PB			
8	7-III-5-PB	UFV336-28	CIFC 524 = Caturra Amarelo (CIFC 1637/48) x CIFC H.W.3/5 [Blue Montain (CIFC 187/8) x S.353-4/5 (CIFC 34/13)]	F ₃
9	9-II-1PB	UFV313-133	CIFC H275/7 = Caturra Vermelho (CIFC 19/1) x S.795 (CIFC 1344/19)	F ₄
10	9-II-2PB			
11	9-II-5PB+			
12	9-III-1PB			
13	9-III-2PB			
14	9-III-5PB			
15	10-II-5PB			
16	11-I-6PB	UFV 314-19	CIFC H275/13 = Caturra Vermelho (CIFC 19/1) x S.795 (CIFC 1344/19)	F ₄
17	11-III-2PB			
18	Catiguá MG2	-----	-----	-
19	15-II-3PB-	UFV317-02	CIFC H525 = Caturra Vermelho (CIFC 1640/28) x [CIFC H257/7 (Caturra Vermelho CIFC 19/1) x S.795 (CIFC 1344/19)]	F ₃
20	15-II-5PB-			
21	Araponga MG2	-----	-----	-
22	17-I-2PB			

Continuação

Tabela 1. Genealogia dos 313 indivíduos de café analisados no estudo.

Trat	ID campo	Material genético	Cruzamento de origem	G
23	17-I-4PB	UFV311-59	CIFC H227/1 = Caturra Amarelo (CIFC 426/2) x S.333 (CIFC 254/14)	F ₄
24	17-II-4PB			
25	19-II-2PB	UFV336-05	CIFC 524 = Caturra Amarelo (CIFC 1637/48) x CIFC H.W.3/5 [Blue Montain (CIFC 187/8) x S.353-4/5 (CIFC 34/13)]	F ₃
26	19-III-3PB			
27	Catuaí Verm. IAC 144	-----	-----	-
28	MGS Paraíso2	-----	-----	-

Trat: número do tratamento; ID Campo: identificação do tratamento no campo; Material genético: nome dado a planta gerada após o cruzamento; G: geração dos indivíduos avaliados.

Seleção assistida por marcadores para resistência múltipla a doenças

Folhas jovens e totalmente expandidas das 313 plantas de café foram coletadas e o DNA foi extraído usando a metodologia descrita por Diniz et al. (2005). A qualidade do DNA foi avaliada em gel de agarose (1%) e quantificada usando o espectrofotômetro NanoDrop 2000 (*Thermo Fisher Scientific*). As amostras de DNA foram padronizadas a $25 \text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ e armazenadas a -20°C até a análise.

O DNA extraído foi amplificado com 10 marcadores moleculares (SP-M16-SH3, BA-48-21O-f, BA-124-12K-f, Sat244, CaRHv8, SSR16, CaRHv9, CARF005, CBD-Sat 207 e CBD-Sat235) para inferir a presença de diferentes genes de resistência a *H. vastatrix* e *C. kahawae* (Tabela 2). Para análise de resistência a *H. vastatrix* utilizou-se os marcadores SP-M16-SH3, BA-48-21O-f, BA-124-12K-f e Sat244 (loco A) ligados ao gene S_H3 (Mahé et al., 2008), os SSR16, CaRHv8 (loco B) e CaRHv9 (loco C) ligados aos dois QTL que conferem resistência as raças I, II e patótipo 001 de *H. vastatrix* (Almeida et al., 2021) e CARF005 (loco D) ligado a outro loco (Alvarenga et al., 2011 e Barka et al., 2020). Para análise de resistência ao gene *Ck-1* de *C. kahawae*, utilizou-se os marcadores CBD-Sat235 e CBD-Sat207 (Loco E) identificados e mapeados por Gichuru et al. (2008).

A reação de PCR para os marcadores do loco A consistiu em um volume final de 25 μl , 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 μM de cada *primer*, 0,5 U de Taq DNA polimerase, completando o volume com água milli-Q estéril. As amplificações foram realizadas com desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos; 35 ciclos a 94°C por 45 segundos, temperaturas de anelamento específico para cada *primer* (Tabela 2) por 45 segundos, extensão de 72°C por 45 segundos e extensão final a 72°C por 10 minutos. Os acessos CIFC H147/1, CIFC H153/2 e S.288/23 foram os controles portadores do alelo de resistência, e as cultivares Caturra Vermelho CIFC 19/1 e Catuaí Amarelo IAC 64 (UFV 2148/57) os controles negativos.

Tabela 2. Descrição dos marcadores moleculares utilizados na genotipagem, que estão ligados a genes que conferem resistência a *H. vastatrix* e a *C. kahawae*.

Fungo	Loco	Gene	Marcador	Sequência	T (°C)	Referência	
<i>Hemileia vastatrix</i>	A	SH3	BA-48-21O-f	R:ACTTGGCAGGCGTAATTGAA F:ACAGTGAATTCCCCAAGCAC	52	Mahé et al. (2008)	
			SP-M16- SH3	R:ATCTAGCTTTGGAACATCGT F:TAACTGGAAACTTGGCTTG	49		
			Sat244	R:GCATACTAAGGAATTATCTGACT GCT F:GCATGTGCTTTTTGATGTCGT	52		
			BA-124-12KF	R:TGCAGATTGATGGCACGTTA F:TGATTTCGCTTGTTGTCGAG	56		
	B	QTL-GL2	SSR 016	R:CCACACAACCTCCTCATTC F:ACCCGAAAGAAAGAACCAAG	65	Combes et al. (2000)	
			CaRHv8	F:CCTTCTAGTGTTACCGAGGA R:CTTAGCGCCATGAATAGCCA	65		
	C	QTL-GL5	CaRHv9	F:TGATGAAGAAGAGCGCATAGC R:GTCTAAGACCAGAATCAGATGG	65	Almeida et al. (2021)	
	D	NB-ARC e LRR	CARF005	F:GGACATCAACACCAACCTC R:ATCCCTACCATCCACTTCAAC	60	Alvarenga et al. (2011); Barka et al. (2020)	
	<i>Colletotrichum kahawae</i>	E	Ck-1	CBD-Sat 207	F:GAAGCCGTTTCAAGCC R:CAATCTCTTTCCGATGCTCT	50	Gichuru et al. (2008)
				CBD-Sat 235	F:TCGTTCTGTCATTAAATCGTCAA R:GCAAATCATGAAAATAGTTGGTG		

SSR: Simple sequence repeat; F: Primer Forward; R: Primer Reverse

Os marcadores do loco B, CaRHv8 e SSR16, estão ligados ao QTL presentes no Grupo de Ligação 2 (QTL-GL2) que conferem resistência as raças I e II e ao patótipo 001 de *H. vastatrix* (Almeida et al., 2021). A análise desses marcadores se complementa na genotipagem das plantas, pois, o SSR16 é codominante, identificando-se os indivíduos BB, Bb e bb; e o CaRHv8 dominante, ligado em repulsão, marcando só um dos alelos (b). Para o loco B, utilizou-se o marcador CaRHv9, que está ligado no QTL do grupo de ligação 5 (QTL-GL5). O genótipo Híbrido de Timor UFV 443-03 foi o controle resistente a *H. vastatrix*, a cultivar Catuaí Amarelo IAC 64 (UFV 2148/57) a suscetível. A PCR para os marcadores CaRHv8 e CaRHv9 foi realizada em um volume final de 20 µl, contendo 50 ng de DNA, tampão de reação de PCR 1X, 2,0 mM de MgCl₂, 0,15 mM de cada dNTP; 0,1 µM de cada *primer*, 1 U de Taq DNA polimerase, completando o volume com água milli-Q estéril. As amplificações foram realizadas com desnaturação inicial 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. A reação para o marcador SSR16 foi semelhante ao CaRHv8 e 9, só difere por utilizar 0,6 mM de MgCl₂. A amplificação consistiu em desnaturação inicial 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 e extensão final a 72°C por 8 minutos.

O marcador CARF005, representado pelo loco D, amplifica um gene correspondente a um *Resistance Gene Analog* (RGA), que compartilha sequências conservadas com outros genes SH e expressa um alelo polimórfico característico que confere fenótipos de resistência distintos (Barka et al., 2020). A PCR foi realizada em uma mistura de reação de 20 µL contendo 50 ng de DNA, 0,1 µM de cada *primer*, 0,15 mM de cada dNTP, 1,0 mM de MgCl₂, 1 U de Taq DNA polimerase e 1 X tampão de reação de PCR. A amplificação consistiu com desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de amplificação de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 61°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto, e final extensão a 72°C por 10 min. O Híbridos de Timor CIFC 832/2 e Caturra Vermelho CIFC 19/1, foram utilizados como controle resistente e suscetível, respectivamente.

Os marcadores do loco E, CBD-Sat207 e CBD-Sat235, estão ligados ao gene *Ck-1* que confere resistência a CBD (Gichuru et al., 2008). A PCR consistiu 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. A amplificação consistiu em 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 para os marcadores de S_{H3} , QTL-GL2 e *Ck-1* 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 CaRHv9 foi visualizado em gel de agarose (1,5%). A eletroforese do CARF005 foi em capilar em sequenciador ABI 3130xl *Genetic Analyzer – Applied Biosystems*.

RESULTADOS

*Amplificação de marcadores ligados ao gene S_{H3} de resistência a *H. vastatrix* (Loco A)*

Foram analisadas 313 plantas de café (24 grupos de cruzamentos e quatro cultivares) para quatro marcadores ligados ao gene S_{H3} de resistência a *H. vastatrix*. Os marcadores SP-M16-SH3, BA-48-21O-f e Sat244 foram codominantes, possibilitando a diferenciação dos indivíduos homocigotos e heterocigotos. E o BA-124-12K-f, foi dominante, identificando os genótipos A_{-} e aa.

Na Tabela 3 encontra-se a genotipagem das 313 plantas para cada marcador analisado nesse estudo. Com o marcador BA-48-21O-f, identificou-se 159 indivíduos (50,80%) com o alelo do gene S_{H3} em homocigose (AA), 69 heterocigotos (Aa), 66 recessivos (aa) e 19 apresentaram dados perdidos (F). O marcador SP-M16-SH3 apresentou 200 indivíduos (63,90%) com o genótipo AA, 61 heterocigotos (Aa), 51 recessivos (aa) e um com dado perdido (F). Analisando o Sat244, observou-se 190 indivíduos (60,70%) com genótipo AA, 70 heterocigotos Aa, 51 recessivos (aa) e dois com dados perdidos (F). Por último, o marcador BA-124-12K-f permitiu identificar 258 indivíduos (82,43%) A_{-} , 53 recessivos (aa) e dois com dados perdidos (F).

Tabela 3: Genotipagem das 313 plantas para 10 marcadores envolvidos na resistência de ferrugem e CBD em cafeeiros arábica.

Trat	Indiv.	BA48	BA124	SPM16	SAT244	S _H 3	CaRHv8	SSR16	QTL2	CaRHv9 - QTL5	CARF005	SAT207	SAT235	Ck-1
1	1	aa	aa	aa	aa	aa	b	bb	bb	cc	dd	ee	ee	ee
	2	Aa	A-	Aa	Aa	Aa	b	bb	bb	C	dd	ee	ee	ee
	3	Aa	A-	AA	AA	RE	b	bb	bb	C	dd	ee	ee	ee
	4	Aa	A-	Aa	Aa	Aa	b	bb	bb	cc	dd	ee	ee	ee
	5	Aa	A-	Aa	Aa	Aa	b	bb	bb	cc	dd	ee	ee	ee
	6	Aa	F	AA	AA	?	b	bb	bb	cc	dd	ee	ee	ee
	7	Aa	A-	Aa	Aa	Aa	b	bb	bb	C	dd	ee	ee	ee
	8	aa	aa	aa	aa	aa	b	bb	bb	cc	dd	ee	ee	ee
	9	Aa	A-	AA	AA	RE	b	bb	bb	C	dd	ee	ee	ee
	10	Aa	A-	Aa	Aa	Aa	b	bb	bb	C	dd	ee	ee	ee
	11	AA	A-	AA	AA	AA	b	bb	bb	C	dd	ee	ee	ee
	12	aa	aa	AA	AA	RE	b	bb	bb	cc	dd	ee	ee	ee
2	13	F	A-	Aa	Aa	?	b	bb	bb	cc	dd	ee	ee	ee
	14	aa	A-	Aa	Aa	RE	b	bb	bb	C	dd	ee	ee	ee
	15	F	A-	AA	Aa	?	b	bb	bb	C	dd	ee	ee	ee
	16	F	aa	aa	aa	?	b	bb	bb	cc	dd	ee	ee	ee
	17	F	A-	AA	AA	?	b	bb	bb	cc	dd	ee	ee	ee
	18	F	A-	Aa	Aa	?	b	bb	bb	C	dd	ee	ee	ee
	19	F	A-	Aa	Aa	?	b	bb	bb	C	D	ee	ee	ee
	20	F	A-	Aa	Aa	?	b	bb	bb	C	dd	ee	ee	ee
	21	aa	A-	Aa	Aa	RE	b	bb	bb	cc	dd	ee	ee	ee
	22	aa	aa	aa	aa	aa	b	bb	bb	cc	dd	ee	ee	ee
	23	aa	A-	Aa	Aa	RE	b	bb	bb	cc	dd	ee	ee	ee
	24	F	A-	Aa	Aa	?	b	bb	bb	cc	dd	ee	Ee	RE

Loco A: gene S_H3; Loco B: QTL do grupo de ligação 2; Loco C: QTL do grupo de ligação 5; Loco D: gene S_H10; Loco E: gene Ck-1; RE: recombinação observada para o indivíduo; F: dado perdido; ?: não é possível afirmar o genótipo.

Tabela 3: Genotipagem das 313 plantas para 10 marcadores envolvidos na resistência de ferrugem e CBD em cafeeiros arábica.

Trat	Indiv.	BA48	BA124	SPM16	SAT244	S _H 3	CaRHv8	SSR16	QTL2	CaRHv9 - QTL5	CARF005	SAT207	SAT235	Ck-1
3	25	F	A-	AA	Aa	?	b	bb	bb	cc	dd	ee	ee	ee
	26	AA	A-	AA	AA	AA	b	bb	bb	C	dd	ee	ee	ee
	27	F	A-	AA	AA	?	b	bb	bb	C	dd	ee	ee	ee
	28	aa	Aa	aa	aa	aa	BB	BB	BB	C	D	ee	ee	ee
	29	F	A-	AA	AA	?	b	bb	bb	cc	dd	ee	ee	ee
	30	aa	Aa	aa	Aa	RE	b	bb	bb	C	dd	ee	ee	ee
	31	aa	Aa	aa	aa	aa	b	bb	bb	C	dd	ee	ee	ee
	32	F	Aa	aa	aa	?	b	F	?	cc	dd	ee	ee	ee
	33	F	A-	Aa	Aa	?	BB	F	?	cc	dd	ee	ee	ee
	34	aa	A-	Aa	Aa	RE	b	bb	bb	C	dd	ee	ee	ee
	35	F	A-	Aa	Aa	?	b	F	?	cc	dd	ee	ee	ee
4	36	aa	A-	AA	Aa	RE	b	bb	bb	cc	dd	ee	ee	ee
	37	F	F	F	aa	?	BB	F	?	cc	dd	F	ee	?
	38	F	A-	AA	aa	?	b	F	?	cc	dd	ee	ee	ee
	39	aa	Aa	aa	Aa	RE	BB	BB	BB	cc	dd	ee	ee	ee
	40	AA	A-	AA	AA	AA	b	BB	RE	cc	dd	ee	ee	ee
	41	aa	Aa	aa	aa	aa	BB	bb	RE	C	D	Ee	Ee	Ee
	42	AA	A-	AA	AA	AA	b	bb	bb	C	dd	ee	ee	ee
	43	AA	A-	AA	AA	AA	b	bb	bb	C	dd	ee	ee	ee
	44	aa	A-	AA	AA	RE	b	F	?	C	dd	ee	ee	ee
	45	F	A-	AA	AA	?	b	bb	bb	cc	dd	ee	ee	ee
	46	Aa	A-	Aa	Aa	Aa	b	bb	bb	cc	dd	ee	ee	ee
47	Aa	A-	AA	AA	RE	BB	Bb	RE	cc	D	ee	ee	ee	
5	48	aa	A-	AA	AA	RE	b	bb	bb	cc	dd	ee	ee	ee

Loco A: gene S_H3; Loco B: QTL do grupo de ligação 2; Loco C: QTL do grupo de ligação 5; Loco D: gene S_H10; Loco E: gene Ck-1; RE: recombinação observada para o indivíduo; F: dado perdido; ?: não é possível afirmar o genótipo.

Tabela 3: Genotipagem das 313 plantas para 10 marcadores envolvidos na resistência de ferrugem e CBD em cafeeiros arábica.

Trat	Indiv.	BA48	BA124	SPM16	SAT244	S _H 3	CaRHv8	SSR16	QTL2	CaRHv9 - QTL5	CARF005	SAT207	SAT235	Ck-1
5	49	AA	A-	AA	AA	AA	b	bb	bb	cc	dd	ee	ee	ee
	50	F	A-	AA	AA	?	b	bb	bb	C	dd	ee	ee	ee
	51	AA	A-	AA	AA	AA	b	bb	bb	cc	dd	ee	ee	ee
	52	AA	A-	AA	AA	AA	b	bb	bb	cc	dd	ee	ee	ee
	53	AA	A-	AA	AA	AA	b	bb	bb	C	dd	ee	ee	ee
	54	AA	A-	AA	AA	AA	b	F	?	C	dd	ee	ee	ee
	55	AA	A-	AA	AA	AA	b	bb	bb	C	dd	ee	ee	ee
	56	AA	A-	AA	AA	AA	b	bb	bb	cc	dd	ee	ee	ee
	57	AA	A-	AA	AA	AA	b	bb	bb	cc	dd	ee	ee	ee
	58	AA	A-	AA	AA	AA	b	bb	bb	C	dd	ee	ee	ee
6	59	Aa	A-	AA	AA	RE	b	bb	bb	C	dd	ee	ee	ee
	60	aa	Aa	aa	aa	aa	b	bb	bb	cc	dd	ee	ee	ee
	61	AA	A-	AA	AA	AA	b	bb	bb	C	dd	ee	ee	ee
	62	Aa	A-	Aa	Aa	Aa	b	bb	bb	C	dd	ee	ee	ee
	63	aa	A-	Aa	Aa	RE	b	bb	bb	C	dd	ee	ee	ee
	64	aa	A-	aa	Aa	RE	b	bb	bb	cc	dd	ee	ee	ee
	65	aa	A-	Aa	Aa	RE	b	bb	bb	cc	dd	ee	ee	ee
	66	aa	Aa	aa	aa	aa	b	bb	bb	cc	dd	ee	ee	ee
	67	Aa	A-	Aa	Aa	Aa	b	bb	bb	C	D	ee	ee	ee
	68	AA	A-	AA	AA	AA	b	bb	bb	C	D	ee	ee	ee
	69	aa	Aa	aa	aa	aa	b	bb	bb	C	dd	ee	ee	ee
7	70	Aa	A-	Aa	Aa	Aa	b	bb	bb	C	dd	ee	ee	ee
	71	Aa	A-	Aa	Aa	Aa	b	bb	bb	C	dd	ee	ee	ee
	72	Aa	A-	AA	AA	RE	b	bb	bb	C	dd	ee	ee	ee
	73	AA	A-	AA	AA	AA	b	bb	bb	C	dd	ee	ee	ee

Loco A: gene S_H3; Loco B: QTL do grupo de ligação 2; Loco C: QTL do grupo de ligação 5; Loco D: gene S_H10; Loco E: gene Ck-1; RE: recombinação observada para o indivíduo; F: dado perdido; ?: não é possível afirmar o genótipo.

Tabela 3: Genotipagem das 313 plantas para 10 marcadores envolvidos na resistência de ferrugem e CBD em cafeeiros arábica.

Trat	Indiv.	BA48	BA124	SPM16	SAT244	S _H 3	CaRHv8	SSR16	QTL2	CaRHv9 - QTL5	CARF005	SAT207	SAT235	Ck-1
7	74	AA	A-	AA	AA	AA	b	bb	bb	cc	dd	ee	ee	ee
	75	AA	A-	AA	AA	AA	b	bb	bb	cc	dd	ee	ee	ee
	76	Aa	A-	AA	AA	RE	b	bb	bb	C	dd	ee	ee	ee
	77	Aa	A-	AA	AA	RE	b	F	?	C	dd	ee	ee	ee
	78	AA	A-	AA	AA	AA	b	bb	bb	C	dd	ee	ee	ee
	79	aa	A-	AA	AA	RE	b	bb	bb	C	dd	ee	ee	ee
	80	AA	A-	AA	AA	AA	b	bb	bb	C	dd	ee	ee	ee
	81	AA	A-	AA	AA	AA	b	bb	bb	C	dd	ee	ee	ee
	82	AA	A-	AA	AA	AA	b	bb	bb	cc	dd	ee	ee	ee
	83	AA	A-	AA	AA	AA	b	bb	bb	C	dd	ee	ee	ee
8	84	Aa	A-	AA	AA	RE	b	bb	bb	cc	dd	ee	ee	ee
	85	Aa	A-	Aa	Aa	Aa	b	bb	bb	C	dd	ee	ee	ee
	86	aa	A-	Aa	Aa	RE	b	bb	bb	cc	D	ee	ee	ee
	87	AA	A-	AA	AA	AA	b	bb	bb	C	dd	ee	ee	ee
	88	Aa	A-	AA	Aa	RE	b	bb	bb	C	dd	ee	ee	ee
	89	AA	A-	Aa	AA	RE	b	bb	bb	C	dd	ee	ee	ee
	90	Aa	A-	Aa	Aa	Aa	b	bb	bb	C	dd	ee	ee	ee
	91	Aa	A-	AA	AA	RE	b	bb	bb	cc	D	ee	ee	ee
	92	AA	A-	AA	AA	AA	b	bb	bb	C	D	ee	ee	ee
	93	Aa	A-	Aa	Aa	Aa	b	bb	bb	C	D	ee	ee	ee
	94	aa	Aa	aa	aa	aa	b	bb	bb	C	dd	ee	ee	ee
	95	Aa	A-	AA	AA	RE	b	bb	bb	C	D	ee	ee	ee
9	96	Aa	A-	AA	AA	RE	b	bb	bb	C	dd	ee	ee	ee
	97	Aa	A-	AA	F	?	b	bb	bb	cc	dd	ee	ee	ee
	98	AA	A-	AA	AA	AA	b	bb	bb	cc	dd	ee	ee	ee

Loco A: gene S_H3; Loco B: QTL do grupo de ligação 2; Loco C: QTL do grupo de ligação 5; Loco D: gene S_H10; Loco E: gene Ck-1; RE: recombinação observada para o indivíduo; F: dado perdido; ?: não é possível afirmar o genótipo.

Tabela 3: Genotipagem das 313 plantas para 10 marcadores envolvidos na resistência de ferrugem e CBD em cafeeiros arábica.

Trat	Indiv.	BA48	BA124	SPM16	SAT244	S _H 3	CaRHv8	SSR16	QTL2	CaRHv9 - QTL5	CARF005	SAT207	SAT235	Ck-1
9	99	AA	A-	AA	AA	AA	b	bb	bb	C	dd	ee	ee	ee
	100	Aa	A-	AA	AA	RE	b	bb	bb	C	dd	ee	ee	ee
	101	Aa	A-	Aa	Aa	Aa	b	bb	bb	cc	dd	ee	ee	ee
	103	AA	A-	AA	AA	AA	b	BB	RE	C	D	ee	ee	ee
	104	AA	A-	AA	AA	AA	b	BB	RE	C	dd	ee	ee	ee
	105	AA	A-	AA	AA	AA	b	BB	RE	C	dd	ee	ee	ee
	106	Aa	A-	AA	AA	RE	b	BB	RE	C	dd	ee	ee	ee
10	107	AA	A-	AA	AA	AA	b	BB	RE	cc	dd	ee	ee	ee
	108	AA	A-	AA	AA	AA	b	BB	RE	cc	D	ee	ee	ee
	109	AA	A-	AA	AA	AA	b	BB	RE	C	dd	ee	ee	ee
	110	AA	A	AA	AA	AA	b	BB	RE	C	D	ee	ee	ee
	111	AA	A-	AA	AA	AA	b	BB	RE	cc	D	ee	ee	ee
	112	AA	A-	AA	AA	AA	b	BB	RE	cc	dd	ee	ee	ee
	113	AA	A-	AA	AA	AA	b	bb	bb	cc	dd	ee	ee	ee
	114	Aa	A-	Aa	Aa	Aa	b	bb	bb	cc	dd	ee	ee	ee
	115	AA	A-	AA	AA	AA	b	bb	bb	C	D	ee	ee	ee
	116	AA	A-	AA	AA	AA	b	bb	bb	C	D	ee	ee	ee
	117	AA	A-	AA	AA	AA	b	bb	bb	C	F	ee	ee	ee
11	118	F	A-	AA	AA	?	b	bb	bb	cc	F	ee	ee	ee
	119	AA	A-	AA	AA	AA	b	bb	bb	cc	dd	ee	ee	ee
	120	AA	A-	AA	AA	AA	b	bb	bb	C	dd	ee	ee	ee
	121	AA	A-	AA	AA	AA	b	bb	bb	C	dd	ee	ee	ee
	122	AA	A-	AA	AA	AA	b	BB	RE	C	dd	ee	ee	ee
	123	AA	A-	AA	AA	AA	b	bb	bb	cc	D	ee	ee	ee

Loco A: gene S_H3; Loco B: QTL do grupo de ligação 2; Loco C: QTL do grupo de ligação 5; Loco D: gene S_H10; Loco E: gene Ck-1; RE: recombinação observada para o indivíduo; F: dado perdido; ?: não é possível afirmar o genótipo.

Tabela 3: Genotipagem das 313 plantas para 10 marcadores envolvidos na resistência de ferrugem e CBD em cafeeiros arábica.

Trat	Indiv.	BA48	BA124	SPM16	SAT244	S _H 3	CaRHv8	SSR16	QTL2	CaRHv9 - QTL5	CARF005	SAT207	SAT235	Ck-1
11	124	AA	A-	AA	AA	AA	b	bb	bb	C	D	ee	ee	ee
	125	AA	A-	AA	AA	AA	b	bb	bb	C	dd	ee	ee	ee
	126	AA	A-	AA	AA	AA	b	bb	bb	C	D	ee	ee	ee
	127	AA	A-	AA	AA	AA	b	bb	bb	C	dd	ee	ee	ee
	128	AA	A-	AA	AA	AA	b	bb	bb	C	dd	ee	ee	ee
	129	AA	A-	AA	AA	AA	b	bb	bb	C	dd	ee	ee	ee
12	130	AA	A-	AA	AA	AA	b	bb	bb	C	dd	ee	ee	ee
	131	AA	A-	AA	AA	AA	b	bb	bb	C	dd	ee	ee	ee
	132	aa	A-	Aa	Aa	RE	b	bb	bb	C	dd	ee	ee	ee
	133	AA	A-	AA	AA	AA	b	BB	RE	C	dd	ee	ee	ee
	134	AA	A-	AA	AA	AA	b	bb	bb	C	dd	ee	ee	ee
	135	AA	A-	AA	AA	AA	b	bb	bb	C	dd	ee	ee	ee
	136	AA	A-	AA	AA	AA	b	bb	bb	C	dd	ee	ee	ee
	137	AA	A-	AA	AA	AA	b	bb	bb	C	dd	ee	ee	ee
	138	AA	A-	AA	AA	AA	b	bb	bb	C	dd	ee	ee	ee
	139	AA	A-	AA	AA	AA	b	bb	bb	C	dd	ee	ee	ee
	140	AA	A-	AA	AA	AA	b	bb	bb	C	dd	ee	ee	ee
141	AA	A-	AA	AA	AA	b	bb	bb	C	dd	ee	ee	ee	
13	142	AA	A	AA	AA	AA	b	bb	bb	cc	dd	ee	ee	ee
	143	AA	A-	AA	AA	AA	b	bb	bb	cc	dd	ee	ee	ee
	144	AA	A-	AA	AA	AA	b	bb	bb	cc	dd	ee	ee	ee
	145	AA	A-	AA	AA	AA	b	bb	bb	C	dd	ee	ee	ee
	146	Aa	A-	AA	AA	RE	b	bb	bb	cc	dd	ee	ee	ee
	147	AA	A-	AA	AA	AA	b	bb	bb	cc	dd	ee	ee	ee
	148	Aa	A-	AA	AA	RE	b	bb	bb	C	dd	ee	ee	ee

Loco A: gene S_H3; Loco B: QTL do grupo de ligação 2; Loco C: QTL do grupo de ligação 5; Loco D: gene S_H10; Loco E: gene Ck-1; RE: recombinação observada para o indivíduo; F: dado perdido; ?: não é possível afirmar o genótipo.

Tabela 3: Genotipagem das 313 plantas para 10 marcadores envolvidos na resistência de ferrugem e CBD em cafeeiros arábica.

Trat	Indiv.	BA48	BA124	SPM16	SAT244	S _H 3	CaRHv8	SSR16	QTL2	CaRHv9 - QTL5	CARF005	SAT207	SAT235	Ck-1
13	149	AA	A-	AA	AA	AA	b	bb	bb	cc	dd	ee	ee	ee
	150	AA	A-	AA	AA	AA	b	bb	bb	C	dd	ee	ee	ee
	151	AA	A-	AA	AA	AA	b	bb	bb	C	dd	ee	ee	ee
	152	AA	A-	AA	AA	AA	b	bb	bb	C	dd	ee	ee	ee
	153	AA	A-	AA	AA	AA	b	bb	bb	C	dd	ee	ee	ee
14	154	Aa	A-	Aa	AA	RE	b	bb	bb	cc	dd	ee	ee	ee
	155	AA	A-	AA	AA	AA	b	bb	bb	cc	dd	ee	ee	ee
	156	AA	A-	AA	AA	AA	b	bb	bb	cc	dd	ee	ee	ee
	157	AA	A-	AA	AA	AA	b	bb	bb	cc	dd	ee	ee	ee
	158	AA	A-	AA	AA	AA	b	bb	bb	cc	dd	ee	ee	ee
	159	AA	A-	AA	AA	AA	b	bb	bb	cc	dd	ee	ee	ee
	160	AA	A-	AA	AA	AA	b	bb	bb	C	dd	ee	ee	ee
	161	AA	A-	AA	AA	AA	b	bb	bb	cc	dd	ee	ee	ee
	162	AA	A-	AA	AA	AA	b	bb	bb	cc	dd	ee	ee	ee
	163	AA	A-	AA	AA	AA	b	bb	bb	cc	dd	ee	ee	ee
	164	AA	A-	AA	AA	AA	BB	bb	RE	C	dd	ee	ee	ee
165	AA	A-	AA	AA	AA	b	bb	bb	cc	dd	ee	ee	ee	
15	166	aa	Aa	aa	aa	aa	b	bb	bb	C	dd	ee	ee	ee
	167	Aa	A-	Aa	Aa	Aa	b	bb	bb	cc	dd	ee	ee	ee
	168	aa	Aa	aa	aa	aa	b	bb	bb	cc	dd	ee	ee	ee
	169	aa	Aa	aa	Aa	RE	b	bb	bb	cc	dd	ee	ee	ee
	170	Aa	A-	Aa	Aa	Aa	b	bb	bb	C	dd	ee	ee	ee
	171	Aa	A-	Aa	Aa	Aa	b	bb	bb	cc	dd	ee	ee	ee
	172	AA	A-	AA	AA	AA	b	bb	bb	cc	dd	ee	ee	ee
	173	Aa	A-	Aa	Aa	Aa	b	bb	bb	cc	dd	ee	ee	ee

Loco A: gene S_H3; Loco B: QTL do grupo de ligação 2; Loco C: QTL do grupo de ligação 5; Loco D: gene S_H10; Loco E: gene Ck-1; RE: recombinação observada para o indivíduo; F: dado perdido; ?: não é possível afirmar o genótipo.

Tabela 3: Genotipagem das 313 plantas para 10 marcadores envolvidos na resistência de ferrugem e CBD em cafeeiros arábica.

Trat	Indiv.	BA48	BA124	SPM16	SAT244	S _H 3	CaRHv8	SSR16	QTL2	CaRHv9 - QTL5	CARF005	SAT207	SAT235	Ck-1
15	174	AA	A-	AA	AA	AA	b	bb	bb	cc	dd	ee	ee	ee
	175	Aa	A-	Aa	Aa	Aa	b	bb	bb	cc	dd	ee	ee	ee
	176	AA	A-	AA	AA	AA	b	bb	bb	C	dd	ee	ee	ee
	177	Aa	A-	Aa	Aa	Aa	b	bb	bb	C	dd	ee	EE	RE
16	178	AA	A-	AA	AA	AA	b	bb	bb	cc	dd	ee	ee	ee
	179	AA	A-	AA	AA	AA	b	bb	bb	C	dd	ee	EE	RE
	180	AA	A	AA	AA	AA	b	bb	bb	cc	dd	ee	ee	ee
	181	AA	A-	AA	AA	AA	b	bb	bb	C	dd	ee	ee	ee
	182	AA	A-	AA	AA	AA	b	bb	bb	cc	dd	ee	ee	ee
	183	AA	A-	AA	AA	AA	b	bb	bb	C	dd	ee	ee	ee
	184	AA	A-	AA	AA	AA	b	bb	bb	cc	dd	ee	ee	ee
	185	AA	A-	AA	AA	AA	b	bb	bb	cc	dd	ee	ee	ee
	186	AA	A-	AA	AA	AA	b	bb	bb	cc	dd	ee	ee	ee
	188	AA	A-	AA	AA	AA	b	bb	bb	cc	dd	ee	ee	ee
	189	AA	A-	AA	AA	AA	b	bb	bb	cc	dd	ee	ee	ee
17	190	aa	Aa	aa	aa	aa	b	bb	bb	cc	dd	ee	ee	ee
	191	Aa	A-	Aa	Aa	Aa	b	bb	bb	cc	dd	ee	ee	ee
	192	aa	Aa	aa	aa	aa	b	bb	bb	cc	dd	ee	ee	ee
	193	Aa	A-	Aa	Aa	Aa	b	bb	bb	cc	dd	ee	ee	ee
	194	Aa	A	AA	Aa	RE	b	bb	bb	cc	dd	ee	ee	ee
	195	Aa	A-	Aa	Aa	Aa	b	bb	bb	cc	dd	ee	ee	ee
	196	AA	A-	AA	AA	AA	b	bb	bb	cc	dd	ee	ee	ee
	197	aa	Aa	aa	aa	aa	b	bb	bb	cc	dd	ee	ee	ee
	198	Aa	A-	Aa	Aa	Aa	b	bb	bb	cc	dd	ee	ee	ee
	199	Aa	A-	Aa	Aa	Aa	BB	bb	RE	cc	F	ee	ee	ee

Loco A: gene S_H3; Loco B: QTL do grupo de ligação 2; Loco C: QTL do grupo de ligação 5; Loco D: gene S_H10; Loco E: gene Ck-1; RE: recombinação observada para o indivíduo; F: dado perdido; ?: não é possível afirmar o genótipo.

Tabela 3: Genotipagem das 313 plantas para 10 marcadores envolvidos na resistência de ferrugem e CBD em cafeeiros arábica.

Trat	Indiv.	BA48	BA124	SPM16	SAT244	S _H 3	CaRHv8	SSR16	QTL2	CaRHv9 - QTL5	CARF005	SAT207	SAT235	Ck-1
17	200	Aa	A-	Aa	Aa	Aa	b	bb	bb	cc	dd	ee	ee	ee
	201	aa	Aa	aa	aa	aa	b	bb	bb	cc	dd	ee	ee	ee
18	202	aa	Aa	aa	aa	aa	BB	BB	BB	cc	dd	Ee	Ee	Ee
	203	aa	Aa	aa	aa	aa	BB	BB	BB	cc	dd	Ee	Ee	Ee
	204	aa	Aa	aa	aa	aa	BB	BB	BB	cc	dd	EE	Ee	RE
	205	aa	A-	aa	aa	RE	BB	BB	BB	cc	dd	Ee	Ee	Ee
	206	aa	Aa	aa	aa	aa	BB	BB	BB	cc	dd	Ee	Ee	Ee
	208	aa	Aa	aa	aa	aa	BB	BB	BB	cc	dd	Ee	Ee	Ee
	209	aa	Aa	aa	aa	aa	BB	BB	BB	cc	dd	Ee	Ee	Ee
	210	aa	Aa	aa	aa	aa	BB	BB	BB	cc	dd	Ee	Ee	Ee
	211	aa	Aa	aa	aa	aa	BB	BB	BB	cc	dd	Ee	Ee	Ee
	212	aa	Aa	aa	aa	aa	BB	BB	BB	cc	dd	Ee	Ee	Ee
	213	aa	Aa	aa	Aa	RE	BB	BB	BB	cc	dd	EE	Ee	RE
19	214	AA	A-	AA	AA	AA	b	bb	bb	cc	dd	ee	ee	ee
	215	AA	A-	AA	AA	AA	b	bb	bb	cc	dd	ee	ee	ee
	216	AA	A-	AA	AA	AA	b	bb	bb	cc	dd	ee	ee	ee
	217	AA	A-	AA	AA	AA	b	bb	bb	cc	dd	ee	ee	ee
	218	AA	A-	AA	AA	AA	b	bb	bb	cc	dd	ee	ee	ee
	219	AA	A-	AA	AA	AA	b	bb	bb	cc	dd	ee	ee	ee
	220	AA	A	AA	AA	AA	b	bb	bb	cc	dd	ee	ee	ee
	221	AA	A-	AA	AA	AA	b	bb	bb	cc	dd	ee	ee	ee
	222	AA	A	AA	AA	AA	b	bb	bb	cc	dd	ee	ee	ee
	223	AA	A-	AA	AA	AA	b	bb	bb	cc	dd	ee	ee	ee
	224	AA	A-	AA	AA	AA	b	bb	bb	cc	dd	ee	ee	ee
	225	AA	A-	AA	AA	AA	b	bb	bb	cc	dd	ee	ee	ee

Loco A: gene S_H3; Loco B: QTL do grupo de ligação 2; Loco C: QTL do grupo de ligação 5; Loco D: gene S_H10; Loco E: gene Ck-1; RE: recombinação observada para o indivíduo; F: dado perdido; ?: não é possível afirmar o genótipo

Tabela 3: Genotipagem das 313 plantas para 10 marcadores envolvidos na resistência de ferrugem e CBD em cafeeiros arábica.

Trat	Indiv.	BA48	BA124	SPM16	SAT244	S _H 3	CaRHv8	SSR16	QTL2	CaRHv9 - QTL5	CARF005	SAT207	SAT235	Ck-1
20	226	AA	A-	AA	AA	AA	b	bb	bb	cc	dd	ee	ee	ee
	227	AA	A	AA	AA	AA	b	bb	bb	cc	dd	ee	ee	ee
	228	AA	A-	AA	AA	AA	b	bb	bb	cc	dd	ee	ee	ee
	229	AA	A-	AA	AA	AA	b	bb	bb	cc	dd	ee	ee	ee
	230	AA	A-	AA	AA	AA	b	bb	bb	cc	dd	ee	ee	ee
	231	AA	A-	AA	AA	AA	b	bb	bb	cc	dd	ee	ee	ee
	232	AA	A-	AA	AA	AA	b	bb	bb	cc	dd	ee	ee	ee
	233	AA	A-	AA	AA	AA	b	bb	bb	cc	dd	ee	ee	ee
	234	AA	A-	AA	AA	AA	b	bb	bb	cc	dd	ee	ee	ee
	235	Aa	A-	AA	AA	RE	b	bb	bb	cc	dd	ee	ee	ee
	236	Aa	A	AA	AA	RE	b	bb	bb	cc	dd	ee	ee	ee
	237	AA	A	AA	AA	AA	b	bb	bb	cc	dd	ee	ee	ee
21	238	aa	Aa	aa	aa	aa	BB	BB	BB	cc	dd	Ee	EE	RE
	239	aa	Aa	aa	aa	aa	BB	BB	BB	cc	dd	ee	Ee	ee
	240	aa	Aa	aa	aa	aa	BB	BB	BB	cc	dd	EE	Ee	RE
	241	aa	Aa	aa	aa	aa	BB	BB	BB	cc	dd	EE	Ee	RE
	242	aa	Aa	aa	aa	aa	BB	BB	BB	cc	dd	ee	Ee	RE
	243	aa	Aa	aa	aa	aa	BB	BB	BB	cc	dd	EE	Ee	RE
	244	aa	Aa	aa	aa	aa	BB	BB	BB	cc	dd	ee	EE	RE
	245	aa	Aa	aa	aa	aa	BB	BB	BB	cc	dd	ee	Ee	RE
	246	aa	Aa	aa	Aa	RE	BB	BB	BB	cc	dd	EE	Ee	RE
	247	aa	Aa	aa	aa	aa	BB	BB	BB	cc	dd	Ee	Ee	Ee
	248	aa	Aa	aa	aa	aa	BB	BB	BB	cc	dd	ee	Ee	RE
	249	aa	Aa	aa	aa	aa	BB	BB	BB	cc	dd	ee	Ee	RE
22	250	AA	A	AA	AA	AA	b	bb	bb	cc	dd	ee	ee	ee

Loco A: gene S_H3; Loco B: QTL do grupo de ligação 2; Loco C: QTL do grupo de ligação 5; Loco D: gene S_H10; Loco E: gene Ck-1; RE: recombinação observada para o indivíduo; F: dado perdido; ?: não é possível afirmar o genótipo.

Tabela 3: Genotipagem das 313 plantas para 10 marcadores envolvidos na resistência de ferrugem e CBD em cafeeiros arábica.

Trat	Indiv.	BA48	BA124	SPM16	SAT244	S _H 3	CaRHv8	SSR16	QTL2	CaRHv9 - QTL5	CARF005	SAT207	SAT235	Ck-1
22	251	Aa	A	Aa	Aa	Aa	b	bb	bb	cc	dd	ee	ee	ee
	252	AA	A	AA	AA	AA	b	bb	bb	cc	dd	ee	ee	ee
	253	AA	A	AA	AA	AA	b	bb	bb	C	dd	ee	ee	ee
	254	AA	A	AA	AA	AA	b	bb	bb	cc	dd	ee	ee	ee
	255	Aa	A	Aa	Aa	Aa	b	bb	bb	cc	dd	ee	ee	ee
	256	AA	A	AA	AA	AA	b	bb	bb	cc	dd	ee	ee	ee
	257	AA	A	AA	AA	AA	b	bb	bb	cc	dd	ee	ee	ee
	258	AA	A	AA	AA	AA	b	bb	bb	cc	dd	ee	ee	ee
	259	AA	A	AA	AA	AA	b	bb	bb	cc	dd	ee	ee	ee
	260	Aa	A	Aa	Aa	Aa	b	bb	bb	cc	dd	ee	ee	ee
	261	AA	A	AA	AA	AA	b	bb	bb	cc	dd	ee	ee	ee
23	262	AA	A	AA	AA	AA	b	bb	bb	cc	dd	ee	ee	ee
	263	AA	A	AA	AA	AA	b	bb	bb	cc	dd	ee	ee	ee
	264	Aa	A	Aa	Aa	Aa	b	bb	bb	C	dd	Ee	Ee	Ee
	265	AA	A	AA	AA	AA	b	bb	bb	C	dd	ee	ee	ee
	266	AA	A	AA	AA	AA	b	bb	bb	cc	dd	ee	ee	ee
	267	AA	A	AA	AA	AA	b	bb	bb	cc	dd	ee	ee	ee
	268	Aa	A	Aa	Aa	Aa	b	bb	bb	cc	dd	ee	ee	ee
	269	AA	A	AA	AA	AA	b	bb	bb	cc	dd	ee	ee	ee
	270	AA	A	AA	AA	AA	b	bb	bb	cc	dd	ee	ee	ee
	271	Aa	A	AA	AA	RE	b	bb	bb	cc	dd	ee	ee	ee
	272	AA	A	AA	AA	AA	b	bb	bb	cc	dd	ee	ee	ee
	273	AA	A	AA	AA	AA	b	bb	bb	cc	dd	F	ee	?
24	274	AA	A	AA	AA	AA	b	bb	bb	C	dd	ee	ee	ee
	275	AA	A	AA	AA	AA	b	bb	bb	C	dd	ee	ee	ee

Loco A: gene S_H3; Loco B: QTL do grupo de ligação 2; Loco C: QTL do grupo de ligação 5; Loco D: gene S_H10; Loco E: gene Ck-1; RE: recombinação observada para o indivíduo; F: dado perdido; ?: não é possível afirmar o genótipo.

Tabela 3: Genotipagem das 313 plantas para 10 marcadores envolvidos na resistência de ferrugem e CBD em cafeeiros arábica.

Trat	Indiv.	BA48	BA124	SPM16	SAT244	S _H 3	CaRHv8	SSR16	QTL2	CaRHv9 - QTL5	CARF005	SAT207	SAT235	Ck-1
24	276	AA	A	AA	AA	AA	b	bb	bb	C	dd	ee	ee	ee
	277	AA	A	AA	AA	AA	b	bb	bb	C	dd	ee	ee	ee
	278	AA	A	AA	AA	AA	b	bb	bb	cc	dd	ee	ee	ee
	279	Aa	A	Aa	Aa	Aa	b	bb	bb	cc	dd	ee	ee	ee
	280	AA	A	AA	AA	AA	b	bb	bb	cc	dd	ee	ee	ee
	281	AA	A	AA	AA	AA	b	bb	bb	cc	dd	ee	ee	ee
	282	AA	A	AA	AA	AA	b	bb	bb	cc	dd	ee	ee	ee
	283	AA	A	AA	F	?	b	bb	bb	cc	dd	ee	ee	ee
25	284	AA	A	AA	AA	AA	b	bb	bb	C	dd	ee	ee	ee
	285	Aa	A	AA	Aa	RE	b	bb	bb	cc	dd	ee	ee	ee
	286	Aa	A	Aa	Aa	Aa	b	bb	bb	cc	dd	ee	ee	ee
	287	aa	Aa	aa	aa	aa	b	bb	bb	C	dd	ee	ee	ee
	288	aa	Aa	aa	aa	aa	b	bb	bb	C	dd	ee	ee	ee
	289	Aa	A	Aa	Aa	Aa	b	bb	bb	C	dd	ee	ee	ee
	290	Aa	A	Aa	Aa	Aa	b	bb	bb	C	dd	ee	ee	ee
	291	aa	A	aa	aa	RE	b	bb	bb	C	dd	ee	ee	ee
	292	Aa	A	AA	Aa	RE	b	bb	bb	C	dd	ee	ee	ee
	293	Aa	A	Aa	Aa	Aa	b	bb	bb	C	dd	ee	ee	ee
	294	Aa	A	Aa	Aa	Aa	b	bb	bb	C	dd	ee	ee	ee
	295	Aa	A	AA	Aa	RE	b	bb	bb	C	dd	ee	ee	ee
26	296	Aa	A	AA	AA	RE	b	bb	bb	C	dd	ee	ee	ee
	297	AA	A	AA	AA	AA	b	bb	bb	C	dd	ee	ee	ee
	298	AA	A	AA	AA	AA	b	bb	bb	C	dd	ee	ee	ee
	299	Aa	A	AA	AA	RE	b	bb	bb	C	dd	ee	ee	ee
	300	AA	A	AA	AA	AA	b	bb	bb	C	dd	ee	ee	ee

Loco A: gene S_H3; Loco B: QTL do grupo de ligação 2; Loco C: QTL do grupo de ligação 5; Loco D: gene S_H10; Loco E: gene Ck-1; RE: recombinação observada para o indivíduo; F: dado perdido; ?: não é possível afirmar o genótipo.

Tabela 3: Genotipagem das 313 plantas para 10 marcadores envolvidos na resistência de ferrugem e CBD em cafeeiros arábica.

Trat	Indiv.	BA48	BA124	SPM16	SAT244	S _H 3	CaRHv8	SSR16	QTL2	CaRHv9 - QTL5	CARF005	SAT207	SAT235	Ck-1
26	301	AA	A	AA	AA	AA	b	bb	bb	C	dd	ee	ee	ee
	302	AA	A	AA	AA	AA	b	bb	bb	C	dd	ee	ee	ee
	303	Aa	A	Aa	Aa	Aa	b	bb	bb	C	dd	ee	ee	ee
	304	Aa	A	AA	AA	RE	b	bb	bb	cc	dd	ee	ee	ee
	305	AA	A	AA	AA	AA	b	bb	bb	C	dd	ee	ee	ee
	306	Aa	A	Aa	Aa	Aa	b	bb	bb	C	dd	ee	Ee	RE
	307	AA	A	AA	AA	AA	b	bb	bb	cc	dd	ee	ee	ee
27	308	aa	Aa	aa	aa	aa	b	bb	bb	cc	dd	ee	ee	ee
	309	aa	Aa	aa	aa	aa	b	F	?	C	dd	ee	ee	ee
	310	aa	Aa	Aa	aa	RE	b	F	?	C	dd	ee	ee	ee
28	311	aa	Aa	Aa	aa	RE	BB	F	?	cc	dd	ee	ee	ee
	312	aa	Aa	Aa	aa	RE	BB	BB	BB	C	dd	ee	ee	ee
	313	aa	Aa	Aa	aa	RE	BB	F	?	C	dd	Ee	Ee	Ee

Loco A: gene S_H3; Loco B: QTL do grupo de ligação 2; Loco C: QTL do grupo de ligação 5; Loco D: gene S_H10; Loco E: gene Ck-1; RE: recombinação observada para o indivíduo; F: dado perdido; ?: não é possível afirmar o genótipo.

Analisando em conjunto a amplificação para os quatro marcadores, 238 indivíduos (76,04%) apresentaram genótipo confirmado a presença do gene S_{H3} . Do total de cafeeiros analisados, 157 indivíduos (65,97%) apresentaram o alelo do gene S_{H3} em homozigose (AA), 40 em heterozigose (Aa) e 41 não continham o alelo de resistência (aa). Dos 75 indivíduos restantes, 53 apresentaram recombinação entre os marcadores e 22 apresentaram perdas de dados para algum marcador (F).

Os indivíduos 3, 9, 47, 59, 72, 76, 77, 84, 91, 95, 96, 100, 106, 146, 148, 235, 236, 271, 296, 299 e 304 para o marcador BA-48-21O-f foram heterozigoto (Aa) para o gene S_{H3} e para os outros marcadores codominantes foram homozigotos (AA). Esse mesmo marcador para os indivíduos 14, 21, 23, 34, 36, 44, 48, 63, 65, 79, 86 e 132 não apresentaram o alelo do gene S_{H3} (aa) e os demais marcadores apresentaram pelo menos um alelo do gene.

Outra recombinação foi observada para o marcador Sat244 nos indivíduos 30, 39, 169, 213 e 246, no qual foram heterozigotos para o gene S_{H3} (Aa), enquanto os demais marcadores o genótipo foi aa. Além disso, o indivíduo 154, para esse marcador, foi homozigoto (AA) e os demais marcadores codominantes foram heterozigoto (Aa).

Recombinação no marcador SP-M16-SH3 foi observado nos indivíduos 88, 194, 285, 292 e 295 que apresentaram o alelo do gene S_{H3} em homozigose (AA), diferindo dos outros marcadores. Esse marcador para o indivíduo 89 foi heterozigoto (Aa), mas para os outros marcadores codominantes foi homozigoto (AA). Nos indivíduos 310, 311, 312 e 313 o genótipo obtido com esse marcador foi Aa e para os demais aa.

Recombinação também foi observada para o BA-124-12K-f nos indivíduos 205 e 291, no qual apresentaram o alelo do gene S_{H3} ($A_{_}$), no entanto para os demais marcadores o gene não se encontrava (aa).

No indivíduo 12, os marcadores SP-M16-SH3 e Sat244 identificaram o alelo do gene S_{H3} em homozigose (AA), porém para BA-124-12K-f e BA-48-21O-f foi recessivo (aa). Semelhante a esse resultado, o indivíduo 64 para os marcadores BA-124-12K-f e Sat244 foi identificado o alelo do gene S_{H3} ($A_{_}$), mas para BA-48-21O-f e SP-M16-SH3 foi recessivo (aa).

Analisando os grupos de cruzamento, observou-se que os tratamentos 16 e 19 todos os indivíduos foram homozigotos para o gene S_{H3} (AA). Os tratamentos 9, 10, 11, 12, 13, 14, 20, 22, 23 e 24 a maioria dos indivíduos pertencentes a esses grupos de cruzamentos foram $A_{_}$. Entretanto, todos os indivíduos dos tratamentos 18, 21, 27 e 28 foram suscetíveis (aa).

Amplificação de marcadores ligados aos QTL de resistência as raças I, raça II e ao patótipo 001 de H. vastatrix (Loco B e C)

A análise do loco B foi realizada por meio de marcadores ligados ao QTL do grupo de ligação 2 (QTL-GL2) CaRHv8 (Almeida et al., 2021) e SSR16 (Combes et al., 2000). O CaRHv8 apresenta padrão dominante, em repulsão, marcando somente um alelo recessivo (b), portanto, a presença da marca identifica indivíduos Bb e bb, porém não é possível diferenciá-los, enquanto a ausência dela identifica os indivíduos BB. Por outro lado, o SSR16 com padrão de banda codominante, identifica indivíduos homocigotos e heterocigotos (BB, Bb e bb). Nesse sentido, a análise em conjunto desses marcadores permite a identificação dos heterocigotos (Bb) com maior precisão.

Dessa forma, foram identificados 256 indivíduos (81,79%) com genótipo bb, 27 em homocigose (BB), 18 recombinação entre os marcadores e 12 dados perdidos para o marcador SSR16 (Tabela 3). Analisando o CaRHv8, 278 indivíduos apresentaram um alelo b e 35 em homocigose (BB). Avaliando os tratamentos, observou-se todos os indivíduos dos tratamentos 18 (Catiguá MG2) e 21 (Araponga MG2) apresentaram o alelo de resistência para o QTL-GL2.

A recombinação nos indivíduos 40, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 122 e 133 apresentaram o genótipo em homocigose (BB) com o SSR16 e para o CaRHv8 o alelo b. Os indivíduos 41, 164 e 199 para o SSR16 não apresentou o alelo de resistência (bb), porém para o CaRHv8 o genótipo foi em homocigose (BB). O indivíduo 47, para ambos os marcadores apresentou o alelo de resistência, porém para o CaRHv8 foi homocigoto (BB) e o SSR16 heterocigoto (Bb).

Para o loco C, o marcador CaRHv9 ligado ao QTL do grupo de ligação 5 foi utilizado. Esse marcador é dominante em acoplamento, portanto, não é possível diferenciar os indivíduos homocigotos dos heterocigotos. Dessa forma, a presença do alelo de resistência (C_) foi identificado em 131 indivíduos (41,85%) e 182 não apresentaram o alelo de resistência (cc) (Tabela 3).

Amplificação de marcador ligado ao gene SH10 potencialmente envolvido na resistência a H. vastatrix (Loco D)

Para obter resistência durável e identificar vários locos de resistência à ferrugem, o marcador CARF005 também foi analisado. O CARF005 é um marcador de análogo de gene de resistência (RGA) (Barka et al. 2020; Alzate-Marin et al. 2005) associado a outros loci que

conferem resistência a *H. vastatrix*. Por ser um marcador dominante, permite a identificação dos genótipos D_ e dd.

Por meio da análise de eletroforese capilar, os dados genotípicos mostraram que 290 indivíduos (92,65%) não apresentam o alelo de resistência (dd), 20 apresentam o alelo de resistência (D_) e três dados perdidos (Tabela 3).

Amplificação de marcadores ligado ao gene Ck-1 de resistência a C. kahawae (Loco E)

Na avaliação da resistência das plantas, os marcadores moleculares CBD-Sat207 e CBD-Sat235 (loco E) associados a resistência a CBD foram incluídos na abordagem da SAM. Esses marcadores são codominantes, portanto, permite a identificação dos homozigotos e heterozigotos.

Na genotipagem dos 313 indivíduos, para CBD-Sat207, 290 (92,65%) apresentaram genótipo ee, 15 (Ee), seis (EE) e dois dados perdidos. Para o marcador CBD-Sat235, 282, 27 e quatro indivíduos apresentaram o genótipo ee, Ee e EE, respectivamente (Tabela 3). Portanto, recombinação entre os marcadores foram observadas em 16 indivíduos. Os indivíduos 24, 242, 245, 248, 249 e 306 apresentaram o genótipo Ee para o marcador CBD-Sat235 e ee para o marcador CBD-Sat207. Os indivíduos 177, 179 e 244 apresentaram o genótipo EE (CBD-Sat235), porém ee para CBD-Sat207. O marcador CBD-Sat207 nos indivíduos 204, 213, 240, 241, 243 e 246 foram EE, enquanto o CBD-Sat235 foram Ee. O indivíduo 238, apresentou genótipo Ee (CBD-Sat207) e EE (CBD-Sat235).

Avaliando os tratamentos observou-se que todos os indivíduos da cultivar Catiguá MG2 e 50% dos indivíduos da cultivar Araponga MG2 apresentaram o alelo do gene *Ck-1* (A_). E em 24 tratamentos todos os indivíduos foram suscetíveis ao fungo.

Piramidação dos alelos dos genes de resistência de H. vastatrix e C. kahawae

O monitoramento dos alelos dos genes por meio de marcadores moleculares permitiu a identificação de pirâmide de genes de diferentes locos de resistência em um indivíduo. Dessa forma, 134 indivíduos (42,81%) apresentaram mais de um alelo de resistência com diferentes combinações (Tabela 4).

Os indivíduos 28, 41, 47, 67, 68, 92, 93, 95, 103, 110, 115, 124, 126 e 264 apresentaram piramidação tripla, e os demais apresentaram dupla piramidação. Sendo que dessa piramidação dupla, 77,69% dos indivíduos são do genótipo (A_bbC_ddee), ou seja, apresentam o alelo de resistência do gene *S_{H3}* e o QTL/GL5, ambos envolvidos na resistência a *H. vastatrix*.

Tabela 4. Piramidação de alelos de genes de resistência para ferrugem e CBD em cafeeiros arábica.

Ind.	Genótipo	Ind.	Genótipo	Ind.	Genótipo	Ind.	Genótipo
2	AabbC_ddee	102	AAbbC_ddee	177	AabbC_ddee	312	aaBBC_ddee
3	A_bbC_ddee	104	AAbbC_ddee	179	AAbbC_ddee	202	aaBBccddEe
7	AabbC_ddee	105	AAbbC_ddee	181	AAbbC_ddee	203	aaBBccddEe
9	A_bbC_ddee	106	A_bbC_ddee	183	AAbbC_ddee	204	aaBBccddE_
10	AabbC_ddee	109	AAbbC_ddee	265	AAbbC_ddee	205	aaBBccddEe
11	AAbbC_ddee	117	AAbbC_?ee	274	AAbbC_ddee	206	aaBBccddEe
26	AAbbC_ddee	120	AAbbC_ddee	275	AAbbC_ddee	207	aaBBccddEe
42	AAbbC_ddee	121	AAbbC_ddee	276	AAbbC_ddee	208	aaBBccddEe
43	AAbbC_ddee	122	AAbbC_ddee	277	AAbbC_ddee	209	aaBBccddEe
53	AAbbC_ddee	125	AAbbC_ddee	284	AAbbC_ddee	210	aaBBccddEe
54	AA?C_ddee	127	AAbbC_ddee	289	AabbC_ddee	211	aaBBccddEe
55	AAbbC_ddee	128	AAbbC_ddee	290	AabbC_ddee	212	aaBBccddEe
58	AAbbC_ddee	129	AAbbC_ddee	292	A_bbC_ddee	213	aaBBccddE_
59	A_bbC_ddee	130	AAbbC_ddee	293	AabbC_ddee	238	aaBBccddE_
61	AAbbC_ddee	131	AAbbC_ddee	294	AabbC_ddee	240	aaBBccddE_
62	AabbC_ddee	133	AAbbC_ddee	295	A_bbC_ddee	241	aaBBccddE_
70	AabbC_ddee	134	AAbbC_ddee	296	A_bbC_ddee	243	aaBBccddE_
71	AabbC_ddee	135	AAbbC_ddee	297	AAbbC_ddee	246	aaBBccddE_
72	A_bbC_ddee	136	AAbbC_ddee	298	AAbbC_ddee	247	aaBBccddEe
73	AAbbC_ddee	137	AAbbC_ddee	299	A_bbC_ddee	28	aaBBC_D_ee
76	A_bbC_ddee	138	AAbbC_ddee	300	AAbbC_ddee	41	aabbC_D_Ee
77	A_?C_ddee	139	AAbbC_ddee	301	AAbbC_ddee	47	A_B_ccD_ee
78	AAbbC_ddee	140	AAbbC_ddee	302	AAbbC_ddee	67	AabbC_D_ee
80	AAbbC_ddee	141	AAbbC_ddee	303	AabbC_ddee	68	AAbbC_D_ee
81	AAbbC_ddee	145	AAbbC_ddee	305	AAbbC_ddee	92	AAbbC_D_ee
83	AAbbC_ddee	148	A_bbC_ddee	306	AabbC_ddee	93	AabbC_D_ee
85	AabbC_ddee	150	AAbbC_ddee	91	A_bbccD_ee	95	A_bbC_D_ee
87	AAbbC_ddee	151	AAbbC_ddee	108	AAbbccD_ee	103	AAbbC_D_ee
88	A_bbC_ddee	152	AAbbC_ddee	111	AAbbccD_ee	110	AAbbC_D_ee
89	A_bbC_ddee	153	AAbbC_ddee	116	AAbbccD_ee	115	AAbbC_D_ee
90	AabbC_ddee	160	AAbbC_ddee	123	AAbbccD_ee	124	AAbbC_D_ee
96	A_bbC_ddee	164	AAbbC_ddee	19	?bbC_D_ee	126	AAbbC_D_ee
99	AAbbC_ddee	170	AabbC_ddee	264	AabbC_ddEe		-----
100	A_bbC_ddee	176	AAbbC_ddee	313	aa?C_ddEe		-----

Loco A: gene S_{H3} ; Loco B: QTL do grupo de ligação 2; Loco C: QTL do grupo de ligação 5; Loco D: gene S_{H10} ; Loco E: gene $Ck-1$; Ind.: Indivíduo analisado; ?: Genótipo não confirmado para o alelo do gene correspondente.

DISCUSSÃO

Atualmente, a utilização de defensivos agrícolas como única forma de controle vem sendo substituída por outras estratégias, dentre elas, tem-se o uso de cultivares resistentes (Almeida et al., 2021). No caso do café, o desenvolvimento de uma nova variedade é desafiador, pois o método tradicional leva cerca de 25 a 30 anos devido à natureza perene dessa cultura (Moncada et al. 2016). Nesse contexto, a SAM quando adotada no processo de melhoramento genético de novas variedades, reduz drasticamente esse tempo (Gimase et al., 2020).

Marcadores associados ao gene S_{H3} foram analisados nos indivíduos e mais de 75% da população apresentaram esse gene. No Brasil, o gene S_{H3} na forma dominante é o único gene conhecido que ainda não foi suplantado, o que mostra a importância de incorporar esse gene nas cultivares melhoradas. Cultivares contendo esse gene podem ser infectadas apenas pela raça que possui o gene de virulência v_3 , no entanto, as raças de *H. vastatrix* até então identificadas no Brasil ainda não possuem esse gene (Zambolim & Caixeta, 2021).

O gene S_{H3} foi identificado em *C. liberica* (Prakash et al., 2004) e introgridido em *C. arabica* por híbridos naturais interespecíficos. Como as populações analisadas no presente trabalho são derivadas desses híbridos, a presença de indivíduos contendo o gene era esperado. Além disso, alguns dos materiais genéticos analisados foram caracterizados como resistentes em gerações anteriores por Alkimim et al. (2017). Da mesma forma que era de se esperar, que as cultivares comerciais não apresentassem o gene S_{H3} , pois a espécie *C. liberica* não faz parte de suas genealogias.

Alkimim et al. (2017) demonstraram a eficiência desses marcadores na seleção de plantas contendo o gene S_{H3} , por meio da identificação de cafeeiros em plantas derivadas de cruzamentos com *C. liberica*. Gutiérrez-Calle et al. (2021) utilizando alguns desses marcadores, ressaltaram a importância deles no monitoramento do gene nos programas de melhoramento. O monitoramento do gene S_{H3} nos indivíduos, no presente trabalho, permitiu a identificação de recombinantes para os quatro marcadores. A recombinação nos marcadores BA-48-21OR e SP-M16-SH3 pode ser explicada pela distância do marcador e o gene de resistência S_{H3} . De acordo com Mahé et al. (2008), esses marcadores estão localizados a uma distância de 0,6 cM e 1,8 cM, respectivamente. Para os marcadores Sat244 e BA-124-12K-f, Alkimim et al. (2017) explicaram que a distância desses marcadores pode variar dependendo da população em estudo e do número de indivíduos avaliados. Portanto, para evitar a perda do gene de resistência, consideramos como plantas contendo o alelo de resistência S_{H3} , apenas os indivíduos com os quatro marcadores.

Ao longo dos anos, vários cultivares foram desenvolvidos com resistência a ferrugem, no entanto, a essa resistência foi suplantada devido ao surgimento de novas raças. Atualmente mais de 50 raças fisiológicas de *H. vastatrix* foram identificadas no mundo e a raça II é a mais comum e difundida em todo o mundo (Zambolim & Caixeta, 2021). Almeida et al. (2021) desenvolveram marcadores com alta eficiência de seleção de café com resistência a *H. vastatrix*. Os marcadores do QTL/GL2 identificaram poucos indivíduos apresentando o alelo de resistência e o marcador do QTL/GL5 permitiu a identificação de mais indivíduos com o alelo de resistência. As cultivares Catiguá MG2 e Araponga MG2 apresentaram o alelo de resistência, devido o Híbrido de Timor fazer parte do *background* desses indivíduos. Por outro lado, a baixa quantidade de indivíduos apresentando os alelos desses genes nas populações analisadas, pode estar relacionado a origem desses materiais, pois não apresentam Híbrido de Timor em sua genealogia. No entanto, segundo Pestana et al. (2015) e Almeida et al. (2021), a resistência é controlada por dois QTL dominantes e independentes, ou seja, a presença de um alelo dominante em um dos locos garante a resistência do genótipo às raças I, II e patótipo 001 de *H. vastatrix*. Dessa forma, a quantidade de indivíduos resistentes a esses patótipos acabam sendo em maior quantidade. Com relação a recombinação para os marcadores do QTL/GL2, pode ser explicada pela distância entre os marcadores para o QTL. No mapa de ligação a distância entre esses marcadores para o QTL é de 1,5 cM (Almeida et al., 2021), apesar de ser uma distância pequena, pode haver uma baixa recombinação.

O melhoramento de plantas tem buscado combinar diferentes formas de resistência simultaneamente, piramidando vários genes que cobrem uma gama diversificada de mecanismos de resistência (Silva et al., 2022). Nesse sentido, o marcador CARF005 foi utilizado, pois compartilha sequências conservadas com outros genes de resistência a ferrugem e apresenta um alelo polimórfico característico que confere diferentes fenótipos de resistência (Barka et al., 2020), além disso, constitui um loco diferente dos QTL (Almeida et al., 2021). Porém, este gene de resistência a ferrugem foi detectado em poucos indivíduos. A provável explicação, seria a descendência desse gene, pois veio do *C. canephora* (Barka et al., 2020), e os indivíduos estudados são originados de cruzamentos de *C. arabica* x *C. liberica*.

Uma outra preocupação dos melhoristas para os cafeeiros arábica, especialmente no Brasil, é com relação a doença CBD. O fungo *C. kahawae* é altamente agressivo e especializado em infectar bagas de café verde (Cui et al., 2020) levando a perdas de produtividade expressivas. Por ser restrita na África, a identificação de genótipos resistentes no Brasil, se dá por meio de marcadores moleculares desenvolvidos por (Gichuru et al., 2008) e validado por

(Alkimim et al. 2017). O gene *Ck-1* foi identificado em acessos Híbrido de Timor (Gichuru et al., 2008; Silva et al., 2018), isso explica a presença do gene *Ck-1* em alguns indivíduos, principalmente nas cultivares Catiguá MG2 e Araponga MG2. Assim como Alkimim et al. (2017), também observamos materiais genéticos originados de Seleção Indiana contendo esse gene.

CONCLUSÕES

Plantas de café portadoras de diferentes genes de resistência à ferrugem e CBD foram identificadas neste estudo. As informações geradas neste trabalho são úteis para o melhoramento genético do cafeeiro no desenvolvimento de cultivares com múltipla resistência, em especial para o melhoramento preventivo para CBD. Além disso, é possível selecionar plantas conforme o interesse do melhorista ou descartar que foram suscetíveis. A utilização de marcadores moleculares em gerações precoces é eficiente em selecionar materiais contendo genes de resistência.

REFERÊNCIAS

- Alkimim ER, Caixeta ET, Sousa TV, Pereira, A.A.; de Oliveira, A.C.B.; Zambolim, L.; Sakiyama, N.S. Marker-assisted selection provides arabica coffee with genes from other *Coffea* species targeting on multiple resistance to rust and coffee berry disease. *Mol. Breed.* 2017, 37, 6.
- Almeida DP, Caixeta ET, Moreira KF, de Oliveira ACB, de Freitas KNP, Pereira AA, Rosado RDS, Zambolim L, Cruz CD (2021) Marker-Assisted Pyramiding of Multiple Disease Resistance Genes in Coffee Genotypes (*Coffea arabica*). *Agronomy*, 11(9):1763. <https://doi.org/10.3390/agronomy11091763>
- Alvarenga, S. M., Caixeta, E. T., Hufnagel, B., Thiebaut, F., Maciel-Zambolim, E., Zambolim, L., Sakiyama, N. S. (2011). Molecular markers from coffee genome expressed sequences potentially involved in resistance to rust. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, 46(8), 890–898. <https://doi.org/10.1590/s0100-204x2011000800015>
- Alzate-Marin AL, Cervigni GD, Moreira MA, Barros EG. Seleção assistida por marcadores moleculares visando ao desenvolvimento de plantas resistentes a doenças, com ênfase em feijoeiro e soja. *Fitopatol. Bras.* 2005, 30, 333–342.
- Avelino A, Cristancho M, Georgiou S, Imbach P, Aguilar L, Bornemann G, Läderach P, Anzueto F, Hruska A J, Morales C (2015) The coffee rust crises in Colombia and Central

- America (2008–2013): impacts, plausible causes and proposed solutions. *Food Security* 7(2):303-321. doi: 10.1007/s12571-015-0446-9.
- Barka GD, Caixeta ET, Ferreira SS, Zambolim L (2020) In silico guided structural and functional analysis of genes with potential involvement in resistance to coffee leaf rust: A functional marker based approach. *PLoS ONE.*, 15, e0222747
- Bettencourt AJ & Noronha-Wagner M (1971) Genetic factors conditioning resistance of *Coffea arabica* L. to *Hemileia vastatrix* Berk & Br. *Agron. Lusit.*, 31, 285–292.
- Bettencourt AJ & Rodrigues CJ (1988) Principles and practice of coffee breeding for resistance to rust and other diseases. *Coffee Agron.*, 4, 199–234.
- Brito GG, Caixeta ET, Gallina AP, Maciel-Zambolim E, Zambolim L, Diola V, Loureiro ME (2010) Inheritance of coffee leaf rust resistance and identification of AFLP markers linked to the resistance gene. *Euphytica*, 173:255-264.
- Cabral A, Azinheira HG, Talhinhos P, Batista D, Ramos AP, Silva MdC, Oliveira H, Várzea V. Pathological, Morphological, Cytogenomic, Biochemical and Molecular Data Support the Distinction between *Colletotrichum cigarro* comb. et stat. nov. and *Colletotrichum kahawae*. *Plants*. 2020; 9(4):502. <https://doi.org/10.3390/plants9040502>
- Combes MC, Andrzejewski S, Anthony F, Bertrand B, Rovelli P, Graziosi G, Lashermes P (2000) Characterization of microsatellite loci in *Coffea arabica* and related coffee species. *Molecular Ecology*, 9(8), 1178–1180. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2000.00954-5.x>
- Cui L, Hanika K, Visser RGF, Bai Y. Improving Pathogen Resistance by Exploiting Plant Susceptibility Genes in Coffee (*Coffea* spp.). *Agronomy*. 2020; 10(12):1928. <https://doi.org/10.3390/agronomy10121928>
- Davis AP, Tosh J, Ruch N, Fay MF (2011) Growing coffee: *Psilanthus* (Rubiaceae) subsumed on the basis of molecular and morphological data; implications for the size, morphology, distribution and evolutionary history of *Coffea*. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 167(4), 357–377. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.2011.01177.x>
- Diniz I, Figueiredo A, Loureiro A, Batista D, Azinheira H, Várzea V, Pereira AP, Gichuru E, Moncada P, Guerra-Guimarães L, Oliveira H (2017). A first insight into the involvement of phytohormones pathways in coffee resistance and susceptibility to *Colletotrichum kahawae*. *PLoS ONE* 12(5):e0178159.
- Gichuru EK, Agwanda CO, Combes MC, Mutitu EW, Ngugi ECK, Bertrand B, Lashermes P (2008) Identification of molecular markers linked to a gene conferring resistance to coffee berry disease (*Colletotrichum kahawae*) in *Coffea arabica*. *Plant Pathol.*, 57, 1117–1124.

- Giddisa G (2016). A Review on the Status of Coffee Berry Disease (*Colletotrichum kahawae*) in Ethiopia. *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare* 6(19):140-151.
- Gimase JM, Thagana WM, Omondi CO, Cheserek JJ, Gichuru EK (2021) Genetic relationship and the occurrence of multiple gene resistance to coffee berry disease (*Colletotrichum kahawae*, Waller & Bridge) within selected *Coffea arabica* varieties in Kenya. *African Journal of Plant Science*, 15(1), 39-48.
- Gimase JM, Thagana WM, Omondi CO, Cheserek JJ, Gichimu BM, Gichuru EK (2020) Quantitative trait loci (QTL) mapping of resistance to coffee berry disease (*Colletotrichum kahawae* Waller & Bridge) in *Coffea arabica* L. variety Rume Sudan. *African Journal of Agricultural Research*, 16(8), 1184-1194. DOI: 10.5897/AJAR2020.14842
- Gutiérrez-Calle, Savina A., Sánchez-Díaz, Rosa A., Delgado-Silva, Yolanda B., Montenegro, Juan D., Gutiérrez, Dina L., Maicelo-Quintana, Jorge L., & Guerrero-Abad, Juan C (2021). Capillary electrophoresis as a tool for genotyping SH3 mediated coffee leaf rust resistance. *Scientia Agropecuaria*, 12(1), 91-99. <https://dx.doi.org/10.17268/sci.agropecu.2021.011>
- Jaber EHA, Srour AY, Zambounis AG, Vakalounakis DJ, Doulis AG (2020) Identification of SCAR markers linked to the Foc gene governing resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* in *cucumber* cv. SMR-18. *Eur. J. Plant Pathol.*, 157, 845–855.
- Mahé L, Combes MC, Várzea VMP, Guilhaumon C, Lashermes P (2008) Development of sequence characterized DNA markers linked to leaf rust (*Hemileia vastatrix*) resistance in coffee (*Coffea arabica* L.). *Mol. Breed.*, 21, 105–113.
- Moncada MDP, Tovar E, Montoya JC, González A, Spindel J, McCouch S (2016) A genetic linkage map of coffee (*Coffea arabica* L.) and QTL for yield, plant height, and bean size. *Tree Genet. Genomes*, 12(5).
- Pestana KN, Capucho AS, Caixeta ET, de Almeida DP, Zambolim EM, Cruz CD, Zambolim L, Pereira AA, de Oliveira ACB, Sakiyama NS (2015) Inheritance study and linkage mapping of resistance loci to *Hemileia vastatrix* in Híbrido de Timor UFV 443-03. *Tree Genet. Genomes*, 11.
- Prakash NS, Marques DV, Varzea VMP, Silva MC, Combes MC, Lashermes P (2004) Introgression molecular analysis of a leaf rust resistance gene from *Coffea liberica* into *C. arabica* L. *Theor. Appl. Genet.*, 109, 1311–1317.
- Silva R, Zambolim L, Castro ISL, Rodrigues HS, Cruz C, Caixeta ET (2018) The Híbrido de Timor germplasm: identification of molecular diversity and resistance sources to coffee berry disease and leaf rust. *Euphytica*, 214(153) <https://doi.org/10.1007/s10681-018-2231-2>

- Setotaw TA, Caixeta ET, Zambolim EM, Sousa TV, Pereira AA, Baião AC, Cruz CD, Zambolim L, Sakiyama NS (2020). Genome Introgression of Híbrido de Timor and Its Potential to Develop High Cup Quality C. Arabica Cultivars. *Journal of Agricultural Science* 12(4):64-76.
- Silva MdC, Guerra-Guimarães L, Diniz I, Loureiro A, Azinheira H, Pereira AP, Tavares S, Batista D, Várzea V (2022) An Overview of the Mechanisms Involved in Coffee-*Hemileia vastatrix* Interactions: Plant and Pathogen Perspectives. *Agronomy.*, 12(2):326. <https://doi.org/10.3390/agronomy12020326>
- Talhinhas P, Batista D, Diniz I, Vieira A, Silva DN, Loureiro A, Tavares S, Pereira AP, Azinheira HG, Guerra-Guimara L, Varzea V, Silva MDZC (2017) The coffee leaf rust pathogen *Hemileia vastatrix*: one and a half centuries around the tropics. *Molecular Plant Pathology* 18(8), 1-13. doi: 10.1111/mpp.12512
- Van der Vossen HAM, Walyaro DJ (2009) Additional evidence for oligogenic inheritance of durable host resistance to coffee berry disease (*Colletotrichum kahawae*) in Arabica coffee (*Coffea arabica* L.). *Euphytica* 165:105-111
- Van Der Vossen HAM & Walyaro DJ (1980) Breeding for resistance to coffee berry disease in *Coffea arabica* L. II. Inheritance of the resistance. *Euphytica*, 29(3), 777–791. <https://doi.org/10.1007/BF00023225>
- Zambolim, L. Current status and management of coffee leaf rust in Brazil. *Trop. plant pathol.* 41, 1–8 (2016). <https://doi.org/10.1007/s40858-016-0065-9>
- Zambolim L & Caixeta ET (2021) An overview of physiological specialization of coffee leaf rust—New designation of pathotypes. *Int. J. Curr. Res.*, 13, 15479–15490
- Waller JM, Bridge PD, Black RL, Hakiza G (1993) Differentiation of the coffee berry disease pathogen. *Mycological Research* 97:989-99

Conclusões gerais

A seleção assistida por marcadores, permitiu identificar cafeeiros resistentes a ferrugem e ao CBD separadamente e em associação com diferentes combinações. No estudo de análise de diversidade, as testemunhas foram alocadas em um grupo separado em relação a população F_2 de interesse. Nas análises dos dados fenotípicos via modelos mistos (REML/BLUP), o estudo apresentou resultados de grande valia para programas de melhoramento genético do cafeeiro, identificando genótipos promissores.