



UNIVERSIDADE FEDERAL DE RONDÔNIA - UNIR
NÚCLEO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA TERRA - NCET
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DESENVOLVIMENTO REGIONAL E
MEIO AMBIENTE - PGDRA

EXPRESSÃO DA AUTOINCOMPATIBILIDADE EM GENÓTIPOS DE *Coffea*
***canephora* CULTIVADOS NA AMAZÔNIA OCIDENTAL**

RODRIGO PRADO DEPOLO

PORTO VELHO – RO

2023



UNIVERSIDADE FEDERAL DE RONDÔNIA - UNIR
NÚCLEO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA TERRA - NCET
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DESENVOLVIMENTO REGIONAL E
MEIO AMBIENTE - PGDRA

EXPRESSÃO DA AUTOINCOMPATIBILIDADE EM GENÓTIPOS DE *Coffea*
***canephora* CULTIVADOS NA AMAZÔNIA OCIDENTAL**

RODRIGO PRADO DEPOLO

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Barros Rocha.

Dissertação apresentada como requisito avaliativo do Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente - PGDRA da Universidade Federal de Rondônia - UNIR, Área de concentração Desenvolvimento Sustentável e Diagnóstico Ambiental, Linha de Pesquisa 1 Ambiente, Saúde & Sustentabilidade, para a obtenção do Título de Mestre.

PORTO VELHO – RO

2023

Catalogação da Publicação na Fonte
Fundação Universidade Federal de Rondônia - UNIR

D422e Depolo, Rodrigo Prado.
Expressão da autoincompatibilidade em genótipos de *Coffea canephora* cultivados na Amazônia Ocidental / Rodrigo Prado Depolo. - Porto Velho, 2023.

37 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Barros Rocha.

Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente. Núcleo de Ciências Exatas e da Terra. Fundação Universidade Federal de Rondônia.

1. Autoincompatibilidade gametofítica. 2. Conilon. 3. Robusta. I. Rocha, Rodrigo Barros. II. Título.

Biblioteca Central

CDU 663.93



Fundação Universidade Federal de Rondônia
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO DESENV. REGIONAL E MEIO
AMBIENTE**

ATA Nº 2023

ATA DE DEFESA DE CONCLUSÃO DE CURSO

Dr. ANGELO GILBERTO MANZATTO, UNIR

Examinador Interno

MAURÍCIO REGINALDO ALVES DOS SANTOS, EMBRAPA

Examinador Interno

Dr. WANDERLEY RODRIGUES BASTOS, UNIR

Examinador Interno

RODRIGO BARROS ROCHA, EMBRAPA

Presidente

RODRIGO PRADO DEPOLO

Mestrando



Fundação Universidade Federal de Rondônia
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO DESENV. REGIONAL E MEIO
AMBIENTE

FOLHA DE CORREÇÕES

ATA Nº 2023

Autor: RODRIGO PRADO DEPOLO

Título: EXPRESSÃO DA AUTOINCOMPATIBILIDADE EM GENÓTIPOS DE Coffea
canephora CULTIVADOS NA AMAZÔNIA OCIDENTAL

Banca examinadora:

Prof. ANGELO GILBERTO MANZATTO Examinador Interno

Prof. MAURÍCIO REGINALDO ALVES DOS SANTOS Examinador Interno

Prof. WANDERLEY RODRIGUES BASTOS Examinador Interno

Prof. RODRIGO BARROS ROCHA Presidente

Os itens abaixo deverão ser modificados, conforme sugestão da banca

1. [] INTRODUÇÃO
2. [] REVISÃO BIBLIOGRÁFICA
3. [] METODOLOGIA
4. [] RESULTADOS OBTIDOS
5. [] CONCLUSÕES

COMENTÁRIOS GERAIS: A revisão foi realizada pelo discente após a qualificação, não havendo sugestões após a defesa.

Declaro, para fins de homologação, que as modificações, sugeridas pela banca examinadora, acima mencionada, foram cumpridas integralmente.

Documento assinado digitalmente
gov.br RODRIGO BARROS ROCHA
Data: 02/06/2023 10:50:10-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. RODRIGO BARROS ROCHA

Orientador(a)

RODRIGO PRADO DEPOLO

**EXPRESSÃO DA AUTOINCOMPATIBILIDADE EM GENÓTIPOS DE *Coffea*
canephora CULTIVADOS NA AMAZÔNIA OCIDENTAL**

Comissão Examinadora

Documento assinado digitalmente



RODRIGO BARROS ROCHA
Data: 02/06/2023 10:50:10-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Rodrigo Barros Rocha
UNIR / EMBRAPA-RO
Orientador

Documento assinado digitalmente



MAURICIO REGINALDO ALVES DOS SANTO
Data: 12/06/2023 11:58:37-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Maurício Reginaldo Alves dos Santos
UNIR / EMBRAPA-RO
Membro Titular

Documento assinado digitalmente



WANDERLEY RODRIGUES BASTOS
Data: 15/06/2023 16:54:24-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Wanderley Rodrigues Bastos
UNIR
Membro Titular

Prof. Dr. Ângelo Gilberto Manzatto
UNIR
Membro Suplente

Porto Velho, 24 de abril de 2023.

Resultado: Aprovado.

Dedico esse trabalho aos meus Pais, Paulo e Diana, que me moldaram e apoiaram até aqui, a minha irmã Paula, e a todos os amigos da EMBRAPA e UNIR, sem os quais não alcançaria o presente trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Empresa Brasileira de pesquisa Agropecuária (EMBRAPA – RO).

Agradeço a Universidade Federal de Rondônia (UNIR).

Agradeço ao programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente (PGDRA).

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Agradeço ao Prof. Dr. Rodrigo Barros Rocha, por todo o conhecimento passado, por toda a ajuda e orientação durante esse processo, por toda sua dedicação e palavras de incentivo. Sendo um profissional único, com grande responsabilidade e caráter sem igual.

Agradeço aos professores e coordenação do PGDRA, pelos conhecimentos transmitidos e apoio em todos os âmbitos necessários para conclusão do mestrado.

Agradeço aos meus amigos e colegas de trabalho, Carolina Augusto de Souza e Francisco Paiva Uchôa, por todo o apoio e auxílio.

A minha família que sempre acreditou no meu potencial e me incentivou a lutar pelos meus sonhos.

Agradeço a todos!

RESUMO

O objetivo desse trabalho é caracterizar a expressão da autoincompatibilidade gametofítica em uma população de melhoramento do cafeeiro *Coffea canephora*, fornecendo subsídios para manejo dessa característica e desenvolvimento de novas cultivares. Para tanto, foram realizadas 550 polinizações *in vitro* entre 62 plantas matrizes das variedades botânicas Conilon (27) e Robusta (35). Genótipos previamente conhecidos, dos grupos de compatibilidade I, II e III, foram inicialmente utilizados como plantas testadoras. Foram identificados 32 genótipos compatíveis com todos os testadores previamente conhecidos, indicando a existência de novos grupos de compatibilidade. A partir desses resultados, foram realizadas hibridações em delineamento de dialelo completo com cruzamentos recíprocos para caracterizar plantas testadoras dos novos grupos de compatibilidade. Baseado na resposta de compatibilidade com as plantas testadoras, os genótipos foram agrupados em seis grupos, identificados a seguir: 11 genótipos no grupo I (17,74%), 13 genótipos no grupo II (20,97%), 6 genótipos (9,68%) no grupo III, 9 genótipos (14,52%) no grupo IV, 8 genótipos (12,90%) no grupo V e 15 genótipos (24,19%) no grupo VI. A comparação dos grupos de compatibilidade com a diversidade genética avaliada em campo mostrou que os genótipos de Conilon se agruparam em apenas um dos quadrantes da dispersão, estimada a partir dos dois primeiros componentes principais. Os três quadrantes de maior número de genótipos Robusta apresentaram maior frequência de plantas do grupo de compatibilidade VI (39, 48 e 23%) enquanto no quadrante de maior ocorrência de genótipos de Conilon, o grupo de compatibilidade II é o mais frequente (31%). Até a obtenção desses resultados, avaliações de populações brasileiras indicaram a existência de apenas três alelos e três grupos de compatibilidade. A identificação de novos grupos de compatibilidade fornece subsídios para novas práticas de manejo buscando aumentar a eficiência de polinização, pelo favorecimento natural de cruzamentos totalmente compatíveis.

Palavras-chave: autoincompatibilidade gametofítica; conilon; robusta.

ABSTRACT

The objective of this work is to characterize the expression of gametophytic self-incompatibility in a population of coffee breeding *Coffea canephora*, providing subsidies for the management of this characteristic and the development of new cultivars. For this purpose, 550 in vitro pollinations were carried out between 62 mother plants of the botanical varieties Conilon (27) and Robusta (35). Previously known genotypes, from compatibility groups I, II and III, were initially used as test plants. Thirty-two genotypes compatible with all previously known testers were identified, indicating the existence of new compatibility groups. Based on these results, hybridizations were carried out in a complete diallel design with reciprocal crosses to characterize tester plants of the new compatibility groups. Based on the compatibility response with the test plants, the genotypes were grouped into six groups, identified as follows: 11 genotypes in group I (17.74%), 13 genotypes in group II (20.97%), 6 genotypes (9.68%) in group III, 9 genotypes (14.52%) in group IV, 8 genotypes (12.90%) in group V and 15 genotypes (24.19%) in group VI. The comparison of the compatibility groups with the genetic diversity evaluated in the field showed that the Conilon genotypes were grouped in only one of the quadrants of the dispersion, estimated from the first two principal components. The three quadrants with the highest number of Robusta genotypes showed a higher frequency of plants from compatibility group VI (39, 48 and 23%) while in the quadrant with the highest occurrence of Conilon genotypes, compatibility group II is the most frequent (31%). Until these results were obtained, evaluations of Brazilian populations indicated the existence of only three alleles and three compatibility groups. The identification of new compatibility groups provides subsidies for new management practices seeking to increase pollination efficiency, by naturally favoring fully compatible crossings.

Keywords: gametophytic self-incompatibility; Conilon; Robust.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Detalhe da lavoura de café clonal no município de Rolim de Moura, plantados em linha, em que um clone não floresceu no mesmo dia dos demais, portanto havendo falha na sincronia da polinização. Foto: Frederico José Evangelista Botelho.....18;
- Figura 2.** Imagens utilizando microscopia de fluorescência em aumento de 20 vezes da estrutura do tubo polínico no estigma da flor 30 horas após a polinização. Figura de Souza (2020)19;
- Figura 3:** Teste de germinação de grãos de pólen com visualização em microscópio com ampliação de 50X, 2 horas após a imersão em solução de sacarose a 10%. Foto: SOUZA, C. A. (2020)22;
- Figura 4:** A: Estigma polinizado sem o desenvolvimento de tubos polínicos. B: A polinização de apenas um dos lados do estigma bifido favorece a visualização ao microscópio pelo contraste entre os estilos polinizado e não polinizado. Foto: Carolina Rodrigues de Souza.....23;
- Figura 5.** Dispersão gráfica dos dois primeiros componentes principais de 62 genótipos das variedades botânicas Conilon e Robusta identificados pelas formas geométricas (triângulo: Conilon, quadrado: Robusta). As letras A, B, C e D identificam os quadrantes de maior similaridade, e os centroides representam as plantas com as características típicas da variedade botânica Conilon (centroide 1) e Robusta (centroide 2). Os algarismos romanos representam os grupos de compatibilidade I, II, III e IV respectivamente.....32.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Resumo das hibridizações realizadas de 62 genótipos com plantas-teste dos grupos de compatibilidade I, II e III. As hibridizações não compatíveis são indicadas pelo número entre parênteses e as hibridizações compatíveis são indicadas pelos números sem formatação.....25;
- Tabela 2.** Hibridações em delineamento de dialelo completo com autofecundações e recíprocos de seis genótipos com características das variedades botânicas Conilon e Robusta que foram compatíveis com todas as testemunhas previamente conhecidas. A: resposta de compatibilidade das hibridações direcionadas. B: agrupamento nos novos grupos de compatibilidade denominados ordinalmente de IV, V e VI.....28;
- Tabela 3.** Resumo das hibridizações realizadas de 32 genótipos com plantas testadoras dos grupos de compatibilidade IV, V e VI. As hibridizações não compatíveis são indicadas pelo número entre parênteses e as hibridizações compatíveis são indicadas pelos números sem formatação.....29;
- Tabela 4.** Agrupamento de 62 matrizes de *Coffea canephora* das variedades botânicas Conilon e Robusta, identificados em seus respectivos grupos de acordo com a compatibilidade com plantas testadoras.....30.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
2.1 Características botânicas do <i>Coffea canephora</i>	13
2.2 Botânica floral e polinização do cafeeiro <i>Coffea canephora</i>	14
2.3 Autoincompatibilidade em <i>Coffea canephora</i>	15
2.4 Microscopia de fluorescência.....	18
2.5 Frequências alélicas, genotípicas e equilíbrio de Hardy Weinberg	19
2.6 Estimativas de máxima verossimilhança.....	20
3. MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1 Plantas testadoras e população reprodutora	20
3.2 Polinização <i>in vitro</i>.....	21
3.3 Microscopia de fluorescência.....	23
3.4 Diversidade genética.....	24
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
5. CONCLUSÃO	33
4. REFERÊNCIAS	33

1. INTRODUÇÃO

A autoincompatibilidade (AI) é um mecanismo fisiológico presente no sistema reprodutivo do cafeeiro *Coffea canephora*, que favorece naturalmente a ocorrência de polinizações cruzadas (IGIC et al., 2008). Na natureza, a redução nas taxas de autofecundação e de hibridação entre plantas aparentadas favorecem as populações alógamas, contribuindo para a redução dos efeitos deletérios da endogamia e aumento da diversidade genética (NETTANCOURT, 2001).

Na cafeicultura clonal, o cultivo de um número reduzido de genótipos resulta em uma menor variabilidade genética entre plantas, que representam uma pequena amostra das populações naturais, provenientes do seu centro de origem no continente africano (FERRÃO et al., 2017; MORAES et al., 2018). O conhecimento e o manejo da autoincompatibilidade são importantes para o cultivo desse cafeeiro, uma vez que seu desconhecimento pode reduzir a produtividade e a qualidade dos grãos, resultado de uma menor eficiência da polinização (ROCHA et al., 2015).

Nessa espécie, a autoincompatibilidade tem sua expressão governada por apenas um gene multialélico identificado pela letra S (BERTHAUD, 1980). A reação de incompatibilidade gametofítica, característica desse cafeeiro, ocorre entre o tubo polínico e o estigma, que não deve compartilhar o mesmo alelo da planta receptora (LASHERMES et al., 1996; NOWAK et al., 2011). O impedimento à autofecundação deve-se, a paralisação do desenvolvimento dos tubos polínicos, causada pela ação de ribonucleases que degradam o RNA ribossômico impedindo o crescimento do tubo polínico (NETTANCOURT, 2001; NOWAK et al., 2011).

Apesar da incompatibilidade do *C. canephora* ter sido relatada ainda na década de 60, poucos trabalham se dedicaram a caracterizar a compatibilidade dessa espécie, entre os quais destacam-se os mais importantes: Devreux et al. (1959), observaram que após a autopolinização, o tubo polínico não se desenvolve impossibilitando que o grão de pólen chegue até o ovário. Conagin e Mendes (1961) e Berthaud (1980) levantaram evidências de que a autoincompatibilidade em *Coffea canephora* deve ser governada pela ação de um único gene S, com três formas alélicas (S₁, S₂, S₃). Lashermes et al. (1994), obtiveram populações de plantas duplos haploides, homozigotas para o gene S e mostraram o desenvolvimento do tubo polínico pode ser observado utilizando microscopia de fluorescência. Lashermes et al. (1996), identificaram marcadores moleculares em desequilíbrio de ligação com essa característica. Omolaja e Fawole (2004), quantificaram a interação de cinco formas alélicas na expressão desta característica. Nowak et al. (2011), caracterizaram o polimorfismo deste gene entre várias espécies do gênero *Coffea*. De Franceschi et al. (2012), descreveram que a incompatibilidade se deve a interação de glicoproteínas específicas no estigma da flor e nos grãos de pólen que se

combinam para formação de dímeros. Moraes et al. (2018), identificaram plantas testadoras de três diferentes grupos de compatibilidade.

Mais recentemente Souza et al. (2021), apresentaram uma metodologia para avaliação da autoincompatibilidade (AI) utilizando polinização *in vitro* associada a microscopia de fluorescência, para reduzir a taxa de contaminação das hibridações e reduzir o tempo necessário para diagnóstico da compatibilidade.

Embora avaliações no centro de origem indiquem a existência de até cinco formas alélicas do gene S (OMOLAJA & FAWOLE, 2004), avaliações fora do centro de origem, em germoplasma cultivado no Brasil, indicaram a ocorrência de apenas três formas alélicas na expressão desta característica (S₁, S₂ e S₃) (CONAGIN e MENDES, 1961; FERRÃO, et al. 2017; MORAES et al. 2018).

Com a caracterização da autoincompatibilidade de novos genótipos desenvolvidos é possível a implementação de plantas compatíveis entre si, aumentando o pegamento de frutos devido a uma maior taxa da eficiência da polinização em lavouras comerciais, promovendo um aumento na produtividade (SOUZA et al., 2017; IMBACH et al., 2017; DEPOLO, et al. 2022).

O objetivo desse trabalho é caracterizar a autoincompatibilidade de acessos do Banco de Germoplasma da Embrapa quantificando a diversidade alélica e genotípica de uma população de melhoramento fornecendo subsídios para manipulação dessa característica no desenvolvimento de novas variedades.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Características botânicas do *Coffea canephora*

O café, no mercado internacional, é uma das culturas mais importantes nos dias atuais, isso se deve ao consumo de sua bebida que se encontra no dia a dia da população mundial. No Brasil, está concentrada a maior produção de café no mundo, recebendo também o título de segundo maior consumidor de sua bebida e sendo referência no cultivo das duas principais espécies cafeeiras: *Coffea arabica* e *Coffea canephora* (ABIC, 2021). A quantidade de café da espécie *C. canephora* produzida no Brasil possui grande expressividade no mercado internacional, chegando a representar cerca de 21% da produção mundial. A partir destes dados, estima-se que esta produção alcançará 16,96 milhões de sacas, ocupando uma área de 389,19 mil hectares de cultivo (EMBRAPA, 2022).

No estado de Rondônia, o cultivo da espécie *C. canephora* é predominante devido as características climáticas da região, onde esta variedade melhor se adequa já que esta tem uma melhor adaptação a regiões de clima tropical. A produção no Estado, é oriundo do cultivo que está nas mãos da agricultura familiar, promovendo uma fonte de renda e um melhor desenvolvimento para as famílias e regiões que o cultivam (MARCOLAN et al., 2009).

As plantas do gênero *Coffea canephora* são dicotiledôneas pertencentes à família Rubiaceae, onde estão inseridas aproximadamente 124 espécies. Entretanto, no Brasil o cultivo destinado a produção comercial é oriundo de duas espécies, sendo estas a *Coffea arabica* e *C. canephora* (BRIDSON, 1994). A espécie *C. canephora* possui duas variedades botânicas distintas que são cultivadas na Amazônia Ocidental: a variedade botânica Conilon, caracterizada por plantas de crescimento tipo arbusto, tolerância à seca e maior suscetibilidade a doenças; e a variedade botânica Robusta, caracterizada pelo crescimento ereto, frutos e folhas de maior tamanho, menor tolerância à seca e maior resistência a pragas e doenças (MONTAGNON et al., 2008; TEIXEIRA et al., 2020, DUBBERSTEIN et al., 2020).

A estrutura destas plantas é formada por um ou mais ramos ortotrópicos (verticais), apresentando ramificações laterais em seu corpo, sendo estes, os ramos plagiotrópicos (horizontais); suas folhas são simples e opostas, suas flores são brancas e sua inflorescência é formada com uma quantidade de 3 a 20 flores. As plantas se caracterizam por serem perenes, com porte arbustivo ou arbóreo, de caule lenhoso e flores hermafroditas (FAZUOLI et al., 2000; CHARRIER e ESKES, 2004).

Quando comparadas, as plantas das duas espécies comerciais se diferenciam por sua morfologia e reprodução, onde o *C. canephora* se difere por ser uma planta que apresenta multicaule, maior adaptabilidade ao clima tropical e a baixas altitudes, plantas mais vigorosas e frutos menores e mais esféricos. Na reprodução, enquanto o café arábica apresenta a autofecundação onde a planta é

capaz de se auto fecundar (autogamia), o café canéfora apresenta a fecundação cruzada (alogamia), onde este necessitará de uma segunda planta para que seja realizada a fecundação (FERRÃO et al., 2007b).

Além de ser designado como alogâmicos e diploides ($2n = 2 \times = 22$), os indivíduos da espécie *C. canephora* apresentam também uma particularidade chamada de Autoincompatibilidade Gametofítica (AI). Esse sistema reprodutivo concede um alto grau de variabilidade genética favorecendo a formação de uma população composta de indivíduos heterozigotos e, conseqüentemente, uma maior capacidade de adaptação a uma ampla e variada escala de características ambientais e edafoclimáticas (BERTHAUD et al., 2003).

2.2. Botânica floral e polinização do cafeeiro *Coffea canephora*

Sendo a parte responsável pela reprodução, propagação e produção da planta, as flores possuem algumas das funções mais importantes para a planta. Dito isto, as flores possuem suas partes mais importantes bem divididas em ovário, sépalas, pétalas, estames e pistilo (LOPES, 2015).

O estigma bífido está localizado sobre uma extensão com o formato de um tubo fino chamado de estilo ou estilete, o corpo do mesmo está unido ao corpo do ovário através de um tecido estigmatóide nomeado de tecido de transmissão. A união do estigma, do estilete e do ovário, é chamada de pistilo (ALLARD, 1971).

O ovário bilocular possui uma dupla de cavidades separadas, onde cada uma destas armazena dois óvulos. As cavidades se comunicam com o estilete por canais individuais, fazendo com que a polinização ocorra em ambos, em um, ou até mesmo em nenhum deles. Tendo em vista de que a fertilização é um processo que necessita do transporte, da germinação dos grãos de pólen e do desenvolvimento do tubo polínico oriundo de pólenes compatíveis no estigma da flor. (CHARRIER e ESKES, 2004).

A formação de frutos derivados da fertilização dos dois óvulos, originarão grãos cuja superfície dorsal é convexa e a ventral é plana com uma rachadura no meio sentido longitudinal, sendo chamado de grão “chato”. Quando o desenvolvimento do fruto é originado apenas de um dos óvulos, este produzirá um grão ovalado com uma ranhura longitudinal no meio, sendo identificado como grão do tipo “moca”.

De acordo com Charrier (1972), o processo de polinização no *C. canephora* ocorre com a transferência de pólen da antera de uma flor para o estigma de outra, essa ação tem como principal agente polinizador o vento. Porém, ocorre também a ação de outros agentes polinizadores, os biológicos, estando entre esses diversos tipos de insetos e as abelhas como principal. A efetividade da polinização é de responsabilidade dos agentes como um todo, os agentes biológicos se

apresentam como os mais eficientes uma vez que podem transportar o pólen a uma distância de 700 metros, enquanto o vento, pode transportar por 50 metros (ESCH e BURNS,1996).

O processo de florescimento segundo Mendes (1949), é dividido em etapas e tem seu início na indução floral e finaliza na antese, a floração nesta espécie ocorre de forma gregária onde todas as plantas individualizadas em uma determinada área, irão florescer juntas, realizando uma sincronização do florescimento. A antese ou abertura floral, tem seu início na parte da manhã e continuam abertas durante todo o período do dia, realizada a fertilização, as anteras começam a apresentar uma coloração escura.

Os grãos de pólen que são gerados por esse gênero de plantas, pode ser caracterizado por conter 3 núcleos, onde se divide em um núcleo vegetativo e dois germinativos, que são responsáveis por realizar a fecundação do óvulo. Sua estrutura é formada por uma camada interior chamada de intina (celulose) e uma camada mais resistente de ceras e proteínas, além de possuir uma substancia em seu exterior chamada de exina, que favorece a fixação dos grãos de pólen na parede do estigma (FERRÃO et al., 2007a).

As paredes do estigma formam papilas alongadas com pelos longos e ramificados que ajudam também na fixação do grão de pólen, onde este encontrará um ambiente favorável para seu desenvolvimento graças ao tecido glandular do estigma que excreta substancias para estar realizando esta recepção do grão de pólen e facilitação do seu processo de germinação (LOPES, 2015).

Após o processo de aderência dos grãos de pólen no estigma, estes começam o processo de germinação formando um tubo polínico, onde se desenvolverá ao longo do estilete em direção ao ovário, levando o núcleo vegetativo e os dois germinativos. Ao entrar em contato com o óvulo, o tubo libera suas células espermáticas no saco embrionário. Uma célula espermática junto com a oosfera formará o zigoto e a outra célula junto com a célula central formarão um núcleo triploide (3n), chamado de célula mãe do albúmen ou célula mãe do endosperma secundário (CONAGIN e MENDES, 1961).

Com a fecundação e várias mitoses, a célula mãe originará um tecido de reserva chamado de endosperma. Ao mesmo tempo, o zigoto se divide para a formação do embrião que sessa seu desenvolvimento e entra em uma forma de dormência. A semente que germinará e dará origem a um novo indivíduo é o nome dado ao conjunto formado pelo embrião, endosperma e tegumento.

2.3. Autoincompatibilidade em *Coffea canephora*

A autoincompatibilidade (AI) também pode ser comparada a alogamia, sendo um mecanismo genético que impedirá o processo de fertilização uma vez que a planta é polinizada pelo pólen originado dela mesma. Favorecendo a alogamia, a AI aumenta a variabilidade genética dentro

das populações se tornando um fator decisivo na evolução das angiospermas (BREWBAKER, 1957; HESLOP-HARRISON, 1983; SCHIFINO-WITTMAN e DALL'AGNOL, 2002).

Esse mecanismo genético é governado por um gene S que governa a expressão dessa característica, acredita-se que este tenha evoluído individualmente, várias vezes durante a evolução das plantas com flores, já que sua presença está distribuída em diversas espécies vegetais (CHARLESWORTH E AWADALLA, 1998). Seu mecanismo tem forma de ação pré-zigótica, possuindo ação direta na fecundação dos grãos de pólen. Porém, segundo Ferrão et al. (2004), essa forma possui uma maior vantagem quando comparada com a ação pós-zigótica, pois não comprometerá a integridade dos óvulos, reduzindo assim, a produção de frutos.

Quanto as características florais das plantas que apresentam a AI, eles podem ser classificados de duas formas: quando observasse a ocorrência de modificações florais, esta é definida como heteromórfica; quando não há a ocorrência de modificação floral, é definida como homomórfica. Dentro das espécies cultivadas, não é visualizada a ocorrência de dimorfismo floral, diferindo apenas em seu mecanismo genético de ação (SCHIFINO-WITTMAN e DALL'AGNOL, 2002).

As angiospermas apresentam dois tipos de AI, esporofítica (AIE) onde o sucesso da fecundação fertilização ocorre com a interação entre as proteínas produzidas pela planta que produziu o grão de pólen e está localizada na camada externa do grão (exina) com o estigma da planta que receberá o mesmo. Já na gametofítica (AIG), a fertilização ocorre de acordo com a expressão do gene S do genoma haploide do grão de pólen (FRANCESCHI, P. DE, et al., 2012).

Quanto aos fatores que inibem cada um dos mecanismos genéticos, na AIG ocorre após a anáfase da primeira divisão meiótica durante a microesporogênese sendo produzidos dois pares de esporos com fenótipos diferentes. Já na AIE, a inibição ocorre na anáfase I, produzindo esporos com o mesmo fenótipo (BREWBAKER, 1957).

A expressão da autoincompatibilidade gametofítica possui sua expressão governada por um gene multialélico identificado pela letra S, tendo sua interação entre o pólen e o estigma determinada pelo polimorfismo do gene S, do inglês “Sterility locus” que é associado S-RNase, uma glicoproteína que age no pólen e pistilo (SASSA, et al. 2010). Impedindo esta, que o tubo polínico se desenvolva no estilete, através da parada no crescimento devido a ação de ribonucleases que degradam o RNA ribossômico (CASTRIC e VEKEMANS, 2004).

Sendo uma espécie alógama, o *Coffea canephora* apresenta a autoincompatibilidade do tipo gametofítica onde terá sua variabilidade genética favorecida nas populações naturais. Seu mecanismo é ocorre entre o tubo polínico e o grão de pólen, que não podem possuir o mesmo alelo da planta receptora (LASHERMES et al., 1996; NOWAK et al., 2011).

O *C. canephora* apresenta outros mecanismos para favorecer a fecundação cruzada, sendo estes a grande quantidade de pólen produzida pelas flores e a sincronização da floração, onde as plantas mesmo que diferentes entre si, sincronizarão e sua abertura floral ou antese, ocorrerá no mesmo momento para todas. Pode ocorrer nesta espécie também a ocorrência do grão tipo “moca” que é resultado da baixa eficiência na polinização, ele ocorre quando apenas uma das duas bolsas do ovário é fecundada, formando um grão arredondado ou ovalado. (CARVALHO et al., 1983; CHARRIER e BERTHAUD, 1988).

A escolha de clones não compatíveis na lavoura pode provocar uma maior incidência de grãos moca na lavoura, além de causar a falta de sincronização da floração onde os clones podem não realizar a antese ao mesmo tempo que os demais, sendo estes fatores da baixa eficiência na polinização (Figura 1), consequência esta da autoincompatibilidade gametofítica, podendo ocorrer quedas na produtividade da lavoura e também na qualidade desses grãos. Em um plantio clonal, devem ser selecionados clones compatíveis entre si e ao mesmo tempo intercalando suas linhas, para aumentar a eficiência na polinização e, conseqüentemente, diminuir perdas na produção (BRAGANÇA et al., 2001; FERRÃO et al., 2007b).

A agricultura nos dias atuais caminha ao lado do melhoramento genético, com o intuito de aumentar as produtividades das culturas comerciais, produzindo mais em áreas menores. Desse modo, o plantio de materiais genéticos mais adaptados, mais resistentes e mais produtivos junto com a melhoria nas práticas de manejo das lavouras, estão gerando lavouras superiores com potencial para se tornarem melhores ainda (SHUSTER e CRUZ, 2004).

No melhoramento genético, a autoincompatibilidade tem suas vantagens e suas desvantagens, pois por favorecer a fecundação cruzada ela aumenta a variabilidade genética e por sua vez torna baixa a ocorrência de alelos recessivos e efeitos da endogamia, formando indivíduos mais resistentes, adaptáveis e produtivos. Porém, sua limitação é a de impedir a obtenção linhas puras desses genótipos. Outra vantagem que a AI proporciona ao melhoramento genético é a obtenção de sementes híbridas sem a necessidade de outros procedimentos, como o sistema de macho esterilidade (MICHAELSON-YEATES et al., 1997).

Figura 1. Detalhe da lavoura de café clonal no município de Rolim de Moura/ RO, plantados em linha, em que um clone não floresceu no mesmo dia dos demais, portanto havendo falha na sincronia da polinização. Foto: ROCHA, R. B. (2020).



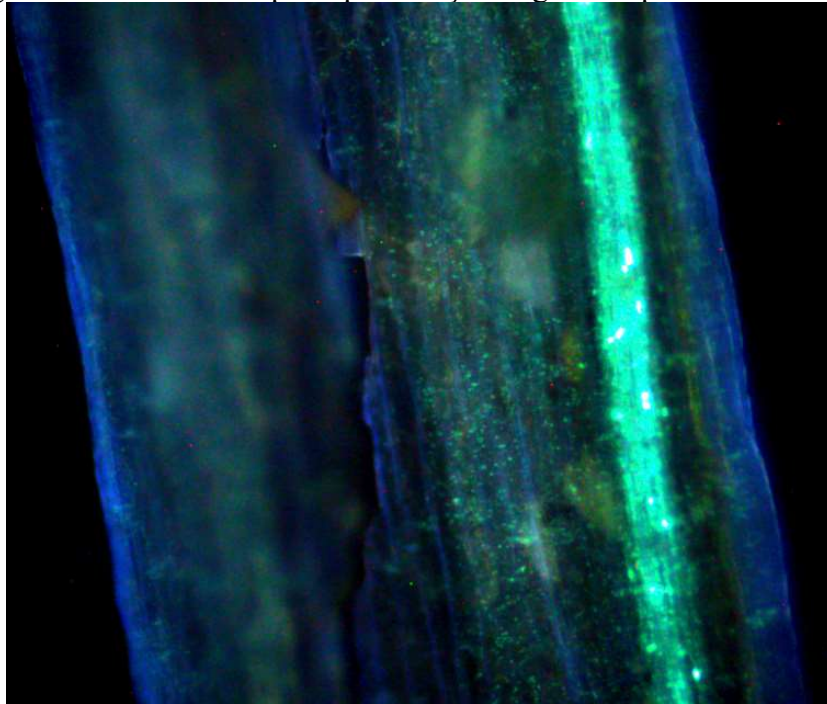
2.4. Microscopia de fluorescência

A microscopia de fluorescência se baseia na visualização através da irradiação de luz em diversos comprimentos de onda no momento em que determinada substância é irradiada pela luz em uma determinada onda, fazendo com que as substâncias sofram contrastes e suas estruturas realçadas para uma melhor visualização, com o auxílio de corantes fluorescentes (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004; MAUCH-MANI e MAUCH, 2005).

Essa técnica apresenta um alto grau seletivo, com capacidade de ser superior qualitativa e quantitativa, sem influenciar nos dados e resultados mesmo que água esteja presente no momento da visualização. Porém, com essa técnica superior para análise de dados, necessita de um custo adicional para a obtenção dos equipamentos (MILORI et al., 2002).

Um corante que já vem sendo utilizado a muito por possuir afinidade com os tubos polínicos é o azul de anilina, com uso para a microscopia vegetal ele apresenta certa compatibilidade com as caloses localizadas nos tubos polínicos. Essas caloses podem ser descritas como um polissacarídeo presente na parede celular do tubo em baixa quantidade, porém, se torna mais concentrado no espermatófito e no gametófito após a meiose, aumentando o contraste, e melhorando a visualização dos tubos polínicos (Figura 2) (MAUCH-MANI e MAUCH, 2005).

Figura 2. Imagens utilizando microscopia de fluorescência em aumento de 20 vezes da estrutura do tubo polínico no estigma da flor 30 horas após a polinização. Figura adaptada de Souza, C. A. (2020).



2.5. Frequências alélicas, genóticas e equilíbrio de Hardy Weinberg

As espécies alógamas possuem alguns aspectos em sua reprodução que foram descritos por Wilhelm Weinberg e Godfrey Harold Hardy. Estes estudaram o que hoje é chamado de Equilíbrio de Hardy-Weinberg, que seria em outras palavras o princípio da Genética de Populações, que visa trazer os mecanismos que alteram as frequências alélicas e genóticas de uma população. Seleção natural, deriva genética, mutação e fluxo gênico, diversos cruzamentos foram realizados e analisados por estes dois estudiosos (BORÉM e MIRANDA, 2013).

De acordo com a lei, se as populações não possuírem fatores evolutivos envolvidos em seu desenvolvimento, suas frequências alélicas e genóticas continuam inalteradas. Assim sendo, uma população em equilíbrio deve ser seguida de: 1) a população é infinita; 2) os acasalamentos ocorrem ao acaso; 3) todos os indivíduos são férteis; 4) não possui efeito da seleção; 5) não ocorrem migrações; e 6) não ocorrem mutações (CONTI, 2009).

Para realizar uma análise de mudança de frequência genotípica de uma geração para a outra pode se realizar o teste do qui-quadrado, sendo representado pelo símbolo X^2 , sendo um teste não paramétrico, sem depender de dados populacionais como média e variância. Seu princípio é comparar as proporções, ou seja, a diferença entre as frequências observadas e as esperadas em um determinado evento, sendo usado para verificar se a frequência de um acontecimento observado se desvia significativamente ou não com que este é esperado (CONTI, 2009).

Levando em consideração da autoincompatibilidade gametofítica no *Coffea canephora*, que é expressada por um único gene multialélico, espera-se cruzamentos totalmente compatíveis, parcialmente compatíveis e não compatíveis. Sendo estas expressões: 1) auto-incompatibilidade: presença de formas alélicas idênticas (Ex.: S1S2 x S1S2); 2) compatibilidade parcial: presença de uma forma alélica em comum (Ex.: S1S2 x S1S3); 3) totalmente compatíveis: todas as formas alélicas são diferentes (Ex.: S1S2 x S3S4) (FAZUOLI, 1986; CHARLESWORTH e GUTTMAN, 1997).

De acordo com Omalaja e Fawole (2004), em seu centro de origem foram observadas a presença de pelo menos 5 formas alélicas. A caracterização da genealogia do gene S em progênies brasileiras de *C. canephora* foi realizado por Moraes et al (2018) que agruparam doze genótipos em três grupos de compatibilidade diferentes, com as expressões S1S2, S1S3 e S2S3.

As plantas que apresentam a autoincompatibilidade pré-zigótica, possuem uma vantagem em relação a pós-zigóticas, é favorecido o cruzamento de grãos de pólen geneticamente diferentes e os zigotos não possuem seu desenvolvimento afetado, assim plantas parcialmente compatíveis terão taxas de 50% fertilização, levando em consideração que a eficiência da polinização está susceptível aos agentes polinizadores (LOPES, 2015).

2.6. Estimativas de máxima verossimilhança

Todo procedimento que realiza hibridação de forma direcionada tem uma probabilidade de erro, tendo isso em vista, a partir de um grande número de hibridações é possível realizar um teste para determinar a probabilidade de presença de variadas genealogias em relação a hipótese nula de que todos pertencem ao mesmo grupo de compatibilidade (LOPES, 2015).

Quanto ao estudo da herança deve se considera um provável erro, sendo assim, existem dois tipos de erros que podem se associar ao teste de hipótese. Sendo dito por Krug (1938) e Charrier e Eskes (2004) que a contaminação pode ser considerada a fonte de erro mais importante para um experimento de hibridação. O erro I, também conhecido como falso positivo, está presente quando ocorre alguma forma de contaminação durante a realização dos procedimentos, e o erro II é o chamado falso negativo, podendo ser representado por alguma falha que ocorreu durante o experimento (LOPES, 2015).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Plantas testadoras e população reprodutora

A resposta de compatibilidade de cada genótipo foi avaliada em relação às plantas testadoras. Os genótipos BRS 1216 (Conilon Emcapa03 × Robusta1675), BRS 2299 (genótipo híbrido de polinização aberta) e BRS 3193 (genótipo híbrido de polinização aberta) foram utilizados como plantas testadoras dos grupos de compatibilidade I, II e III, respectivamente (MORAES et al. 2018, TEIXEIRA et al. 2020).

A população reprodutora foi composta por sessenta e duas plantas com características das variedades botânicas Conilon e Robusta, cultivadas em campo de produção híbrida montado em 2017 no campo experimental da EMBRAPA de Porto Velho, RO, Brasil. Esta população reprodutora foi selecionada de acordo com a maior divergência genética estimada a partir da avaliação dos descritores agronômicos e morfológicos ao longo de três anos (OLIVEIRA et al. 2018). As matrizes da variedade botânica Conilon, se caracterizam morfológicamente pelo seu menor porte, maior resistência ao déficit hídrico e maior suscetibilidade a pragas e doenças. E as matrizes da variedade botânica Robusta se diferenciam pelo maior porte, menor resistência ao déficit hídrico e maior resistência a pragas e doenças (ROCHA et al. 2015). Os genótipos da variedade botânica Conilon foram identificados com o prefixo **C** e as plantas-mãe da variedade botânica Robusta foram identificadas pela letra **R**.

3.2. Polinização *in vitro*

A polinização *in vitro* consistiu na transferência dos grãos de pólen das plantas doadoras para os estigmas das plantas receptoras, realizada em laboratório. No campo experimental da Embrapa Rondônia no município de Porto Velho, RO, a floração foi monitorada semanalmente de janeiro a dezembro de 2020. O menor número de grãos de pólen e flores necessários para a polinização *in vitro* permite que um maior número de hibridizações seja realizado ao longo do ano-safra. Os procedimentos de polinização *in vitro* foram realizados em três ocasiões diferentes: 5 de junho de 2020, 31 de julho de 2020 e 9 de setembro de 2020, totalizando 550 hibridizações direcionadas, com 289, 108 e 153 hibridizações realizadas em cada data, respectivamente. Antes da polinização *in vitro*, foram realizados testes de germinação dos grãos de pólen para cada planta doadora em solução de sacarose a 10% (OWUOR 1985).

Para facilitar o desprendimento dos grãos de pólen, as anteras foram imersas em 5,0 mL de solução de sacarose a 10% em tubos tipo Eppendorf. Utilizando uma pipeta, a solução contendo grãos de pólen foi distribuída de forma homogênea em uma placa de Petri. Após 60 minutos, usando um microscópio estereoscópico (ampliação de 50x), três réplicas de 100 grãos de pólen foram contadas para cada doador de pólen. Os grãos de pólen cujo comprimento do tubo polínico era maior que o diâmetro do grão de pólen foram considerados germinados. Taxas médias de germinação superiores a 60% indicam boa viabilidade do grão de pólen (OWUOR, 1985) (Figura 3). No dia anterior à antese,

por volta das 16h, foram coletadas as inflorescências das plantas receptoras e doadoras (testadoras), que foram colocadas em sacos de papel e levadas ao Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Embrapa Rondônia.

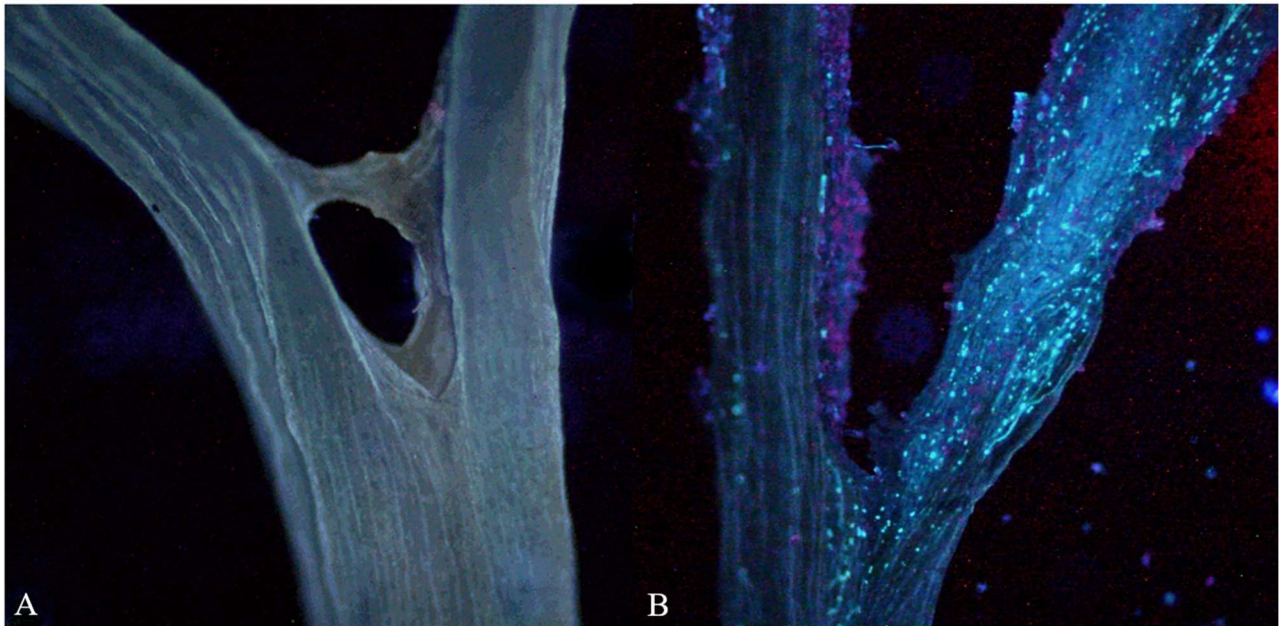
Figura 3: Teste de germinação de grãos de pólen com visualização em microscópio com ampliação de 50X, 2 horas após a imersão em solução de sacarose a 10%. Foto: SOUZA, C. A. (2020).



Os estames e pétalas das flores receptoras foram removidos e as inflorescências, contendo três, quatro ou cinco flores, foram colocadas em recipientes com meio de cultura sólido (água, 30% sacarose, 6% ágar bacteriológico, 1% amoxicilina), com o pedúnculo imerso em meio de cultura (TORRES et al., 1998). Após a exposição ao ambiente, o meio de cultura antibiótico é viável por aproximadamente quatro dias, tempo suficiente para o desenvolvimento dos tubos polínicos, que requerem aproximadamente 36 horas. As inflorescências das plantas doadoras, com os botões ainda fechados, foram colocadas em recipientes com o mesmo meio de cultura, com o pedúnculo imerso no meio. Em seguida, todos os recipientes foram lacrados com filme plástico para evitar contaminação por grãos de pólen e mantidos em sala de crescimento de plantas a 26 ± 1 °C e fotoperíodo de 16 horas ($50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Cada diagnóstico de compatibilidade é com base na avaliação de 10 estigmas polinizados em uma das pontas do estigma bifido. No dia da antese, os grãos de pólen foram coletados das flores a partir das 09:00 (Nove) horas da manhã em que se encontravam secos o suficiente para que ocorra a raspagem das anteras deiscientes com bisturi. A raspagem deve ser realizada até que os grãos de pólen sejam visíveis a olho nu no bisturi. A lâmina do bisturi, cheia

de grãos de pólen, foi então delicadamente esfregada em uma das pontas do estigma bifido levando à aderência dos grãos de pólen ao estigma, a polinização em apenas um dos lados permitiu uma melhor confirmação da formação do tubo polínico. Os estigmas foram incubados nas mesmas condições durante 30 horas após a polinização ter sido realizada (Figura 4).

Figura 4: A: Estigma polinizado sem o desenvolvimento de tubos polínicos. B: A polinização de apenas um dos lados do estigma bifido favorece a visualização ao microscópio pelo contraste entre os estilos polinizados e não polinizados. Foto: SOUZA, C. A. (2020).



3.3. Microscopia de fluorescência

O diagnóstico de compatibilidade é baseado na visualização do desenvolvimento dos tubos polínicos no pistilo das plantas compatíveis. Trinta e seis (36) horas após a polinização, os estigmas foram armazenados em solução de FAA (formaldeído 10%, ácido acético glacial 10% e etanol 80%), utilizando frascos de penicilina (10 mL) com tampa de borracha (COULIBALY et al. 2002). As amostras foram então armazenadas em geladeira a 5°C até o preparo das lâminas. Para o preparo das lâminas, os pistilos foram retirados do FAA, lavados com água destilada e imersos em hidróxido de sódio (NaOH 1N) por 2 horas. Após esse período, os estigmas foram lavados com água destilada e corados por 12 horas com corante azul de anilina 1% preparado em solução de K_2HPO_4 0,1 M. Em seguida, os estigmas foram novamente lavados com água destilada. A solução de hidróxido de sódio causa hidrólise alcalina das ligações covalentes do tipo éster entre a lignina e os carboidratos estruturais da parede celular com solubilização da hemicelulose e dos compostos fenólicos (TARKOW e FEIST, 1969).

Para visualização, dez pistilos foram colocados em cada lâmina, e uma lamínula foi pressionada delicadamente sobre os pistilos para achatá-los na lâmina. O material foi visualizado em microscópio (Leica DM2500), equipado com sistema de fotodocumentação. Os pistilos foram visualizados em aumentos de 100x e 200x, contando-se o número de pistilos que apresentavam tubos polínicos completamente desenvolvidos. Dez estigmas foram avaliados para cada hibridização direcionada, sendo considerados compatíveis os cruzamentos que apresentaram tubos polínicos completamente desenvolvidos no estilo do estigma. A eficiência de polinização (Ep) foi estimada a partir da razão entre o número de estigmas polinizados (NPS) e o número total de estigmas (TNS). No diagnóstico de compatibilidade, é importante considerar que cada procedimento tem uma probabilidade de erro, devido às condições de manuseio do material ou do ambiente. Os procedimentos de polinização *in vitro* permitem que a transferência de grãos de pólen seja controlada com precisão, evitando diagnósticos falsos positivos que ocorrem quando dois genótipos são incorretamente considerados compatíveis, devido à contaminação. Erros do tipo falso negativo também podem ocorrer, quando dois genótipos são considerados incompatíveis, devido a alguma falha no procedimento. Assim, para diagnóstico de compatibilidade, foi considerada uma taxa de erro de 5% em cada procedimento.

3.4. Diversidade genética

Para quantificação da variabilidade genética, foram avaliadas as seguintes características nos anos agrícolas de 2018-2019 e 2019-2020: altura de planta (PHEI), número de ramos plagiotrópicos produtivos (NPLAG); distância entre rosetas da parte intermediária do ramo plagiotrópico (DROS); número de grãos por roseta da parte intermediária do ramo plagiotrópico (GROS); número de rosetas por ramo plagiotrópico (NROS); e comprimento do ramo plagiotrópico (PLAGL). O tempo de maturação foi determinado utilizando-se o critério de que a planta tenha 70% de frutos no estágio cereja, com registro da data de colheita (NDAYS). Os valores genotípicos da produção por parcela (VGProd) foram estimados com base no peso dos grãos processados. Por sua vez, a granulometria foi avaliada individualmente utilizando um conjunto de 12 peneiras diferentes a partir de amostras de 250g de café beneficiado (PEN). O comprimento e a largura das folhas (LLEN, LWID, respectivamente) foram estimados a partir da avaliação de 10 folhas coletadas no terço médio da planta e medidas com paquímetro digital.

Para quantificar a divergência genética, utilizou-se a análise de componentes principais, associada aos pontos de referência denominados centróides, obtidos a partir do comportamento médio de cada variedade botânica (ROCHA et al., 2005). Centróides foram usados para interpretar o agrupamento de genótipos em relação às variedades botânicas características.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O agrupamento de um genótipo em determinado grupo de compatibilidade fundamenta-se no diagnóstico de incompatibilidade com um dos testadores previamente conhecidos (MORAES et al., 2018). As hibridações foram planejadas a partir dos resultados observados em cada experimento, considerando indivíduos a serem avaliados e as plantas testadoras previamente conhecidas. Os resultados sumarizados de 289 hibridações mostram que 17 genótipos da variedade botânica Conilon (27%) e 13 genótipos da variedade botânica Robusta (21%) agruparam com algum dos três testadores previamente conhecidos (Tabela 1).

A transferência de grãos de pólen entre anteras doadoras e estigmas receptores, em ambiente asséptico, evita a ocorrência de erros tipo falso positivo causado pela contaminação com grãos de pólen provenientes de diferentes plantas (SOUZA et al., 2021). No entanto, erros do tipo falso negativo podem ocorrer quando dois genótipos são classificados como incompatíveis devido a uma falha no procedimento. Deste total de 289 hibridações foram observados 13 diagnósticos que falharam, o que equivale a uma taxa de erro de 4,5%. O valor de probabilidade do agrupamento de cada genótipo foi estimado individualmente em função do número de estigmas avaliados, considerando probabilidade de erro de 5% (Tabela 1).

Tabela 1. Resumo das hibridizações realizadas de 62 genótipos com plantas-teste dos grupos de compatibilidade I, II e III. As hibridizações não compatíveis são indicadas pelos números negativos e as hibridizações compatíveis são indicadas pelos números sem formatação.

n	Genótipo	I	II	III	FN	FP	Group	p-value
1	C 167	-2	1	1	0	0	I	<0.01
2	C 799	-2	1	1	0	0	I	<0.01
3	C 986	-2	1	1	0	0	I	<0.01
4	C 154	-2	1	1	0	0	I	<0.01
5	C 452	-2	1	1	0	0	I	<0.01
6	C468	1	-2	2	0	0	II	<0.01
7	C 795	1	-2	1	1	0	II	<0.01
8	C 945	1	-2	1	0	0	II	<0.01
9	C 125	2	-1	2	0	0	II	0.05
10	C 184	1	-1	1	0	0	II	0.05
11	C 59	1	-2	1	0	0	II	<0.01
12	C 729	1	-1	2	0	0	II	0.05
13	C 801	1	-2	1	0	0	II	<0.01
14	C 46	1	-2	2	0	0	II	<0.01

15	C 484	1	1	-2	0	0	III	<0.01
16	C 968	1	1	-1	0	0	III	0.05
17	C 694	2	1	-2	0	0	III	<0.01
18	C 796	1	1	1	0	0	New	-
19	C 998	1	1	1	0	0	New	-
20	C 1048	2	3	3	1	0	New	-
21	C 1059	2	2	1	1	0	New	-
22	C 556	2	1	1	1	0	New	-
23	C 747	1	1	1	0	0	New	-
24	C 846	1	1	1	0	0	New	-
25	C 890	1	1	1	0	0	New	-
26	C 909	1	1	1	0	0	New	-
27	C 973	1	1	1	0	0	New	-
28	R 183	-2	2	1	1	0	I	<0.01
29	R 30	-1	4	1	0	0	I	0.05
30	R 5	-2	1	1	0	0	I	<0.01
31	R 214	-2	1	1	0	0	I	<0.01
32	R 216	-2	1	1	1	0	I	<0.01
33	R 3	-2	1	2	0	0	I	<0.01
34	R 277	1	-2	1	0	0	II	<0.01
35	R 63	1	-2	1	0	0	II	<0.01
36	R 9	1	-2	1	0	0	II	<0.01
37	R 99	3	-2	2	0	0	II	<0.01
38	R 164	2	2	-2	0	0	III	<0.01
39	R 32	3	1	-2	0	0	III	<0.01
40	R 36	2	1	-3	0	0	III	<0.01
41	R 20	3	2	3	0	0	New	-
42	R 161	1	1	1	0	0	New	-
43	R 186	1	3	2	0	0	New	-
44	R 222	2	1	1	0	0	New	-
45	R 240	2	1	2	0	0	New	-
46	R 302	1	1	2	1	0	New	-
47	R 212	1	2	1	0	0	New	-
48	R 224	2	2	2	1	0	New	-
49	R 157	1	2	1	0	0	New	-
50	R 160	1	2	1	1	0	New	-
51	R 220	1	3	1	0	0	New	-
52	R 243	1	6	1	0	0	New	-
53	R 307	2	1	1	2	0	New	-
54	R 309	1	1	1	0	0	New	-
55	R 312	2	4	2	0	0	New	-
56	R 42	3	3	2	0	0	New	-
57	R 66	1	4	1	0	0	New	-
58	R 90	1	1	2	1	0	New	-
59	R 1	1	2	1	0	0	New	-

60	R 131	2	4	2	0	0	New	-
61	R 125	1	3	2	1	0	New	-
62	R 155	1	2	1	0	0	New	-

n: numeração ordinal; Genótipo: identificação do genótipo do receptor; I: grupo de compatibilidade I (um); II: grupo de compatibilidade II (dois); grupo de compatibilidade III (três); Novo: um novo grupo de compatibilidade; FN: hibridizações com erro do tipo falso negativo; FP: hibridizações com erro do tipo falso positivo; Grupo: diagnóstico do grupo de compatibilidade; e valor de p: probabilidade de erro de classificação do genótipo em seu respectivo grupo de compatibilidade considerando uma taxa de erro de 5%.

A eficiência de polinização estimada a partir da comparação entre o número de diagnósticos compatíveis (233) e o número total de hibridações (289) foi de 80%. Na população avaliada constituída por 62 genótipos, foram observados 10 genótipos da variedade botânica Conilon (16%) e 22 genótipos da variedade botânica Robusta (36%) que foram compatíveis com todos os testadores conhecidos, indicando a existência de novos grupos de compatibilidade.

No centro de origem desse cafeeiro em continente africano, existem relatos de maior variabilidade alélica do gene S que governa a expressão da autoincompatibilidade (OMOLAJA e FAWOLE, 2004). Até a obtenção dos resultados desse trabalho, avaliações de populações brasileiras indicaram a existência de apenas três alelos, e três grupos de compatibilidade. Na década de 60 Conagin e Mendes (1961) apresentaram resultados mostrando o agrupamento de genótipos em três grupos diferentes, e mais recentemente, resultados semelhantes foram observados por Moraes et al. (2018), que agruparam clones de novas cultivares desenvolvidas pela Embrapa em apenas três grupos de compatibilidade (TEIXEIRA et al., 2020).

O maior número de hibridações avaliadas nesse estudo e a seleção prévia dos genitores de maior divergência genética das variedades botânicas Conilon e Robusta (OLIVEIRA et al., 2018), pareceram fundamentais para identificação das novas fontes de variabilidade. Na caracterização da compatibilidade de dez cultivares da Embrapa, Moraes et al., 2018 observaram uma diversidade menor entre genótipos com grau de parentesco de irmãos completos e meios irmãos.

A identificação de novos grupos de compatibilidade fornece subsídios para novas práticas de manejo para aumentar a eficiência de polinização, pelo favorecimento natural de cruzamentos totalmente compatíveis. Em *C. canephora* o percentual de grãos moca pode ser interpretado como uma medida da eficiência de polinização (SOUZA et al., 2017). Aumentos de até 40% na taxa de pegamento dos frutos foram observados em trabalhos de eficiência de polinização (IMBACH et al., 2017), que tem sua importância aumentada nos anos de maior produtividade do cafeeiro, quando nos dias do florescimento uma grande quantidade de flores deve ser polinizada por diferentes agentes polinizadores. Souza et al. (2017), observaram um aumento de 40 para 60% no percentual de grãos moca entre a primeira safra e a segunda safra de maior produtividade.

Buscando agrupar os genótipos que foram compatíveis com todos os testadores previamente conhecidos foram realizadas hibridações em delineamento de dialelo completo com cruzamentos recíprocos (Tabela 2). Os genótipos avaliados foram escolhidos aleatoriamente dentro do grupo das plantas classificadas em novos grupos de compatibilidade, tendo sido utilizadas como doadores, os ramos dos seis genótipos que apresentaram no momento da hibridação as maiores taxas de germinação de seus grãos de pólen (Taxa de germinação $\geq 85\%$).

Fundamental para o estudo da herança de características quantitativas, os delineamentos em dialelo, também são úteis para caracterização da compatibilidade de um menor número de genótipos com maior precisão (HAYMAN, 1954). Os cruzamentos recíprocos são interpretados para revisar os diagnósticos de compatibilidade, confirmando cada uma das hibridações realizadas individualmente. Os genótipos avaliados agruparam-se em três novos grupos de compatibilidade identificados pelos algarismos romanos IV, V e VI (Tabela 2). A partir dessa classificação as plantas C556 e C1059 do grupo IV a planta R309 do grupo V e as plantas R161, R 224 e C1048 do grupo VI foram escolhidas como plantas testadoras dos seus respectivos grupos de compatibilidade.

Tabela 2. Hibridações em delineamento de dialelo completo com autofecundações e recíprocos de seis genótipos com características das variedades botânicas Conilon e Robusta que foram compatíveis com todas as testemunhas previamente conhecidas. A: resposta de compatibilidade das hibridações direcionadas. B: agrupamento nos novos grupos de compatibilidade denominados ordinalmente de IV, V e VI.

A:							B:			
Genotypes	C1059	C556	C1048	R309	R161	R224	Groups	IV	V	VI
C1059	NC ¹	NC	C	C	C	C	IV	C556	R309	R161
C556	NC ²	NC ¹	C	C	C	C	V	C1059		R224
C1048	C ²	C ²	NC ¹	C	NC	NC	VI			C1048
R309	C ²	C ²	C ²	NC ¹	C	C				
R161	C ²	C ²	NC ²	C ²	NC ¹	NC				
R224	C ²	C ²	NC ²	C ²	NC ²	NC ¹				

Genótipos identificados pela letra C são plantas da variedade botânica Conilon e os genótipos identificados pela letra R são plantas da variedade botânica Robusta. ¹autofecundações, ²cruzamentos recíprocos, IV, V e VI: novos grupos de compatibilidade identificados.

Diferente do conceito normalmente utilizado no melhoramento de plantas de utilização de plantas testadoras para determinação das capacidades específicas e gerais de combinação, a utilização de plantas testadoras para determinação dos grupos de compatibilidade se fundamenta na avaliação da resposta de compatibilidade em comparação com uma planta de genótipo conhecido para o gene S. Os genótipos C556, R309 e R224 foram utilizados como plantas testadoras dos grupos de compatibilidade IV, V e VI nas hibridações realizadas no mês de setembro de 2020. Os resultados

sumarizados da avaliação de 153 hibridações indicam que entre os 32 genótipos que foram compatíveis com todos os testadores previamente conhecidos, 9 clones se agruparam no grupo IV, oito clones no grupo V e quinze clones no grupo VI (Tabela 3). Na avaliação destas 153 hibridações foram observados 9 erros falso negativos, que equivale a uma proporção de 3,9%.

Tabela 3. Resumo das hibridizações realizadas de 32 genótipos com plantas testadoras dos grupos de compatibilidade IV, V e VI. As hibridizações não compatíveis são indicadas pelo número entre parênteses e as hibridizações compatíveis são indicadas pelos números sem formatação.

n	Clone	IV	V	VI	FN	FP	Grupo	p-value
1	C 1048	4	3	-3	0	0	VI	<0.01
2	C 1059	-3	4	1	1	0	IV	<0.01
3	C 556	-3	4	2	0	0	IV	<0.01
4	C 747	-2	1	2	0	0	IV	<0.01
5	C 973	2	-1	1	1	0	V	0.05
6	C 796	-1	1	1	1	0	IV	0.05
7	C 846	4	3	-2	0	0	VI	<0.01
8	C 890	2	-2	1	0	0	V	<0.01
9	C 909	2	-2	2	0	0	V	<0.01
10	C 998	2	-2	2	0	0	V	<0.01
11	R 90	1	1	-1	1	0	VI	0.05
12	R 1	-2	1	2	0	0	IV	<0.01
13	R 125	1	1	-2	0	0	VI	<0.01
14	R 131	1	1	-2	0	0	VI	<0.01
15	R 155	2	1	-2	1	0	VI	<0.01
16	R 157	1	1	-2	0	0	VI	<0.01
17	R 160	1	2	-2	0	0	VI	<0.01
18	R 161	1	1	-1	0	0	VI	0.05
19	R 186	-2	1	1	0	0	IV	<0.01
20	R 20	2	1	-2	0	0	VI	<0.01
21	R 212	1	1	-2	0	0	VI	<0.01
22	R 220	1	1	-2	0	0	VI	<0.01
23	R 222	1	1	-1	0	0	VI	0.05
24	R 224	1	1	-1	0	0	VI	0.05
25	R 240	1	1	-1	0	0	VI	0.05
26	R 243	-2	2	1	0	0	IV	<0.01
27	R 302	2	-2	1	1	0	V	<0.01
28	R 307	1	-1	1	0	0	V	0.05
29	R 309	1	-2	1	0	0	V	<0.01
30	R 312	1	-2	1	0	0	V	<0.01
31	R 42	-1	1	1	0	0	IV	0.05
32	R 66	-2	2	1	0	0	IV	<0.01

IV: grupo de compatibilidade IV; V: grupo de compatibilidade V; grupo de compatibilidade VI; FN: hibridizações com erro do tipo falso negativo; FP: hibridizações com erro do tipo falso positivo; e

valor de p: probabilidade de erro de classificação do genótipo em seu respectivo grupo de compatibilidade considerando uma taxa de erro de 5%.

Apesar da sua importância, ainda há muito a ser esclarecido em relação aos mecanismos de expressão da compatibilidade no cafeeiro *C. canephora* (NOWAK et al., 2018). A caracterização das sequências das formas alélicas do gene S é favorecida pelo estudo de plantas haploides ou duplos haploides, homocigotas para esse gene. Lashermes et al. (1994), relataram o desenvolvimento de plantas haploides a partir de eventos raros de poliembirionia no cafeeiro que ocorrem em menos de 1% nas sementes e Lashermes et al. (1996), estudando o desequilíbrio de ligação, observaram marcadores RFLP e RAPD associados a esse gene. A baixa ocorrência espontânea de sementes poliembrionárias e a aplicação limitada de resultados de desequilíbrio de ligação entre marcadores moleculares e o gene que governa a expressão dessa característica, dificultam a utilização desses resultados no estudo da compatibilidade.

Baseado nos resultados de incompatibilidade com genótipos testadores dos grupos de compatibilidade, os 62 clones avaliados foram agrupados em seis grupos identificados a seguir: 11 genótipos no grupo I (17,74%), 13 genótipos no grupo II (20,97%), 6 genótipos (9,68%) no grupo III, 9 genótipos (14,52%) no grupo IV, 8 genótipos (12,90%) no grupo V e 15 genótipos (24,19%) no grupo VI. (Tabela 4).

Tabela 4. Agrupamento de 62 matrizes de *Coffea canephora* das variedades botânicas Conilon e Robusta, identificados em seus respectivos grupos de acordo com a compatibilidade com plantas testadoras.

	I	II	III	IV	V	VI
n	S1S2	S1S3	S2S3	S(1,2,3)S4	S(1,2,3)S4	S(1,2,3)S4
1	C 154	C 125	C 484	C 1059	C 890	C 1048
2	C 167	C 184	C 694	C 556	C 909	C 846
3	C 452	C 46	C 968	C 747	C 998	R 90
4	C 799	C468	R 164	C 796	C 973	R 160
5	C 986	C 59	R 32	R 243	R 309	R 222
6	R 183	C 795	R 36	R 186	R 312	R 20
7	R 214	C 801		R 1	R 302	R 161
8	R 216	C 945		R 42	R 307	R 131
9	R 3	C 729		R 66		R 125
10	R 30	R 63				R 155
11	R 5	R 9				R 157
12		R 99				R 224
13		R 277				R 212
14						R 220
15						R 240
Total	11	13	6	9	8	15

Conilon	5	9	3	4	4	2
Robusta	6	4	3	5	4	13
Robusta (%)	0.55	0.31	0.50	0.56	0.50	0.87

¹Plantas testadoras: Grupo I: BRS1216, Clone 12, Grupo II: BRS2299, BRS2336, Grupo III: BRS3210, BRS3193, Grupo IV: C1059; Grupo V: R309, C890; Grupo VI: r160; C846, C1048. S₁, S₂, S₃, S₄: diferentes formas alélicas do gene S, S_(1,2,3): forma alélica desconhecida de acordo com a variabilidade observada pode apresentar variação entre os alelos S₁, S₂ e S₃.

A caracterização dos genótipos testadores em duas etapas, permitiu inferir os genótipos dos grupos de compatibilidade I, II e III, mas limita a inferência dos genótipos dos grupos IV, V e VI que podem apresentar quaisquer combinações de alelos dos testadores previamente conhecidos, com a nova forma alélica dos novos grupos de compatibilidade identificados (Tabela 4). Essa limitação se deve a impossibilidade de diferenciar as hibridações parcialmente compatíveis que são aquelas que ocorrem entre genótipos que compartilham o mesmo alelo (ex. S₁S₂ x S₁S₃) das hibridações totalmente compatíveis que acontece entre genótipos que não compartilham nenhuma forma alélica em comum (ex. S₁S₂ x S₃S₄).

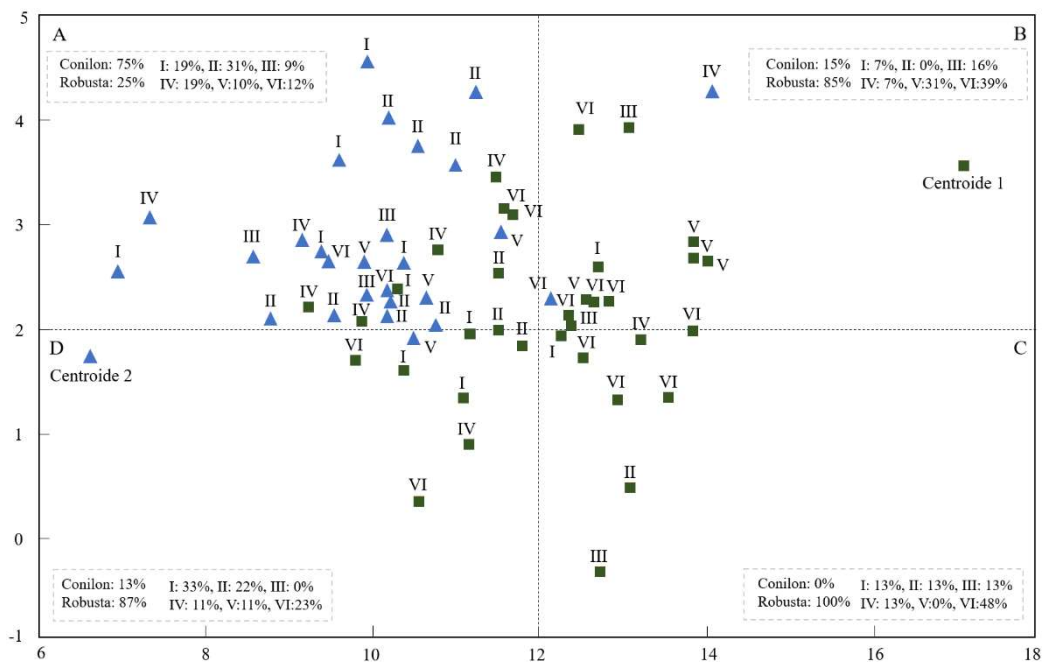
Por apresentar ação pré-zigótica que afeta a germinação dos grãos de pólen, não é possível diferenciar as hibridações parcialmente e totalmente compatíveis a partir do desenvolvimento dos tubos polínicos ou a partir do desenvolvimento dos frutos em campo. Ao trabalhar com plantas capazes de realizar apenas hibridações parcialmente compatíveis. Moraes et al. (2018), observaram altas taxas de pegamento de frutos. Esse resultado está associado ao desenvolvimento dos tubos polínicos, uma vez que os grãos de pólen incompatíveis, que paralisam seu desenvolvimento, não interferem no desenvolvimento dos grãos de pólen compatíveis.

Os seis grupos apresentaram diferentes frequências de plantas das variedades botânicas Conilon e Robusta (Tabela 4). O grupo II apresentou maior frequência de plantas da variedade botânica Conilon (0,69) e o grupo VI apresentou maior frequência de plantas da variedade botânica Robusta (0,87). Visando comparar os grupos de compatibilidade com a diversidade estimada a partir de avaliações em campo foi interpretada a dispersão dos dois primeiros componentes principais associados a pontos referenciais (Figura 4).

Os dois primeiros componentes principais que representam 78% da variabilidade dos dados originais, mostram a separação entre as duas populações de melhoramento, uma vez que os genótipos de Conilon se concentraram principalmente no quadrante A e os genótipos da variedade botânica Robusta nos quadrantes B, C e D (Figura 4). A maior dispersão dos genótipos da variedade botânica Robusta está associada a uma maior variabilidade genética observada entre os acessos de população.

Figura 5. Dispersão gráfica dos dois primeiros componentes principais de 62 genótipos das variedades botânicas Conilon e Robusta identificados pelas formas geométricas (triângulo: Conilon,

quadrado: Robusta). As letras A, B, C e D identificam os quadrantes de maior similaridade, e os centroides representam as plantas com as características típicas da variedade botânica Conilon (centroide 1) e Robusta (centroide 2). Os algarismos romanos representam os grupos de compatibilidade I, II, III e IV, respectivamente.



Genótipos dessa variedade botânica são uma importante fonte de variabilidade para a seleção e desenvolvimento de novos cultivares. Muitos trabalhos têm demonstrado diferenças entre populações de plantas dessas duas variedades botânicas, que são exploradas no melhoramento para produção de genótipos híbridos com as melhores características de cada uma destas variedades botânicas. Híbridos naturais que apresentam o menor tamanho, resistência à seca do Conilon, maior peneira e resistência a pragas e doenças do Robusta têm se destacado nas avaliações de campo (OLIVEIRA et al., 2018).

Nessa dispersão observa-se que os quadrantes B, C e D apresentaram maiores frequências de genótipos das variedades botânicas Robusta, 85%, 100% e 87%, respectivamente. Esses mesmos quadrantes apresentaram maior frequência de plantas do grupo de compatibilidade VI (39, 48 e 23%, respectivamente). Já no quadrante A, em que os genótipos de Conilon são mais frequentes, o grupo de compatibilidade II é o mais frequente (31%).

O mecanismo de determinação da compatibilidade coloca o gene S sob seleção negativa dependente da frequência, o que significa que a frequência de um alelo é inversamente proporcional ao seu valor adaptativo (FALCONER, 1996). Ou seja, os indivíduos em uma população portadores de formas alélicas mais raras desse gene, se beneficiam da maior frequência de potenciais plantas doadoras de pólen, fazendo com que a taxa de fecundidade de um indivíduo seja inversamente proporcional à frequência do alelo na população. Estas condições têm algumas implicações

importantes: nenhuma das formas alélicas pode se fixar na população, a taxa de mudança é maior do que em um loco neutro e os indivíduos da população serão altamente heterozigóticos.

Embora a autoincompatibilidade seja uma importante característica para populações naturais desse cafeeiro, a produção de frutos em uma lavoura depende da polinização entre plantas compatíveis. Em condições de cultivo trata-se de uma característica que deve ser manejada para não diminuir a eficiência de polinização das plantas, com impacto nas produtividades dos cafezais.

5. CONCLUSÕES

A partir de plantas testadoras previamente conhecidas foram identificadas novos grupos de compatibilidade ainda não relatados em plantas cultivadas no Brasil. A identificação de novos grupos de compatibilidade fornece subsídios para novas práticas de manejo para aumentar a eficiência de polinização, pelo favorecimento natural de cruzamentos totalmente compatíveis. A comparação do agrupamento dos genótipos em seus grupos de compatibilidade com a diversidade genética avaliada em campo indica que o grupo II apresentou maior frequência de plantas da variedade botânica Conilon (0,69) e o grupo VI apresentou maior frequência de plantas da variedade botânica Robusta (0,87). O maior número de hibridações avaliadas nesse estudo e a seleção prévia dos genitores de maior divergência genética das variedades botânicas Conilon e Robusta pareceram fundamentais para identificação das novas fontes de variabilidade.

Sendo a autoincompatibilidade uma característica que promove um aumento da variabilidade genética das populações vegetais na natureza, promovendo uma população mais resistente e com maior adaptabilidade em diferentes tipos de meio ambiente. Com uma grande importância também, nos estudos de melhoramento genético, colaborando para a formação de indivíduos que se destacam em suas características fenológicas e produtivas da espécie.

Com o aumento dos grupos de compatibilidade no *Coffe canephora*, se torna possível a identificação de uma maior quantidade de genótipos compatíveis uns com os outros em um cultivo comercial, aumentando assim, a eficiência da polinização e conseqüentemente aumento na produtividade nas lavouras.

6. REFERÊNCIAS

- ABIC. **Estatísticas**, 2015. Disponível em: <<http://www.abic.com.br/estatisticas.html>>. Acesso em: 20 de junho de 2022.
- ALLARD, R.W. **Princípios do melhoramento genético das plantas**. São Paulo: Edgard Blüchner, p. 381. 1971.
- BERTHAUD, J. Incompatibility in Coffea-Canephora - Test Method and Genetic Determinism. **Cafe Cacao The**, v.24, n.4, p.267-274, 1980.
- BERTRAND, B. GUYOT, B.; ANTHONY, F. LASHERMES, P. Impact of the Coffea canephora gene introgression on beverage quality of C. arabica. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 107, n. 3, p. 387-394, ago. 2003.
- BORÉM, A.; MIRANDA G. V. **Melhoramento de Plantas**. Viçosa, MG: 6ª Ed. UFV, p. 523, 2013.
- BRAGANÇA, S. M.; CARVALHO, C. H. S.; FONSECA, A. F. A.; FERRÃO, R. G. **Variedades clonais de café Conilon para o Estado do Espírito Santo**. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v.36, p.765- 770, 2001.
- BREWBAKER J. L. **Pollen cytology and self-Incompatibility systems in plants**. J Hered 48:271-277, 1957.
- CARVALHO, J. E. U. de; KATO, A. K.; FIGUEIRÊDO, F. J. C. **Efeito do estágio de maturação do fruto sobre a qualidade da semente do guaranazeiro**. Belém: EMBRAPA-CPATU, 1983. 11 p. (Circular técnica, 43).
- CASTRIC, V.; VEKEMANS, X. **Invited Review: Plant self-incompatibility in natural populations: a critical assessment of recent theoretical and empirical advances**. Molecular Ecology, v.13, n.10, p.2873-2889, 2004.
- CHARLESWORTH, D.; GUTTMAN, D. S. **Plant genetics: Seeing selection in S allele sequences**. Current Biology, v.7, n.1, p.R34-R37, 1997.
- CHARLESWORTH, D.; AWADALLA, P. **Flowering plants self-incompatibility: the molecular population genetics of Brassica S-loci**. Heredity, v.81, p.1-9, 1998.
- CHARRIER, A; VIGREUX, M. L'intercompatibilité des clones de caféiers cultivés sur la côte est Malgache. **Café Cacao Thé**, v. 16, n. 2, p. 111-122, 1972.
- CHARRIER, A.; ESKES, A. B. Botany and Genetics of Coffee. In: WINTGENS, J. N.(Ed.). **Coffee: Growing, Processing, Sustainable Production: A guidebook for growers, processors, trades and researchers**. Weinheim. Wiley-Vch, p.25-56, 2009.
- CONAGIN, C.H.T.M.; MENDES, A. J. T. **Pesquisas citológicas e genéticas em três espécies de Coffea; autoincompatibilidade em Coffea canephora**. Bragantia, v.20, p.787- 804, 1961.
- ESCH, H. E.; BURNS, J. E. **Distance estimation by foraging honeybees**. Journal of Experimental Biology, v.199, n.1, p.155-162, 1996.
- CONTI, FÁTIMA. **Biometria - Qui quadrado**. Muitas Dicas. Laboratório de Informática - ICB - UFPA. Disponível em:< <http://www.ufpa.br/dicas/biome/biopdf/bioqui.pdf>> Acesso em:29 set 2015.
- DE FRANCESCHI, P.; DONDINI, L.; SANZOL, J. Molecular bases and evolutionary dynamics of self-incompatibility in the Pyrinae (Rosaceae). **Journal of Experimental Botany**, 2012.
- DEPOLO, R.P.; ROCHA, R.B.; SOUZA, C.A. de; SANTOS, M.R.A. dos; ESPINDULA, M.C.; TEIXEIRA, A.L. Expression of selfincompatibility in Coffea canephora genotypes grown in the western Amazon. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.57, e03031, 2022.
- DEVREUX, M. et al. Stability parameters for comparing varieties. **Crop Science**, v.6, p.36-40, 1959.
- DUBBERSTEIN, D.; PARTELLI, F. L.; GUILHEN, J. H. S.; RODRIGUES, W. P.; RAMALHO, J. C.; RIBEIRO-BARROS, A. I. Características biométricas como ferramenta para identificação e melhoramento de genótipos de Coffea canephora. **Genetics and Molecular Research**, v. 19, n. 2, 2020.

- FALCONER, D.S. **Introdução à genética quantitativa**. Edinburgh: Longman Group Limited, 463p, 1996.
- EMBRAPA. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/68437155/producao-dos-cafes-do-brasil-ocupa-182-milhao-de-hectares-em-2022>. Acesso em 25 de junho de 2022.
- ESCH, H. E.; BURNS, J. E. **Distance estimation by foraging honeybees**. Journal of Experimental Biology, v.199, n.1, p.155-162, 1996.
- FAZUOLI, L. C.; GALLO, P. B.; MARTINS, A. L. M.; GUERREIRO, O.; MEDINA, H. P. Seleção antecipada e sua eficiência no café Icatu. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PESQUISAS DOS CAFÉS DO BRASIL, 1.,2000, Campinas. **Anais...** Campinas: IAC, 2000. p. 576-582.
- FERRÃO, R. G.; FONSECA, A. F. A.; FERRÃO, M. A. G.; DE MUNER, L. H.; VERDIM FILHO, A. C.; VOLPI, P. S.; MARQUES, E. M. G.; ZUCATELI, F. **Café Conilon: técnicas de produção com variedades melhoradas**. Circular Técnica, 03-I, Vitória, ES:Incaper, p.60, 2004.
- FERRÃO, M. A. G.; DA FONSECA, A. F. A.; VERDIN FILHO, A. C.; VOLPI, P. S. Origem, dispersão geográfica, taxonomia e diversidade genética de *Coffea canephora*. In: FERRÃO, R. G. et al. (Ed.). **Café conilon**. Vitória-ES: Incaper, p.66-91, 2007a.
- FERRÃO, R. G.; PACOVA, B.; FERRÃO, M.; DA FONSECA, A. F. A. Melhoramento genético do *Coffea canephora*. In: FERRÃO, R.G. et al. (Ed.). **Café Conilon**. Vitória-ES: Incaper, p.121-173, 2007 b.
- FERRÃO, M. A. G.; SOUZA, E. M. R.; FONSECA, A. F. A.; FERRÃO, R. G. **Autoincompatibilidade e produção sustentável do café Conilon**. Incaper, Vitória, p.177-188, 2017.
- FRANCESCHI, P. DE; DONDINI, L.; SANZOL, J. **Molecular bases and evolutionary dynamics of self-incompatibility in the *Pyrinae* (*Rosaceae*)**. Journal of Experimental Botany 63: 4015-4032, 2012.
- HESLOP-HARRISON, J. **Pollen-stigma interaction in the Leguminosae: the organization of the stigma in *Tritifium pratense* L.** Annals of Botany 51: 571-583, 1983.
- IGIC, B.; LANDE, R.; KOHN, J. R. **Perda de autoincompatibilidade e suas consequências evolutivas**. Int J Plant Sci 169: 93-104, 2008.
- IMBACH, P.; FUNG, E.; HANNAH, L.; NAVARRO-RACINES, C. E.; ROUBIK, D. W.; RICKETTS, T. H.; ROEHRDANZ, P. R. **Coupling of pollination services and coffee suitability under climate change**. PNAS 114 (39): 10438-10442, 2017.
- JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. Ed. Guanabara Koogan, 10 ed. p.488, 2004.
- HAYMAN, B. I. The theory and analysis of diallel crosses. **Genetics**, v. 39, p 789-809. PMID:17247520, 1954.
- KRUG, C. A. **Controle da polinização do cafeeiro**. v. 15, Campinas: IAC, p.12, 1938. (Boletim Técnico)
- LASHERMES, P.; COUTURON, E.; CHARRIER, A. Doubled haploids of *Coffea canephora*: development, fertility and agronomic characteristics. **Euphytica**, v. 74, p. 149-157,1994.
- LASHERMES, P.; COUTURON, E.; MOREAU, N.; PAILLARD, M.; LOUARN, J. **Inheritance and genetic mapping of self-incompatibility in *Coffea canephora* Pierre**. Theoretical and Applied Genetics, v. 93, n. 3, p. 458-462, 1996.
- LOPES, T. A. **Caracterização da autoincompatibilidade gametofítica de clones superiores de *Coffea canephora***. Universidade Federal de Rondônia, Núcleo de Ciências Exatas e da Terra. 2015.
- MARCOLAN, A. L.; RAMALHO, A. R.; MENDES, A. M.; TEIXEIRA, C. A. D.; FERNANDES, C. de F.; COSTA, J. N. M.; VIEIRA JÚNIOR, J. R.; OLIVEIRA, S. J. de M. FERNANDES, S. R.; VENEZIANO, W. **Cultivo dos cafeeiros Conilon e Robusta para Rondônia**. 3. ed. rev. atual. 61p. Porto Velho: Embrapa Rondônia, 2009. 67p. (Embrapa Rondônia. Sistema de Produção, 33).
- MAUCH-MANI B.; MAUCH F. **The role of abscisic acid in plant-pathogen interactions**. Curr Opin Plant Biol. 8(4):409-14, 2005.

- MENDES, C. H. T. **Introdução ao estudo da auto-esterilidade no gênero *Coffea***. *Bragantia*, 9:25-41, 1949.
- MILORI, D. M. B. P.; MARTIN-NETO, L.; BAYER, C.; MIELNICZUK, J.; BAGNATO, V. **Humification degree of soil humic acids determined by fluorescence spectroscopy**. *Soil Science*, vol.167, p. 739-749, 2002.
- MICHAELSON-YEATES, T.P.T.; MARSHALL A.; ABBERTON, M. T.; RHODES, I. **Self-compatibility and heterosis in white clover (*Trifolium repens* L)**. *Euphytica*, v.94, p.341-34, 1997.
- MONTAGNON, C.; LEROY, T.; CILAS, C.; LEGNATÉ, H.; CHARRIER, A. Heterozygous genotypes are efficient testers for assessing between-population combining ability in the reciprocal recurrent selection of *Coffea canephora*. **Euphytica**, v. 160, n. 1, p. 101-110, 2008.
- MORAES, M. S. Caracterização da autoincompatibilidade gametofítica de clones superiores de *Coffea canephora*. **Genética e Pesquisa Molecular**, v. 17, p. 1-11, 2018.
- NETTANCOURT, D. **Incompatibility and incongruity in wild and cultivated plants**, 2nd edn. Berlin: Springer. p. 322, 2001.
- NOWAK, M. D.; DAVIS, A. P.; ANTHONY, F.; YODER, A. D. **Expression and Trans-Specific Polymorphism of Self-Incompatibility RNases in *Coffea* (Rubiaceae)**. *Plos One*, v.6, n.6, 2011.
- OMOLAJA, S.; FAWOLE, I. **Determination of the number of self-incompatibility alleles (SIA) in *Coffea canephora* and the role of pollen-stylar protein in the expression of SIA**. In: OMOLAJA S. AND FAWOLE I. (eds.) ASIC 2004 20th International Conference on Coffee Science, Bangalore, p. 11-15.
- OLIVEIRA, L. N. L. D.; ROCHA, R. B.; FERREIRA, F. M.; SPINELLI, V. M.; RAMALHO, A. R.; TEIXEIRA, A. L. Selection of *Coffea canephora* parents from the botanical varieties Conilon and Robusta for the production of intervarietal hybrids. **Ciência Rural**, v. 48, n. 4, 2018.
- OWUOR, J. Interspecific hybridization between *Coffea arabica* L. and tetraploid *C. canephora* P. Ex Fr. II. Meiosis in F 1 hybrids and back crosses to *C. arabica*. **Euphytica**, v.34, p. 355-360, 1985
- ROCHA, R. B.; MURO-ABAD, J. I.; ARAÚJO, E. F.; CRUZ, C. D. Utilização do método Centróide para estudo de estabilidade e adaptabilidade ao ambiente,. **Ciência Florestal**, v, 15, p, 255-266, 2005.
- ROCHA, R. B.; TEIXEIRA, A. L.; RAMALHO, A. R.; SOUZA, F. D. Melhoramento de *Coffea canephora* - considerações e metodologias, In: MARCOLAN, A. L. e ESPINDULA, M. C. (Ed.). **Café na Amazônia**, Brasília, DF: Embrapa, 2015.
- SASSA, H.; KAKUI, H.; MINAMIKAWA, M. **Pollen-expressed F-box gene family and mechanism of S-RNase-based gametophytic self-incompatibility (GSI) in Rosaceae**. *Sexual Plant Reproduction* 23: 39-43, 2010. Disponível em:<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20165962>> Acesso em: 14 Jul. 2015.
- SCHIFINO-WITTMANN, M. T.; DALL'AGNOL, M. **Autoincompatibilidade em plantas**. *Ciencia Rural*, v.32, p.1083-1090, 2002. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cr/v32n6/12759.pdf>> Acesso em: 23 fev 2015.
- SCHUSTER, I.; CRUZ, C. D. **Estatística genômica aplicada a populações derivadas de cruzamentos controlados.**, Viçosa- MG: Editora UFV, p. 568, 2004.
- SOUZA, C. A. D.; ROCHA, R. B.; ALVES, E. A.; ESPINDULA, M. C.; RAMALHO, A. R.; TEIXEIRA, A. L.; FERRÃO, M. A. G. Componentes genéticos do desenvolvimento e maturação de frutos de *Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner. **Coffee Science**, v.12, p. 355-364, 2017.
- SOUZA, C. A. D.; ROCHA, R. B.; SANTOS, M. R. A. D.; LOPES, T. A.; TEIXEIRA, A. L.; ESPINDULA, M. C. In vitro pollination and fluorescence microscopy for characterization of gametophytic selfincompatibility of *Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner. **Crop Breeding and Applied Biotechnology** 21(4): e37692142, 2021.
- TARKOW, Harold; FEIST, WILLIAM C. A mechanism for improving the digestibility of lignocellulosic materials with dilute alkali and liquid ammonia. 1969. 197-218.
- TEIXEIRA, A. L.; ROCHA, R. B.; ESPINDULA, M. C.; RAMALHO, A. R.; VIEIRA JÚNIOR, J. R.; ALVES, E. A.; FERNANDES, C. D. F. Amazonian Robustas-new *Coffea canephora* coffee

cultivars for the Western Brazilian Amazon. **Crop Breeding and Applied Biotechnology 20:** e323420318, 2020.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** Brasília: Embrapa-SPI: Embrapa-CNPq, 1998.