

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA**

**EDUARDO GRANADOS BRENES**

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E RESISTÊNCIA A DOENÇAS DE  
GENÓTIPOS DE CAFEIROS ORIGINÁRIOS DA AMÉRICA  
CENTRAL**

**Viçosa, Minas Gerais**

**2022**

**EDUARDO GRANADOS BRENES**

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E RESISTÊNCIA A DOENÇAS DE  
GENÓTIPOS DE CAFEIROS ORIGINÁRIOS DA AMÉRICA  
CENTRAL**

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

Orientador: Laércio Zambolim

Coorientadora: Eveline Teixeira Caixeta

**Viçosa, Minas Gerais  
2022**

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

T

G748c  
2022 Granados Brenes, Eduardo, 1987-  
Caracterização molecular e resistência a doenças de  
genótipos de cafeeiros originários da América Central / Eduardo  
Granados Brenes. – Viçosa, MG, 2022.  
1 tese eletrônica (97 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Laércio Zambolim.  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa,  
Departamento de Fitopatologia, 2022.  
Inclui bibliografia.  
DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2022.182>  
Modo de acesso: World Wide Web.

1. *Coffea arabica*. 2. *Hemileia vastatrix*. 3. *Colletotrichum  
kahawae*. 4. Diversidade genética. I. Zambolim, Laércio.  
II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de  
Fitopatologia. Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia.  
III. Título.

CDD 22. ed. 633.7394

Bibliotecário(a) responsável: Renata de Fátima Alves CRB6/2578

**EDUARDO GRANADOS BRENES**

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E RESISTÊNCIA A DOENÇAS DE  
GENÓTIPOS DE CAFEIROS ORIGINÁRIOS DA AMÉRICA  
CENTRAL**

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

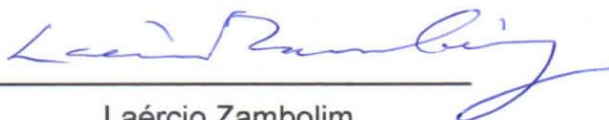
APROVADA: 1º de abril de 2022

Assentimento:



---

Eduardo Granados Brenes  
Autor



---

Laércio Zambolim  
Orientador

***“A Deus, minha esposa Laura e filho Santiago...  
Nossa família...  
Dedico”***

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus.

À minha esposa Laura e meu filho Santiago pelo apoio, companhia e compreensão, pelas palavras de alento em todo momento.

À minha família Granados Brenes e Rojas Murillo pela ajuda e motivação em todo momento apesar da distância.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-graduação em Fitopatologia, pela oportunidade de realizar meus estudos.

À Universidade de Costa Rica, pela bolsa brindada para realizar meus estudos de post graduação fora do país.

Ao professor, Dr. Laércio Zambolim, pela orientação e confiança em mim depositada.

À Dra. Eveline, pela confiança e apoio no desenvolvimento da pesquisa.

À todos meus amigos do laboratório BioCafé, pela ajuda e companhia, por fazer os momentos difíceis mais fáceis.

Aos professores e funcionários do Departamento de Fitopatologia pela formação e ajudas brindadas durante meus estudos.

À todos meus amigos e família que de uma ou outra maneira contribuíram tanto na Costa Rica como no Brasil, para meu crescimento profissional e pessoal.

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

Muito Obrigado!!

## RESUMO

Granados Brenes, Eduardo, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, abril de 2022. **Caracterização molecular e resistência a doenças de genótipos de cafeeiros originários da América Central.** Orientador: Laércio Zambolim. Coorientadora: Eveline Teixeira Caixeta.

A cultura do café tem apresentado uma série de doenças que provocam severos danos na cafeicultura de diversos países. Visando minimizar esses problemas, programas de melhoramento genético têm desenvolvido cultivares com resistência à fatores bióticos e abióticos. No entanto, o uso dessa cultivares associado a autogamia e origem do cafeeiro arábica tem resultado em estreita relação genética entre os genótipos e, conseqüentemente, maior vulnerabilidade a doenças e pragas. Técnicas tradicionais de inoculação do patógeno complementadas com a biologia molecular permitem verificar a presença de genes que conferem resistência a ferrugem (*Hemileia vastatrix*), principal doença da cultura, e ao *Colletotrichum kahawae* causador da antracnose verde dos grãos, além de auxiliar o estudo de diversidade das cultivares. Marcadores ligados a genes que conferem resistência a doenças, complementam os trabalhos clássicos de fenotipagem das plantas de café na determinação da resistência ou a susceptibilidade a patógenos. Diante desse panorama, esse trabalho teve como objetivo a verificação da diversidade genética das cultivares de café da América Central, utilizando 16 marcadores microssatélites distribuídos aleatoriamente no genoma de *C. arabica*. Além disso, a resistência dessas cultivares foi verificada por meio da fenotipagem com as raças II e XXXIII de *H. vastatrix* e genotipagem com marcadores moleculares ligados a genes de resistência a *H. vastatrix* e a *C. kahawae*. As análises moleculares com marcadores aleatórios revelaram diversidade entre e dentro das cultivares analisadas, sendo possível obter o padrão molecular da maioria delas. Essas análises permitiram também observar erros de identificação de cultivar, misturas ou hibridações nas cultivares. Das 36 cultivares fenotipadas para resistência, 30 foram resistentes a raça II e 26 a raça XXXIII de *H. vastatrix*. Na genotipagem, os cafeeiros apresentaram variabilidade e alelos que conferem resistência a *H. vastatrix*, complementado os resultados fenotípicos, sugerindo uma piramidação de genes de resistência nos cafeeiros da América Central.

Palavras-chave: *Coffea arabica*. *Hemileia vastatrix*. *Colletotrichum kahawae*. Seleção assistida por marcadores moleculares. Diversidade genética.

## ABSTRACT

Granados Brenes, Eduardo, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, April, 2022. **Molecular characterization and disease resistance of coffee genotypes originating in Central America.** Adviser: Laércio Zambolim. Co-advisers: Eveline Teixeira Caixeta.

Several diseases can cause severe damages to coffee plants in many coffee-producing countries. In order to minimize those problems, plant breeding has developed plants with resistance to biotic and abiotic factors. However, the use of Arabica coffee cultivars coupled with self-fertilization of the plant and the origin of the crop resulted in a close genetic relationship between cultivars, leading to susceptibility to diseases and pests. Traditional techniques complemented by molecular biology allow the verification of genes that confer resistance to coffee leaf rust (*Hemileia vastatrix*), the main disease of the crop, and to *Colletotrichum kahawae* (CBD), the causal agent of green anthracnose in grains. Microsatellite markers (SSR) are extensively employed to obtain unique molecular patterns (fingerprinting). Specific markers linked to genes that confer resistance to diseases complement classic phenotyping and help determine plant resistance or susceptibility to pathogens. In that sense, this work aimed to verify the genetic diversity of coffee cultivars from Central America using 16 SSR markers randomly distributed in *C. arabica* genome. Moreover, the resistance of these cultivars was verified through phenotyping with races II and XXXIII of *H. vastatrix* and genotyping with molecular markers linked to resistance genes to *H. vastatrix* and *C. kahawae*. Fingerprinting analysis also revealed cultivars with the same molecular pattern, suggesting misidentification, mixtures, or hybridization of the analyzed cultivars. Of the 36 cultivars phenotyped for disease resistance, 30 were resistant to *H. vastatrix* race II and 26 to race XXXII. In genotyping, coffee plants demonstrated variability and alleles that confer resistance to *H. vastatrix*, suggesting a pyramiding of resistance genes in Central American cultivars.

**Keywords:** *Coffea arabica*. *Hemileia vastatrix*. *Colletotrichum kahawae*. Marker-assisted selection. Genetic diversity.



## SUMÁRIO

Introdução.....	9
Referências .....	12
CAPÍTULO I.....	15
Caracterização e diversidade genética de genótipos de <i>Coffea arabica</i> provenientes da América Central por marcadores moleculares microsatélites (SSR).....	15
1. Introdução .....	16
2. Material e Métodos .....	19
2.1. Material genético .....	19
2.2. Coleta de folhas e extração de DNA .....	19
2.3. Marcadores microsatélites.....	23
2.4. Análises da diversidade genética.....	24
2.5. Análise da estrutura populacional .....	24
3. Resultados .....	25
4. Discussão .....	51
5. Conclusões .....	55
1. Referências.....	56
CAPÍTULO II.....	61
Resistência de cultivares de cafeeiros provenientes da América Central, as raças II e XXXIII de <i>Hemileia vastatrix</i> e genotipagem com a utilização de marcadores moleculares .....	61
1. Introdução .....	62
2. Material e Métodos .....	65
2.1. Fenotipagem.....	65
2.1.1. Multiplicação do inóculo de <i>Hemileia vastatrix</i> .....	67
2.1.2. Testes de germinação .....	67

2.1.3. Preparo e inoculação dos discos foliares para fenotipagem com as raças II e XXXIII de <i>H. vastatrix</i> .....	67
2.1.4. Avaliação dos Componentes de Resistência .....	68
2.2. Genotipagem .....	69
2.2.1. Material genético e obtenção de DNA genômico .....	69
2.2.2. Marcadores moleculares associados ao gene <i>S<sub>H3</sub></i> de resistência do cafeeiro à ferrugem .....	69
2.2.3. Marcadores associados aos locos de resistência do Híbrido de Timor que confere resistência a <i>Hemileia vastatrix</i> .....	71
2.2.4. Marcadores ligado ao gene Ck-1 que confere resistência a <i>Colletotrichum kahawae</i> (CBD).....	73
2.2.5. Análises dos dados.....	75
3. Resultados.....	76
3.1. Fenotipagem.....	76
3.2. Genotipagem .....	80
4. Discussão .....	89
5. Conclusões .....	93
Referências .....	94

## Introdução

O café é considerado cultura de importância econômica a nível mundial. O manejo inadequado do cafezal pode causar diminuição na produção e aumento na incidência de doenças (López-Bravo et al., 2012), tanto no sistema de cultivo a pleno sol quanto no sombreado.

Dentre as fontes de resistência à doenças disponíveis para os programas de melhoramento genético do cafeeiro, destaca-se os Híbridos de timor (HDT). Esses cafeeiros são portadores de genes que conferem resistência a diferentes patógenos (Bettencourt & Lopes, 1979, 1992), entre eles *Hemileia vastatrix* agente causal da ferrugem do café, *Colletotrichum kahawae* agente causal da antracnose nos grãos verdes do café entre outros (Alves Pereira et al., 2005) .

No ano de 2013, na América Central e na Colômbia, observou-se perdas na produção de café causada pelo fungo *Hemileia vastatrix* Berk & Br. entre 16% e 30%. Essas perdas ocasionaram queda na produção de café, o que resultou em grande impacto social aos pequenos cafeicultores, pela diminuição no preço do café e conseqüentemente, ocasionando perda de emprego de muitas famílias (Avelino et al., 2015).

A maioria das cultivares de café arábica plantadas na América são suscetíveis a maioria das raças de *H. vastatrix*, incluindo as mais difundidas no mundo (Avelino & Anzueto, 2020; Bettencourt & Carvalho, 1968), sendo necessário obter cultivares com resistência duradoura à ferrugem. Dessa forma, programas de melhoramento têm sido desenvolvidos em vários países produtores de café, visando a obtenção de cultivares resistentes. O melhoramento buscam introduzir nas cultivares novos genes com resistência completa ou parcial capazes de controlar a doença, resultando na redução da vulnerabilidade do cultivo a longo prazo (McDonald & Linde, 2002).

As cultivares resistentes podem ser utilizadas em resposta a mudanças climáticas, como aumento de temperatura e chuva que favorecem o período de latência e incubação de *H. vastatrix*, visando uma diminuição na incidência. O patógeno deve superar maior quantidade de genes de resistência, onde vai requerer a perda ou supressão de seus genes de avirulência complementares (Avelino et al., 2015) dificultando a colonização no tecido vegetal.

No café, pelo menos nove genes dominantes já foram relatados conferindo resistência a ferrugem entre as principais espécies de café, destacando *Coffea arabica* que possuem genes de resistência  $S_{H1}$ ,  $S_{H2}$ ,  $S_{H4}$  e  $S_{H5}$  (Bettencourt & Carvalho, 1968), *Coffea canephora* por apresentar genes de resistência  $S_{H6}$ ,  $S_{H7}$ ,  $S_{H8}$ ,  $S_{H9}$  e a espécie *Coffea liberica* com gene de resistência  $S_{H3}$  (Rodrigues et al., 1975). Recentemente dos novos genes  $S_H$  candidatos a resistência foram clonadas e identificados a nível molecular, sendo denominados gene 11 (Barka et al., 2020) e HdT\_LRR\_RLK2 que é um receptor de membrana (Almeida et al., 2020) conferindo resistência a *H. vastatrix*.

Além do uso de cultivares resistentes, outras estratégias são utilizadas para combater a ferrugem do cafeeiro, como o controle químico, com misturas, por exemplo a calda bordalesa e produtos sistêmicos como triazóis e estrobilurinas (Zambolim, 2016). O controle químico pela utilização excessiva ou indiscriminada de fungicidas sistêmicos, geralmente causa alterações nos patógenos, podendo ocasionar perda de sensibilidade aos fungicidas. Uma vez que um patógeno tem a capacidade em ser resistente aos fungicidas o melhoramento genético tem grande importância, por ser capaz de portar genes de resistência durável (Parlevliet, 1979; Parlevliet & Zadoks, 1977; VALE et al., 2001), sem alterar as características organolépticas que caracterizam os cafeeiros da espécie *C. arabica*.

Marcadores moleculares tem sido utilizados para auxiliar a manipulação e entendimento dos genes de resistência presentes nas cultivares (Almeida et al., 2020; Ferrão et al., 2015; Pestana et al., 2015; Sousa et al., 2017; Souza et al., 2013). Além disso, marcadores moleculares do tipo AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), SCAR (Sequence Characterized Amplified region), RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), SSR (Simple Sequence Repeat), entre outros, têm sido analisados de maneira complementar aos descritores morfológicos, permitindo a determinação de padrão molecular (Sousa et al., 2017) e o estudo da variabilidade genética das cultivares e acesso de cafeeiros de importância para o melhoramento (Ferrão et al., 2015; Lino Ferreira et al., 2020; Silva et al., 2018; Sousa et al., 2017).

Apesar das ferramentas tecnológicas eficientes, os genótipos de cafeeiros cultivados nos países da América Central não são pouco explorados enquanto a diversidade genética e presença de alelos que conferem resistência a doenças. Esses países cultivam diferentes cultivares de café, no entanto, não se tem conhecimento

da diversidade e resistência dos genótipos às raças de *H. vastatrix*. Por tanto a caracterização desses materiais genéticos é essencial para o desenvolvimento dos programas de melhoramento de *C. arabica*, que buscam explorar genes promissores para resistência a doenças. Estudos de sequenciamento feitos em espécies de *Coffea* mostram uma grande divergência populacional entre genótipos de diferentes espécies, no entanto, níveis baixos de diversidade foram observados entre cafeeiros de *C. arabica*, possivelmente devido a um único evento de poliploidização, que ocorreu em tempos evolutivos recentes (Scalabrin et al., 2020). Dessa forma, o conhecimento e manipulação da variabilidade genética é especialmente importante para o sucesso do melhoramento genético de *C. arabica*.

Diante desses fatos, este trabalho teve como objetivos: identificar o perfil molecular (*fingerprinting*) de cultivares de café arábica da América Central, por meio de marcadores SSR, além de estudar divergência genética dos genótipos entre e dentro de cada país (Capítulo I); verificar a resistência por meio de fenotipagem com as raças II e XXXIII de *H. vastatrix* e genotipagem com a utilização de marcadores moleculares ligados a genes que conferem resistência a *H. vastatrix* e *Colletotrichum kahawae*.

## Referências

- Almeida, D. P. de, Castro, I. S. L., Mendes, T. A. de O., Alves, D. R., Barka, G. D., Barreiros, P. R. R. M., Zambolim, L., Sakiyama, N. S., & Caixeta, E. T. (2020). Receptor-Like Kinase (RLK) as a candidate gene conferring resistance to *Hemileia vastatrix* in coffee. *Scientia Agricola*, 78(6), 1–9. <https://doi.org/10.1590/1678-992x-2020-0023>
- Alves Pereira, A., Sussumu Sakiyama, N., Zambolim, L., Moura, W., Zambolim, E., & Caixeta Teixeira, E. (2005). Identification and use of sources of durable resistance to coffee leaf rust in the UFV/ EPAMIG breeding program. In L. Zambolim, E. Maciel-Zambolim, & V. M. Pinto Varzea (Eds.), *Durable Resistance to Coffee Leaf Rust* (pp. 215–232).
- Avelino, J., & Anzueto, F. (2020). CHAPTER 9: Coffee Rust Epidemics in Central America: Chronicle of a Resistance Breakdown Following the Great Epidemics of 2012 and 2013. In *Emerging Plant Diseases and Global Food Security* (pp. 185–198). The American Phytopathological Society. <https://doi.org/10.1094/9780890546383.009>
- Avelino, J., Cristancho, M., Georgiou, S., Imbach, P., Aguilar, L., Bornemann, G., Läderach, P., Anzueto, F., Hruska, A. J., & Morales, C. (2015). The coffee rust crises in Colombia and Central America (2008–2013): impacts, plausible causes and proposed solutions. *Food Security*, 7(2), 303–321. <https://doi.org/10.1007/s12571-015-0446-9>
- Barka, G. D., Caixeta, E. T., Ferreira, S. S., & Zambolim, L. (2020). In silico guided structural and functional analysis of genes with potential involvement in resistance to coffee leaf rust: A functional marker based approach. *PLoS ONE*, 15(7), e0222747. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222747>
- Bettencourt, A., & Lopes, J. (1979). Transferencia de fatores de resistencia a *Hemileia vastatrix* Berk & Br. do Híbrido de Timor para a cultivar Caturra vermelho de *Coffea arabica* L.. *Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras*, 287–294.
- Bettencourt, A., & Lopes, J. (1992). Fatores genéticos que condicionam a resistência às raças de *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. dos clones-tipo dos grupos 1, 2 e 3 de derivados de Híbridos de Timor. *Brotéria Genética*.
- Bettencourt, & Carvalho, A. (1968). Melhoramento visando a resistência do cafeeiro à ferrugem. *Bragantia*, 27(4), 35–68. <https://doi.org/10.1590/s0006-87051968000100004>
- Ferrão, L. F. V., Caixeta, E. T., Pena, G., Zambolim, E. M., Cruz, C. D., Zambolim, L., Ferrão, M. A. G., & Sakiyama, N. S. (2015). New EST–SSR markers of *Coffea arabica*: transferability and application to studies of molecular characterization and genetic mapping. *Molecular Breeding*, 35(1), 31. <https://doi.org/10.1007/s11032-015-0247-z>

- Lino Ferreira, J., Teixeira Caixeta, E., Fatima Caniato, F., Setotaw, T., César Sant'Ana, G., & Maria Ferreira, L. (2020). Genetic Diversity of *Coffea arabica*. In *Genetic Variation*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.94744>
- López-Bravo, D. F., Virginio-Filho, E. de M., & Avelino, J. (2012). Shade is conducive to coffee rust as compared to full sun exposure under standardized fruit load conditions. *Crop Protection*, 38, 21–29. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2012.03.011>
- McDonald, B. A., & Linde, C. (2002). PATHOGEN POPULATION GENETICS, EVOLUTIONARY POTENTIAL, AND DURABLE RESISTANCE. *Annual Review of Phytopathology*, 40(1), 349–379. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.40.120501.101443>
- Parlevliet, J. E. (1979). Components of Resistance that Reduce the Rate of Epidemic Development. *Annual Review of Phytopathology*, 17(1), 203–222. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.17.090179.001223>
- Parlevliet, J. E., & Zadoks, J. C. (1977). The integrated concept of disease resistance: A new view including horizontal and vertical resistance in plants. *Euphytica*, 26(1), 5–21. <https://doi.org/10.1007/BF00032062>
- Pestana, K. N., Capucho, A. S., Caixeta, E. T., de Almeida, D. P., Zambolim, E. M., Cruz, C. D., Zambolim, L., Pereira, A. A., de Oliveira, A. C. B., & Sakiyama, N. S. (2015). Inheritance study and linkage mapping of resistance loci to *Hemileia vastatrix* in Híbrido de Timor UFV 443-03. *Tree Genetics and Genomes*, 11(4), 1–13. <https://doi.org/10.1007/s11295-015-0903-9>
- Rodrigues, C. J., Bettencourt, A. J., & Rijo, L. (1975). Races of the Pathogen and Resistance to Coffee Rust. *Annual Review of Phytopathology*, 13(1), 49–70. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.13.090175.000405>
- Scalabrin, S., Toniutti, L., Di Gaspero, G., Scaglione, D., Magris, G., Vidotto, M., Pinosio, S., Cattonaro, F., Magni, F., Jurman, I., Cerutti, M., Suggi Liverani, F., Navarini, L., Del Terra, L., Pellegrino, G., Ruosi, M. R., Vitulo, N., Valle, G., Pallavicini, A., ... Bertrand, B. (2020). A single polyploidization event at the origin of the tetraploid genome of *Coffea arabica* is responsible for the extremely low genetic variation in wild and cultivated germplasm. *Scientific Reports*, 10(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-61216-7>
- Silva, R. A., Zambolim, L., Castro, I. S. L., Rodrigues, H. S., Cruz, C. D., & Caixeta, E. T. (2018). The Híbrido de Timor germplasm: identification of molecular diversity and resistance sources to coffee berry disease and leaf rust. *Euphytica*, 214(9), 1–16. <https://doi.org/10.1007/s10681-018-2231-2>
- Sousa, T. V., Caixeta, E. T., Alkimim, E. R., de Oliveira, A. C. B., Pereira, A. A., Zambolim, L., & Sakiyama, N. S. (2017). Molecular markers useful to discriminate *Coffea arabica* cultivars with high genetic similarity. *Euphytica*, 213(3), 75. <https://doi.org/10.1007/s10681-017-1865-9>

- Souza, F. de F., Caixeta, E. T., Ventorim Ferrão, L. F., Ferreira Pena, G., Sakiyama, N. S., Maciel Zambolim, E., Zambolim, L., & Cruz, C. D. (2013). Diversidade Molecular no germoplasma de *Coffea canephora* conservado e cultivado no Brasil. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 13(4), 221–227. <https://doi.org/10.1590/S1984-70332013000400001>
- VALE, F. X. R. DO, PARLEVLIE, J. E., & ZAMBOLIM, L. (2001). Concepts in plant disease resistance. *Fitopatologia Brasileira*, 26(3), 577–589. <https://doi.org/10.1590/s0100-41582001000300001>
- Zambolim, L. (2016). Current status and management of coffee leaf rust in Brazil. *Tropical Plant Pathology*, 41(1), 1–8. <https://doi.org/10.1007/s40858-016-0065-9>



## **CAPÍTULO I**

**Caracterização e diversidade genética de genótipos de *Coffea arabica*  
provenientes da América Central por marcadores moleculares microssatélites  
(SSR)**

## 1. Introdução

O melhoramento genético do *Coffea arabica* L. visa a obtenção de plantas com porte baixo, resistência a doenças e pragas, adaptabilidade a diferentes ambientes, aumento da produtividade, boas características organolépticas e qualidade de bebida. Um dos principais focos dos programas de melhoramento da América Latina e outros países está na resistência a doenças, principalmente à ferrugem do cafeeiro (Anacafé, 2021; Caixeta et al., 2015; Oliveira et al., 2007; Petek et al., 2006). Atualmente, várias cultivares resistentes a ferrugem estão disponíveis e está sendo usada em diferentes países.

O cafeeiro arábica é uma planta autógama, que possui em torno de 10% de polinização cruzada natural. Dessa forma, os programas de melhoramento têm sido desenvolvidos usando métodos de hibridação e seleção, seguido de avanço de gerações, visando obter cultivares com os genes de interesse em homozigose. No entanto, esse melhoramento genético constitui-se em um processo lento que pode durar até 30 anos para obter uma cultivar promissora, o que resulta em custos altos (Melese & Kolech, 2021).

Além do longo processo de melhoramento, o café arábica apresenta uma base genética muito estreita atribuída à sua origem poliploide recentemente descoberta, biologia reprodutiva, evolução e disseminação no mundo (Scalabrin et al., 2020). Esse estreitamento da base genética é ainda maior quando se analisa as cultivares plantadas (T. . A. Setotaw et al., 2013), resultando em maior vulnerabilidade das lavouras a problemas bióticos e abióticos (Krishnan et al., 2021).

O emprego de técnicas de biologia molecular associada a genética clássica permite uma complementariedade de informações, que fornece suporte aos programas de melhoramento genético e reduz o tempo de lançamento de cultivares (Krishnan et al., 2021). Além disso, as informações moleculares podem aumentar a eficiência dos estudos de identidade e diversidade genética, facilitando a utilização dos recursos genéticos pelo melhorista.

Marcadores moleculares de DNA têm sido incorporados no melhoramento do cafeeiro para obtenção de cultivares de café com resistência múltipla à doenças (Almeida et al., 2021; Medeiros et al., 2021), com melhores características bioquímicas e físicas (Melese & Kolech, 2021), assim como detecção e quantificação da variabilidade genética (Almeida et al., 2021; Benti et al., 2020; Medeiros et al.,

2021; Rodrigues da Silva et al., 2019; Sánchez et al., 2020; Sousa et al., 2019; Spinoso-Castillo et al., 2021). Além disso, essa metodologia garante a identidade dos recursos genéticos, possibilita a selecionar genótipos promissores em estágios mais precoces e permite a redução do número de gerações no processo de melhoramento (Benti et al., 2020; Oliveira et al., 2007). Os marcadores de DNA permitem também avaliar a diversidade genética, inferir sobre a sistemática e filogenia molecular de genótipos, identificar genitores (testes de paternidade), detectar similaridades ou dissimilaridade entre acessos e/ou cultivares, assim como diferenciar alelos que conferem resistência a fatores bióticos ou abióticos que possam ser utilizados no melhoramento de plantas (Benti et al., 2020; Pruvot-Woehl et al., 2020; Scalabrin et al., 2020).

Diferentes tipos de marcadores moleculares estão disponíveis atualmente. Esses marcadores podem ser dominantes (incapacidade de distinguir diferenças alélicas de um gene em condições heterozigotas), ou codominantes (podem detectar diferenças alélicas) (Adhikari et al., 2017; Al-Murish et al., 2013; Silvestrini et al., 2005). Para o cafeeiro, estudos de diversidade genética baseados em diferentes marcadores moleculares AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), SCAR (Sequence Characterized Amplified region), RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), SSR (Simple Sequence Repeat), mostraram a eficiência dos marcadores SSR. A sua eficiência está associada a abundância no genoma, codominância, multialelismo, especificidade de loco, rapidez e facilidade relativa de execução do ensaio, poder de resolução e reprodutibilidade da técnica (Anthony et al., 2002; Benti et al., 2020; Ferrão et al., 2013; Missio et al., 2010, 2011; Oliveira et al., 2007; T. Setotaw et al., 2010)

A diversidade genética pode ser analisada utilizando características morfológicas, agronômicas, geográficas e químicas. No entanto, a discriminação de materiais genéticos baseados somente em características fenotípicas pode ser dificultada devido a influência do ambiente e limitação do número de características a ser avaliada. Dessa forma, a utilização de marcadores moleculares, como ferramenta auxiliar, tem permitido aumentar a eficiência na identificação da diversidade genética e na seleção assistida por marcadores moleculares (SAM) de cafeeiros (Alkimim et al., 2017; Ferrão et al., 2015; Silva et al., 2018; Sousa et al., 2017).

Sousa et al. (2017), utilizando marcadores SSR, determinaram o perfil molecular individual de 34 cultivares de *C. arabica* no Brasil e observaram diferenças entre e dentro de cada uma das cultivares analisadas, identificando 31 perfis moleculares únicos. Silva et al. (2018) avaliaram acessos do banco de germoplasma do grupo Híbrido de Timor e a análise de diversidade mostrou a formação de 21 grupos. Esses trabalhos mostram a alta eficácia na utilização de SSR, além de identificar materiais promissores a serem utilizados nos programas de melhoramento.

Marcadores moleculares para estudo de diversidade genética em cafeeiros também têm sido utilizados em pesquisa em outros países produtores no mundo. Na Costa Rica, Sánchez et al. (2020) realizaram a análise da variabilidade genética de genótipos de *C. arabica*, *C. canephora*, *C. excelsa* e *C. liberica*, assim como híbridos F<sub>1</sub> intraespecíficos, pertencentes ao banco de germoplasma. Nesse trabalho, o perfil molecular de cada material foi obtido, mostrando que os genótipos *C. canephora*, *C. excelsa* e *C. liberica* apresentavam maior variabilidade genética. Além de isso evidenciaram que os cafeeiros arábicas apresentam baixo grau de polimorfismo. Montagnon et al. (2021), com oito marcadores SSR, discriminaram os cafés do Yemen baseados em estudos de diversidade, foram obtidos cinco grupos, sendo um grupo formado por cafeeiros exclusivamente originados da Etiópia, o segundo grupo formado por cultivares de diferentes países, dois outros grupos contendo cultivares de outros países e amostras do Yemen e um quinto grupo formado exclusivamente por acessos do Yemen. Destacou-se a importância do uso dos marcadores SSR para a identificação desse grupo contendo apenas acessos do Yemen que difere dos cafeeiros da Etiópia e das cultivares de outros países, sendo, portanto, uma importante fonte de genitores para o melhoramento do país.

Além da diversidade genética, marcadores moleculares têm sido usados para a obtenção do padrão molecular único (*Fingerprinting*) dos genótipos de cafeeiros. Essa informação é de suma importância para o melhoramento genético e para a confiabilidade na manutenção, preservação e intercâmbio de material genético de genótipos de café entre os diferentes institutos de pesquisa a nível internacional (Monge & Guevara, 2000). As cultivares analisadas são, em geral, plantadas nos diferentes países por apresentar resistência à ferrugem, principal doença da cultura nas Américas, porém algumas de essas cultivares lançadas como resistentes atualmente apresentam a resistência suplantada.

Diante desses fatos, o presente trabalho tem por objetivo caracterizar e estudar a diversidade de cultivares de café provenientes da América Central, utilizando marcadores moleculares microssatélites (SSR).

## **2. Material e Métodos**

O trabalho foi desenvolvido no Departamento de Fitopatologia (DFP) e no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (Bioagro), junto ao laboratório de Biotecnologia do Cafeeiro (BioCafé), na Universidade Federal de Viçosa (UFV).

### **2.1. Material genético**

Nas análises de diversidade genética, utilizou-se plantas de 36 cultivares de *Coffea arabica* cultivadas em diferentes países da América Central, plantadas por serem resistentes a ferrugem e algumas por terem potencial para qualidade de bebida. Cultivares do Brasil e Etiópia foram incluídas como controles nas análises. Seis indivíduos foram analisados por cultivar, caso não se tenham o total de plantas, foram utilizadas as disponíveis (Tabela 1). As cultivares foram semeadas em vasos plásticos individuais na casa vegetação para obtenção de muda para extração de DNA. Foram realizadas podas de formação. As plantas foram mantidas em casa de vegetação com temperatura que oscilava entre 20 °C e 28 °C.

### **2.2. Coleta de folhas e extração de DNA**

Para extração de DNA genômico das diferentes plantas de café, foram coletadas 208 amostras foliares apresentadas na Tabela 1. As folhas eram uniformes, sem injúrias, jovens, vigorosas, de cor verde brilhante e completamente expandidas. Em seguida essas foram acondicionadas em tubos Falcon contendo identificação correspondente a cada material. Os tubos com as folhas foram colocados em caixa de isopor para manter a umidade e evitar a oxidação, até serem levadas ao laboratório Biocafé (UFV), onde foram armazenados em ultrafreezer a -80 °C.

As amostras foram liofilizadas por 72 horas e, então, maceradas com auxílio de cadinho e pistilo para a extração do DNA genômico. O tecido vegetal macerado foi armazenado em microtubos de 2,0 mL. O DNA genômico foi extraído com a seguinte metodologia: em microtubos de 2,0 mL identificados, foram adicionados 50 mg de tecido vegetal macerado de cada amostra. Dois tampões foram preparados, o tampão de lise (Sorbitol 0,35 M, Tris-HCl 0,10 M pH 8,0, EDTA 5 mM) e o de extração (NaCl 2 M, CTAB 2%, Tris-HCl 0,2 M, EDTA 0,05 M). Os dois tampões foram misturados e

acrescidos de sarcosil (5%), bissulfito de sódio (1%), carvão ativo (0,1%) e PVP-40 (2%). Após esse preparo, 1,5 mL da solução de extração, pré-aquecida a 65°C, foi adicionada em cada microtubo de 2,0 mL. Os tubos foram deixados em banho-maria a 65 °C por 40 min, sendo agitados de 10 em 10 minutos. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 14.000 rpm e o sobrenadante transferido para novos tubos, com a adição de 600 µL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1). Os tubos foram agitados e centrifugados por 10 minutos a 14.000 rpm. Um total de 800 µL do sobrenadante foi retirado, transferido para outro microtubo contendo 600 µL de isopropanol e mantido overnight a 4 °C. Após esse período, o material foi centrifugado por 20 minutos a 14.000 rpm, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado com etanol 70% e 95%. O DNA foi ressuspendido novamente em 200 µL de TE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0, EDTA 0,1 mM pH 8,0), contendo RNase na concentração final de 80 µg/µL e incubado em *thermomixer* a 37 °C por 30 minutos. O DNA foi precipitado em 40 µL de NaCl 5M e 500 µL de isopropanol 100%, incubado por 2 horas a -20 °C e centrifugado por 20 minutos a 14.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e logo após lavado com etanol 70% e 95%, sendo novamente ressuspendido em 200 µL de TE pH 8. A qualidade e quantidade do DNA foi avaliada em *NanoDrop 2000*. As amostras foram padronizadas a uma concentração de 25 ng µL<sup>-1</sup> e armazenadas em freezer a -20 °C até o momento de seu uso.

**Tabela 1.** Genótipos de café (*Coffea arabica*) provenientes de diferentes países e analisados com marcadores SSR.

País	Nome	Genealogia	Grupo Genético	Nº Plantas por cultivar
Costa Rica	Costa Rica 95	Híbrido de Timor CIFC 832/1 x Caturra (Catimor T8667)	Catimor	1
	San Izidro 48	Villa Sarchí x Híbrido de Timor CIFC 832/2	Sarchimor	6
República Dominicana	Catimor 3	-	Catimor	6
	Catimor 4	-	Catimor	5
El Salvador	Pacamara 1	Pacas x Maragogipe Vermelho	Bourbon-Típica	6
	Pacamara 2	Pacas x Maragogipe Vermelho	Bourbon-Típica	6
	Pacamara 3	Pacas x Maragogipe Vermelho	Bourbon-Típica	1
	Cuscatleco 1	Villa Sarchí CIFC 971/10 x Híbrido de Timor CIFC 832/2 (Sarchimor T5296)	Sarchimor	6
	Pacas 1	Mutação Bourbon	Bourbon-Típica	1
	Pacas 2	Mutação Bourbon	Bourbon-Típica	6
	San Pacho	Caturra x San Bernardo	Bourbon-Típica	1
	Bourbon	Bourbon	Bourbon-Típica	6
	Cuscatleco 2	Villa Sarchí CIFC 971/10 x Híbrido de Timor CIFC 832/2 (Sarchimor T5296)	Sarchimor	6
	San Pacho 1	Caturra x San Bernardo	Bourbon-Típica	6
	San Pacho 2	Caturra x San Bernardo	Bourbon-Típica	6
	CR95 Izalco	Híbrido de Timor CIFC 832/1 x Caturra (Catimor T8667)	Catimor	6
	San Pacho 3	Caturra x San Bernardo	Bourbon-Típica	6
Guatemala	Sarchimor	Villa Sarchí x Híbrido de Timor CIFC 832/2	Sarchimor	6
	Guapa	Catuái x Catimor	Catimor	6
	Colismor	Pache Colis x Catimor T5175	Catimor	6
	Catimor 1	Híbrido de Timor CIFC 832/1 x Caturra (Catimor T5175)	Catimor	2
	Catimor 2	Híbrido de Timor CIFC 832/1 x Caturra (Catimor T5175)	Catimor	6
	Catiguá MG2	Catuái Amarelo IAC 86 x Híbrido de Timor UFV 440-10	Catuái x Híbrido de Timor	6
	Catimor 5175	Híbrido de Timor CIFC 832/1 x Caturra (Catimor T5175)	Catimor	2
	Anacafé	(Catimor T5175 x Caturra) x Pacamara	Catimor	6
Honduras	Catimor 8667	Híbrido de Timor CIFC 832/1 x Caturra (Catimor T8667)	Catimor	6
	Lempira 1	Híbrido de Timor 832/1 x Caturra	Catimor	6
	Geisha	Geisha	Bourbon-Típica	3
	Parainema Apical	Villa Sarchí 971/10 x Híbrido de Timor CIFC 832/2 (Sarchimor T5296-184)	Sarchimor	1
	IHCAFE 90	Híbrido de Timor CIFC 832/1 x Caturra	Catimor	6

**Tabela 1. Continuação.**

<b>País</b>	<b>Nome</b>	<b>Progenitores</b>	<b>Grupo Genético</b>	<b>Nº Plantas por cultivar</b>
Honduras	Parainema	Villa Sarchí 971/10 x Híbrido de Timor CIFC 832/2 (Sarchimor T5296-184)	Sarchimor	2
	Centroamericano_F3	Sarchimor T5296 x Rume Sudan	Sarchimor	6
	Centroamericano_F2	Sarchimor T5296 x Rume Sudan	Sarchimor	6
	Lempira 2	Híbrido de Timor CIFC 832/1 X Caturra	Catimor	6
	Pacamara 4	Pacas x Maragogipe Vermelho	Bourbon-Típica	6
	Catimor T5175	Híbrido de Timor CIFC 832/1 x Caturra (Catimor T5175)	Catimor	6
Etiópiã	Etiópiã 1	-	Bourbon-Típica	6
	Etiópiã 2	-	Bourbon-Típica	5
	Etiópiã 3	-	Bourbon-Típica	5
	Etiópiã 4	-	Bourbon-Típica	4
Brasil	Catuaí Vermelho IAC 144	Caturra Amarelo, IAC 476-11 x Mundo Novo IAC 374-19	Bourbon-Típica	1
	IBC-Palma 2	Catuaí Vermelho IAC 81' x Catimor UFV 353	Catimor	1
	MGS Catiguá MG3	Catuaí Amarelo IAC 86 x Híbrido de Timor UFV 440-10	Catuaí x Híbrido Timor	1
	IPR-103	Catuaí x Icatú	Catuaí	1
	Catuaí IAC 15	Caturra Amarelo, IAC 476-11 x Mundo Novo IAC 374-19	Bourbon-Típica	1
	Bourbon Amarelo UFV-535	Bourbon Amarelo UFV-535	Bourbon-Típica	1
	Catuaí Vermelho 20/15	Icatú x Catuaí	Catuaí	1
	Catuaí Amarelo 2SL	Icatú x Catuaí	Catuaí	1
	Acauã	Mundo Novo IAC 388-17 x Sarchimor IAC 1668	Sarchimor	1
	Tupí Amarelo IAC 5162	Tupí IAC 1669-33 Vermelho x Catuaí Amarelo.	Sarchimor	1
	Tupí IAC 1669/33	Híbrido H 361/4 ('Villa Sarchí' x Híbrido de Timor CIFC 832/2)	Sarchimor	1
	Paraíso MG H419	Catuaí Amarelo IAC 30 x Híbrido Timor UFV 445-46	Catuaí x Híbrido Timor	1
Araponga MG1	Catuaí Amarelo IAC 86 x Híbrido de Timor UFV 446-08	Catuaí x Híbrido Timor	1	



### 2.3. Marcadores microssatélites

Os marcadores microssatélites utilizados (Tabela 2) foram os que apresentaram maior polimorfismo entre cafeeiros da espécie *C. arabica* segundo Sousa et al., (2017).

**Tabela 2.** Descrição dos *primers* microssatélites utilizados.

Primer	Sequência		pb	Cromosomo
	Foward	Reverse		
CaEST-001 <sup>a</sup>	GAAGACCAAGCACCCCTCAAC	ACACCAACTACGGGCAGACA	155	1e
CaEST-002 <sup>a</sup>	GAAGGGACAAAGACGCCTAA	CGACAGATGCAGGAATAAACTG	136	7c
CaEST-022 <sup>a</sup>	GCCATTTACAATCTCACCTC	AGACCCAGCAGACAACAACA	207	6e
CaEST-024 <sup>a</sup>	AGATACCCACCGCCTAATCCT	GCAACAACCTTCTGCTCATCC	108	1e
CaEST-028 <sup>a</sup>	TTAACCTCCTGCCACACA	GCCCAAATAAATCCCTCCA	169	6c
CaEST-029 <sup>a</sup>	AGGAGATGCCTGTGACGAAC	GGACGGAAAGATTCTGGCTTT	191	11e
CaEST-030 <sup>a</sup>	CCCATGAAGACTTGCCAATA	GGGAAATACAAGTGTTGCTG	186	2e
CaEST-031 <sup>a</sup>	CGGAGCAAGTGAATTGAACAGA	AAAGGGAAAGGAAGAAGGAG	109	11c
CaEST-034 <sup>a</sup>	GATACTTCCATGAGGATCGTTG	GATCATACAATGTGGGAAGG	140	9c
CaEST-058 <sup>a</sup>	GTCGATGGCTGGTTGTTGTT	GCCCTGAAATATGATCGCTGT	256	6e
CaEST-071 <sup>a</sup>	ATGGAGAGGAAGACGCAACA	CCTTATTGAAGACGCCAAA	151	6c
CaEST-072 <sup>a</sup>	TTGCTTGCTCCGCATCCTAC	ATCGCTTCCAAGAGGCTTTC	117	7c
CaEST-045 <sup>a</sup>	GCATCCTACCGAGTACATACAA	TCCATCAACAACAACCGAAG	155	7c
CaEST-048 <sup>a</sup>	TGAGACAAGCTATGGAGGAGGA	AACCAGATCAACAGGGTAGGG	194	6e
SSR 16 <sup>b</sup>	ACCCGAAAGAAAGAACCAAG	CCACACAACCTCTCCTCATTC	112	5e
SSR 95 <sup>c</sup>	TAAGAAGCCACGTGACAAGTAAGG	TATGGCCCTTCTCGCTTTAGTT	350	3c

<sup>a</sup> Ferrão et al. (2015); <sup>b</sup> Combes et al. (2000); <sup>c</sup> Moncada and McCouch (2004); pb= pares de bases.

Para realização da reação de PCR, utilizou-se 50 ng de DNA, 1 U de Taq DNA polimerase, tampão 1X da enzima, 1 mM de MgCl<sub>2</sub>, 150 µM de cada dNTP (dGTP, dTTP, dCTP, dATP) e 0,1 µM de cada *primer*, completando com água milli-Q para um volume final de 20 µL. As amplificações foram efetuadas em termocicladores PTC-200 (*MJ Research*) e Veriti (*Applied Biosystems*). A reação foi iniciada com desnaturação a 94 °C por 2 min, seguido por 10 ciclos de *touchdown* PCR, constituídos de 94 °C por 30 segundos (seg), temperatura de anelamento decrescendo 1°C a cada ciclo (de 66 °C até 57 °C) por 30 seg e extensão de 72 °C por 30 seg. Foram realizados mais 30 ciclos de desnaturação a 94 °C, anelamento a 57 °C e extensão a 72 °C, com 30 seg cada etapa. Foi incluída uma extensão final a

72 °C, por 20 min. Os produtos resultantes da reação de PCR foram separados em eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante 6% e visualizados por meio de coloração com nitrato de prata, conforme protocolo descrito por Brito et al., (2010).

#### **2.4. Análises da diversidade genética**

Todos os marcadores utilizados foram avaliados para os 208 indivíduos (Tabela 1), ou seja, todas plantas de cada cultivar analisada. Para a avaliação dos géis, os marcadores foram codificados como codominante. Dessa forma, os códigos utilizados para os alelos foram: 11, 22, 33, 44 para as formas homozigotas e 12, 13, 14, 23, 24 e 34 para as heterozigotas.

O *fingerprint* foi obtido de duas formas: (1) fazendo um *bulk* dos indivíduos de cada cultivar e (2) analisando os dados de cada indivíduo que compõem cada cultivar. Para a obtenção do dendograma utilizou-se o *bulk* da cultivar.

Para as análises de diversidade foi utilizado o *software* R, com ajuda dos pacotes Factoextra, FactoMineR e ggplot2, a partir da matriz construída de cada um dos indivíduos com seus respectivos *primers*. O dendograma foi construído utilizando a técnica de agrupamento UPGMA (Método de ligação média entre grupos), a partir dos valores da matriz de distância euclidiana gerada pelo complemento aritmético do índice não ponderado.

#### **2.5. Análise da estrutura populacional**

O *software* Structure v2.3.4 (Pritchard et al., 2000) foi usado para estudar a estrutura genética das 53 cultivares de *C. arabica*, baseado em 16 SSR. Para determinar o valor de K, foram feitas corridas simuladas de 2 até 20 interações individuais, utilizando os parâmetros de 10.000 repetições e 1.000.000 réplicas de Cadena de Markov Monte Carlo (MCMC). Foram considerados os parâmetros de modelo de mistura e frequência de alelos com 20 execuções cada um, para determinar a possibilidade de mistura.

O valor ótimo de k, foi identificado por STRUTURE HARVESTER software online (Earl & VonHoldt, 2012), comparando os valores de K. Foi calculado o  $\Delta K$  para obter o número mais provável de populações (Evanno et al., 2005).

### 3. Resultados

A caracterização das cultivares de café foi realizada com a utilização de 16 marcadores SSR. Uma análise de e-PCR foi realizada para determinar o tamanho do amplicon esperado e identificar o cromossomo de *C. arabica* que estava sendo analisado com o marcador (Tabela 2). Um total de 62 alelos foi observado nos 208 genótipos utilizados. O número de alelos amplificados por marcador variou entre sete e dois, sendo sete para o marcador CaEST-001, seis para CaEST-022, cinco para CaEST-030 e 058, quatro para CaEST-029, 031, 034 e SSR-95, três para CaEST-022, 024, 028, 045, 071, 072 e SSR16, e dois para CaEST-048, com uma média de 3,8 alelos por loco.

Os dados dos indivíduos de uma mesma cultivar foram agrupados pelo método UPGMA (Método de ligação média entre grupos) e então realizada a análise da diversidade das cultivares de café (Figura 1). Observou-se a discriminação da maioria das cultivares e a formação de seis grandes grupos:

**Grupo I:** formado pelas cultivares MGS Catiguá 3 (Brasil) e Pacamara 4 (Honduras).

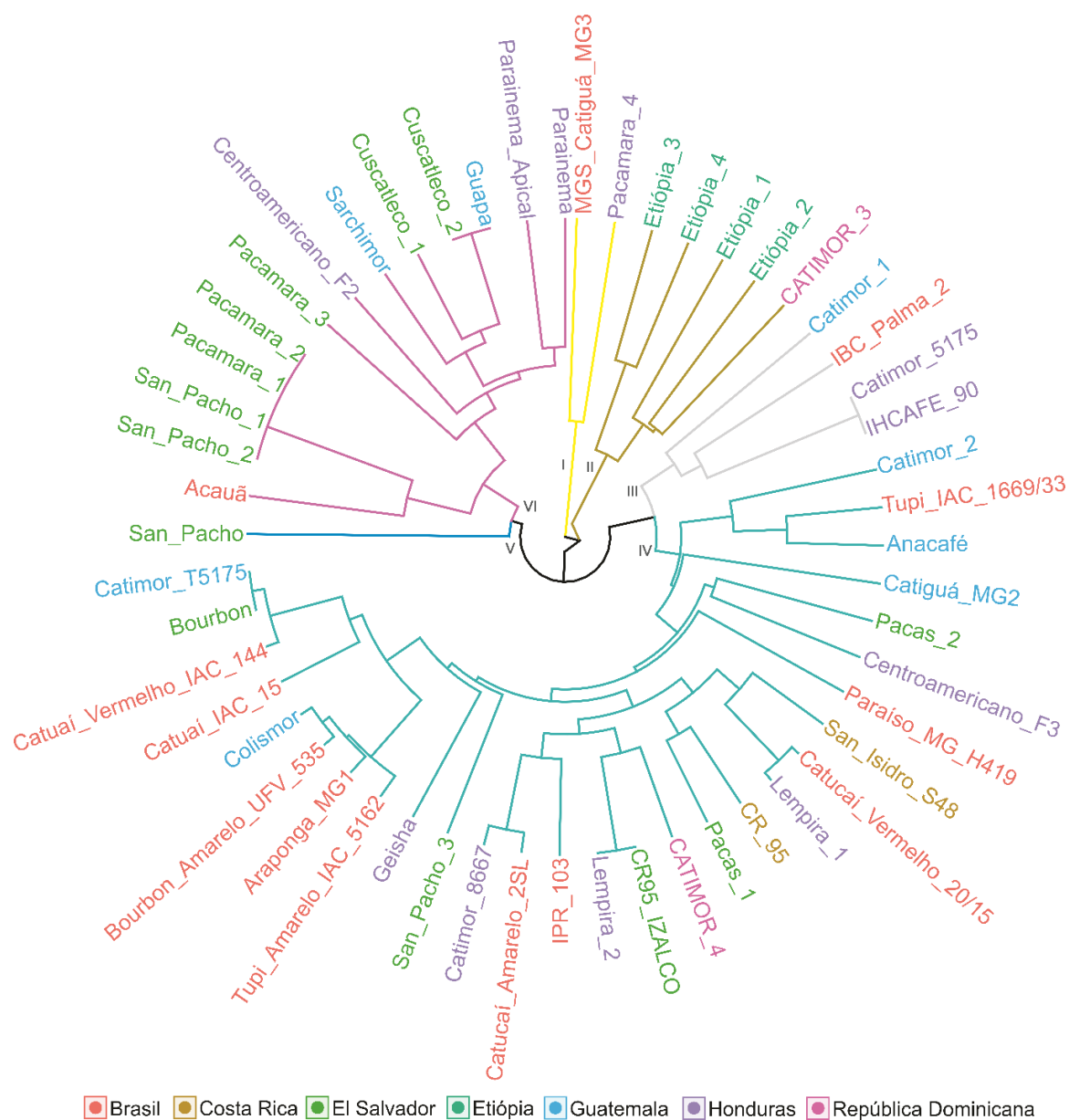
**Grupo II:** formado pelos quatro materiais genéticos da Etiópia e a cultivar Catimor 3 de República Dominicana

**Grupo III:** formado pelos genótipos Catimor 1 (Guatemala), IBC Palma 2 (Brasil), Catimor 5175 e HICAFE 90 (Honduras). Os materiais Catimor 1, Catimor 5175 e IHCAFE 90 correspondem a seleção de progênies do Catimor T-5175 (Anacafé, 2016). A cultivar brasileira IBC Palma 2 tem como progenitor o Catucaí Vermelho IAC 81 e Catimor UFV 353. Esse grupo tem em comum a procedência de materiais ancestrais Catimor.

**Grupo IV:** ficou composta pela maioria dos materiais genéticos analisados, sendo constituído pelas duas cultivares analisadas da Costa Rica (San Isidro- S48 e CR-95), cinco cultivares plantadas em El Salvador; cinco da Guatemala, cinco de Honduras e uma da República Dominicana. A maioria das cultivares brasileira também ficaram nesse grupo (10 cultivares).

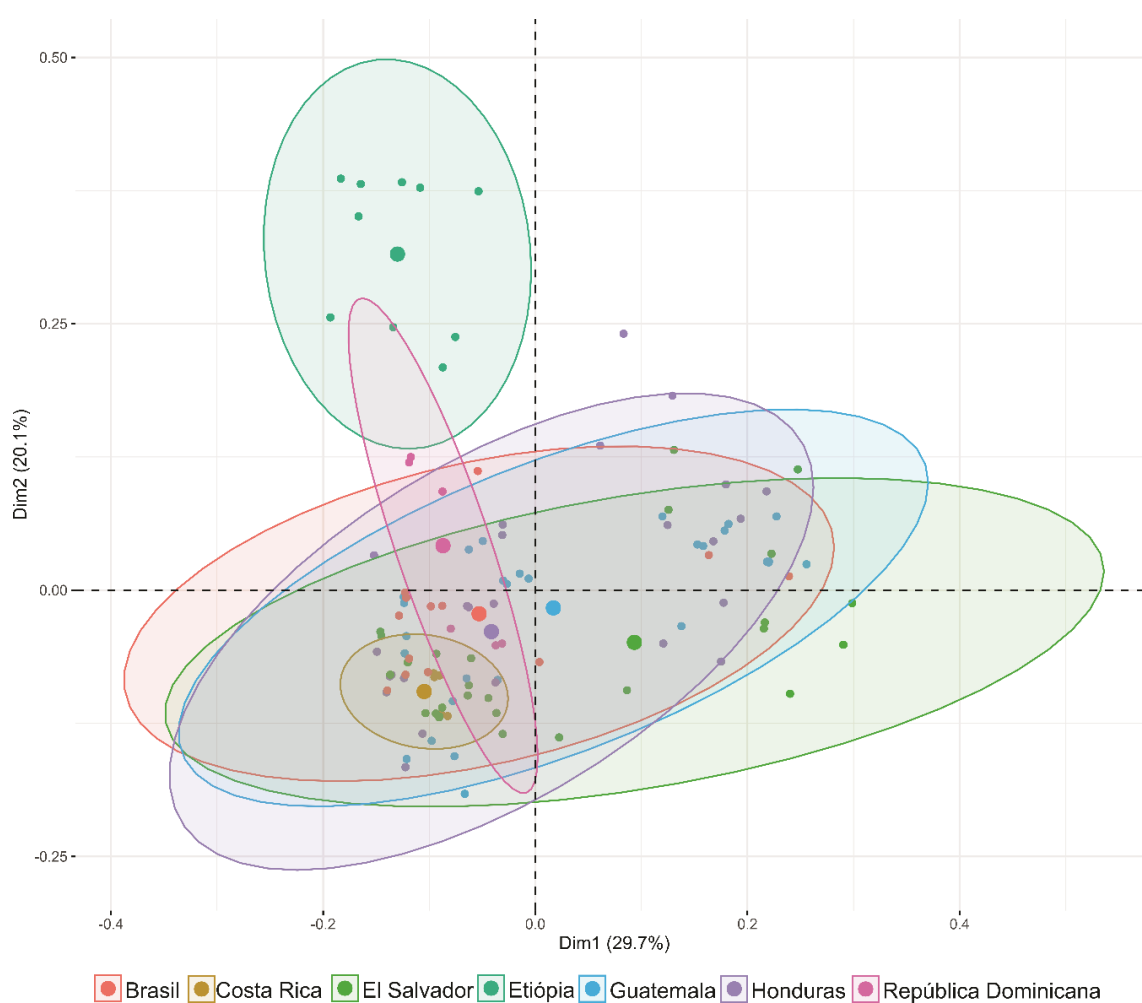
**Grupo V:** ficou formado apenas com a cultivar San Pacho (El Salvador), originada do cruzamento entre caturra (mutação de Bourbon) e San Bernardo (mutação de típica), dando origem a uma planta de porte pequeno com nós pequenos e suscetível a ferrugem.

**Grupo VI:** a maioria das cultivares que formaram esse grupo são plantadas em El Salvador (sete cultivares), além de uma cultivar brasileira (Acauã), duas da Guatemala e três de Honduras.



**Figura 1.** Diversidade dos diferentes genótipos de *Coffea arabica* plantados na América Central, analisados com 16 marcadores microssatélites, obtido pela técnica UPGMA e baseado na matriz de dissimilaridade do complemento aritmético do índice ponderado. Acessos da Etiópia e cultivares brasileiras foram incorporadas como controles.

Na análise, foram considerados os 208 genótipos (Figura 2). Foi possível explicar 49,8% da variabilidade total das cultivares, confirmando a divergência genética entre elas. Realizou-se um agrupamento com base no país de origem (K=7) e o resultado obtido mostrou que apenas os genótipos da Etiópia foram agrupados separadamente. Os agrupamentos das cultivares brasileiras e dos países da América Central ficaram sobrepostos, demonstrando baixa diversidade genética entre as cultivares plantas entre os países (Figura 2). Apenas duas cultivares da República Dominicana apresentaram similaridade com os acesso da Etiópia.



**Figura 2.** Análises de PCoA (Coordenadas Principais) para os 208 indivíduos avaliados com 16 marcadores microssatélites e agrupados segundo o país de origem das cultivares.

Na análise de PCoA sem considerar os países de origem o agrupamento por similaridade genética identificou seis grupos (Figura 3), sendo a maior similaridade entre os grupos 1, 2 e 5, que são compostos em sua maioria por genótipos originados

de cruzamentos envolvendo Híbrido de Timor, Sarchimor e Bourbon-Típica. Os grupos 3, 4 e 6, compostos na maioria por genótipos do grupo Catimor e Bourbon-Típica, também ficaram mais próximos geneticamente e separados dos grupos 1, 2 e 5. Esse resultado evidencia uma distinção entre os cafeeiros originados do Sarchimor dos cafeeiros Catimor. Os cafeeiros denominados Catimor tem descendência do acesso Híbrido de Timor CIFC832/1 e o Sarchimor do Híbrido de Timor CIFC832/2 e esses têm sido utilizados como principais fontes de resistência a fatores bióticos e abióticos nos diferentes programas de melhoramento na América Central e do Sul.

Nessa análise observamos os seguintes agrupamentos:

**Grupo 1:** Anacafé E e F, Catiguá MG2 E, Catimor 2A, Guapa A, B, C, D, E, e F, Sarchimor A, B, D, F de Guatemala; Centroamericano F2 A, D, E e F, Centroamericano F3 B, Parainema A e B, Parainema Apical de Honduras; Cuscatleco 1 A, B, C, D, E e F, Cuscatleco 2 A, B, D, E e F, Pacamara 3, San Pacho de El Salvador.

**Grupo 2:** Pacamara 1 A, B, C, D e E, Pacamara 2 A, B, C, D, E e F, San Pacho 1 A, B, C, E e F, San Pacho 2 A, B, C, D, E e F de El Salvador; Acauã de Brasil.

**Grupo 3:** Catimor 3 A, B, C, D, E e F de República Dominicana; e todos os genótipos de Etiópia 1, 2, 3 e 4.

**Grupo 4:** Anacafé C e D, Catiguá MG2 A, B, C, D e F, Catimor 2 D e E, Colismor B, C, D e E, Sarchimor E de Guatemala; Bourbon A, B, C, D, E e F, Cuscatleco 1 E, Pacamara 1F, Pacas 2 A, B, D, E e F de El Salvador; Catimor 8667 A, B, C, D, E e F, Catimor T5175 A, B, C, D, E e F, Centroamericano F2 B e C, Centroamericano F3 A, C, D, E e F, Geisha A, B e C, IHCAFE 90, Lempira 1 A, B, C, D, E e F de Honduras; Araponga MG1, Bourbon Amarelo UFV 535, Catuaí IAC 15, Catuaí Vermelho IAC 144, Catucaí Amarelo 2SL, Catucaí Vermelho 20/15, IPR 103, Paraíso MG H419, Tupi Amarelo IAC 51, Tupi IAC 1669/3 de Brasil.

**Grupo 5:** Pacamara 4 A, B, C, D, E e F de Honduras; MGS Catiguá 3 de Brasil.

**Grupo 6:** Anacafé A e B, Catimor 1 A e B, Catimor 2 B, C e F, Catimor 5175 A e B, Colismor A e F, Sarchimor C de Guatemala; Catimor 4 A, B, C, D e E de República Dominicana; CR 95 IZALCO A, B, C, D, E e F, Pacas 1A, San Pacho 1 D, San Pacho 3 A, B, C, D, E e F de El Salvador; CR 95 de Costa Rica; IHCAFE 90 A, B, C, D e F, Lempira 2 A, B, C, D, E e F de Honduras; IBC Palma 2 de Brasil.

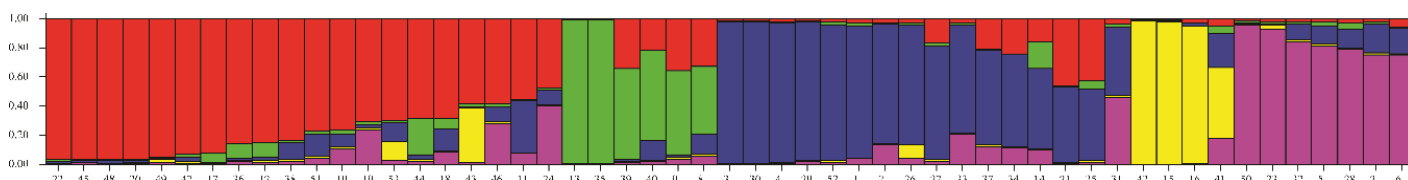


**Figura 3.** Análises de PCoA (Coordenadas Principais) para os 208 indivíduos agrupados com base no dado estatístico, avaliados com 16 marcadores microsatélites.

O algoritmo bayesiano utilizando o modelo ADMISTURE, fez com que as 53 cultivares, incluindo as da América Central, do Brasil e da Etiópia, fossem alocadas em cinco subpopulações (Figura 4). Observou-se mistura genética pela distribuição da probabilidade  $L(k)$  e as estimativas de  $\delta K$ , em várias cultivares, confirmando que o material genético plantado nos diferentes países da América Latina são aparentados e não houve estruturação genética por país.

Considerando os cafeeiros contendo menor proporção de *admixture*, o grupo 1 (vermelho) ficou composto, em geral, por cafeeiros Catimor (Catimor 1(45), Lempira 1 (48), Catimor 5175 (20), IHCAFE 90 (49)). O grupo 2 (verde) ficou com cafeeiros Bourbon-Típica (San Pacho 1 (13) e Pacamara 1 (35)). Esses genótipos não possuem introgressão de outras espécies, portando, são considerados arábica puros e, apesar de susceptível a patógenos, foram incorporados nos diferentes programas de melhoramento por apresentarem outras características agrônômicas desejadas como

qualidade de bebida. No grupo 3 (azul) ficaram a maioria das cultivares brasileiras (Catuaí IAC 15 (3), Bourbon Amarelo UFV 535 (30), Catuaí Vermelho 20/15 (4), IPR 103 (29), Catuaí Vermelho IAC 144 (1), Araponga MG (7)). O grupo 4 (amarelo) constitui os acessos da Etiópia (Etiópia 2 (42), Etiópia 1 (15), Etiópia 3 (16), San Pacho 3 (41)). O grupo 5 (rosa) ficou formado por Sarchimor e Bourbon.



**Figura 4.** Resultado do agrupamento dos 53 genótipos de *Coffea arabica*, utilizando 16 marcadores SSR. Cada barra individual representa um indivíduo. As barras de cores diferentes representam grupos genéticos diferentes. Mistura de cores na barra representa mistura (recombinação) de material genético.

A diferenciação genética entre populações foi calculada mediante os valores de  $F_{st}$  (índice de diferenciação genética de Weir e Cockerham 1984). Os índices de  $F_{st}$  apresentaram valores entre 0,0505 a 0,4447 (Tabela 3). Os valores indicam que as cultivares apresentam variabilidade genética baixa e que podem ter mistura entre os genótipos. Os dados de  $F_{st}$  confirmam o resultado obtido tanto pela análise de Structure (Figura 4), quanto o PCoA (Figura 2), mostrando que existe uma estrita relação genética entre as cultivares plantados nos diferentes países da América Latina.

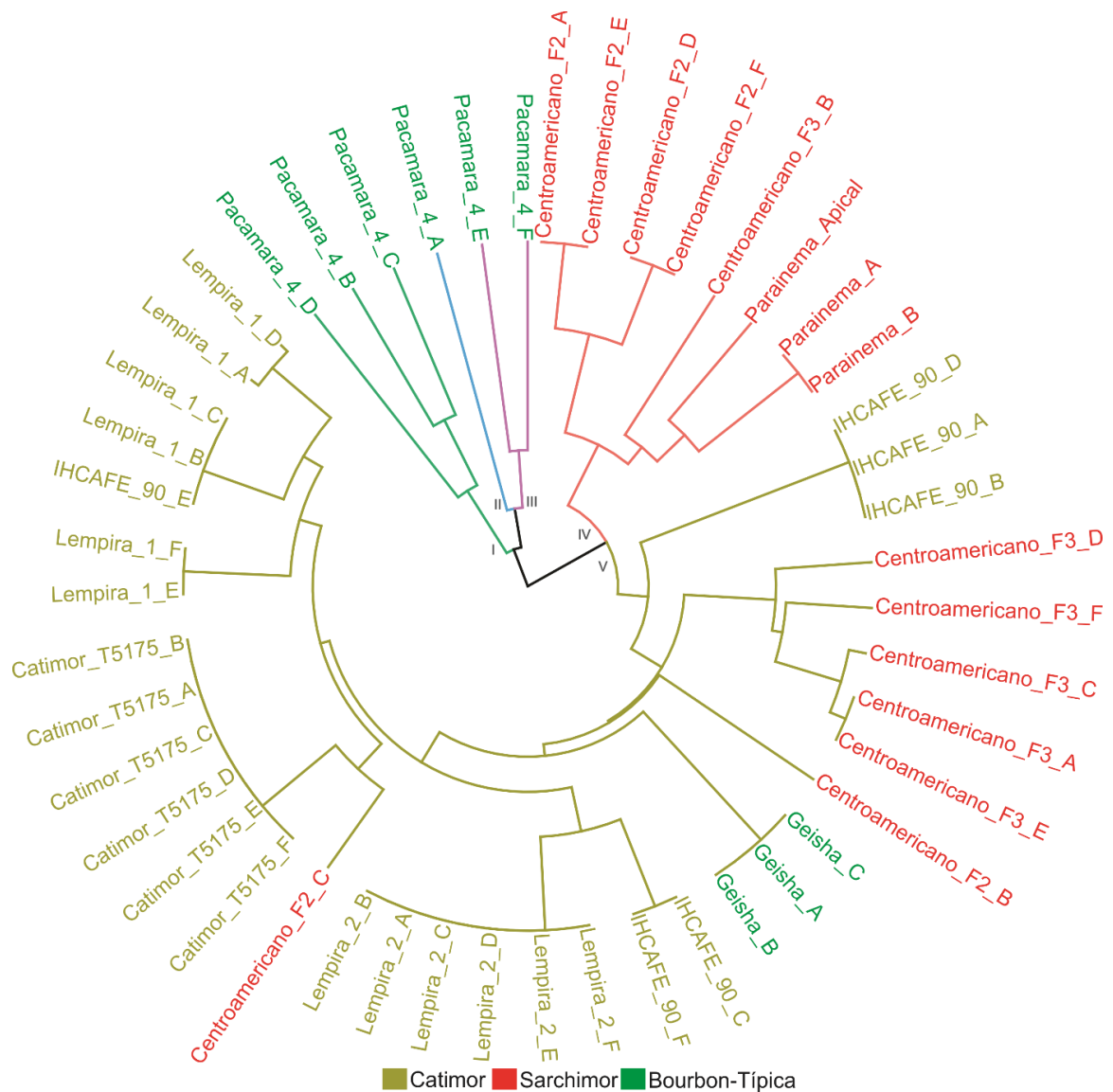
**Tabela 3.** Valores de diferenciação genética ( $F_{st}$ ) entre populações.

População	1	2	3	4	5
1	0,0000				
2	0,2557	0,0000			
3	0,0693	0,2945	0,0000		
4	0,2785	0,4447	0,2964	0,0000	
5	0,0505	0,2069	0,0525	0,2023	0,0000



Estudos de diversidade genética foram, também, realizados entre as cultivares de cada um dos países (Figuras 5, 6, 7, 8 e 9) e em cada grupo genético (Figuras 10, 11, 12 e 13). Os grupos genéticos os quais as cultivares pertencem são Catimor, Híbrido de Timor, Sarchimor e Bourbon-Típica

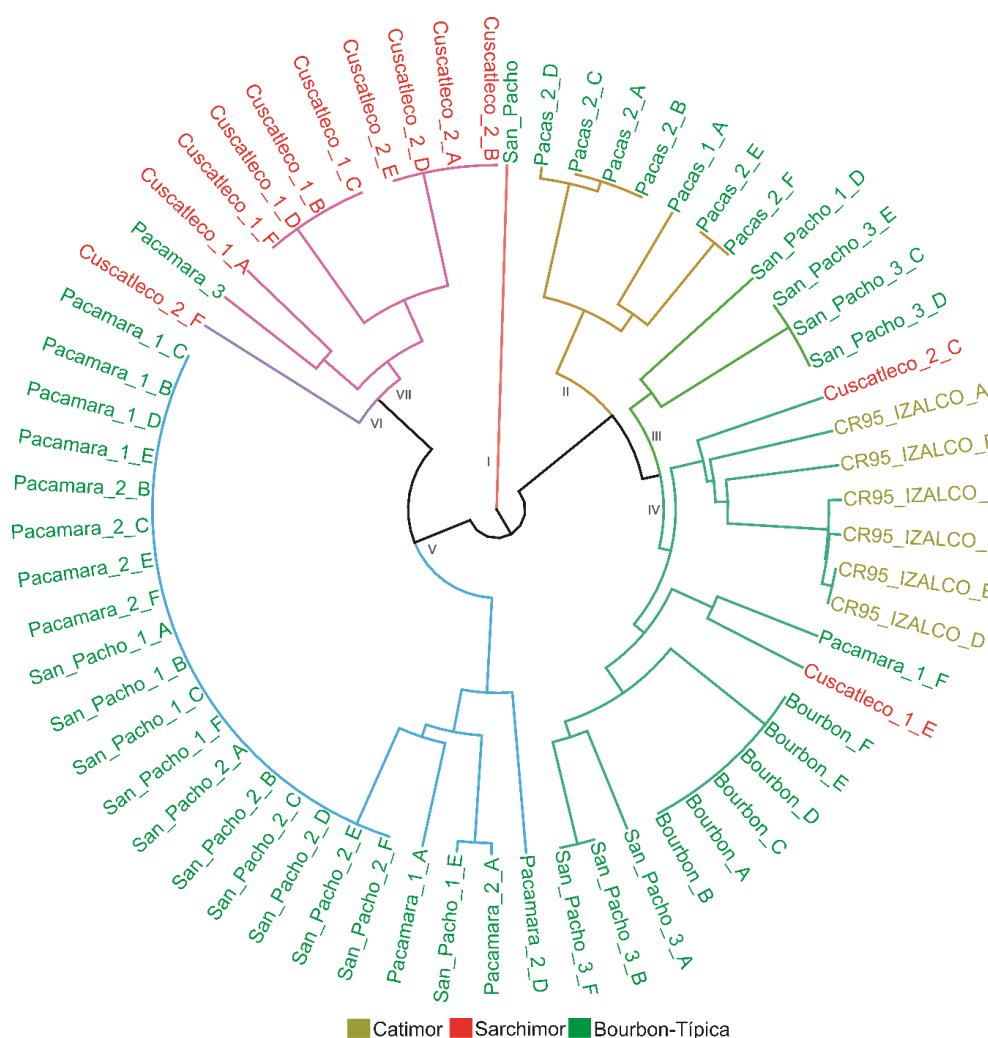
Nas análises de agrupamento das cultivares de Honduras observou-se cinco grupos (Figura 5), utilizando um coeficiente cofenético de 93,94%. Os grupos I, II e III foram formados por diferentes indivíduos de Pacamara, evidenciando segregação dessa cultivar. Esse material, além de apresentar indivíduos diferentes, consiste na cultivar mais distante geneticamente das demais plantadas nesse país. O grupo IV ficou com quatro genótipos Centroamericano F<sub>2</sub>, um genótipo Centroamericano F<sub>3</sub> e os materiais Parainema, que procedem do Sarchimor T5296. O grupo V é o mais amplo, onde se encontram genótipos de IHCAFE 90, Catimor T5175, Lempira, Centroamericano F<sub>3</sub> e F<sub>2</sub> e Geisha. Os resultados mostraram que a cultivar Geisha e a Catimor T5175 não apresentam segregação, pois os diferentes indivíduos da cultivar não foram diferenciados pelos marcadores. Os dados sugerem também que existem dois materiais distintos que são considerados Lempira, o Lempira 2, que não apresenta segregação e o Lempira 1, que apresentou segregação, mas ficou em um subgrupo separado no grupo V. O indivíduo IHCAFE 90E ficou agrupado com o Lempira 1, sugerindo que esse genótipo foi identificado ou denominado erroneamente, podendo ser o Lempira e não IHCAFE.



**Figura 5.** Diversidade genética apresentada nos genótipos de Honduras, utilizando 16 marcadores SSR, obtido pela técnica UPGMA com base na matriz de dissimilaridade do complemento aritmético do índice ponderado.

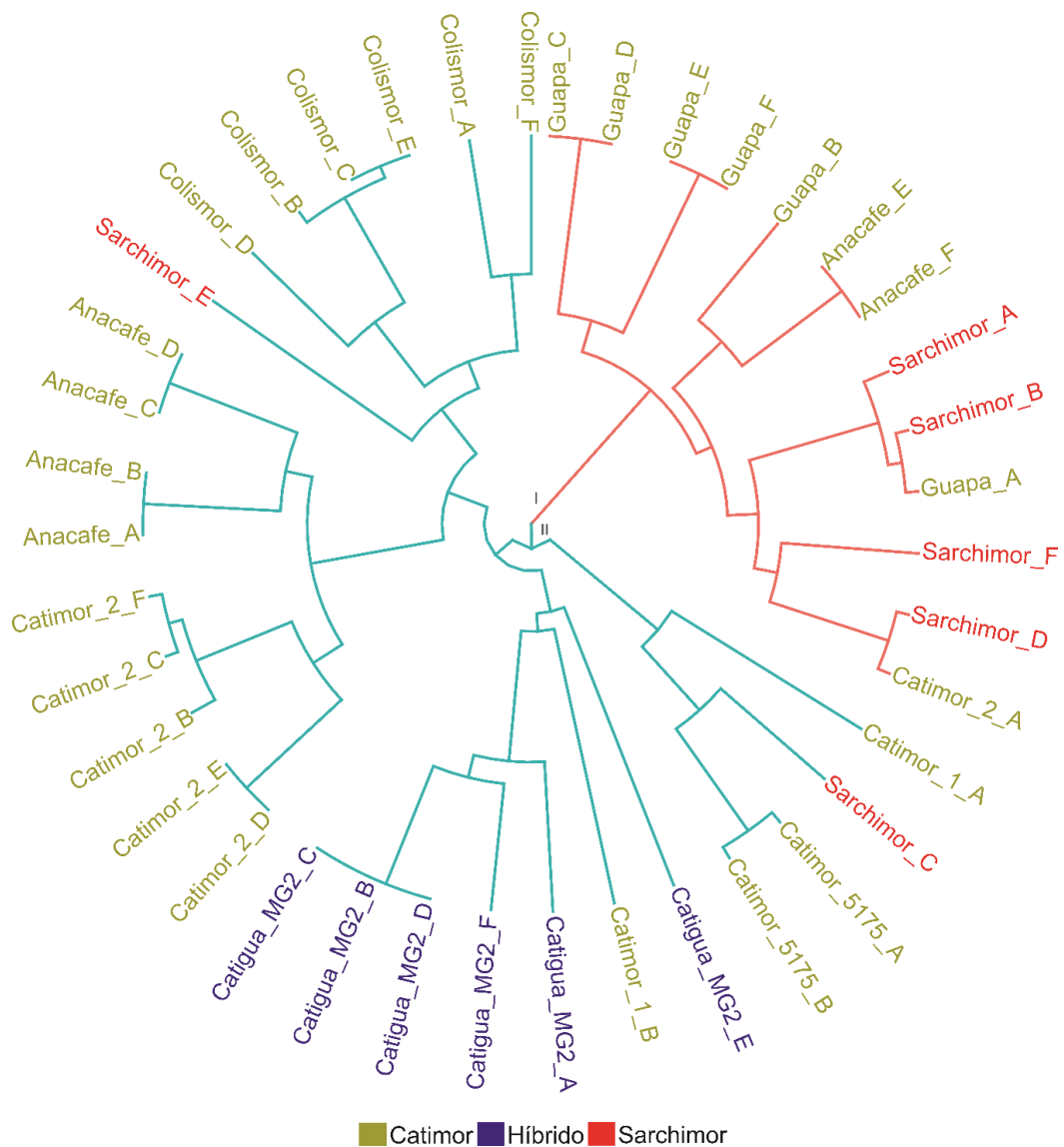
Na Figura 6 observa-se o agrupamento das cultivares de El Salvador. As análises de agrupamento mostram sete grupos, considerando coeficiente cofenético de 96,08%. O grupo I ficou constituído apenas com o único indivíduo analisado da cultivar San Pacho, indicando que esse é o material mais divergente plantado no país. Esse material é derivado do cruzamento natural de Caturra x San Bernardo, ambos são genótipos de grupo de Bourbon-Típica, suscetíveis a uma ampla gama de patógenos, mas com potencial para qualidade de bebida. No grupo II ficaram todos os indivíduos da cultivar Pacas, mostrando similaridade entre eles e no grupo III ficaram

alguns indivíduos San Pacho 3 e San Pacho 1. Os indivíduos dessa cultivar ficaram alocados em dois grupos distintos, III e IV. A cultivar Cuscatleco (1 e 2) apresentou grande segregação, de forma que os indivíduos ficaram em 3 grupos (IV, VI e VII) e dentro do grupo ficaram em subgrupos distintos. CR-95 Izalco, apesar de apresentar distinção entre os indivíduos, ficaram em um subgrupo do grupo IV, evidenciando similaridade genética existente entre os indivíduos da cultivar. Bourbon plantado em El Salvador não apresentaram segregação. Não discriminação também foi observada entre a maioria dos indivíduos das cultivares Pacamara 1, Pacamara 2, San Pacho 1, San Pacho 2 (grupo V), demonstrando grande similaridade genética dentro e entre essas cultivares.



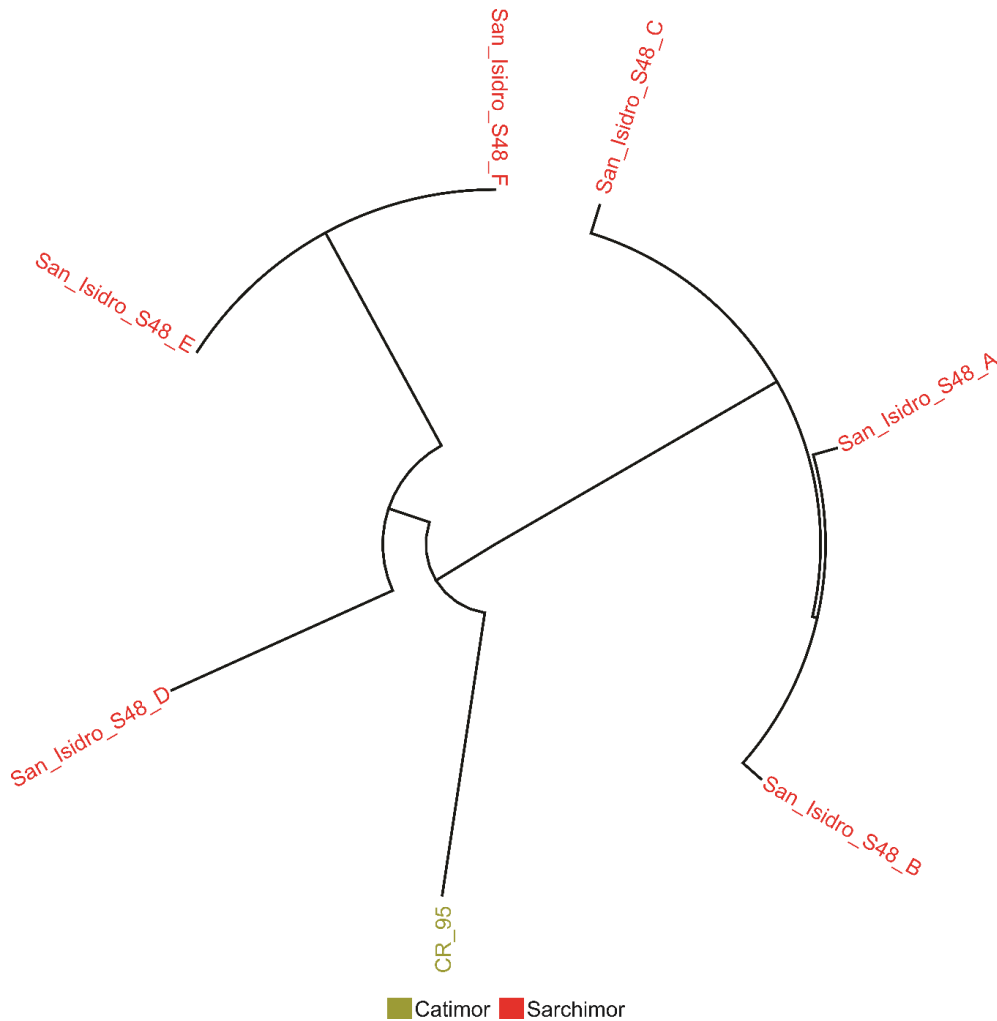
**Figura 6.** Diversidade genética apresentada nos genótipos do El Salvador, utilizando 16 marcadores SSR, obtido pela técnica UPGMA com base na matriz de dissimilaridade do complemento aritmético do índice ponderado.

No agrupamento das cultivares da Guatemala, verificou-se a formação de dois grandes grupos com um coeficiente cogenético de 88,57% (Figura 7). O resultado obtido sugere grande segregação das cultivares usadas no país ou mistura de material plantado. O grupo I ficou composto pelos materiais Guapa A, B, C, D, E e F; Sarchimor A, B, F, D e Catimor. O grupo II ficou composto por Catimor 5175, Catiguá MG2, Anacafé e Colismor. Maior similaridade genética foi observada para os indivíduos da cultivar Catiguá MG2, em que alguns indivíduos não foram discriminados e outros ficaram em um mesmo subgrupo.



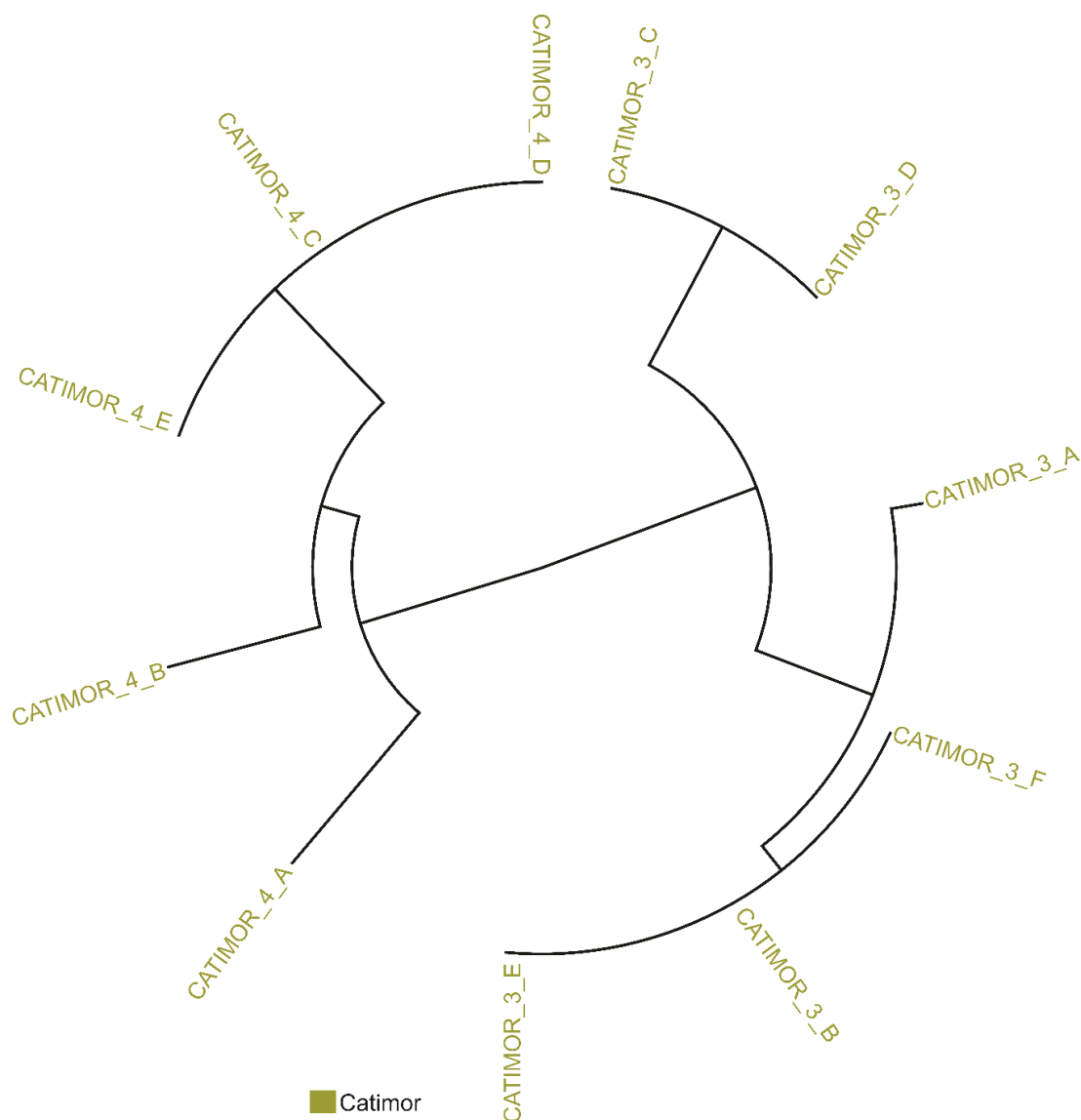
**Figura 7.** Diversidade genética presente nos genótipos do Guatemala, utilizando 16 marcadores SSR, obtido pela técnica UPGMA com base na matriz de dissimilaridade do complemento aritmético do índice ponderado.

A Figura 8 mostra a análises de agrupamento das cultivares da Costa Rica. Apesar da separação dos indivíduos analisados, não foi possível agrupar com base no coeficiente cofenético de 92,39%. Esse resultado sugere similaridade genética das cultivares e segregação (discriminação) de indivíduos dentro de uma mesma cultivar. A cultivar San Isidro S48 originou-se da seleção de cafeeiro Sarchimor T5296, com avanço de geração até F<sub>6</sub> e consiste em material genético promissor para resistência a nematoides. Apesar de lançamento da cultivar em geração mais avançada, a segregação dentro da cultivar foi observada pelos marcadores moleculares. Costa Rica 95 é considerado Catimor do cruzamento de caturra CIFC 19/1 x Híbrido de Timor CIFC832/2 que apresenta resistência a ferrugem.



**Figura 8.** Diversidade genética nos genótipos de Costa Rica, utilizando 16 marcadores SSR, obtido pela técnica UPGMA com base na matriz de dissimilaridade do complemento aritmético do índice ponderado.

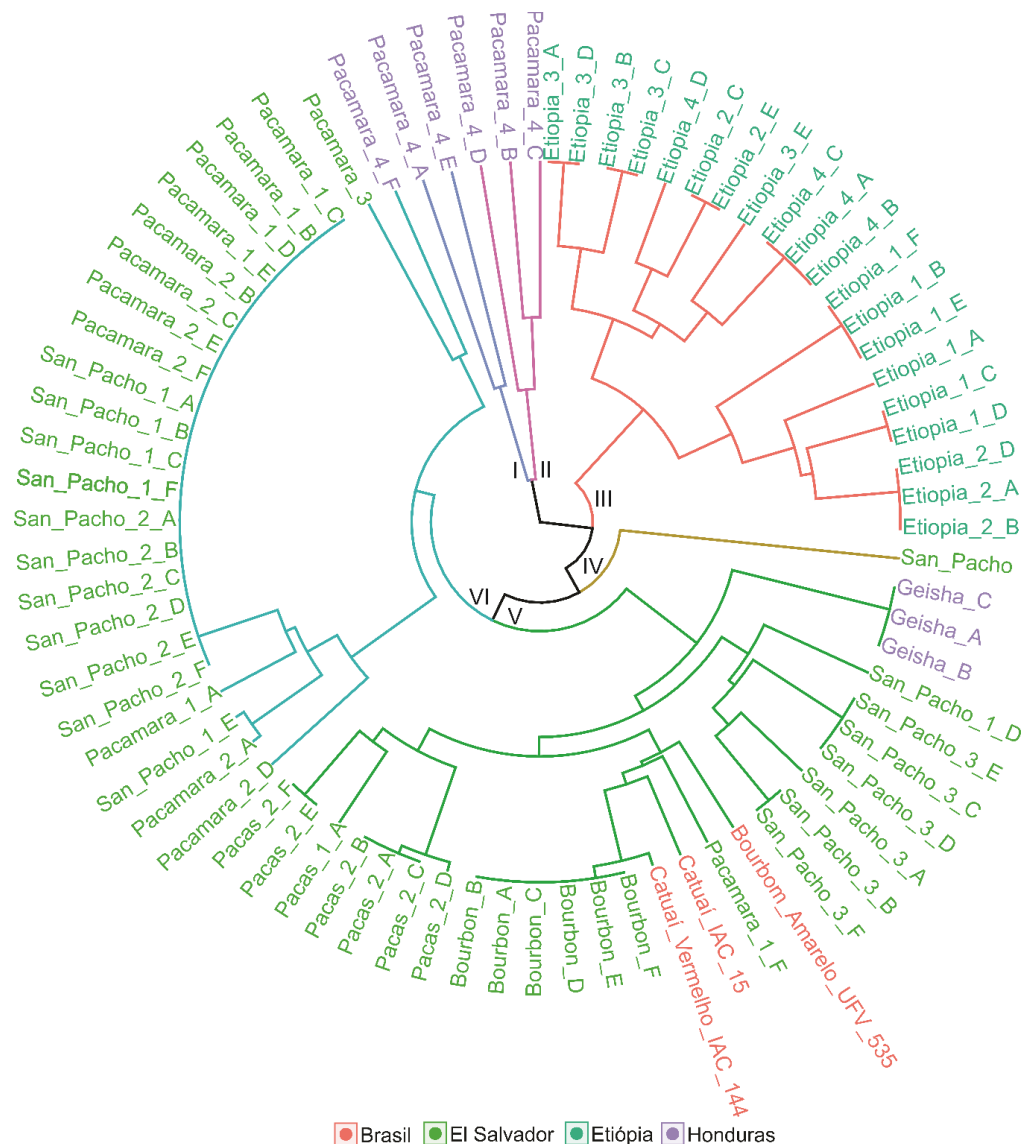
A não formação de grupos também foi observada para as duas cultivares da República Dominicana, apresentando um coeficiente cofenético de 98,97% (Figura 9). As duas cultivares analisadas são Catimor e apresentam segregação dentro da cultivar.



**Figura 9.** Diversidade genético dos genótipos de República Dominicana, utilizando 16 marcadores SSR, obtido pela técnica UPGMA com base na matriz de dissimilaridade do complemento aritmético do índice ponderado.

A outra análise de diversidade foi realizada com base no grupo ao qual a cultivar pertence. Com base na Tabela 1, observa-se que as cultivares da América Central e as cultivares brasileiras e da Etiópia pertencem aos grupos Catimor, Sarchimor, Bourbon-Típica ou Híbrido de Timor.

O estudo dos materiais genéticos pertencentes ao grupo Bourbon-Típica está apresentado na Figura 10. Esses cafeeiros têm potencial para qualidade de bebida e outras características agronômicas de interesse. No entanto, são suscetíveis às principais pragas e doenças. Foram obtidos seis grupos, considerando o coeficiente cofenético de 93,50%. Maior diversidade genética foi observada para a cultivar Pacamara de Honduras, que ficou separada de todos os demais grupos e a segregação dentro da cultivar resultou na presença de indivíduos formando dois grupos (I e II). O Grupo III também ficou separado dos demais e ficou constituído pelos genótipos de Etiópia. O grupo IV ficou composto apenas pelo San Pacho oriundo do cruzamento de Caturra x San Bernardo. No Grupo V foram alocados os indivíduos de Geisha que tem origem de Etiópia e chegou no banco de Germoplasma na Costa Rica e, posteriormente, foi levado a Honduras. Nesse grupo ficaram também os genótipos San Pacho, Bourbon e Pacas, além das cultivares brasileiras Bourbon Amarelo UFV 535, Catuaí IAC 15, Catuaí Vermelho IAC 144. O Grupo VI ficou com os genótipos San Pacho e Pacamara. Em geral observou-se similaridade genética entre os genótipos de América Central e do Brasil, o que pode ser explicado pelo fato de que muitos desses genótipos foram levados de Brasil para os diferentes países, para ser utilizados em programas de melhoramento ou ser utilizado como cultivares comerciais, em função da boa adaptabilidade e aceitação dos cafeicultores.

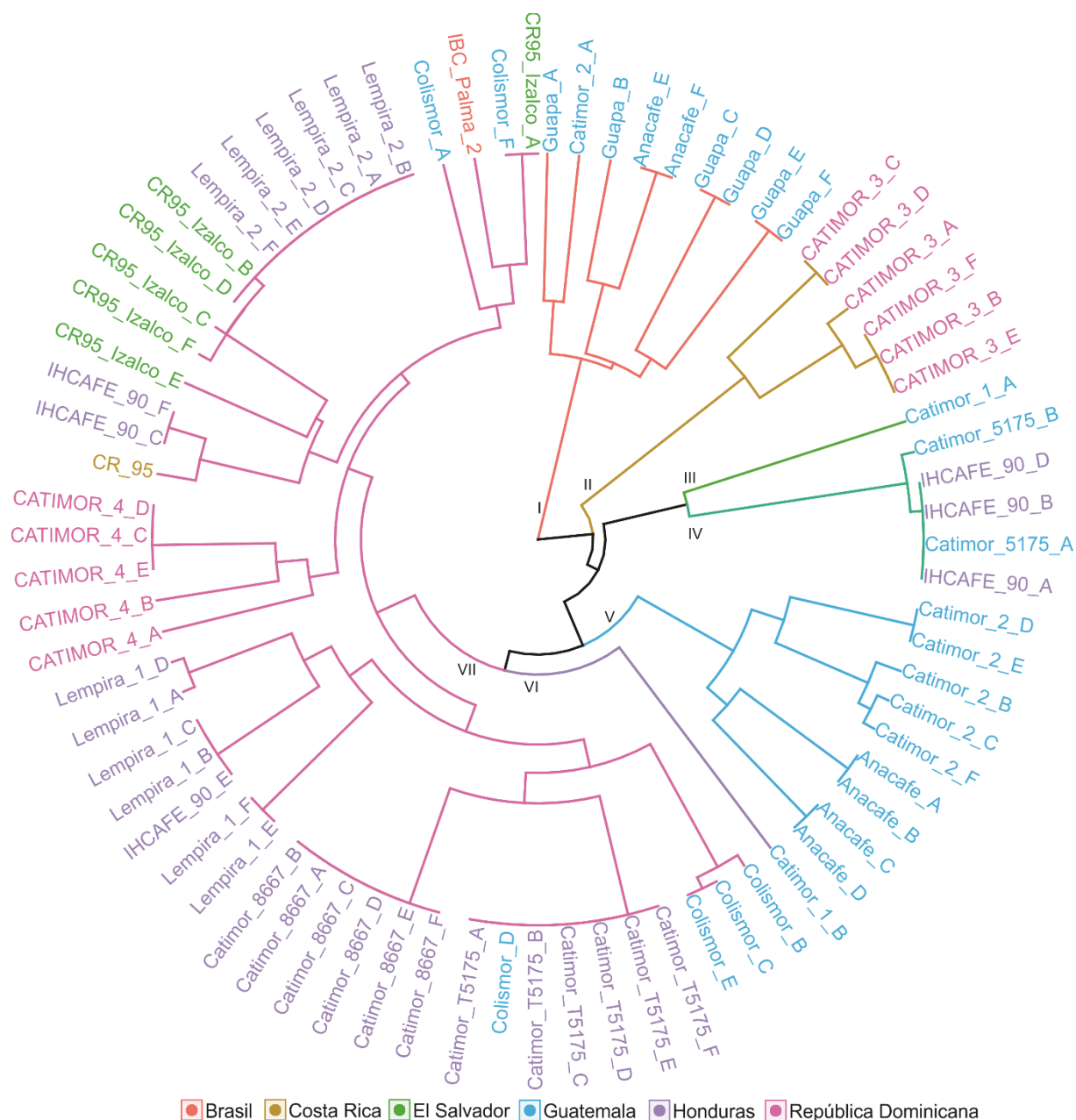


**Figura 10.** Análises de Diversidade do grupo genético Bourbon-Típica dos países de Brasil, El Salvador, Etiópia e Honduras, utilizando 16 marcadores SSR, obtido pela técnica UPGMA com base na matriz de dissimilaridade do complemento aritmético do índice ponderado.

As análises de agrupamento dos cafeeiros do grupo Catimor estão na Figura 11, sendo obtidos sete grupos com um coeficiente cofenético de 92,43%. Observou-se que os cafeeiros Catimor apresentam, em geral, maior diversidade genética quando comparado como os Bourbon-Típicos. O Grupo I ficou separado dos demais, indicando que são compostos pelos indivíduos mais divergentes. O Grupo IV ficou com Catimor 5175 A, B e IHCAFE 90 A, B, D. Essas duas cultivares são genótipos considerados similares, por serem originadas do mesmo cruzamento, e diferiram na



seleção feita nos diferentes países. O Grupo V (Catimor 2 B, C, D, E, F, Anacafé A, B, C, D) também são aparentados por serem originados de mesmo cafeeiro que foram selecionados nos diferentes países. Maior número de genótipos ficou alocado no O Grupo VII, sendo eles Lempira, Catimor T5175, Catimor 8667, IHCAFE 90 (Honduras), Colismor (Guatemala), Catimor 4 (República Dominicana) e CR95 Izalco (El Salvador). Os genótipos Lempira e CR 95 são provenientes de seleção e avanço de gerações do mesmo cruzamento entre Caturra x Híbrido de Timor CIFIC832/1. Catimor, IHCAFE 90, Colismor e Catimor 4 são derivados de um mesmo cafeeiro, o Catimor T5175, por isso são geneticamente mais similares e formam um grande subgrupo.



**Figura 11.** Análises da diversidade genética do grupo Catimor dos países Brasil, Costa Rica, El Salvador, Etiópia, Guatemala, Honduras e República Dominicana, utilizando 16 marcadores SSR, obtido pela técnica UPGMA com base na matriz de dissimilaridade do complemento aritmético do índice ponderado.

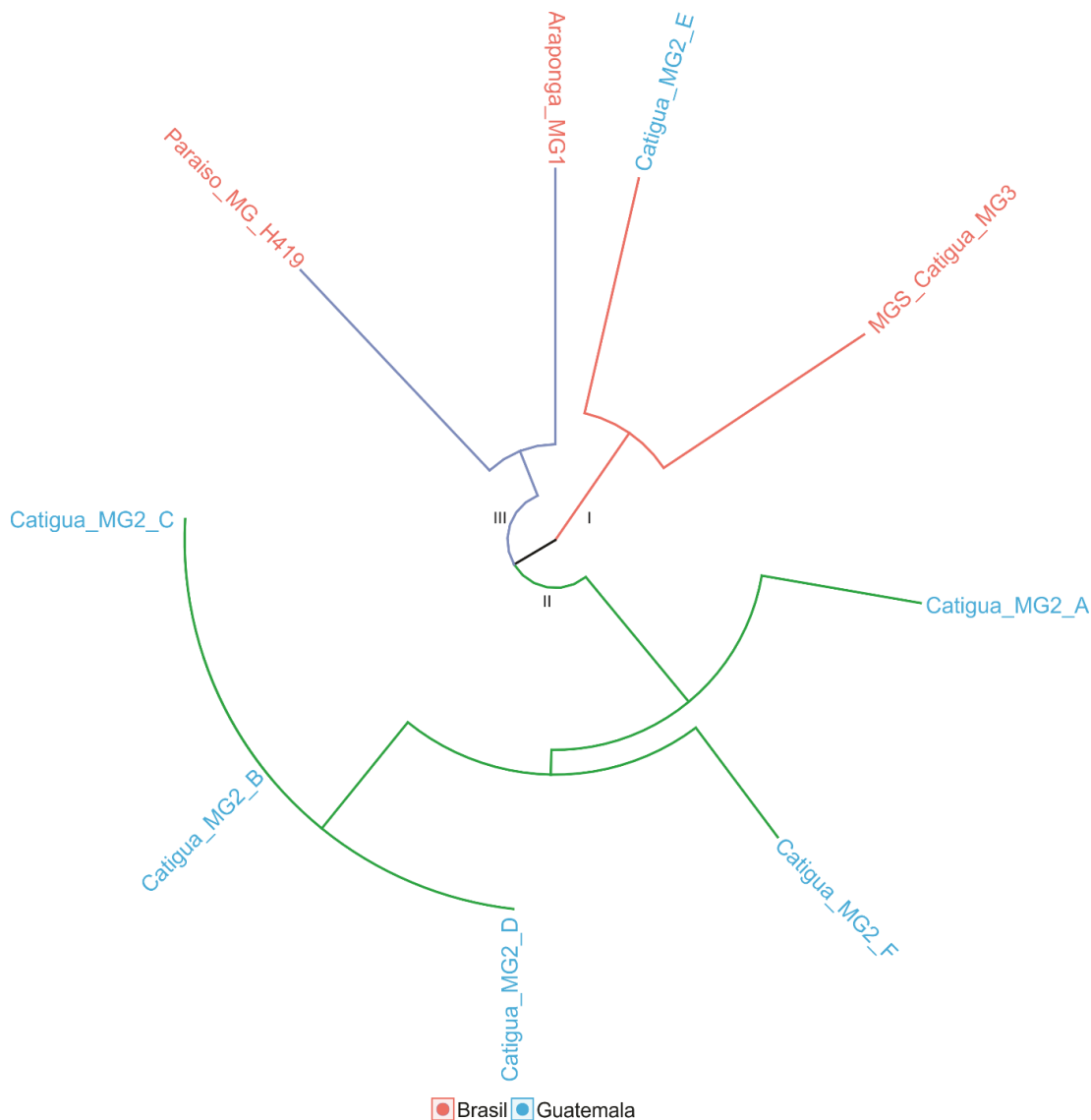
A análises de agrupamento na Figura 12 mostra os genótipos Sarchimor, que formam quatro grupos com um coeficiente cofenético de 95,68%. Sarchimor são cafeeiros originados do cruzamento do Híbrido de Timor CIFC 832/2 com Villa Sarchí. Derivados desse cruzamento foram levados para diferentes países da América do Sul e tem sido usado como importante fonte para obtenção de cultivares com resistência

à ferrugem, nematoides e outras doenças de importância no cultivo do café. O Grupo I ficou formado por Sarchimor C (Guatemala); Grupo II pelas cultivares brasileiras Tupí IAC 1669/33 e Tupí Amarelo IAC 5162, bem como Cuscatleco 1 E e Cuscatleco 2 C (El Salvador), San Isidro S48 A, B, C, D, E, F (Costa Rica), Sarchimor E (Guatemala) e Centroamericano F<sub>3</sub> A, C, D, E e F, Centroamericano F<sub>2</sub> B e C (Honduras) o grupo III ficou apenas formado pela cultivar brasileira Acauã, mostrando que as cultivares atualmente plantadas na América Central são mais distintas dessa brasileira. O Grupo IV ficou com Cuscatleco 2A, B, D, E, F e Cuscatleco 1 A, B, C, D, F (El Salvador), Parainema, Parainema Apical e Centroamericano F<sub>2</sub> A, B, D, E e F (Honduras) e Sarchimor A, B e D, F (Guatemala).



**Figura 12.** Análises da diversidade genética do Grupo Sarchimor, utilizando 16 marcadores SSR, obtido pela técnica UPGMA com base na matriz de dissimilaridade do complemento aritmético do índice ponderado.

A Figura 13 consiste na análise das cultivares derivadas de outros Catuaí x Híbridos de Timor.



**Figura 13.** Análises da diversidade do grupo genético Catuaí x Híbrido de Timor, utilizando 16 marcadores SSR, obtido pela técnica UPGMA com base na matriz de dissimilaridade do complemento aritmético do índice ponderado.

Com base na caracterização molecular realizada, foi obtido o perfil molecular (*fingerprinting*) de cada cultivar da América Central analisada no presente estudo. Quando se observou segregação dos indivíduos dentro de uma cultivar, o *fingerprinting* foi obtido a partir do *bulk* dos indivíduos (Tabela 4) e o *fingerprinting* considerando todos os alelos dos diferentes indivíduos da cultivar (Tabela 5). Na Tabela 4 pode-se verificar um padrão molecular único para as cultivares Guapa e Cuscatleco, IHCAFE90 e Catimor 5175, CR95 e Lempira 2, San Pacho 1, 2 e Pacamara 1, 2, Bourbon e Catimor T5175, que no dendograma (Figura 1) não foram discriminados.

A segunda análises de *fingerprinting* foi verificada a partir dos dados individuais de cada cafeeiro, considerando a segregação dentro de cada cultivar (Tabela 5). O *fingerprinting* constitui-se em uma ferramenta auxiliar aos descritores recomendados para a espécie, sendo extremamente útil nos testes de distinguibilidade, homogeneidade e estabilidade, exigidos no processo de registro e proteção de determinada cultivar (Sousa et al., 2017).

A Tabela 6 mostra a distância genética obtida entre as diferentes cultivares, mostrando as cultivares que apresentam maior e menor dissimilaridade baseado na distância genética.

**Tabela 4.** Perfil molecular de 36 cultivares plantadas na América Central, obtidos do *bulk* dos dados dos indivíduos de cada cultivar de *Coffea arabica*.

País	Nome	CaEST														SSR		
		001	002	022	024	028	029	030	031	034	045	048	058	071	072	016	095	
Costa Rica	CR 95	2	3	1	12	2	12	13	13	2	2	1	13	12	2	2	13	
	San Isidro S48	12	3	1	12	2	2	13	1	2	2	1	13	1	2	2	1	
El Salvador	Bourbon	2	3	2	12	2	2	13	1	2	2	1	13	1	2	12	1	
	CR-95 Izalco	2	3	2	12	2	1	13	1	2	2	1	13	1	2	2	1	
	Cuscatleco 1	1	3	2	12	2	2	13	3	2	2	1	23	2	2	2	1	
	Cuscatleco 2	1	3	2	12	2	1	13	3	2	2	1	23	2	2	2	1	
	Pacamara 1	1	2	2	12	2	1	13	3	12	2	1	13	1	2	12	1	
	Pacamara 2	1	2	2	12	2	1	13	3	12	2	1	13	1	2	12	1	
	Pacamara 3	2	2	2	12	2	2	13	3	2	2	1	23	2	2	2	1	
	Pacas 1	2	3	12	12	2	12	13	1	2	2	1	13	1	2	12	1	
	Pacas 2	2	3	1	12	2	2	13	1	2	1	1	13	1	2	1	1	
	San Pacho	2	3	1	12	2	2	3	3	2	2	1	13	12	2	2	1	
	San Pacho 1	1	2	2	12	2	1	13	3	12	2	1	13	1	2	12	1	
	San Pacho 2	1	2	2	12	2	1	13	3	12	2	1	13	1	2	12	1	
	San Pacho 3	2	3	2	12	2	12	13	13	12	2	1	13	1	2	12	1	
	Guatemala	Anacafé	1	3	2	12	2	2	13	1	2	2	1	23	2	2	2	1
		Catimor 5175	2	3	1	12	2	1	3	1	2	2	1	13	1	2	2	1
Colismor		2	2	2	12	2	2	13	1	2	2	1	13	1	2	12	1	
Sarchimor		1	3	1	12	2	1	13	3	2	2	1	23	2	2	2	1	
Catiguá MG2		2	3	12	12	2	2	13	1	12	2	2	13	1	1	2	1	
Catimor 1		1	3	1	12	2	2	3	1	2	2	1	13	1	2	2	2	
Catimor 2		1	3	1	12	2	1	13	1	2	2	1	23	2	2	2	1	
Guapa		1	3	2	12	2	1	13	3	2	2	1	23	2	2	2	1	

Tabela 4. Continuação.

País	Nome	CaEST														SSR	
		001	002	022	024	028	029	030	031	034	045	048	058	071	072	016	095
Honduras	Catimor 8667	2	3	2	12	2	2	13	1	2	2	1	13	1	2	2	1
	Catimor T5175	2	3	2	12	2	2	13	1	2	2	1	13	1	2	12	1
	Centroamericano F2	12	3	2	12	2	2	13	3	2	2	1	13	12	2	2	1
	Centroamericano F3	1	3	12	12	2	2	13	1	2	2	1	23	12	2	1	1
	IHCAFE 90	2	3	1	12	2	1	3	1	2	2	1	13	1	2	2	1
	Lempira 1	2	3	1	12	2	2	13	1	2	2	1	13	1	2	2	1
	Lempira 2	2	3	2	12	2	1	13	1	2	2	1	13	1	2	2	1
	Pacamara 4	2	4	2	1	12	23	13	3	12	12	2	2	2	12	12	2
	Parainema	1	3	1	12	2	2	13	3	2	2	1	23	2	1	2	1
	Parainema Apical	1	3	1	12	2	2	13	3	2	2	1	23	12	2	2	1
Geisha	2	2	1	12	2	2	12	1	2	2	1	13	1	12	1	1	
República Dominicana	Catimor 3	2	1	2	12	2	2	13	1	2	2	1	13	2	2	2	1
	Catimor 4	2	3	2	12	2	1	13	1	2	2	1	13	2	2	2	1

Identificação da presença de alelos em cada um dos marcadores moleculares utilizados 1 = A<sup>1</sup>A<sup>1</sup>, 2 = A<sup>2</sup>A<sup>2</sup>, 3 = A<sup>3</sup>A<sup>3</sup>, 12 = A<sup>1</sup>A<sup>2</sup>, 13 = A<sup>1</sup>A<sup>3</sup>, 23 = A<sup>2</sup>A<sup>3</sup>, 4 = A<sup>4</sup>A<sup>4</sup>.



**Tabela 5.** Perfil molecular obtido das 36 cultivares plantadas na América Central considerando os dados individual dos cafeeiros de *C. arabica*.

País	Nome	Marcador Molecular															
		001	002	022	024	028	029	030	031	034	045	048	058	071	072	016	095
Costa Rica	CR-95	22	33	11	12	22	12	13	13	22	22	11	13	12	22	22	13
	San Isidro S48	1	3	1	12	2	2	13	1	2	1	1	13	1	2	2	1
		12									12						
El Salvador	Bourbon	2	3	2	12	2	2	13	1	2	2	1	13	1	2	12	1
	CR-95 Izalco	2	2	2	12	2	1	13	1	2	2	1	13	1	2	2	1
		3					12										12
	Cuscatleco 1	1	3	2	12	2	2	13	13	2	2	1	13	1	2	2	1
		2							3				23	2			
	Cuscatleco 2	1	3	2	12	2	1	13	1	2	2	1	13	12	2	12	1
									3				23	2		2	
	Pacamara 1	1	2	2	12	2	1	13	1	12	12	1	13	1	2	12	1
			3				2		3	2	2						
	Pacamara 2	1	2	2	12	2	1	13	1	12	12	1	13	1	2	12	1
			3				2		3	2	2						
	Pacamara 3	2	2	2	12	2	2	13	3	2	2	1	23	2	2	2	1
	Pacas 1	22	33	12	12	22	12	13	11	22	22	11	13	11	22	12	11
		2	3	1	12	2	2	13	1	2	1	1	13	13	2	1	1
	Pacas 2										12						
										2							
San Pacho	22	33	11	12	22	22	33	33	22	22	11	13	12	22	22	11	
San Pacho 1	1	2	2	12	2	1	13	1	12	2	1	13	1	2	12	1	
	2	23						3									
San Pacho 2	1	2	2	12	2	1	13	3	12	2	1	13	1	2	12	1	

**Tabela 5.** Continuação

País	Nome	Marcador Molecular															
		001	002	022	024	028	029	030	031	034	045	048	058	071	072	016	095
El Salvador	San Pacho 3	12	3	2	12	2	12	13	13	12	2	1	13	1	2	12	1
		2								2							
Guatemala	Anacafé	1	3	2	12	2	1	13	1	2	2	1	23	2	2	2	1
							2		3								
	Catimor 5175	2	3	1	12	2	1	3	1	2	2	1	13	1	2	2	1
														12			
	Colismor	1	2	2	12	2	12	13	1	2	2	1	13	1	2	12	1
		2	23				2									2	
			3														
	Sarchimor	1	3	1	12	2	1	12	1	2	2	1	13	1	2	12	1
		2					2	3	3				23	2		2	13
	Catiguá MG2	1	3	1	12	2	2	13	1	12	2	2	13	1	1	2	1
2			12						13	2							
									3								
Catimor 1	1	3	1	12	12	1	13	1	12	2	1	13	1	2	2	1	
	2				2	2	3		2							2	
Catimor 2	1	3	1	12	2	1	13	1	2	2	1	23	2	2	2	1	
	23					12		13									
						2		3									
Guapa	1	3	12	12	2	1	13	3	12	12	1	23	2	2	2	1	
			2			2			2	2							

Tabela 5. Continuação.

País	Nome	Marcador Molecular															
		001	002	022	024	028	029	030	031	034	045	048	058	071	072	016	095
Honduras	Catimor 8667	2	3	2	12	2	2	13	11	2	2	1	13	1	2	2	1
	Catimor T5175	2	3	2	12	2	2	13	1	2	2	1	13	1	2	12	1
	Centroamericano F <sub>2</sub>	1	3	2	12	2	2	13	13	2	1	1	13	1	1	12	1
		12							3		2			12	2	2	
	Centroamericano F <sub>3</sub>	1	3	12	12	2	2	13	1	2	2	1	23	1	2	1	1
									13				3	12			
	IHCAFE 90	2	3	1	12	2	1	13	1	2	2	1	13	1	2	2	1
							2	3									
	Lempira 1	2	3	1	12	2	2	13	1	2	1	1	13	1	2	12	1
	Lempira 2			12							2					2	
		2	3	2	12	2	1	13	1	2	2	1	13	1	2	2	1
	Pacamara 4	1	2	2	1	1	23	1	3	12	12	1	12	2	12	12	2
		12	4		12	12		13		2		2	2		2		
		2	42			2				42							
Parainema	1	3	1	12	2	2	13	3	2	2	1	23	2	1	2	1	
Parainema Apical	11	33	11	12	22	22	13	33	22	22	11	23	12	22	22	11	
Geisha	2	2	1	12	2	2	12	1	2	2	1	13	1	12	1	1	
República Dominicana	Catimor 3	2	1	2	12	2	12	1	1	2	2	1	13	2	2	2	1
							2	13									
	Catimor 4	12	3	2	12	2	1	13	1	2	2	1	13	2	2	2	1
	13			2		12											12
	2																



#### 4. Discussão

Os alelos identificados pelos 16 SSR utilizados variaram de 2 a 7, com uma média de 3,8 alelos por loco, indicando diversidade entre os genótipos analisados. Dados similares (3,17 alelo\loco) foram reportados por Silva et al. (2018) em acessos de germoplasma de cafeeiros do grupo Híbrido de Timor. Medeiros et al. (2021), em um estudo de cultivares e acessos elite do programa de melhoramento brasileiro de *C. arabica*, reportou 2,3 alelos por loco e Sousa et al. (2017) encontraram 2,35 alelos por loco na discriminação de cultivares brasileiras, isso evidencia a estreita relação genética que existe entre os materiais de café, tanto nos grupos genéticos como nos países onde é cultivado na América.

No presente trabalho foi possível conhecer a diversidade genética das cultivares atualmente plantadas na América Central, por meio da utilização dos 16 SSR. Essas cultivares, em geral, são plantadas pelos cafeicultores por serem resistentes a ferrugem. Algumas delas já tiveram a resistência suplantada e outras, apesar de suscetíveis a ferrugem, são utilizadas devido ao potencial para qualidade de bebida. Cultivares brasileiras e acessos da Etiópia foram incluídos na análise para auxiliar no entendimento da diversidade genética. Observou-se que os genótipos procedentes da Etiópia ficaram em um mesmo grupo (Figura 1, grupo II), diferindo dos demais genótipos. Esse resultado indica que as cultivares da América Central e do Brasil são geneticamente distintas dos acessos da Etiópia. Pesquisa realizada com 42 variedades comerciais da Etiópia, utilizando 14 marcadores SSR, mostrou elevado número de alelos polimórficos por loco (7,5) (Benti et al., 2020). Essa alta diversidade genética das variedades da Etiópia foram confirmadas no presente trabalho, sendo ainda demonstrado que as cultivares das Américas são distintas dos acessos da Etiópia avaliados. Os resultados obtidos sugerem que cafeeiros da Etiópia podem ser considerados em programas de melhoramento, para aumento da diversidade genética e na procura de características agronômicas complementares de interesse.

No grupo II (Figura 1), além dos acessos da Etiópia, ficou alocado a Cultivar Catimor\_3 da República Dominicana. A separação desse genótipo das demais cultivares derivadas de Catimor e sua grande similaridade com acessos da Etiópia sugerem que esse material genético não seja Catimor, como considerado pelos produtores.

As cultivares de café analisadas (Tabela 1), apesar de terem sido discriminadas com os marcadores moleculares (Figura 1), são derivadas das mesmas fontes de resistência a ferrugem. Dessa forma, elas são progênies originadas de cruzamentos comuns. Com base nessa origem, os cafeeiros têm sido considerados e agrupados geneticamente como: Catimor, Sarchimor, Híbrido de Timor e Bourbon-Típica. Cafeeiros do grupo Catimor são, em geral, derivados do cruzamento de Caturra CIFC 19/1 x Híbrido de Timor CIFC 832/1 (fonte de resistência para ferrugem). Sarchimor são originados do cruzamento Villa Sarchí x Híbrido de Timor CIFC 832/2 (fonte de resistência). O grupo Híbrido de Timor são provenientes de outros Híbridos de Timor que não são CIFC 832/1 e CIFC 832/2. Híbrido de Timor, são híbridos naturais entre *C. arabica* e *C. canephora* encontrados na Ilha de Timor em 1917, apresentam genes de resistência a diferentes pragas e doenças de importância no café. Sua chegada na América data de 1976, no Brasil, enviado pelo CIFC e posteriormente incorporado nos programas de melhoramento da América Latina, e utilizados até hoje, por ser fonte de resistência a pragas e doenças. Nos programas de melhoramento é utilizado como doador para o gene de resistência. Utilizar os Híbridos de Timor tem potencial alto na incorporação de variabilidade do café, considerando a base genética estrita do *C. arabica*, e que a permitido ter diferentes cultivares de *C. arabica* lançadas nos diferentes países (T. A. Setotaw et al., 2010, 2020).

A identificação e caracterização dos Híbridos de Timor foi feita pelo CIFC em Portugal, onde realizaram a seleção e a Híbridação dos Híbridos de Timor (CIFC 832/1 e 832/2), principais fontes de genes para resistência à ferrugem do café, quando cruzados com cultivares suscetíveis com alta aceitação no comércio, como Caturra e Vila Sarchí. Posteriormente foram distribuídas para os países produtores de café, como resposta ao problema do ataque do patógeno (*Hemileia vastatrix*), que causava prejuízos econômicos na cafeicultura mundial. Essa seleção de indivíduos promissórios com resistência a doenças e pragas é utilizada até hoje na procura de cultivares que portem genes de resistência a fatores bióticos e abióticos (Talhinhas et al., 2017; Zambolim & Caixeta, 2021)

Para o grupo V (Figura 1) ficou formado somente pelo genótipo San Pacho, ficando separado de San Pacho\_1 e San Pacho\_2 (grupo VI). Em El Salvador, a cultivar San Pacho foi coletada em três fazendas diferentes e os dados moleculares sugerem que San Pacho\_1 e San Pacho\_2 são a mesma cultivar, mas a terceira pode

ser uma cultivar diferente que recebeu a denominação errada ou é resultante de hibridação natural ou mistura de sementes ou plantas. Ressalta-se que segregação dentro da cultivar e seleção inconsciente, realizada em diferentes regiões de El Salvador não podem ser descartadas, uma vez que se observou segregação, mesmo de poucas plantas, dentro dessa cultivar (Figura 6). Esse resultado evidencia que entre fazendas pode ocorrer mistura de cultivares, hibridações naturais ou identificação errônea, o que dificulta a rastreabilidade do material plantado.

No caso do grupo VI ficaram alocados tanto cultivares resistentes a ferrugem do grupo genético Sarchimor quanto algumas cultivares suscetíveis como San Pacho e Pacamara. A cultivar brasileira Acauã (Sarchimor) ficou nesse grupo. Com relação a cultivar Guapa, também presente nesse grupo, nada se conhece sobre seus progenitores. Trata-se de um cultivar selecionada por um produtor particular na Guatemala que vem sendo cultivada por mais de dez anos e que apresenta resistência a ferrugem. Pelo fato de a propriedade ter muitos cafeeiros do grupo genético Sarchimor introduzido nos anos 80's e 90's, acredita-se que houve um cruzamento natural com esses cafeeiros, introgrido os genes de resistência do CIFC 832/2<sup>1</sup>. A análise genotípica da cultivar Guapa revelou a possibilidade de considerá-la dentro do grupo genético Sarchimor (Figura 1), pelo fato de ter agrupado com o genótipo Cuscatleco 2. Incorporar o genótipo Guapa aos programas de melhoramento poderia ser de grande utilidade, na procura de genes que podem conferem resistência a pragas e doenças.

Por meio das análises de *fingerprint* (Tabela 4), de agrupamento em *bulk* (Figura 1) e análises das distâncias genéticas (Tabela 6) não foi possível distinguir os genótipos San Pacho 1, San Pacho 2, Pacamara 1 e Pacamara 2, sugerindo que esses quatro genótipos correspondem a uma mesma cultivar ou são cultivares geneticamente muito aparentadas. Todas elas são suscetíveis a ferrugem e pertencem ao grupo genético Bourbon-Típica.

CR 95 Izalco e Lempira 2 também apresentaram alta similaridade (Figura 1). Essas duas cultivares são derivadas de um mesmo cafeeiro resistente a ferrugem, Catimor T-8667, tendo as progênies selecionada na Costa Rica e Honduras, respectivamente. Catimor 5175 não foi discriminado de IHCAFE 90, o que pode ser explicado pelo desenvolvimento da cultivar. IHCAFE 90 foi obtido pela seleção

---

<sup>1</sup> Francisco Anzueto, Comunicação por e-mail, 2020.

realizada pelo Instituto Hondurenho do Café a partir da descendência Catimor 5175 (Anacafé, 2021; Anzueto, 2019).

Os genótipos que apresentam maior dissimilaridade foram Etiópia 3 e Catimor 1 (49,518), San Pacho e Etiópia 3 (49,305) e Pacamara 4 e Catimor 3 (48,969). Tais valores de dissimilaridade podem ser explicados pelo fato dos genótipos da Etiópia não terem sido utilizados nos programas de melhoramento das Américas. Essas fontes de variabilidade são importantes e devem ser consideradas em futuros programas que buscam cultivares promissores na cafeicultura. Utilizando 30 marcadores SSR, Rodrigues da Silva et al. (2019) discriminaram 36 genótipos de *Coffea* sp. com uma média de 6,9 alelos por locos, revelando que os genótipos da Etiópia apresentam maior diversidade genética que as variedades comerciais do Brasil. O presente trabalho mostrou que os materiais da Etiópia são distintos não só das cultivares brasileira, mas também das cultivares da América Central.

As cultivares da América Central apresentaram similaridade genética com as cultivares do Brasil, o que pode ser explicado pelo uso de genitores comuns ou aparentados nos programas de melhoramento dos diferentes países. Acessos comuns tem sido mantidos e conservados nos Bancos de Germoplasma estabelecidos na Costa Rica, no Centro Agrônomo Tropical de Pesquisa e Ensino (CATIE) e no Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), no Brasil. O Banco de Germoplasma dos dois países receberam os mesmos genótipos, os quais foram enviados pelo CIFC aos diferentes centros de pesquisa, quando a ferrugem chegou nas Américas e, desde então, as mesmas fontes de resistência têm sido usadas no melhoramento genético (Talhinhas et al., 2017; Zambolim & Caixeta, 2021). Além disso, muitas cultivares desenvolvidas e disponibilizadas pelos programas de melhoramento do Brasil, em especial as cultivares com resistência a ferrugem, foram introduzidos na América Central.

Essa similaridade das cultivares plantadas nos diferentes países das Américas foi confirmado pela falta de estruturação dos cafeeiros quanto ao país de origem (Figura 2 e 5). Estruturação genética também não foi observada quando considerou o grupo genético das cultivares (Catimor, Sarchimor, Híbrido e Bourbon-Típica).

Os dados moleculares dos cafeeiros foram utilizados também para obter o *fingerprinting* das cultivares da América Central. Considerando o *bulk* dos indivíduos de uma cultivar foram identificados 34 perfis moleculares distintos (Tabela 4). Quando



foi considerado o perfil de todos os indivíduos, incluindo a segregação dentro das cultivares (Tabela 5), obtendo-se informações mais detalhadas das cultivares. Também se observou polimorfismo na maioria dos indivíduos analisados, fato importante no momento da seleção de cultivares promissores. Dados similares de polimorfismo individual foi reportado por Medeiros et al., (2021) e Sousa et al., (2017) evidenciando segregação dentro das cultivares de café.

## **5. Conclusões**

1. Diversidade genética é encontrada entre cultivares plantadas na América Central.
2. A discriminação com base em marcadores moleculares permite a obtenção do perfil molecular da maioria das cultivares analisadas.
3. Apesar do cafeeiro arabica ser uma espécie autógama, segregação entre cafeeiros ocorre dentro de algumas cultivares da América Central
4. Considerando os alelos dos diferentes indivíduos (análise em *bulk*) e os marcadores SSR usados não é possível distinguir os genótipos Guapa do Cuscatleco, IHCAFE90 do Catimor 5175, CR95 do Lempira 2, San Pacho 1, 2 do Pacamara 1, 2, Bourbon do Catimor T5175, sugerindo que esses genótipos correspondem a uma mesma cultivar ou são cultivares geneticamente muito aparentadas.
5. Erros de identificação de cultivar, misturas ou hibridações são observadas nas cultivares analisadas, quando realizado estudo de diversidade genética por meio de marcadores moleculares.

## 1. Referências

- Adhikari, S., Saha, S., Biswas, A., Rana, T. S., Bandyopadhyay, T. K., & Ghosh, P. (2017). Application of molecular markers in plant genome analysis: a review. *The Nucleus*, 60(3), 283–297. <https://doi.org/10.1007/s13237-017-0214-7>
- Al-Murish, T. M., Elshafei, A. A., Al-Doss, A. A., & Barakat, M. N. (2013). Genetic diversity of coffee (*Coffea arabica* L.) in Yemen via SRAP, TRAP and SSR markers. *Journal of Food, Agriculture and Environment*, 11(2), 411–416.
- Alkimim, E. R., Caixeta, E. T., Sousa, T. V., Pereira, A. A., de Oliveira, A. C. B., Zambolim, L., & Sakiyama, N. S. (2017). Marker-assisted selection provides arabica coffee with genes from other *Coffea* species targeting on multiple resistance to rust and coffee berry disease. *Molecular Breeding*, 37(1), 6. <https://doi.org/10.1007/s11032-016-0609-1>
- Almeida, D., Caixeta, E. T., Moreira, K. F., de Oliveira, A. C. B., de Freitas, K. N. P., Pereira, A. A., Rosado, R. D. S., Zambolim, L., & Cruz, C. D. (2021). Marker-Assisted Pyramiding of Multiple Disease Resistance Genes in Coffee Genotypes (*Coffea arabica*). *Agronomy*, 11(9), 1763. <https://doi.org/10.3390/agronomy11091763>
- Anacafé. (2016). Guía de Variedades de café. Guatemala. 2, 48. <https://www.anacafe.org/uploads/file/9a4f9434577a433aad6c123d321e25f9/Guí-a-de-variedades-Anacafé.pdf>
- Anacafé. (2021). Guía de Variedades de café y selección de semilla. 4, 71. <https://www.anacafe.org/manuales/guia-de-variedades-de-cafe-guatemala/>
- Anthony, F., Combes, M., Astorga, C., Bertrand, B., Graziosi, G., & Lashermes, P. (2002). The origin of cultivated *Coffea arabica* L. varieties revealed by AFLP and SSR markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 104(5), 894–900. <https://doi.org/10.1007/s00122-001-0798-8>
- Anzueto, F. R. (2019). Variedades de café, estrategias de manejo y riesgos de afectación por roya del café. In E. Bellos Baltazar, L. Soto Pinto, G. Huerta Palacios, & J. Gómez Riuz (Eds.), *Caminar el cafetal: Perspectivas socioambientales del café y su gente*. (Primera, pp. 97–113).
- Benti, T., Gebre, E., Tesfaye, K., Berecha, G., Lashermes, P., Kyallo, M., & Kouadio Yao, N. (2020). Genetic diversity among commercial arabica coffee (*Coffea arabica* L.) varieties in Ethiopia using simple sequence repeat markers. *Journal of Crop Improvement*, 35(2), 1–22. <https://doi.org/10.1080/15427528.2020.1803169>
- Brito, G. G., Caixeta, E. T., Gallina, A. P., Zambolim, E. M., Zambolim, L., Diola, V., & Loureiro, M. E. (2010). Inheritance of coffee leaf rust resistance and identification of AFLP markers linked to the resistance gene. *Euphytica*, 173(2), 255–264. <https://doi.org/10.1007/s10681-010-0119-x>

- Caixeta, E. T., Pestana, K. N., & Pestana, R. N. (2015). Melhoramento Do Cafeeiro : Ênfase Na Aplicação Dos Marcadores Moleculares. In *Tópicos Especiais em Produção Vegetal V* (pp. 154–179).
- Combes, M. C., Andrzejewski, S., Anthony, F., Bertrand, B., Rovelli, P., Graziosi, G., & Lashermes, P. (2000). Characterization of microsatellite loci in *Coffea arabica* and related coffee species. *Molecular Ecology*, 9(8), 1178–1180. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.2000.00954-5.x>
- Earl, D. A., & VonHoldt, B. M. (2012). STRUCTURE HARVESTER: A website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*, 4(2), 359–361. <https://doi.org/10.1007/s12686-011-9548-7>
- Evanno, G., Regnaut, S., & Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: A simulation study. *Molecular Ecology*, 14(8), 2611–2620. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x>
- Ferrão, L. F. V., Caixeta, E. T., Pena, G., Zambolim, E. M., Cruz, C. D., Zambolim, L., Ferrão, M. A. G., & Sakiyama, N. S. (2015). New EST–SSR markers of *Coffea arabica*: transferability and application to studies of molecular characterization and genetic mapping. *Molecular Breeding*, 35(1), 31. <https://doi.org/10.1007/s11032-015-0247-z>
- Ferrão, L. F. V., Caixeta, E. T., Souza, F. de F., Zambolim, E. M., Cruz, C. D., Zambolim, L., & Sakiyama, N. S. (2013). Comparative study of different molecular markers for classifying and establishing genetic relationships in *Coffea canephora*. *Plant Systematics and Evolution*, 299(1), 225–238. <https://doi.org/10.1007/s00606-012-0717-2>
- Krishnan, S., Matsumoto, T., Nagai, C., Falconer, J., Shriner, S., Long, J., Medrano, J. F., & Vega, F. E. (2021). Vulnerability of coffee (*Coffea* spp.) genetic resources in the United States. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 68(7), 2691–2710. <https://doi.org/10.1007/S10722-021-01217-1/TABLES/2>
- Lino Ferreira, J., Teixeira Caixeta, E., Fatima Caniato, F., Setotaw, T., César Sant’Ana, G., & Maria Ferreira, L. (2020). Genetic Diversity of *Coffea arabica*. In *Genetic Variation*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.94744>
- Medeiros, A. C., Caixeta, E. T., Oliveira, A. C. B. de, Sousa, T. V., Stock, V. de M., Cruz, C. D., Zambolim, L., & Pereira, A. A. (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. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2021.705278>
- Melese, Y. Y., & Kolech, S. A. (2021). Coffee (*Coffea arabica* L.): Methods, objectives, and future strategies of breeding in Ethiopia—Review. In *Sustainability (Switzerland)* (Vol. 13, Issue 19, p. 10814). Multidisciplinary Digital Publishing Institute. <https://doi.org/10.3390/su131910814>

- Missio, R. F., Caixeta, E. T., Zambolim, E. M., Pena, G. F., Zambolim, L., Dias, L. A. S., & Sakiyama, N. S. (2011). Genetic characterization of an elite coffee germplasm assessed by gSSR and EST-SSR markers. *Genetics and Molecular Research*, 10(4), 2366–2381. <https://doi.org/10.4238/2011.October.6.2>
- Missio, R. F., Caixeta, E. T., Zambolim, E. M., Zambolim, L., Cruz, C. D., & Sakiyama, N. S. (2010). Polymorphic information content of SSR markers for *Coffea* spp. *Cropp Breeding and Applied Biotechnology*, 10(1), 89–94. <https://doi.org/10.12702/1984-7033.v10n01a12>
- Moncada, P., & McCouch, S. (2004). Simple sequence repeat diversity in diploid and tetraploid *Coffea* species. *Genome*, 47(3), 501–509. <https://doi.org/10.1139/g03-129>
- Monge, M., & Guevara, R. (2000). *Agriculture in alliance with nature: CATIE's recent advances in breeding and conservation of plant genetic resources* (Issue January).
- Montagnon, C., Mahyoub, A., Solano, W., & Sheibani, F. (2021). Unveiling a unique genetic diversity of cultivated *Coffea arabica* L. in its main domestication center: Yemen. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 68(6), 2411–2422. <https://doi.org/10.1007/S10722-021-01139-Y/FIGURES/2>
- Oliveira, B. A. C., Teixeira Caixeta, E., Zambolim Maciel, E., Zambolim, L., & Sakiyama, N. S. (2007). Aplicação técnica de marcadores moleculares no melhoramento de plantas. In *Instituto Agrônômico Campinas* (Issue 81, p. 17).
- Petek, M. R., Sera, T., Sera, G. H., de Batista Fonseca, I. C., & Ito, D. S. (2006). Seleção de progênies de *Coffea arabica* com resistência simultânea à mancha aureolada e à ferrugem alaranjada. *Bragantia*, 65(1), 65–73. <https://doi.org/10.1590/S0006-87052006000100009>
- Pritchard, J. K., Stephens, M., & Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155(2), 945–959. <https://doi.org/10.1093/genetics/155.2.945>
- Privot-Woehl, S., Krishnan, S., Solano, W., Schilling, T., Toniutti, L., Bertrand, B., & Montagnon, C. (2020). Authentication of *Coffea arabica* Varieties through DNA Fingerprinting and its Significance for the Coffee Sector. *Journal of AOAC International*, 103(2), 325–334. <https://doi.org/10.1093/JAOCINT/QSZ003>
- Rodrigues da Silva, B. S., Sant'Ana, G. C., Chaves, C. L., Godoy Androcioli, L., Vecchia Ferreira, R., Hiroshi Sera, G., Charmetant, P., Leroy, T., Pot, D., Silva Domingues, D., & Protasio Pereira, L. F. (2019). Population structure and genetic relationships between Ethiopian and Brazilian *Coffea arabica* genotypes revealed by SSR markers. *Genetica*, 147(2), 205–216. <https://doi.org/10.1007/s10709-019-00064-4>

- Sánchez, E., Solano, W., Gatica-Arias, A., Chavarría, M., & Araya-Valverde, E. (2020). Microsatellite DNA fingerprinting of *Coffea* sp. Germplasm conserved in Costa Rica through singleplex and multiplex PCR. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 20(1), 2020. <https://doi.org/10.1590/1984-70332020v20n1a3>
- Scalabrin, S., Toniutti, L., Di Gaspero, G., Scaglione, D., Magris, G., Vidotto, M., Pinosio, S., Cattonaro, F., Magni, F., Jurman, I., Cerutti, M., Suggi Liverani, F., Navarini, L., Del Terra, L., Pellegrino, G., Ruosi, M. R., Vitulo, N., Valle, G., Pallavicini, A., ... Bertrand, B. (2020). A single polyploidization event at the origin of the tetraploid genome of *Coffea arabica* is responsible for the extremely low genetic variation in wild and cultivated germplasm. *Scientific Reports*, 10(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-61216-7>
- Setotaw, T. A., Caixeta, E. T., Pereira, A. A., de Oliveira, A. C. B., Cruz, C. D., Zambolim, E. M., Zambolim, L., & Sakiyama, N. S. (2013). Coefficient of Parentage in *Coffea arabica* L. Cultivars Grown in Brazil. *Crop Science*, 53(4), 1237–1247. <https://doi.org/10.2135/cropsci2012.09.0541>
- Setotaw, T. A., Caixeta, E. T., Pena, G. F., Zambolim, E. M., Pereira, A., & Sakiyama, N. S. (2010). Breeding potential and genetic diversity of “Híbrido do Timor” coffee evaluated by molecular markers. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 10(4), 298–304. <https://doi.org/10.1590/S1984-70332010000400003>
- Setotaw, T. A., Caixeta, E. T., Zambolim, E. M., Sousa, T. V., Pereira, A. A., Baião, A. C., Cruz, C. D., Zambolim, L., & Sakiyama, N. S. (2020). Genome Introgression of Híbrido de Timor and Its Potential to Develop High Cup Quality *C. arabica* Cultivars. *Journal of Agricultural Science*, 12(4), 64. <https://doi.org/10.5539/jas.v12n4p64>
- Setotaw, T., Dias, L. A. dos S., & Missio, R. F. (2010). Genetic divergence among barley accessions from Ethiopia. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 10(2), 116–123. <https://doi.org/10.12702/1984-7033.v10n02a03>
- Silva, R. A., Zambolim, L., Castro, I. S. L., Rodrigues, H. S., Cruz, C. D., & Caixeta, E. T. (2018). The Híbrido de Timor germplasm: identification of molecular diversity and resistance sources to coffee berry disease and leaf rust. *Euphytica*, 214(9), 1–16. <https://doi.org/10.1007/s10681-018-2231-2>
- Silvestrini, M., Junqueira, M. G., Favarin, A. C., Guerreiro Filho, O., Maluf, M. P., Silvarolla, M. B., & Colombo, C. (2005). DIVERSIDADE GENÉTICA DA ESPÉCIE *Coffea arabica* L. AVALIADA POR MARCADORES MICROSSATÉLITES. *Biblioteca Do Café*. [www.conab.gov.br](http://www.conab.gov.br).
- Sousa, T. V., Caixeta, E. T., Alkimim, E. R., de Oliveira, A. C. B., Pereira, A. A., Zambolim, L., & Sakiyama, N. S. (2017). Molecular markers useful to discriminate *Coffea arabica* cultivars with high genetic similarity. *Euphytica*, 213(3), 75. <https://doi.org/10.1007/s10681-017-1865-9>

- Sousa, T. V., Caixeta, E. T., Alkimim, E. R., Oliveira, A. C. B., Pereira, A. A., Sakiyama, N. S., Zambolim, L., & Resende, M. D. V. (2019). Early selection enabled by the implementation of genomic selection in *Coffea arabica* breeding. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1934. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01934>
- Spinoso-Castillo, J. L., Corona-Torres, T., Escamilla-Prado, E., Morales-Ramos, V., Heber Aguilar-Rincón, V., & García-de los Santos, G. (2021). Genetic Diversity of *Coffea arabica* L.: A Genomic Approach. In *Landraces - Traditional Variety and Natural Breed [Working Title]*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.96640>
- Talhinhas, P., Batista, D., Diniz, I., Vieira, A., Silva, D. N., Loureiro, A., Tavares, S., Pereira, A. P., Azinheira, H. G., Guerra-Guimarães, L., Várzea, V., & Silva, M. do C. (2017). The coffee leaf rust pathogen *Hemileia vastatrix*: one and a half centuries around the tropics. *Molecular Plant Pathology*, 18(8), 1039–1051. <https://doi.org/10.1111/mpp.12512>
- Zambolim, L., & Caixeta, E. T. (2021). AN OVERVIEW OF PHYSIOLOGICAL SPECIALIZATION OF COFFEE LEAF RUST-NEW DESIGNATION OF PATHOTYPES. *International Journal of Current Research*, 13(01), 15564–15575. <https://doi.org/https://doi.org/10.24941/ijcr.40600.01.2021>

## **CAPÍTULO II**

**Resistência de cultivares de cafeeiros provenientes da América Central, as raças II e XXXIII de *Hemileia vastatrix* e genotipagem com a utilização de marcadores moleculares.**

## 1. Introdução

O café é originário da África, sendo a espécie *Coffea arabica* especificamente originada da região da Etiópia, de onde o cultivo se propagou para o resto do mundo. A espécie se adaptou a vários países, no entanto, eventos naturais de epidemias da doença causada pelo fungo *Hemileia vastatrix*, tem ocasionado grandes prejuízos na cafeicultura a nível mundial, pela sua facilidade de disseminação e adaptação aos lugares geográficos de produção de café (McCook, 2006; Zambolim & Caixeta, 2021). No ano 2013, na América Central e Colômbia, foi registrado um evento epidêmico que causou grandes prejuízos aos cafeicultores, gerando perdas significativas nos países a nível político, econômico e social (Avelino et al., 2015).

As epidemias, a ocorrência do fungo em várias regiões produtoras e a grande variabilidade do patógeno tem desencadeado o surgimento de novas raças mais complexas de *H. vastatrix* em busca de adaptabilidade a condições climáticas que favorecem ao patógeno, provocando perda de resistência em cultivares que antes eram consideradas resistentes (Cabral et al., 2016; Talhinhos et al., 2017). Muitas dessas novas raças são portadoras de genes de virulência com capacidade de suplantam a resistência de cultivares contendo genes de resistência (Zambolim & Caixeta, 2021). O aumento da doença nas lavouras e a presença de novas raças ou patótipos levam a um aumento do uso de fungicidas para o controle da doença, como cobre, triazóis, estrobirulinas entre outras moléculas (Zambolim, 2016). No entanto, o uso indiscriminado dos produtos pode causar danos ambientais e perda de sensibilidade do fungo às moléculas, apesar desse fenômeno ainda não se ter sido confirmado cientificamente, diminuindo sua efetividade no controle da doença.

Diante desse panorama, os pesquisadores intensificaram a identificação e desenvolvimento de novas cultivares, que além de resistência aos patótipos existentes de *H. vastatrix*, possuem outras características de interesse agrônomo. Dentre essas características estão incluídas as morfológicas (arquitetura de planta, ramificação, número de nós), físicas (tamanho de folhas, flores e frutos), fenológicas (ciclo de frutificação), ecológicas (adaptação a diferentes altitudes, umidade, resistência a diferentes doenças e pragas), tecnológicas (qualidade do grão de café, uniformidade de maturação) e ainda componentes envolvidos na produtividade (Monge & Guevara, 2000).



Visando dar suporte aos complexos programas de melhoramento genético, os melhoristas incorporam estratégias moleculares e estatísticas, aos métodos convencionais, para aumentar a eficiência e rapidez na obtenção das novas cultivares. Para a resistência à ferrugem, foi construído um mapa genético de *C. arabica*, que permitiu identificar duas regiões (QTL – *Quantitative Trait Loci*) que correspondem a dois genes de efeito maior e independentes que conferem resistência ao cafeeiro a três patótipos de *H. vastatrix*, raça I, raça II e patótipo 001 (Pestana et al., 2015). A partir desse mapeamento, foram desenvolvidos e obtidos marcadores moleculares flanqueando esses dois locos, sendo um marcador do tipo SCAR (CaRHv8) e um microsatélite (SSR016) associado ao QTL do grupo de ligação 2 (QTL-GL2) e um SCAR (CaRHVv9) e um CAPS (CaRHv10\_CAP) associado ao QTL do grupo de ligação 5 (QTL-GL5) (Almeida et al., 2021). Esses marcadores podem ser usados para monitorar e auxiliar a introgressão desses dois genes nas cultivares de café em desenvolvimento. Esses genes de efeito maior identificados e marcados são provenientes do cafeeiro do grupo Híbrido de Timor (acesso UFV 443-03), uma das principais fontes de resistência à ferrugem do cafeeiro.

Outro gene de resistência a ferrugem foi identificado e clonado nessa mesma fonte de resistência, mas em outro acesso (Híbrido de Timor CIFC 832/2). Um marcador denominado CARF005 foi desenvolvido a partir da sequência desse gene (Alvarenga et al., 2011) e apesar de também ser proveniente de Híbrido de Timor, Almeida et al. (2021) comprovaram ser um gene de resistência diferente dos dois QTL identificados por Pestana et al. (2015).

Trabalhando com outras fontes de resistência a ferrugem, como a seleção Indiana S.288, Mahé et al. (2008) mapearam um gene maior de resistência, utilizando três marcadores SCAR (BA-48-21-f, BA-124-12K-f e SP-M16 S<sub>H</sub>3) e um marcador SSR (Sat244). Esse gene mapeado corresponde ao gene S<sub>H</sub>3 originado da espécie *C. liberica* e introgridido em *C. arabica* por cruzamento natural que deu origem as seleções indianas.

Marcadores moleculares também foram identificados para gene de resistência a outra importante doença do cafeeiro, a antracnose dos frutos (Coffee Berry Disease - CBD). A doença se encontra restrita a África, mais sua chegada à América pode causar grandes perdas na cafeicultura, sendo importante identificar materiais que contenham genes que conferem resistência como forma de melhoramento preventivo.

Gichuru et al. (2008) caracterizaram o gene denominado *Ck-1*, proveniente da fonte de resistência Híbrido de Timor, usando abordagem de mapeamento genético. Nesse trabalho, dois marcadores SSR e oito AFLP foram identificados como ligados ao gene *Ck-1*.

Os vários genes que conferem resistência a diferentes patótipos de uma doença e de outras doenças podem ser incorporados em uma cultivar. A introdução de múltiplos genes em uma cultivar no melhoramento genético é denominado de piramidação gênica. Essa estratégia de melhoramento é importante para obter uma resistência de amplo espectro e de longa duração, bem como conferir resistência múltipla (Almeida et al., 2021; Liu et al., 2020). Nesse contexto, marcadores moleculares podem auxiliar efetivamente na identificação de genótipos que possuem múltiplos genes de resistência na presença de efeito dominante ou epistático, permitindo a piramidação de vários genes de resistência em uma única cultivar (Alkimim et al., 2017; Almeida et al., 2021). A seleção assistida por marcadores moleculares (SAM) é uma ferramenta importante não apenas para identificar, monitorar e piramidar os genes de interesse no melhoramento, mas também, tem a capacidade de detectar e analisar polimorfismos genéticos presentes entre os genótipos (Medeiros et al., 2021; Oliveira et al., 2021).

Para o sucesso dos programas de melhoramento para resistência a doenças é necessário, ainda, a contínua incorporação de novas fontes de resistência. Essas fontes podem ser identificadas por meio de inoculações de diferentes acessos da planta com diferentes raças do patógeno, com destaque para as raças mais frequentes e que apresentam níveis de agressividade diferentes. No patossistema café-*H. vastatrix*, a raça II é a mais frequentemente encontrada no Brasil (Cabral et al., 2009) e nos demais países produtores de café do continente americano (Zambolim & Caixeta, 2021). Essa raça apresenta o gene de virulência *v5* e sua ocorrência generalizada provavelmente se deve ao plantio, nas várias regiões, de cultivares de café que contêm apenas o gene *S<sub>H</sub>5* (Talhinhas et al., 2017). A partir da utilização de cultivares resistentes, contendo mais genes de resistência, nas Américas, novas raças foram identificadas (Zambolim & Caixeta, 2021). A raça XXXIII foi identificada no Brasil suplantando genótipos de café considerados resistentes à ferrugem, em cafeeiros do grupo genético Catimor. Está é uma raça mais complexa e possui os genes de virulência *v5*, *v7* ou *v5*, *v7*, *v9* (Capucho et al., 2012). A inoculação de cafeeiros com

essas duas raças, a mais frequente e a mais virulenta, é de suma importância não só para buscar novas fontes de resistência, mas também para estudar o potencial de resistência ou susceptibilidade de cafeeiros que são atualmente plantados nas Américas.

Diante do exposto, o objetivo desse trabalho foi caracterizar as cultivares plantadas em diferentes países da América Central por meio de inoculações com diferentes raças de *H. vastatrix* e uso de marcadores moleculares associados a diferentes locos de resistência a esse patógeno. As cultivares foram também analisadas quanto presença do gene *Ck-1* que confere resistência a *Colletotrichum kahawae* para identificar cultivares promissórios que possam conferir resistência a essa doença quarentenária nas Américas.

## **2. Material e Métodos**

O trabalho foi realizado no Departamento de Fitopatologia (DFP) e no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (Bioagro), junto ao Laboratório de Biotecnologia do Cafeeiro (BioCafé), na Universidade Federal de Viçosa (UFV).

### **2.1. Fenotipagem**

Foram utilizadas seis plantas quando possível dos 36 cultivares do gênero *Coffea* da espécie *arabica* procedentes de cinco países da América Central (Tabela 1), inoculadas com duas raças de *Hemileia vastatrix*, raça II e XXXIII. Esses genótipos correspondem a cultivares plantadas atualmente nos países da América Central.

**Tabela 1.** Genótipos de café (*Coffea arabica*) provenientes de diferentes países da América Central.

País	Nome	Progenitores	Grupo Genético	Nº Plantas por cultivar
Costa Rica	Costa Rica 95	Híbrido de Timor CIFC 832/1 x Caturra (Catimor T8667)	Catimor	1
	San Izidro 48	Villa Sarchí x Híbrido de Timor CIFC 832/2	Sarchimor	6
República Dominicana	Catimor 3	-	Catimor	6
	Catimor 4	-	Catimor	5
El Salvador	Pacamara 1	Pacas x Maragogipe Vermelho	Bourbon-Típica	6
	Pacamara 2	Pacas x Maragogipe Vermelho	Bourbon-Típica	6
	Pacamara 3	Pacas x Maragogipe Vermelho	Bourbon-Típica	1
	Cuscatleco 1	Villa Sarchí CIFC 971/10 x Híbrido de Timor CIFC 832/2 (Sarchimor T5296)	Sarchimor	6
	Pacas 1	Mutação Bourbon	Bourbon-Típica	1
	Pacas 2	Mutação Bourbon	Bourbon-Típica	6
	San Pacho	Caturra x San Bernardo	Bourbon-Típica	1
	Bourbon	Bourbon	Bourbon-Típica	6
	Cuscatleco 2	Villa Sarchí CIFC 971/10 x Híbrido de Timor CIFC 832/2 (Sarchimor T5296)	Sarchimor	6
	San Pacho 1	Caturra x San Bernardo	Bourbon-Típica	6
	San Pacho 2	Caturra x San Bernardo	Bourbon-Típica	6
	CR95 Izalco	Híbrido de Timor CIFC 832/1 x Caturra (Catimor T8667)	Catimor	6
	San Pacho 3	Caturra x San Bernardo	Bourbon-Típica	6
Guatemala	Sarchimor	Villa Sarchí x Híbrido de Timor CIFC 832/2	Sarchimor	6
	Guapa	Catuaí x Catimor	Catimor	6
	Colismor	Pache Colis x Catimor T5175	Catimor	6
	Catimor 1	Híbrido de Timor CIFC 832/1 x Caturra (Catimor T5175)	Catimor	2
	Catimor 2	Híbrido de Timor CIFC 832/1 x Caturra (Catimor T5175)	Catimor	6
	Catiguá MG2	Catuaí Amarelo IAC 86 x Híbrido de Timor UFV 440-10	Catuaí x Híbrido Timor	6
	Catimor 5175	Híbrido de Timor CIFC 832/1 x Caturra (Catimor T5175)	Catimor	2
	Anacafé	(Catimor T5175 x Caturra) x Pacamara	Catimor	6
Honduras	Catimor 8667	Híbrido de Timor CIFC 832/1 x Caturra (Catimor T8667)	Catimor	6
	Lempira 1	Híbrido de Timor 832/1 x Caturra	Catimor	6
	Geisha	Geisha	Bourbon-Típica	3
	Parainema Apical	Villa Sarchí 971/10 x Híbrido de Timor CIFC 832/2 (Sarchimor T5296-184)	Sarchimor	1
	IHCAFE 90	Híbrido de Timor CIFC 832/1 x Caturra	Catimor	6
	Parainema	Villa Sarchí 971/10 x Híbrido de Timor CIFC 832/2 (Sarchimor T5296-184)	Sarchimor	2
	Centroamericano_F <sub>3</sub>	Sarchimor T5296 x Rume Sudan	Sarchimor	6
	Centroamericano F <sub>2</sub>	Sarchimor T5296 x Rume Sudan	Sarchimor	6
	Lempira 2	Híbrido de Timor CIFC 832/1 X Caturra	Catimor	6
	Pacamara 4	Pacas x Maragogipe Vermelho	Bourbon-Típica	6
	Catimor T5175	Híbrido de Timor CIFC 832/1 x Caturra (Catimor T5175)	Catimor	6

### **2.1.1. Multiplicação do inóculo de *Hemileia vastatrix***

A multiplicação do inóculo de *H. vastatrix* foi realizada em mudas de *C. arabica* cv. Caturra, devido a sua alta suscetibilidade a ferrugem. Foram selecionadas plantas com alto vigor vegetativo e com três meses de idade, mantidas em casa de vegetação com temperatura variando de 23 °C a 28 °C e umidade relativa de 60 a 80%. Foi utilizado cerca de 50 mg de uredosporos do fungo da raça II (v5) caracterizada por Cardoso (1986) e raça XXXIII (v5,7 ou v5,7,9) caracterizada por Capucho et al., (2012) provenientes da coleção Biocafé. A inoculação foi realizada com auxílio de pincel de pêlo de camelo número 2, em folhas das mudas de café. As mudas inoculadas foram colocadas em câmara escura e mantidas por 48 horas após a incubação em câmara de nevoeiro (temperatura 22 °C e umidade relativa próxima a 100 %). As plantas foram transferidas para câmara de incubação com temperatura de 22 °C, onde permaneceram por 30 dias para multiplicação dos uredosporos. Parte dos uredosporos foram armazenados em freezer a -80 °C, visando preservação a longo prazo e a outra parte foi acondicionada em cápsulas de gelatina e colocadas no dessecador a 5 °C, com umidade relativa de 50% (Zambolim & Chaves, 1974) até o momento de realização da fenotipagem.

### **2.1.2. Testes de germinação**

Os testes de germinação dos uredosporos antes da inoculação foram realizados em placas de ágar-água a 1% (Zambolim & Chaves, 1974). Os uredosporos foram espalhados com ajuda de um pincel de pêlo de camelo número 2 e logo após colocados em câmara escura por 24 horas a uma temperatura de 22 °C. A contagem dos esporos germinados e não germinados foi realizada em microscópio estereoscópico, considerando germinados e viáveis aqueles que tiveram o tubo germinativo com o dobro do diâmetro do uredosporo. Somente foram utilizados uredosporos com germinação acima de 30%.

### **2.1.3. Preparo e inoculação dos discos foliares para fenotipagem com as raças II e XXXIII de *H. vastatrix***

Folhas jovens dos genótipos de café descritos na Tabela 1 foram utilizadas para a obtenção dos discos de tecido vegetal para os testes de

inoculação. Selecionou-se folhas desenvolvidas que não apresentavam nenhum sintoma de injúria e deficiência nutricional. Dezesseis discos retirados do centro das folhas foram utilizados por genótipo. A remoção dos discos foi realizada com auxílio de um furador de rolhas com 2,0 cm de diâmetro. Como controle, utilizou-se discos de plantas do cultivar Caturra.

A inoculação foi realizada espalhando cerca de 1,0 mg de uredosporos com auxílio de um pincel de pêlo de camelo número 2, na face abaxial, em cada disco de folha de café mantidos sobre a tela de aço inoxidável dentro da caixa de plástico (gerbox). Para cada um dos diferentes genótipos de café foram utilizados um gerbox que em seguida foram borrifados com água destilada esterilizada (Eskes, 1982). As caixas plásticas foram incubadas em câmara escura por 48 horas ( $22 \pm 2$  °C) e depois levadas para câmara de incubação. Uma limpeza foi realizada nos discos com auxílio de algodão para eliminar o excesso de uredosporos na face abaxial, tomando cuidado para não causar ferimentos, com a finalidade de evitar a presença de fungos parasitas a *H. vastatrix* (Capucho et al., 2005). Posteriormente, os gerbox foram colocados em ambiente com fotoperíodo de 12 horas luz/escuro e com temperatura controlada de  $22 \pm 2$  °C, permanecendo por 45 dias até a leitura final da presença ou não de uredosporos.

#### **2.1.4. Avaliação dos Componentes de Resistência**

Os componentes de resistência dos cafeeiros a *H. vastatrix* analisados conforme os descritos por Parlevliet (1979). Foram eles:

**Período de incubação (PI):** período decorrido da inoculação até a observação de 50% de discos com sintomas da doença.

**Período latente (PL):** período do décimo dia após inoculação até a observação de 50% da incidência final de discos com sinais.

**Incidência:** porcentagem final de discos apresentando sinais da doença.

**Produção de uredosporos:** quantidade final de uredosporos produzidos, utilizando a metodologia proposta por Boudrot et al. (2016).

**Severidade:** a severidade da ferrugem foi avaliada nos 16 discos das folhas, em cada gerbox. A avaliação foi realizada a partir do décimo dia após a inoculação a cada dois dias, até 45 dias. A escala de severidade da ferrugem adotada foi a descrita por Granados & Zambolim (2019) com modificações, onde:

0 corresponde a ausência de sinais e sintomas nos discos; 1 ( $\leq 1\%$ ), 2 ( $\leq 10\%$ ); 3 ( $\geq 10\%$  e  $\leq 15\%$ ), 4 ( $\geq 15\%$  e  $\leq 30\%$ ), 5 ( $\geq 30\%$  e  $\leq 50\%$ ) e 6 ( $\geq 50\%$ ) da área dos discos cobertas com uredosporos do fungo, respectivamente.

**Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD):** a partir dos dados de severidade calculou-se a AACPD, utilizada por Campbell e Madden (1990).

## **2.2. Genotipagem**

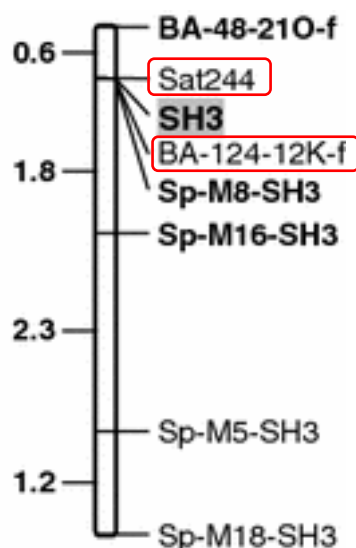
### **2.2.1. Material genético e obtenção de DNA genômico**

As 36 cultivares frequentemente plantadas na América Central (Tabela 1) foram analisadas com marcadores moleculares. Cada cultivar foi representada por no mínimo seis plantas, quando possível. Dessa forma, um total de 175 amostras foliares foram coletadas para extração de DNA genômico. Folhas uniformes, sem injúrias, jovens, vigorosas, de cor verde brilhante e completamente expandidas foram coletadas e acondicionadas em tubos Falcon contendo identificação correspondente a cada cultivar. Os tubos com as folhas foram colocados em caixa de isopor para manter a umidade e evitar a oxidação, até serem levadas ao laboratório Biocafé (UFV), onde foram armazenados em ultra-freezer a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Para a extração do DNA genômico as amostras coletadas e armazenadas foram liofilizadas e trituradas com auxílio de cadinho e pistilos. Em seguida, o tecido vegetal foi armazenado em microtubos de  $2,0\text{ }\mu\text{L}$ . O DNA genômico foi extraído conforme a metodologia proposta por Diniz et al. (2005) com adaptações, como mencionado no capítulo 1.

### **2.2.2. Marcadores moleculares associados ao gene $S_H3$ de resistência do cafeeiro à ferrugem**

Para identificação de genótipos portadores do gene  $S_H3$  de resistência à *H. vastatrix* foi realizada amplificação das amostras de DNA extraídas utilizando dois marcadores, SCAR Ba-124-12K-f e o marcador SSR Sat 244 ligados à este gene (Figura 1) e identificados por Mahé et al., (2008).



**Figura 1.** Mapa de ligação mostrando os marcadores moleculares ligados em acoplamento com o gene *S<sub>H3</sub>* (em negrito). Nomes dos marcadores moleculares estão à direita, enquanto as distâncias de mapa estimadas em cM são mostradas à esquerda (Mahé et al., 2008). Marcadores utilizados estão dentro do retângulo vermelho.

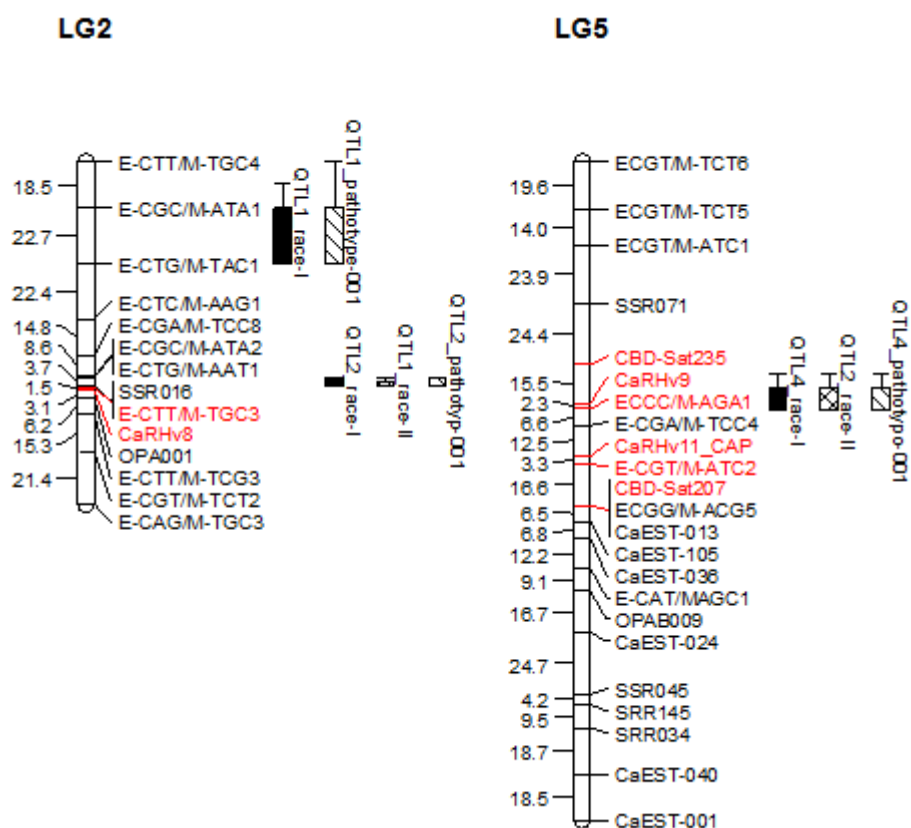
Para avaliar cada um dos indivíduos foram considerados portadores do alelo de resistência do gene *S<sub>H3</sub>* aqueles que apresentaram os dois marcadores moleculares ligados ao gene. Cinco controles foram utilizados, dos quais três genótipos são portadores do alelo de resistência do gene *S<sub>H3</sub>* (CIFC H147/1, CIFC H153/2 e S.288/23) e dois genótipos suscetíveis (Caturra Vermelho – CIFC 19/1 e Catuaí amarelo IAC 64 - UFV 2148/57). As amplificações por PCR foram realizadas em um volume final de 25 µl, contendo 50 ng de DNA, tampão de reação de PCR 1X, 2,0 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM de cada dNTP, 0,4 µM de cada *primer*, 0,5 unidade de Taq DNA polimerase, completando o volume com água milli-Q estéril. As reações foram realizadas em termocicladores PTC-200 (*MJ Research*) e Veriti (*Applied 23 Biosystems*) e tiveram uma fase inicial de desnaturação a 95 °C por 5 minutos; 35 ciclos a 94 °C por 45 segundos, temperaturas de anelamento de 52 °C para o Sat244 e 56 °C para o Ba-124-12KF por 45 segundos, seguido de extensão de 72 °C por 45 segundos. Foi adicionada uma extensão final a 72 °C por 10 minutos. Os produtos resultantes da reação de PCR foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida



desnaturante 6% e visualizados por meio de coloração com nitrato de prata (Brito et al., 2010).

### 2.2.3. Marcadores associados aos locos de resistência do Híbrido de Timor que confere resistência a *Hemileia vastatrix*

Para identificar cafeeiros que possuem locos de resistência provenientes da fonte de resistência do Híbrido de Timor, foram utilizados três marcadores moleculares, SSR 016, CaRHv8 e CaRHv9 (Almeida et al., 2021) ligados a dois QTL que correspondem a genes de efeito maior que conferem resistência as raças I, II e ao patótipo 001 de *H. vastatrix* (Figura 2).



**Figura 2.** Grupo de Ligação 2 (LG2) do Mapa de ligação de *Coffea arabica* contendo o marcador SSR16 e CaRHv8 (vermelho). Grupo de Ligação 5 (LG5) do Mapa de ligação contendo o marcador CaRHv9 e CaRHv11\_CAP e os CBD-Sat207 e CBD-Sat235 (vermelho). À direita da barra estão os nomes dos marcadores moleculares e à esquerda, as distâncias em cM. (Almeida et al., 2021).

Os marcadores SSR16 e CaRHv8 estão ligados ao QTL do grupo de ligação 2. O SSR16 apresenta um padrão codominante, identificando os indivíduos BB, Bb e bb. O CaRHv8 é um marcador dominante, ligado em repulsão, marcando o alelo recessivo, portanto, esse marcador permite a identificação de indivíduos que apresentam o genótipo BB ou b. Nesse caso, os indivíduos que não possuem a banda foram considerados resistentes e homocigotos (BB) (Almeida et al., 2021). O marcador CaRHv9 está ligado ao QTL do grupo de ligação 5 (Figura 2) e se comporta como marcador dominante e acoplado, o que permite a identificação dos genótipos C<sub>u</sub> e cc (Almeida et al., 2021). Como controle foram utilizados o Híbrido de Timor UFV 443-03 que possui os dois QTL e o Catuaí Amarelo IAC 64 (UFV 2148/57) que não possuem os QTL.

As cultivares foram analisadas, também, com o marcador CARF005. Esse marcador foi identificado por Alvarenga et al. (2011) e corresponde a outro loco de resistência existente na fonte Híbrido de Timor. Nesse trabalho esse loco foi denominado de D e, como o marcador é dominante, foi possível identificar os genótipos D<sub>u</sub> e dd.

As amplificações por PCR para CaRHv8 e CaRHv9 foram realizadas em um volume final de 20 µl, contendo 50 ng de DNA, tampão de reação de PCR 1X, 2,0 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,15 mM de cada dNTP, 0,1 µM de cada *primer*, 1 unidade de Taq DNA polimerase, completando o volume com água milli-Q estéril. As reações foram feitas em termocicladores PTC-200 (*MJ Research*) e Veriti (*Applied 23 Biosystems*) e tiveram uma fase inicial de desnaturação a 95 °C por 5 minutos; 35 ciclos a 94 °C por 30 segundos, temperatura de anelamento de 65 °C por 30 segundos, seguido de extensão de 72 °C por 1 minuto e extensão final a 72 °C por 10 minutos.

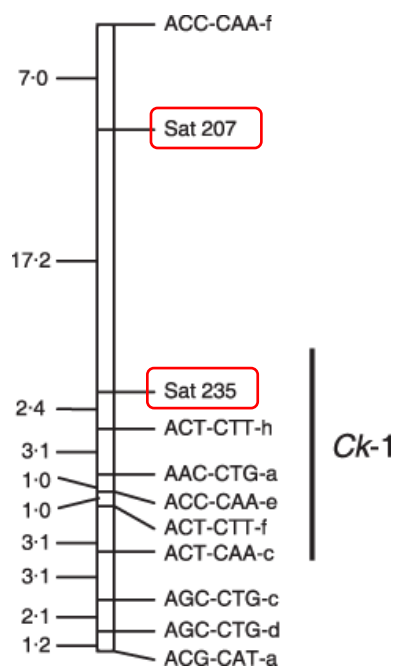
A reação de PCR para CARF005 foi realizada em um volume final de 20 µl, contendo 50 ng de DNA, tampão de reação de PCR 1X, 2,0 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,15 mM de cada dNTP, 0,1 µM de cada *primer*, 1 unidade de Taq DNA polimerase, completando o volume com água milli-Q estéril. As reações foram feitas em termocicladores PTC-200 (*MJ Research*) e Veriti (*Applied 23 Biosystems*) e tiveram uma fase inicial de desnaturação a 95 °C por 5 minutos; 35 ciclos a 94 °C por 30 segundos, temperatura de anelamento de 60 °C por 30 segundos, seguido de extensão de 72 °C por 1 minuto e extensão final a 72 °C

por 10 minutos. Os produto de amplificação foi aplicado em gel de agarose 1% e realizada a eletroforese em tampão TBE 1X a uma voltagem de 70V por 40 minutos e depois corado em brometo de etídio (10 mg.mL<sup>-1</sup>) a 0,002%.

Na realização da reação de PCR para o SSR16, foi utilizado 50 ng de DNA, 1 U de Taq DNA polimerase, tampão 1X da enzima, 1 mM de MgCl<sub>2</sub>, 150 µM de cada dNTP (dGTP, dTTP, dCTP, dATP) e 0,1 µM de cada *primer*, completando com água milli-Q para um volume final de 20 µL. As amplificações foram efetuadas em termocicladores PTC-200 (MJ Research) e Veriti (Applied Biosystems). A reação foi iniciada com desnaturação a 94 °C por 2 min, seguido por 10 ciclos de *touchdown* PCR, constituídos de 94 °C por 30 segundos (seg), temperatura de anelamento decrescendo 1 °C a cada ciclo (de 66 °C até 57 °C) por 30 seg e extensão de 72 °C por 30 seg. Foram realizados mais 30 ciclos de desnaturação a 94 °C, anelamento a 57 °C e extensão a 72 °C, 30 seg cada etapa. A extensão final se realizou a 72 °C, por 20 min. Os produtos resultantes da reação de PCR foram separados em eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante 6% e visualizados por meio de coloração com nitrato de prata, conforme protocolo descrito por (Brito et al., 2010).

#### **2.2.4. Marcadores ligado ao gene Ck-1 que confere resistência a *Colletotrichum kahawae* (CBD)**

Foram utilizados os marcadores moleculares CBD-Sat235 e CBD-Sat207 ligados ao gene *Ck-1* que confere resistência a CBD. Esses marcadores foram identificados por Gichuru et al. (2008) (Figura 3), validados por Alkimim et al. (2017) e mapeados por Almeida et al. (2021) no grupo de ligação cinco (Figura 2).



**Figura 3.** Mapa de ligação genética de marcadores associados à resistência do cafeeiro a *Colletotrichum kahawae*, obtido com base na população  $F_2$  de *Coffea arabica* (SL28 × Catimor 88). Os valores à esquerda indicam as distâncias entre os marcadores em cM. A direita está representado o segmento que contém o loco *Ck-1* de resistência ao CBD (Gichuru et al., 2008). Marcadores utilizados estão dentro do retângulo vermelho.

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

As amplificações por PCR foram realizadas em um volume final de 25  $\mu$ l, contendo 50 ng de DNA, tampão de reação de PCR 1X, 2,0 mM de  $MgCl_2$ , 0,1 mM de cada dNTP, 0,4  $\mu$ M de cada primer, 0,5 unidade de Taq DNA polimerase, completando o volume com água milli-Q estéril. As reações foram feitas em termocicladores PTC-200 (*MJ Research*) e Veriti (*Applied Biosystems*) e tiveram uma fase inicial de desnaturação a 95 °C por 5 minutos; 35 ciclos a 94 °C por 45 segundos, temperaturas de anelamento de 50 °C por 45 segundos, seguido de extensão de 72 °C por 45 segundos e extensão final a 72 °C por 10 minutos. Os produtos resultantes da reação de PCR foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante 6% e visualizados por meio de coloração com nitrato de prata (Brito et al., 2010).

A leitura dos géis foi realizada com base na presença ou ausência da banda de resistência, utilizando o padrão de bandas apresentado pelos controles que apresentam o gene de resistência (EE, Ee), UFV377-15, UFV440-10, MGS Catiguá 3, e os suscetíveis (ee) Caturra vermelho (CIFC19/1) e Catuai Vermelho IAC 144.

#### **2.2.5. Análises dos dados**

O fenotipagem em gerbox, foi feito em delineamento experimental inteiramente casualizado (caixa de plástico com 16 discos de folhas) por tratamento. Foi repetido 2 vezes no tempo. A comparação das medias foi feita pelo teste de a 5% de significância

Para realização das análises estatísticas utilizou-se o programa InfoStat (Di Rienzo et al., 2020).

### 3. Resultados

#### 3.1. Fenotipagem

De acordo com os resultados da análise fenotípica (Tabela 2), a resistência ou susceptibilidade das cultivares às raças II e XXXIII de *Hemileia vastatrix* foram obtidas com base na severidade (esporulação dos discos foliares de cada cultivar).

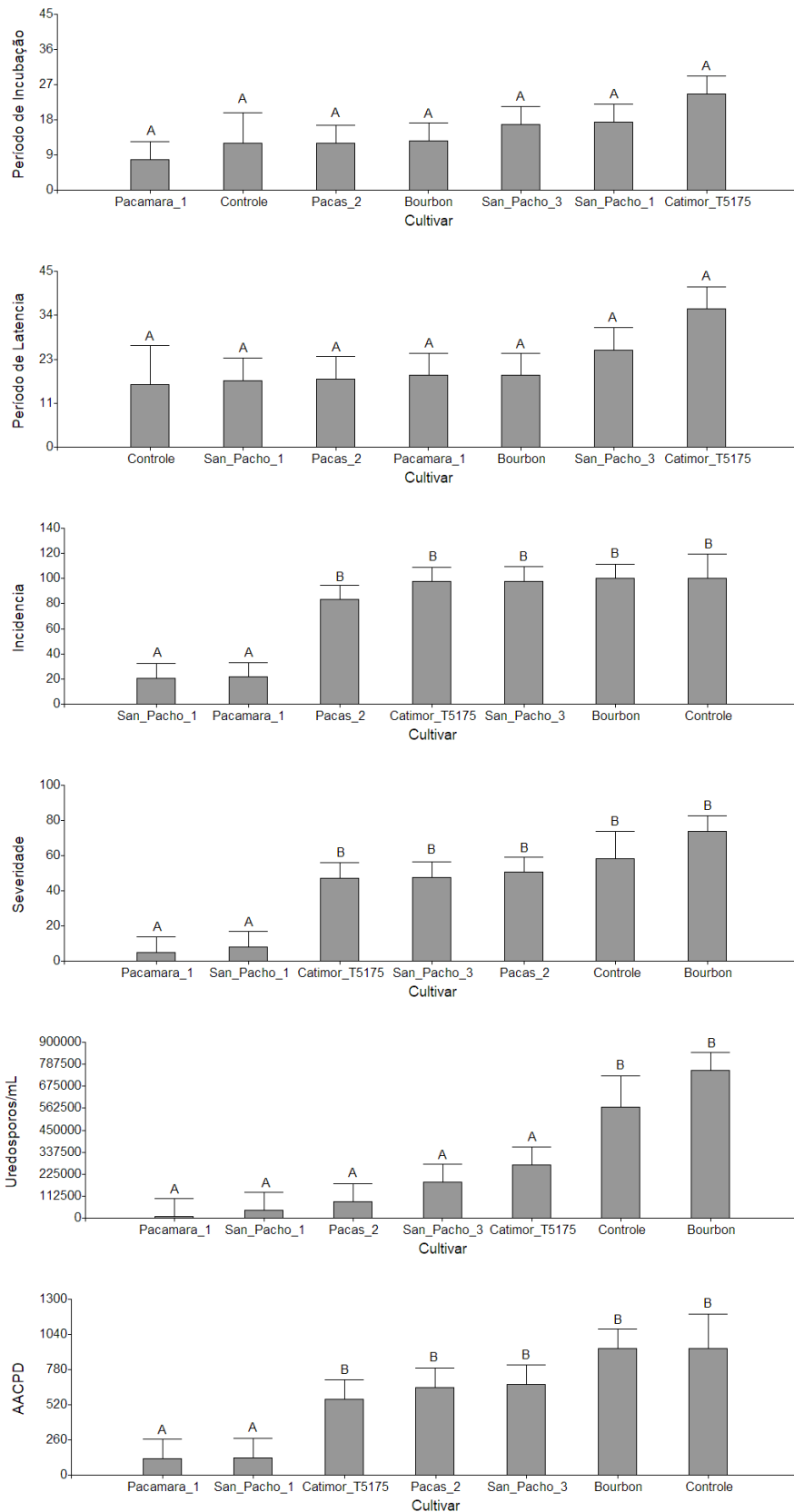
**Tabela 2.** Fenotipagem das 36 cultivares provenientes da América Central com as raças II e XXXIII de *H. vastatrix* (R= Resistente, S= Suscetível).

Cultivar	Raça XXXIII	Raça II	Cultivar	Raça XXXIII	Raça II
Catimor_3 <sup>1</sup>	R	R	Catimor_1 <sup>4</sup>	R	R
Catimor_4 <sup>1</sup>	S	R	Catimor_2 <sup>4</sup>	R	R
CR_95 <sup>2</sup>	R	R	Catigua_MG2 <sup>4</sup>	R	R
San_Isidro_S48 <sup>2</sup>	R	R	Catimor_5175 <sup>4</sup>	R	R
Catimor_8667 <sup>3</sup>	R	R	Anacafe <sup>4</sup>	R	R
Lempira_1 <sup>3</sup>	R	R	Pacamara_1 <sup>5</sup>	S	S
Lempira_2 <sup>3</sup>	S	R	Pacamara_2 <sup>5</sup>	R	R
Parainema_Apical <sup>3</sup>	R	R	Pacamara_3 <sup>5</sup>	R	R
IHCAFE_90 <sup>3</sup>	R	R	Cuscatleco_1 <sup>5</sup>	R	R
Parainema <sup>3</sup>	R	R	Cuscatleco_2 <sup>5</sup>	R	R
Pacamara_4 <sup>3</sup>	R	R	Pacas_1 <sup>5</sup>	R	R
Centroamericano_F3 <sup>3</sup>	R	R	Pacas_2 <sup>5</sup>	S	S
Centroamericano_F2 <sup>3</sup>	R	R	San_Pacho <sup>5</sup>	S	R
Geisha <sup>3</sup>	R	R	San_Pacho_1 <sup>5</sup>	R	S
Catimor_T5175 <sup>3</sup>	S	S	San_Pacho_2 <sup>5</sup>	R	R
Sarchimor <sup>4</sup>	R	R	San_Pacho_3 <sup>5</sup>	S	S
Guapa <sup>4</sup>	R	R	CR95_Izalco <sup>5</sup>	S	R
Colismor <sup>4</sup>	S	R	Bourbon <sup>5</sup>	S	S

<sup>1</sup>República Dominicana <sup>2</sup>Costa Rica <sup>3</sup>Honduras <sup>4</sup>Guatemala <sup>5</sup>El Salvador

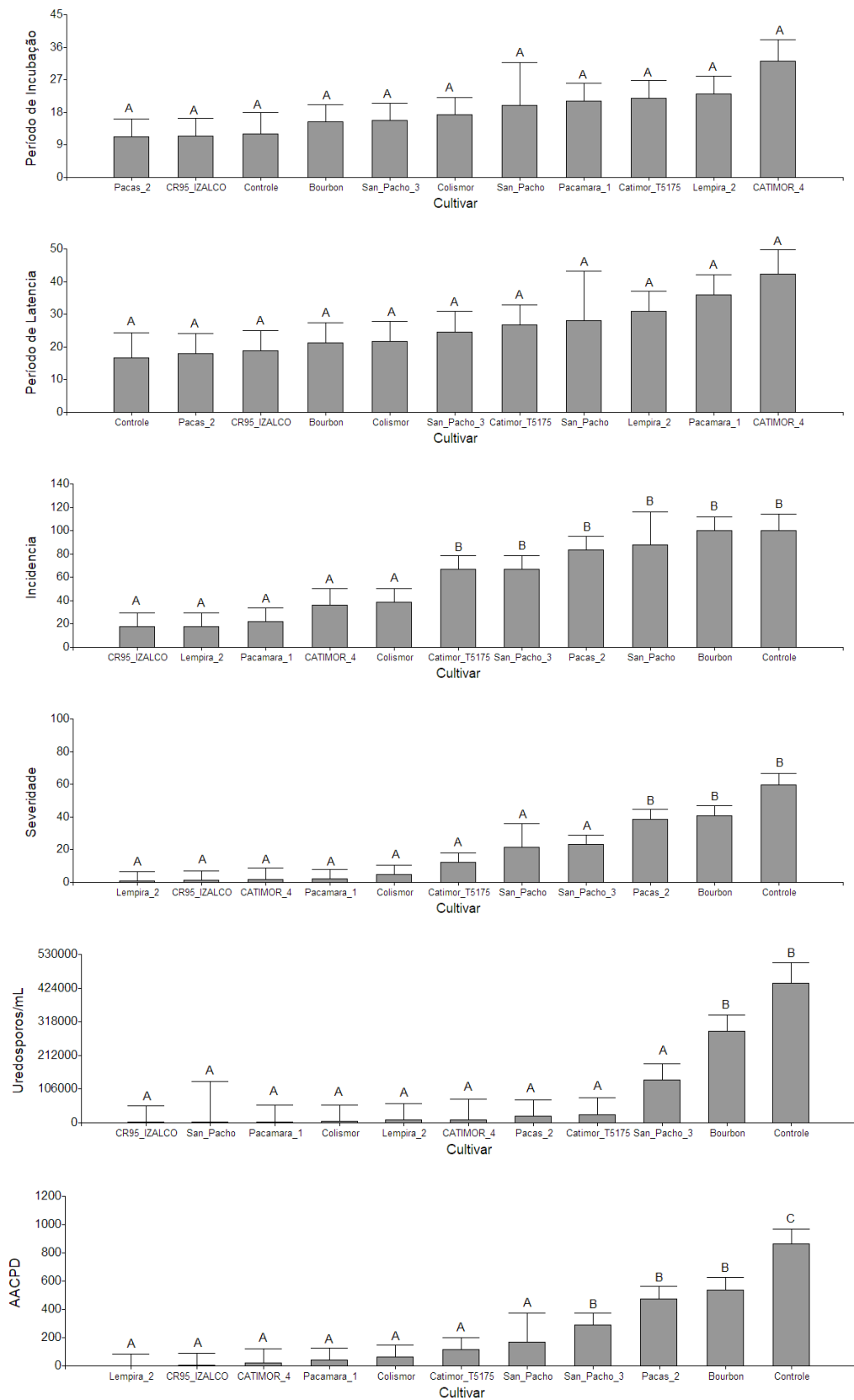
A maioria das cultivares analisadas apresentaram resistência à ferrugem (83% cultivares resistente à raça II e 72% à raça XXXIII). Analisando a fenotipagem para raça II, das 36 cultivares analisadas, seis (Catimor T5175, Pacamara\_1, Pacas\_2, San Pacho 1 e 3, Bourbon) apresentaram reação compatível com ferrugem, ou seja, susceptibilidade. Para raça XXXIII, dez cultivares (Catimor 4, Lempira 2, Catimor T5175, Colismor, Pacamara 1, Pacas 2, San Pacho, San Pacho 3, CR Izalco e Bourbon), apresentam a mesma reação de susceptibilidade.

Com base nos resultados da análises de variância, verificou-se diferenças significativas nos componentes de resistência Incidência, Severidade, Produção de uredosporos/mL, Area Abaixo da Curva do Progresso da Doença (AACPD), para aqueles cultivares que apresentaram susceptibilidade a raça II (Figura 4) e a XXXIII (Figura 5) de *H. vastatrix*.



**Figura 4.** Componentes de resistência avaliados nas cultivares que apresentaram suscetibilidade a raça II de *H. vastatrix*. Como controle foi utilizada a cultivar Caturra.





**Figura 5.** Componentes de resistência avaliados nas cultivares que apresentam suscetibilidade a raça XXXIII de *H. vastatrix*.

Para os componentes de resistência quantitativos avaliados para a raça II (Figura 4), não foi observada diferença significativa para o período de incubação (PI) e período latente (PL). Menor incidência significativa foi detectada para San Pacho 1 e Pacamara 1 quando comparadas com Pacas, Catimor T5175, San Pacho 3, Bourbon e o controle (Caturra). Menor severidade e AACPD também foi observada para essas mesmas duas cultivares, San Pacho 1 e Pacamara 1. A produção de esporos foi significativamente maior para Bourbon e o controle.

De acordo com os resultados apresentados para a raça XXXIII (Figura 5), para PI e PL também não foi verificada diferença significativa entre as cultivares. Maiores valores de incidência foram observados para Catimor T5175, San Pacho 3, Pacas 2, San Pacho, Bourbon e o controle (Caturra). No caso da severidade, as cultivares Lempira 2, CR95 Izalco, Catimor 4, Pacamara 1, Colismor, Catimor T5175, San Pacho, San Pacho 3 não diferiram estatisticamente e apresentaram menor valor significativo quando comparadas com o controle e as cultivares Pacas 2 e Bourbon. Bourbon e o controle apresentaram as maiores quantidades de uredosporos e diferiram estatisticamente das cultivares CR Izalco, San Pacho, Pacamara 1, Colismor, Lempira 2, Catimor 4, Pacas 2, Catimor T5175 e San Pacho 3. Para a AACPD, as cultivares Lempira 2, CR95 Izalco, Catimor 4, Pacamara 1, Colismor, Catimor T5175 e San Pacho não apresentaram diferenças significativas, mas se diferiram das cultivares San Pacho 3, Pacas 2 e Bourbon que apresentaram os maiores valores. Todas as cultivares apresentaram diferenças significativas em relação ao controle (Caturra).

### **3.2. Genotipagem**

Além da informação da resistência a duas importantes raças de *H. vastatrix*, as cultivares plantadas na América Central foram analisadas quanto a presença de diferentes genes de resistência com base em marcadores moleculares. Por meio de marcadores previamente identificados como ligados aos genes (Tabela 3), foi possível monitorar os alelos de resistência em quatro locos distintos (locos A, B, C e D) que conferem resistência à ferrugem e um loco (loco E) associado a resistência a CBD. O loco A (marcadores Sat 244 e BA-124-12K-f) corresponde ao gene *S<sub>H</sub>3* identificados em *C. liberica* e introgridido em genótipos de *C. arabica* por meio de híbridos naturais entre as duas espécies.

Os locos B (marcadores CaRHv8 e SSR 16) e C (marcador CarHv9) correspondem a genes maiores de resistência presente no Híbrido de Timor e que confere resistência às raças I, II e patotipo 001 de *H. vastatrix*. O loco D (marcador CARF 005) também está presente na fonte de resistência Híbrido de Timor e foi clonada comprovando domínios conservados de genes de resistência de plantas a patógenos (RGA- Análogo de Gene de Resistência). O gene de resistência a CBD (loco E), identificado em Híbrido de Timor, foi monitorado pelos marcadores Sat 235 e Sat 207 (Tabela 3).

Do total de 175 plantas avaliadas com base nos marcadores moleculares (Tabela 4), 18 indivíduos (10,34%) apresentaram o alelo de resistência para o gene  $S_H3$  (loco A), sendo todos em homozigose (Aa). Entre os cafeeiros contendo o alelo de resistência para esse gene estão um dos indivíduos de Pacamara 1 (proveniente de El Salvador e do grupo genético Bourbon-Típica), um Pacamara 4 (Honduras, grupo Bourbon-Típica), o cafeeiro de Pacas 1 (El Salvador, grupo Bourbon-Típica), dois Pacas 2 (El Salvador, grupo Bourbon-Típica), um Geisha (Honduras, grupo Bourbon-Típica), três Catimor\_8667 (Honduras, grupo Catimor), três Catimor 4 (República Dominicana, grupo Catimor), três Colismor (Guatemala, grupo Catimor), dois IHCAFE\_90E (Honduras, grupo Catimor) e um San\_Isidro\_S48 (Guatemala, grupo Catimor). Dessa forma, estão incluídos cafeeiros dos cinco países e dos três grupos genéticos.

**Tabela 3.** Marcadores moleculares utilizados, que estão ligados a genes que conferem resistência a *Hemileia vastatrix* e a *Colletotrichum kahawae*.

Resistência	Loco	Gene	Marcador	Tipo	Distância (cM)	Marcação
<i>Hemileia vastatrix</i>	A	S <sub>H</sub> 3	SAT 244	SSR	0	Codominante
			BA-124 -12K-f	SCAR	0	Dominante
	B	Gene/QTL-GL2	CaRHv8	SCAR	3	Dominante
			SSR 016	SSR	3.7	Codominante
	C	Gene/QTL-GL5	CaRHv9	SCAR	2.3	Dominante
	D	NB-ARC e LRR	CARF 005	Específico	.	Dominante
<i>Colletotrichum kahawae</i>	E	Ck-1	SAT 235	SSR	0	Codominante
			SAT 207	SSR	17.2	Codominante

SSR: Simple sequence repeat; SCAR: Sequence Characterized Amplified Regions; CAPS: Cleaved Amplified Polymorphic Sequence

**Tabela 4.** Genótipos obtidos com a utilização de marcadores moleculares associados aos genes de resistência do cafeeiro a *Hemileia vastatrix*: *S<sub>H3</sub>* (Loco A), QTL para resistência as raças I, II e patótipo 001 (Loco B e C), NB-ARC e LRR (Loco D); e a *Colletotrichum kahawae* gene Ck-1 (Loco E).

Indivíduo	Genótipo	Indivíduo	Genótipo	Indivíduo	Genótipo
Pacamara_1A <sup>5*</sup>	aabbC_D_EE	San_Pacho <sup>5*</sup>	aaBbC_ddEe	Catimor_3E <sup>1**</sup>	aaBBC_D_ee
Pacamara_1B <sup>5*</sup>	aabbC_D_ee	San_Pacho_1A <sup>5*</sup>	aabbC_D_Ee	Catimor_3F <sup>1**</sup>	aaBbccddee
Pacamara_1C <sup>5*</sup>	aabbccD_Ee	San_Pacho_1B <sup>5*</sup>	aabbC_D_Ee	Catimor_8667_A <sup>3**</sup>	aaBbccddEe
Pacamara_1D <sup>5*</sup>	aabbccD_Ee	San_Pacho_1C <sup>5*</sup>	aabbC_D_Ee	Catimor_8667_B <sup>3**</sup>	aaBbccddEe
Pacamara_1E <sup>5*</sup>	aabbccD_EE	San_Pacho_1D <sup>5*</sup>	aabbccdde	Catimor_8667_C <sup>3**</sup>	AaBbccddEe
Pacamara_1F <sup>5*</sup>	AabbccddEe	San_Pacho_1E <sup>5*</sup>	aabbC_D_Ee	Catimor_8667_D <sup>3**</sup>	AaBBccddEe
Pacamara_2A <sup>5*</sup>	aabbccD_Ee	San_Pacho_1F <sup>5*</sup>	aabbC_D_Ee	Catimor_8667_E <sup>3**</sup>	aaBBC_ddEe
Pacamara_2B <sup>5*</sup>	aabbccD_Ee	San_Pacho_2A <sup>5*</sup>	aabbC_D_Ee	Catimor_8667_F <sup>3**</sup>	AaBbC_ddEe
Pacamara_2C <sup>5*</sup>	aabbccD_Ee	San_Pacho_2B <sup>5*</sup>	aabbC_D_Ee	Catimor_T5175_A <sup>3**</sup>	aabbccdde
Pacamara_2D <sup>5*</sup>	aabbccD_Ee	San_Pacho_2C <sup>5*</sup>	aabbC_D_Ee	Catimor_T5175_B <sup>3**</sup>	aabbccdde
Pacamara_2E <sup>5*</sup>	aaBbC_D_ee	San_Pacho_2D <sup>5*</sup>	aaBbC_D_Ee	Catimor_T5175_C <sup>3**</sup>	aabbccdde
Pacamara_2F <sup>5*</sup>	aaBbC_D_Ee	San_Pacho_2E <sup>5*</sup>	aabbC_D_Ee	Catimor_T5175_D <sup>3**</sup>	aabbccdde
Pacamara_3 <sup>5*</sup>	aaBbccD_ee	San_Pacho_2F <sup>5*</sup>	aabbC_D_Ee	Catimor_T5175_E <sup>3**</sup>	aabbccdde
Pacamara_4A <sup>3*</sup>	aabbC_D_EE	San_Pacho_3A <sup>5*</sup>	aabbC_D_Ee	Catimor_T5175_F <sup>3**</sup>	aabbccdde
Pacamara_4B <sup>3*</sup>	aaBbC_D_Ee	San_Pacho_3B <sup>5*</sup>	aabbccdde	Catimor_5175 <sup>4**</sup>	aaBBC_D_Ee
Pacamara_4C <sup>3*</sup>	aaBbC_D_Ee	San_Pacho_3C <sup>5*</sup>	aabbccdde	Catimor_5175 <sup>4**</sup>	aaBBC_D_Ee
Pacamara_4D <sup>3*</sup>	AabbC_D_EE	San_Pacho_3D <sup>5*</sup>	aabbC_D_Ee	Catimor_1A <sup>4**</sup>	aaBbccD_Ee
Pacamara_4E <sup>3*</sup>	aabbC_D_Ee	San_Pacho_3E <sup>5*</sup>	aaBbccdde	Catimor_1B <sup>4**</sup>	aaBBC_D_Ee
Pacamara_4F <sup>3*</sup>	aaBbC_D_Ee	San_Pacho_3F <sup>5*</sup>	aabbC_D_ee	Catimor_2A <sup>4**</sup>	aaBBccD_Ee
Pacas_1A <sup>5*</sup>	AaBbccD_Ee	Bourbon_A <sup>5*</sup>	aabbccdde	Catimor_2B <sup>4**</sup>	aaBBC_D_EE
Pacas_2A <sup>5*</sup>	aaBbC_ddEe	Bourbon_B <sup>5*</sup>	aabbccdde	Catimor_2C <sup>4**</sup>	aaBBC_D_ee
Pacas_2B <sup>5*</sup>	A_bbC_ddEe	Bourbon_C <sup>5*</sup>	aabbccdde	Catimor_2D <sup>4**</sup>	aaBBC_D_Ee
Pacas_2C <sup>5*</sup>	AabbccddEe	Bourbon_D <sup>5*</sup>	aabbccdde	Catimor_2E <sup>4**</sup>	aaBbC_D_ee
Pacas_2D <sup>5*</sup>	aabbccddEe	Bourbon_E <sup>5*</sup>	aabbccdde	Catimor_2F <sup>4**</sup>	aaBBC_ddEe
Pacas_2E <sup>5*</sup>	aabbccddEe	Bourbon_F <sup>5*</sup>	aabbccdde	Catimor_4A <sup>1**</sup>	aaBbccdde
Pacas_2F <sup>5*</sup>	aaBbccddEe	Catimor_3A <sup>1**</sup>	aaBBC_D_ee	Catimor_4B <sup>1**</sup>	aaBbccdde
Geisha_A <sup>3*</sup>	aaBbC_ddee	Catimor_3B <sup>1**</sup>	aaBbC_D_ee	Catimor_4C <sup>1**</sup>	aaBBccdde
Geisha_B <sup>3*</sup>	aaBbC_ddEe	Catimor_3C <sup>1**</sup>	aaBbccdde	Catimor_4D <sup>1**</sup>	aaBBccdde
Geisha_C <sup>3*</sup>	AaBbC_ddEe	Catimor_3D <sup>1**</sup>	aaBBC_D_ee	Catimor_4E <sup>1**</sup>	aaBbccdde

<sup>1</sup>República Dominicana <sup>2</sup>Costa Rica <sup>3</sup>Honduras <sup>4</sup>Guatemala <sup>5</sup>El Salvador \*Bourbon-Típica \*\*Catimor \*\*\*Sarchimor \*\*\*\*Híbrido

Continuação Tabela 4.

Indivíduo	Genótipo	Indivíduo	Genótipo	Indivíduo	Genótipo
Colismor_A4**	AaBBccD_Ee	IHCAFE_90F3**	AaBBC_ddEe	Centroamericano_F3D3****	aabbC_D_Ee
Colismor_B4**	AaBbccddEe	Anacafe_A4**	aaBBC_D_Ee	Centroamericano_F3E3****	aabbC_D_Ee
Colismor_C4**	AaBbccddEe	Anacafe_B4**	aaBBC_D_Ee	Centroamericano_F3F3****	aabbC_D_Ee
Colismor_D4**	aabbccddEe	Anacafe_C4**	aaBBC_D_Ee	Sarchimor_A4***	aaBBC_D_Ee
Colismor_E4**	aaBbccddEe	Anacafe_D4**	aaBBC_D_Ee	Sarchimor_B4***	aaBBccD_Ee
Colismor_F4**	aaBBcD_Ee	Anacafe_E4**	aaBBC_D_EE	Sarchimor_C4***	aaBBccD_Ee
Guapa_A4**	aaBbccD_Ee	Anacafe_F4**	aaBBC_D_Ee	Sarchimor_D4***	aaBbccD_Ee
Guapa_B4**	aaBbccD_EE	CR95_IZALCO_A5**	aaBBccdee	Sarchimor_E4***	aabbccddEe
Guapa_C4**	aaBbccD_ee	CR95_IZALCO_B5**	aaBBC_D_ee	Sarchimor_F4***	aaBbccD_Ee
Guapa_D4**	aaBbccD_Ee	CR95_IZALCO_C5**	aaBBccdee	Cuscatleco_1A5***	aaBBC_D_ee
Guapa_E4**	aaBBC_D_Ee	CR95_IZALCO_D5**	aaBBccdee	Cuscatleco_1B5***	aaBBC_D_Ee
Guapa_F4**	aaBBC_D_Ee	CR95_IZALCO_E5**	aaBBccD_ee	Cuscatleco_1C5***	aaBbccD_ee
Lempira_1A3**	aaBbC_ddee	CR95_IZALCO_F5**	aaBbccdee	Cuscatleco_1D5***	aaBBccD_Ee
Lempira_1B3**	aaBBC_ddEe	CR_952**	aaBBC_D_ee	Cuscatleco_1E5***	aaBbccD_Ee
Lempira_1C3**	aaBbC_ddEe	Catigua_MG2A4****	aaBBC_D_Ee	Cuscatleco_1F5***	aaBbccD_Ee
Lempira_1D3**	aabbC_ddEe	Catigua_MG2B4****	aaBBC_D_Ee	Cuscatleco_2A5***	aaBbC_D_Ee
Lempira_1E3**	aaBBccddEe	Catigua_MG2C4****	aaBBC_D_ee	Cuscatleco_2B5***	aaBbC_D_Ee
Lempira_1F3**	aaBBccddEe	Catigua_MG2D4****	aaBbC_D_Ee	Cuscatleco_2C5***	aaBbC_D_Ee
Lempira_2A3**	aaBBccdde	Catigua_MG2E4****	aaBBC_D_EE	Cuscatleco_2D5***	aaBBC_D_Ee
Lempira_2B3**	aaBBccdde	Catigua_MG2F4****	aaBBccD_Ee	Cuscatleco_2E5***	aaBbC_D_Ee
Lempira_2C3**	aaBBccdde	Centroamericano_F2A3****	aaBbccdde	Cuscatleco_2F5***	aaBBC_D_EE
Lempira_2D3**	aaBBccdde	Centroamericano_F2B3****	aaBbC_D_ee	San_Isidro_S482***	aaBBC_D_Ee
Lempira_2E3**	aaBBccdde	Centroamericano_F2C3****	aabbC_D_Ee	San_Isidro_S482***	aaBBC_D_EE
Lempira_2F3**	aaBBccdde	Centroamericano_F2D3****	aaBBC_D_Ee	San_Isidro_S482***	AaBBccD_Ee
IHCAFE_90A3**	aaBBC_D_Ee	Centroamericano_F2E3****	aaBBC_D_Ee	San_Isidro_S482***	aaBBC_D_Ee
IHCAFE_90B3**	aaBBC_D_Ee	Centroamericano_F2F3****	aaBBC_D_Ee	San_Isidro_S483***	aaBBC_D_Ee
IHCAFE_90C3**	aaBBcD_Ee	Centroamericano_F3A3****	aabbC_D_Ee	Parainema_Apical3***	aaBBC_D_ee
IHCAFE_90D3**	aaBBC_D_ee	Centroamericano_F3B3****	aabbC_D_EE	Parainema_A3***	aaBBC_D_ee
IHCAFE_90E3**	AaBBccdde	Centroamericano_F3C3****	aabbC_D_Ee	Parainema_B3***	aaBBC_D_Ee

<sup>1</sup>República Dominicana <sup>2</sup>Costa Rica <sup>3</sup>Honduras <sup>4</sup>Guatemala <sup>5</sup>El Salvador \*Bourbon-Típica \*\*Catimor \*\*\*Sarchimor \*\*\*\*Híbrido

Para os marcadores do loco B, 40,57% dos indivíduos apresentaram o alelo de resistência em homozigose dominante (BB), 28% em heterozigose (Bb) e 31,43% em homozigose recessiva (bb). No loco C, o alelo de resistência (C\_) foi observado em 54,29% e o alelo homozigoto recessivo (cc) representou 45,71% dos indivíduos. Do total de cafeeiros analisados, 147 apresentaram alelo de resistência em pelo menos um dos locos que conferem resistência às raças I, II, ou patótipo 001 de *H. vastatrix* (Tabela 4). Vinte e oito cafeeiros não apresentaram o alelo de resistência em nenhum dos dois locos (bbcc), sugerindo que esses indivíduos são suscetíveis a raça II, predominante no continente americano. Entre esses cafeeiros estão indivíduos das cultivares Pacamara 1, Pacas 2, San Pacho 3, Bourbon e Catimor T5175, que quando fenotipados com raça II de *H. vastatrix* apresentaram susceptibilidade (Tabela 2). Dessa forma, os dados genotípicos confirmam a susceptibilidade observada na inoculação. Quatro indivíduos da cultivar Pacamara 2 não apresentaram alelos de resistência para esses dois QTL, no entanto, foram resistentes quando inoculados com *H. vastatrix*. Esses dados sugerem que, além dos dois QTL, devem existir outros locos que conferem resistência a raça II do patógeno. Os resultados obtidos evidenciam a importância na complementariedade das informações encontradas na fenotipagem e utilização de marcadores moleculares para compreender a resistência do cafeeiro.

Para o gene RGA clonado, observou-se a presença do alelo de resistência em 62,86% dos indivíduos (D\_) (Tabela 4). Considerando os quatro locos de resistência para ferrugem, observou-se que 18 cafeeiros não apresentaram alelos de resistência em nenhum loco (aabbccdd) e 32% dos indivíduos tem a presença do alelo de resistência nos três locos (A\_B\_C\_) (Tabela 4). A caracterização molecular mostra a segregação desses diferentes locos dentro e entre as cultivares da América Central analisadas. Além disso, foi possível detectar a piramidação de alelos de resistência em vários cafeeiros, o que é desejado para obtenção de resistência durável a doença.

Nas análises para determinar a presença do gene que confere resistência a *Colletotrichum kahawae* (CBD), foi observado que 6,29% indivíduos apresentaram o alelo de resistência em homozigose (EE), 60,57% em heterozigose (Ee) e 33,14% em homozigose recessiva (ee), ou seja, não apresentam resistência a CBD (Tabela 4).

A análise conjunta dos cinco genes de resistência, considerando os diferentes grupos genéticos estudados, foi verificado que:

### **A) Grupo Bourbon-Típica**

Para a cultivar Pacamara, do total de 19 indivíduos, 10% apresentaram o alelo de resistência para o gene  $S_{H3}$  (loco A), 32% para o loco B em heterozigose (Bb) e 68% para o loco B em homozigose recessiva (bb). O alelo de resistência no loco C (C\_) foi observado em 53% dos indivíduos e no loco D em 95%. Para resistência a CBD, o alelo de resistência em heterozigose (Ee) foi encontrado em 64% dos indivíduos e 21% em homozigoze dominante (EE). Da combinação de locos nos indivíduos para resistência ferrugem, 31% tem a presença de três locos e 26% tem a presença de dois locos (Tabela 4).

Para a cultivar Pacas, do total de sete indivíduos, 43% apresentaram o alelo para  $S_{H3}$  (loco A), 43% o loco B de maneira heterozigota (Bb), 29% o loco C\_, e 14% o loco D. Para o loco de resistência a CBD, 100% dos indivíduos apresentaram o alelo de resistência em heterozigose. Da combinação de locos nos indivíduos para resistência a ferrugem, 14% revelaram a presença de três locos para resistência a ferrugem enquanto 29% apresentaram dois locos, 29% dos indivíduos não apresentam locos.

Dos três indivíduos da cultivar Geisha, todos apresentaram pelo menos um gene de resistência, sendo obtidos os seguintes genótipos: aabbC\_D\_Ee; aaBbC\_ddEe; AaBbC\_ddEe.

Para San Sacho, do total de 19 indivíduos, nenhum dos indivíduos analisados apresentou o alelo de resistência para  $S_{H3}$  (loco A). Para o loco B, 16% apresentaram o loco heterozigoto (Bb) e 84% loco homozigoto recessivo (bb). O genótipo C\_ foi observado em 79% dos indivíduos, enquanto D\_ em 74%. O loco de resistência a CBD apresentou-se de maneira heterozigota (Ee) em 74% dos indivíduos e 26% como homozigoto dominante (EE). Da combinação de locos que conferem resistência a ferrugem, 5% apresentaram alelos de resistência em três locos e 74% em dois locos. Do total de indivíduos 16 % apresentaram seu genótipo de maneira recessiva para todos os locos de resistência a doença.

Já o cultivar Bourbon, quando analisado com os diferentes marcadores para determinar a presença de locos que possam conferir resistência a doenças, se evidenciou por não apresenta nenhum loco, é uma cultivar suscetível a ferrugem e diante de uma eventual entrada do CBD na América não apresentaria resistência.



## B) Grupo Catimor

As cultivares Lempira, CR95 e Catimor 8667, possuem a mesma origem genética. Do total de 25 indivíduos, três possuíram o alelo para  $S_H3$  (loco A), sendo uma exceção. Para o loco B, 68% dos indivíduos apresentaram-se como BB, 28% Bb e 4% bb. O loco C revelou-se em 32% dos indivíduos. Já o loco D se apresentou em 12% dos indivíduos. O loco E, de resistência a CBD apresentou-se de maneira heterozigota (Ee) 44%. Da combinação de locos nos indivíduos para resistência a ferrugem, 12% apresentaram três locos, 32% dois e 56% um loco, demonstrando que aqueles indivíduos que tem menos locos de resistência a ferrugem, apresentam maiores possibilidade da suplantação de genes pelo fungo *H. vastatrix*, como já reportado para Lempira em Honduras no ano 2017 (León-Gómez, 2017) e CR-95 em Costa Rica e Guatemala no 2019 (Cedicafe, 2019).

As cultivares Anacafé, IHCAFE90, Catimor e Catimor T5175, possuem a mesma origem genética. Do total de 39 indivíduos, dois possuíram o alelo para  $S_H3$  (loco A), sendo uma exceção. Para o loco B, 64% dos indivíduos apresentaram o loco BB, 21% o Bb e 15% bb. Do total de indivíduos, 56% tem o loco C\_, 59% o loco D de resistência a ferrugem. Para CBD, 44% apresentaram Ee e 5% de maneira homozigota dominante (EE). Da combinação de locos para resistência a ferrugem 54% dos indivíduos revelaram-se com três locos, enquanto 13% com dois e 18% um loco. Quinze por cento dos indivíduos não apresentaram pelo menos um loco que confere resistência a ferrugem. Mostra que indivíduos que possuem uma menor quantidade de locos de resistência a ferrugem, apresentam maiores possibilidades de susceptibilidade a *H. vastatrix*. Catimor T5175, apresenta locos de maneira homozigota recessiva, caracterizando a mesma como suscetível, evidenciado quando fenótipo com as raça II e XXXII de *H. vastatrix*.

O cultivar Colismor, do total de 6 indivíduos, três possuem o alelo para  $S_H3$  (loco A), sendo uma exceção. Para o loco B, os indivíduos apresentaram-se como BB (53%), Bb (50%) e bb (17%). Todos os indivíduos apresentaram o loco cc, enquanto 33% apresentaram o loco D. Para CBD revelou-se presença do loco em 100% dos indivíduos de maneira heterozigota (Ee). Da combinação de locos que conferem resistência a ferrugem 17% tem a presença de três locos, 50% de dois e 17% um loco.

A cultivar Guapa, do total de 6 indivíduos, nenhum apresentou o alelo para  $S_H3$  (loco A). Para o loco B os indivíduos apresentaram-se como, 33% (BB) e 67% (Bb). O

loco C foi revelado em 33% dos indivíduos, enquanto o loco D em todos. Somente 17% apresentaram o loco de resistência a CBD de maneira homocigota dominante (EE), 67% heterocigota (Ee) e 17% homocigoto recessivo. Da combinação de locos para resistência a ferrugem, 33% têm a presença de três locos e 67% de dois locos.

### **C) Grupo Sarchimor**

Parainema, originaria de Honduras, do total de 3 indivíduos, nenhum apresentou o alelo para  $S_{H3}$  (loco A). No entanto, 100% dos indivíduos revelaram o loco BB, o loco C\_, e loco D. Para resistência ao CBD, 33% dos indivíduos apresentaram loco de maneira heterocigota (Ee) e 67% homocigoto recessivo (ee). Da combinação de locos nos indivíduos 100% revelaram três locos para resistência a ferrugem.

A cultivar Sarchimor, apresentou do total de 6 indivíduos, nenhum loco para  $S_{H3}$  (loco A). Em contrapartida, 60% dos indivíduos revelaram o loco BB e 40% Bb. O loco C\_ se apresentou em 20% dos indivíduos, enquanto o loco D em 100%. Para o loco de resistência a CBD, todos os indivíduos se apresentaram de maneira heterocigota (Ee). Da combinação de locos para resistência a ferrugem, 20% têm a presença de três locos e 80% têm presença de dois locos.

Cuscatleco originada de El Salvador, de 12 indivíduos, nenhum apresentou o alelo para  $S_{H3}$  (loco A). Quase a metade (42%) dos indivíduos se apresentaram como BB e 58% como Bb. O loco C\_ se revelou em 66%, e loco D em todos os indivíduos. O loco de resistência a CBD foi apresentado de maneira heterocigota (Ee) em 75% dos indivíduos, homocigota dominante (EE) em 8% e homocigota recessiva (ee) em 16%. Da combinação de locos para resistência a ferrugem 67% tem a presença de três locos para resistência a ferrugem e 33% têm presença de dois locos.

O cultivar San Isidro S48, de 6 indivíduos, um (16%) mostrou o alelo para  $S_{H3}$  (loco A). Todos os indivíduos possuíram o loco BB, 83% o loco C\_, e 100% o loco D. Para resistência a CBD, os locos se apresentaram de maneira heterocigota (Ee) em 83% dos indivíduos e homocigota dominante (EE) em 17%. Da combinação de locos nos indivíduos 100% apresentou três locos de resistência para ferrugem.

Do total de 12 indivíduos para a cultivar Centroamericano, nenhum possui o alelo para  $S_{H3}$  (loco A). Para o loco B, 25% dos indivíduos apresentaram-se como BB e 17% de maneira heterocigota (Bb). O loco C\_ se revelou em 92% dos indivíduos, a mesma porcentagem foi obtida para o loco D. O loco de resistência a CBD se

apresentou de maneira heterozigota (Ee) em 75% dos indivíduos e 17% como homozigota dominante (EE). Da combinação de locos nos indivíduos 33% tem a presença de três locos e 58% têm presença de dois locos para resistência a ferrugem

#### **D) Grupo Híbrido**

Para a cultivar Catiguá MG2, do total de 6 indivíduos, nenhum apresentou o alelo para S<sub>H3</sub> (loco A). O loco B foi apresentado para 83% dos indivíduos como BB e para 17% de maneira heterozigota (Bb). A maioria (83%) dos indivíduos apresentaram o loco C<sub>-</sub>, enquanto todos apresentaram o loco D. os locos de resistência para CBD foram apresentados de maneira heterozigota (Ee) em 66% dos indivíduos e homozigota dominante (EE) em 17%. Da combinação de locos 83% tem a presença de três locos e 17% de dois locos para resistência a ferrugem.

#### **4. Discussão**

Por muitos anos, a cafeicultura da América Central e Caribe tiveram preferência por utilizarem cultivares de *C. arabica* do grupo genético Típica-Bourbon. Esse grupo genético é constituído por cafeeiros que não possuem introgressão de genes de outras espécies, sendo considerados arábicas puras, e, em geral, são suscetíveis às principais pragas e doenças. A preferência dos cafeicultores por esse grupo está no potencial dos cafeeiros para qualidade de bebida, característica importante e que define o valor a ser pago pelo produto (Melese & Kolech, 2021; Monge & Guevara, 2000). A partir dos anos 2012-2013, devido a epidemia de ferrugem ocorrida na região (Avelino et al., 2015; Zambolim & Caixeta, 2021), os produtores passaram a buscar e plantar cultivares com resistência a *H. vastatrix*. Dentre os materiais genéticos disponíveis para substituir os cafeeiros suscetíveis estavam os Catimores e Sarchimores (Anzueto, 2019). Cultivares desses grupos foram desenvolvidas a partir da introgressão de genes de resistência a doenças da espécie *C. canephora*. Para a obtenção das cultivares, os melhoristas cruzaram cafeeiros do grupo Típica-Bourbon, para manter as características morfoagronômicas e qualidade de bebidas desses genótipos, com híbridos interespecíficos naturais contendo os genes de resistência. Tanto o Catimor quanto o Sarchimor foram originados do Híbrido de Timor (híbrido natural entre *C. arabica* e *C. canephora*), que apresentam genes que conferem resistência a patógenos como *H. vastatrix* e nematoides (Setotaw et al., 2013; Zambolim & Caixeta, 2021) e que tem um alto potencial nos programas de

melhoramento pela presença de genes que conferem resistência a fatores bióticos e abióticos que afetam a produção de café.

Esse estudo evidencia que muitas cultivares plantadas na América Central possuem resistência ou tolerância a raça II de *H. vastatrix*, até mesmo alguns cafeeiros do grupo Típica-Bourbon. No entanto, raças mais complexas, que apresentam maior número de genes de virulência, como a raça XXXIII, tendem a suplantar a resistência de algumas cultivares (Tabela 2). Essa suplantação foi observada para as cultivares Catimor 4, Lempira 2, Colismor, San Pacho e CR95 Izalco, que foram resistentes à raça II, porém, suscetível à raça XXXIII (Tabela 2). A incorporação de novas cultivares resistentes a ferrugem tem modificado o parque cafeeiro da América Central (Anacafé, 2021). Esse fato promove uma pressão de seleção no patógeno, suplantando os genes de resistência e ocasionando o aparecimento de novas raças mais complexas de *H. vastatrix* (Zambolim & Caixeta, 2021).

Dessa forma, apesar de a maioria das cultivares analisadas terem apresentado resistência à ferrugem (83% cultivares a raça II e 72% a raça XXXIII), existe uma preocupação de suplantação da resistência, o que motiva a busca por cafeeiros com resistência durável. Uma das estratégias para obtenção de cultivar com resistência durável é o acúmulo de alelos de resistência em diferentes locos, o denominado piramidação gênica. Essa piramidação foi analisada no presente trabalho por meio de marcadores moleculares, sendo possível identificar cafeeiros contendo diferentes combinações de genes de resistência à ferrugem e ao CBD. A utilização de cultivares com resistência a ferrugem é importante e proporciona um manejo eficiente da doença, contribuindo para o sucesso na produção.

Além de analisar a resistência qualitativa, no presente trabalho, os cafeeiros foram avaliados quanto a diferentes componentes quantitativos. Dessa forma, os indivíduos que apresentaram susceptibilidade a ferrugem foram analisados quanto ao período de latência, período de incubação, incidência, severidade, quantidade de uredosporos e área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD).

O período de latência está estreitamente relacionado com a taxa de multiplicação do patógeno, uma vez que períodos pequenos aumentam o número de ciclos de multiplicação e, conseqüentemente, resultam em intensidade da doença (Vale et al., 2001). Apesar de sua importância, as cultivares analisadas nesse nosso

estudo, não diferiram estatisticamente em relação a essa característica, levando em consideração o período máximo de 34 dias. Para os componentes de incidência e severidade, existe uma relação direta com a produção de uredosporos, onde uma maior incidência resulta em maior severidade e maior produção de uredosporos (Figuras 4 e 5).

Avaliar resistência quantitativa muitas vezes dificulta a interpretação da informação, mas utilizar o parâmetro de AACPD, permite estimar a gravidade acumulada da doença sem ter que considerar a interação do genótipo x ambiente (Vale et al., 2001). Para a raça II (Figura 4), a cultivar Bourbon apresentou a AACPD maior, mas essa não diferiu estatisticamente das cultivares Catimor T5175, Pacas2 e San Pacho 3. Já para raça XXXIII (Figura 5), a AACPD maior foi para Pacas 2 e Bourbon, que diferiram estatisticamente das outras cultivares suscetíveis. Deve-se monitorar a variável AACPD, visando evitar a taxa de acumulação de aparecimento de novas epidemias que possam afetar novamente a produção de café.

Diante desse panorama, o aparecimento de novas raças ou patótipos de *H. vastatrix* são cada vez mais complexas, com capacidade de suplantar a resistência das cultivares de café. Esse fato pode dever-se a mudanças no parque cafeeiro da América Central, que possui fontes de resistência proveniente dos Híbridos de Timor, que permite uma suplantação, por fatores coevolução planta-patógeno. Assim é importante conhecer o genótipo ou a presença do loco para conferir resistência do café ao patógeno *H. vastatrix*. Entender a teoria proposta por Flor em 1942, a qual indica que “para cada gene de resistência no hospedeiro, há um gene de avirulência no patógeno”, é que permite explicar a resistência nas plantas (Flor, 1971).

Com base nessa teoria, para que um patógeno consiga suplantar a resistência de genótipos como os identificados nesse trabalho, que contêm pelo menos três ou quatro genes de resistência, é necessário que ocorra mutação de três ou quatro genes de avirulência do fungo, dificultando sua interação com o hospedeiro. Agrupamento de genes em um mesmo indivíduo evidencia piramidação, desejada no melhoramento de novas cultivares, sendo a melhor forma de obter vários locos que ofereçam resistência vertical a patógenos que causam doenças no cafeeiro (Cui et al., 2020). Essa técnica segue a premissa de que é raro uma raça conter todos os genes de virulência, o que permite que a resistência seja mais duradoura (Zambolim & Caixeta, 2021).

Além da piramidação gênica, os marcadores moleculares utilizados permitiram observar homozigose e heterozigose em alguns locos estudados. Para o gene *ck-1* que conferem resistência a CBD, em 175 indivíduos analisados, 6,25% têm o loco de forma homozigota dominante (EE) e 57% de forma heterozigota (Ee). Muitos deles são promissores para conferir resistência ao patógeno. Considerando que a doença se encontra quarentenária na América, esse controle preventivo pode ser muito útil diante de uma eventual entrada do patógeno no continente (Cui et al., 2020).

Uma grande descoberta é a presença de genes de resistência *S<sub>H3</sub>*, em indivíduos do grupo genético Catimor e Sarchimor, devido ao fato desse gene conferir uma resistência duradoura a *H. vastatrix* (Gutiérrez-Calle et al., 2021). Esses indivíduos são promissores nos programas de melhoramento como fontes de resistência à ferrugem.

No caso de cultivares do grupo Catimor que só possuem um gene em algum dos locos que conferem resistência a ferrugem, por exemplo Catimor 4 (loco B) e Lempira 2 (loco B), apresentam uma maior possibilidade da resistência ser suplantada, como verificado para o cultivar Lempira em Honduras no ano 2017 (León-Gómez, 2017). Esse fato explica a preocupação de produtores em evidenciar a presença do fungo nos cultivares pela suplantação da resistência, vai precisar de um manejo e monitoriamento mas rigoroso para diminuir o avance da doença nas plantações de essas cultivares.

Os Sarchimores têm a particularidade de apresentar mais genes de resistência a ferrugem, por exemplo as cultivares Cuscatleco e Parainema que possuem alelos de resistência nos dois QTL (B<sub>-</sub> e C<sub>-</sub>) e no gene clonado (D<sub>-</sub>). Esse fato explica por que as cultivares derivadas de Catimor estão se tornando suscetíveis a ferrugem e as derivadas de Sarchimor continuam como resistente, visto que quanto ao loco para CBD o Sarchimor possui o alelo de resistência e o Catimor em geral não apresenta.

Esses resultados mostram que existem variedades para enfrentar o problema atual de doenças no parque cafeiteiro da América, mas os trabalhos de fenotipagem com raças de *H. vastatrix* devem ser realizados para identificar susceptibilidade a novas raças ou patótipos (Anzueto, 2019), além disso, deve-se ter uma complementariedade com marcadores moleculares que identificam o loco que confere resistência a doenças. Isso permite ter uma rastreabilidade e garantir a autenticidade da cultivar.

A falta do conhecimento genético molecular das cultivares utilizadas na América Central quanto a resistência a doenças, dificulta compreender a resistência completa, resistência incompleta e a possível piramidação de genes, com a finalidade de limitar a evolução do patógeno (León-Gómez, 2017). Com o presente trabalho, essa informação tende a ser esclarecida, graças a utilização da fenotipagem do material genético com duas raças de *H. vastatrix*, complementada com a genotipagem (utilização de marcadores moleculares), que permite elucidar a presença desses locos que conferem resistência, não só a ferrugem, mas também a CBD, anterior a uma eventual entrada na América.

## 5. Conclusões

1. Das 36 cultivares da América Central analisadas para resistência a *H. vastatrix*, 30 são resistentes à raça II e 26 à raça XXXIII do fungo.
2. As cultivares Catimor 4 da República Dominicana, Lempira 2 de Honduras, Colismor da Guatemala e San Pacho de El Salvador, apesar de apresentarem resistência à raça II de *H. vastatrix*, são suscetíveis à raça XXXIII, que é mais complexa.
3. Na genotipagem, os cafeeiros apresentam variabilidade e possuem alelos que conferem resistência a *H. vastatrix*, complementando os resultados da fenotipagem.
4. Diferentes combinações dos alelos de resistência são encontradas quando são analisados os quatro locos associados a resistência a *H. vastatrix*, sendo observado genótipos contendo alelos de resistência em todos os locos até genótipos sem nenhum alelo de resistência.
5. Com base no marcador molecular associado ao gene *Ck-1*, a maioria dos cafeeiros analisados (63,25%) possui alelo de resistência a CBD.
6. Nenhum alelo de resistência foi encontrado nos cafeeiros das cultivares Bourbon de El Salvador e Catimor T5175 de Honduras, confirmando as análises de inoculação das plantas, onde esses genótipos foram suscetíveis.
7. Piramidação gênica de diferentes alelos de resistência a *H. vastatrix* e *C. kahawae* estão presentes entre as cultivares plantadas na América Central.

## Referências

- Alkimim, E. R., Caixeta, E. T., Sousa, T. V., Pereira, A. A., de Oliveira, A. C. B., Zambolim, L., & Sakiyama, N. S. (2017). Marker-assisted selection provides arabica coffee with genes from other *Coffea* species targeting on multiple resistance to rust and coffee berry disease. *Molecular Breeding*, 37(1), 6. <https://doi.org/10.1007/s11032-016-0609-1>
- Almeida, D., Caixeta, E. T., Moreira, K. F., de Oliveira, A. C. B., de Freitas, K. N. P., Pereira, A. A., Rosado, R. D. S., Zambolim, L., & Cruz, C. D. (2021). Marker-Assisted Pyramiding of Multiple Disease Resistance Genes in Coffee Genotypes (*Coffea arabica*). *Agronomy*, 11(9), 1763. <https://doi.org/10.3390/agronomy11091763>
- Alvarenga, S. M., Caixeta, E. T., Hufnagel, B., Thiebaut, F., Maciel-Zambolim, E., Zambolim, L., & Sakiyama, N. S. (2011). Marcadores moleculares derivados de sequências expressas do genoma café potencialmente envolvidas na resistência à ferrugem. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 46(8), 890–898. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2011000800015>
- Anacafé. (2021). Guía de Variedades de café y selección de semilla. 4, 71. <https://www.anacafe.org/manuales/guia-de-variedades-de-cafe-guatemala/>
- Anzueto, F. R. (2019). Variedades de café, estrategias de manejo y riesgos de afectación por roya del café. In E. Bellos Baltazar, L. Soto Pinto, G. Huerta Palacios, & J. Gómez Riuz (Eds.), *Caminar el cafetal: Perspectivas socioambientales del café y su gente*. (Primera, pp. 97–113).
- Avelino, J., Cristancho, M., Georgiou, S., Imbach, P., Aguilar, L., Bornemann, G., Läderach, P., Anzueto, F., Hruska, A. J., & Morales, C. (2015). The coffee rust crises in Colombia and Central America (2008–2013): impacts, plausible causes and proposed solutions. *Food Security*, 7(2), 303–321. <https://doi.org/10.1007/s12571-015-0446-9>
- Boudrot, A., Pico, J., Merle, I., Granados, E., Vílchez, S., Tixier, P., Filho, E. de M. V., Casanoves, F., Tapia, A., Allinne, C., Rice, R. A., & Avelino, J. (2016). Shade Effects on the Dispersal of Airborne *Hemileia vastatrix* Uredospores. *Phytopathology*, 106(6), 572–580. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-02-15-0058-R>
- Brito, G. G., Caixeta, E. T., Gallina, A. P., Zambolim, E. M., Zambolim, L., Diola, V., & Loureiro, M. E. (2010). Inheritance of coffee leaf rust resistance and identification of AFLP markers linked to the resistance gene. *Euphytica*, 173(2), 255–264. <https://doi.org/10.1007/s10681-010-0119-x>
- Cabral, P. G. C., Maciel-Zambolim, E., Oliveira, S. A. S., Caixeta, E. T., Zambolim, L., Bosa, V., Gerais, M., Mandioca, E., Fruticultura, C., & Das Almas, B.; (2016). Genetic diversity and structure of *Hemileia vastatrix* populations on *Coffea* spp. *Plant Pathology*, 65(2), 196–204. <https://doi.org/10.1111/PPA.12411>



- Cabral, P. G. C., Zambolim, E. M., Zambolim, L., Lelis, T. P., Capucho, A. S., & Caixeta, E. T. (2009). Identification of a new race of *Hemileia vastatrix* in Brazil. *Australasian Plant Disease Notes*, 4(1), 129–130. <https://doi.org/10.1071/DN09052>
- Campbell, C. L. and Madden, L. V. (1990). Introduction to Plant Disease Epidemiology. USA: Wiley-Interscience Press. In *Introduction to plant disease epidemiology*. John Wiley & Sons.
- Capucho, A., N Rufino, R. J., Zambolim, E. M., Caixeta, E. T., B de OLIVEIRA, A. C., de ALMEIDA, R. F., de BRITO, G. G., & Zambolim, L. (2005). Método de inoculação de *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. em folhas destacadas de cafeeiro. *Simpósio De Pesquisa Dos Cafés Do Brasil*, 57. <http://www.sbicafe.ufv.br/handle/123456789/2081>
- Capucho, Zambolim, E., Freitas, R., Haddad, F., Caixeta, E., & Zambolim, L. (2012). Identification of race XXXIII of *Hemileia vastatrix* on *Coffea arabica* Catimor derivatives in Brazil. *Australasian Plant Disease Notes*, 7(1), 189–191. <https://doi.org/10.1007/s13314-012-0081-7>
- Cardoso, R. M. L. (1986). *Novas raças fisiológicas de Hemileia vastatrix Berk. et Br. no Brasil; métodos de identificação e detecção de grupos fisiológicos em cafeeiros derivados do híbrido de Timor*. Universidade Federal de Viçosa.
- Cedicafe. (2019). *Monitoreo de la Roya en Variedades Mejoradas de Coffea arábica L., en las Siete Regiones de Guatemala*. 12.
- Cui, L., Hanika, K., Visser, R. G. F., & Bai, Y. (2020). Improving pathogen resistance by exploiting plant susceptibility genes in coffee (*Coffea spp.*). In *Agronomy* (Vol. 10, Issue 12). <https://doi.org/10.3390/agronomy10121928>
- Di Rienzo, ., Casanoves, F., Balzarini, M. G., Gonzalez, L., Tablada, M., & Robledo, C. . (2020). *Centro de Transferencia InfoStat*. <http://www.infostat.com.ar>
- Diniz, L. E. C., Sakiyama, N. S., Lashermes, P., Caixeta, E. T., Oliveira, A. C. B., Zambolim, E. M., Loureiro, M. E., Pereira, A. A., & Zambolim, L. (2005). Analysis of AFLP markers associated to the Mex-1 resistance locus in Icatu progenies. *Cropp Breeding and Applied Biotechnology*, 5(4), 387–393. <https://doi.org/10.12702/1984-7033.v05n04a03>
- Eskes, A. B. (1982). The use of leaf disk inoculations in assessing resistance to coffee leaf rust (*Hemileia vastatrix*). *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 88(4), 127–141. <https://doi.org/10.1007/BF01977270>
- Flor, H. H. (1971). Current Status of the Gene-For-Gene Concept. *Annual Review of Phytopathology*, 9(1), 275–296. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.09.090171.001423>

- Gichuru, E. K., Agwanda, C. O., Combes, M. C., Mutitu, E. W., Ngugi, E. C. K., Bertrand, B., & Lashermes, P. (2008). Identification of molecular markers linked to a gene conferring resistance to coffee berry disease (*Colletotrichum kahawae*) in *Coffea arabica*. *Plant Pathology*, 57(6), 1117–1124. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2008.01846.x>
- Granados, E., & Zambolim, L. (2019). Drying Time of Systemic and Protectant Fungicides on Coffee Leaves Exposed to Artificial Rain for the Control of Leaf Rust. *Journal of Agricultural Science*, 11(6), 329. <https://doi.org/10.5539/jas.v11n6p329>
- Gutiérrez-Calle, S. A., Sanchez-Díaz, R. A., Delgado-Silva, Y. B., Montenegro, J. D., Gutiérrez, D. L., Maicelo-Quintana, J. L., & Guerrero-Abad, J. C. (2021). Capillary electrophoresis as a tool for genotyping SH3 mediated coffee leaf rust resistance. *Scientia Agropecuaria*, 12(1), 91–99. <https://doi.org/10.17268/SCI.AGROPECU.2021.011>
- León-Gómez, R. (2017). Informe de gira técnica para evaluar problemática de presencia de roya (*Hemileia vastatrix*) en variedades resistentes de café en Honduras.
- Liu, R., Lu, J., Zhou, M., Zheng, S., Liu, Z., Zhang, C., Du, M., Wang, M., Li, Y., Wu, Y., & Zhang, L. (2020). Developing stripe rust resistant wheat (*Triticum aestivum* L.) lines with gene pyramiding strategy and marker-assisted selection. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 67(2), 381–391. <https://doi.org/10.1007/s10722-019-00868-5>
- Mahé, L., Combes, M. C., Várzea, V. M. P., Guilhaumon, C., & Lashermes, P. (2008). Development of sequence characterized DNA markers linked to leaf rust (*Hemileia vastatrix*) resistance in coffee (*Coffea arabica* L.). *Molecular Breeding*, 21(1), 105–113. <https://doi.org/10.1007/s11032-007-9112-z>
- McCook, S. (2006). Global rust belt: *Hemileia vastatrix* and the ecological integration of world coffee production since 1850. *Journal of Global History*, 1(2), 177–195. <https://doi.org/10.1017/S174002280600012X>
- Medeiros, A. C., Caixeta, E. T., Oliveira, A. C. B. de, Sousa, T. V., Stock, V. de M., Cruz, C. D., Zambolim, L., & Pereira, A. A. (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. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2021.705278>
- Melese, Y. Y., & Kolech, S. A. (2021). Coffee (*Coffea arabica* L.): Methods, objectives, and future strategies of breeding in Ethiopia—Review. In *Sustainability (Switzerland)* (Vol. 13, Issue 19, p. 10814). Multidisciplinary Digital Publishing Institute. <https://doi.org/10.3390/su131910814>

- Monge, M., & Guevara, R. (2000). *Agriculture in alliance with nature: CATIE's recent advances in breeding and conservation of plant genetic resources* (Issue January).
- Oliveira, A. J., Oliveira, T. C. de, Santos, A. A. C. dos, Siqueira, T. A., Duarte, W. M., Caldeira, D. S. A., Vilarinho, M. K. C., Almici, M. da S., Silva, G. F. da, Barelli, M. A. A., & Karsburg, I. V. (2021). Principais marcadores moleculares. *Research, Society and Development*, 10(15). <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i15.23633>
- Parlevliet, J. E. (1979). Components of Resistance that Reduce the Rate of Epidemic Development. *Annual Review of Phytopathology*, 17(1), 203–222. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.17.090179.001223>
- Pestana, K. N., Capucho, A. S., Caixeta, E. T., de Almeida, D. P., Zambolim, E. M., Cruz, C. D., Zambolim, L., Pereira, A. A., de Oliveira, A. C. B., & Sakiyama, N. S. (2015). Inheritance study and linkage mapping of resistance loci to *Hemileia vastatrix* in Híbrido de Timor UFV 443-03. *Tree Genetics and Genomes*, 11(4), 1–13. <https://doi.org/10.1007/s11295-015-0903-9>
- Setotaw, T. . A., Caixeta, E. T., Pereira, A. A., de Oliveira, A. C. B., Cruz, C. D., Zambolim, E. M., Zambolim, L., & Sakiyama, N. S. (2013). Coefficient of Parentage in *Coffea arabica* L. Cultivars Grown in Brazil. *Crop Science*, 53(4), 1237–1247. <https://doi.org/10.2135/cropsci2012.09.0541>
- Talhinhas, P., Batista, D., Diniz, I., Vieira, A., Silva, D. N., Loureiro, A., Tavares, S., Pereira, A. P., Azinheira, H. G., Guerra-Guimarães, L., Várzea, V., & Silva, M. do C. (2017). The coffee leaf rust pathogen *Hemileia vastatrix*: one and a half centuries around the tropics. *Molecular Plant Pathology*, 18(8), 1039–1051. <https://doi.org/10.1111/mpp.12512>
- Vale, F. X. R. DO, Parlevliet, J. E., & Zambolim, L. (2001). Concepts in plant disease resistance. *Fitopatologia Brasileira*, 26(3), 577–589. <https://doi.org/10.1590/S0100-41582001000300001>
- Zambolim, L. (2016). Current status and management of coffee leaf rust in Brazil. *Tropical Plant Pathology*, 41(1), 1–8. <https://doi.org/10.1007/s40858-016-0065-9>
- Zambolim, L., & Caixeta, E. T. (2021). AN OVERVIEW OF PHYSIOLOGICAL SPECIALIZATION OF COFFEE LEAF RUST-NEW DESIGNATION OF PATHOTYPES. *International Journal of Current Research*, 13(01), 15564–15575. <https://doi.org/https://doi.org/10.24941/ijcr.40600.01.2021>
- Zambolim, L., & Chaves, M. C. (1974). Efeito de baixas temperaturas e do binomio temperatura-umidade relativa sobre a viabilidade dos uredosporos de *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. e *Uromyces phaseoli* typica arth. *Experientiae*, 17(7), 151–184.