

ANA CAROLINA ANDRADE SILVA

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E FENOTÍPICA DE POPULAÇÕES DE *Coffea arabica* EM SELEÇÃO RECORRENTE

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2020**

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E FENOTÍPICA DE POPULAÇÕES DE *Coffea arabica* EM SELEÇÃO RECORRENTE

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

Orientadora: Eveline Teixeira Caixeta

Coorientadora: Dênia Pires de Almcida

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2020**

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

ANA CAROLINA ANDRADE SILVA

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E FENOTÍPICA DE POPULAÇÕES DE *Coffea arabica* EM SELEÇÃO RECORRENTE

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

APROVADA: 24 de março de 2020.

Assentimento:



Ana Carolina Andrade Silva
Autora



Eveline Teixeira Caixeta
Orientadora

**A Deus,
Minha mãe, meu pai,
Minha irmã, meu irmão e meus sobrinhos,
Meu namorado Ruan.**

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter iluminado o meu caminho, me aproximado de pessoas extraordinárias e ser fonte de fé e força.

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

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de estudo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à FINEP, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior Brasil (CAPES), ao Consorcio pesquisa café (CBP&D Café) e ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia do Café- INTC Café pelo apoio financeiro.

À Dra. Eveline Teixeira Caixeta, pela orientação, por toda paciência, ajuda e ensinamentos.

À minha Coorientadora Dra. Dênia Pires de Almeida e ao Dr. Antônio Carlos Baião, pelos ensinamentos e disponibilidade.

À minha família, em especial minha mãe Delizete, meu pai Eduardo, minha irmã Camila, meus anjos Marcus e Laurinha, e meus sobrinhos Victor, Miguel Ferreira, Miguel Teixeira e Rafael. Obrigada pelo apoio, carinho, incentivo e paciência.

Ao meu namorado Ruan, pelo incentivo diário, amor e amizade. Obrigada por sempre me lembrar que sou capaz.

Às minhas amigas Bárbara Pacheco e Sara Nacarate, que sempre me incentivaram a continuar na vida acadêmica.

À minha amiga Cris, pela companhia nas disciplinas e por me mostrar que posso ir muito além do que imagino.

À família Biocafé, por tornarem esta jornada mais leve, e por todo ensinamento e apoio. Em especial às minhas amigas Fran e Letícia, por me acolherem tão bem, não medirem esforços para me ajudar e me incentivar.

Enfim, agradeço todos que de alguma forma, contribuíram para esta conquista.

“A persistência é o menor caminho do êxito”.
(Charles Chaplin)

RESUMO

SILVA, Ana Carolina Andrade, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2020. **Caracterização molecular e fenotípica de populações de *Coffea arabica* em seleção.** Orientadora: Eveline Teixeira Caixeta. Coorientadora: Dênia Pires de Almeida.

Os principais problemas fitossanitários nas lavouras de café arábica são a ferrugem causada pelo fungo *Hemileia vastatrix* e *Coffee Berry Disease (CBD)* causada pelo fungo *Colletotrichum kahawae*, sendo uns dos principais responsáveis pela redução da produtividade do cafeeiro e qualidade de bebida. Uma forma socioambiental eficiente para o controle dessas doenças é o uso de cultivares resistentes obtidas por meio de melhoramento genético. No entanto, o melhoramento genético do cafeeiro é um processo demorado, que pode levar cerca de 25 anos para se obter uma nova cultivar. Nesse sentido, a utilização de métodos de melhoramento associados a marcadores moleculares é uma alternativa viável para acelerar o processo de desenvolvimento de novas cultivares de café. Uma das aplicações de extrema relevância dos marcadores moleculares no melhoramento genético de plantas consiste em sua utilização como ferramenta auxiliar nos procedimentos de seleção assistida por marcadores moleculares (SAM). A SAM no processo de piramidação de alelos de resistência a doenças é amplamente eficiente, uma vez que permite a seleção na ausência do patógeno, anula o efeito do ambiente, de pleiotropia e epistasia e permite a eliminação dos genótipos indesejáveis nas primeiras gerações de seleção. Desse modo, o objetivo do presente estudo foi implementar a seleção assistida no melhoramento de duas populações de *C. arabica*, C6T-10 e C6T-24, em geração F₂ de seleção recorrente. Estudo da diversidade genética e análises morfoagronômicas dessas populações também foram realizadas para auxiliar na seleção dos cafeeiros. Para tanto, DNA de 148 cafeeiros pertencente às duas populações foi extraído e amplificado com marcadores moleculares associados a genes de resistência a ferrugem e ao CBD, bem como marcadores microssatélites distribuídos aleatoriamente no genoma. Para resistência a ferrugem foram utilizados marcadores ligados a três locos, sendo dois QTL que correspondem a genes maiores de resistência as raças I, II e patótipo 001 de *H. vastatrix* e um gene RGA (*Disease Resistance Gene Analogs*). Para CBD foram utilizados dois marcadores que se encontram flanqueando o gene *Ck-1*. Os marcadores microssatélites foram usados para o estudo de diversidade genética. Os dados dos marcadores associados aos dois QTL sugerem que todos cafeeiro da população C6T-24

possuem resistência para as raças I, II e patótipo 001 de *H. vastatrix*, pois a presença de um alelo dominante em um dos dois locos é suficiente para que o indivíduo seja resistente. O gene RGA associado a resistência a esse patógeno foi identificado em 117 cafeeiros. Para resistência a *C. kahawae*, 46 cafeeiros da população C6T-10 e 59 da população C6T-24 apresentaram o gene *Ck-1*. Foram identificados 37 cafeeiros da população C6T-10 e 23 da população C6T-24 com a piramidação dos quatro locos de resistência a *H. vastatrix* e *C. kahawae*. Esses mesmos cafeeiros foram avaliados como resistentes à ferrugem em nível de campo no ano de 2019. Outras características morfoagronômicas foram analisadas, permitindo a seleção de genótipos contendo piramidação de genes de resistência e características de interesse agrônomo. Para auxiliar na seleção de genótipos a serem cruzados para formar novo ciclo de retrocruzamento, foi realizado estudo da diversidade dos cafeeiros, usando a análise de agrupamento UPGMA. Observou-se a formação de quatro grupos principais, permitindo evidenciar a diversidade dentro da população C6T-10. Com base nesse trabalho, foi possível selecionar cafeeiros em geração F₂ contendo a piramidação de alelos de resistência a *H. vastatrix* e *C. kahawae*, bem como genótipos contendo diversidade que podem ser usados para cruzamento e formação de nova população para seleção recorrente.

Palavras-chave: Melhoramento do cafeeiro. SAM. Diversidade genética. Piramidação de genes. *Hemileia vastatrix*. *Colletotrichum kahawae*.

ABSTRACT

SILVA, Ana Carolina Andrade, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2020.
Molecular and phenotypic characterization of *Coffea arabica* populations in selection.
Adviser: Eveline Teixeira Caixeta. Co-adviser: Dênia Pires de Almeida.

The main phytosanitary problems in Arabica coffee washers are rust that is caused by the fungus *Hemileia vastatrix* and Coffee Berry Disease (CBD), which is caused by the fungus *Colletotrichum kahawae*, being one of the main responsible for the reduction of coffee and drink quality. An efficient socioenvironmental way to control these diseases is the use of resistant cultivars, preventing the means of genetic breeding. However, the coffee plant breeding is a long process, which can take about 25 years to obtain a new cultivar. Thus, the use of breeding methods associated with molecular markers is a viable alternative to accelerate the process of developing new coffee cultivars. One of the extremely relevant applications of molecular markers in the plant breeding method consists of its use as an auxiliary tool in the selection procedures assisted by molecular markers (SAM). In SAM, the process of gene stacking disease-resistant alleles is efficient, as it allows selection in the absence of pathogens, cancels the environmental effects, pleiotropy, and epistasis and allows the selection of undesirable genotypes in the first selection tests. Now the objective of the present study was to implement a selection assisted in the improvement of two species of *C. arabica*, C6T-10, and C6T-24, in the F₂ generation of recurrent selection. Genetic diversity studies and morpho- agronomic analyzes of these were also carried out for auxiliary coffee selection. For this purpose, the DNA of 148 coffee trees from two species was extracted and amplified with molecular markers associated with rust resistance genes and CBD, as well as microsatellite markers distributed randomly in the genome. For resistance to rust, markers linked to three sites were used, two QTL that use the genes with the highest resistance such as races I, II, and model 001 of *H. vastatrix* and one RGA (Disease Resistance Gene Analogs) gene. For CBD, two markers were used that separate the Ck-1 gene. Microsatellite markers were used to study genetic diversity. The data from the markers associated with the two QTLs suggest that all coffee trees in the C6T-24 population show resistance to races I, II and model 001 of *H. vastatrix*, since a dominant allele is present in one of the two locations is sufficient for anyone to be tough. The RGA gene associated with resistance to this pathogen was identified in 117 coffee trees. For resistance to *C. kahawae*, 46 coffee trees from the C6T-10 population and 59 from the C6T-24 population had the Ck-1 gene. 37 coffees

from the C6T-10 population and 23 from the C6T-24 population were selected with a gene stacking of four resistance sites to *H. vastatrix* and *C. kahawae*. These same coffee trees have been rated as rust-resistant at the field level in 2019. Other morpho-agronomic characteristics were analyzed, allowing the selection of genotypes that use resistance gene stacking and characteristics of agronomic interest. For an auxiliary selection of genotypes to be crossed to form a new backcross cycle, a study of coffee diversity was carried out, using a UPGMA cluster analysis. Observe the formation of four main groups, allowing us to demonstrate the diversity in the C6T-10 population. Based on this work, it was possible to select coffee trees in the F2 generation, including the removal of resistance alleles to *H. vastatrix* and *C. kahawae*, as well as the selected genotypes that can be used for monitoring and training new populations for selection.

Keywords: Coffee improvement. SAM. Genetical diversity. Gene stacking. *Hemilea vastatrix*. *Colletotrichum kahawae*.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.	11
2	MATERIAL E MÉTODOS	14
2.1	Material genético	14
2.2	Extração de DNA	16
2.3	Seleção assistida por marcadores moleculares (SAM)	17
2.3.1	Seleção assistida por marcadores moleculares para resistência à <i>H. vastatrix</i>	17
2.3.2	Seleção assistida por marcadores moleculares para resistência à <i>Colletotrichum kahawae</i> - CBD	19
2.4	Estudo de diversidade genética	20
2.5	Avaliações fenotípicas	22
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
3.1	Seleção assistida para QTL de resistência as raças I, II e patótipo 001 de <i>H. vastatrix</i>	24
3.2	Seleção assistida com o marcador CARF005 para resistência à <i>H. vastatrix</i>	27
3.3	Seleção assistida para o gene <i>Ck-1</i> conferindo resistência para <i>Coffee Berry Disease</i> – CBD	28
3.4	Análise conjunta dos dados moleculares e dados fenotípicos	31
3.5	Estudo de diversidade genética da População C6T-10	37
4	CONCLUSÕES	40
5	REFERÊNCIAS	41

1 INTRODUÇÃO

O cafeeiro pertence à família *Rubiaceae* e ao gênero *Coffea* tendo 104 espécies descritas (DAVIS et al., 2011). Das espécies, apenas *Coffea arabica* L. e *Coffea canephora* são cultivadas, e representam 60% e 40% da produção mundial, respectivamente (ICO, 2018). Seus grãos produzem uma das bebidas mais populares do mundo, se destacando como uma das mais importantes *commodities* (TOZZI & GHINI, 2016). O Brasil se destaca como o maior produtor e exportador mundial de café, sendo o café arábica de maior representatividade, com 72% do cultivo nacional (CONAB, 2019).

C. arabica L. é a única espécie tetraploide ($2n=4x=44$) do gênero, sendo as demais espécies diploides ($2n=2x=22$). Seu genoma alotetraploide provém da hibridação natural entre

C. eugenioides e *C. canephora* (LASHERMES et al., 1999). É uma espécie autocompatível e autógama, ou seja, se reproduz predominantemente por autofecundação, que ocorre em aproximadamente 90% das flores (CUBRY et al. 2008). É nativa do sudoeste da Etiópia, sudeste do Sudão e norte do Quênia (BRIDSON 1982).

Os principais problemas fitossanitários nas lavouras de café arábica são a ferrugem causada pelo fungo *Hemileia vastatrix* e *Coffee Berry Disease* (CBD) causada pelo fungo *Colletotrichum kahawae*. Essas doenças atacam as folhas e os frutos do cafeeiro, sendo uns dos principais responsáveis pela redução da produtividade e qualidade de bebida (MANUELE et al., 2010; JÚNIOR et al., 2013). O controle químico por meio do uso de fungicidas tem-se mostrado eficiente para controlar os prejuízos causados por estes fungos. Todavia, este é um método de controle que eleva consideravelmente o custo de produção do cafezal (GICHURU et al. 2008; ZAMBOLIM 2016), além de expor o meio ambiente e o aplicador ao risco de contaminação pelos fungicidas.

Uma forma socioambiental mais eficiente para o controle dessas doenças é o uso de cultivares resistentes obtidas por meio de melhoramento genético. Esta alternativa apresenta baixo custo, eficiência, facilidade de implantação e causa menores danos ao ambiente (FREITAS et al., 2007). Todavia, um dos grandes desafios dos programas de melhoramento é obter uma variedade que reúna todas as características de interesse. Em café arábica deseja-se a piramidação de alelos associados a características de interesse, tais como resistência e/ou tolerância a fatores bióticos e abiótico. Este processo de piramidação pode ser realizado em etapas, uma vez que é difícil obter dois genitores que combinem as todas as características de interesse.

Uma alternativa é a seleção recorrente, que se baseia em sucessivos ciclos de seleção e recombinação das melhores progênies, possibilitando o aumento da frequência de alelos favoráveis de forma gradativa, sem exaurir a variabilidade genética (HALLAUER et al., 1985). É um método viável para a obtenção de novos genótipos de café arábica, permitindo ganhos simultâneos em vários caracteres de interesse.

Nesse contexto, diferentes fontes de resistência para essas duas doenças do cafeeiro já foram identificadas. A resistência das plantas de café às diferentes raças de *H. vastatrix* tem sido atribuída à pelo menos nove genes denominados de S_H1 a S_H9, que atuam de forma independente ou conjunta (NORONHA-WAGNER, M., BETTENCOURT 1967; BETTENCOURT, A.J., NORONHA-WAGNER, M & LOPES 1980; BETTENCOURT, A.J., RODRIGUES 1988). Esses genes de resistência foram encontrados em *C. arabica* (S_H1, 2, 4, 5), *C. canephora* (S_H6, 7, 8, 9) e *C. liberica* (S_H3) (BETTENCOURT & NORONHA-WAGNER, 1971). Os genes S_H5, 6, 7, 8 e 9 também foram encontrados em acessos de Híbrido de Timor (HdT), que correspondem a híbridos naturais entre *C. arabica* e *C. canephora*. Os genes identificados em *C. arabica* já foram suplantados por diversas raças de *H. vastatrix* (BETTENCOURT & NORONHA-WAGNER, 1971), dessa forma, os programas de melhoramento têm buscado introgridir os genes de *C. canephora* e *C. liberica* em cafeeiros arábica.

Quanto a resistência do cafeeiro à *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 HdT. Estudos realizados por Agwanda *et al.* (1997) demonstraram que a resistência também era controlada por outros genes, como os genes R e K, presentes nas variedades Rume Sudan e K7, respectivamente. Gichuru *et al.* (2008) identificaramo gene *Ck-1* como o loco de resistência a *C. kahawae* em cafeeiros derivados de Catimor e sugeriram que esse gene corresponde ao loco T previamente identificado em HdT.

Programas de melhoramento do cafeeiro temutilizado as diferentes fontes para obtenção de resistência duradoura para essas doenças. No entanto, o melhoramento genético do cafeeiro é um processo demorado, que pode levar cerca de 25 anos para se obter uma nova cultivar (MORENO, 2004) e requer uma extensa área experimental. Isso se deve ao fato de o cafeeiro ser uma espécie perene, de ciclo longo e porte arbustivo. Além disso, a eficiência da seleção nas primeiras gerações de autofecundação é muito baixa devido, principalmente, à ocorrência de alelos dominantes em heterozigose (KALTCHUK-SANTOS &

BODANESE-ZANETTINI, 2002; MORAIS & MELO, 2011).

A utilização de métodos de melhoramento associados a marcadores moleculares é uma alternativa viável para acelerar o processo de desenvolvimento de novas cultivares de café. O uso de marcadores ligados a genes de interesse é especialmente importante na seleção quando se tem limitação na fenotipagem, como no caso de avaliação para CBD nos cafezais do Brasil, onde a doença ainda não está presente e é de suma importância o melhoramento preventivo, ou quando o programa de melhoramento tem como objetivo a piramidação de genes, ou seja, introduzir dois ou mais genes na cultivar.

As vantagens de implementar seleção de plantas por meio de métodos moleculares (seleção assistida por marcadores moleculares - SAM) está na redução do número de plantas para serem testadas em campo, detecção de variabilidade em todos os tecidos vegetais independente da fase de desenvolvimento e não apresentar interferência do ambiente e de efeitos pleiotrópicos e epistáticos, além de permitir a eliminação dos genótipos indesejáveis nas primeiras gerações de seleção (OLIVEIRA et al., 2007; AGARWAL et al., 2008, ALKIMIM et al., 2017). Dessa forma, a SAM no processo de piramidação de alelos de resistência a doenças é amplamente eficiente.

Marcadores moleculares também têm sido utilizados nos programas de melhoramento genético para analisar a variabilidade das plantas. O seu uso para estudo de diversidade genética tem relevante utilidade, principalmente em espécies que apresentam base genética estreita, como *C. arabica*. Nesse caso, marcadores moleculares podem ser utilizados para discriminar os indivíduos fenotipicamente semelhantes, com base no genótipo (FERRÃO et al., 2015; SOUSA et al., 2017).

Além disso, a seleção recorrente assistida por marcador molecular (MARS) tem sido implementada nos programas de melhoramento uma vez que acelera os processos de seleção e aumentar a frequência de alelos favoráveis nas populações a cada geração, sem redução da variabilidade genética (TOBAR, 2019).

Desse modo, o objetivo do presente estudo foi implementar a seleção assistida por marcadores moleculares no melhoramento *C. arabica* para identificação de cafeeiros contendo diferentes genes de resistência às principais doenças, ferrugem e CBD e análise de diversidade genética para formação de novos ciclos de seleção recorrente.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material genético

Foram avaliados 148 cafeeiros de duas populações em processo de melhoramento (Tabela 1), que se encontram na geração F₂. As populações foram selecionadas a partir de cruzamentos realizados em um modelo de dialelo circulante, onde 144 híbridos F₁ foram analisados (TOBAR, 2019). Com base nesse estudo, as plantas F₁ resultantes do cruzamento entre as cultivares Catiguá MG2 e Acauã Novo, que são cultivares comercialmente utilizadas por cafeicultores por exibirem bons desempenhos agronômicos, sobressaíram por apresentarem dois locos associados a resistência do cafeeiro a *H. vastatrix* e o loco de resistência a CBD piramidados. Além disso, alguns dos híbridos desse cruzamento ficaram entre os 30% melhores híbridos selecionados *pelo rank-médio*. O índice de *rank-médio* foi obtido com base em características fenotípicas (vigor vegetativo, tamanho dos frutos maduros, incidência de cercosporiose) e permitiu identificar os indivíduos com os quais pode-se obter maiores ganhos com a seleção (TOBAR, 2019).

Tabela 1. Cafeeiros avaliados nas populações C6T-10 e C6T-24 em geração F₂ e testemunhas.

POPULAÇÃO C6T-10				POPULAÇÃO C6T-24			
Cafeeiro	Identificação	Cafeeiro	Identificação	Cafeeiro	Identificação	Cafeeiro	Identificação
1	T1B1P2	45	T13B2P10	74	T1B3P1	118	T1B4P3
2	T2B1P2	46	T13B2P11	75	T1B3P3	119	T2B4P1
3	T13B1P1	47	T13B2P13	76	T2B3P2	120	T2B4P3
4	T13B1P2	48	T13B2P15	77	T2B3P3	121	T14B4P1
5	T13B1P3	49	T13B2P16	78	T14B3P2	122	T14B4P2
6	T13B1P4	50	T13B2P19	79	T14B3P4	123	T14B4P3
7	T13B1P5	51	T13B2P21	80	T14B3P5	124	T14B4P4
8	T13B1P6	52	T13B2P23	81	T14B3P6	125	T14B4P5
9	T13B1P7	53	T13B2P24	82	T14B3P9	126	T14B4P6
10	T13B1P8	54	T13B2P25	83	T14B3P11	127	T14B4P7
11	T13B1P9	55	T13B2P26	84	T14B3P12	128	T14B4P8
12	T13B1P10	56	T13B2P29	85	T14B3P14	129	T14B4P9
13	T13B1P12	57	T13B2P30	86	T14B3P16	130	T14B4P10
14	T13B1P16	58	T13B2P32	87	T14B3P17	131	T14B4P11
15	T13B1P17	59	T13B2P33	88	T14B3P18	132	T14B4P14
16	T13B1P18	60	T13B2P34	89	T14B3P19	133	T14B4P15
17	T13B1P20	61	T13B2P35	90	T13B3P20	134	T14B4P16
18	T13B1P22	62	T13B2P36	91	T14B3P21	135	T14B4P17
19	T13B1P23	63	T13B2P37	92	T14B3P22	136	T14B4P18
20	T13B1P24	64	T13B2P38	93	T14B3P23	137	T14B4P19
21	T13B1P25	65	T13B2P39	94	T14B3P25	138	T14B4P20
22	T13B1P26	66	T13B2P40	95	T14B3P26	139	T14B4P21
23	T13B1P27	67	T13B2P41	96	T14B3P27	140	T14B4P22
24	T13B1P28	68	T13B2P42	97	T14B3P28	141	T14B4P23
25	T13B1P30	69	T13B2P43	98	T14B3P31	142	T14B4P25
26	T13B1P32	70	T13B2P44	99	T14B3P32	143	T14B4P26
27	T13B1P33	71	T13B2P45	100	T14B3P33	144	T14B4P27
28	T13B1P35	72	T13B2P46	101	T14B3P34	145	T14B4P28
29	T13B1P36	73	T13B2P50	102	T14B3P35	146	T14B4P30
30	T13B1P37	-	-	103	T14B3P36	147	T14B4P31
31	T13B1P38	-	-	104	T14B3P37	148	T14B4P32
32	T13B1P39	-	-	105	T14B3P38	149	T14B4P33
33	T13B1P40	-	-	106	T14B3P39	150	T14B4P33
							4
34	T13B1P41	-	-	107	T14B3P40	151	T14B4P35
35	T13B1P44	-	-	108	T14B3P42	152	T14B4P36
36	T13B1P45	-	-	109	T14B3P44	153	T14B4P38
37	T13B1P49	-	-	110	T14B3P45	154	T14B4P39
38	T13B1P50	-	-	111	T14B3P46	155	T14B4P40
39	T1B2P1	-	-	112	T14B3P47	156	T14B4P41
40	T2B2P1	-	-	113	T14B3P48	157	T14B4P43
41	T13B2P1	-	-	114	T14B3P49	158	T14B4P44
42	T13B2P2	-	-	115	T14B3P50	159	T14B4P46
43	T13B2P4	-	-	116	T1B4P1	160	T14B4P47
44	T13B2P8	-	-	117	T1B4P2	161	T14B4P48

Dois híbridos F_1 desse cruzamento, C6T-10-B6-E3 e C6T-24-B6-E3, foram autofecundados, resultando em progênies F_2 (Figura 1). O plantio do experimento foi realizado em fevereiro de 2016, utilizando o delineamento com testemunha intercalar. Inicialmente, cada população era composta por dois blocos de 50 cafeeiros cada, no espaçamento 3,0 x 0,80 m, totalizando 100 cafeeiros por população. Contudo, houve morte de alguns cafeeiros, sendo então avaliadas 69 plantas na população C6T-10 e 79 plantas na população C6T-24. Como testemunhas foram utilizadas a cultivar Paraíso MG H419-1 e Catuaí Vermelho IAC 144 resistentes e susceptíveis à *H. vastatrix*, respectivamente.

Figura 1. Representação do cruzamento entre genitores Catiguá MG2 e Acauã Novo, os quais deram origem a duas populações F_2 .

Os cafeeiros avaliados pertencem ao Programa de Melhoramento Genético do Cafeeiro desenvolvido pela Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG) em parceria com a Universidade Federal de Viçosa (UFV) e a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa-Café).

2.2 Extração de DNA

Para a extração de DNA foram coletadas amostras foliares dos 148 indivíduos das duas populações e 13 testemunhas. O DNA foi extraído de folhas jovens, vigorosas, sadias e verdes brilhantes. Esse material foi coletado em saco plástico devidamente identificado, umidificado com água, onde o pecíolo das folhas ficou em contato com algodão úmido, e mantido em caixa de isopor para, a fim de evitar a oxidação das folhas coletadas. Em seguida, o material vegetal foi conduzido ao laboratório BioCafé da UFV. As folhas foram lavadas em água corrente, secas empapel toalha, acondicionadas em tubos Falcon devidamente

identificados e armazenadas em freezer a -80°C. Posteriormente, as amostras congeladas foram liofilizadas, maceradas em cadinhos com auxílio de pistilo e armazenadas em microtubos de 2,0 ml.

A extração do DNA genômico das folhas maceradas foi realizado pelo método proposto por Diniz et al. (2005). A qualidade do DNA foi testada em gel de agarose e a quantificação realizada em Nano Drop 2000. O DNA foi diluído para a concentração de 25 ng/μL e armazenado a -20°C até o momento de uso.

2.3 Seleção assistida por marcadores moleculares (SAM)

Na análise de seleção assistida dos cafeeiros F₂ foram utilizados 5 marcadores moleculares de marca específica, previamente identificados como ligados a genes que conferem resistência a *H. vastatrix* e a *C. kahawae* (Tabela 2).

A fim de facilitar a análise dos dados gerados pelos marcadores moleculares ligados aos genes de resistência e a identificação dos alelos de resistência presentes nos cafeeiros avaliados, no presente estudo estes marcadores representam os diferentes locos de resistência a ferrugem e a CBD. Neste sentido, o marcador SSR 016 representa o loco B, o marcador CaRHv9 o loco C e o marcador CARF005 representa o loco E. Finalmente os marcadores CBD-Sat235 e CBD-Sat207 ligados ao gene Ck-1 representaram o loco D (Tabela 2).

Tabela 2: Marcadores moleculares ligados a genes que conferem resistência a *H. vastatrix* e *C. kahawae*. Sequências e temperaturas de anelamento T(°C).

Loco	Marcador	Sequência dos Primers	T (°C)
B	SSR 016	R: CCACACA ACTCTCCTCATTC	65
		F: ACCCGAAAGAAAGAACAACCAAG	
C	CaRHv9	R: GTCTAAGACCAGAATCAGATGG	65
		F: TGATGAAGAAGAGCGCATAGC	
E	CA RF005	R: ATCCCTACCATCCACTTCAAC	60
		F: GGACATCAACACCAACCTC	
D	CBD-Sat235	R: GCAAATCATGAAAATAGTTGGTG	50
		F: TCGTTCTGTCATTAATCGTCAA	
D	CBD-Sat207	R: CAATCTCTTTCCGATGCTCT	50
		F: GAAGCCGTTTCAAGCC	

¹F= Forward primer; R=Reverse

2.3.1 Seleção assistida por marcadores moleculares para resistência à *H. vastatrix*

Visando identificar indivíduos que apresentem resistência à *H. vastatrix*, foram utilizados três marcadores moleculares, sendo o marcador microsatélite SSR016, o

marcador SCAR CaRHv9 e o marcador RGA CARF005. O marcador SSR016 (Figura 3) está ligado ao QTL do grupo de ligação 2. No presente trabalho este marcador representa o loco B de resistência. Apresenta um padrão codominante, identificando-se os indivíduos BB, Bb e bb. O marcador CaRHv9 está ligado ao QTL do grupo de ligação 5 (Figura 3) e no presente trabalho representam o loco C de resistência. Esse comporta-se como marcador dominante e acoplado, sendo identificados na população os indivíduos com genótipos C₋ e cc (ALMEIDA, 2019). O marcador CARF005 está associado a um outro QTL que não do grupo de ligação 2 e 5. Está representado pelo loco E, e apresenta padrão dominante, não sendo possível distinguir cafeeiros dominantes homozigotos de dominantes heterozigotos, apenas os genótipos E₋ e ee.

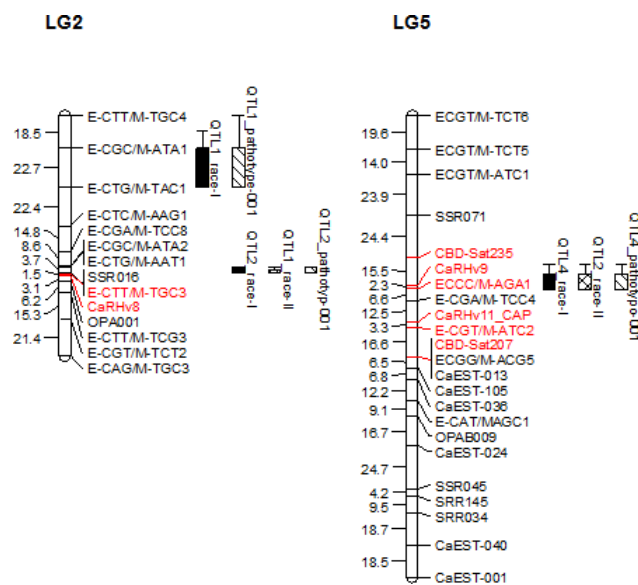


Figura 2. LG2 = Grupo de Ligação 2 do Mapa de ligação para *C. arabica* contendo o marcador SSR16 . LG5 = Grupo de Ligação 5 do Mapa de ligação para *C. arabica* contendo o marcador CaRHv9₁₆₁ e os CBD-Sat207 e CBD-Sat235. À direita da barra estão os nomes dos marcadores moleculares e à esquerda, as distâncias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

A amplificação do *primer* SSR016 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 (Invitrogen), completando o volume com água milli-Q. Para a amplificação foi utilizado o procedimento *touchdown* PCR, que consistiu em: etapa de desnaturação a 94°C por 2 minutos; 10 ciclos de desnaturação 94°C por 30 segundos, anelamento a 66°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 foirealizada a 72°C por 8 minutos.

A amplificação com os *primer* 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 (Cellco), completando o volume com água milli-Q. A amplificação consistiu em 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.

Para os *primers* CaRHv9 e CARF005, os produtos resultantes da reação de PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose e corados em brometo de etídio. Para o *primer* SSR 016, os produtos resultantes da reação de PCR foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante 6% e visualizados por meio de coloração com nitrato de prata, segundo Brito et al. (2010).

A amplificação do DNA por PCR do *primer* CARF005 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 unidade de Taq DNA polimerase (Invitrogen), completando o volume com água milli-Q. A amplificação foi realizada em termociclador Veriti (Applied Biosystem) e consistiu em etapa inicial de desnaturação de 95° C por 5 minutos, seguida de trinta e cinco ciclos de desnaturação a 94° C por 30 segundos, anelamento a 60° C por 30 segundos e extensão a 72° C por 1 minuto. Após os ciclos, foi realizada extensão final de 72° C por 10 minutos.

Para avaliar a presença do alelo de resistência nos indivíduos em estudo, foi utilizado o padrão de bandas apresentados pelos genótipos controles, previamente identificados como resistente (HdT UFV 443-03) e suscetível (Catuaí Amarelo IAC 64). As leituras dos géis foram realizadas com base na presença ou ausência da marca (banda) de resistência. Para o marcador codominante SSR016 foram avaliados genótipos homozigotos e heterozigotos.

2.3.2 Seleção assistida por marcadores moleculares para resistência à

***Colletotrichum kahawae* – CBD**

Foram utilizados dois marcadores moleculares ligados ao gene *Ck-1*, identificados e mapeados por Gichuru et al. (2008) (Figura 3) e validados por Alkimim et al. (2017) (Tabela 2), representando o loco D de resistência no presente estudo. Como controle foram utilizados três genótipos sabidamente portadores do gene *Ck-1* (Híbridos de Timor UFV 377-15 e UFV 440-10 e a cultivar MGS Catiguá 3) e dois genótipos suscetíveis (Caturra Vermelho - CIFC 19/1 e Catuaí Vermelho IAC 64 - UFV 2148-57).

Figura 3. Mapa de ligação genética de marcadores encontrados associados à resistência do cafeeiro a *C. kahawae* construído com base na população F₂ de *C. arabica* (SL28 × Catimor 88). Os valores à esquerda indicam as distâncias entre os marcadores em cM. A direita segmento que contém o loco *Ck-1* de resistência ao CBD (GICHURU *et al.*, 2008).

A amplificação por PCR foi realizada em um volume final de 25 µL, contendo 50 ng de DNA genômico, 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 (Invitrogen), completando o volume com água milli-Q. As reações foram realizadas em termocicladores PTC-200 (*MJ Research*) e Veriti (*Applied Biosystems*) e consistiram em uma fase inicial de desnaturação a 95° C por 5 minutos; 35 ciclos a 94° C por 45 segundos, com temperaturas de anelamento específica para cada *primer*, por um período de 45 segundos e extensão a 72° C por 45 segundos; e extensão final a 72° C por 10 minutos.

Os produtos resultantes da reação de PCR foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante 6% e visualizados por meio de coloração com nitrato de prata (BRITO *et al.* 2010). Para avaliar a resistência nos indivíduos em estudo, foi utilizado 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. Como se tratam de marcadores codominantes, foram avaliados genótipos homocigotos e heterocigotos.

2.4 Estudo de diversidade genética

Para o estudo de diversidade genética, inicialmente foi realizada análise de *primers* microssatélites, para selecionar os que apresentassem polimorfismo nas populações em estudo. Posteriormente, com os *primers* polimórficos selecionados (Tabela 3), foram

analisados em todos indivíduos das duas populações F₂.

Tabela 3. *Primes* SSR utilizados no estudo de diversidade, temperatura de *melting* (T_m), tamanho dos fragmentos gerados em pares de bases (bp) e referência.

R: CGACAGATGCAGGAATAAACTG

R: CCTTATTGAAGACGCCCAAA

R: ACTGGTCTCTCGTCTGTGAA

R: GGTTGCGTCAAACAAGTCAA

R: TTATATCCCGCGGCAAGTCC

R: CCACACAACCTCTCCTCATTC

R: CAATCTCTTTCCGATGCTCT

R: GCAAATCATGAAAATAGTTGGTG

¹F= *Foward primer*; R=*Reverse*

Na reação de PCR foram utilizados 50 ng de DNA, 1 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen), tampão 1X, 1 mM de MgCl₂, 150 μM de cada dNTP e 0,1 μM de cada *primer*, completando com água milli-Q para um volume final de 20 μL. Para a amplificação, foi utilizado o procedimento “touchdown PCR”, que consistiu em: etapa de desnaturação a 94°C por 2 minutos, seguido por 10 ciclos de touchdown PCR, constituídos de 94°C por 30 segundos, 66°C, decrescendo 1°C a cada ciclo (de 66°C até 57°C), por 30 segundos e extensão de 72°C por 30 segundos. Posteriormente, foram realizados 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 min.

A matriz de dissimilaridade genética foi calculada utilizando-se os coeficientes de dissimilaridade de Nei e Li (Nei; Li 1979). A matriz foi gerada com o auxílio da função Nei.dist do pacote Poppr e, posteriormente, foi realizado um agrupamento hierárquico com a função Hclust empregando o parâmetro UPGMA. O dendrograma foi obtido por meio da função Fviz- dend do pacote FactoExtra. Todas as análises foram conduzidas em ambiente R versão 3.5.3.

2.5 Avaliações fenotípicas

Foram avaliadas 12 características morfoagronômicas dos cafeeiros no ano de 2019, sendo: vigor vegetativo, produção, uniformidade de maturação dos frutos, tamanho dos frutos maduros, diâmetro de copa, diâmetro de caule, número de pares de ramos plagiotrópicos, comprimento do ramo plagiotrópico, número de nós no ramo plagiotrópicos, altura de planta, severidade ferrugem e severidade cercosporiose (Tabela 4).

Tabela 4. Características morfoagronômicas avaliadas no ano de 2019 para as populações em estudo.

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

Cercosporiose

cercóspora. OBS.: 2 = baixa incidência e 5 = alta incidência.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

m

3.1 Seleção assistida para QTL de resistência as raças I, II e patótipo 001 de *H. vastatrix*

Para verificar a presença de genes de resistência a *H. vastatrix*, marcadores associados a dois QTL foram utilizados, sendo um no grupo de ligação (GL) 2 e outro no GL5 do mapa genético construído por Pestana et al. (2015).

Na população C6T-10, dos 69 cafeeiros analisados para o marcador SSR016 ligado ao QTL-GL 2, todos apresentaram a marca de resistência. Como o marcador SSR016 é um marcador codominante, foi possível identificar cafeeiros homozigotos e heterozigotos (Tabela 5). Sendo assim, 65 (94,2%) cafeeiros apresentaram o alelo de resistência do QTL-GL2 em homozigose, tendo, portanto, o genótipo BB e 4 (5,8%) apresentaram o loco de resistência em heterozigose, sendo Bb. Todavia, por meio da análise da planta F1 que deu origem a população F2 C6T-10, observou-se que ela é resistente homozigota. Sendo assim, os cafeeiros resistentes heterozigotos presentes na população C6T-10 (cafeeiros 9, 45, 59 e 67) foram descartados, por provavelmente serem oriundos de contaminação.

Tabela 5. Cafeeiros da população C6T-10 portadores de loco/QTL de resistência as raças I, II e patótipo 001 de *H. vastatrix* com o marcador SSR016 que pertence ao grupo de ligação 2.

Resistentes Homozigotos (BB)					
3	4	5	6	7	8
10	11	12	13	14	15
16	17	18	19	20	21
22	23	24	25	26	27
28	29	30	31	32	33
34	35	36	37	38	41
42	43	44	46	47	48
49	50	51	52	53	54
55	56	57	58	60	61
62	63	64	65	66	68
69	70	71	72	73	-

Dos 79 cafeeiros avaliados na população C6T-24, todos apresentaram banda de resistência para o marcador SSR016 ligado ao QTL-GL 2, sendo todos resistentes homozigotos (Tabela 6).

Tabela 6. Cafeeiros da população C6T-24 portadores de loco/QTL de resistência as raças I, II e patótipo 001 de *H. vastatrix* com o marcador SSR016 que pertence ao grupo de ligação 2.

Resistente Homozigoto (BB)					
7	7	8	8	8	8
8	9	0	1	2	3
8	8	8	8	8	8
4	5	6	7	8	9
9	9	9	9	9	9
0	1	2	3	4	5
9	9	9	9	1	1
6	7	8	9	0	0
				0	1
1	1	1	1	1	1
0	0	0	0	0	0
2	3	4	5	6	7
1	1	1	1	1	1
0	0	1	1	1	1
8	9	0	1	2	3
1	1	1	1	1	1
1	1	2	2	2	2
4	5	1	2	3	4
1	1	1	1	1	1
2	2	2	2	2	3
5	6	7	8	9	0
1	1	1	1	1	1
3	3	3	3	3	3
1	2	3	4	5	6
1	1	1	1	1	1
3	3	3	4	4	4
7	8	9	0	1	2
1	1	1	1	1	1
4	4	4	4	4	4
3	4	5	6	7	8
1	1	1	1	1	1
4	5	5	5	5	5
9	0	1	2	3	4
1	1	1	1	1	1
5	5	5	5	5	6
5	6	7	8	9	0
1	-	-	-	-	-
6					
1					

Os dados moleculares mostraram que os indivíduos das progênies apresentaram o alelo para resistência em homozigose para o QTL-GL2. Tobar (2019) também encontrou cafeeiros F1 C6T resistentes e homozigotos, corroborando com os dados obtidos no presente trabalho. A obtenção de indivíduos homozigotos para esse loco já na geração F2 é de grande importância para o melhoramento genético do cafeeiro, pois garante que as progênies futuras,

provenientes de autofecundação, também sejam resistentes.

Analisando o marcador CaRHv9 que está ligado ao QTL-GL 5, foi possível observar que 50 (76,96%) cafeeiros da população C6T-10 (Tabela 7) e 26 (33%) da população C6T-24 (Tabela 8) apresentaram o alelo de resistência. Segundo Almeida (2015), o marcador CaRHv9 apresenta padrão de bandas dominantes, portanto, a marca de resistência encontrada nos cafeeiros pode estar em homozigose ou em heterozigose, não sendo possível distinguir. Indivíduos contendo a marca tiveram o genótipo denominado de C_.

Tabela 7. Cafeeiros da população C6T-10 portadores de loco/QTL de resistência as raças I, II e patótipo 001 de *H. vastatrix* com o marcador CaRHv9 que pertence ao grupo de ligação 5.

Resistentes (C_)					
3	4	5	7	8	1
					1
12	13	14	15	16	1
					9
21	22	24	25	26	2
					7
28	33	34	36	37	3
					8
42	43	44	46	47	4
					9
50	51	52	53	54	5
					5
56	57	60	61	62	6
					3
64	65	66	68	70	7
					1
72	73	-	-	-	-

Tabela 8. Cafeeiros da população C6T-24 portadores de loco/QTL de resistência as raças I, II e patótipo 001 de *H. vastatrix* com o marcador CaRHv9 que pertence ao grupo de ligação 5.

Resistentes (C_)					
7	7	8	8	8	8
8	9	1	4	5	7
8	9	9	9	9	9
9	0	1	2	3	4
1	1	1	1	1	1
1	1	1	2	2	3
0	1	4	6	7	1
1	1	1	1	1	1
3	3	3	3	3	4
2	3	4	5	7	3
1	1	-	-	-	-
4	4				
4	9				

Segundo Pestana et al. (2015), a resistência dos cafeeiros as raças I, II e patótipo 001 de *H. vastatrix* é conferida por dois locos dominantes independentes. Portanto, a presença de um alelo dominante em um dos dois locos é suficiente para que o indivíduo seja resistente e possa ser selecionado para avançar geração. Dessa forma, os dados permitiram identificar cafeeiros com genótipos BBC_ e BBcc que são resistentes e poderão ser selecionados para o avanço de próximas gerações.

No entanto, para obtenção resistência durável a doença, o melhoramento genético tem buscado indivíduos contendo maior número possível de alelos de resistência. Assim, foi

possível identificar cafeeiros contendo os dois locos piramidados (Tabela 9), apresentando o genótipo BBC_. Esses cafeeiros devem ser priorizados no melhoramento genético.

Tabela 9. Cafeeiros F₂ contendo os dois marcadores, SSR16 e CaRHv9, associados ao QTL- GL2 e QTL-GL5 que conferem resistência as raças I, II e patótipo 001 de *H. vastatrix*.

Cafeeiros da população C6T-10 (BBC_)					
3	4	5	7	8	1
					1
1	1	1	1	1	1
2	3	4	5	6	9
2	2	2	2	2	2
1	2	4	5	6	7
2	3	3	3	3	3
8	3	4	6	7	8
4	4	4	4	4	4
2	3	4	6	7	9
5	5	5	5	5	5
0	1	2	3	4	5
5	5	6	6	6	6
6	7	0	1	2	3
6	6	6	6	7	7
4	5	6	8	0	1
7	7	-	-	-	-
2	3				
Cafeeiros da população C6T-24 (BBC_)					
7	7	8	8	8	8
8	9	1	4	5	7
8	9	9	9	9	9
9	0	1	2	3	4
1	1	1	1	1	1
1	1	1	2	2	3
0	1	4	6	7	1
1	1	1	1	1	1
3	3	3	3	3	4
2	3	4	5	7	3
1	1	-	-	-	-
4	4				
4	9				

3.2 Seleção assistida com o marcador CARF005 para resistência à *H. vastatrix*

Além de verificar os dois QTL para resistência a *H. vastatrix*, outro loco de resistência a este patógeno foi analisado nessas populações. O marcador dominante CARF005, derivado de RGA (*Disease Resistance Gene Analogs*), foi desenvolvido por Alvarenga et al. (2011) e localizado no mapa de ligação de *C. arabica* por Almeida et al. (2019). Neste mapa de ligação foi observado que este marcador marca loco diferente do QTL-GL2 e QTL-GL5. Portanto o marcador CARF005 faz parte de um terceiro loco associado à resistência a *H. vastatrix*.

Dentre os 65 cafeeiros avaliados na população C6T-10 51 (78,46) apresentaram a

marca de resistência (Tabela 10) e dos 79 cafeeiros avaliados na população C6T-24, 66 (86,54) (Tabela 11). Portanto, foram considerados portadores do gene de resistência marcado pelo CARF005 (E₋). Como se trata de um marcador dominante, não é possível distinguir cafeeiros heterozigotos de cafeeiros homozigotos dominantes.

Tabela 11. Cafeeiros da população C6T-24 considerados portadores do gene de resistência marcado pelo CARF005.

Resistentes (E_)					
3	4	5	7	1	1
				1	2
14	15	16	17	1	1
				8	9
22	24	25	26	2	2
				8	9
30	33	34	36	3	3
				7	8
42	43	44	46	4	4
				7	9
50	51	52	53	5	5
				4	5
56	57	58	60	6	6
				1	2
63	64	65	66	6	7
				8	0
71	72	73	-	-	-

Tabela 11. Cafeeiros da população C6T-24 considerados portadores do gene de resistência marcado pelo CARF005.

Resistentes (E_)					
7	7	8	8	8	8
8	9	1	3	4	5
8	8	8	9	9	9
6	7	9	1	2	3
9	9	9	9	9	9
4	5	6	7	8	9
1	1	1	1	1	1
0	0	0	0	0	0
0	1	2	3	4	6
1	1	1	1	1	1
0	0	0	1	1	1
7	8	9	0	1	2
1	1	1	1	1	1
1	1	1	2	2	2
3	4	5	3	5	6
1	1	1	1	1	1
2	2	3	3	3	3
7	8	0	1	2	4
1	1	1	1	1	1
3	3	3	3	3	4
5	6	7	8	9	0
1	1	1	1	1	1
4	4	4	4	4	4
2	3	4	5	6	7
1	1	1	1	1	1

4	4	5	5	5	5
8	9	0	1	2	3
1	1	1	1	1	1
5	5	5	5	5	5
4	5	6	7	8	9

3.3 Seleção assistida para o gene *Ck-1* conferindo resistência para *Coffee Berry Disease (CBD)*

Além das análises de cafeeiros resistentes à *H. vastatrix* e visando o melhoramento preventivo foi utilizado dois marcadores moleculares SSR identificados e mapeados por Gichuru et al. (2008) e validados por Alkimim et al. (2017) como estando associados ao gene *Ck-1*, que confere resistência à *Colletotrichum kahawae*. A disponibilidade desses marcadores gera vantagem aos programas de melhoramento, pois permite a identificação de cafeeiros contendo genes de resistência na ausência do patógeno, uma vez este o *C. kahawae* ainda está restrito ao continente africano (VIEIRA et al., 2019).

Dos 65 cafeeiros analisados na população C6T-10, 46 (70,77%) foram considerados

portadores do gene *Ck-1* para os dois marcadores e 19 (29,23%) não apresentaram as marcas. Nessa progênie, 9 cafeeiros (19,57%) foram avaliados como resistentes homozigotos e 37 (como resistentes heterozigotos, para ambos os marcadores (Tabela 12).

Tabela 12. Cafeeiros da população C6T-10 portadores dos marcadores CBD-Sat235 e CBD- Sat207 associados ao gene *Ck-1* que confere resistência à *C. kahawae*.

Resistentes Homozigotos (DD)					
4	24	4	4	5	5
		2	5	1	4
58	61	7	7	-	-
		2	3		
Resistentes Heterozigotos (Dd)					
3	8	1	1	1	1
		1	4	6	7
19	21	2	2	2	2
		2	5	6	7
28	29	3	3	3	3
		0	1	3	4
35	36	3	4	4	4
		8	4	6	7
49	50	5	5	5	5
		3	5	6	7
62	64	6	6	6	7
		5	6	8	0
71	-	-	-	-	-

Os cafeeiros 10, 12, 18, 43,60, 63 e 69 não apresentaram a marca de resistência para o marcador CBD-Sat207, todavia apresentaram essa marca para o marcador CBD-Sat 235. Ao analisar o marcador CBD-Sat235, sete cafeeiros (5, 7, 20, 23, 32, 37, 48) não apresentaram a marca de resistência, mas quando analisado com o CBD-Sat 207 esse marcador apresentou a banda. Esses dados demonstram a presença de recombinação no loco analisado.

Recombinações também foram observadas quando se analisou a homozigose e heterozigose dos dois marcadores. Os cafeeiros 8, 33, 34, 49, 50, 62, 64, 65, 66, 70, 71 foram resistentes heterozigotos para o marcador CBD-Sat207, no entanto, foram resistentes homozigotos para o marcador CBD-Sat235. Os cafeeiros 14, 22, 25, 26, 36, 68 foram resistentes heterozigotos para CBD-Sat 235 e homozigoto para CBD-Sat207.

Dos 79 cafeeiros da população C6T-24 analisados com os marcadores CBD-Sat207 e CBD-Sat235, 59 (74,68%) foram considerados portadores do gene *Ck-1* que confere resistência a *C. kahawae*, para os dois marcadores. Como se tratam de marcadores codominantes, possibilitando identificar cafeeiros homozigotos e heterozigotos, foram identificados 56 (94,92%) cafeeiros resistentes heterozigotos e 3 (5,08%) resistentes

homozigotos (Tabela 13).

Tabela 13. Cafeeiros da população C6T-24 portadores dos marcadores CBD-Sat235 e CBD- Sat207 associados ao gene *Ck-1* que confere resistência à *C. kahawae*.

	Resistentes Homozigotos (DD)				
83	85	134	-	-	-
	Resistentes Heterozigotos (Dd)				
7	7	8	8	8	8
8	9	1	6	7	9
9	9	9	9	9	9
1	2	3	4	5	6
9	1	1	1	1	1
7	0	0	0	0	0
	0	3	4	5	6
1	1	1	1	1	1
0	0	0	1	1	1
7	8	9	0	1	2
1	1	1	1	1	1
1	1	2	2	2	2
4	5	1	2	3	5
1	1	1	1	1	1
2	2	2	3	3	3
6	7	8	1	2	3
1	1	1	1	1	1
3	3	3	3	4	4
5	6	7	9	0	2
1	1	1	1	1	1
4	4	4	4	4	4
3	4	5	7	8	9
1	1	1	1	1	1
5	5	5	5	5	5
0	1	2	4	5	6
1	1	-	-	-	-
5	5				
7	8				

A alta percentagem de cafeeiros resistentes (74,68%) era esperada, uma vez que essa população possui como uns de seus progenitores a cultivar Sarchimor e HdT, ambas resistentes a *C. kahawae* (GICHIMU et al. 2013; GICHIMU et al. 2014; ALKIMIM et al. 2017).

Foram observados um total de 16 recombinações. Os cafeeiros 80, 98, 99, 101, 102,141 e 159 não apresentaram a marca de resistência para o marcador CBD-Sat207, no entanto apresentaram essa marca em heterozigose para o marcador CBD-Sat 235. Quando analisado o marcador CBD-Sat235, cinco cafeeiros (88, 90, 129, 138 e 146) não apresentaram a marca de resistência, já com o CBD-Sat 235 esses cafeeiros apresentaram a banda.

Um outro tipo de recombinação ocorreu para o marcador CBD-Sat207, os cafeeiros 81, 87 e 133 foram resistentes heterozigotos para este marcador, enquanto que esses mesmos cafeeiros foram resistentes homozigotos para o marcador CBD-Sat235. O mesmo aconteceu

com marcador CBD-Sat235, no qual os cafeeiros 106, 111, 112 e 121 foram resistentes heterozigotos, no entanto para o marcador CBD-Sat 207 eles foram resistentes homozigotos.

A distância estimada dos dois marcadores, 17,2 cM, justifica o número grande de recombinantes encontrado. Quanto maior a distância entre marcadores, maior a chance de ocorrência de recombinações (CARNEIRO & VIEIRA, 2002). A recombinação pode resultar na perda do loco deresistência, portanto, deve-se analisar conjuntamente marcadores próximos e flanqueado o gene de interesse (ALKIMIM et al., 2017).

Portanto, para evitar que recombinações resultem na perda do gene, os cafeeiros que apresentaram alelo de suscetibilidade para pelo menos um dos marcadores analisados foram considerados como suscetíveis. Foram considerados resistentes e portadores do gene *Ck-1* apenas os cafeeiros que apresentaram a marca de resistência em ambos marcadores.

3.4 Análise conjunta dos dados moleculares e dados fenotípicos

Na busca de resistência duradoura a estratégia mais eficiente e de amplo espectro consiste na introdução e acúmulo de maior número de genes em uma cultivar, ou seja, a piramidação de alelos de resistência a doenças (KAUSHIK et al., 2016). Uma vez que a cultura do café é acometida por doenças que apresentam alta variabilidade genética associada a suplantação da resistência (ZAMBOLIM, 2016), a piramidação de alelos por meio da SAM se torna uma estratégia eficiente nos programas de melhoramento de *C. arabica*.

Nesse sentido, 37 cafeeiros da população C6T-10 e 23 da população C6T-24 (Tabela 14) apresentaram a piramidação dos diferentes alelos de resistência à *H. vastatrix* e a *C. kahawae*, ou seja, banda de resistência para todos os marcadores (CARF005, SSR 016, CaRHv9, CBD-Sat207 e CBD-Sat 235) avaliados na SAM. Portanto, esses cafeeiros devem ser priorizados no programa de melhoramento, pois possuem piramidação de maior número alelos de resistência a *H. vastatrix* e a *C. kahawae*.

Tabela 14. Cafeeiros das populações C6T-10 e C6T-24 com piramidação de alelos de resistência nos quatro loco de resistência a *H. vastatrix* analisados número de alelos (B_C_D_E_).

Cafeeiros da população C6T-10-B6-E3					
3	4	11	14	16	1
					9
22	24	25	26	28	3
					3
34	36	38	42	44	4
					6
47	49	50	51	53	5
					4
55	56	57	61	62	6
					4
65	66	68	70	71	7
					2
73	-	-	-	-	-
Cafeeiros da população C6T-24-B6-E3					
78	79	81	85	87	8
					9
91	92	93	94	110	1
					1
					1
114	126	127	131	132	1

					3
					4
135	137	143	144	149	-

Os cafeeiros selecionados por apresentarem piramidação de maior número de alelos para resistência a *H. vastatrix* e a *C. kahawae* foram analisados quanto a 12 características

morfoagronômicas de interesse para a cafeicultura (Tabela 15 e 16). Observou-se que os 60 cafeeiros foram resistentes a *H. vastatrix* em campo, apresentando notas 1 e 2. Esses dados confirmam a resistência identificada pelos marcadores moleculares.

Os dados fenotípicos mostraram que esses cafeeiros não apresentaram ou tiveram baixa incidência de cercosporiose (CER). A cercosporiose, cujo agente etiológico é o fungo *Cercospora coffeicola* Berkeley & Cooke, tem sido considerado também problema fitossanitário do café (JUNIOR et al., 2003, ZAMBOLIM et al., 2005). O patógeno pode infectar folhas e frutos do cafeeiro, causando perdas de 15% a 30% (GUIMARÃES et al., 2010), e pode prejudicar a qualidade da bebida, devido a processos de fermentação (ZAMBOLIM et al., 2005; MESQUITA et al., 2016).

Para a característica vigor (VIG), dos cafeeiros selecionados devido a piramidação de maior número de alelos, 18 cafeeiros da população C6T-10 e 14 da população C6T-24 apresentaram valores na média ou acima da média. Quanto às características produção, tamanho de fruto (TF) e uniformidade de maturação (UMT), para a população C6T-10, 15, 35 e 10 cafeeiros estão na média ou acima da média, respectivamente. Para a população C6T-24, todos apresentaram nota 3 para tamanho de fruto e 9 e 11 estão na média ou acima da média para uniformidade de maturação e produção, respectivamente. Na avaliação das características altura de plantas (APL), diâmetro de copa (DCO) e diâmetro de caule (DCA), na população C6T-10, 20, 21 e 21 cafeeiros respectivamente, estão na média ou acima da média. Na população C6T-24 foram 14, 10 e 12, respectivamente. Para número de ramos plageotrópicos (NRP), comprimento do ramo plageotrópico (CRP) e número de nós do ramo plageotrópico (NNR), encontraram-se na média ou acima da média na população C6T-10, 19, 17 e 13 cafeeiros, respectivamente. Já na população C6T-24, esses números são de 11, 9 e 12, respectivamente.

Com base nessas análises, é possível identificar genótipos contendo diferentes locos de resistência às principais doenças do cafeeiro e que apresentem características morfoagronômicas de interesse. Esses cafeeiros estão sendo selecionados para avanço de geração e cruzamento para formação de novo ciclo de retrocruzamento.

Diversos estudos, como os realizados por Severino et al. (2002) e Teixeira et al. (2012), demonstram alta correlação positiva entre as características fenotípicas em estudo, como vigore produtividade. Carvalho et al. (2010) analisaram a correlação entre caracteres vegetativos e a produtividade do cafezal e propuseram que o diâmetro do caule, a altura de plantas, o número e o comprimento de ramos plagiotrópicos podem ser utilizados para a

seleção indireta e precoce de genótipos de café mais produtivos.

O café é um produto cujo valor depende da qualidade da bebida (AVELINO et al., 2005), que por sua vez depende do nível de maturação dos frutos na colheita (SILVA et al., 2010; MARTINEZ et al., 2013; de OLIVEIRA et al., 2018). Assim, a qualidade de bebida é influenciada pela uniformidade de maturação dos frutos, uma vez que frutos mais maduros produzem uma bebida melhor e, portanto, um maior retorno aos agricultores. Sendo assim, cafeeiros com frutos uniformes (nota 1) ou mediamente uniformes (notas 2) são desejáveis.

Estas correlações são de grande importância para o melhoramento de plantas uma vez que auxiliam o melhorista na seleção e descarte precoce de acessos. Além disso, nem sempre é possível avaliar todas as características desejadas, já que se trata de um trabalho oneroso que demanda tempo e mão de obra especializada.

Assim, estes cafeeiros apresentam características potenciais de uso nos programas de melhoramento, principalmente por apresentarem características fenotípicas superiores e a piramidação de genes pronta para ser aproveitada nas próximas

Tabela 15. Genes de resistência e análise fenotípica dos 37 cafeeiros da população C6T-10 selecionados por apresentarem piramidação de maior número de alelos de resistência a *H. vastatrix* e *C. kahawae*.

mCafeeiro	Genótipo			VIG	TF	UMT	CER	FER	PRO	APL	DCO	DCA	NRP	CRP	NNR	
	SSR016	CaRHv9 CK-1	CARF005													
3	BB	C_	E_	<i>Dd</i>	8	3	3	1	1	0.1	118	143	44,4	40	56	17
4	BB	C_	E_	DD	6	3	3	2	1	3	105	133	33,23	44	68	22
11	BB	C_	E_	Dd	7,5	3	3	2	1	3,5	100	105	35,9	42	64	22
14	BB	C_	E_	Dd	5	3	2	2	1	0,5	89	83	19,21	40	41	18
16	BB	C_	E_	Dd	6,5	3	3	2	1	3,5	115	126	33	50	54	21
19	BB	C_	E_	Dd	6,5	3	3	2	1	3,5	134	138	37,58	48	60	22
22	BB	C_	E_	Dd	7	3	4	1	2	3	143	155	53	70	72	25
24	BB	C_	E_	DD	7	3	4	2	2	4	148	169	44	60	86	25
25	BB	C_	E_	Dd	8	3	3	2	2	4	138	159	45	74	74	27
26	BB	C_	E_	Dd	8	3	3	1	1	4,5	137	133	43	64	56	16
28	BB	C_	E_	Dd	7,5	3	3	2	1	3,5	129	142	46	60	55	78
33	BB	C_	E_	Dd	6	3	3	2	2	3	141	123	42	50	60	16
34	BB	C_	E_	Dd	8	3	4	2	2	2,5	125	134	39	50	50	14
36	BB	C_	E_	Dd	7	3	3	2	2	4	133	168	43	44	68	20
38	BB	C_	E_	Dd	8	3	3	2	2	6	145	159	46	68	80	21
42	BB	C_	E_	DD	8,5	4	3	2	2	5,5	135	143	46	64	77	23
44	Bb	C_	E_	Dd	4	3	4	2	2	1	84	78	34	40	50	20
46	BB	C_	E_	Dd	5	4	2	1	2	2	98	82	23	40	44	18
47	BB	C_	E_	Dd	5	2	4	2	2	2	101	80	26	54	42	14
49	BB	C_	E_	Dd	7	3	3	2	2	2,5	124	130	37	62	55	17
50	BB	C_	E_	Dd	7	3	3	2	2	2,5	107	131	32	56	62	18
51	BB	C_	E_	DD	7	3	3	2	2	2,5	94	98	39	44	54	16
53	BB	C_	E_	Dd	6,5	3	3	3	2	2	104	116	27	38	62	17
54	BB	C_	E_	DD	8	2	3	2	1	4,5	129	148	40,6	54	59	17

VIG = Vigor vegetativo; TF = Tamanho dos frutos maduros; UMT = Uniformidade de maturação dos frutos; CER = Incidência à Cercosporiose; FER = Incidência à ferrugem; PRO = Produção de frutos de café; APL = altura de planta; DCO = diâmetro de copa; DCA = diâmetro de caule; NRP = número de pares de ramos plagiotrópicos na haste principal; CRP = comprimento de um ramo plagiotrópicos representativo da planta; NNR = número de nós no ramo plagiotrópicos.

Genótipo

Tabela 15. Continuação.

Cafeiro	SSR016	CaRHv9	CARF005	CK-1	VIG	TF	UMT	CER	FER	PRO	APL	DCO	DCA	NRP	CRP	NNR
55	BB	C_	E_	D d	7	3	3	1	2	3	135	15 4	41 ,5	42	64	22
56	BB	C_	E_	D d	8	3	3	2	2	3	118	13 4	41 ,8	56	56	20
57	BB	C_	E_	D d	7	3	2	2	2	4	121	11 9	35 ,1	42	65	19
61	BB	C_	E_	D D	8	3	3	2	2	2, 5	145	15 7	47 ,8	68	77	27
62	BB	C_	E_	D d	8	3	3	3	1	4	147	18 3	43 ,1	68	72	21
64	BB	C_	E_	D d	7, 5	3	4	2	2	2, 5	122	15 7	42 ,3	60	64	21
65	BB	C_	E_	D d	7, 5	3	3	2	2	3, 5	138	15 6	46 ,4	58	59	19
66	BB	C_	E_	D d	8	3	4	2	2	3	151	15 9	49 ,6	62	72	25
68	BB	C_	E_	D d	8	3	4	2	2	2, 5	125	14 7	38	60	62	20
70	BB	C_	E_	D d	8	3	3	4	2	3, 5	136	16 9	38 ,5	62	80	24
71	BB	C_	E_	D d	7	3	4	2	2	2, 5	139	14 1	32 ,2	56	62	15
72	BB	C_	E_	D D	7	3	3	2	2	2, 5	122	15 3	42 ,6	60	66	23
73	BB	C_	E_	D D	8	3	4	2	2	3	122	14 7	34 ,4	60	66	19
Média					7, 6	3	3,3	-	-	3, 1	131	15 0,1	40 ,5	57	66	20 ,9

VIG = Vigor vegetativo; TF = Tamanho dos frutos maduros; UMT = Uniformidade de maturação dos frutos; CER = Incidência à Cercosporiose; FER = Incidência à ferrugem; PRO = Produção de frutos de café; APL = altura de planta; DCO = diâmetro de copa; DCA = diâmetro de caule; NRP = número de pares de ramos plagiotrópicos na haste principal; CRP = comprimento de um ramo plagiotrópicos representativo da planta; NNR = número de nós no ramo plagiotrópicos.

Tabela 16. Genes de resistência e análise fenotípica dos 23 cafeeiros da população C6T-24 selecionados por apresentarem piramidação de maior número de alelos de resistência a *H. vastatrix* e *C. Kahawae*.

.Cafeeiro	Genótipo			VIG	TF CRP	UMT	CER	FER	PRO	APL	DCO	DCA	NRP			
	SSR016	CaRHv9 CK-1	CARF005													
78	BB	C_	E_	Dd	7,5	3	3	2	2	5	125	148	45	60	64	
79	BB	C_	E_	Dd	7,5	3	3	2	2	6	133	150	43,5	66	59	
81	BB	C_	E_	Dd	6	3	4	3	2	4,5	128	144	45,2	56	60	
85	BB	C_	E_	DD	7,5	3	3	2	2	3	130	151	43,8	60	64	
87	BB	C_	E_	Dd	7	3	2	2	2	3	109	139	42,1	50	44	
89	BB	C_	E_	Dd	7	3	3	2	2	3,5	128	151	42,2	50	74	
91	BB	C_	E_	Dd	7	3	3	2	2	3	131	139	42,1	70	59	
92	BB	C_	E_	Dd	8	3	2	2	2	4,5	126	149	47,1	56	54	
93	BB	C_	E_	Dd	8	3	4	2	1	5	130	147	40,9	60	64	
94	BB	C_	E_	Dd	8	3	4	2	2	4,5	133	143	47,4	58	70	
110	BB	C_	E_	Dd	6,5	3	4	2	2	3,5	109	122	31,7	59	60	
111	BB	C_	E_	Dd	8	3	4	2	2	5	127	178	51,9	58	65	
114	BB	C_	E_	Dd	8	3	4	2	2	8	132	152	52,4	68	67	
126	BB	C_	E_	Dd	6	3	3	2	1	0,1	126	132	31,1	58	51	
127	BB	C_	E_	Dd	9	3	3	2	2	9	129	140	40	66	74	
131	BB	C_	E_	Dd	7	3	4	2	2	3,5	125	139	45	56	82	
132	BB	C_	E_	Dd	6	3	2	2	2	1	122	137	43,7	48	82	
134	BB	C_	E_	DD	8	3	4	2	2	3,5	139	171	38,4	64	90	
135	BB	C_	E_	Dd	7	3	4	2	2	2,5	126	133	40,3	58	65	
137	BB	C_	E_	Dd	8	3	3	2	2	3	133	165	47	66	89	
143	BB	C_	E_	Dd	8	3	3	2	2	4,5	144	153	42,7	64	80	
144	BB	C_	E_	Dd	8	3	3	2	2	3,5	139	144	41	66	86	
149	BB	C_	E_	Dd	8	3	3	2	2	6	130	142	38	54	70	
Média											7,4	3	3,3	-		
68,4											-	4,1	128	146,5	42,7	59,6

VIG = Vigor vegetativo; TF = Tamanho dos frutos maduros; UMT = Uniformidade de maturação dos frutos; CER = Incidência à Cercosporiose; FER = Incidência à ferrugem; PRO = Produção de frutos de café; APL = altura de planta; DCO = diâmetro de copa; DCA = diâmetro de caule; NRP = número de pares de ramos plagiotrópicos na haste principal; CRP = comprimento de um ramo plagiotrópicos representativo da planta; NNR = número de nós no ramo plagiotrópicos.

3.5 Estudo de diversidade genética da População C6T-10

As populações em estudo fazem parte de um programa de melhoramento pelo método de seleção recorrente. Este método se baseia num processo cíclico de seleção e recombinação de indivíduos ou progênes superiores, que iniciam em uma população base geneticamente heterogêneas. Sua finalidade é o aumento da frequência de alelos favoráveis gradativamente, sem exaurir a variabilidade genética (HALLAUER et al., 1985; RAMYA, et al., 2016).

Portanto, na formação de população para obtenção de novo ciclo de retrocruzamento, devem ser cruzados genótipos que apresentam características de interesse agrônômico e que possuem variabilidade genética. Cruzamentos de genótipos divergente permitem ganho de seleção. Dessa forma, as progênes em estudo foram também analisadas quanto a diversidade genética. Os estudos de diversidade genética são de grande importância para o conhecimento da estrutura e distribuição da variação entre e dentro das populações, direcionar cruzamentos futuros, para o planejamento de programas de melhoramento e para a definição de estratégias de trabalho (GUEDES et al., 2013). Especialmente, na seleção recorrente, a manutenção da diversidade ao longo dos ciclos é essencial para o ganho contínuo de seleção.

Com o intuito de identificar indivíduos mais divergentes na população para direcionar cruzamentos futuros e, manter a diversidade genética ao longo dos ciclos de seleção, oito *primers* microssatélites (Tabela 4) foram utilizados para a análise da diversidade dentro da população. Os *primers* utilizados permitiram a identificação de 1 a 2 alelos por loco.

Por meio dos dados moleculares foi gerada uma matriz de dissimilaridade genética baseada na distância de Nei e Li (NEI & LI 1979). A utilização dessa distância se faz justificável uma vez que a mesma não considera coincidências do tipo 0-0 impedindo que a não amplificação de bandas seja interpretada como uma característica comum (CRUZ et al., 2011). Dessa forma, no dendrograma (Figura 4) gerado a partir dos dados moleculares foi possível observar a formação de três grandes grupos.

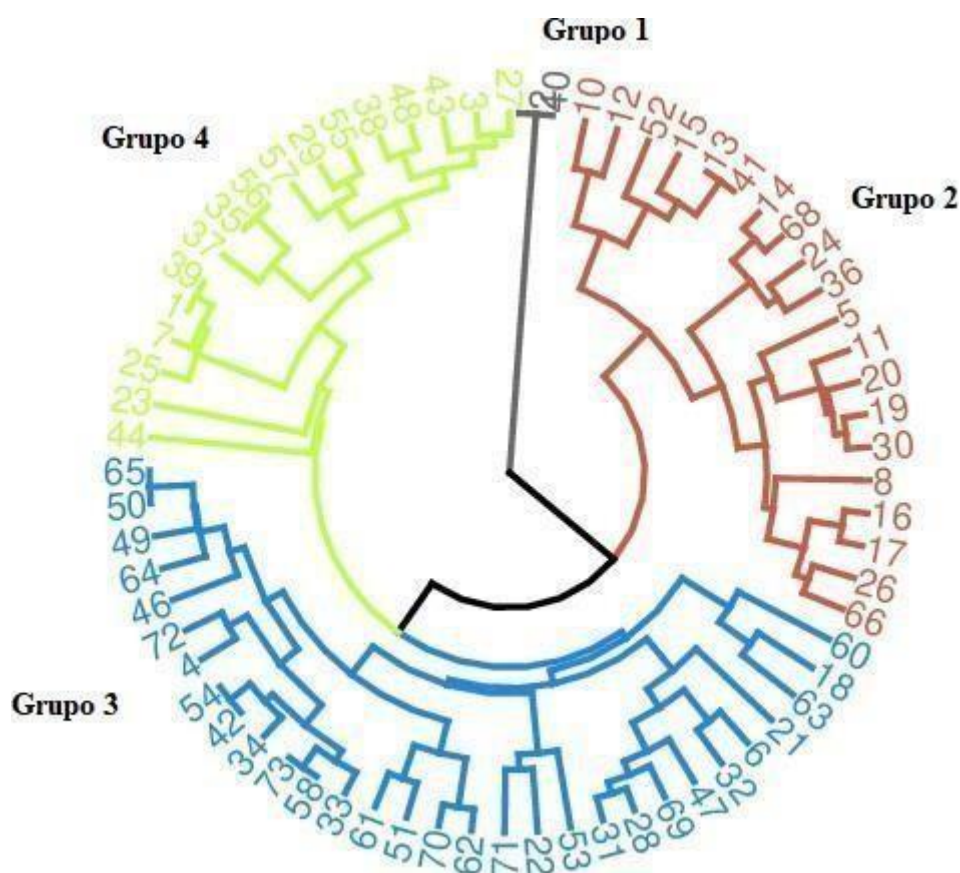


Figura 4. Dendrograma gerado pela análise de cafeeiros arábica com oito marcadores moleculares e técnica UPGMA, com base na matriz de dissimilaridade do complemento aritmético do índice não ponderado.

No grupo I (cinza) ficaram agrupados as testemunhas suscetíveis à ferrugem utilizadas no delineamento do experimento em campo, Catuaí Vermelho IAC 144 (02 e 40). O grupo II (marron) ficou constituído por vinte genótipos da progênie F2 (cafeeiros 5, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 19, 20, 24, 26, 30, 36, 41, 52, 66, 68). Esse grupo pode ser subdividido em dois, grupo IIa contendo os genótipos 10, 12, 13, 15, 41 e 52, grupo IIb com os demais. Maior similaridade foi observada entre os cafeeiros 13 e 41.

O terceiro e maior grupo foi formado por 30 cafeeiros. Nesse *cluster* também foi possível observar o índice de similaridade máximo entre alguns cafeeiros, como é o caso dos cafeeiros 65 e 50, 54 e 42, 73 e 58. O grupo quatro ficou composto por 15 cafeeiros (3, 23, 25, 27, 29, 35, 37, 38, 39, 43, 44, 48, 55, 56, 57) e as testemunhas resistentes à ferrugem utilizadas no delineamento do experimento em campo Paraíso MG H 419-1 (01 e 39). Máxima similaridade foi observada entre os cafeeiros 56 e 35, e entre as testemunhas

01 e 39.

Os 37 cafeeiros dessa população selecionados por apresentarem a piramidação dos quatro locos de resistência a *H. vastatrix* e *C. kahawae* (Tabela 16), estão distribuídos em todos os grupos. O grupo II possui nove cafeeiros selecionados (cafeeiros 11, 14, 16, 19, 24, 26, 36, 66, 68). Sete cafeeiros (cafeeiros 3, 25, 38, 44, 55, 56, 57) ficaram agrupados no grupo IV e os demais 21 cafeeiros selecionados ficaram no III.

Esses dados permitem selecionar genótipos contendo a piramidação de genes de resistência a doenças e em grupos distintos para serem cruzados e formarem a população do próximo ciclo de seleção recorrente.

Dessa forma, recomenda-se, por exemplo, o cruzamento do cafeeiro 26 (pertencente ao grupo IIb do dendrograma) como cafeeiro 38 (do grupo IV) para assegurar maior potencial para ganho genético. Além disso, esses cafeeiros apresentam boas características fenotípicas, como vigor e produção.

4 CONCLUSÕES

O uso de marcadores moleculares foi eficiente na identificação de indivíduos com a piramidação de alelos de resistência a doenças e na estimativa da diversidade genética dentro da população C6T-10. A Seleção Assistida por Marcadores permitiu identificar 37 cafeeiros da população C6T-10 e 23 da população C6T-24 com piramidação de maior número de alelos de resistência à *H. vastatrix* e a *C. kahawae*. Esses cafeeiros podem ser utilizados como fonte de resistência para novos cruzamentos. A fenotipagem em campo confirmou a resistência dos cafeeiros selecionados pelos marcadores. Os dados moleculares e fenotípicos permitiram selecionar cafeeiros contendo a piramidação dos quatro locos de resistência a doença, bem como características morfoagronômicas de interesse e variabilidade genética. Esses cafeeiros podem ser utilizados no cruzamento para obtenção de novo ciclo de retrocruzamento.

5 REFERÊNCIAS

Agwanda, C.O., Lashermes, P., Trouslot, P., et al (1997). Identification of RAPD markers for resistance to coffee berry disease, *Colletotrichum kahawae*, in arabica coffee. *Euphytica*, 97(2): 241-248.

Agarwal, M., Shrivastava, N., & Padh, H. (2008). Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant cell reports*, 27(4): 617- 631.

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

Almeida, D. P. (2015) Desenvolvimento e utilização de marcadores moleculares para seleção de cafeeiros resistentes à ferrugem. Dissertação (Mestrado em genética e melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, 2015.

Almeida, D. P. (2019) Clonagem e caracterização de um novo gene putativo de resistência d cafeeiro a *Hemilia vastatrix* e aplicação na seleção assistida. Tese (Doutorado em genética e melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, 2019.

Alvarenga, S. M., Caixeta E. T., Hufnagel B., et al (2011) Marcadores moleculares derivados de sequências expressas do genoma café potencialmente envolvidas na resistência à ferrugem. *Pesqui Agropecuária Bras* 46:890–898.

Avelino, J., Barboza, B., Araya, J. C., Fonseca, C., Davrieux, F., Guyot, B., & Cilas, C. (2005). Effects of slope exposure, altitude and yield on coffee quality in two altitude terroirs of Costa Rica, Orosi and Santa María de Dota. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(11), 1869-1876.

Bettencourt, A.J., Rodrigues CJ (1988) Principles and practice of coffee breeding for resistance to rust and other diseases. *Coffee Agron* 4:199–234.

Bridson D. M. (1982) Studies in *Coffea* and *Psilanthus* (Rubiaceae subfam. Cinchonoideae) for Part 2 of “Flora of Tropical East Africa”: Rubiaceae. *Kew Bull* 36:817.

Caixeta, E. T., Pestana, K. N., & Pestana, R. K. N. (2015). Melhoramento docafeeiro: ênfase na aplicação dos marcadores moleculares. Embrapa Café-Capítulo em livro científico (ALICE).

Carneiro, M. S., & Vieira, M. L. C. (2002). Mapas genéticos emplantas. *Bragantia*, 61(2), 89-100.

Carvalho, A. M. D., Mendes, A. N. G., Carvalho, G. R., Botelho, C. E., Gonçalves, F.

M. A., & Ferreira, A. D. (2010). Correlação entre crescimento e produtividade de cultivares de café em diferentes regiões de Minas Gerais, Brasil. *Pesquisa agropecuária brasileira*, 45(3): 269- 275.

Combes, M. C., 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.

Cruz, C. D., Ferreira, F. M., & Pessoni, L. A. (2011). *Biometria aplicada ao estudo da diversidade genética*. Visconde do Rio Branco: Suprema, 620.

Cubry, P., Musoli, P., Legnaté, H. et al (2008) Diversity in coffee assessed with SSR markers: structure of the genus *Coffea* and perspectives for breeding. *Genome* 51:50–63.

de Brito, G. G., Caixeta, E. T., Gallina, A. P., et al (2010) Inheritance of coffee leaf rust resistance and identification of AFLP markers linked to the resistance gene. *Euphytica* 173:255–264.

de Oliveira Aparecido, L. E., Rolim, G. D. S., Moraes, J. R. D. S. C. D., Valeriano, T.

T. B., & Lense, G. H. E. (2018). Maturation periods for *Coffea arabica* cultivars and their implications for yield and quality in Brazil. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(10), 3880-3891.

Diniz, L. E., Sakiyama, N. S., Lashermes, P., Caixeta, E. T., Oliveira, A. C. B., Zambolim, E. M., ... & Zambolim, L. (2005). Analysis of AFLP markers associated to the Mex- 1 resistance locus in Icatu progenies. *Crop breeding and applied technology*, 5(4), 387.

Diola, V., de Brito, G. G., Caixeta, E. T., Maciel-Zambolim, E. et al(2011) High- density genetic mapping for coffee leaf rust resistance. *Tree genetics & genomes*, 7:1199-1208.

Ferrão, L. F. V., Caixeta, E. T., Pena, G. et al (2015) New EST–SSR markers of *Coffea arabica*: transferability and application to studies of molecular characterization and genetic mapping. *Molecular Breeding*, 35:31.

Freitas, Z. M. T. S., Oliveira, F. J., Carvalho, S. P., Santos, V. F., Santos, J. P. (2007) Avaliação de caracteres quantitativos relacionados com o crescimento vegetativo entre cultivares de café arábica de porte baixo. *Bragantia*, 66, 267:275.

Gichuru, E. K., Agwanda, C. O., Combes, M. C. et al(2008a) Identification of molecular markers linked to a gene conferring resistance to coffee berry disease (*Colletotrichum kahawae*) in *Coffea arabica*. *Plant Pathol* 57:1117–1124.

Gichimu, B. M., Gicheru, E. K., Mamati, G. E., & Nyende, A. B. (2013). Variation and association of cup quality attributes and resistance to Coffee Berry Disease in *Coffea arabica* L. composite cultivar, Ruiru 11. *African Journal of Horticultural Science*, 7: 22–35.

Gichimu, B. M., Gichuru, E. K., Mamati, G. E., & Nyende, A. B. (2014). Occurrence of Ck-1 gene conferring resistance to Coffee Berry Disease in *Coffea arabica* cv. Ruiru 11 and its parental genotypes. *Journal of Agricultural and Crop Research*, 2: 51–61.

Grover, A., Sharma, P. C. (2016) Development and use of molecular markers: past and present. *Critical reviews in biotechnology*, 36: 290-302.

Guimarães, R. J., Mendes, A. N. G., & Baliza, D. P. (2010). Semiologia do cafeeiro: Sintomas de desordens nutricionais, fitossanitárias e fisiológicas. *Lavras: Ed. UFLA*.

Hallauer, A. R., Darrah, L. L. (1985) Compendium of recurrent selection methods and their application. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 3(1): 1–33.

INTERNATIONAL COFFEE ORGANIZATION –ICO. Total Production by all exporting countries. London: 2018.

Júnior, D. G., Pozza, E. A., Pozza, A. A., et al (2003) Incidência e severidade da cercosporiose do cafeeiro em função do suprimento de potássio e cálcio em solução nutritiva. *Fitopatologia Brasileira*, 28:286-291.

Kaltchuk-Santos, E., Bodanese-Zanettini, M. H. (2002) Androgênese: uma rota alternativa no desenvolvimento do pólen. *Ciência Rural*, 32: 165-173.

Kaushik, A., Kaswan, V., Sharma, S., & Kumar, R. (2016). Gene Pyramiding: A Novel Approach for Disease Resistance. *Annals of Biology*, 32(1), 13-16.

Lashermes, P., Combes, M. C., Robert, J. et al (1999) Molecular characterisation and origin of the *Coffea arabica* L. genome. *Molecular and General Genetics MGG*, 261:259- 266. Manuel, L., Talhinhos, P., Várzea, V., Neves-Martins, N. (2010) Characterization of *Colletotrichum kahawae* isolates causing coffee berry disease in Angola. *J Phytopathol* 158:310–313.

Martinez, H. E. P., Poltronieri, Y., Farah, A., & Perrone, D. (2013). Zinc supplementation, production and quality of coffee beans. *Revista Ceres*, 60(2), 293-299.

Morais, T. P. D., & Melo, B. D. (2011). Biotecnologia aplicada ao melhoramento genético do cafeeiro. *Ciência Rural*, 41(5), 753-760.

Nei, M., & Li, W. H. (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(10), 5269- 5273.

Noronha-Wagner, M., Bettencourt AJ (1967) Genetics study of resistance of coffee spp. to leaf rust. Identification and behaviour of four factors conditioning disease reaction in coffee arabica to twelve physiologic races of *Hemileia vastatrix*. *Can J Bot* 45:2021–2031.

Oliveira, A. C. B., Sakiyama, N. S., Caixeta, E. T. et al (2007) Partial map of *Coffea arabica* L. and recovery of the recurrent parent in backcross progenies. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 7(2): 196-203.

Pestana, K. N., Capucho, A. S., Caixeta, E. T., de Almeida, D. P., Zambolim, E. M., Cruz, C. D., ... & Sakiyama, N. S. (2015). Inheritance study and linkage mapping of resistance loci to *Hemileia vastatrix* in Híbrido de Timor UFV 443-03. *Tree genetics & genomes*, 11(4): 72.

Phumichai, C., Phumichai, T., Wongkaew, A. (2015) Novel chloroplast microsatellite (cpSSR) markers for genetic diversity assessment of cultivated and wild *Hevea* rubber. *Plant molecular biology reporter*, 33:1486-1498.

Romero, G., Vásquez, L. M., Lashermes, P., & Herrera, J. C. (2014). Identification of a major QTL for adult plant resistance to coffee leaf rust (*Hemileia vastatrix*) in the natural Timor hybrid (*Coffea arabica* x *C. canephora*). *Plant breeding*, 133(1), 121-129.

Severino, L. S., Sakiyama, N. S., Pereira, A. A., Miranda, G. V., Zambolim, L., & Barros, U. V. (2002). Associações da produtividade com outras características agronômicas de café (*Coffea arabica* L. “Catimor”). *Acta Scientiarum. Agronomy*, 24: 1467-1471.

Silva, S. D. A., Lima, J. D. S., & Alves, A. I. (2010). Spatial study of grain yield and percentage of bark of two varieties of *Coffea arabica* L. to the production of quality coffee. *Bioscience Journal*, 26(4): 558-565.

Sousa, T. V., Caixeta, E. T., Alkimim, E. R., de Oliveira, A. C. B., Pereira, A. A., Zambolim, L., & Sakiyama, N. S. (2017). Molecular markers useful to discriminate *Coffea arabica* cultivars with high genetic similarity. *Euphytica*, 213(3): 75.

Teixeira, A. L., Gonçalves, F. M. A., Rezende, J. C. D., Carvalho, S. P. D., Pereira, A. A., Moraes, B. F. X. D., & Teixeira, L. G. V. (2012). Seleção precoce para produção de grãos em café arábica pela avaliação de caracteres morfológicos. *Pesquisa agropecuária brasileira*, 47(8): 1110-1117.

Tobar, L. M. S. (2019) Piramidação de alelos de resistência a patógenos em cafeeiros arábica utilizando seleção recorrente assistida por marcadores moleculares. Tese (Doutorado em fitotecnia) - Universidade Federal de Viçosa, 2019.

Tozzi, F. R. O., Ghini, R. (2016) Impacto do aumento da concentração atmosférica

de dióxido de carbono sobre a ferrugem e o crescimento do cafeeiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 51:933-941.

Van der Vossen, H. A. M., Walyaro, D. J. (1980) Breeding for resistance to coffee berry disease in *Coffea arabica* L. II. Inheritance of the resistance. *Euphytica*, 29:777- 791.

Vieira, Y., Silva, D. N., Varzea, V. M. P., Paulo, O. S., & Batista, D. (2019). Genome- wide signatures of selection in *Colletotrichum kahawae* reveal candidate genes potentially involved in pathogenicity and aggressiveness. *Frontiers in microbiology*, 10, 1374.

Zambolim, L., Vale, F. R., Zambolim, E. M. (2005) Doenças do cafeeiro. In: KIMATI, H. et al. (Ed.). *Manual de fitopatologia: doenças de plantas cultivadas*. 4. ed. São Paulo: Ceres. 2:165-180.

Zambolim L (2016) Current status and management of coffee leaf rust in Brazil. *Trop Plant Pathol* 41:1–8.