

ANA CAROLINA ANDRADE SILVA

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E ESTUDO DE AUTOINCOMPATIBILIDADE
GAMETOFÍTICA DE CAFEEIROS AMAZÔNICOS**

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

Coorientador: Rodrigo Barros Rocha

ANA CAROLINA ANDRADE SILVA

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E ESTUDO DE AUTOINCOMPATIBILIDADE
GAMETOFÍTICA DE CAFEIROS AMAZÔNICOS**

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: 26 DE FEVEREIRO DE 2024

Assentimento:

Ana Carolina Andrade Silva
Autora

Eveline Teixeira Caixeta
Orientadora

**Em memória do meu pai, Eduardo
Silva,**

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Deus, obrigada! Obrigada por me conceder saúde, resiliência, inteligência, pessoas extraordinárias, sabedoria e fé para concluir o doutorado.

Agradeço a minha mãe Delizete, minha irmã Camila, meus sobrinhos Victor, Miguel e Rafael, e meu cunhado Alex por apoiarem meus estudos e serem base e suporte para chegar até aqui. Agradeço ao meu pai, Eduardo, que foi fazer sua morada no céu, mas que sempre deixou claro o seu orgulho em ter mais uma filha doutora. Obrigada por desde cedo, ensinarem que o estudo muda vidas!

Agradeço ao meu noivo Ruan por todo suporte emocional, amor incondicional, palavras de acolhimento e motivação. Obrigada por sido presente em todos os dias do doutorado, mesmo sendo alguns a 1500 km de distância. Obrigada por sonhar meus sonhos comigo!

As minhas amigas, em especial a Jaqueline Bicalho e Adriana Jung. Obrigada por me encorajarem, serem escuta e apoio.

Agradeço a minha orientadora Dra. Eveline Caixeta. Obrigada por toda orientação profissional e pessoal nestes bons anos de pós-graduação. Sua força, generosidade, profissionalismo e amizade serão levados comigo aonde eu estiver.

Ao Biocafé, pelo acolhimento nestes anos, ensinamentos e cafezinhos. Em especial a Letícia Faria e Bruno, os quais não mediram esforços para ajudar na realização deste e outros trabalhos.

A Embrapa Rondônia, em especial os pesquisadores Dr. Rodrigo Rocha e Dr. Alessandro Teixeira, por cederem as plantas e demais dados para realização do trabalho. Além, de serem sempre solícitos.

Agradeço a disponibilidade da banca examinadora em participar da defesa de tese.

Agradeço a Universidade Federal de Viçosa (UFV) e ao Programa de Pós-Graduação e Genética e Melhoramento pelo ensino de excelência.

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

À CAPES, CNPq e FAPEMIG pela concessão da bolsa de estudos e o financiamento da pesquisa.

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

**“Em tudo dai graças ao Senhor, em toda e qualquer situação, porque esta é a vontade de Deus,
no Cristo Jesus, a vosso respeito.”**

(1Ts 5, 16-18)

RESUMO

SILVA, Ana Carolina Andrade, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2024.
Caracterização molecular e estudo de autoincompatibilidade de cafeeiros amazônicos.
Orientador: Eveline Teixeira Caixeta. Coorientador: Rodrigo Barros Rocha.

A caracterização dos materiais genéticos de café desempenha um papel crucial no desenvolvimento de variedades mais resilientes e adaptadas às condições climáticas em mudança, contribuindo para a sustentabilidade e o futuro da produção de café. Dentre as centenas de espécies do gênero *Coffea* já descritas, a espécie *Coffea canephora* se destaca por apresentar características válidas na adaptação às condições climáticas (resistência a pragas e doenças, tolerância a seca, ampla distribuição geográfica). É uma espécie diploide, alógama e que possui autoincompatibilidade gametofítica. Ampliar os estudos para melhor conhecimento desta autoincompatibilidade também se torna essencial, uma vez que para se obter cruzamentos promissores, é necessário genitores de grupos de compatibilidade diferente, para que ocorra a fertilização. Sendo assim, os objetivos do presente trabalho foram: (i) avaliar a diversidade genética de cafeeiros provenientes do programa de melhoramento da Embrapa Rondônia juntamente com genótipos de produtores locais, via marcadores moleculares SNP; (ii) usar marcadores moleculares para identificação de cafeeiros contendo diferentes genes de resistência às principais doenças da cultura: ferrugem e CBD e (iii) sequenciar e avaliar diferenças em regiões de interesse do gene S, que podem estar relacionadas ao mecanismo de autoincompatibilidade gametofítica na espécie *C. canephora*. Os marcadores SNPs utilizados permitiram diferenciar e caracterizar com eficiência os cafeeiros em estudo. O dendrograma pela análise destes marcadores ficou dividido em cinco grupos. O grupo I e o grupo IV alocaram dois cafeeiros cada. O grupo II alocou 33, de sua grande maioria pertencentes a variedade botânica Robusta. O grupo III ficou constituído por 18 cafeeiros, pertencentes a variedade botânica Conilon. Por fim, o quinto e maior grupo alocou 85 cafeeiros, sendo a maioria correspondente a híbridos entre as duas variedades botânicas. Marcadores moleculares ligados a genes de resistência a doenças também possibilitaram a identificação de cafeeiros contendo piramidação de alelos de resistência a *Hemileia vastatrix* e *Colletotrichum. kahawae*. Quanto ao estudo de autoincompatibilidade, as sequências de DNA dos genótipos dos diferentes grupos de autoincompatibilidade foram alinhadas e não foi encontrado polimorfismo. Ao realizar o BLAST entre a sequência consenso obtida do sequenciamento realizado com o *primer* HVa3 e o genoma de referência de *C. canephora*, observou-se que há duas regiões de alinhamento no

cromossomo 2, com grande quantidade de *mismatch* e *Gap*. Esta diferença observada pode ser decorrente da ampla diversidade genética presente na espécie. Além disso, o genoma de referência disponível foi obtido de um cafeeiro geneticamente distante dos Robustas Amazônicos e Conilons cultivados no Brasil. O alinhamento entre as duas sequências amplificadas em regiões distintas no genoma de *C. canephora* com o *primer* Hva3 mostrou serem idênticas. Este resultado pode ser um indício dessas serem regiões repetitivas dispersas no genoma da espécie. Portanto, foi possível identificar cafeeiros divergentes geneticamente, contendo a piramidação de alelos de resistência a *H. vastatrix* e *C. kahawae*. E, este estudo de autoincompatibilidade abre portas para que novos estudos possam ser realizados a partir deste.

Palavras-chave: *Coffea canephora*. *Hemileia vastatrix*. CBD. SNP. Gene S. Grupos de compatibilidade.

ABSTRACT

SILVA, Ana Carolina Andrade, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February 2024. **Molecular characterization and study of gametophytic self-incompatibility in Amazonian coffee.** Adviser: Eveline Teixeira Caixeta. Co-adviser: Rodrigo Barros Rocha.

The characterization of coffee genetic materials plays a crucial role in developing varieties that are more resilient and adapted to changing climate conditions, contributing to the sustainability and future of coffee production. Among the hundreds of species of the genus *Coffea* already described, the species *Coffea canephora* stands out for presenting valid characteristics in adapting to climatic conditions (resistance to psychological conditions and diseases, tolerance to drought, wide geographic distribution). It is a diploid, allogamous species that has gametophytic self-incompatibility. Expanding studies to better understand this self-incompatibility is also essential, since to obtain promising crosses, parents from different compatibility groups are needed for fertilization to occur. Therefore, the objectives of the present work were: (i) to evaluate the genetic diversity of coffee trees from the Embrapa Rondônia breeding program together with genotypes from local producers, via SNP molecular markers; (ii) use molecular markers to identify coffee plants containing different resistance genes to the main diseases of the crop: rust and CBD and (iii) sequence and verify differences in regions of interest of the S gene, which may be related to the gametophytic self-incompatibility mechanism in species *C. canephora*. The SNP markers used allowed us to efficiently differentiate and characterize the coffee trees under study. The dendrogram based on the analysis of these markers was divided into five groups. Group I and group IV allocated two coffee plants each. Group II allocated 33, the vast majority of which belonged to the Robusta botanical variety. Group III consisted of 18 coffee plants, belonging to the Conilon botanical variety. Finally, the fifth and largest group allocated 85 coffee plants, the majority of which corresponded to hybrids between the two botanical varieties. Molecular markers linked to disease resistance genes also made it possible to identify coffee plants containing pyramiding of resistance alleles to *Hemileia vastatrix* and *Colletotrichum. kahawae*. Regarding the self-incompatibility study, the DNA sequences of the genotypes of the different self-incompatibility groups were aligned and no polymorphism was found. When performing BLAST between the consensus sequence obtained from sequencing carried out with the HVa3 primer and the reference genome of *C. canephora*, it was observed that there are two regions of alignment on

chromosome 2, with a large amount of mismatch and gap. This observed difference may be due to the wide genetic diversity present in the species. Furthermore, the available reference genome was obtained from a coffee plants genetically distant from the Amazonian Robustas and Conilons cultivated in Brazil. The alignment between the two sequences amplified in different regions of the *C. canephora* genome with the Hva3 primer showed that they were identical. This result may be an appeal to these repetitive regions scattered throughout the species' genome. Therefore, it was possible to identify genetically divergent coffee plants, containing the pyramidation of resistance alleles to *H. vastatrix* and *C. kahawae*. And, this self-incompatibility study opens the door for new studies to be carried out based on this.

Keywords: *Coffea canephora*. *Hemileia Vastatrix*. CBD. SNP markers. Gene S. Compatibility groups.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL.....	12
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	14
CAPÍTULO I	16
RESUMO.....	17
1. Introdução.....	18
2. Material e Métodos.....	20
2.1 Estudo de Diversidade Genética Molecular	20
2.1.1 Material Genético	20
2.1.2 Análise de qualidade de marcadores moleculares SNP	24
2.1.3 Análise de diversidade genética	24
2.2 Marcadores Moleculares associados a resistência a ferrugem e CBD	25
3. Resultados	30
3.1 Estudo de Diversidade Genética Molecular	30
3.2 Marcadores Moleculares associados a resistência a ferrugem e CBD	33
3.2.1. Marcadores ligados ao gene <i>SH3</i> de resistência à <i>H. vastatrix</i> (Loco A). 33	
3.2.2 Marcadores moleculares ligados aos QTL que conferem resistência as raças I, II e ao patótipo 001 de <i>H. vastatrix</i> (Loco B e C)	33
3.2.3 Marcador funcional NB-ARC de resistência a <i>H. vastatrix</i> (Loco D).....	40
3.2.4 Marcador funcional RLK 2 de resistência a <i>H. vastatrix</i> (Loco E).....	40
3.2.5 Marcadores SSR ligados ao gene <i>Ck-1</i> de resistência à <i>C. kahawae</i> (Loco F)	41
4. Discussão	41
4.1 Estudo de Diversidade Genética Molecular	41
4.2 Marcadores Moleculares associados a resistência a ferrugem e CBD	43
5. Conclusões.....	47
6. Referências bibliográficas.....	47
CAPÍTULO II	53
RESUMO.....	54
1. Introdução.....	55
2. Material e Métodos.....	56
2.1 Material genético.....	56
2.2 Seleção de <i>primers</i> para estudo de autoincompatibilidade em <i>C. canephora</i>	56
2.3 Sequenciamento Sanger	57

2.3.1 Amplificação dos fragmentos em gel de poliacrilamida para sequenciamento	57
2.3.2 Sequenciamento de banda de gel de poliacrilamida e análise comparativa dos fragmentos sequenciados	58
3.Resultados e Discussão	58
4. Conclusões.....	69
5. Referências Bibliográficas	69

INTRODUÇÃO GERAL

Conhecer os materiais genéticos de café disponíveis para direcionar futuros cruzamentos em programas de melhoramento da cultura, é um dos caminhos para se obter materiais resilientes as novas condições climáticas (altas temperaturas e chuvas irregulares) (Jawo et al., 2023). Dentre as mais de 124 espécies de *Coffea* já descritas (Davis, 2011), a espécie *Coffea canephora* se destaca por ter uma ampla distribuição geográfica (Maurin et al., 2007).

C. canephora é uma planta diploide ($2n=2x=22$) e alógama. Possui um sistema de autoincompatibilidade gametofítica (Berthaud, 1980; Rocha et al., 2015), o que favorece seu sistema de reprodução sexuada e o aumento variabilidade genética (Moraes et al., 2018; Ferrão et al., 2019). A expressão de autoincompatibilidade nesta espécie é governada por um gene multialélico, identificado pela letra S (S1, S2 e S3) (Berthaud, 1980; Ferrão et al., 2017). Estudar as regiões do gene S que podem estar relacionadas ao mecanismo de autoincompatibilidade gametofítica na espécie é uma forma de prever a qual grupo de compatibilidade os cafeeiros pertencem. Essa estratégia facilita o direcionamento dos cruzamentos entre cafeeiros pertencentes a grupos de compatibilidade diferentes, de modo a garantir a fertilização do cruzamento.

Originário na África, a espécie cafeeira *C. canephora* se expandiu por diversos países tropicais e subtropicais, com destaque para o Brasil (Ferrão et al., 2017). O estado de Rondônia é o segundo maior produtor da espécie no país. Seus campos de produção são formados por cultivares lançadas pelo programa de melhoramento da Embrapa Rondônia (Teixeira et al., 2020; Rocha et al., 2021), além de clones selecionados pelos produtores locais (Espindula et al., 2022). Apesar do país ser reconhecido como maior produtor e exportador de café, estresses bióticos e abióticos podem afetar as safras, principalmente com as mudanças climática (Jawo et al., 2023). Consequentemente, levam a perda de produtividade e aumento o custo de produção.

Dentre os fatores que podem limitar a produção desses cafeeiros, destacam-se as doenças fúngicas. A ferrugem causada por *Hemileia vastatrix* e *Coffee berry disease* (CBD) causada por *Colletotrichum kahawae*, são as principais doenças que acometem o cafeeiro (Zambolim e Caixeta, 2021; Lu et al., 2022). O uso de cultivares resistentes para o controle dessas doenças nos cafezais é uma alternativa econômica e sustentável (Gimase et al., 2020; Hordofa, 2021; Almeida et al., 2021). Para contornar estes desafios e acelerar o processo de obtenção de novas cultivares, ferramentas biotecnológicas estão disponíveis, a exemplo dos marcadores moleculares de DNA.

Marcadores moleculares ligados a genes de resistência a *H. vastatrix* e a *C. kahawae* estão disponíveis, o que possibilita a identificação de cafeeiros portadores de genes de resistência a esses patógenos (Gichuru et al., 2008; Alkimim et al., 2017; Almeida et al., 2021). A utilização desses marcadores permite a identificação de cafeeiros com piramidação dos alelos de resistência a essas doenças e demais características agronômicas de interesse. Assim, o uso desses marcadores auxilia o melhorista na escolha de genitores resistentes, presentes no germoplasma, para serem incorporados nos programas de melhoramento e para avanço de geração (Caixeta et al., 2016; Almeida et al., 2021).

Os marcadores moleculares de DNA também são de grande valia para estudos de diversidade genética (Silva et al., 2018; Medeiros et al., 2021; Faria, 2022; Saavedra et al., 2023). O sequenciamento de Nova Geração (NGS) facilitou e acelerou a descoberta de marcadores SNP (Single Nucleotide Polimorphism). Estes podem ser utilizados para avaliar a diversidade genética molecular, uma vez que são o tipo de polimorfismo mais abundante nos genomas, além de serem codominantes e bialélicos (Alkimim et al., 2018; Faria et al., 2022). Essas características tornam esses marcadores informativos e úteis para caracterização molecular e estudo detalhado da diversidade genética.

Desse modo, os objetivos do presente estudo foram (i) avaliar a diversidade genética de cafeeiros provenientes do programa de melhoramento da Embrapa Rondônia juntamente com genótipos de produtores locais, via marcadores moleculares SNP; (ii) usar marcadores moleculares para identificação de cafeeiros contendo diferentes genes de resistência às principais doenças da cultura: ferrugem e CBD e (iii) sequenciar e avaliar diferenças em regiões de interesse do gene *S*, que podem estar relacionadas ao mecanismo de autoincompatibilidade gametofítica na espécie *C. canephora*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alkimim ER, Caixeta ET, Sousa TV et al (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*, 37:1-10.
- Alkimim ER, Caixeta ET, Sousa TV et al (2018). High-throughput targeted genotyping using next-generation sequencing applied in *Coffea canephora* breeding. *Euphytica*, 214:1-18.
- Almeida DP, Caixeta ET, Moreira KF et al (2021). Marker-assisted pyramiding of multiple disease resistance genes in coffee genotypes (*Coffea arabica*). *Agronomy*, 11:1763.
- Berthaud J (1980). L'incompatibilité chez *Coffea canephora*: méthode de test et déterminisme génétique. *Café Cacao Thé*, 24: 267-274.
- Caixeta ET, Oliveira ACB, Brito GG et al (2016). Tipos de Marcadores Moleculares. In: BORÉM, Aluizio; CAIXETA, Eveline Teixeira (org.). *Marcadores Moleculares*. Viçosa, MG: Editora UFV, p. 385.
- Davis AP (2011). *Psilanthus mannii*, the type species of *Psilanthus*, transferred to *Coffea*. *Nordic Journal of Botany*, 29:471-472.
- Espindula MC, Dalazen JR, Rocha RB et al (2022). *Robustas Amazônicos: os cafeeiros cultivados em Rondônia*. 144p.
- Faria LS (2022). *Estrutura Populacional e Diversidade Genética de Coffea canephora detectadas por Marcadores Moleculares*. Tese Universidade Federal de Viçosa
- Faria LS, Alkimim ER, Barreiro PRRM et al (2022). Genome-wide association study of plant architecture and diseases resistance in *Coffea canephora*. *Euphytica*, 218:92.
- Ferrão RG, De Muner LH, Da Fonseca AFA et al (2017). *Café Conilon*. Vitória, ES: Incaper, 2017.
- Ferrão MAG, Ferrão RG, Fonseca AFA et al (2019). Origin, geographical dispersion, taxonomy and genetic diversity of *Coffea canephora*. In *Conilon Coffee*; Ferrão RG, Fonseca AFA, Ferrão MAG, De Muner L.H, Eds.; Incaper: Vitória, Brazil, 85–110.
- Gichuru EK, Agwanda CO, Combes MC et al (2008). Identification of molecular markers linked to a gene conferring resistance to coffee berrydisease (*Colletotrichum kahawae*) in *Coffea arabica*. *Plant Pathol* 57:1117–1124.
- Gimase JM, Thagana WM, Omondi CO et al (2020). Genome-Wide Association Study identify the genetic loci conferring resistance to Coffee Berry Disease (*Colletotrichum kahawae*) in *Coffea arabica* var. Rume Sudan. *Euphytica*, 216: 1-17.
- Hordofa, ZW (2021). Coffee pathology research in Ethiopia: A review.
- Jawo TO, Kyereh D & Lojka B (2023). The impact of climate change on coffee production of small farmers and their adaptation strategies: a review. *Climate and Development*, 15: 93-109.

- Lu L, Tibpromma S, Karunarathna SC et al (2022). Comprehensive Review of Fungi on Coffee. *Pathogens*, 11: 411.
- Maurin O, Davis AP, Chester M et al (2007). Towards a phylogeny for *Coffea* (Rubiaceae): identifying well-supported lineages based on nuclear and plastid DNA sequences. *Annals of Botany*, 100: 1565-1583.
- Medeiros AC, Caixeta ET, Oliveira ACBD et al (2021). Combining Ability and Molecular Marker Approach Identified Genetic Resources to Improve Agronomic Performance in *Coffea arabica* Breeding. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 5:311.
- Moraes MS, Teixeira AL, Ramalho AR et al (2018). Characterization of gametophytic self-incompatibility of superior clones of *Coffea canephora*. *Genetics and Molecular Research*, 17: 1-11.
- Rocha RB, Teixeira AL, Ramalho AR et al (2015). Melhoramento de *Coffea canephora*: considerações e metodologias. Embrapa Semiárido-Capítulo em livro técnico (INFOTECA-E).
- Rocha RB, Teixeira AL, Ramalho AR et al (2021). *Coffea canephora* breeding: estimated and achieved gains from selection in the Western Amazon, Brazil. *Ciência Rural*, 51.
- Saavedra LM, Caixeta ET, Barka GD et al (2023). Marker-Assisted Recurrent Selection for Pyramiding Leaf Rust and Coffee Berry Disease Resistance Alleles in *Coffea arabica* L. *Genes*, 14: 189.
- Silva RA, Zambolim, L, Castro ISL et al (2018). The Híbrido de Timor germplasm: identification of molecular diversity and resistance sources to coffee berry disease and leaf rust. *Euphytica*, 214:1-16.
- Teixeira AL, Rocha RB, Espindula MC et al (2020). Amazonian Robustas-new *Coffea canephora* coffee cultivars for the Western Brazilian Amazon. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 20:323420318.
- 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.

CAPÍTULO I

MARCADORES MOLECULARES PARA ESTUDO DA DIVERSIDADE E DA RESISTÊNCIA À FERRUGEM E AO CBD EM CAFEEIROS DA ESPÉCIE *COFFEA* *CANEPHORA* DO ESTADO DE RONDÔNIA

RESUMO

A busca por materiais genéticos que sejam resilientes as constantes mudanças climáticas é um fato primordial na agricultura, com destaque para a cultura do café. A espécie *Coffea canephora* possui atributos que fazem desta uma das espécies mais adaptadas a estas mudanças, uma vez que suporta maiores temperaturas, é fonte de alelos favoráveis a resistência a pragas e doenças, além de sua ampla distribuição geográfica. No Brasil, o estado de Rondônia se destaca como o segundo maior produtor de *C. canephora*. Seu parque cafeeiro é composto por cultivares lançadas pelo programa de melhoramento da Embrapa Rondônia e clones selecionados e plantados por produtores. Conhecer a diversidade genética e os genes de resistência a doenças que estes materiais possuem pode orientar o programa de melhoramento na busca e combinação de materiais que se adaptem melhor as mudanças climáticas atuais. Desse modo, os objetivos do presente estudo foram (i) avaliar a diversidade genética de cafeeiros provenientes do programa de melhoramento da Embrapa Rondônia juntamente com genótipos de produtores locais, via marcadores moleculares SNP e (ii) identificar cafeeiros com diferentes genes de resistência às principais doenças da cultura: ferrugem (*Hemileia vastatrix*) e CBD (*Colletotrichum kahawae*), com base em marcadores moleculares. O estudo de diversidade genética molecular evidenciou a formação de cinco grupos, permitindo identificar variabilidade genética entre os cafeeiros em estudo. O grupo I e o grupo IV alocaram dois cafeeiros cada. O grupo II alocou 33, de sua grande maioria pertencentes a variedade botânica Robusta. O grupo III ficou constituído por 18 cafeeiros, pertencentes a variedade botânica Conilon. Por fim, o quinto e maior grupo alocou 85 cafeeiros, sendo a maioria correspondente a híbridos entre as duas variedades botânicas. Os marcadores SNPs utilizados permitiram diferenciar e caracterizar com eficiência os cafeeiros em estudo. Marcadores moleculares ligados a genes de resistência a doenças também possibilitaram a identificação de cafeeiros contendo piramidação de alelos de resistência a *H. vastatrix* e *C. kahawae*. Portanto, foi possível identificar cafeeiros divergentes geneticamente, contendo a piramidação de alelos de resistência a *H. vastatrix* e *C. kahawae*. Esses cafeeiros podem ser utilizados como genitores nos próximos cruzamentos por programas de melhoramento genético do cafeeiro.

1. INTRODUÇÃO

O cafeeiro, arbusto perene pertencente à família Rubiaceae e ao gênero *Coffea*, possui cerca de 124 espécies descritas (Davis, 2011). Dentre estas, a espécie *Coffea canephora* se destaca pela sua importância econômica (Conab, 2022). É uma planta perene, de ciclo longo, diploide ($2n=2x=22$), de fácil propagação vegetativa e possui autoincompatibilidade do tipo gametofítica (Rocha et al., 2015; Moraes et al., 2018; Faria et al., 2022). Devido suas propriedades químicas, seus grãos são de grande importância na composição de blends com *C. arabica* e na fabricação de cafés solúveis.

A espécie *C. canephora* é formada por duas variedades botânicas: Conilon e Robusta, ambas cultivadas e comercializadas (Alkimim et al., 2020). A variedade botânica Conilon é composta por cafeeiros menores, tolerantes a seca e que apresentam maior suscetibilidade a doenças. Já a variedade botânica Robusta é formada por cafeeiros de maior porte e vigor, folhas e frutos de maior tamanho, menor tolerância ao déficit hídrico, porém maior resistência a pragas e doenças (Rocha et al., 2015; Ferrão et al., 2019). Os materiais genéticos Conilon predominam no Brasil em comparação ao Robusta, sendo este último mais expressivo em plantações no estado de Rondônia (Rocha et al., 2015; Ferrão et al., 2019).

A designação variedade botânica se refere a indivíduos de uma mesma espécie que se desenvolveram naturalmente e apresentam características diferentes dos demais indivíduos que compõem a mesma espécie (Partelli et al., 2019). Por apresentarem características divergentes e complementares, a heterose manifestada nos cruzamentos entre cafeeiros Robusta e Conilon, pode ser explorada nos programas de melhoramento. Assim, é possível obter híbridos que reúnam as melhores características de ambas variedades botânicas, tais como maior tolerância a seca (advinda do Conilon), pragas e doenças (advinda do Robusta) (Teixeira et al., 2017; Sousa et al., 2022). Com isso, o maior vigor manifestado em cruzamentos intervarietais pode ser explorado na cultura. (Teixeira et al., 2017; Teixeira et al., 2020; Rocha et al., 2021; Alkimim et al., 2021).

O interesse pela produção e comercialização de *C. canephora* aumenta a cada dia no Brasil e em todo o mundo. A espécie possui características organolépticas e químicas que são notadamente aproveitadas na produção de cafés solúveis e no desenvolvimento de blends com *C. arabica* (Leroy et al., 2005; Silva et al., 2022; Viencz et al., 2023). Essa espécie cafeeira se destaca na composição de cafés expressos, contribuindo com corpo e densidade (Silva et al., 2022). Dentro do gênero, é considerada uma das espécies mais adaptada às mudanças climáticas atuais, pronunciada pelas altas temperaturas, variabilidade das chuvas e maior ocorrência de pragas e doenças. Isso ocorre por ser esse cafeeiro ser mais adaptado a maiores temperaturas e

constituir fonte de alelos favoráveis para resistência a pragas e doenças, além de possuir uma ampla distribuição geográfica (Maurin et al., 2007; Ferrão et al., 2019; Ferrão et al., 2023; Jawo et al., 2023). Sendo assim, é uma espécie de grande importância nos programas de melhoramento genético do gênero.

No Brasil, o estado de Rondônia se destaca como o segundo maior produtor de *C. canephora* (Conab, 2022). Seu parque cafeeiro é composto por cultivares lançadas pelo programa de melhoramento da Embrapa Rondônia (Teixeira et al., 2020; Rocha et al., 2021), além de clones selecionados pelos produtores locais (Espindula et al., 2022). Conhecer a diversidade genética e os genes de resistência a doenças que estes materiais possuem pode orientar os programas de melhoramento da Embrapa Rondônia e outros do país na busca e combinação de materiais que se adaptem melhor as mudanças climáticas atuais.

Estimar a diversidade genética auxilia na caracterização dos cafeeiros, manutenção do banco de germoplasma, direcionamento de futuros cruzamentos e ganhos com seleção (Sousa et al., 2017; Silva et al., 2018; Medeiros et al., 2021). Apesar da história da cafeicultura Rondoniense e brasileira ter iniciado com a introdução das duas variedades botânicas, Robusta e Conilon, ocorreu a formação de híbridos naturais. Por apresentarem características intermediárias das duas variedades, estes híbridos são mais comumente difundidos entre os cafeicultores (Ferrão et al., 2013; Espindula et al., 2020; Faria, 2022; Espindula et al., 2022). No entanto, a identificação desses híbridos e variedades botânicas por avaliações fenotípicas tem sido um desafio. Assim, o uso dos marcadores moleculares SNP para estimar a diversidade genética à nível de DNA é uma ferramenta promissora. Estes podem ser utilizados para avaliar a diversidade genética molecular, uma vez que são o tipo de polimorfismo mais abundante nos genomas, são codominantes e bialélicos. (Alkimim et al., 2018; Faria et al., 2022).

A caracterização dos cafeeiros também pode ser realizada por marcadores moleculares ligados as principais doenças que acometem a cultura (Gichuru et al., 2008; Alkimim et al., 2017; Almeida et al., 2021). A ferrugem do cafeeiro causada pelo fungo *Hemileia vastatrix* e *Coffee Berry Disease* (CBD) causado pelo fungo *Colletotrichum kahawae* são doenças importantes que acometem o cafeeiro (Zambolim & Caixeta et al., 2021; Campuzano-Duque & Blair, 2022). Apesar de *C. canephora* ser uma espécie portadora dos genes de resistência, estudos evidenciam que há diferentes níveis de resistência entre os genótipos, podendo haver cafeeiros resistentes, moderadamente resistentes e até mesmo suscetíveis (Ferrão, 2013; Capucho et al., 2021). Assim, é necessário a identificação de cafeeiros com maiores níveis de resistência à ferrugem e ao CBD, sendo essa uma estratégia para minimizar os impactos das mudanças climáticas em sua cadeia produtiva

Desse modo, os objetivos do presente estudo foram (i) avaliar a diversidade genética de cafeeiros provenientes do programa de melhoramento da Embrapa Rondônia juntamente com genótipos de produtores locais, via marcadores moleculares SNP e (ii) usar marcadores moleculares para identificação de cafeeiros contendo diferentes genes de resistência às principais doenças da cultura: ferrugem e CBD.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Estudo de Diversidade Genética Molecular

2.1.1 Material Genético

Um total de 140 cafeeiros da espécie *C. canephora* foram genotipados com marcadores SNP em larga escala (Tabela 1). Esses cafeeiros são provenientes do programa de melhoramento da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) do estado de Rondônia, juntamente com genótipos de produtores locais. Dentre os genótipos, há cafeeiros das variedades botânicas Conilon e Robusta, além de híbridos.

Amostras foliares dos 140 cafeeiros foram coletadas e enviadas ao laboratório de Biotecnologia do Cafeeiro – BioCafé, na Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil. A extração do DNA genômico foi realizada pelo método proposto por Diniz et al. (2005). A qualidade do DNA foi testada em gel de agarose e a quantificação realizada em NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA). A concentração de DNA das amostras foi padronizada e enviada à empresa Rapid Genomics, Flórida, EUA, para sequenciamento e identificação de marcadores moleculares SNP.

A genotipagem baseada em sequenciamento foi realizada utilizando enriquecimento direcionado seguido de Sequenciamento de Nova Geração (NGS) (Gnrike et al., 2009). As 140 amostras de *C. canephora* foram preparadas para NGS e hibridizadas contra 10.000 sondas sintetizadas em solução. Essas sondas foram construídas a partir de sequências de referência provenientes do Projeto Brasileiro do Genoma Café e do banco de dados do genoma da espécie *C. canephora* (Sousa et al., 2017; Alkimim et al., 2018). O sequenciamento foi realizado em uma plataforma de sequenciamento Illumina Hi-Seq e os marcadores SNP identificados por abordagem de bioinformática.

Tabela1: Identificação dos genótipos de cafeeiros analisados, distinguindo variedade botânica, genealogia e origem da amostra. Genótipos comercializados em domínio público, identificados pelo menos pelo mesmo número, partilham a mesma origem.

Cafeeiro	Identificação	Variedade botânica	Genealogia	Origem
1	RobIAC8	Robusta	Polinização aberta	Banco de germoplasma
2	C25	Híbrido	Polinização aberta	Domínio Público 1
3	BAG32	Híbrido	Polinização aberta	Banco de germoplasma
4	BAG30	Híbrido	Polinização aberta	Banco de germoplasma
5	RobIAC6	Robusta	Polinização aberta	Banco de germoplasma
6	RobIAC7	Robusta	Polinização aberta	Banco de germoplasma
7	RobGuarini2102	Robusta	Polinização aberta	Banco de germoplasma
8	RobGuarini2109	Robusta	Polinização aberta	Banco de germoplasma
9	RobGuarini2104	Robusta	Polinização aberta	Banco de germoplasma
10	RobGuarini2107	Robusta	Polinização aberta	Banco de germoplasma
11	RobGuarini2106	Robusta	Polinização aberta	Banco de germoplasma
12	Rob224	Robusta	Polinização aberta	Banco de germoplasma
13	Rob211	Robusta	Polinização aberta	Banco de germoplasma
14	AP7	Robusta	Polinização aberta	Apoatã IAC
15	AP6	Robusta	Polinização aberta	Apoatã IAC
16	AP4	Robusta	Polinização aberta	Apoatã IAC
17	AP5	Robusta	Polinização aberta	Apoatã IAC
18	AP1	Robusta	Polinização aberta	Apoatã IAC
19	AP3	Robusta	Polinização aberta	Apoatã IAC
20	AP2	Robusta	Polinização aberta	Apoatã IAC
21	BAG29	Híbrido	Polinização aberta	Banco de germoplasma
22	Rob272	Robusta	Polinização aberta	Domínio Público 2
23	Rob124	Robusta	Polinização aberta	Banco de germoplasma
24	Rob128	Robusta	Polinização aberta	Banco de germoplasma
25	Rob36	Robusta	Polinização aberta	Banco de germoplasma
26	Rob32	Robusta	Polinização aberta	Banco de germoplasma
27	Rob126	Robusta	Polinização aberta	Banco de germoplasma
28	Rob63	Robusta	Polinização aberta	Banco de germoplasma
29	RobIAC1	Robusta	Polinização aberta	Banco de germoplasma
30	Rob65	Robusta	Polinização aberta	Banco de germoplasma
31	Rob66	Robusta	Polinização aberta	Banco de germoplasma
32	RobIAC4	Robusta	Polinização aberta	Banco de germoplasma
33	RobIAC5	Robusta	Polinização aberta	Banco de germoplasma
34	RobIAC3	Robusta	Polinização aberta	Banco de germoplasma
35	RobIAC2	Robusta	Polinização aberta	Banco de germoplasma
36	BAG89	Híbrido	Polinização aberta	Banco de germoplasma
37	Con1089	Conilon	Polinização aberta	Banco de germoplasma
38	Con795	Conilon	Polinização aberta	Banco de germoplasma
39	Con566	Conilon	Polinização aberta	Banco de germoplasma
40	Con154	Conilon	Polinização aberta	Banco de germoplasma
41	BRSOuroPreto73	Conilon	Polinização aberta	Cultivar
42	BRSOuroPreto61	Conilon	Polinização aberta	Cultivar

43	Con4650	Conilon	Polinização aberta	Banco de germoplasma
44	BRSOuroPreto88	Conilon	Polinização aberta	Cultivar
45	BRSOuroPreto89	Conilon	Polinização aberta	Cultivar
46	Con201	Conilon	Polinização aberta	Banco de germoplasma
47	Con530	Conilon	Polinização aberta	Banco de germoplasma
48	Con69	Conilon	Polinização aberta	Banco de germoplasma
49	Con556	Conilon	Polinização aberta	Banco de Germoplasma
50	Con796	Conilon	Polinização aberta	Banco de Germoplasma
51	BRSOuroPreto160	Conilon	Polinização aberta	Cultivar
52	BRSOuroPreto57	Conilon	Polinização aberta	Banco de Germoplasma
53	BRS2357	Conilon	Polinização aberta	Cultivar
54	GJ2	Híbrido	Polinização aberta	Domínio Público 1
55	GJ20	Híbrido	Polinização aberta	Domínio Público 1
56	AP8	Robusta	Polinização aberta	Apoatã IAC
57	SK244	Híbrido	Polinização aberta	Domínio público 3
58	GJ1	Híbrido	Polinização aberta	Domínio Público 1
59	N7	Híbrido	Polinização aberta	Domínio público 4
60	CA1	Híbrido	Polinização aberta	Domínio público 5
61	N32	Híbrido	Polinização aberta	Domínio público 4
62	VP156	Híbrido	Polinização aberta	Domínio público 6
63	LB015	Híbrido	Polinização aberta	Domínio público 7
64	LB80	Híbrido	Polinização aberta	Domínio público 7
65	L1	Híbrido	Polinização aberta	Domínio público 8
66	R22	Híbrido	Polinização aberta	Domínio público 9
67	AS3	Híbrido	Polinização aberta	Domínio público 10
68	SK80	Híbrido	Polinização aberta	Domínio público 3
69	SK41	Híbrido	Polinização aberta	Domínio público 3
70	N13	Híbrido	Polinização aberta	Domínio público 4
71	N12	Híbrido	Polinização aberta	Domínio público 4
72	N2	Híbrido	Polinização aberta	Domínio público 4
73	N8(G8)	Híbrido	Polinização aberta	Domínio público 4
74	AS12	Robusta	Polinização aberta	Domínio público 10
75	GB1	Híbrido	Polinização aberta	Domínio público 11
76	GJ21	Híbrido	Polinização aberta	Domínio Público 1
77	GB4	Híbrido	Polinização aberta	Domínio público 11
78	WP6	Híbrido	Polinização aberta	Domínio público 15
79	LB160	Híbrido	Polinização aberta	Domínio público 7
80	LB7	Híbrido	Polinização aberta	Domínio público 7
81	GB7	Híbrido	Polinização aberta	Domínio público 11
82	BG180	Híbrido	Polinização aberta	Domínio público 12
83	P50	Híbrido	Polinização aberta	Domínio público 6
84	AS1	Híbrido	Polinização aberta	Domínio público 10
85	AS5	Híbrido	Polinização aberta	Domínio público 10
86	AS6	Híbrido	Polinização aberta	Domínio público 10
87	AS7	Híbrido	Polinização aberta	Domínio público 10
88	BAG41	Híbrido	Polinização aberta	Banco de germoplasma

89	N1	Híbrido	Polinização aberta	Domínio público 4
90	N16	Híbrido	Polinização aberta	Domínio público 4
91	AS10	Híbrido	Polinização aberta	Domínio público 10
92	AS2	Híbrido	Polinização aberta	Domínio público 10
93	P42	Híbrido	Polinização aberta	Domínio público 13
94	R152	Híbrido	Polinização aberta	Domínio público 9
95	AR106	Híbrido	Polinização aberta	Domínio público 14
96	GJ5	Híbrido	Polinização aberta	Domínio Público 1
97	GJ3	Híbrido	Polinização aberta	Domínio Público 1
98	LB22	Híbrido	Polinização aberta	Domínio público 7
99	LB88	Híbrido	Polinização aberta	Domínio público 8
100	LB68	Híbrido	Polinização aberta	Domínio público 9
101	LB33	Híbrido	Polinização aberta	Domínio público 10
102	LB20	Híbrido	Polinização aberta	Domínio público 11
103	LB102	Híbrido	Polinização aberta	Domínio público 12
104	LB12	Híbrido	Polinização aberta	Domínio público 13
105	LB110	Híbrido	Polinização aberta	Domínio público 14
106	LB60	Híbrido	Polinização aberta	Domínio público 15
107	LB15	Híbrido	Polinização aberta	Domínio público 16
108	LB10	Híbrido	Polinização aberta	Domínio público 17
109	GJ30	Híbrido	Polinização aberta	Domínio Público 1
110	B3T8P54	Híbrido	Emcapa03 x Robusta2258	Banco de germoplasma
111	GJ8	Híbrido	Polinização aberta	Domínio Público 1
112	BAG28	Híbrido	Polinização aberta	Banco de germoplasma
113	BAG19	Híbrido	Emcapa03 x Robusta1675	Banco de germoplasma
114	BAG21	Híbrido	Robusta1675 x Cpafo194	Banco de germoplasma
115	BRS3220	Híbrido	Emcapa03 x Robusta1675	Cultivar
116	GJ25	Híbrido	Polinização aberta	Domínio Público 1
117	BRS1216	Híbrido	Emcapa03 x Robusta1675	Cultivar
118	BAG26	Híbrido	Emcapa03 x Robusta2258	Banco de germoplasma
119	BRS3213	Híbrido	Emcapa03 x Robusta2258	Cultivar
120	BAG24	Híbrido	Emcapa03 x Robusta1675	Banco de germoplasma
121	BRS3210	Híbrido	Emcapa03 x Robusta2258	Cultivar
122	BAG33	Híbrido	Polinização aberta	Banco de germoplasma
123	BAG34	Híbrido	Polinização aberta	Banco de germoplasma
124	BAG23	Híbrido	Polinização aberta	Banco de germoplasma
125	BAG22	Híbrido	Emcapa03 x Robusta2258	Banco de germoplasma
126	VP148	Híbrido	Polinização aberta	Domínio público 6
127	BRSOuroPreto120	Conilon	Polinização aberta	Cultivar
128	BRSOuroPreto125	Conilon	Polinização aberta	Cultivar
129	Con854	Conilon	Polinização aberta	Banco de germoplasma
130	Con1048	Conilon	Polinização aberta	Banco de germoplasma
131	BRS3137	Híbrido	Polinização aberta	Cultivar
132	BRS2336	Híbrido	Polinização aberta	Cultivar
133	BRSOuroPreto203	Conilon	Polinização aberta	Cultivar
134	BRS2299	Híbrido	Polinização aberta	Cultivar

135	BRSOuroPreto130	Conilon	Polinização aberta	Cultivar
136	BRSOuroPreto199	Híbrido	Polinização aberta	Cultivar
137	BRSOuroPreto184	Conilon	Polinização aberta	Cultivar
138	BRSOuroPreto155	Conilon	Polinização aberta	Cultivar
139	BRS3193	Híbrido	Polinização aberta	Cultivar
140	BRS2314	Híbrido	Emcapa03 x Robusta640	Cultivar

2.1.2 Análise de qualidade de marcadores moleculares SNP

O conjunto de dados dos SNPs foram filtrados com os seguintes parâmetros de qualidade: MinDP3, DPrange15-750, *Miss*0,4, MAF0,01 e MinQ10 e CR0,95. As análises de qualidade foram conduzidas em ambiente RStudio version 4.2.1. SNP com valores de qualidade inferiores aos estabelecidos por estes critérios foram removidos.

MinDP3 é a profundidade mínima de sequenciamento por SNP e por indivíduo. SNP com valores inferiores ao determinado por este parâmetro foram considerados como dados ausentes; DPrange é o intervalo médio de profundidade de sequenciamento dos indivíduos para a qual um SNP é mantido. Os marcadores SNP com cobertura média nos indivíduos fora da faixa determinada em cada filtro foram removidos; *Miss* é a porcentagem de dados ausentes aceitos nos indivíduos após a filtragem pelo parâmetro MinDP. Marcadores SNP com valores de *Miss* acima do definido no parâmetro foram removidos; MAF é uma medida relacionada com a variação dos alelos na população, em que alelos de menor frequência por serem pouco informativos e não representarem relevância genética nos indivíduos, são retirados; *Call Rate* refere-se a uma medida para eliminar SNP com grande quantidade de valores perdidos; MinQ é a qualidade mínima aceita para SNP. Sendo assim, SNP com valores de qualidade abaixo dos estabelecidos pelos critérios de qualidade utilizados no presente estudo, foram removidos.

2.1.3 Análise de diversidade genética

Para a análise de diversidade genética, os dados dos SNPs foram codificados como 0, 1 e 2. Uma vez que se trata de marcadores bialélicos e codominantes, 0 indica indivíduos homozigotos para o alelo menos frequente, 1 indica indivíduos heterozigotos e 2 indica indivíduos homozigotos para o alelo mais frequente. Desse modo, cafeeiros que apresentaram genótipos $A^1 A^1$, $A^1 A^2$ ou $A^2 A^2$ foram codificados como 11, 12 e 22, respectivamente.

A diversidade foi avaliada através de uma matriz de dissimilaridade genética calculada utilizando-se os coeficientes de dissimilaridade de Nei (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 de Média de Ligação Média entre

Grupos (UPGMA). O dendrograma foi obtido por meio da função *Fviz*-dend do pacote FactoExtra. Todas as análises foram conduzidas em ambiente RStudio version 4.2.1

2.2 Marcadores Moleculares associados a resistência a ferrugem e CBD

Dos 140 cafeeiros analisados no estudo de diversidade genética molecular, uma amostra de 110 cafeeiros foi selecionada para identificar os alelos de resistência presentes nos diferentes locos via marcadores moleculares. Assim, esses cafeeiros foram analisados com marcadores moleculares ligados a genes que conferem resistência às duas principais doenças fúngicas que acometem o cafeeiro: Ferrugem causada pelo fungo *Hemileia vastatrix* e *Coffee berry disease* (CBD) causada por *Colletotrichum kahawae*. Os cafeeiros analisados estão na Tabela 2.

Foram extraídos DNA genômico de amostras foliares dos 110 cafeeiros. O material foi coletado e enviado ao laboratório de Biotecnologia do Cafeeiro – BioCafé, na Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil. A extração do DNA genômico foi realizada pelo método proposto por Diniz et al. (2005). A qualidade do DNA foi testada em gel de agarose e a quantificação realizada em NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA). 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 purificado dos cafeeiros foi amplificado com oito marcadores moleculares identificados em estudos prévios como associados a genes que conferem resistência a *Hemileia vastatrix* e a *Colletotrichum kahawae* (Tabela 3). Foram analisados cinco locos associado a resistência a *H. vastatrix*, sendo o loco S_H3 monitorado com os marcadores Sat244 e BA-124-12K-f (Mahé et al., 2008), aqui denominado de Loco A. O QTL-GL2, denominado Loco B, monitorado pelo marcador SSR016 (Combes et al., 2000). O QTL-GL5, denominado Loco C, monitorado pelo marcador CaRHv9 (Almeida et al., 2021). O gene candidato *NB-ARC*, Loco D, monitorado pelo marcador CARF005 (Barka et al., 2020) e o Loco E, para outro gene candidato a resistência *HdT_LRR_RLK2*, monitorado pelo marcador RLK2 (Almeida et al., 2021). Para análise de resistência a *C. kahawae* foi avaliado o gene *Ck-1*, nomeado de Loco F. Este foi monitorado por dois marcadores que flanqueiam o gene, Sat235 e Sat207 (Gichuru et al., 2008; Alkimim et al., 2017). Os cafeeiros na Tabela 2 estão enumerados de acordo com a Tabela 1. Por isso, a numeração dos cafeeiros da Tabela 2 não está em ordem contínua, uma vez que é uma amostra de 110 cafeeiros provenientes dos 140 cafeeiros da Tabela 1.

Tabela 2: Identificação dos genótipos de cafeeiros analisados, pertencentes ao banco de germoplasma e programa de melhoramento da Embrapa Rondônia, além de clones provenientes de produtores do estado de Rondônia (clones de domínio público).

Cafeeiro	Identificação	Cafeeiro	Identificação	Cafeeiro	Identificação	Cafeeiro	Identificação	Cafeeiro	Identificação
1	RobIAC8	38	Con795	70	N13	94	R152	119	BRS3213
3	BAG32	39	Con566	71	N12	95	AR106	120	BAG24
4	BAG30	40	Con154	72	N2	96	GJ5	121	BRS3210
12	Rob224	43	Con4650	73	N8(G8)	97	GJ30	122	BAG33
13	Rob211	46	Con201	74	AS12	98	LB22	123	BAG34
14	AP7	47	Con530	75	GB1	99	LB88	124	BAG23
15	AP6	48	Con69	76	GJ21	100	LB68	125	BAG22
16	AP4	49	Con556	77	GB4	101	LB33	129	Con854
17	AP5	50	Con796	78	WP6	102	LB20	130	Con1048
18	AP1	53	BRS2357	79	LB160	103	LB102	131	BRS3137
19	AP3	54	GJ2	80	LB7	104	LB12	132	BRS2336
20	AP2	55	GJ20	81	GB7	105	LB110	134	BRS2299
21	BAG29	56	AP8	82	BG180	106	LB60	139	BRS3193
22	Rob272	57	SK244	83	P50	107	LB15	140	BRS2314
23	Rob124	58	GJ1	84	AS1	108	LB10	-	-
24	Rob128	59	N7	85	AS5	109	GJ30	-	-
25	Rob36	61	N32	86	AS6	111	GJ8	-	-
26	Rob32	62	VP156	87	AS7	112	BAG19	-	-
27	Rob126	64	LB80	88	BAG41	113	BAG21	-	-
28	Rob63	65	L1	89	N1	114	BAG28	-	-
30	Rob65	66	R22	90	N16	115	BRS3220	-	-
31	Rob66	67	AS3	91	AS10	116	GJ25	-	-
36	BAG89	68	SK80	92	AS2	117	BRS1216	-	-
37	Con1089	69	SK41	93	P42	118	BAG26	-	-

Tabela 3: Descrição dos marcadores moleculares utilizados na SAM, que estão associados a genes que conferem resistência a *Hemileia vastatrix* e a *Colletotrichum kahawae*.

Resistência	Loco	Marcador	Gene marcado	Primers	T (°C)	Referência
<i>Hemileia vastatrix</i>	A	Sat244	<i>SH3</i>	F: GCATGTGCTTTTTGATGTCGT R:GCATACTAAGGAATTATCTGACTGCT	52	Mahé et al. 2008; Alkimin et al. 2017
		BA-124 - 12K-f		F: TGATTTTCGCTTGTTGTCGAG R: TGCAGATTGATGGCACGTTA	56	Mahé et al. 2008; Alkimin et al. 2017
	B	SSR016	QTL-LG2	F:ACCCGAAAGAAAGAACCAAG R: CCACACAACCTCTCCTCATTC	65	Combes et al. 2000; Almeida et al., 2021
	C	CaRHv9	QTL-LG5	F: TGATGAAGAAGAGCGCATAGC R:GTCTAAGACCAGAATCAGATGG	65	Almeida et al., 2021
	D	CARF005	<i>NB-ARC</i>	F:GGACATCAACACCAACCTC R:ATCCCTACCATCCACTTCAAC	60	Alvarenga et al., 2011; Barka et al., 2020
	E	RLK 2	<i>HdT_LRR_RLK2</i>	F: GCTCACAGGTCCGATTCCCTCTG R:TTTGGAATAGGCCCGGAAAGA	66	Almeida et al. 2021
<i>Colletotrichum kahawae</i>	F	Sat235	<i>Ck-1</i>	F: TCGTTCTGTCATTAAATCGTCAA R: GCAAATCATGAAAATAGTTGGTG	50	Gichuru et al. 2008; Alkimin et al. 2017
		Sat207		R: GAAGCCGTTTCAAGCC F: CAATCTCTTTCCGATGCTCT	50	Gichuru et al. 2008; Alkimin et al. 2017

2.2.1 Marcadores ligados ao gene S_H3 de resistência a *Hemileia vastatrix*

Foram utilizados como controles três genótipos portadores do gene S_H3 (CIFC H147, CIFC H153/2 e S.288) e dois genótipos suscetíveis (Caturra Vermelho (CIFC 19/1) e Catuaí Vermelho IAC 64 (UFV 2148/57). A genotipagem foi realizada com um marcador SCAR (BA-124-12K-f) e um marcador SSR (Sat244), ambos identificados por Mahé et al. (2008) como marcadores ligados ao gene S_H3 (Tabela 3).

A amplificação por PCR foi realizada em um volume final de 25 μ L contendo 50 ng de DNA genômico, 1 x tampão Taq DNA polimerase, 2,0 mM de $MgCl_2$, 0,1 mM de dNTPs, 0,4 μ M de cada *primer* e 0,5 unidades de Taq DNA polimerase (Invitrogen). As reações foram realizadas em termocicladores PTC-200 (MJ Research) e Veriti (Applied Biosystems), com as seguintes condições: desnaturação inicial por 5 min a 95°C, 35 ciclos de 45 s a 94°C, anelamento por 45 s a temperaturas específicas para cada *primer*, extensão por 45 s a 72°C e uma extensão final por 10 min a 72°C. A genotipagem foi conduzida por eletroforese capilar em sequenciador ABI 3130xl Genetic Analyzer – AppliedBiosystems.

2.2.2 Marcadores moleculares ligados aos QTL que conferem resistência as raças I, II e ao patótipo 001 de *H. vastatrix*

Visando identificar indivíduos que apresentem resistência as raças I, II e patótipo 001 de *H. vastatrix*, foram utilizados dois marcadores moleculares, que correspondem aos locos B e C. O Loco B é um QTL (*Quantitative Trait Locus*) localizado no grupo de ligação 2 (GL2) do mapa genético e pode ser monitorado pelo marcador codominante SSR016 (Combes et al., 2000). O Loco C corresponde a outro QTL localizado no grupo de ligação 5 (GL5), associado ao marcador dominante CaRHv9 (Tabela 3).

A amplificação do marcador SSR016 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* e 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 por 30 segundos, reduzindo 1°C a cada ciclo, 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 20 minutos. A genotipagem foi conduzida por eletroforese capilar em sequenciador ABI 3130xl Genetic Analyzer – AppliedBiosystems.

A amplificação do marcador 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* e 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. Os produtos da PCR foram verificados por eletroforese em gel de agarose 1,5% e visualizados por meio de coloração com Brometo de Etídio (0,5 µg.ml⁻¹).

Os controles utilizados foram o Híbridos de Timor UFV 443-03 e Catuaí Amarelo IAC 64, como resistente e suscetível, respectivamente.

2.2.3 Marcador funcional NB-ARC de resistência a *H. vastatrix*

O marcador dominante CARF005 é derivado de RGA (*Disease Resistance Gene Analogs*). Este amplifica uma região do DNA a qual codifica uma proteína potencialmente envolvida na resistência do cafeeiro à ferrugem.

Os reagentes de PCR foram tampão de reação de PCR 1X, dNTPs 0,2 mM, *primers* 0,2 µM, MgCl₂ 1 mM, 0,8 unidades Taq polimerase (Invitrogen) e 5 ng de DNA em um volume de reação de 20 µl. A amplificação consistiu em: desnaturação do DNA a 95°C por 5 min, seguida por 35 ciclos de 94°C por 30s, 60°C por 30s e 72°C por 1 min e uma extensão a 72°C por 10 min. Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5% e visualizados por meio de coloração com Brometo de Etídio (0,5 µg.ml⁻¹).

Os controles utilizados foram o Híbridos de Timor CIFC 832/2 e Caturra Vermelho CIFC 19/1, como resistente e suscetível, respectivamente.

2.2.4 Marcador funcional RLK de resistência a *Hemileia vastatrix*

Almeida et al. (2021) identificaram e clonaram o gene denominado *HdT_LRR_RLK2*, através da triagem de BACs correspondentes a Híbrido de Timor CIFC 832/2. Com base neste gene, desenvolveram o marcador funcional RLK2 (Tabela 3).

A amplificação por PCR para este marcador foi realizada em um volume final de 20 µl, contendo 50 ng de DNA genômico, tampão de reação PCR 1x, 1 mM de MgCl₂, 0,15 mM de cada dNTP, 0,1 µM de cada *primer* e 1 unidade de Taq DNA polimerase (Invitrogen), completando o volume com água milli-Q estéril. A amplificação foi realizada a partir de uma desnaturação inicial a 94°C por 5 min, seguido de 34 ciclos de amplificação de desnaturação a 94°C por 30 s, anelamento a 66°C por 30 s; extensão a 72°C por 1 min e uma extensão final de

72°C por 10 min. A genotipagem foi conduzida por eletroforese capilar em sequenciador ABI 3130xl Genetic Analyzer – AppliedBiosystems.

Os genótipos Híbrido de Timor CIFC 832/1 e Caturra Vermelho CIFC 19/1 foram utilizados como controle resistente e suscetível, respectivamente.

2.2.5 Marcadores SSR ligados ao gene Ck-1 de resistência à *C. kahawae*

Foram utilizados os marcadores moleculares Sat207 e Sat235, ligados ao gene *Ck-1*. Esses foram identificados e mapeados por Gichuru et al. (2008) e validados por Alkimim et al. (2017) (Tabela 3). 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).

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 unidade de Taq DNA polimerase (Invitrogen), completando o volume com água milli-Q. As reações foram realizadas em termociclador 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 de 50 °C por um período de 45 segundos e extensão a 72° C por 45 segundos; e extensão final a 72° C por 10 minutos. A genotipagem foi conduzida por eletroforese capilar em sequenciador ABI 3130xl Genetic Analyzer – AppliedBiosystems.

3. RESULTADOS

3.1 Estudo de Diversidade Genética Molecular

Após as análises de qualidade, foram obtidos 39.329 marcadores SNPs para *C. canephora*. Estes marcadores foram usados para obter uma matriz de dissimilaridade genética. Utilizando a técnica de agrupamento UPGMA a partir dos valores da matriz de distância gerada foi obtido um dendrograma (Figura 1) constituído por cinco grupos, sendo três grupos maiores e dois grupos menores.

O grupo I foi formado por dois cafeeiros (RobIAC8 e C25). O grupo II foi formado por 33 cafeeiros. Este grupo pode ser dividido em cinco subgrupos (IIa, IIb, IIc, IId e IIe). O grupo III ficou composto por 18 cafeeiros, e também pode ser dividido em cinco subgrupos (IIIa, IIIb, IIIc, IIId e IIIe). O grupo IV assim como o grupo I, compõe apenas dois cafeeiros (GJ2 e GJ20).

O último e maior grupo (grupo V) foi formado por 85 cafeeiros. Este pode ser subdividido em oito subgrupos (Va, Vb, Vc, Vd, Ve, Vf, Vg e Vh).

No grupo II ficou agrupado a maioria dos cafeeiros da variedade botânica Robusta. Dos 33 cafeeiros contendo o passaporte de Robusta, 30 ficaram alocados nesse grupo. O RobIAC8 ficou no grupo I, que é o mais próximo geneticamente do grupo II. Dessa forma, os Robustas ficaram agrupados separadamente dos demais. O acesso identificado como Apoatã AP8 (indivíduo 56) ficou separado, indicando que este cafeeiro pode ser um híbrido e não um Robusta como definido no passaporte. Os Robustas que ficaram nesse grupo foram introduzidos do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) e mantido no BAG da Embrapa Rondônia. Estão incluídos nesse grupo os acessos provenientes da Coleção 5, 10, 1655, 2258-1, 2286 do IAC, os Guarini e os Apoatã IAC. Os cafeeiros Guarini (RobGuarini 2102, RobGuarini 2109, RobGuarini 2104, RobGuarini 2107 e RobGuarini 2106) ficaram alocados no subgrupo IIb e as sete plantas de Apoatã no IIc. Três plantas da BAG de Rondônia, que tinham o passaporte de híbrido intervarietal, ficaram no grupo II, BAG29, BAG30 e BAG32, sugerindo que são plantas da variedade botânica Robusta.

No grupo III ficou a maioria dos cafeeiros Conilon pertencentes ao banco de germoplasma da Embrapa Rondônia (Con1089, Con566, Con154, Con4650, Con201, Con530, Con69, Con556, Con796), além de cafeeiros BRSOuroPreto (BRSOuroPreto73, BRSOuroPreto61, BRSOuroPreto88, BRSOuroPreto89 e BRSOuroPreto160) que também pertencem a essa variedade botânica.

O último e maior grupo (grupo V), alocou os cafeeiros híbridos, obtidos por polinização aberta. A grande maioria, foi selecionada em campo pelos produtores locais. Observa-se no subgrupo Ve, uma concentração de cafeeiros iniciados pela sigla LB (LB22, LB88, LB68, LB33, LB020, LB102, LB12, LB110, LB60, LB15 e LB010), obtidos no campo de um único produtor.

Nove híbridos F_1 , provenientes de cruzamentos artificiais entre cafeeiro Conilon e Robusta, foram incluídos na análise. Desses, oito híbridos, BAG19, BAG21, BRS3220, BRS1216, BAG26, BRS3213, BAG24 e BRS3210 formaram o subgrupo Vf. O outro cafeeiro comprovadamente híbrido F_1 , o BRS2314, ficou no subgrupo Vh. No Vh estão também outras cultivares da Embrapa de polinização aberta, BRS3193, BRS2299, BRSOuroPreto203, BRSOuroPreto130, BRSOuroPreto184 e BRSOuroPreto155, indicando serem essas cultivares híbridos intervarietais.

Analisando as 10 cultivares BRS lançadas pela Embrapa Rondônia, observa-se que apenas a cultivar BRS2357 ficou alocada no grupo III. Essa é a única cultivar que foi lançada do grupo varietal Conilon, as demais foram lançadas como híbrido intervarietal, o que foi confirmado pelos dados moleculares. Essas cultivares híbridas ficaram alocadas no grupo V, distribuídas entre o subgrupo Vf (BRS3220, BRS1216, BRS3213 e BRS 3210), subgrupo Vg (BRS3137 e BRS2336) e subgrupo Vh (BRS2299, BRS3193 e BRS2314).

3.2 Marcadores Moleculares associados a resistência a ferrugem e CBD

3.2.1. Marcadores ligados ao gene S_H3 de resistência à *H. vastatrix* (Loco A)

Na Tabela 4 é apresentada a genotipagem de 110 cafeeiros para cada marcador analisado nesse estudo. Esses cafeeiros foram analisados com dois marcadores ligados ao gene S_H3 de resistência a *H. vastatrix*.

O marcador Sat244 é codominante, possibilitando a diferenciação dos indivíduos homozigotos e heterozigotos. Analisando o Sat244, observou-se sete cafeeiros heterozigotos portadores do genótipo Aa e 103 com genótipo homozigoto recessivos (aa). Já o marcador BA-124-12K-f é dominante, permitindo identificar genótipos A₋ e aa. Analisando este marcador, foi identificado 19 cafeeiros A₋.

Apenas o cafeeiro 3, BAG32, apresentou marcas associadas a resistência para os dois marcadores moleculares, sendo heterozigoto para Sat244. Os demais apresentaram apenas a banda de resistência para um único marcador, o que indica recombinação entre os dois marcadores. Nos cafeeiros 13, 18, 20, 28, 50, 56, 70, 81, 84, 87, 88, 105, 108, 117, 118, 125, 132 e 139 observou-se a marca de resistência para o marcador BA-124-12K-f, sendo, portanto, genotipados como A₋. Todavia, para o marcador Sat244 a marca de resistência não se encontrava (aa). Ao analisar o marcador Sat244, os cafeeiros 12, 21, 23, 27, 57 e 90 apresentaram a marca de resistência, mas quando analisados com o BA-124-12K-f foram suscetíveis.

Foram considerados como cafeeiros portadores do gene S_H3 apenas os que possuíram a marca de resistência para os dois marcadores moleculares analisados. Sendo assim, apenas o cafeeiro 3 (BAG 32) foi considerado portador do gene S_H3 . O gene S_H3 é proveniente da espécie *C. liberica*. Sendo assim, já era esperado que este loco de resistência a ferrugem, não fosse encontrado em um grande número de cafeeiros da espécie *C. canephora* analisados.

3.2.2 Marcadores moleculares ligados aos QTL que conferem resistência as raças I, II e ao patótipo 001 de *H. vastatrix* (Loco B e C)

Marcadores moleculares associados aos QTL-GL2 (grupo de ligação 2) e QTL-GL5 (grupo de ligação 5) também foram utilizados para verificar a presença de genes de resistência a *H. vastatrix*. Estes QTLs estão no mapa genético construído por Pestana et al. (2015).

A análise do loco B (Tabela 4) foi realizada por meio do marcador SSR016 (Combes et al., 2000; Almeida et al., 2021), ligados ao QTL-GL2. Este apresenta padrão de banda codominante, identificando indivíduos homozigotos e heterozigotos (BB, Bb e bb). Sendo

assim, 47 cafeeiros apresentaram o alelo de resistência do QTL-GL2 em homozigose dominante (BB), 41 cafeeiros em heterozigose (Bb) e 22 cafeeiros em homozigose recessiva (aa).

Analisando o marcador CaRHv9 que está ligado ao QTL-GL5 (Loco C), foi possível observar que 51 cafeeiros apresentaram o alelo de resistência. Este marcador apresenta padrão de bandas dominantes, não sendo possível diferenciar indivíduos homozigotos de heterozigotos. Desse modo, indivíduos contendo a marca tiveram o genótipo denominado de C₋.

Observou-se, portanto, que a maioria dos acessos analisados possuem o alelo de resistência no loco B ou no loco C ou em ambos. A presença de alelo de resistência em apenas um dos locos pode conferir resistência em campo, a depender da ocorrência dos patógenos de *H. vastatrix* na região. Alelo de resistência nos dois locos, o que ocorreu em 45 cafeeiros, pode conferir resistência mais duradoura ao patógeno. Esse resultado demonstra o potencial desses cafeeiros de Rondônia como fonte portadora de gene que confere resistência a raça I e II e patótipo 001 de *H. vastatrix*.

Tabela 4. Seleção Assistida por Marcadores Moleculares associados a resistência do cafeeiro à ferrugem nos genes *S_H3* (Loco A), QTL para resistência às raças I, II e ao patótipo 001 (Loco B e C); NB-ARC (Loco D); HdT_LRR_RLK2 (Loco E); e Ck-1 para CBD (Loco F).

Cafeeiro	BA124	Sat244	SH3	SSR016	QTL-GL2	CaRHv9	QTL-GL5	CARF005	SH10	RLK2	HdT_LRR_RLK2	Sat207	Sat235	Ck-1
1	aa	aa	A	bb	A	cc	A	D_	P	ee	A	FF	ff	A
3	A_	Aa	P	BB	P	cc	A	dd	A	ee	A	FF	ff	A
4	aa	aa	A	BB	P	C_	P	D_	P	E_	P	ff	FF	A
12	aa	Aa	A	Bb	P	cc	A	D_	P	ee	A	FF	FF	P
13	A_	aa	A	bb	A	cc	A	D_	P	E_	P	ff	ff	A
14	aa	aa	A	Bb	P	cc	A	D_	P	ee	A	FF	FF	P
15	aa	aa	A	bb	A	cc	A	D_	P	E_	P	FF	FF	P
16	aa	aa	A	Bb	P	cc	A	D_	P	E_	P	FF	ff	A
17	aa	aa	A	bb	A	cc	A	dd	A	ee	A	FF	FF	P
18	A_	aa	A	bb	A	cc	A	dd	A	ee	A	ff	ff	A
19	aa	aa	A	bb	A	cc	A	dd	A	ee	A	FF	ff	A
20	A_	aa	A	Bb	P	cc	A	dd	A	ee	A	FF	FF	P
21	aa	Aa	A	Bb	P	cc	A	D_	P	E_	P	FF	ff	A
22	aa	aa	A	BB	P	cc	A	D_	P	ee	A	FF	ff	A
23	aa	Aa	A	Bb	P	cc	A	dd	A	ee	A	FF	ff	A
24	aa	aa	A	BB	P	C_	P	D_	P	ee	A	ff	ff	A
25	aa	aa	A	BB	P	C_	P	D_	P	E_	P	ff	FF	A
26	aa	aa	A	Bb	P	cc	A	D_	P	ee	A	FF	ff	A
27	aa	Aa	A	Bb	P	cc	A	dd	A	E_	P	FF	ff	A
28	A_	aa	A	bb	A	cc	A	D_	P	E_	P	ff	FF	A
30	aa	aa	A	Bb	P	cc	A	dd	A	ee	A	FF	FF	P
31	aa	aa	A	BB	P	cc	A	D_	P	ee	A	FF	ff	A
36	aa	aa	A	Bb	P	C_	P	D_	P	E_	P	ff	FF	A

P: Presença do alelo de resistência no loco; A: Ausência do alelo de resistência no loco.

...Continuação Tabela 4

37	aa	aa	A	BB	P	C_	P	D_	P	ee	A	ff	FF	A
38	aa	aa	A	Bb	P	C_	P	D_	P	ee	A	ff	ff	A
39	aa	aa	A	BB	P	C_	P	D_	P	ee	A	ff	FF	A
40	aa	aa	A	Bb	P	C_	P	D_	P	E_	P	ff	ff	A
43	aa	aa	A	BB	P	cc	A	D_	P	ee	A	ff	ff	A
46	aa	aa	A	bb	A	C_	P	D_	P	ee	A	ff	ff	A
47	aa	aa	A	BB	P	C_	P	D_	P	E_	P	FF	ff	A
48	aa	aa	A	BB	P	C_	P	D_	P	E_	P	ff	ff	A
49	aa	aa	A	BB	P	C_	P	dd	A	ee	A	ff	ff	A
50	A_	aa	A	BB	P	cc	A	dd_	A	ee	A	ff	ff	A
53	aa	aa	A	bb	A	cc	A	dd	A	ee	A	FF	FF	P
54	aa	aa	A	BB	P	cc	A	dd	A	ee	A	Ff	ff	A
55	aa	aa	A	bb	A	C_	P	D_	P	ee	A	FF	FF	P
56	A_	aa	A	bb	A	cc	A	dd	A	ee	A	FF	FF	P
57	aa	Aa	A	Bb	P	C_	P	D_	P	EE	P	ff	Ff	A
58	aa	aa	A	Bb	P	cc	A	D_	P	ee	A	ff	ff	A
59	aa	aa	A	Bb	P	C_	P	D_	P	ee	A	ff	FF	A
61	aa	aa	A	Bb	P	cc	A	D_	P	ee	A	ff	ff	A
62	aa	aa	A	Bb	P	C_	P	D_	P	ee	A	ff	Ff	A
64	aa	aa	A	bb	A	C_	P	D_	P	ee	A	ff	ff	A
65	aa	aa	A	BB	P	cc	A	D_	P	ee	A	ff	FF	A
66	aa	aa	A	BB	P	C_	P	D_	P	ee	A	FF	ff	A
67	aa	aa	A	bb	A	C_	P	D_	P	ee	A	FF	FF	P
68	aa	aa	A	BB	P	C_	P	D_	P	ee	A	ff	FF	A

P: Presença do alelo de resistência no loco; A: Ausência do alelo de resistência no loco.

...Continuação Tabela 4

69	aa	aa	A	BB	P	C_	P	D_	P	ee	A	FF	FF	P
70	A_	aa	A	Bb	P	C_	P	D_	P	E_	P	ff	FF	A
71	aa	aa	A	Bb	P	C_	P	D_	P	E_	P	FF	FF	P
72	aa	aa	A	Bb	P	C_	P	D_	P	ee	A	FF	FF	P
73	aa	aa	A	bb	A	C_	P	dd	A	E_	P	FF	FF	P
74	aa	aa	A	bb	A	cc	A	D_	P	ee	A	FF	ff	A
75	aa	aa	A	BB	P	cc	A	D_	P	E_	P	ff	ff	A
76	aa	aa	A	BB	P	cc	A	D_	P	ee	A	FF	FF	P
77	aa	aa	A	BB	P	C_	P	D_	P	ee	A	ff	FF	A
78	aa	aa	A	BB	P	C_	P	D_	P	E_	P	ff	FF	A
79	aa	aa	A	BB	P	C_	P	D_	P	ee	A	Ff	Ff	P
80	aa	aa	A	Bb	P	C_	P	D_	P	ee	A	ff	Ff	A
81	A_	aa	A	Bb	P	C_	P	D_	P	E_	P	FF	ff	A
82	aa	aa	A	bb	A	cc	A	D_	P	E_	P	ff	ff	A
83	aa	aa	A	Bb	P	C_	P	dd	A	ee	A	FF	ff	A
84	A_	aa	A	bb	A	cc	A	D_	P	ee	A	FF	FF	P
85	aa	aa	A	BB	P	C_	P	D_	P	ee	A	ff	FF	A
86	aa	aa	A	Bb	P	C_	P	D_	P	ee	A	ff	FF	A
87	A_	aa	A	BB	P	cc	A	dd	A	E_	P	FF	ff	A
88	A_	aa	A	BB	P	cc	A	D_	P	ee	A	ff	FF	A
89	aa	aa	A	BB	P	C_	P	D_	P	E_	P	FF	FF	P
90	aa	Aa	A	Bb	P	C_	P	D_	P	E_	P	FF	FF	P
91	aa	aa	A	BB	P	cc	A	D_	P	ee	A	ff	FF	A
92	aa	aa	A	Bb	P	C_	P	dd	A	ee	A	FF	FF	P
93	aa	aa	A	BB	P	C_	P	D_	P	E_	P	FF	ff	A

P: Presença do alelo de resistência no loco; A: Ausência do alelo de resistência no loco.

...Continuação Tabela 4

94	aa	aa	A	Bb	P	C_	P	D_	P	ee	A	ff	FF	A
95	aa	aa	A	Bb	P	C_	P	D_	P	E_	P	ff	FF	A
96	aa	aa	A	Bb	P	cc	A	D_	P	ee	A	ff	FF	A
97	aa	aa	A	BB	P	C_	P	D_	P	ee	A	FF	FF	P
98	aa	aa	A	BB	P	cc	A	D_	P	ee	A	ff	Ff	A
99	aa	aa	A	BB	P	C_	P	D_	P	ee	A	ff	ff	A
100	aa	aa	A	bb	A	cc	A	D_	P	ee	A	ff	ff	A
101	aa	aa	A	BB	P	cc	A	D_	P	ee	A	Ff	ff	A
102	aa	aa	A	BB	P	cc	A	D_	P	ee	A	ff	Ff	A
103	aa	aa	A	BB	P	cc	A	D_	P	ee	A	ff	FF	A
104	aa	aa	A	BB	P	cc	A	D_	P	ee	A	ff	ff	A
105	Aa	aa	A	BB	P	C_	P	D_	P	ee	A	ff	Ff	A
106	aa	aa	A	BB	P	C_	P	dd_	A	E_	P	ff	ff	A
107	aa	aa	A	BB	P	C_	P	D_	P	ee	A	FF	ff	A
108	A_	aa	A	BB	P	C_	P	D_	P	E_	P	ff	ff	A
109	aa	aa	A	Bb	P	cc	A	dd	A	EE	P	FF	Ff	P
111	aa	aa	A	BB	P	cc	A	dd	A	ee	A	ff	FF	A
112	aa	aa	A	Bb	P	cc	A	dd	A	ee	A	ff	ff	A
113	aa	aa	A	Bb	P	cc	A	dd	A	ee	A	ff	FF	A
114	aa	aa	A	bb	A	cc	A	D_	P	ee	A	Ff	FF	P
115	aa	aa	A	Bb	P	cc	A	dd	A	ee	A	ff	ff	A
116	aa	aa	A	bb	A	C_	P	D_	P	E_	P	ff	FF	A
117	A_	aa	A	bb	A	cc	A	dd	A	ee	A	ff	ff	A
118	A_	aa	A	Bb	P	C_	P	D_	P	E_	P	ff	ff	A
119	aa	aa	A	Bb	P	cc	A	D_	P	ee	A	ff	FF	A

P: Presença do alelo de resistência no loco; A: Ausência do alelo de resistência no loco.

...Continuação Tabela 4

120	aa	aa	A	Bb	P	cc	A	D_	P	ee	A	ff	FF	A
121	aa	aa	A	Bb	P	cc	A	D_	P	ee	A	ff	ff	A
122	aa	aa	A	BB	P	C_	P	D_	P	ee	A	ff	FF	A
123	aa	aa	A	BB	P	C_	P	D_	P	E_	P	ff	ff	A
124	aa	aa	A	BB	P	cc	A	D_	P	ee	A	ff	FF	A
125	A_	aa	A	Bb	P	cc	A	D_	P	E_	P	ff	FF	A
129	aa	aa	A	BB	P	cc	A	D_	P	E_	P	ff	ff	A
130	aa	aa	A	Bb	P	C_	P	dd_	A	ee	A	ff	FF	A
131	aa	aa	A	bb	A	cc	A	D_	P	ee	A	FF	ff	A
132	A_	aa	A	BB	P	cc	A	dd	A	ee	A	FF	ff	A
134	aa	aa	A	Bb	P	C_	P	dd	A	ee	A	FF	FF	P
139	A_	aa	A	BB	P	cc	A	dd	A	ee	A	ff	FF	A
140	aa	aa	A	Bb	P	cc	A	dd	A	ee	A	ff	FF	A

P: Presença do alelo de resistência no loco; A: Ausência do alelo de resistência no loco.

3.2.3 Marcador funcional NB-ARC de resistência a *H. vastatrix* (Loco D)

Um quarto loco associado à resistência a *H. vastatrix* também foi analisado (Loco D). O marcador dominante CARF005 é derivado de EST mineradas (*Expressed Sequence Tag*). Este foi previamente confirmado por Alvarenga et al. 2011 por amplificar uma região do DNA que corresponde a uma janela aberta de leitura parcial (ORF), do genoma de *C. arabica*. Barka et al. 2020 examinando uma biblioteca BAC construída com o clone resistente à ferrugem do Híbrido de Timor CIFC 832/2, identificou e caracterizou o gene *NB-ARC*, monitorado pelo marcador CARF005, como um novo gene S_H . Este foi localizado no mapa de ligação de *C. arabica* em um loco diferente do QTL-GL2 e QTL-GL5 (Alvarenga et al., 2011; Barka et al., 2020).

Dos 110 cafeeiros avaliados, 82 são portadores do gene de resistência marcado pelo CARF005 (D₋). Como se trata de um marcador dominante, não é possível distinguir cafeeiros heterozigotos de cafeeiros homozigotos dominantes.

3.2.4 Marcador funcional RLK 2 de resistência a *H. vastatrix* (Loco E)

Afim de piramidar o maior número de alelos que conferem resistência a *H. vastatrix*, um quinto loco também foi analisado (Loco E), através do marcador RLK2. Almeida *et al.* (2021) desenvolveram um marcador molecular funcional denominado RLK2, que monitora o gene *HdT_LRR_RLK2*. Este é um possível novo gene S_H , não encontrado nas plantas diferenciadoras de café. Em seu estudo, Almeida et al. 2021 observaram que este gene apresentou diferença de expressão no genótipo resistente. Assim, o marcador RLK2 é dominante, capaz de diferenciar indivíduos resistentes e suscetíveis à ferrugem do cafeeiro, para este loco.

Sendo um marcador dominante, foi possível identificar cafeeiros E₋ e ee. Dos 110 cafeeiros analisados, 33 apresentaram o loco de resistência, tendo genótipo E₋.

De forma geral, foram identificados cafeeiros contendo de zero a quatro genes de resistência a ferrugem, piramidados. Os cafeeiros com quatro genes de resistência piramidados, portadores do genótipo aaBBC_D_E foram: 4, 25, 47, 48, 78, 89, 93, 108 e 120. Já os cafeeiros com quatro genes de resistência piramidados, com o genótipo aaB_C_D_E foram: 36, 40, 57, 70, 71, 81, 90, 95 e 118. Para os cafeeiros portadores de três genes de resistência piramidados, foram identificados os genótipos: aaBBC_D_ee (cafeeiros 37, 39, 59, 66, 68, 69, 77, 79, 85, 91, 97, 99, 105, 107 e 122), aaBbC_D_ee (cafeeiros 38, 62, 72, 80, 86 e 94), aaBBccD_E_ (cafeeiro 75), aaBbccD_E_ (cafeeiros 16, 21, 125 e 129), aaBBC_ddE_ (cafeeiro 106) e aabbC_D_E_ (cafeeiro 116).

3.2.5 Marcadores SSR ligados ao gene Ck-1 de resistência à *C. kahawae* (Loco F)

Além de fontes potenciais para resistência a diferentes raças de ferrugem, nesse trabalho, buscou-se identificar fontes de resistência a outra doença devastadora da cultura do café, o CBD. Com o intuito de monitorar os locos de resistência a *C. kahawae*, dois marcadores moleculares SSR foram utilizados, Sat207 e Sat235. Esses marcadores foram 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 análise conjunta dos marcadores de CBD permitiu identificar cafeeiros portadores do gene Ck-1. Foram identificados 24 cafeeiros contendo alelos de resistência nos dois marcadores analisados, sendo todos resistentes homozigotos (FF). (Tabela 4).

Foram observadas recombinações para estes marcadores. Os cafeeiros 4, 14, 25, 28, 36, 37, 39, 65, 68, 77, 78, 86, 88, 90, 91, 94, 95, 96, 101, 111, 113, 116, 119, 120, 122, 124, 125, 130, 139 e 140 não apresentaram a marca de resistência para o marcador Sat207, todavia apresentaram essa marca para o marcador Sat235. Ao analisar o marcador Sat235, os cafeeiros 1, 3, 16, 19, 21, 22, 23, 26, 27, 31, 47, 54, 66, 74, 81, 83, 87, 93, 101, 107, 131 e 132 não apresentaram a marca de resistência, mas quando analisado com o Sat207 esse marcador apresentou a banda.

Também foram observadas duas recombinações quando se avaliou a homozigose e heterozigose dos dois marcadores. O cafeeiro 114 (BAG28) foi resistente heterozigoto para o marcador Sat207. No entanto, para o marcador Sat235 se mostrou resistente homozigoto. Já o cafeeiro 109 (GJ30) foi resistente heterozigoto para o marcador Sat235, e resistente homozigoto para o marcador Sat207.

Assim, foi identificado cafeeiros com piramidação de genes para ferrugem e CBD, a exemplo dos cafeeiros portadores dos genótipos: aaBBC_D_E_FF (cafeeiro 89), aaBbC_D_E_FF (cafeeiros 71 e 90), aaBBC_D_eeFF (cafeeiro 97), aaBbC_D_eeFF (cafeeiro 72) e aaBBC_D_eeFf (cafeeiro 79).

4. DISCUSSÃO

4.1 Estudo de Diversidade Genética Molecular

A diversidade genética de cafeeiros plantados e mantidos em coleções do estado de Rondônia foram detalhadamente analisados com marcadores moleculares. Sendo assim, a análise de diversidade genética molecular dos 140 cafeeiros, obtidos a partir de 39.329 marcadores moleculares SNP permitiu a separação dos cafeeiros da variedade botânica Robusta

e Conilon, além de permitir a caracterização de cafeeiros de polinização aberta que estão sendo considerados como híbridos intervarietais.

A cafeicultura Rondoniense em sua grande parte, é formada por clones selecionados pelos agricultores da região (Espindula et al., 2017). Todavia, não se sabe ao certo o passaporte desses clones, a qual variedade botânica pertencem ou de qual possuem maior contribuição genômica. A exemplo do clone C25, no qual dados indicam ser cafeeiro Robusta, uma vez que está no grupo I, sendo geneticamente mais próximo dos cafeeiros do grupo II, o grupo dos Robustas. Entre os clones dos produtores, GJ2 e GJ20 são as mais distintas geneticamente dos demais cafeeiros dos produtores ficando em grupo separado (grupo IV), uma vez que os demais clones de produtores ficaram no grande grupo V.

Essa diversidade genética encontrada nos materiais de cultivo em Rondônia pode ser explorada para adaptação das plantas em diferentes regiões, bem como no contexto das mudanças e variações climáticas. O gradativo aumento da temperatura e chuva irregulares podem afetar negativamente a cultura do café, trazendo perdas de produção, aumento de doenças, prejudicando a maioria das áreas de cultivo (Zullo et al., 2011; Davis et al., 2012; Rahn et al., 2018). Estudos mostram que entre as áreas de cultivo de *C. canephora* no país, os estados de Rondônia e Bahia poderão sofrer maiores impactos com as mudanças climáticas, uma vez que tiveram a grande redução de áreas adequadas para o cultivo da espécie (Lorençone et al., 2023).

BRSOuroPreto é uma cultivar multiclonal, composta pelo agrupamento de 15 genótipos selecionados em lavouras comerciais do estado de Rondônia. Essa cultivar multiclonal tem características de cafeeiros Conilon, portanto, foi lançada como variedade botânica Conilon (Espindula et al., 2022). No entanto, alguns clones que compõe a cultivar tem comportamento de híbridos intervarietal. No presente trabalho, 11 clones dessa cultivar foram caracterizadas molecularmente. Cinco clones ficaram no grupo dos Conilons (grupo III) e seis no grande grupo V, onde estão os cafeeiros híbridos. É válido destacar que os clones BRSOuroPreto203, BRSOuroPreto130, BRSOuroPreto184 e BRSOuroPreto155, ficaram alocados no subgrupo de híbridos F₁ (Vg). Esse é um indicativo de que essas cultivares possam ser híbridos intervarietais.

Os dados de diversidade genética também sugerem que alguns clones, apesar de terem identificações diferentes e vindos de produtores diferentes ou identificação distinta na BAG, podem ser o mesmo clone ou materiais muito aparentados, como os cafeeiros: RobGuarini2107 (10) e RobGuarini2106 (11); AP3 (19) e AP2 (20); Rob32 (26) e Rob126 (27); N13 (70) e N12 (71); LB20 (102) e LB102 (103); BAG26 (118) e BRS3213 (119).

A disponibilidade de variabilidade genética no café, é essencial para que o programa de melhoramento alcance ganhos de seleção e manutenção da variabilidade genética (Sousa et al., 2017; Hoque et al., 2020). Sendo assim, a partir do dendrograma é possível selecionar indivíduos que apresentam a marca de resistência à ferrugem e ao CBD, e que sejam divergentes. Ou seja, serão selecionados indivíduos que estejam alocados em grupos diferentes, para explorar o máximo de variabilidade (Alkimi et al., 2021). Além disso, a separação da espécie em suas variedades botânicas permite que genótipos híbridos sejam obtidos. Assim, é possível explorar a heterose manifestada em cruzamentos intervarietais (Alkimi et al., 2021), uma vez que as variedades botânicas Conilon e Robusta se alocaram em grupos distintos.

4.2 Marcadores Moleculares associados a resistência a ferrugem e CBD

Marcadores Moleculares de DNA também foram utilizados para identificar cafeeiros que sejam potenciais fontes de resistência para as duas principais doenças da cultura: Ferrugem do cafeeiro e CBD. Essa caracterização é essencial para direcionar novos cruzamentos e manejo. Apesar de *C. canephora* ser uma espécie portadora dos genes de resistência, estudos evidenciam que há diferentes níveis de resistência de genótipo para genótipo, podendo haver cafeeiros resistentes, moderadamente resistentes e até mesmo suscetíveis (Ferrão, 2013; Capucho et al., 2021).

A ferrugem do cafeeiro, causada por *Hemileia vastatrix*, pode ser encontrada em praticamente todas regiões cafeeiras, levando a perdas de mais de 50% da produção (Talhinhas et al., 2017; Zambolim & Caixeta, 2021; Velásquez & Banchón, 2022). Pelo menos nove genes dominantes presentes em diferentes espécies de café já foram caracterizados, sendo do S_H1 ao S_H9. Os genes de resistência do S_H1, S_H2, S_H4 e S_H5 são derivados de *C. arabica*, S_H3 derivados de *C. liberica* e, os genes S_H6, S_H7, S_H8 e S_H9, identificados em *C. canephora*. Estes também estão presentes no Híbrido de Timor (HdT), híbrido natural entre *C. arabica* e *C. canephora*. Recentemente, Barka et al. (2020) e Almeida et al. (2021) identificaram e caracterizaram dois genes S_Hs candidatos de resistência a *H. vastatrix* e Híbrido de Timor.

A presença de outros alelos e locos de resistência que conferem ao cafeeiro resistência à ferrugem (Combes et al., 2000; Mahé et al., 2008; Alvarenga et al., 2011; Alkimi et al. 2017; Barka et al., 2020 Almeida et al., 2021) foi também estudada na coleção de cafeeiros de Rondônia. O objetivo foi identificar potenciais fontes contendo o maior número de genes de resistência. Quanto o maior número de genes de resistência uma planta tiver, mais difícil será a suplantação da sua resistência. Essa durabilidade está relacionada ao surgimento de novas raças de *H. vastatrix*, que é muito mais dinâmico que a resposta de um programa de melhoramento.

A alta variabilidade do patógeno representa um risco à resistência durável dos cafeeiros em campo (Almeida et al., 2021). Desse modo, cinco locos (aqui denominados de A, B, C, D e E) de resistência a *H. vastatrix* foram analisados para identificar cafeeiros contendo a piramidação de alelos de resistência.

O loco A representa o gene S_H3 , que apesar de ter sido identificado em outra espécie cafeeira (*C. liberica*), foi utilizado para verificar se algum acesso de *C. canephora* também o possui. Com base em dois marcadores que flanqueiam o gene S_H3 , BA-124-12K-f e Sat244 (Mahé et al., 2008), observou-se que apenas o cafeeiro BAG32, tem o potencial de possuir esse gene de resistência. Esse cafeeiro corresponde a um acesso do Banco de Germoplasma da Embrapa Rondônia, sendo um híbrido de polinização aberta. No estudo de diversidade ficou agrupado com os Robustas, porém próximo ao grupo dos híbridos. Para identificação de cafeeiros com potencial de possuir esse gene, foi considerado, apenas, o acesso que apresentou alelos de resistência para os dois marcadores moleculares. Essa estratégia evita que seja selecionada planta resultante de recombinação e, que por consequência, tenha o marcador molecular, mas não o gene de resistência. O gene S_H3 é de suma importância para o melhoramento genético do cafeeiro para resistência a ferrugem, uma vez que é o único gene conhecido que ainda não foi suplantado (Zambolim & Caixeta, 2021).

Os cafeeiros foram, também, analisados com marcadores moleculares associados a dois QTL que conferem resistência as raças I, II e ao patótipo 001 de *H. vastatrix*. A incorporação desses dois locos nos cafeeiros é de grande importância por serem essas as raças mais frequentes no Brasil. Dentre as mais de 50 raças de *H. vastatrix* já identificadas, a raça II se destaca como a mais comum e amplamente difundida no país (Zambolim & Caixeta, 2021). Os dados moleculares para o QTL/GL2 (Loco B) mostraram 47 cafeeiros resistentes homozigotos (BB), 42 resistentes heterozigotos (Bb) e 22 suscetíveis homozigotos (bb). Quanto ao QTL/GL5 (Loco C), o marcador utilizado apresenta padrão dominante, sendo possível identificar 51 cafeeiros resistentes C_.

A resistência dos cafeeiros as raças I, II e patótipo 001 de *H. vastatrix* é conferida por dois locos dominantes independentes (Pestana et al., 2015). Portanto, a presença de um alelo dominante em um dos dois locos já garante que o indivíduo é resistente e pode ser selecionado (Almeida et al., 2021). Dessa forma, os dados permitiram identificar cafeeiros com genótipos BBC_, BBcc BbC_, Bbcc, bbC_ que são resistentes e poderão ser selecionados para o avanço de próximas gerações. As melhores fontes de resistência correspondem aos cafeeiros com o genótipo BBC_, pois apresentam os dois genes, levando a uma maior durabilidade de resistência e loco B em homozigose. Locos em homozigose garante que todos os gametas

formadores da progênie terão o alelo de resistência. Para o loco C, não foi possível distinguir os homozigotos dos heterozigotos, pois o marcador molecular disponível e utilizado tem comportamento dominante. Os cafeeiros que apresentaram o genótipo BBC_ foram: BAG 34, BAG33, BAG30, N1, AS5, Rob128, Rob36, GB4, WP6, Con530, Con69, LB60, LB88, LB110 e LB160.

Buscando a resistência durável, outros dois locos que correspondem a genes de resistência S_{H3} clonados (Barka et al., 2020; Almeida et al. 2021) foram analisados. O marcador CARF005 (Loco D) possibilitou a identificação de 82 cafeeiros resistentes. Por ser um marcador dominante não foi possível caracterizar o loco como homozigoto ou heterozigoto. Observou-se que um grande número de cafeeiros apresentou esta marca de resistência, o que pode ser explicado por esse gene ter sido clonado de Híbridos de Timor que possuem genes de resistência da espécie *C. canephora* (Barka et al., 2020).

O outro gene previamente clonado e monitorado nesse estudo corresponde ao Loco E. De perfil dominante, esse marcador permitiu identificar 33 cafeeiros contendo a marca de resistência. O marcador RLK2 foi desenvolvido com base na presença e ausência do gene HdT_LRR_RLK2 em vários clones diferenciais de café. Estes clones contêm diferentes combinações dos genes de resistência à ferrugem. Almeida et al. 2021 observaram que o gene HdT_LRR_RLK2 não corresponde a nenhum dos genes de resistência já caracterizado (S_H 1-9).

A piramidação dos cinco genes para resistência a ferrugem já não era esperada, pois gene S_{H3} advém da espécie *C. liberica*. Todavia, os cafeeiros identificados com os outros quatro genes de resistência piramidados, são fontes promissoras de resistência. A destaque para os cafeeiros 4, 25, 47, 48, 78, 89, 93, 108 e 123 que contém o loco B em homozigose dominante, o qual não irá segregar em campo. A piramidação dos alelos de resistência irá dificultar a suplantação da resistência pelo patógeno (Saavedra et al., 2023; Sera et al., 2022; Zambolim & Caixeta, 2021; Silva et al., 2018; Alkimim et al., 2017). Sendo assim, esses cafeeiros são potenciais genitores para os programas de melhoramento do cafeeiro, uma vez que apresentam quatro alelos de resistência a ferrugem, piramidados.

Marcadores moleculares também foram utilizados para monitorar locos de resistência a outra doença, conhecida como CBD, causada pelo fungo *Colletotrichum kahawae*. Foram utilizados dois marcadores SSR, ambos identificados e mapeados por Gichuru et al. (2008) e validados por Alkimin et al. (2017). Esses marcadores se encontram flanqueando o gene Ck-1, que confere resistência a doença. Através da análise conjunta dos marcadores, foi identificado 24 cafeeiros homozigotos resistentes. Esses indivíduos apresentam a marca de resistência para

os dois marcadores moleculares (Sat207 e Sat235). A análise conjunta é realizada para aumentar a eficiência de seleção (Alkimin et al., 2017) evitando que indivíduos recombinantes sejam avançados para a próxima geração. As recombinações observadas, ou seja, a presença de apenas um marcador, podem resultar na perda dos genes de resistência (Saavedra et al., 2023). Isso se deve ao fato da distância estimada dos dois marcadores, 17,2 cM (Gichuru et al., 2008). Quanto maior a distância entre marcadores, maior a chance de ocorrência de recombinações (Carneiro & Vieira, 2002).

Embora o CBD seja uma doença restrita ao continente Africano, o melhoramento preventivo é de extrema importância. O desenvolvimento e caracterização de cultivares resistentes resguarda a cultura do café, caso esta doença chegue no Brasil. A disponibilidade desses marcadores permite a identificação de indivíduos contendo genes de resistência mesmo na ausência do patógeno (Gichuru et al., 2008; Alkimin et al., 2017; Vieira et al., 2019; Caixeta et al., 2016).

Dentre as outras diversas vantagens de utilizar marcadores moleculares para identificar indivíduos que contenham alelos de resistência a doenças, está a piramidação dos múltiplos alelos de resistência. Seja para um único patógeno ou múltiplos patógenos (Almeida et al., 2021; Jaber et al., 2020). A Tabela 4 mostra a genotipagem dos cafeeiros de Rondônia para ferrugem e CBD. Nesta tabela é possível identificar cafeeiros contendo o maior número de alelos piramidados para ambas as doenças. Os cafeeiros N1, N12 e N16 apresentaram quatro alelos de resistência para ferrugem e o alelo para CBD (B_C_D_E_FF). Esses três cafeeiros são híbridos de polinização aberta e correspondem a plantas selecionadas por um produtor de Rondônia, sendo obtidas de uma mesma lavoura. Pelo dendrograma observa-se que os cafeeiros N1 e N16 são geneticamente similares, ficando ambos no subgrupo Vd. Quando um genótipo possui alelos de resistência piramidados, aumenta a estabilidade de desempenho no ambiente. Esta é uma das propriedades mais desejáveis dos genótipos a serem recomendados para uma lavoura prolongada (Melese et al., 2021), como é o caso da cultura do café.

Cruzamentos de genótipos divergentes permitem ganho de seleção e manutenção da diversidade genética ao longo dos ciclos (Sousa et al., 2017; Hoque et al., 2020). A Tabela 4 direciona a escolha dos melhores genótipos a serem utilizados para futuros cruzamentos. Com isso, é possível selecionar cafeeiros que possuem a piramidação de alelos de resistência para ferrugem e CDB e estejam alocados em grupos de diversidade diferentes. A exemplo, pode-se realizar o cruzamento do cafeeiro identificado por N12, possui genes piramidados (BbC_D_E_FF), e está alocado no grupo Vb do dendrograma, com o cafeeiro identificado por Rob36 (BBC_D_E_ff). Este também possui os genes de resistência a ferrugem piramidados e

está alocado no grupo de ligação IId. Isto irá propiciar maior ganho de seleção e manutenção da variabilidade genética, uma vez que estão alocados em grupos diferentes no dendrograma, sendo divergentes geneticamente.

A cafeicultura faz parte do cenário Rondoniense desde sua colonização, em meados de 1970 (Oliveira et al., 2015). Todavia, maiores destaques para produção foram alcançados anos após o início do cultivo (Espindula et al., 2022). Atualmente, o estado de Rondônia é o segundo maior produtor nacional de *C. canephora* (Conab, 2022). Apesar de ser uma cultura de cadeia produtiva e robusta, existem desafios, como as mudanças climáticas globais (Gruter et al., 2022; Bilen et al., 2023). Esta poderá ocasionar riscos a resistência a estresses bióticos e abióticos. A exemplo, estudos projetam reduções no período de incubação da ferrugem do café, o que poderá ocasionar epidemias mais graves (Bilen et al., 2023).

A utilização dos marcadores moleculares nos programas de melhoramento permite um grande avanço na obtenção de cultivares superiores, uma vez que auxilia as tomadas de decisões dos melhoristas. Desse modo, possibilitam conhecer os materiais disponíveis e acelerar os processos de obtenção de materiais resilientes as mudanças climáticas.

5. CONCLUSÕES

Os marcadores moleculares SNPs foram eficientes no estudo de diversidade genética. Os cafeeiros da variedade botânica Robusta se concentraram no grupo II, os cafeeiros da variedade botânica Conilon, no grupo III e os híbridos intervarietais no grupo V. A caracterização molecular para resistência a Ferrugem e CBD permitiram identificar cafeeiros portadores de diferentes genes de resistência a essas doenças. Visando o desenvolvimento de clones e híbridos com múltipla resistência a ferrugem e CBD que sejam resilientes as mudanças climáticas, esses resultados são úteis para o direcionamento de novos cruzamentos em programas de melhoramento do cafeeiro.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alkimim ER, Caixeta ET, Sousa TV et al (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*, 37:1-10.
- Alkimim ER, Caixeta ET, Sousa TV et al (2018). High-throughput targeted genotyping using next-generation sequencing applied in *Coffea canephora* breeding. *Euphytica*, 214:1-18.
- Alkimim ER, Caixeta, ET, Sousa, TV et al (2020). Selective efficiency of genome-wide selection in *Coffea canephora* breeding. *Tree Genetics & Genomes*, 16:1-11.

Alkimim ER, Caixeta ET, Sousa TV et al (2021). Designing the best breeding strategy for *Coffea canephora*: Genetic evaluation of pure and hybrid individuals aiming to select for productivity and disease resistance traits. *PloS one*, 16: e0260997.

Almeida DP, Caixeta ET, Moreira KF et al (2021). Marker-assisted pyramiding of multiple disease resistance genes in coffee genotypes (*Coffea arabica*). *Agronomy*, 11:1763.

Alvarenga SM, 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.

Bilen C, El Chami D, Mereu V et al (2023). A Systematic Review on the Impacts of Climate Change on Coffee Agrosystems. *Plants*, 12:102.

Barka GD, Caixeta ET, Ferreira SS et al (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.

Caixeta ET, Pestana KN, & Pestana RKN (2015). Melhoramento do cafeeiro: ênfase na aplicação dos marcadores moleculares. Embrapa Café-Capítulo em livro científico (ALICE).

Caixeta ET, Oliveira ACB, Brito GG et al (2016). Tipos de Marcadores Moleculares. In: BORÉM, Aluizio; CAIXETA, Eveline Teixeira (org.). *Marcadores Moleculares*. Viçosa, MG: Editora UFV, p. 385.

Capucho AS, Zambolim EM, Freitas RL et al (2012). Identification of race XXXIII of *Hemileia vastatrix* on *Coffea arabica* Catimor derivatives in Brazil. *Australasian Plant Disease Notes*, 7:189-191.

Carneiro MS & Vieira MLC (2002). Genetic maps in plants. *Bragantia*, 61:89-100.

Combes MC, Andrzejewski, S, Anthony F et al (2000). Characterization of microsatellite loci in *Coffea arabica* and related coffee species. *Molecular ecology*, 9:1178-1180

Conab (2022). Acompanhamento da safra brasileira CAFÉ – Terceiro Levantamento – Setembro 2022.

Davis AP (2011). *Psilanthus mannii*, the type species of *Psilanthus*, transferred to *Coffea*. *Nordic Journal of Botany*, 29:471-472.

Davis AP, et al. (2012). The impact of climate change on indigenous arabica coffee (*coffea arabica*): Predicting future trends and identifying priorities. *PLoS ONE*, 11: e47981.

Diniz LE, Sakiyama NS, Lashermes P et al (2005). Analysis of AFLP markers associated to the Mex- 1 resistance locus in Icatu progenies. *Crop breeding and applied technology*, 5: 387.

Espindula MC, Araújo LFBD, Schmidt R et al (2020). Early induction of orthotropic shoots in *Coffea canephora*. *Revista Ceres*, 67:281-287.

- Faria LS, Alkimim ER, Barreiro PRRM et al (2022). Genome-wide association study of plant architecture and diseases resistance in *Coffea canephora*. *Euphytica*, 218:92.
- Faria LS (2022). Estrutura Populacional e Diversidade Genética de *Coffea canephora* detectadas por Marcadores Moleculares. Tese Universidade Federal de Viçosa.
- Ferrão LFV (2013). Marcadores microssatélites em estudo de diversidade, mapeamento genético e análises de QTLs em *Coffea canephora*. Tese Universidade Federal de Viçosa.
- Ferrão LFV, Caixeta ET, Souza FDF et al (2013). Comparative study of different molecular markers for classifying and establishing genetic relationships in *Coffea canephora*. *Plant systematics and evolution*, 299:225-238.
- Ferrão MAG, da Fonseca AF, Volpi PS et al (2023). Genomic-assisted breeding for climate-smart coffee. *The Plant Genome*, e20321.
- Gichuru EK, Agwanda CO, Combes MC et al (2008). Identification of molecular markers linked to a gene conferring resistance to coffee berrydisease (*Colletotrichum kahawae*) in *Coffea arabica*. *Plant Pathol* 57:1117–1124.
- Gichuru E, Alwora G, Gimase J et al (2021). Coffee leaf rust (*Hemileia vastatrix*) in Kenya—A review. *Agronomy*, 11:2590.
- Gnirke A, Melnikov A, Maguire J et al (2009). Seleção híbrida de solução com oligonucleotídeos ultralongos para sequenciamento direcionado massivamente paralelo. *Biotechnologia da natureza*, 27: 182-189.
- Grüter R, Trachsel T, Laube P & Jaisli, I. (2022). Expected global suitability of coffee, cashew and avocado due to climate change. *PloS one*, 17: e0261976.
- Hoque A, Fiedler JD, Rahman M (2020). Genetic diversity analysis of a flax (*Linum usitatissimum* L.) global collection. *BMC genomics*, 21: 1-13.
- Jaber EHA, Srour AY, Zambounis AG et al (2020). Identification of SCAR markers linked to the Foc gene governing resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* in cucumber cv. SMR-18. *European Journal of Plant Pathology*, 157:845-855.
- Jawo TO, Kyereh D & Lojka B (2023). The impact of climate change on coffee production of small farmers and their adaptation strategies: a review. *Climate and Development*, 15: 93-109.
- Leroy T, Marraccini P, Dufour M et al (2005). Construction and characterization of a *Coffea canephora* BAC library to study the organization of sucrose biosynthesis genes. *Theoretical and Applied Genetics*, 111:1032-1041.
- Lorençone PA, de Oliveira Aparecido LE, Lorençone JA et al (2023). Climate change and its consequences on the climatic zoning of *Coffea canephora* in Brazil. *Environment, Development and Sustainability*, 1-22.
- Mahé L, Combes MC, Várzea VMP et al (2008) Development of sequence characterized DNA markers linked to leaf rust (*Hemileia vastatrix*) resistance in coffee (*Coffea arabica* L.). *Mol. Breed.*, 21:105–113.

- Maurin O, Davis AP, Chester M et al (2007). Towards a phylogeny for *Coffea* (Rubiaceae): identifying well-supported lineages based on nuclear and plastid DNA sequences. *Ann Bot* 100:1565–1583.
- Medeiros AC, Caixeta ET, Oliveira ACBD et al (2021). Combining Ability and Molecular Marker Approach Identified Genetic Resources to Improve Agronomic Performance in *Coffea arabica* Breeding. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 5:311.
- Meira D, Panho MC, Beche E et al (2022). Gene pyramiding combinations confer resistance of Asian soybean rust. *Crop Science*, 62:792-801
- Melese Y & Kolech SA (2021). Coffee (*Coffea arabica* L.): Methods, objectives, and future strategies of breeding in Ethiopia. *Sustainability*, 13:10814.
- Nei M, Li WH (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76:5269- 5273.
- Partelli FL & Espindula MC (2019). Café conilon: conhecimento para superar desafios. Alegre, ES: CAUFES.
- Pestana KN, Capucho AS, Caixeta ET et al (2015). Inheritance study and linkage mapping of resistance loci to *Hemileia vastatrix* in Híbrido de Timor UFV 443-03. *Tree Genetics and Genomes*, 11:1–13.
- Rahn E et al. (2018). Exploring adaptation strategies of coffee production to climate change using a process-based model. *Ecological Modelling*, 371: 76–89.
- Rocha RB, Teixeira AL, Ramalho AR et al (2015). Melhoramento de *Coffea canephora*: considerações e metodologias. Embrapa Semiárido-Capítulo em livro técnico (INFOTECA-E).
- Rocha RB, Teixeira AL, Ramalho AR et al (2021). *Coffea canephora* breeding: estimated and achieved gains from selection in the Western Amazon, Brazil. *Ciência Rural*, 51.
- Saavedra LM, Caixeta ET, Barka GD et al (2023). Marker-Assisted Recurrent Selection for Pyramiding Leaf Rust and Coffee Berry Disease Resistance Alleles in *Coffea arabica* L. *Genes*, 14: 189.
- Sera GH, de Carvalho CHS, de Rezende Abrahão JC et al (2022). Coffee leaf rust in Brazil: Historical events, current situation, and control measures. *Agronomy*, 12:496.
- Silva RA, Zambolim, L, Castro ISL et al (2018). The Híbrido de Timor germplasm: identification of molecular diversity and resistance sources to coffee berry disease and leaf rust. *Euphytica*, 214:1-16.
- Silva MDC, Guerra-Guimarães L, Diniz I et al (2022). An Overview of the Mechanisms Involved in Coffee-*Hemileia vastatrix* Interactions: Plant and Pathogen Perspectives. *Agronomy*, 12:326.

- Sousa TV, Caixeta ET, Alkimim ER et al (2017). Molecular markers useful to discriminate *Coffea arabica* cultivars with high genetic similarity. *Euphytica*, 213:1-15.
- Sousa TV, Caixeta ET, Alkimim ER et al (2017). Population structure and genetic diversity of coffee progenies derived from Catuaí and Híbrido de Timor revealed by genome-wide SNP marker. *Tree genetics & genomes*, 13:1-16.
- Talhinhas P, Batista D, Diniz I et al (2017). The coffee leaf rust pathogen *Hemileia vastatrix*: one and a half centuries around the tropics. *Molecular plant pathology*, 18:1039.
- Teixeira AL, Souza FDF, Rocha RB et al (2017). Performance of intraspecific hybrids (Kouillou x Robusta) of *Coffea canephora* Pierre. *African J Agric Res*, 12:2675-2680.
- Teixeira AL, Rocha RB, Espindula MC et al (2020). Amazonian Robustas-new *Coffea canephora* coffee cultivars for the Western Brazilian Amazon. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 20: e323420318.
- Velásquez S & Banchón C (2022). Influence of pre-and post-harvest factors on the organoleptic and physicochemical quality of coffee: a short review. *Journal of Food Science and Technology*, 1-13.
- Vieira A, Diniz I, Loureiro A et al (2019). Aggressiveness profiling of the coffee pathogen *Colletotrichum kahawae*. *Plant pathology*, 68:358-368.
- Vienetz T, Acre LB, Rocha RB et al (2023). Caffeine, trigonelline, chlorogenic acids, melanoidins, and diterpenes contents of *Coffea canephora* coffees produced in the Amazon. *Journal of Food Composition and Analysis*, 117: 105140.
- 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.
- Zullo J et al. (2011). Potential for growing Arabica coffee in the extreme south of Brazil in a warmer world. *Climatic Change*, 109: 535–548.

CAPÍTULO II

ANÁLISE DAS SEQUENCIAS DE REGIÕES GENÔMICAS ASSOCIADAS A AUTOINCOMPATIBILIDADE EM *Coffea canephora*

RESUMO

Conhecida como uma das bebidas mais apreciadas no mundo, o café é advindo de plantas da família Rubiaceae e gênero *Coffea*. A espécie *Coffea Canephora* é uma planta diploide, alógama e autoincompatível. A autoincompatibilidade impede que uma planta fértil forme sementes viáveis caso seja fertilizada pelo seu próprio pólen. Esta característica é governada, nessa espécie, por um gene multialélico “S” (S1, S2 e S3). Assim, uma planta reconhece e rejeita o próprio pólen ou o pólen de outros indivíduos que sejam geneticamente idênticos, ou seja, que apresentem o mesmo alelo no loco S. Para contornar o mecanismo de autoincompatibilidade gametofítica e obter eficiência de polinização nos cultivos clonais de *C. canephora*, é primordial que haja combinação de genótipos de grupos de compatibilidade divergentes no campo. Visando definir a qual grupo de compatibilidade os genótipos do estado de Rondônia, Brasil, pertencem, o objetivo deste trabalho foi sequenciar e avaliar diferenças em regiões de interesse do gene S, que podem estar relacionadas ao mecanismo de autoincompatibilidade gametofítica na espécie *C. canephora*. Foram selecionados genótipos de *C. canephora* sabidamente pertencentes a três diferentes grupos de autoincompatibilidade (grupo I, II e III). Foram utilizados quatro diferentes *primers* para a amplificação de regiões polimórficas de interesse no gene S, previamente desenhados em regiões hipervariáveis no cromossomo 2 da espécie. A amplificação dos fragmentos foi realizada em gel de poliacrilamida e, posteriormente, foi realizado o sequenciamento das bandas de gel para análise comparativa dos fragmentos via *Clustal Omega*. As sequências de DNA dos genótipos dos diferentes grupos de autoincompatibilidade foram alinhadas e não foi encontrado polimorfismo. Ao realizar o BLAST entre a sequência consenso obtida do sequenciamento realizado com o *primer* HVa3 e o genoma de referência de *C. canephora*, observou-se que há duas regiões de alinhamento no cromossomo 2, com grande quantidade de *mismatch* e *Gap*. Esta diferença observada pode ser decorrente da ampla diversidade genética presente na espécie. Além disso, o genoma de referência disponível foi obtido de um cafeeiro geneticamente distante dos Robustas Amazônicos e Conilons cultivados no Brasil. O alinhamento entre as duas sequências amplificadas em regiões distintas no genoma de *C. canephora* com o *primer* HVa3 mostrou serem idênticas. Este resultado pode ser um indício dessas serem regiões repetitivas dispersas no genoma da espécie. Este trabalho corresponde ao início de entendimento do mecanismo e as regiões genômicas envolvidas na autoincompatibilidade de *C. canephora*.

1. INTRODUÇÃO

Conhecida como uma das bebidas mais apreciadas no mundo, o café é advindo de plantas da família Rubiaceae e gênero *Coffea*. Apesar do gênero conter mais de 124 espécies já descritas (Davis et al., 2011), apenas duas são de maior importância econômica: *Coffea arabica* e *Coffea Canephora*. A primeira é uma espécie autógama e aloteraploide ($2n = 4x = 44$) originada do cruzamento entre *C. eugenoides* e *C. canephora*, enquanto a segunda espécie é uma alógama e diplóide ($2n = 2x = 22$) (Charrier & Berthaud 1985).

Alguns fatores impulsionaram a demanda e consequente produção da espécie *C. canephora*. Por proporcionarem uma bebida com mais corpo, alto teor de sólidos solúveis e rendimento industrial, os cafeeiros desta espécie são amplamente utilizados em *blends* para produção de café solúvel e expresso (Rocha et al., 2015; Conab, 2022). Além disso, esta espécie é de grande importância no melhoramento genético do cafeeiro. São importantes reservatórios de genes de resistência às principais doenças que acometem a cultura, e apresentam uma grande diversidade genética a ser explorada, pré-requisito para garantir ganhos genéticos com seleção em um programa de melhoramento (Ferrão et al., 2019; Sousa et al., 2022).

Um dos fatores que contribuem para a grande diversidade genética na espécie *C. canephora* é o mecanismo de autoincompatibilidade do tipo gametofítica (AIG), presente no sistema reprodutivo da espécie (Depolo et al., 2022). De forma geral, a autoincompatibilidade impede que uma planta fértil forme sementes viáveis caso seja fertilizada pelo seu próprio pólen (Vieira et al., 2021). Como não há formação de zigoto caso haja autopolinização, este mecanismo favorece a fecundação cruzada para a manutenção da espécie.

Estudos demonstraram que esta característica é governada por apenas um gene multialélico “S”, com uma série de alelos interagindo, sendo eles S1, S2 e S3 (Conagin e Mendes, 1961; Berthaud, 1980; Souza et al., 2021). A reação de AIG na espécie ocorre entre o tubo polínico e o estilete quando possuem o mesmo alelo (Coulibaly *et al.*, 2003, Vieira et al., 2021). Quando o alelo S do pólen é diferente dos dois alelos S do estilete, o tubo polínico cresce normalmente, entrando no ovário e realizando a fertilização (Ferrão *et al.*, 2019). Assim, uma planta reconhece e rejeita o próprio polén ou o pólen de outros indivíduos que sejam geneticamente idênticos, ou seja, que apresentam mesmo alelo no loco S. Com isto, há a promoção do cruzamento entre indivíduos geneticamente distintos para esta característica (Nettancourt, 2001; Zhang et al., 2023).

Para contornar o mecanismo de AIG e obter eficiência de polinização nos cultivos clonais de *C. canephora*, é primordial que haja combinação de genótipos de grupos de compatibilidade diferentes no campo. Análises das sequências de DNA da região do loco S,

bem como o desenvolvimento de marcadores moleculares pode auxiliar a definição do grupo de compatibilidade dos genótipos. A detecção da diferença nas sequências de DNA de cafeeiros de grupos de compatibilidade diferentes pode ser uma alternativa prática, rápida e eficaz para este fim (Sousa et al., 2022).

Desse modo, o objetivo deste trabalho foi sequenciar e avaliar diferenças em regiões de interesse do gene S, que podem estar relacionadas ao mecanismo de autoincompatibilidade gametofítica na espécie *C. canephora*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material genético

Foram selecionados genótipos de *C. canephora* sabidamente pertencentes a três diferentes grupos de autoincompatibilidade (Tabela 1). Esses genótipos estão entre as cultivares lançadas recentemente pela Embrapa Rondônia. Os genótipos BRS 1216, BRS 3213, BRS 3210 e BRS 2299 são híbridos intervarietais, obtidos pela hibridação controlada entre genótipos das variedades botânicas Rosbuta e Conilon. Já o genótipo BRS 2357 pertencente a variedade botânica Conilon (Espindula et al., 2022).

O material foliar foi coletado no estado de Rondônia – Brasil e enviado ao laboratório de Biotecnologia do Cafeeiro – BioCafé, na Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil. A extração do DNA genômico foi realizada pelo método proposto por Diniz et al. (2005). A qualidade do DNA foi testada em gel de agarose e a quantificação realizada em NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA). As amostras de DNA foram padronizadas a $25 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ e armazenadas a -20°C até a análise.

Tabela 1. Genótipos utilizados em cada *primer* e seus respectivos grupos de autoincompatibilidade.

Grupo de autoincompatibilidade	<i>Primers</i>		
	HVa3	HVb3	HVb8
Grupo I	BRS1216	BRS1216	BRS1216
Grupo II	BRS2357	BRS2299	BRS2357
Grupo III	BRS 3213	BRS3213	BRS 3213
	BRS 3210	-	-

2.2 Seleção de *primers* para estudo de autoincompatibilidade em *C. canephora*

Com o intuito de propor *primers* para a amplificação e sequenciamento de regiões polimórficas de interesse no gene S, que determina a expressão de incompatibilidade em *C.*

canephora, Silva et al., 2022 (relatório do doutorado) desenharam 20 *primers*. Estes foram desenhados em duas regiões hipervariáveis (Hv) no cromossomo 2 de *C. canephora*. Assim, 10 *primers* foram desenhados para a HVa e outros 10 para a região HVb (Tabela 2). Para facilitar a didática do trabalho, os códigos dos *primers* foram alterados do original.

Tabela 2. *Primers* previamente desenhados para amplificação de regiões polimórficas de interesse (HVa e HVb) no gene S de *C. canephora*.

Código do <i>primer</i>	Sequência <i>Forward</i>	Sequência <i>Reverse</i>	Tam
HVa1	CACTCCAAATATTGGGGATGCAA	CCATCGTATTGCAGGGTGGGA	304
HVa2	AATATTGGGGATGCAAAGTGC	TGGGGTCCATCGTATTGCAG	303
HVa3	CAAATATTGGGGATGCAAAGTGC	TCCATCGTATTGCAGGGTGG	300
HVa4	ACTCCAAATATTGGGGATGCAA	GGTCCATCGTATTGCAGGGT	306
HVa5	TCCAAATATTGGGGATGCAAAGTG	GGGTCCATCGTATTGCAGGG	305
HVa6	CACTCCAAATATTGGGGATGCAAA	GGGGTCCATCGTATTGCAGG	309
HVa7	TCCAAATATTGGGGATGCAAAGT	TTCTGGGGTCCATCGTATTGC	310
HVa8	ACTCCAAATATTGGGGATGCAAA	CATCGTATTGCAGGGTGGAC	302
HVa9	CTCCAAATATTGGGGATGCAAAGT	GTCCATCGTATTGCAGGGTG	304
HVa10	ACTCCAAATATTGGGGATGCAAAG	CTGGGGTCCATCGTATTGCAG	310
HVb1	TAGCACAAAGCCACCTCCAC	CGGGAGATTTCGAGCTCATGG	520
HVb2	ATCGTAGCACAAAGCCACCT	TCGAGCTAAAAGAATCGGGAG	539
HVb3	CATCGTAGCACAAAGCCACC	GGAGATTTCGAGCTCATGGCCTA	523
HVb4	TTTTCTCCCGGGAACATCGT	TTCGAGCTAAAAGAATCGGGAG	555
HVb5	AATAGCGGCACCGTAACTCC	GAGATTTCGAGCTAAAAGAATCGGG	500
HVb6	CTCCCGGGAACATCGTAGC	TTCGAGCTAAAAGAATCGGGA	551
HVb7	TAATAGCGGCACCGTAACTCC	AGATTTCGAGCTAAAAGAATCGGGA	500
HVb8	TTCTCCCGGGAACATCGTAG	TTCGAGCTAAAAGAATCGGGAGAT	553
HVb9	GGAACATCGTAGCACAAAGCC	ATTCGAGCTAAAAGAATCGGGAGA	546
HVb10	GTAACCTCCGGCGTAACTCCA	AAATGGGCAAAAAGAATCAGGAG	507

Foi realizada a PCR eletrônica (e-PCR) (Rotmistrovsky *et al.*, 2004) para os 20 *primers* previamente desenhados. Esta ferramenta foi utilizada com o intuito de verificar se estes pares de *primers* são específicos para o alvo que se foi desenhado, ou seja, se não estão alinhando em múltiplas regiões do genoma de *C. canephora*.

2.3 Sequenciamento Sanger

2.3.1 Amplificação dos fragmentos em gel de poliacrilamida para sequenciamento

A amplificação do DNA purificado por PCR 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* e 1,0 unidade de Taq DNA polimerase (Invitrogen), completando o volume com água milli-Q. As reações foram realizadas em termociclador 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 30 segundos, anelamento a 62° C por 30 segundos e extensão a 72° C por um minuto; e extensão final a 72° C por 10 minutos. Os produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante 6% e visualizados por meio de coloração com nitrato de prata (Brito et al. 2010).

2.3.2 Sequenciamento de banda de gel de poliacrilamida e análise comparativa dos fragmentos sequenciados

As bandas visualizadas em gel de poliacrilamida foram recortadas com auxílio de espátula reta, transferidas para *eppendorf* de 0,5 ml e diluídas com 80 µL de TBE 1X. Posteriormente, foi seguido o protocolo de sequenciamento de fragmentos de banda de gel de poliacrilamida. O fragmento de DNA de interesse presente na banda recortada do gel de poliacrilamida foi sequenciado em sequenciador ABI 3130xl Genetic Analyzer (*Applied Biosystems*) no laboratório de Biotecnologia do Cafeeiro, localizado no Instituto de Biotecnologia Aplicado à Agropecuária (Bioagro) da Universidade Federal de Viçosa. Após o sequenciamento, as sequências de baixa qualidade foram retiradas e formadas sequências consenso utilizando o programa Sequencer 4.10.1 (*Gene Codes Corporation-USA*). Os fragmentos de DNA sequenciados dos diferentes genótipos correspondentes a grupos de compatibilidade diferentes foram comparados entre si pela ferramenta de alinhamento *Clustal Omega* (Sievers et al., 2011). Também foi realizado o BLAST entre essas sequências obtidas no sequenciamento e com o genoma de referência de *Coffea canephora* (Denoeud et al., 2014) disponibilizado no Coffee Genome Hub, pela ferramenta BLASTn (Coffee Genome Hub - <http://www.coffee-genome.org/blast>).

3.RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para prosseguir o estudo de autoincompatibilidade na espécie *C. canephora* através da comparação de sequência de DNA amplificada dos genótipos pertencentes a grupos de compatibilidade diferentes, foi utilizada a ferramenta de PCR eletrônica (e-PCR). Através desta ferramenta foi possível conferir o alinhamento, posição e a taxa de *mismatch* e *gap* dos *primers* em estudos. *Mismatch* são pares de base que não correspondem corretamente, sendo inconsistência ou diferença entre as sequências entre o *primer* e a região de anelamento no DNA. Os *gap* são lacunas de regiões não sequenciadas ou desconhecidas no genoma.

Os resultados da e-PCR mostraram que todos os 20 *primers* disponibilizados anelaram em regiões próximas de 6617450-6620971 do cromossomo 2 (código HG974429.1) do genoma de *C. canephora* (Tabela 3). Alguns *primers* anelaram em mais de uma região, o que poderia ocasionar múltiplas bandas na PCR, ou seja, bandas que não correspondem ao fragmento de interesse no estudo. Todavia, ao analisar os resultados obtidos de regiões de anelamento dos *primers* foi possível observar que a região HVa é uma região duplicada do genoma. Já a região HVb não apresenta essa duplicação, pois observa-se que apenas o *primer reverse* se deslocou em poucos pares de base para a direita ou esquerda. Neste caso, estes primers amplificaram apenas uma região (Figura 1). A amplificação de múltiplas regiões dificulta a análise das sequencias de DNA.

Tabela 3. Resultado da e-PCR realizada com 20 *primers* candidatos a estudo de autoincompatibilidade em *C. canephora*.

Gene encontrado pela e-PCR	Código do Primer	Região de anelamento do primer	Tamanho do amplicon encontrado/ esperado	Mismatch	GAP
HG974429.1	HVa1	6626285- 6626588	304/304-304	0	0
HG974429.1	HVa1	6620656-6620959	304/304-304	0	0
HG974429.1	HVa2	6626292-6626594	303/303-303	0	0
HG974429.1	HVa2	6620663-6620965	303/303-303	0	0
HG974429.1	HVa2	27382238-27382579	342/303-303	6	5
HG974429.1	HVa3	6626290-6626589	300/300-300	0	0
HG974429.1	HVa3	6620661-6620960	300/300-300	0	0
HG974429.1	HVa4	6626286-6626591	306/306-306	0	0
HG974429.1	HVa4	6620657-6620962	306/306-306	0	0
HG974429.1	HVa5	6626288-6626592	305/305-305	0	0
HG974429.1	HVa5	6620659-6620963	305/305-305	0	0
HG974429.1	HVa6	6626285-6626593	309/309-309	0	0
HG974429.1	HVa6	6620656-6620964	309/309-309	0	0
HG974429.1	HVa7	6626288-6626597	310/310-310	0	0
HG974429.1	HVa7	6620659-6620968	310/310-310	0	0
HG974429.1	HVa8	6626286-6626587	302/302-302	0	0
HG974429.1	HVa8	6620657-6620958	302/302-302	0	0
HG974429.1	HVa9	6626287-6626590	304/304-304	0	0
HG974429.1	HVa9	6620658-6620961	304/304-304	0	0
HG974429.1	HVa10	6626286-6626595	310/310-310	0	0
HG974429.1	HVa10	6620657-6620966	310/310-310	0	0
HG974429.1	HVb1	6617553-6618072	520/520-520	0	0
HG974429.1	HVb2	6617549-6618110	562/539-539	2	2
HG974429.1	HVb2	6617549-6618087	539/539-539	0	0
HG974429.1	HVb3	6617548-6618070	523/523-523	0	0
HG974429.1	HVb4	6617534-6618111	578/555-555	3	2
HG974429.1	HVb4	6617534-6618088	555/555-555	0	0
HG974429.1	HVb5	6617593-6618092	500/500-500	0	0
HG974429.1	HVb6	6617538-6618111	574/551-551	3	2
HG974429.1	HVb6	6617538-6618088	551/551-551	0	0
HG974429.1	HVb7	6617592-6618091	500/500-500	0	0
HG974429.1	HVb8	6617536-6618089	554/553-553	0	1
HG974429.1	HVb8	6617536-6618088	553/553-553	0	0
HG974429.1	HVb9	6617544-6618089	546/546-546	0	0
HG974429.1	HVb9	6617544-6618088	545/546-546	0	1
HG974429.1	HVb10	6617605-6618111	507/507-507	0	0
HG974429.1	HVb10	6617605-6618088	484/507-507	3	3

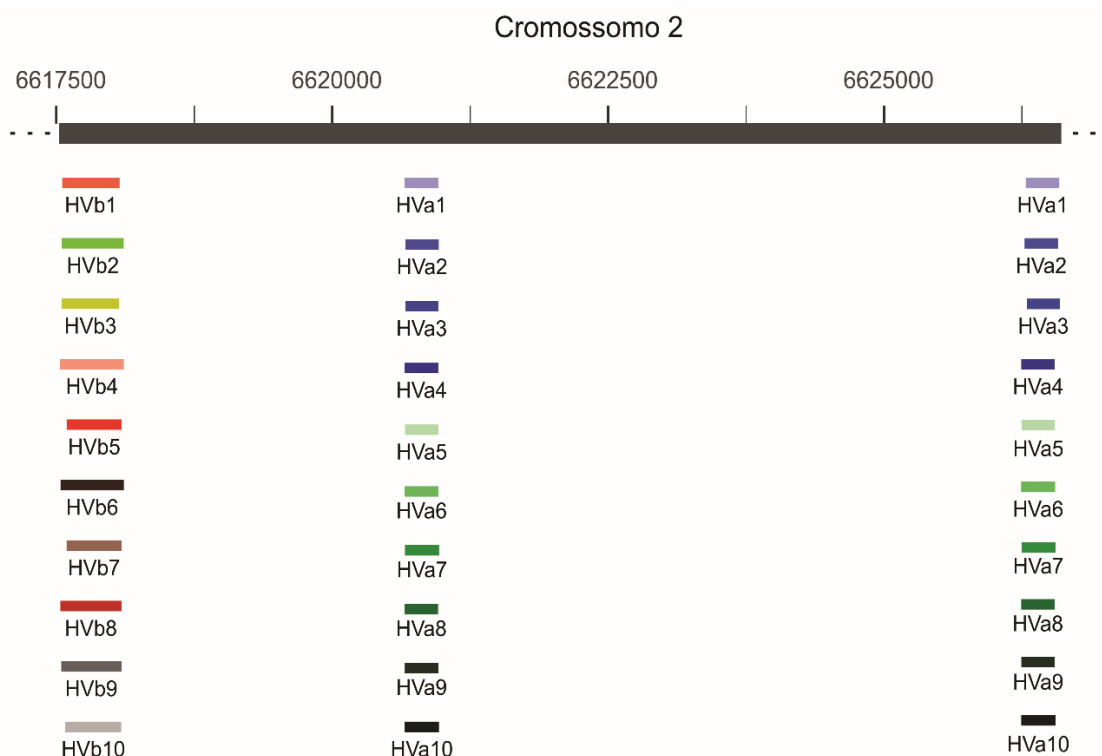


Figura 1: Demonstração do alinhamento dos 20 *primers* no cromossomo 2 do genoma de *C. canephora*. Cada cor corresponde a um conjunto de *primer*.

A partir desses resultados foram selecionados quatro *primers* (Tabela 4), sendo dois *primers* para região de hipervariação A - HVa (Hva3 e Hva7) e dois para região de hipervariação B - HVb (Hvb3 e Hvb8). Estes foram selecionados com base no tamanho de fragmento amplificado e região amplificada. Todavia, durante o protocolo de sequenciamento, o *primer* HVa7 demonstrou em gel estar amplificando mais de uma região do genoma. Dessa forma, este foi descartado do trabalho.

Tabela 4. Conjunto de *primers* pré-selecionados para sequenciamento de região de AIG no cromossomo 2 de *C. canephora*.

Nome	Forward	Reverse	Tam
HVa3	CAAATATTGGGGATGCAAAGTGC	TCCATCGTATTGCAGGGTGG	300
HVa7	TCCAAATATTGGGGATGCAAAGT	TTCTGGGGTCCATCGTATTGC	310
HVb3	CATCGTAGCACAAAGCCACC	GGAGATTCGAGCTCATGGCCTA	523
HVb8	TTCTCCCGGGAACATCGTAG	TTCGAGCTAAAAGAATCGGGAGAT	553

O sequenciamento Sanger realizado para os três *primer* (HVa3, HVb3 e HVb8) com genótipos distintos quanto ao grupo de compatibilidade apresentou alta qualidade (variando de 75 a 96% de qualidade). As sequências de DNA dos genótipos, cada um pertencente a um grupo de autoincompatibilidade, foram alinhadas. Os resultados obtidos mostram que não existe

polimorfismo para as regiões sequenciadas, quando comparado o DNA dos cafeeiros do grupo I, com do grupo II e com do grupo III. Este resultado foi similar para os três *primers* (para as três regiões) utilizados no trabalho (Figura 2,3 e 4).

```

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

IIIa  -----AAAGTTTATGACATACGCATAGAACTTTTGAAAGTACTTTTGAGTTTTTTTCA  53
I      -----TGACATACGCATAGAACTTTTGAAAGTACTTTTGAGTTTTTTTCA  45
IIIb   -----GTTTATGACATACGCATAGAACTTTTGAAAGTACTTTTGAGTTTTTTTCA  50
II      AAGTGGAAGTTTATGACATACGCATAGAACTTTTGAAAGTACTTTTGAGTTTTTTTCA  60
          *****

IIIa    GGATAACTCAAAAAGGAAGTATGACGTTAACGATTTAACATAGGTATGGGAGTGCATAGA  113
I        GGATAACTCAAAAAGGAAGTATGACGTTAACGATTTAACATAGGTATGGGAGTGCATAGA  105
IIIb     GGATAACTCAAAAAGGAAGTATGACGTTAACGATTTAACATAGGTATGGGAGTGCATAGA  110
II        GGATAACTCAAAAAGGAAGTATGACGTTAACGATTTAACATAGGTATGGGAGTGCATAGA  120
          *****

IIIa    AATCTAACCCGTAGTGGTCTATAGCGAGTGCCAGGACAGTTGTATAAATCCGCGTATAG  173
I        AATCTAACCCGTAGTGGTCTATAGCGAGTGCCAGGACAGTTGTATAAATCCGCGTATAG  165
IIIb     AATCTAACCCGTAGTGGTCTATAGCGAGTGCCAGGACAGTTGTATAAATCCGCGTATAG  170
II        AATCTAACCCGTAGTGGTCTATAGCGAGTGCCAGGACAGTTGTATAAATCCGCGTATAG  180
          *****

IIIa    TTGTCCGGCCATAGACCATGCAATGTGAACT-----  204
I        TTGTCCGGCCATAGACCATGCAATGTGAACTTAGG-----  200
IIIb     TTGTCCGGCCATAGACCATGCAATGTGAACTTAGGCACTGG--  211
II        TTGTCCGGCCATAGACCATGCAATGTGAACTTAGGCACTGGT  223
          *****

```

Figura 2: Alinhamento das sequencias obtidas via ferramenta *Clustal Omega* a partir do sequenciamento realizado com o primer HVa3. I - Grupo de compatibilidade 1 representado pelo genótipo BRS1216; II - Grupo de compatibilidade 2 representado pelo genótipo BRS2357; IIIa - Grupo de compatibilidade 3 representado pelo genótipo S3213; IIIb – Grupo de compatibilidade 3 representado pelo genótipo BRS3210,

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```

II      ---TTTTGTAATAGCGGCACCGTAACTCTGGCGTAACTCCAATTTCACTTGAGATGGCC 56
I       ---TTTTGTAATAGCGGCACCGTAACTCTGGCGTAACTCCAATTTCACTTGAGATGGCC 57
III     TTGTTTTGTAATAGCGGCACCGTAACTCTGGCGTAACTCCAATTTCACTTGAGATGGCC 60
          *****

II      GACATGACCTCTGAAACTCTGGGCCACGGTAGCGGGATCCCTTTTTTTGGATTAAAGAGT 116
I       GACATGACCTCTGAAACTCTGGGCCACGGTAGCGGGATCCCTTTTTTTGGATTAAAGAGT 117
III     GACATGACCTCTGAAACTCTGGGCCACGGTAGCGGGATCCCTTTTTTTGGATTAAAGAGT 120
          *****

II      ATAGACCTAAGATCATAGGTGAACATTAACGTCTTTGCTTGATTAATAAGCTTTGTTGG 176
I       ATAGACCTAAGATCATAGGTGAACATTAACGTCTTTGCTTGATTAATAAGCTTTGTTGG 177
III     ATAGACCTAAGATCATAGGTGAACATTAACGTCTTTGCTTGATTAATAAGCTTTGTTGG 180
          *****

II      TTGAAACATTTTGTGAACACGTGCCATGACGGCTCCATTCCTGGGCCCAAAATCTTTGT 236
I       TTGAAACATTTTGTGAACACGTGCCATGACGGCTCCATTCCTGGGCCCAAAATCTTTGT 237
III     TTGAAACATTTTGTGAACACGTGCCATGACGGCTCCATTCCTGGGCCCAAAATCTTTGT 240
          *****

II      TCAATGCGCCAGTTACCTGTTGCTGACGGGGGATTTCGGCAAGAAATAATCATACCAATAG 296
I       TCAATGCGCCAGTTACCTGTTGCTGACGGGGGATTTCGGCAAGAAATAATCATACCAATAG 297
III     TCAATGCGCCAGTTACCTGTTGCTGACGGGGGATTTCGGCAAGAAATAATCATACCAATAG 300
          *****

II      TCATCCCGAGCGTCAATACTTCGTTGATCCTACACAAAGTCAAGGATATACAAAAAATT 356
I       TCATCCCGAGCGTCAATACTTCGTTGATCCTACACAAAGTCAAGGATATACAAAAAATT 357
III     TCATCCCGAGCGTCAATACTTCGTTGATCCTACACAAAGTCAAGGATATACAAAAAATT 360
          *****

II      AATTCCATTAATCGAATCAAATATCATACATTTGTTTTGCGAGCTAATATGTAATAATT 416
I       AATTCCATTAATCGAATCAAATATCATACATTTGTTTTGCGAGCTAATATGTAATAATT 417
III     AATTCCATTAATCGAATCAAATATCATACATTTGTTTTGCGAGCTAATATGTAATAATT 420
          *****

II      CTGTTTGTTGATATTAATGTTGG-- 440
I       CTGTTTGTTGATATTAATGTTGG-- 441
III     CTGTTTGTTGATATTAATGTTGGAT 446
          *****

```

Figura 3: Alinhamento das sequencias obtidas via ferramenta *Clustal Omega* a partir do sequenciamento realizado com o primer HVb3. I - Grupo de compatibilidade 1 representado pelo genótipo BRS1216; II - Grupo de compatibilidade 2 representado pelo genótipo BRS2299; III - Grupo de compatibilidade 3 representado pelo genótipo BRS3213.

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```

I      GCATGTTGTTGTTTTGTAATAGCGGCACCGTAACCTCTGGCGTAACTCCAATTTCACTTG      60
III    --ATGTTGTTGTTTTGTAATAGCGGCACCGTAACCTCTGGCGTAACTCCAATTTCACTTG      58
II     GCATGTTGTTGTTTTGTAATAGCGGCACCGTAACCTCTGGCGTAACTCCAATTTCACTTG      60
      *****

I      AGATGGCCGACATGACCTCTGAAACTCTGGGCCACGGTAGCGGGATCCCTTTTTTTGGAT      120
III    AGATGGCCGACATGACCTCTGAAACTCTGGGCCACGGTAGCGGGATCCCTTTTTTTGGAT      118
II     AGATGGCCGACATGACCTCTGAAACTCTGGGCCACGGTAGCGGGATCCCTTTTTTTGGAT      120
      *****

I      TAAAGAGTATAGACCTAAGATCATAGGTGAACATTAACGTCTTTGCTTGATTAATAATAGC      180
III    TAAAGAGTATAGACCTAAGATCATAGGTGAACATTAACGTCTTTGCTTGATTAATAATAGC      178
II     TAAAGAGTATAGACCTAAGATCATAGGTGAACATTAACGTCTTTGCTTGATTAATAATAGC      180
      *****

I      TTTGTTGGTTGAAAACATTTTGTGAACACGTGCCATGACGGCTCCATTCTGGGCCCAAA      240
III    TTTGTTGGTTGAAAACATTTTGTGAACACGTGCCATGACGGCTCCATTCTGGGCCCAAA      238
II     TTTGTTGGTTGAAAACATTTTGTGAACACGTGCCATGACGGCTCCATTCTGGGCCCAAA      240
      *****

I      ATCTTTGTTCAATGCGCCAGTTACCTGTTGCTGACGGGGGATTCGGCAAGAAATAATCAT      300
III    ATCTTTGTTCAATGCGCCAGTTACCTGTTGCTGACGGGGGATTCGGCAAGAAATAATCAT      298
II     ATCTTTGTTCAATGCGCCAGTTACCTGTTGCTGACGGGGGATTCGGCAAGAAATAATCAT      300
      *****

I      ACCAATAGTCATCCCGAGCGTCAATACTTCGTTGATCCTACACAAAGTCAAGGATATACA      360
III    ACCAATAGTCATCCCGAGCGTCAATACTTCGTTGATCCTACACAAAGTCAAGGATATACA      358
II     ACCAATAGTCATCCCGAGCGTCAATACTTCGTTGATCCTACACAAAGTCAAGGATATACA      360
      *****

I      AAAAAATTAATTCCATTAATCGAATCAAACATATACATTTGTTTTGCGAGCTAATATG      420
III    AAAAAATTAATTCCATTAATCGAATCAAACATATACATTTGTTTTGCGAGCTAATATG      418
II     AAAAAATTAATTCCATTAATCGAATCAAACATATACATTTGTTTTGCGAGCTAATATG      420
      *****

I      TAATAATTCTGTTTGTGATATTAATGTTGGATGTTTTTTAGTTCTAGAAATTATAG      478
III    TAATAATTCTGTTTGTGATATTAATGTTGGATGTTTTTTAGTTCTAGAAATTATAG      476
II     TAATAATTCTGTTTGTGATATTAATGTTGGATGTTTTTTAGTTCTAGAAATTATAG      478
      *****

```

Figura 4: Alinhamento das sequências obtidas via ferramenta *Clustal Omega* a partir do sequenciamento realizado com o primer HVb8. I – Grupo de compatibilidade 1 representado pelo genótipo BRS1216; II - Grupo de compatibilidade 2 representado pelo genótipo BRS2357; IIIa - Grupo de compatibilidade 3 representado pelo genótipo BRS3213

Ao realizar o BLAST entre a sequência consenso obtida do sequenciamento realizado com o *primer* HVa3 e o genoma de referência de *C. canephora*, observou-se que há duas regiões de alinhamento no cromossomo 2. O primeiro alinhamento observado foi na região 6620712-6620313 (Figura 5) e outro na região 6626341-6626542 (Figura 6), ambos com 99,51% de identidade com o genoma de referência. Para o *primer* Hvb3 houve um alinhamento no cromossomo 2, na região 6617588-6618025 com 99,55% de identidade (Figura 7). Por fim, para o *primer* HVb8 observou-se que há um alinhamento no cromossomo 2: 6616577-6619051, com 99,58% de identidade (Figura 8).

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```

HVa3      ---CTAAGTTCAC-----ATTGCATGGTCTATGGCCGGACAACATAC 40
chr2:6620712 TTATGACATACGCATAGAACCTTTGAAAGTACTTTTGAGTTTTTTCAGGATAACTCAA 60
          * * * * *          * *   * * * * * * * * * *

HVa3      GCGGAATTTATA-----CAACTGTCCTGGCACTCGCTATAGACCACTACGGG 87
chr2:6620712 AAGGAAGTATGGCATTAAACGATTTAACATAGGTATGGGAGTGCATAGAAATCTAACCCGT 120
          **** *          * *   * * * * * * * * * *

HVa3      TTAGATTCTATGCACTCCCATACCTATGTTAAATCGTTAACGTCATACTTCCTTTTGA 147
chr2:6620712 AGTGGTCTATAGCGAGTGCCAGGACAGTTG-----TATAAATCCGCGTATA 167
          * * * * * * * * * * * *          * * * * * * *

HVa3      GTTATCCTGAAAAAACTCAAAAGTACTTTCAAAAGTTCTATGCGTATGTCATAAA 203
chr2:6620712 GTTGTCCGGCCATAGACCATGCAATG-----TGAAGTTAG----- 202
          *** * * * * * * *          * * * *

```

Figura 5: Região 6620712-6620313 obtida pelo BLAST entre o genoma de *C. canephora* e a sequência consenso obtida com o primer HVa3.

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```

HVa3      ---CTAAGTTCAC-----ATTGCATGGTCTATGGCCGGACAACATAC 40
chr2:6626341 TTATGACATACGCATAGAACCTTTGAAAGTACTTTTGAGTTTTTTCAGGATAACTCAA 60
          * * * * *          * *   * * * * * * * * * *

HVa3      GCGGAATTTATA-----CAACTGTCCTGGCACTCGCTATAGACCACTACGGG 87
chr2:6626341 AAGGAAGTATGGCATTAAACGATTTAACATAGGTATGGGAGTGCATAGAAATCTAACCCGT 120
          **** *          * *   * * * * * * * * * *

HVa3      TTAGATTCTATGCACTCCCATACCTATGTTAAATCGTTAACGTCATACTTCCTTTTGA 147
chr2:6626341 AGTGGTCTATAGCGAGTGCCAGGACAGTTG-----TATAAATCCGCGTATA 167
          * * * * * * * * * * * *          * * * * * * *

HVa3      GTTATCCTGAAAAAACTCAAAAGTACTTTCAAAAGTTCTATGCGTATGTCATAAA 203
chr2:6626341 GTTGTCCGGCCATAGACCATGCAATG-----TGAAGTTAG----- 202
          *** * * * * * * *          * * * *

```

Figura 6: Região 6626341-6626542 obtida pelo BLAST entre o genoma de *C. canephora* e a sequência consenso obtida com o primer HVa3.

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```

HVb          TTTTGTAAAGCGGCACCGTAACTCTGGCGTAACTCCAATTTCACTTGAGATGGCCGACA 60
chr2:6617588. -TTTGTAAAGCGGCACCGTAACTCCGGCGTAACTCCAATTTCACTTGAGATGGCCGACA 59
                *****

HVb          TGACCTCTGAAACTCTGGGCCACGGTAGCGGGATCCCTTTTTTTGGATTAAAGAGTATAG 120
chr2:6617588. TGACCTCTGAAACTCTGGGCCACGGTAGCGGGATCCCTTTTTTTGGATTAAAGAGTATAG 119
                *****

HVb          ACCTAAGATCATAGGTGAACATTAACGTCTTTGCTTGATTAATAAGCTTTGTTGGTTGA 180
chr2:6617588. ACCTAAGATCATAGGTGAACATTAACGTCTTTGCTTGATTAATAAGCTTTGTTGGTTGA 179
                *****

HVb          AAACATTTTGTGAACACGTGCCATGACGGCTCCATTCTGGGCCCAAAATCTTTGTTCAA 240
chr2:6617588. AAACATTTTGTGAACACGTGCCATGACGGCTCCATTCTGGGCCCAAAATCTTTGTTCAA 239
                *****

HVb          TGCGCCAGTTACCTGTTGCTGACGGGGGATTTCGGCAAGAAATAATCATACCAATAGTCAT 300
chr2:6617588. TGCGCCAGTTACCTGTTGCTGACGGGGGATTTCGGCAAGAAATAATCATACCAATAGTCAT 299
                *****

HVb          CCCGAGCGTCAATACTTCGTTGATCCTACACAAAGTCAAGGATATACAAAAAATTAATT 360
chr2:6617588. CTCGAGCGTCAATACTTCGTTGATCCTACACGAAGTCAAGGATATACAAAA-AATTAATT 358
                * *****

HVb          CCATTAATCGAATCAAATATCATACATTTGTTTTGCGAGCTAATATGAATAATTCTGT 420
chr2:6617588. CCATTAATCGAATCAAATATCATACATTTGTTTTGCGAGCTAATATGAATAATTCTGT 418
                *****

HVb          TTGTTGATATTAAATGTTGG 440
chr2:6617588. TTGTTGATATTAAATGTTGG 438
                *****

```

Figura 7: Região 6617588-6618025 obtida pelo BLAST entre o genoma de *C. canephora* e sequência consenso obtida com o *primer* HVb3.

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```

chr2:6617578 -TGTGTGTGTTTTGTAAAGCGGCACCGTAACTCCGGCGTAACTCCAATTTCACTTGAG 59
HVb8          ATGTTGTTGTTTTGTAAAGCGGCACCGTAACTCTGGCGTAACTCCAATTTCACTTGAG 60
                *****

chr2:6617578 ATGGCCGACATGACCTCTGAAACTCTGGGCCACGGTAGCGGGATCCCTTTTTTTGGATTA 119
HVb8          ATGGCCGACATGACCTCTGAAACTCTGGGCCACGGTAGCGGGATCCCTTTTTTTGGATTA 120
                *****

chr2:6617578 AAGAGTATAGACCTAAGATCATAGGTGAACATTAACGTCTTTGCTTGATTAATAAGCTT 179
HVb8          AAGAGTATAGACCTAAGATCATAGGTGAACATTAACGTCTTTGCTTGATTAATAAGCTT 180
                *****

chr2:6617578 TGTGTTGTTGAAAACATTTTGTGAACACGTGCCATGACGGCTCCATTCTGGGCCCAAAAT 239
HVb8          TGTGTTGTTGAAAACATTTTGTGAACACGTGCCATGACGGCTCCATTCTGGGCCCAAAAT 240
                *****

chr2:6617578 CTTTGTTCAATGCGCCAGTTACCTGTTGCTGACGGGGGATTTCGGCAAGAAATAATCATAC 299
HVb8          CTTTGTTCAATGCGCCAGTTACCTGTTGCTGACGGGGGATTTCGGCAAGAAATAATCATAC 300
                *****

chr2:6617578 CAATAGTCATCTCGAGCGTCAATACTTCGTTGATCCTACACGAAGTCAAGGATATACAAA 359
HVb8          CAATAGTCATCTCGAGCGTCAATACTTCGTTGATCCTACACGAAGTCAAGGATATACAAA 360
                *****

chr2:6617578 A-AATTAATTCATTAAATCGAATCAAATATCATACATTTGTTTTGCGAGCTAATATGTA 418
HVb8          AAAATTAATTCATTAAATCGAATCAAATATCATACATTTGTTTTGCGAGCTAATATGTA 420
                * *****

chr2:6617578 ATAATTCTGTTTGTGATATTAAATGTTGGATGTTTTTTAGTTCTAGAAATTATAG 474
HVb8          ATAATTCTGTTTGTGATATTAAATGTTGGATGTTTTTTAGTTCTAGAAATTATAG 476
                *****

```

Figura 8: Região 6616577-6619051 obtida pelo BLAST entre o genoma de *C. canephora* e sequência consenso obtida com o *primer* HVb8.

Ao analisar as Figuras 5 e 6, correspondentes ao BLAST entre a sequência consenso do *primer* HVa3 e o genoma de referência de *C. canephora*, observa-se grande quantidade de *mismatch* e *Gap*. Ou seja, há diferenças entre a região sequenciada por este *primer* e o genoma de *C. canephora*. O BLAST foi realizado contra o genoma de referência disponibilizado do Coffee Genome Hub, que foi obtido de uma planta duplo haploide (acesso DH200-94) proveniente do clone IF200. Este apresenta características intermediárias entre os grupos genéticos Guineano e Congolês, ou seja, um híbrido (Lashermes et al., 1993; Denoeud et al., 2014). A espécie *C. canephora* apresenta uma grande diversidade genética, sendo composto por dois grandes grupos genéticos: Guineano e Congolês (Berthaud, 1986). O primeiro corresponde a genótipos do oeste africano (Guiné e Costa do Marfim) e ainda é pouco explorado nos programas de melhoramento genético do cafeeiro. Já o grupo Congolês é composto por genótipos da região central da África, sendo divididos em quatro subgrupos (Montagnon et al., 1992; Dussert et al., 1999). O subgrupo SG1 é formado em sua maioria por materiais do grupo varietal Conilon. O subgrupo SG2, B e C compreendem genótipos do grupo varietal Robusta (Rocha et al., 2015).

Dessa forma, a diferença observada entre a sequência de DNA do genoma de referência e dos cafeeiros de Rondônia pode ser decorrente da ampla diversidade genética presente na espécie. Os genótipos utilizados neste trabalho pertencem aos subgrupos SG1 e SG2. Apesar de ser um híbrido entre os grupos genéticos Guineano e Congolês, os resultados obtidos indicam que o genótipo utilizado para o sequenciamento do genoma de referência (clone IF200) não compartilham destes mesmos subgrupos. Assim, este genoma de referência é geneticamente diferente dos Robustas Amazônicos e Conilons cultivados no Brasil.

Ao realizar o alinhamento entre as duas sequências amplificadas em regiões distintas no genoma de *C. canephora* com o *primer* Hva3 (Figura 9), observa-se que elas são idênticas. Este resultado demonstra que *C. canephora* contém essa região repetitivas dispersas no genoma da espécie.

```

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

chr2:6620712      TTATGACATACGCATAGAACTTTTGAAAGTACTTTTGAGTTTTTTTCAGGATAACTCAA 60
chr2:6626341      TTATGACATACGCATAGAACTTTTGAAAGTACTTTTGAGTTTTTTTCAGGATAACTCAA 60
*****

chr2:6620712      AAGGAAGTATGGCATTAAACGATTTAACATAGGTATGGGAGTGCATAGAAATCTAACCCGT 120
chr2:6626341      AAGGAAGTATGGCATTAAACGATTTAACATAGGTATGGGAGTGCATAGAAATCTAACCCGT 120
*****

chr2:6620712      AGTGGTCTATAGCGAGTGCCAGGACAGTTGTATAAATCCGCGTATAGTTGTCCGGCCAT 180
chr2:6626341      AGTGGTCTATAGCGAGTGCCAGGACAGTTGTATAAATCCGCGTATAGTTGTCCGGCCAT 180
*****

chr2:6620712      AGACCATGCAATGTGAACCTTAG      202
chr2:6626341      AGACCATGCAATGTGAACCTTAG      202
*****

```

Figura 9: Alinhamento entre as duas sequencias amplificadas em regiões distintas no genoma de *C. canephora* com o primer HVa3.

A grande similaridade observada no BLAST no genoma de *C. canephora* entre as regiões amplificadas pelos *primers* HVb3 e HVb8 (Figura 7 e Figura 8) mostra que, mesmo sendo genótipos geneticamente distintos, esses dois *primers* foram construídos em regiões conservadas do genoma de *C. canephora*. Estes dois *primers* estão localizados em regiões muito semelhantes no genoma, assim como outros *primers* que ainda não foram testados para essa região (Figura 1). Desse modo, uma estratégia para dar continuidade ao trabalho, seria a utilização de *primers* que não estão nesta mesma região.

Ao avaliar os resultados dos alinhamentos das sequencias obtidas via ferramenta *Clustal Omega* a partir do sequenciamento realizado com os *primers* HVa3 (Figura 2), HVb3 (Figura 3) e HVb8 (Figura 4) observa-se a ausência de polimorfismo. Ou seja, não é perceptível a partir desses conjuntos de *primers* as diferenças na sequência de DNA entre genótipos pertencentes a diferentes grupos de autoincompatibilidade de *C. canephora*. Diferente da grande diversidade observada no BLAST entre o genoma de *C. canephora* e o *primer* HVa3, quando se compara os alinhamentos das sequencias obtidas entre os genótipos pertencentes a três diferentes grupos de autoincompatibilidade, para os três *primers* (Figura 2, 3 e 4), os genótipos trabalhados se mostram mais aparentados e não se observa diferença entre estes.

Possivelmente, a região em que os três *primers* utilizados no trabalho anelam no genoma não consiste na região que diferencie estes genótipos quanto ao grupo de compatibilidade. A AIG ainda é pouco estudada para a espécie *C. canephora* e as análises do DNA, que está associado a essa característica, precisam ser continuadas para ampliar o conhecimento dessa autoincompatibilidade e permitir o desenvolvimento de marcadores moleculares que possam ser usados para caracterizar os vários genótipos de cafeeiros plantados.

4. CONCLUSÕES

Não foi possível detectar diferenças nas sequências de DNA dos genótipos de *C. canephora*, pertencente a diferentes grupos de autoincompatibilidade (grupo I, II e III). Todavia, ao realizar o BLAST entre a sequência consenso obtida do sequenciamento realizado com o primer HVa3 e o genoma de referência de *C. canephora*, observou-se que há duas regiões de alinhamento no cromossomo 2, com grande quantidade de *mismatch* e *Gap*. Esta diferença observada pode ser decorrente da ampla diversidade genética presente na espécie, no qual o genoma de referência ainda é geneticamente diferente dos Robustas Amazônicos e Conilons cultivados no Brasil. Foram encontrados indícios de regiões repetitivas dispersas no genoma da espécie. Ao realizar o alinhamento entre as duas sequências amplificadas em regiões distintas no genoma de *C. canephora* com o primer Hva3, observa-se que elas são idênticas. Este trabalho serve de base para a continuidade do estudo de incompatibilidade na espécie.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Berthaud J (1980). L'incompatibilité chez *Coffea canephora*: méthode de test et déterminisme génétique. Café Cacao Thé, 24: 267-274.
- Berthaud J (1986). Les ressources génétiques pour l'amélioration des caféiers africains diploïdes. Evaluation de la richesse génétique des populations sylvestres et de ses mécanismes organisateurs. Conséquences pour l'application. 379f. Tese (Doutorado em Agronomia) – ORSTOM, Paris.
- Charrier A & Berthaud J (1985). Botanical classification of coffee. Coffee: botany, biochemistry and production of beans and beverage, 13-47.
- COFFEE GENOME HUB. Disponível em: <http://www.coffee-genome.org/blast>. Acesso em 20 de novembro de 2023.
- Conagin CH & Mendes AJT (1961). Pesquisas citológicas e genéticas em três espécies de Coffea: auto-incompatibilidade em *Coffea canephora* Pierre ex Froehner. Bragantia, 20:788-804.
- Coulibaly I, Revol B, Noirot M et al (2003). AFLP and SSR polymorphism in a *Coffea* interspecific backcross progeny [(*C. heterocalyx* × *C. canephora*) × *C. canephora*]. Theoretical and Applied Genetics, 107:1148-55.
- Davis AP (2011). *Psilanthus mannii*, the type species of *Psilanthus*, transferred to *Coffea*. Nordic Journal of Botany, 29:471-472.

De Nettancourt D (2001). Incompatibility and incongruity in wild and cultivated plants (Vol. 3). Springer Science & Business Media.

Denoeud F, Carretero-Paulet L, Dereeper A et al (2014). The coffee genome provides insight into the convergent evolution of caffeine biosynthesis. *science*, 345(6201), 1181-1184.

Depolo RP, Rocha RB, Souza CAD et al (2022). Expression of self-incompatibility in *Coffea canephora* genotypes grown in the western Amazon. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 57.

Diniz LE, Sakiyama NS, Lashermes P et al (2005). Analysis of AFLP markers associated to the Mex- 1 resistance locus in Icatu progenies. *Crop breeding and applied technology*, 5: 387.

Dussert S, Lashermes P, Anthony F et al (1999). Le caféier, *Coffea canephora*. Diversité génétique des plantes tropicales cultivées, 175,194.

Espindula MC, Dalazen JR, Rocha RB et al (2022). Robustas Amazônicos: os cafeeiros cultivados em Rondônia. 144p.

Ferrão MAG, Ferrão RG, Fonseca AFA et al (2019). Origin, geographical dispersion, taxonomy and genetic diversity of *Coffea canephora*. In *Conilon Coffee*; Ferrão RG, Fonseca AFA, Ferrão MAG, De Muner L.H, Eds.; Incaper: Vitória, Brazil, 85–110.

Lashermes P, Couturon E & Charrier A (1993). Doubled haploids of *Coffea canephora*: development, fertility and agronomic characteristics. *Euphytica*, 74, 149-157.

Montagnon C, Leroy, T, Yapo AB (1992). Diversite genotypique et phenotypeque de Quelques groupes de cafeiers (*Coffea canephora* Pierre) em collection. Consequences sur leur utilisation en selection. *Café Cacao Thé* 36: 187-198.

Rocha RB, Teixeira AL, Ramalho AR et al (2015). Melhoramento de *coffea canephora*: considerações e metodologias. Embrapa Semiárido-Capítulo em livro técnico (INFOTECA-E).

Rocha RB, Teixeira AL, Ramalho AR et al (2021). *Coffea canephora* breeding: estimated and achieved gains from selection in the Western Amazon, Brazil. *Ciência Rural*, 51.

Sievers F, Wilm A, Dineen D et al (2011). Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular systems biology*, 7: 539.

Silva ANR; Rocha RB; Ferreira GEM (2022). Estudo do gene S, que determina a autoincompatibilidade em *Coffea canephora*, visando ao desenvolvimento de iniciadores para suas regiões polimórficas. Projeto de doutorado, Universidade Federal de Rondônia.

Sousa P, Vieira H, Santos E et al (2022). *Coffea canephora*: Heterotic Crosses Indicated by Molecular Approach. *Plants*, 11: 3023.

Vieira J, Pimenta J, Gomes A et al (2021). Identificação do locus *Rosa S* e implicações na evolução dos sistemas de autoincompatibilidade gametofítica de Rosaceae. *Relatórios Científicos*, 11: 3710.

Zhang D, Li YY, Zhao X et al (2023). Molecular insights into self-incompatibility systems: from evolution to breeding. *Plant Communications*, 5: 100719.