

DIVERSIDADE GENÉTICA DE CLONES DE *Coffea canephora* POR
MEIO DE ABORDAGENS FENOTÍPICAS E MOLECULARES

PRISCILA GONÇALVES FIGUEIREDO DE SOUSA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES / RJ
JANEIRO - 2023

DIVERSIDADE GENÉTICA DE CLONES DE *Coffea canephora* POR
MEIO DE ABORDAGENS FENOTÍPICAS E MOLECULARES

PRISCILA GONÇALVES FIGUEIREDO DE SOUSA

Tese apresentada ao Centro de Ciências e
Tecnologias Agropecuárias da Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,
como parte das exigências para obtenção do
título de Doutora em Produção Vegetal

Orientador: Prof. Dr. Henrique Duarte Vieira

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

JANEIRO – 2023

FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pela autora.

S725

Sousa, Priscila Goncalves Figueiredo de.

DIVERSIDADE GENÉTICA DE CLONES DE *Coffea canephora* POR MEIO DE ABORDAGENS

FENOTÍPICAS E MOLECULARES / Priscila Goncalves Figueiredo de Sousa. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2023.

109 f. : il.

Inclui bibliografia.

Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, 2023.

CDD - 630

DIVERSIDADE GENÉTICA DE CLONES DE *Coffea canephora* POR
MEIO DE ABORDAGENS FENOTÍPICAS E MOLECULARES

PRISCILA GONÇALVES FIGUEIREDO DE SOUSA

Tese apresentada ao Centro de Ciências e
Tecnologias Agropecuárias da Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,
como parte das exigências para obtenção do
título de Doutora em Produção Vegetal

Aprovada em: 25 de janeiro de 2023

Comissão examinadora

Pós Doc. Rosenilda de Souza (D.Sc., Ciências) – UENF

Prof^a. Daniela Barros de Oliveira (D.Sc., Ciências) – UENF

Prof. Fábio Luiz Partelli (D.Sc., Produção Vegetal) - UFES
(Coorientador)

Prof. Henrique Duarte Vieira (D.Sc., Produção Vegetal) - UENF
(Orientador)

“Eu sou a videira verdadeira, e meu Pai é o agricultor. Todo ramo que não der fruto em mim, ele o cortará; e podará todo o que der fruto, para que produza mais fruto.”

João 15, 1-2

DEDICO

Aos meus pais Edmilson e Celma,
Aos meus irmãos Lucas e Sara.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me concedido a graça da realização desse sonho e por tudo que Ele faz em minha vida;

Aos meus pais Edmilson e Celma por não medirem esforços para realização dos nossos sonhos, por estarem sempre presentes mesmo a distância, pelas infinitas orações, pelo apoio, incentivo e conselhos a cada dia;

Aos meus irmãos Lucas e Sara pela amizade e companheirismo a cada dia;

A toda minha família pelos ótimos momentos desfrutados juntos nos períodos de férias em casa;

Ao meu orientador Henrique Duarte Vieira por ter acreditado em mim, pelos ensinamentos, conselhos e orientação durante todos esses anos;

Aos professores Coorientadores, Alexandre Pio Viana, Fábio Luiz Partelli e Daniela Barros de Oliveira por serem sempre solícitos em ajudar e orientar e também pelo apoio na execução dos experimentos;

A Eileen, pela amizade e por ter pego na minha mão por diversas vezes para ajudar nos experimentos e na escrita dos artigos, por me acalmar em momentos de tensão e dizer que vai dar tudo certo, minha eterna gratidão!

Às técnicas de laboratório Marcela Boechat e Silvia Menezes de Faria Pereira, por toda ajuda com os equipamentos do laboratório durante a execução dos experimentos, foram fundamentais para que tudo fosse feito de maneira correta;

A Universidade Estadual Norte Fluminense, pela oportunidade de realização de um sonho;

Ao CNPq pela concessão da bolsa;

A FAPES pela parceria junto a Universidade Federal do Espírito Santo juntamente com o professor Fábio Luiz Partelli;

Ao pessoal da UFES pela ajuda na coleta do material vegetal para a realização dos experimentos;

Ao pessoal do laboratório de sementes pela ótima convivência;

Aos amigos da UENF pelos bons momentos vividos fora da Universidade;

A Ruth, amiga-irmã, obrigada pela convivência maravilhosa que tivemos durante esse período, pela amizade que só aumentou, pela parceria de sempre, pelo apoio em tudo e por estar sempre perto e presente;

Aos amigos de Imperatriz que mesmo longe estão sempre presentes;

Agradeço a cada um que se envolveu, participou e me amparou na realização desse sonho.

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	04
2.1 <i>Coffea canephora</i> : importância, produção e usos.....	04
2.2 <i>Coffea canephora</i> : origem, dispersão e botânica.....	06
2.3 Melhoramento genético do <i>Coffea canephora</i>	08
2.4 Diversidade genética do <i>Coffea canephora</i>	10
2.5 Marcadores moleculares microssatélites	11
2.6 Fenotipagem digital.....	13
2.7 Tamanho de grãos.....	15
3. ARTIGOS	18
3.1 <i>Coffea canephora</i> : Heterotic Crosses Indicated by Molecular Approach .	18
3.2 Diversidade genética em genótipos de <i>C. canephora</i> via fenotipagem digital	50
3.3 Magnus Grano: Qualidade máxima em tamanho de grãos.....	76
4. RESUMO E CONCLUSÕES	87
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90

RESUMO

Sousa, Priscila Gonçalves Figueiredo de. D.Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Janeiro de 2023. Diversidade genética de clones de *Coffea canephora* por meio de abordagens fenotípicas e moleculares. Orientador: Prof. Henrique Duarte Vieira. Coorientador: Prof. Alexandre Pio Viana. Supervisor: Prof. Fábio Luiz Partelli.

Objetivou-se com esse trabalho fazer a caracterização molecular de *C. canephora* por meio de marcadores microssatélites, quantificar a diversidade genética nesses clones por meio da estratégia Ward-MLM, estimar os parâmetros genéticos e correlações a partir da fenotipagem digital de grãos e frutos e ainda o lançamento da cultivar Magnus Grano, que é composta por cinco genótipos e que apresenta altas produtividades, os grãos apresentam tamanhos maiores e os genótipos apresentam boa adaptação às condições de cultivo. Para isso foram realizados três experimentos, em que no primeiro experimento foram avaliados por meio de marcadores microssatélites uma população de 44 genótipos de *C. canephora* e 1 genótipo de *C. arabica*, e para essa avaliação foram utilizados 21 primers. Esses primers identificaram 61 alelos na população e entre 2 e 5 alelos por loco. O índice de informação indicou um alto nível de polimorfismo dos marcadores analisados. De acordo com a heterozigosidade observada e esperada, a diversidade genética na população é alta. O coeficiente de endogamia global da população detectou alta heterozigosidade e zero endogamia dentro desta população. A diversidade genética entre os acessos também foi

avaliada pelo método de grupos de pares não ponderados baseado em médias aritméticas (UPGMA). Seis grupos foram formados com base na regra de corte de Mojena e três usando a abordagem bayesiana. Esses resultados confirmam a existência de diversidade genética, variabilidade genética e potencial de seleção em futuros melhoramentos envolvendo os 45 genótipos estudados. No segundo experimento foi feita fenotipagem digital de grãos e frutos de 43 genótipos de *C. canephora* com o auxílio do equipamento *GroundEye*[®], e com isso verificou-se que a variância genotípica foi superior em relação à variância ambiental em todas as variáveis analisadas, tanto de grãos quanto de frutos, indicando que os genótipos avaliados apresentam alta variabilidade genética. A maior distância genética, foi observada entre os grupos I e IV, indicando situação favorável para realização de cruzamentos entre os genótipos desses grupos. A análise de correlação fenotípica revelou correlações significativas positivas e negativas entre as variáveis. As variáveis analisadas por meio da análise digital de sementes e grãos foram eficientes em detectar a divergência genética entre os 43 clones de *C. canephora*. As variáveis área, diâmetro máximo e mínimo são as mais indicadas para realização da seleção para obtenção de genótipos de grãos maiores. E, no terceiro experimento foi feito o lançamento da Cultivar Magnus Grano características desejáveis, sobretudo peso elevado e tamanho de grãos maiores que têm valor agregado na qualidade, somados à alta produtividade para as condições do norte do Estado do Espírito Santo.

ABSTRACT

Sousa, Priscila Gonçalves Figueiredo de. D.Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. January, 2023. Genetic diversity of *Coffea canephora* clones using phenotypic and molecular approaches. Advisor: Prof. Henrique Duarte Vieira. Co-advisor: Prof. Alexandre Pio Viana. Supervisor: Prof. Fabio Luiz Partelli.

The objective of this work was to carry out the molecular characterization of *C. canephora* using microsatellite markers, quantify the genetic diversity in these clones using the Ward-MLM strategy, estimate the genetic parameters and correlations based on digital phenotyping of grains and fruits and also the launch of the Magnus Grano cultivar, which is composed of five genotypes and has high yields, the grains are larger in size and the genotypes are well adapted to growing conditions. For this, three experiments were carried out, where in the first experiment a population of 44 genotypes of *C. canephora* and 1 genotype of *C. arabica* were evaluated using microsatellite markers, and for this evaluation 21 primers were used. These primers identified 61 alleles in the population and between 2 and 5 alleles per locus. The information index indicated a high level of polymorphism of the analyzed markers. According to the observed and expected heterozygosity, the genetic diversity in the population is high. The global inbreeding coefficient of the population detected high heterozygosity and zero inbreeding within this population. Genetic diversity among accessions was also assessed using the unweighted pair group method based on arithmetic means

(UPGMA). Six groups were formed based on Mojena cut rule and three using the Bayesian approach. These results confirm the existence of genetic diversity, genetic variability and selection potential in future improvements involving the 45 studied genotypes. In the second experiment, digital phenotyping of grains and fruits of 43 genotypes of *C. canephora* was carried out with the aid of the GroundEye® equipment, and with that it was verified that the genotypic variance was superior in relation to the environmental variance in all the analyzed variables, both of grains and fruits, indicating that the evaluated genotypes present high genetic variability. The greatest genetic distance was observed between groups I and IV, indicating a favorable situation for carrying out crosses between the genotypes of these groups. Phenotypic correlation analysis revealed significant positive and negative correlations between variables. The variables analyzed through digital seed analysis were efficient in detecting the genetic divergence among the 43 clones of *C. canephora*. The variables area, maximum and minimum diameter are the most suitable for carrying out the selection to obtain genotypes with larger grains. And in the third experiment, the Cultivar Magnus Grano was released, with desirable characteristics, especially high weight and larger grain size, which have added value in terms of quality, in addition to high productivity for conditions in the north of the State of Espírito Santo.

1. INTRODUÇÃO

Coffea canephora, conhecida popularmente como Conilon ou Robusta, é a segunda espécie de café mais produzida no mundo (ICO, 2022), e o Brasil é o segundo maior produtor desta espécie, representando cerca de 20% da produção mundial (CONAB, 2022). O café Conilon ainda possui um grande espaço a ocupar, pois o mesmo pode apresentar uma bebida diferenciada, com características sensoriais próprias ao invés de atuar apenas na produção de blends (Vignoli; Bassoli; Benassi, 2011).

A produção e demanda do *C. canephora* tem aumentado significativamente nos últimos anos, pois além de sua maior participação nos blends ainda confere à bebida maior teor de sólidos solúveis, maior rendimento industrial e oferece uma bebida mais encorpada (Ivoglio et al., 2008; Lima Filho et al., 2012, 2015; Teixeira et al., 2016), essa mistura diminui os custos e pode compor até 60% dos blends, atualmente essa cultura corresponde por 1/3 do comércio global de café (ICO, 2018; Davis et al., 2019).

E, para que seja ofertado um produto com maior qualidade é necessário observar o conjunto de processos que vão desde o desenvolvimento e melhoramento das variedades, manejo, cuidados com a colheita e pós-colheita e características de grãos.

C. canephora é uma espécie que se reproduz por alogamia obrigatória devido à sua característica de autoincompatibilidade gametofítica (Moraes et al.,

2018). Portanto há alta variabilidade genética, resultando em plantas com diferentes potenciais (Ramalho et al., 2016; Bergo et al., 2020).

Em programas de melhoramento genético a presença de variabilidade genética é condição básica e necessária para se obter ganhos genéticos com seleção (Babova et al., 2016), visto que os estudos de diversidade genética podem guiar a escolha de genitores para a composição de variedades clonais (Marcolan e Espíndula., 2015).

Sendo assim, o estudo da variabilidade genética é essencial em um programa de melhoramento, já que os cruzamentos envolvendo pais geneticamente divergentes podem induzir a maiores efeitos heteróticos e maior variabilidade, permitindo a construção de populações com uma base genética mais ampla e assim proporcionando maiores ganhos (Cecon et al., 2008; Cruz et al., 2012).

Para estimar a variabilidade genética pode utilizar tanto descritores morfológicos quanto marcadores moleculares. Em relação aos descritores morfológicos associados à qualidade do café, o tamanho do grão é uma característica física de grande importância para a classificação do café durante o beneficiamento e formação de lotes homogêneos, pois no mercado de grãos, os de maiores tamanhos são associados aos cafés de melhor qualidade e maior preço. Porém, para ter acesso a informações precisas sobre o nível de DNA, são utilizados os marcadores moleculares, visto que os mesmos são de grande utilidade para o melhoramento genético (Ferrão et al., 2015), pois não são influenciados pelo ambiente e não se alteram durante o ciclo de vida do indivíduo (Collard e Mackill, 2008). Diversos estudos podem ser auxiliados por meio dos marcadores moleculares em café, como de diversidade genética, resistência a doenças, direcionamento de cruzamentos e certificação de cruzamentos de interesse para o melhoramento (Caixeta et al., 2016).

Entre as diferentes classes de marcadores moleculares, os microssatélites SSR (*Simple Sequence Repeat*), são os preferidos para aplicações e estudos genéticos no melhoramento de plantas, principalmente devido a sua natureza multialélica, herança codominante e transferibilidade entre espécies (Decroocq et al., 2003), facilidade de detecção pela PCR, abundância relativa e cobertura extensiva do genoma (Li et al., 2002).

Já para estimar a variabilidade genética utilizando os descritores morfológicos os pesquisadores começaram a usar a técnica de imagem digital para aumentar a eficiência na classificação, considerando que a técnica de imagem é a prática mais eficiente na classificação de grãos, e com os avanços da tecnologia da computação, tornou-se possível avaliar características morfológicas de sementes e grãos relacionadas a cor, textura e geometria através da fenotipagem digital para quantificar a divergência genética, pois a mesma é uma técnica rápida, confiável, não destrutiva (Santos et al., 2015; Krause et al, 2017).

Com isso, o objetivo desse trabalho foi realizar a caracterização genético-molecular com base em marcadores microssatélites, quantificar a diversidade genética a partir da fenotipagem digital de grãos de 43 genótipos de *C. canephora*, e ainda lançar a cultivar Magnus Grano que é composta por cinco genótipos de *C. canephora*, que apresentam alta produtividade, os grãos apresentam tamanhos maiores e os genótipos mostraram boa adaptação ao cultivo.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Coffea canephora*: Importância, produção e usos

O gênero *Coffea* possui mais de 124 espécies (Davis et al. 2011), mas o comércio global de café depende, principalmente, de duas espécies: Arábica (*Coffea arabica*) compreendendo 64% do café comercializado e Conilon ou robusta (*Coffea canephora*), os 37% restantes (ICO, 2022).

O Brasil é reconhecido mundialmente como o maior produtor de café, e a cafeicultura desempenha um papel crucial na geração de empregos e renda no país. Os estados de Minas Gerais, São Paulo e Espírito Santo se destacam como os maiores produtores nacionais desse grão (CONAB, 2022).

Em 2021, o Brasil manteve sua posição como maior produtor mundial de café, com um total de 47,72 milhões de sacas beneficiadas (60 kg). Essa commodity é de grande importância nas transações internacionais, e o Brasil continua liderando as exportações mundiais do grão. A região sudeste do país é responsável por mais da metade da produção nacional, com cerca de 40,52 milhões de sacas beneficiadas. No Estado do Espírito Santo, a produção em 2021 foi de 14,17 milhões de sacas beneficiadas, com uma área de cultivo de 400.442 hectares (CONAB, 2022).

O café é conhecido como uma das bebidas mais populares ao redor do mundo e além disso é uma mercadoria comercial muito importante, ficando atrás apenas do petróleo em relação ao valor e à quantidade comercializada em todo o mundo (Sunarharum et al., 2014). O cultivo do café gera cerca de 80 bilhões de

dólares por ano e envolve cerca de 125 milhões de pessoas em todo o mundo em sua cadeia de produção. Ao redor do mundo são consumidas cerca de 600 bilhões de xícaras de café anualmente, tornando-se a segunda bebida mais consumida no mundo, ficando atrás apenas da água (Bliska et al., 2007; ICO 2017).

É indiscutível a importância do café na economia mundial, pois ele é um dos produtos primários mais valiosos comercializados (Sakiyama et al., 2015). A cafeicultura é uma atividade agrícola importante na geração de empregos, distribuição de renda e exportação, sendo assim fundamental para a economia brasileira (Belan et al., 2011).

Abordar o termo cafeicultura é contextualizar seus números em nível global, os quais colocam o Brasil como protagonista principal. É falar de um produto que contribuiu para o desenvolvimento nacional desde 1727, quando as primeiras mudas de café foram plantadas no país; é também destacar que o café gera em torno de oito milhões de empregos diretos e indiretos; e que, por força desses números, o Brasil é o maior produtor, maior exportador e segundo maior consumidor mundial da bebida.

O *C. canephora* é bastante utilizado na indústria de café solúvel devido ao maior teor de sólidos solúveis, porém sofre discriminação por parte dos setores de café torrado, moído e expresso, pois no Brasil, acredita-se que o mesmo apresenta baixa qualidade inerente à espécie e difícil de ser modificada (Brige et al., 2019). Apesar disso, a constante mudança de preços na cafeicultura está fazendo com que este café seja cada vez mais utilizado pelas torrefadoras em *blends* (mistura) com o arábica (Zeferino et al., 2010). De acordo com estudos realizados por Mendes (2005), foi constatado que *blends* contendo até 50% de *C. canephora* de boa qualidade não comprometem a qualidade final desejada pelo consumidor.

Com o aumento da demanda pelo *C. canephora*, o ambiente favorável, a tecnologia aliada à grande diversidade genética e a adaptabilidade são fatores que sugerem que pode ser feita uma seleção de materiais de alta qualidade adaptados aos diferentes ambientes (Fonseca, 2006). Desse modo, devido a busca constante por qualidade, o setor cafeeiro vem se reinventando intensamente, agregando valor ao produto oferecido com base na qualidade e análise sensorial.

2.2 Origem, dispersão e botânica

O gênero *Coffea* pertence à família *Rubiaceae*, possui mais de 124 espécies, e as que se destacam são *C. arabica* e *C. canephora*, especialmente por seu uso comercial (Davis et al., 2006).

O *C. canephora* é uma espécie perene, de porte arbustivo, possui caules lenhosos, chegando a atingir 5 m de altura em locais de clima quente e úmido. Suas folhas são elípticas, lanceoladas, com bordas bem onduladas e nervuras bem salientes. As flores são brancas, em grande quantidade por inflorescência e por axila foliar. Suas inflorescências são formadas a partir das gemas seriadas localizadas de forma aleatória nas axilas das folhas de ramos laterais, que se formam na estação de crescimento do ano corrente, de forma que a floração depende estritamente dos ramos plagiotrópicos (Mota et al, 1997).

Os frutos, apresentam coloração verde quando imaturos e podem ser vermelhos ou amarelos quando amadurecidos (Belan et al., 2011). São derivados de um ovário e caracterizados como uma drupa elipsoide, carnoso, com duas lojas e duas sementes, apresentando epicarpo, que é a casca propriamente dita, mesocarpo carnoso e rico em mucilagem (pectinas e açúcares) e endocarpo (ou pergaminho) fibroso e lignificado no final de sua formação, na fase de expansão durante o crescimento do fruto (Melo, 2011).

As sementes do cafeeiro são do tipo recalcitrante, com tamanho, casca e peso inferior ao do café arábica. Possuem duas lojas no ovário, que podem ou não ser fertilizados. Se apenas um óvulo é fertilizado o mesmo ocupará todo o volume do fruto, formando as sementes classificadas como moça que apresentam formato arredondado. O endosperma da semente do café é córneo (duro), esverdeado claro, encoberto com um envoltório delicado, conhecido como película prateada (pergaminho) (Carvalho e Monaco, 1965). O embrião é pequeno, possuindo cerca de 2 mm, fica localizado na base do endosperma, sendo constituído por duas folhas cotiledonares (Carvalho e Monaco, 1965).

O *C. canephora* apresenta produção bienal, pois a emissão de inflorescências e frutificação são descritas em dois anos consecutivos, sendo que no primeiro ano ocorre a formação vegetal, seguida da indução e maturação das gemas florais e no segundo ano fenológico ocorre a florada, formação de chumbinhos e expansão dos frutos até a maturação (De Camargo, 2001).

A diversidade dessa espécie foi descrita por Berthaud em (1986), em que foi dividida em dois grupos de acordo com seus centros de diversidade. O grupo Guineano em que compreende os genótipos do oeste africano e o grupo Congolês que compreende os genótipos da região central da África. O grupo Congolês durante o processo de domesticação e melhoramento foi levado para outros locais e estruturado em cinco subgrupos denominados SG1, SG2, B, C e mais recentemente o grupo UW, composto por acessos selvagens da Uganda (Musoli et al., 2009), justificando assim a maior variabilidade genética presente nessa espécie.

O subgrupo SG1 contempla os genótipos que ocorrem do Benin ao Gabão, denominados de café Conilon, que se destacam por ser o subgrupo de melhor adaptação no Brasil e está presente nas principais variedades desenvolvidas no país. O subgrupo SG2 (oriundos da região da República Democrática do Congo), B (República Centro-Africana) e C (Camarões), compreendem os genótipos conhecidos como café robusta. Esses cafeeiros possuem plantas mais altas, vigorosas, folhas e frutos maiores, resistência à ferrugem do café e apresentam maior sensibilidade à seca (Marraccini et al. 2012).

O *C. arabica* é uma planta alotetraploide ($2n= 4x = 44$), e o *C. canephora* é uma espécie alógama, diploide com $2n= 22$ cromossomos, que compõe populações com grande variabilidade, sendo sua polinização realizada preferencialmente pelo vento e também realizada por insetos em menor intensidade, a fecundação cruzada ocorre entre indivíduos geneticamente não relacionados. A autoincompatibilidade de *C. canephora* está associada a um único *locus* identificado pela letra S do inglês “Sterility locus”, possuidor de uma série alélica composta por três genes, que interagem em um sistema gametofítico, controlando o crescimento do tubo polínico. Quando o fator S tanto do pólen quanto do estilo são iguais, não há compatibilidade, e o tubo polínico não penetra no ovário, não ocorrendo a fertilização (Conagin; Mendes, 1961; Berthaud, 1980; Lashermes et al., 1996).

Uma planta é considerada como autoincompatível, quando a mesma é fértil, porém, de alguma maneira, rejeita o próprio pólen, evitando assim consanguinidade (Asquini et al., 2011). Esta reação está relacionada com o não desenvolvimento do tubo polínico ao longo do estilete, pois este possui o mesmo alelo do pólen. Esta paralisação no crescimento é devido à ação de ribonucleases

que degradam o RNA ribossômico impedindo o crescimento do tubo polínico (Castric e Vekemans, 2004).

Diante disso, o plantio de genótipos não compatíveis pode aumentar a taxa de grãos tipo moça e diminuir a produtividade de grãos. Na cafeicultura clonal, quando há o plantio de clones não compatíveis, a produtividade e a qualidade dos grãos da lavoura podem ser comprometidas devido ao isolamento de plantas não compatíveis. Na composição de uma cultivar clonal, os clones devem ser selecionados considerando sua capacidade de polinização (Ferrão et al., 2007).

De acordo com estudos realizados por Ferrão et al. (2008), observaram em campo, de maneira prática que os clones de *C. canephora* que amadurecem nos meses de abril, maio e junho são denominados de clones de ciclo precoce, intermediário e tardio, respectivamente.

Para o seu bom desenvolvimento, a temperatura ideal está entre 22 e 26°C (Damatta e Ramalho, 2006), podendo ainda tolerar temperaturas entre 37°C durante o dia e 30°C à noite, sendo que temperaturas superiores a 42°C de dia e 34°C à noite causam efeitos deletérios irreversíveis na fotossíntese dessas plantas (Martins et al., 2016; Rodrigues et al., 2016).

Na região de origem ou de alta diversidade genética das espécies de café a precipitação é superior a 2.000 mm e bem distribuída, com uma estação seca de dois a três meses, alta umidade relativa, temperaturas médias anuais em torno de 26°C, com temperatura máxima e mínima variando entre 30°C e 21°C (Coste, 1992).

2.3 Melhoramento genético do *Coffea canephora*

Os programas de melhoramento de plantas buscam a seleção de indivíduos promissores, de forma sustentável e ecologicamente equilibrada. Porém, para alcançar o sucesso, é necessário possuir informações básicas a respeito da espécie de interesse (biologia floral, forma de reprodução e propagação, número de cromossomos, entre outros), além disso é necessário um planejamento para a execução da pesquisa (estrutura física, recursos financeiros e humanos). Os programas de melhoramento buscam na maioria das vezes resultados rápidos e satisfatórios.

O *C. canephora* é uma planta tipicamente alógama, que apresenta autoincompatibilidade gametofítica e florescimento sincronizado, que são mecanismos que favorecem a polinização cruzada (Berthaud, 1980).

Essa espécie apresenta uma alta variabilidade genética natural e polinização cruzada entre gerações devido à alta diversidade entre plantas de uma mesma lavoura que é uma característica marcante dessa espécie (Ferrão et al., 2008).

Em programas de melhoramento genético a presença de variabilidade genética é condição básica e necessária para se obter ganhos genéticos com seleção (Babova et al., 2016).

Nos programas de melhoramento, os indivíduos eram selecionados por meio de marcadores morfológicos, porém os mesmos são influenciados pelo ambiente, e para as diversas características analisadas, apresentam baixo ganho com seleção (Toppa e Jadoski, 2013). Com o aperfeiçoamento das técnicas de biologia molecular, o uso de marcadores moleculares possibilitou significativos avanços na seleção de indivíduos superiores por permitir a detecção de polimorfismo ao nível do DNA (Sousa et al., 2017; Alkimim et al., 2017).

Os programas de melhoramento genético estão sempre em busca de novos métodos e novas estratégias que permitam avaliar em menos tempo um maior número de materiais, auxiliando assim no aumento da capacidade de manipulação da variabilidade genética (Rocha et al., 2015). Os ensaios de competição clonal, têm sido uma das estratégias adotadas e objetivam a identificação de genótipos de maior produtividade de grãos que possam reunir características favoráveis, como menor bienalidade, maturação uniforme, grãos maiores, tolerância a estresses bióticos (ferrugem, nematoides, broca do café) e abióticos (baixa altitude, temperaturas elevadas com déficit hídrico anual acima de 150 a 200 mm) (Ramalho et al., 2016).

Em um programa de melhoramento, é fundamental o conhecimento sobre a diversidade genética entre populações das espécies visando auxiliar na conservação e nas estratégias de usos dos recursos genéticos. A diversidade genética entre um grupo de progenitores tem por objetivo identificar as combinações híbridas de maior efeito heterótico e maior heterozigose (Cruz et al., 2014). Os autores Borém e Miranda (2009) definem a heterose ou vigor híbrido, como o aumento do vigor decorrente do cruzamento entre genótipos

contrastantes, com a possibilidade de reunir na mesma planta as melhores características de cada um dos genitores.

Nos programas de melhoramento de *C. canephora*, os estudos de diversidade genética podem guiar a escolha de genitores para a composição de variedades clonais (Marcolan e Espíndula, 2015).

Um dos objetivos dos programas do melhoramento do cafeeiro é introgridir os genes de resistência junto com outras características de interesse agrônomo como alta produtividade, vigor, uniformidade de maturação, resistência a outras doenças e pragas e também a qualidade do grão e da bebida. A transferência de alelos de resistência para o cafeeiro pode ser facilitada pelo uso de marcadores moleculares que estão localizados próximos aos genes de resistência. O mapeamento genético consiste em uma das estratégias mais eficazes para a realização de estudos avançados de genética, permitindo o entendimento da herança, a identificação e o isolamento de genes ou locus de interesse (Yuan et al., 2015).

Especificamente, para *C. canephora*, os programas de melhoramento têm buscado melhorar diversas características agrônomicas, como produtividade, estabilidade das culturas, resistência aos principais problemas fitossanitários, qualidade da bebida e tolerância à seca (Ferrão et al., 2004; Carvalho; 2008), e além disso têm sido realizados diversos estudos sobre a diversidade genética dessa cultura baseado em características morfoagronômicas e anatômicas foliares, marcadores moleculares, características estomáticas e peso e volume de frutos maduros (Silva et al, 2023; Sousa et al, 2022; Dubberstein et al, 2021; Partelli et al. 2021).

2.4 Diversidade genética de *Coffea canephora*

A espécie *C. canephora* possui floração gregária, muito comum em espécies autoincompatíveis, essa floração acontece em sincronia nos indivíduos de determinada região. No café a florada ocorre geralmente 6 a 10 dias após as chuvas (pelo menos 10 mm de água) ou do retorno da irrigação após um período de estiagem (Ferrão et al., 2007).

A heterogeneidade genética e fenotípica das plantas de *C. canephora* é de grande valor para os programas de melhoramento genético, visto que serve como fonte de genes que podem ser utilizados para criar novos clones. Porém, para os

cafeicultores, essa heterogeneidade fenotípica da lavoura é totalmente indesejada, pois os tratos culturais tornam-se difíceis de ser executados devido às variações entre vigor, porte, arquitetura, maturação, diferença de produtividade entre as plantas. Essas características geralmente são encontradas em cafezais obtidos a partir de sementes (Ivoglio, 2007).

Visando amenizar essa diferença fenotípica entre as plantas de uma lavoura gerada a partir de sementes e sua desuniformidade é comum a formação de lavouras com variedades clonais propagadas por estacas a partir de clones “elites” (Melo, 2011). É importante lembrar que no caso do *C. canephora* essas lavouras devem ser compostas por várias cultivares compatíveis geneticamente para a lavoura produzir.

A utilização de cultivares clonais e a necessidade do plantio de diferentes cultivares geneticamente compatíveis reforçam a necessidade dos estudos genéticos em *C. canephora* (Aleckevetch et al., 2013).

Para isso são feitos estudos utilizando os marcadores moleculares. O uso dos mesmos para detectar polimorfismo ao nível de DNA é um dos desenvolvimentos mais significativos nas técnicas de biologia molecular. Os marcadores moleculares são mais vantajosos que os fenotípicos, pois apresentam maior ganho nas características de interesse e também por não apresentarem influência do meio ambiente, e o fato de poder ser feito em qualquer estágio de desenvolvimento da planta (Gartner et al., 2013).

O estudo da variabilidade genética é essencial em um programa de melhoramento, já que os cruzamentos envolvendo pais geneticamente divergentes podem induzir a maiores efeitos heteróticos e maior variabilidade, permitindo a construção de populações com uma base genética mais ampla e assim proporcionando maiores ganhos (Cecon et al., 2008; Cruz et al., 2012).

2.5 Marcadores moleculares microssatélites

Os marcadores moleculares são de grande utilidade para o melhoramento genético, pois permitem o acesso a informações precisas ao nível de DNA (Ferrão et al., 2015), não são influenciados pelo ambiente e não se alteram durante o ciclo de vida do indivíduo (Collard e Mackill, 2008). Diversos estudos podem ser auxiliados por meio dos marcadores moleculares em café, como o de diversidade

genética, resistência a doenças, direcionamento de cruzamentos e certificação de cruzamentos de interesse para o melhoramento (Caixeta et al., 2016).

Os marcadores moleculares são uma ferramenta rápida e eficaz para estudos genômicos, pois detectam o polimorfismo diretamente ao nível do DNA sem influência ambiental (Souza, 2001). Com base nesse polimorfismo, é possível fazer inferências sobre as relações entre o genótipo e o fenótipo dos indivíduos, o que em última análise permite aumentar a eficiência dos programas de melhoramento.

O uso de marcadores moleculares no estudo da biotecnologia e do DNA recombinante propiciou um avanço muito significativo para a agricultura. A partir do momento que se pode estudar e melhorar as cultivares não só no aspecto fenotípico, mas também no seu genótipo, o conhecimento da estrutura genotípica possibilitou estudos mais acurados junto com o melhoramento de espécies tradicionais, permitindo desenvolver plantas cada vez mais adaptadas às diferentes regiões (Ramalho e Furtini, 2009).

Os tipos de marcadores moleculares disponíveis diferenciam-se pela metodologia empregada na análise. Atualmente os marcadores moleculares mais expressivos são classificados em dois grupos de acordo com a metodologia seguida para identificá-los. Portanto, existem os marcadores baseados em hibridização e baseados na amplificação por PCR (Polymerase Chain Reaction) de DNA (Martins et. al., 2003; Milach, 1998b).

Os marcadores identificados por hibridização são os marcadores RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorfism*). Já aqueles marcadores baseados em amplificação por PCR são os do tipo RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), AFLP (*Amplified Fragment Length 10 Polymorfism*), Microssatélites ou SSR (*Simple Sequence Repeats*) e ISSR (*Inter Simple Sequence Repeteas*) (Martins et. al., 2003; Milach, 1998).

Deve-se ressaltar que cada marcador tem suas características peculiares que devem ser levadas em consideração na escolha do qual utilizar em uma análise. Os Marcadores RAPD são os mais simples e baratos para serem utilizados, no entanto apresentam problemas sérios de repetibilidade. Os Marcadores AFLP são extremamente robustos revelando grande quantidade de *locus* e com alta repetibilidade, no entanto são extremamente elaborados e com custo elevado. Os marcadores microssatélites, uma vez que existam primers

disponíveis, são de alta repetibilidade, no entanto o processo para obtenção dos primers é laborioso e caro (Milach, 1998a). Os marcadores ISSR combinam a facilidade do RAPD com a robustez dos marcadores AFLP e SSR, sendo assim recomendado para trabalhos que requerem confiabilidade sem alto custo para as análises.

Marcadores moleculares de DNA têm sido utilizados para marcação de genes de resistência a doenças, insetos e pragas, avaliação e caracterização de germoplasma, melhoramento de genitores, introgressão gênica e seleção assistida por marcadores. Apresentam-se como ferramentas muito úteis em testes de pureza genética, seleção de resistência a patógenos exóticos ainda inexistentes em determinada região, associação com caracteres quantitativos, estudos de interação genótipo-ambiente, processos legais, entre outros (Milach, 1998b).

Entre as diferentes classes de marcadores moleculares, os microsatélites, também denominadas SSR (*Simple Sequence Repeat*), são os preferidos para aplicações e estudos genéticos no melhoramento de plantas, principalmente devido a sua natureza multialélica, herança codominante e transferibilidade entre espécies (Decroocq et al., 2003), facilidade de detecção pela PCR, abundância relativa e cobertura extensiva do genoma (Li et al., 2002) e necessidade de quantidades pequenas de DNA para dar início às reações (Powell et al., 1996). Além disso, também exibem altas taxas de mutação (Vigoroux et al., 2002) e associação preferencial com regiões não repetitivas do genoma (Morgante et al., 2002).

2.6 Fenotipagem digital

A fenotipagem digital de sementes e grãos pode ser empregada para quantificar a diversidade genética entre os genótipos de uma mesma espécie, e essa quantificação acontece por meio de captura e análise de imagens que proporcionam a elaboração de gráficos e planilhas sobre o material estudado Torres (2018).

Ter informações sobre divergências genéticas de uma população é primordial para qualquer programa de melhoramento, pois as mesmas facilitam na diferenciação de acessos, identificação de genótipos contrastantes e realização

de futuros cruzamentos e servem de banco de dados para identificação de possíveis grupos com maior grau de heterose (Silva et al, 2014).

A análise digital é considerada um método viável além de conseguir resultados rápidos, é um método com baixo custo, podendo ser utilizado em diversas áreas, como as indústrias de alimentos e na agricultura (Andrade et al., 2016).

De acordo com Patel et al. (2012), os sistemas de visão computacional são tecnologias de engenharia que combinam mecânica, instrumentação óptica, câmera digital e tecnologia de processamento de imagem. Esses sistemas empregam métodos que permitem ao computador extrair conteúdos relevantes a partir de imagens e interpretar suas características mais significativas para alcançar os objetivos de classificação, avaliação e detecção de defeitos (Gomes; Leta, 2012).

A visão computacional é uma técnica que utiliza um sistema composto por iluminante, câmera digital e software de processamento de imagem para extrair e analisar informações úteis de uma imagem, conjunto de imagens ou sequência de imagens. O sistema computacional avalia as imagens baseado nos pixels, fornecendo uma análise mais especializada e detalhada (Yam; Papadakis, 2004).

A fenotipagem de sementes via análise visual é um processo trabalhoso que produz resultados subjetivos, dificultando ainda mais a análise de sementes para fins comerciais e tecnológicos. No entanto, hoje novas tecnologias para ambientes controlados como espectroscopia, termografia, tomografia, fluorescência, discriminação isotópica e imagem digital técnicas estão sendo empregadas para aumentar a precisão e reduzir o tempo necessário para medidas fenotípicas para melhor caracterização (Santos e Yassitepe, 2014).

A análise e o processamento de imagens digitais viabilizam a precisão e rapidez das mensurações fenotípicas, além de proporcionar maior confiabilidade dos resultados obtidos pelos melhoristas (Cortes et al., 2017; Maciel et al., 2019; Clemente et al., 2021). Como a classificação de grãos é imprecisa e trabalhosa, os pesquisadores têm utilizado a técnica de imagem para aumentar a eficiência na classificação, levando assim à consideração de que a técnica de imagem é a prática mais eficiente na classificação de grãos de café.

No Brasil, com o intuito de realizar capturas de imagens, histogramas e gráficos que facilitem a análise de sementes e plântulas, a empresa Tbit

desenvolveu o equipamento Groundeye® System Mini em 2011 (Andrade et al., 2016; Ferreira et al., 2018).

Com a utilização do sistema GroundEye® foi possível processar informações contidas nas sementes, o que seria difícil a olho nu, pois existe a interferência da subjetividade do pesquisador. As informações extraídas nas avaliações são de alta precisão, segurança e confiabilidade, e como estão armazenadas em bancos de dados podem ser facilmente acessadas. (Melo 2022).

Em diversas espécies o uso da fenotipagem por imagem tem sido utilizada auxiliando na seleção de plantas (Souza et al., 2015; Maciel et al., 2019; Clemente et al., 2021).

Existem várias pesquisas que aplicaram o uso do processamento de imagens, e uma delas é a pesquisa utilizada por Abreu et al. (2016), em que fizeram análise computadorizada para avaliar a qualidade fisiológica de sementes de café submetidas à secagem e concluíram que a utilização de imagem através da análise do programa SAS é uma alternativa viável e promissora para avaliar a viabilidade e vigor de sementes e mudas de café.

Como um resultado, traços que nunca foram medidos antes ou que só foram medidos em situações começam a ser mensurados com mais frequência (Fiorani e Schurr, 2013) e com maior facilidade, por exemplo, características relacionadas ao tamanho, cor, forma e textura da semente.

Venora et al. (2007) também relataram que a análise de imagens é um método rápido que requer menos de um minuto para digitalização e medição. É também uma técnica muito facilmente reproduzível, além de ser confiável e não destrutiva.

E, de acordo com Armstrong e Saxena (2014), a aplicação do processamento de imagens na agricultura deve ser utilizada, pois demonstra eficiência e precisão em práticas como classificação e inspeção, diminuindo a incerteza dos dados.

2.7 Tamanho de grãos

Diariamente, milhares de pessoas espalhadas pelo mundo inteiro consomem café, e essa bebida carrega consigo diferentes nuances e características, e devido a isso o mercado está sempre à procura de novas

maneiras de ofertá-lo, seja ele por blends, cafés expressos ou gourmets, sendo que ele pode ser ofertado na forma moída ou em grãos.

O café Conilon é a principal fonte de renda para milhões de pequenos agricultores em todo o mundo, e o preço que os agricultores podem obter pelo café é fortemente influenciado por características dos grãos, principalmente em relação ao tamanho e à ausência de defeitos.

Para estabelecer um preço justo, o café é geralmente classificado usando três métodos: i) tipo e defeitos, ii) tamanho do grão (peneira) e iii) qualidade da bebida (Brighenti e Cirillo, 2018). É importante que os cafeicultores compreendam os fatores que afetam as características do grão de café, pois isso determina o preço pelo qual eles podem vender sua produção.

Diversas estratégias têm sido implementadas com a finalidade de incentivar o consumo de café entre diferentes camadas sociais, para Spers et al (2004), o incentivo na melhoria da qualidade do produto tem colaborado para novas formas de consumo. Segundo Lucia et al (2007), tem-se verificado a importância de se observar em quais critérios o consumidor se fundamentava para escolher, comprar e consumir determinado produto. Dentre esses fatores, o tamanho do grão está diretamente ligado à qualidade física do grão buscada pelos consumidores que têm preferência por comprar o grão e moer ao invés de comprar o café moído.

E, para que seja ofertado um produto com maior qualidade é necessário observar o conjunto de processos que vão desde o desenvolvimento e melhoramento das variedades, manejo e os cuidados com a colheita e pós-colheita. E, um dos critérios usados para classificar um café verde como especial é a análise de acordo com a uniformidade do grão, que é feita através da utilização de diferentes peneiras, cor, forma e tipos de grãos (Drumond Neto, 2017). Além da classificação de acordo com a bebida, o mercado de cafés especiais seleciona o café Conilon por peneiras, e apenas os grãos separados por peneira 14 acima são comercializados com valor de café especial (Pereira et al., 2016).

A classificação por peneiras atende principalmente a demanda do mercado de exportação que busca um produto mais uniforme e além disso, essa classificação por peneiras é um processo importante para garantir a qualidade do café, e um dos principais motivos para essa separação é a diferença na

uniformidade no momento da torração do café, pois os grãos menores tendem a torrar em tempos diferentes dos grãos maiores (Oliveira; Oliveira; Freitas, 2019), e com isso a separação por peneiras melhora a execução da torra, melhorando em contrapartida a qualidade do café (Baggenstoss et al., 2008; Pereira et al., 2016). E, de acordo com Sturm (2012), a classificação por peneiras proporciona homogeneidade da amostra, o que vai impactar diretamente no processo de torrefação, pois o fato de se ter tamanhos diferentes de grãos durante a torra, pode acarretar uma torração rápida e desuniforme, onde grãos mais arredondados (mocas) absorvem o calor de forma mais acelerada que os grãos chatos, culminando na formação de sabores e aromas desagradáveis para a bebida do café (Matiello et al., 2002).

A oferta do café em grãos é a forma mais original do café, ou seja, os grãos só passaram pelo processo de torrefação até chegar ao consumidor. Como o café é um produto muito sensível ao oxigênio, o mesmo oxida muito rápido, principalmente quando já está moído, e por isso, quando ele está na forma de grãos ele preserva o sabor e aroma original, além de ter uma vida útil maior em relação ao café já moído.

Assim, trabalhos sobre diferentes genótipos, realizados por meio de ensaios de competição no campo, somados a diversas análises da planta e análises laboratoriais de grãos e que possibilitem a obtenção de cultivares que apresentem grãos maiores para oferecer um produto final de maior qualidade são de fundamental importância para dar continuidade ao trabalho que já vem sendo desenvolvido de forma prática por cafeicultores.

3. ARTIGOS

3.1 *Coffea canephora*: CRUZAMENTOS HETERÓTICOS INDICADOS POR ABORDAGEM MOLECULAR ¹

RESUMO

O gênero *Coffea* compreende mais de 100 espécies, das quais as de maior importância comercial são *Coffea arabica* e *Coffea canephora*. Esta última é uma planta autoincompatível com alta variabilidade genética natural. A detecção de polimorfismo ao nível do DNA por marcadores moleculares permitiu avanços significativos na seleção de plantas superiores. O objetivo deste estudo foi a caracterização molecular de *C. canephora* por meio de marcadores microssatélites. Para tanto, uma população de quarenta e quatro genótipos de *C. canephora* e um genótipo de *C. arabica*, foi avaliada com 21 primers. Esses primers identificaram 61 alelos na população e entre 2 e 5 alelos por loco. O

¹Este capítulo foi publicado por: Sousa, P.; Vieira, H.; Santos, E.; Viana, A.; Boeachat, M.; Partelli, F. (2022). *Coffea canephora*: Heterotic Crosses Indicated by Molecular Approach. *Plants*, 11, 3023. <https://doi.org/10.3390/plants11223023>.

índice de informação indicou um alto nível de polimorfismo dos marcadores analisados. De acordo com a heterozigosidade observada e esperada, a diversidade genética na população é alta. O coeficiente de endogamia global da população detectou alta heterozigosidade e zero endogamia dentro desta população. A diversidade genética entre os acessos também foi avaliada pelo método de grupos de pares não ponderados baseado em médias aritméticas (UPGMA). Seis grupos foram formados com base na regra de corte de Mojena e três usando a abordagem bayesiana. Esses resultados confirmam a existência de diversidade genética, variabilidade genética e potencial de seleção em futuros melhoramentos envolvendo os 45 genótipos estudados.

Palavras-chave: marcadores de DNA, café, marcadores SSR.

Coffea canephora: HETEROTIC CROSSES INDICATED BY MOLECULAR
APPROACH

ABSTRACT

The genus *Coffea* comprises more than 100 species, of which the most commercially important are *Coffea arabica* and *Coffea canephora*. The latter is a self-incompatible plant with high natural genetic variability. The detection of polymorphism at the DNA level by molecular markers allowed significant progress with the selection of superior plants. The objective of this study was the molecular characterization of *C. canephora* using microsatellite markers. To this end, a population of forty-four *C. canephora* genotypes and one *C. arabica* genotype, was evaluated with 21 primers. These primers identified 61 alleles in the population and between 2 and 5 alleles per locus. The information index indicated a high level of polymorphism of the analyzed markers. According

to the observed and expected heterozygosity, the genetic diversity in the population is high. The overall inbreeding coefficient of the population detected high heterozygosity and zero inbreeding within this population. Genetic diversity among the accessions was also evaluated by the unweighted pair-group method based on arithmetic averages (UPGMA). Six groups were formed based on Mojena's cutting rule and three using the Bayesian approach. These results confirmed the existence of genetic diversity, genetic variability and a potential for selection in future breeding efforts involving the 45 genotypes studied.

Keywords: DNA markers; coffee; SSR markers.

INTRODUCTION

Of the more than 100 species of the genus *Coffea*, *C. arabica* L. and *C. canephora* Pierre ex A. Froehner account for approximately 99% of the global coffee bean production. Brazil is the world's largest producer and second largest consumer of coffee. The production and demand of *C. canephora* has increased significantly due to its use in blends with *C. arabica*, to produce espresso and soluble coffee, owing to the high soluble solids content, high industrial yield and contribution to a full-bodied coffee [1].

In view of the gametophytic self-incompatibility, *C. canephora* is an allogamous species [2] with high natural genetic variability, cross-pollination and high genotypic diversity among plants in the same plantation [3,4]. In breeding programs, the availability of genetic variability is a basic prerequisite to ensure genetic gains with selection, and genetic diversity studies can serve as guidelines for the choice of parents in the development of clonal varieties [5].

In breeding programs in the past, plants were selected based on morphological markers, which are modified by environmental influence [6]. With the enhancement of molecular biology techniques, the selection of superior

plants was significantly advanced by the use of molecular markers, for allowing the detection of polymorphism at the DNA level [7,8]. Molecular markers are more advantageous than phenotypic markers because they are free from environmental influence and also because they can be used at any stage of plant development [9].

These markers are already applied in studies on *C. canephora* breeding in the context of targeted high-throughput genotyping [10], genetic diversity characterization and species reclassification [11] or to evaluate the genetic diversity [12], population structure and genetic relationships [13].

Clonal cultivars of *C. canephora* must consist of a combination of genetically divergent genotypes to improve pollination efficiency and ensure successful crop production. In this sense, genetic diversity is essential to maintain productivity, quality and also raise the capacity of response to biotic and abiotic stresses [14]. Thus, the genetic characterization of *C. canephora* clones is fundamental in the planning of recombination strategies between genotypes and the composition of new cultivars, and SSR markers are an effective technique for these purposes. We raised the hypothesis that molecular markers such as SSR are able to detect differences at the DNA level allowing the distinction of genotypes without environmental influence.

Thus, the objectives of this research consisted of: (i) estimation of the genetic distance between plants or clones; (ii) genetic characterization, to measure and structure the genetic variability between genotypes; and (iii) identification of divergent plants for use as parents in coffee breeding programs.

RESULTS AND DISCUSSION

Diversity Parameters via SSR

For this study, a total of 48 primers between SSR and EST were tested to identify the most divergent plants within this *C. canephora* population and thus analyze the molecular genetic diversity.

In the analysis of genetic diversity of the study population, 21 of the 48 tested primers produced amplified DNA fragments, which were selected for being polymorphic.

In evaluation studies by Baltazar et al. [12], on the genetic diversity of *C. arabica* accessions from several areas of the Philippines conserved in an *ex situ* collection, 19 SSR markers were used, 15 of which were polymorphic. The markers used in this study were also highly polymorphic, i.e., they can be used to detect differences between genotypes based on their genetic relationships.

The 21 primers detected 61 alleles in the population and 2 to 5 alleles per locus. Five alleles were detected at SSR-463 and SSR-1005, indicating greater diversity of these than of the other loci. Averaged across the entire data set, the study population had 2.9 alleles (Table 1). This low number of alleles may be associated with the clonal propagation of the population as well as the small population size.

However, the estimated allele frequency is strongly influenced by the number of plants in the population and tends to increase with increasing sample size. The reason is that in large samples, the chance of detecting rare, i.e., low-frequency alleles in the population is greater [15,16].

In studies by Kiwuka et al. [17], on the susceptibility to climate, reproductive potential and conservation of genetic diversity in native and cultivated *C. canephora* in Uganda, a mean of 4.7 alleles per locus in native populations was found. In comparison, a greater number of alleles was detected in the collections of cultivated genotypes. The relatively low allelic diversity found in the native population may be due to restricted gene flow between the closest populations, isolation by fragmentation, genetic drift, anthropogenic disturbance in those forests or mortality due to extreme stress conditions. These results were expected, since different populations and germplasm collections were analyzed in the above studies, while in this study only one clonal *C. canephora* population was evaluated, which explains the low number of alleles it contains.

Table 1. Genetic parameters for the 20 SSR markers and 1 EST marker of the 44 analyzed genotypes. NA: number of alleles; I: information index; He: expected heterozygosity; Ho: observed heterozygosity; and F: fixation index

Locus	NA	I	Ho	He	F
CaEST-010	2	0.413	0.289	0.247	-0.169
SSR-08 ¹	3	0.987	0.5	0.588	0.15
SSR-30 ³	4	0.45	0.211	0.196	-0.076
SSR-34 ³	2	0.474	0.273	0.298	0.083
SSR-35 ³	2	0.65	0.024	0.457	0.947
SSR-37 ³	3	0.625	0.394	0.363	-0.085
SSR-43 ³	2	0.625	0.636	0.434	-0.467
SSR-46 ³	5	0.882	0.512	0.487	-0.05
SSR-48 ²	4	0.869	0.571	0.477	-0.198
SSR-49 ³	3	0.516	0.2	0.284	0.296
SSR-55 ²	3	0.184	0.075	0.073	-0.03
SSR-59 ³	2	0.264	0.148	0.137	-0.08
SSR-70 ⁴	2	0.528	0.395	0.344	-0.148
SSR-71 ⁴	2	0.253	0.14	0.13	-0.075
SSR-74 ⁴	3	1.003	1	0.609	-0.643
SSR-84 ⁵	4	1.038	0.432	0.553	0.219
SSR-87 ⁵	3	0.482	0.25	0.257	0.029
SSR-100 ⁵	5	0.462	0.093	0.195	0.522
SSR-106 ¹	2	0.611	0.6	0.42	-0.429
SSR-114 ⁶	3	0.333	0.178	0.164	-0.086
SSR-119 ³	2	0.619	0.619	0.427	-0.448
Mean	2.904	0.584	0.359	0.34	-0.035

In a study of digital DNA screening of microsatellite markers in *Coffea* sp germplasm, conserved in Costa Rica, Sánchez et al. [18], found a mean of 4 alleles in Arabica coffee and 3.5 alleles in non-Arabica coffee (*C. canephora*, *C. excelsa* and *C. liberica*). These authors also evaluated 46 Arabica and 3 non-Arabica coffee genotypes and concluded that the mean number of alleles was influenced by the number of samples, their genetic base, number of microsatellites used and polymorphism level. This result is similar to ours, as the low allele frequency found in this study may be due to the low number of genotypes in the studied population.

In an analysis of the population structure and genetic relationships between 33 *C. arabica* genotypes and three diploid *Coffea* species (*C. canephora*, *C. eugenioides* and *C. racemosa*) from Brazil and Ethiopia, using 30 SSR markers, Da Silva et al. [13], identified a total of 206 alleles (mean of 6.9), i.e., high allele richness. Although in this study the number of alleles analyzed was lower, these are still a potential source of new alleles to be exploited in coffee breeding programs.

For the 21 microsatellite loci analyzed in this study, the information index (I) of 12 loci (57%) exceeded 0.5. The highest value was 1.038 for locus SSR-845, the lowest 0.184 for locus SSR-552 and the mean across all loci was 0.58 (Table 1).

Studies by Botstein et al. [19], proposed that a locus can be classified as highly informative when the information index exceeds 0.5, moderately informative when between 0.5 and 0.25 and uninformative if lower than 0.25. According to this classification, the above mean value indicates a high level of polymorphism for the analyzed SSR-EST markers.

The genetic diversity of Arabica coffee in the Philippines was analyzed using SSR markers by Baltazar et al. [12], with a view to applications in breeding and selection, to guarantee the genetic stability of the coffee varieties. These authors found information indices between 0.140 and 0.609 and mentioned that most of the markers were moderate to highly informative, indicating their effectiveness in measuring the genetic diversity of the collection. Similarly, in this study, more than 50% of the loci were considered highly informative, which allowed an evaluation of the polymorphism at each locus of the study population with the forty-four genotypes of *C. canephora* and one *C. arabica* genotype. The

index can be affected by the number of alleles and allele frequency at the locus.

The observed heterozygosity (H_o) ranged from 0.093 at locus SSR-1005 to 1 at locus SSR-744 (mean of 0.359). The observed heterozygosity is a measure of the frequency of heterozygotes in a studied sample and indicates the existence of genetic variation in the population, since each heterozygote has different alleles for a given gene, and the frequency of heterozygotes tends to be higher with higher genetic diversity.

According to Hardy–Weinberg expectations, the expected heterozygosity (H_e) ranged from 0.073 at SSR-552 to 0.588 at locus SSR-081 (mean of 0.34).

The observed heterozygosity was higher than expected at 17 loci (80%). When the H_o is greater than expected, this may suggest an excess of heterozygotes in the population in relation to the Hardy–Weinberg equilibrium model, De Moura et al. [20]. In the case of excess heterozygotes, there is no inbreeding, and the genetic diversity of the population is high, as the genotypes were previously selected in breeding programs.

In a study on the genetic structure and diversity of *C. canephora* in Upper Guinea, Labouisse et al. [21], found greater diversity in the Congolese than the Guinean group, with higher H_e and H_o values. They reported a mean H_e of 0.67 and mean H_o of 0.51 for the Congolese but a mean H_e of 0.48 and mean H_o of 0.34 for the Guinean group. The higher the number of alleles in a population, the greater the probability of it being heterozygous. The number of alleles found in this study, although rather low, may still contribute to the maintenance of the high diversity found in this population.

Antioxidant activity and stable free radicals in Robusta green coffee genotypes were analyzed by [22] and the authors stated that the natural reproduction of Robusta species generates highly heterozygous plants and populations with high genetic variability. Consequently, the characterization and exploitation of the genetic variability of this species might identify valuable genetic resources, for production systems or for breeding programs.

Analyzing the values of the fixation index (F) or inbreeding coefficient of the study population, the highest F values (0.947 and 0.522) were found at loci SSR-353 and SSR-1005. However, most values were lower and negative at 14 loci (66%) and the overall population mean was 0.035 (Table 1).

The fixation index is one of the most important parameters in population

genetics, as it measures the balance between homozygotes and heterozygotes in populations, which can vary from -1 to +1. Values close to zero indicate random mating, negative values indicate excess heterozygosity and zero inbreeding for that locus in the study population, while high positive values indicate high inbreeding [23], causing the frequency of homozygotes to be higher than expected under H.W. equilibrium.

According to our results, the fixation index at one locus was very close to 1 (0.947). This may be related to the absence of alleles at that locus, caused by failure in the amplification of alleles, the occurrence of null alleles, or may also indicate the presence of inbreeding. According to Cruz et al. [24], the main effect of inbreeding is a decline in population heterozygosity. Another factor that may have raised the fixation index is the lower number of alleles at this locus, as according to Morgante et al. [25], the loci with the lowest number of alleles are probably located in genome regions where the transcription rate is lower than in the other regions.

Also, with regard to the fixation index, most values found were lower and negative, indicating heterozygosity excess at these loci. The general population mean was 0.035, i.e., zero inbreeding for this population. Another factor is that at the loci with negative values, heterozygosity was also greater than expected, which indicates that the alleles at these loci were not being fixed by inbreeding.

These data showed high rates of cross-pollination in the species under study as well as wide genetic diversity among the analyzed clones. Due to being a self-incompatible species, *C. canephora* receives pollen from several other coffee plants in its surroundings, maintaining the high heterozygosity and zero inbreeding, thus minimizing the risks of genetic drift and allele loss in the population. This result is extremely interesting from the point of view of productivity, showing that the establishment of homogeneous progenies for productivity and quality-related traits may be expected. Concomitantly, diversity is expected among the progenies, so that the best can be selected and cloned to ensure productivity and quality of the final product.

Relative Kinship and Estimates of Genetic Dissimilarity in C. canephora

Obvious kinship (K) was not detected in most individuals in this population (Figure 1). An approximate 76% of the pair-wise kinship estimates were between

0 and 0.09. About 23% between 0.1 and 0.3 and less than 1.5% of the pair-wise kinship estimates were from around 0.4 to 0.5 representing some familial relationships (Figure 1).

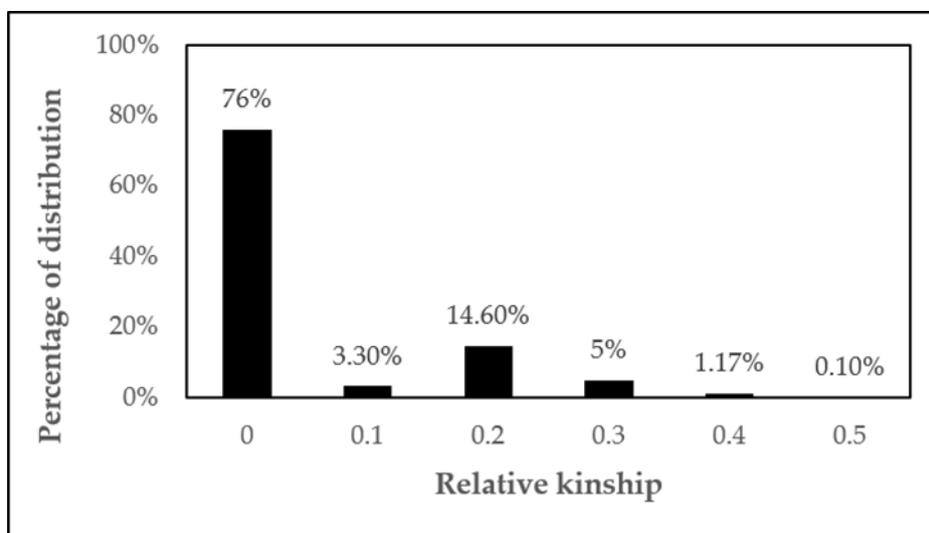


Figure 1. The distributions of pair-wise kinship coefficients for 45 genotypes of *C. canephora*.

The genetic diversity among the accessions was evaluated using the average group linkage method (UPGMA), with the stopping rule of [26], resulting in six groups.

In genetic diversity studies with microsatellite markers, the most commonly used clustering method is UPGMA, which maximizes the cophenetic correlation coefficient and improves data reliability.

In this analysis, the cophenetic correlation index was 0.83, indicating a strong correlation between the dissimilarity matrix and the cophenetic distance matrix computed from the dendrogram. The cophenetic correlation estimate varies from 0 to 1; the higher this coefficient, the greater the representativeness of the dendrogram in relation to the genetic distance matrix. The diversity was confirmed by the formation of groups containing similar genotypes in the cluster analysis using the hierarchical UPGMA method (Figure 2).

Group I contained the largest number of plants, with 16 (35.55%). Group II contained 13 plants (28.88%), group III, 8 (17.77%), group IV, 6 (13.33%) and groups V and VI, 1 plant each (2.22% each). This amount of genotypes in the same group indicates that these plants share the highest number of alleles for

the evaluated loci.

The seed-derived genotype and *C. arabica* genotype formed the fifth and sixth groups, respectively, with such high variability that they did not fit into any of the other groups. Groups with only one genotype were the most divergent in relation to the other groups. It is worth mentioning that both were used as a type of control. Genotype *C. arabica* was included in this study as control, and it was expected to have divergent genetic characteristics isolated from the *C. canephora* genotypes. Moreover, the fact that *C. arabica* formed an isolated group can confirm the effectiveness of the SSR–EST primers that are also used to distinguish different species of the genus *Coffea*.

The detection of divergent genotypes in genetically distinct heterotic groups of *C. canephora* populations is essential for the development of new cultivars of this crop. By selecting the most dissimilar genotypes for future crosses in breeding programs, the problems of genetic self-incompatibility in the species can be avoided.

The most genetically dissimilar genotypes, 122 and Arabica (0.71), had 13 alleles in common, at 16 of the 21 analyzed loci, although in this study Arabica was not used in crosses, but as a control.

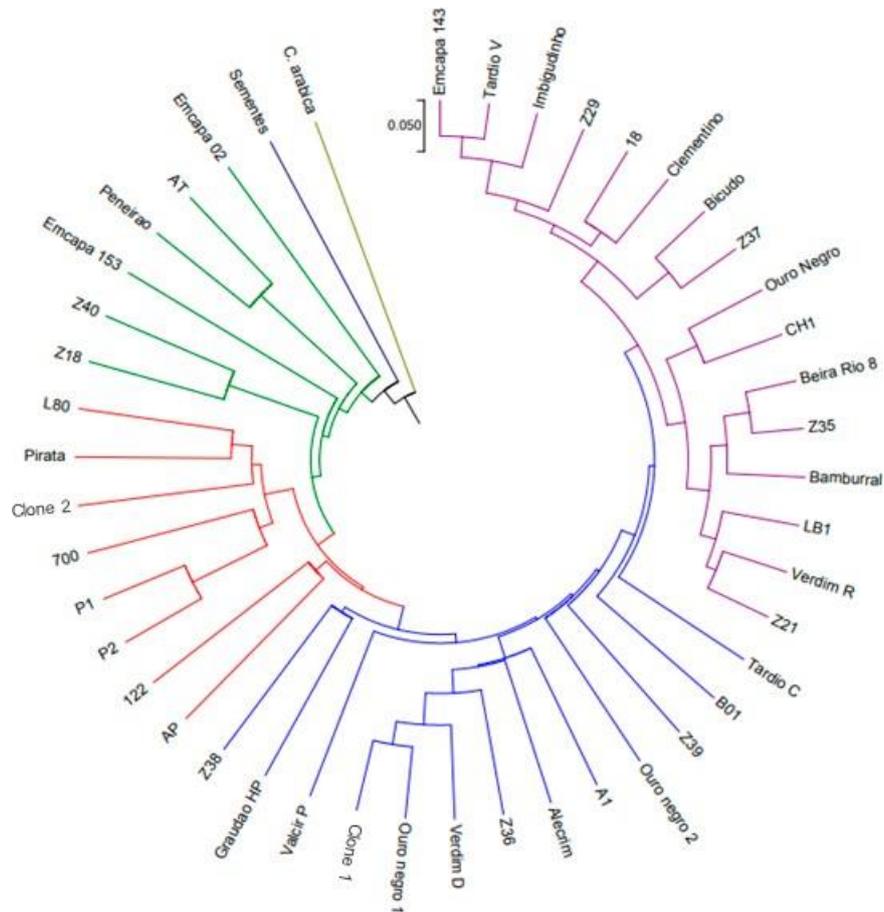


Figure 2. Dendrogram of genetic dissimilarity among 44 *Coffea canephora* genotypes and 1 *Coffea arabica* genotype, constructed using the UPGMA method, with SSR and EST markers.

Genotype Emcapa 02 was most dissimilar in relation to some genotypes, e.g., Z40, 700 and P1, with dissimilarity measures of 0.64, 0.63 and 0.61, respectively, and 16, 15 and 16 alleles in common.

The dissimilarity between the genotypes Peneirão and 122 and between Ouro Negro 2 and AT was 0.63 and 0.61, respectively; the first two had 16 and the latter 19 alleles in common.

These same genotypes were studied by [27], who reported a productivity of 97.10 bags ha⁻¹ for Emcapa 02, 74.55 bags ha⁻¹ for genotype Z40 and 89.19 bags ha⁻¹ for genotype 700. The productivity of genotypes Peneirão and 122 was 81.07 and 99.22 bags ha⁻¹, and genotypes Ouro Negro 2 and AT produced 74.70 and 128.93 bags ha⁻¹, respectively. Genotypes 700 (Group III) and AT (Group IV) were not only dissimilar and highly productive, but also have

an exceptionally low water requirement for mature coffee (less than 315 L) to yield one 60 kg bag of green coffee beans (Table 2).

Table 2. Mean yield in liters of coffee per 60 kg bag and productivity of the genotypes in the groups defined by microsatellite markers using the UPGMA clustering method

Groups	Genotypes	Yield	Productivity
		Liter/bag	Bag/ha
I	Emcapa 143	312.26	94.65
	Tardio V	329.95	69.84
	Imbigudinho	324.82	79.67
	Z29	366.61	70.15
	18	422.67	49.30
	Clementino	355.48	97.86
	Bicudo	366.21	93.09
	Z37	363.78	86.84
	Ouro Negro	346.39	75.24
	CH1	359.87	81.40
	Beira rio 8	439.72	61.81
	Z35	402.23	72.48
	Bamburral	357.23	86.60
	LB1	312.21	118.08
	Verdim R	398.32	82.35
Z21	294.01	102.49	
II	Tardio C	345.15	74.73
	B01	418.21	43.11

	Z39	339.92	95.48
	Ouro Negro 2	316.46	74.70
	A1	365.44	108.19
	Alecrim	341.46	54.37
	Z36	316.62	91.45
	Verdim D	336.65	90.43
	Ouro Negro 1	359.87	72.23
	Clone 1	-	-
	Valcir P	341.11	87.93
	Graudão HP	317.59	86.13
	Z38	372.53	74.94
	AP	313.53	86.28
	122	330.03	81.07
	P2	316.7	92.32
	P1	332.5	93.47
III	700	303.23	89.19
	Clone 2	-	-
	Pirata	379.63	76.22
	L80	364.68	105.53
	Z18	330.2	80.05
	Z40	356.18	74.55
	Emcapa 153	322.45	85.52
IV	Peneirão	326.6	99.22
	AT	303.49	128.93
	Emcapa 02	323.18	97.10

V	Sementes	348.06	70.32
VI	Arabica	-	-

Source: Partelli et al., (2021).

Our data are promising since breeding targets the identification of genotypes with high productivity but also sufficient variability for selection, which was confirmed in the above-mentioned genotypes, with the greatest dissimilarities and high productivity.

The productivity of genotypes Bamburral and Z21 (Group I), A1 (Group II), L80 (Group III) and AT (Group IV) exceeded 100 bags ha⁻¹ (118.08; 102.49; 108.19 and 128.93 bags ha⁻¹, respectively) (Table 2). These high-yielding genotypes were allocated to different groups and can therefore be used in future crosses, targeting even higher productivity and variability. The genotypes Emcapa 143 and Tardio V were the least dissimilar, in other words, the closest (0.06 dissimilarity, 39 common alleles). Most genotypes had shorter distances, probably due to the way in which these clones had been selected by farmers. In general, these producers all selected for the same agronomic characteristics of coffee trees, addressing high yield, plant height and disease resistance, among others. In this way, variability may have declined, and the clones may be somewhat similar. However, possible crosses will be proposed between plants from different groups, based on the greatest dissimilarity and high productivity.

The genotypes within a group are genetically similar, evidencing a certain pattern among most genotypes of the same group. This similarity was observed in groups I, II, III and IV, because in spite of the high genotypic diversity in this population, as mentioned above, some genotypes had a certain degree of genetic similarity and were therefore clustered in the same group.

The similarity between these genotypes can be explained by genetic drift that occurred when Conilon was first introduced in the country, according to 30. According to Fazuoli et al. [28], despite the high diversity, a large amount of seed from few plants was imported to establish the first plantations in Brazil, in the southeast region. The observed diversity is therefore still a minor sample of the natural diversity of the species; in addition, this variability has been decimated and may be at risk due to intense selection practiced by farmers over the years.

According to Cruz et al. [29] and Carmona et al. [30], the study of genetic divergence between accessions of a particular crop is essential to know and understand the genetic variability it contains. The resulting data are useful for the preservation and use of accessions, since genetically distinct and promising genotypes could be identified, making the grouping of these lines possible using statistical procedures, with a view to establishing homogeneity within and heterogeneity between the groups.

Genetic divergence analyses can be used to refine the selection of parents to be crossed. Crosses between highly divergent parents can maximize progeny heterozygosity and heterosis, thus increasing the chances of selecting superior elite plants. Clones with greater genetic dissimilarity can be selected for population formation, because by recommending a set of hybrids with greater genetic distances, the problems of genetic self-incompatibility of the species are minimized. In addition to the genetic distance, crosses between genotypes with a lower degree of kinship should be prioritized. As verified in Figure 1, the minority of peer-relatedness estimates were between 0.1 and 0.5.

Analysis of Genetic Structure

The Bayesian approach, based on the K criterion described by Evanno et al. (2005), used the alleles for inferences about the genetic structure of *C. canephora* genotypes and K = 3 was indicated as the most likely number of clusters (Figure 3 and Supplementary Material Figure S1). In a Bayesian analysis of the genetic structure and diversity of *C. canephora* in Upper Guinea, Labouisse et al. [21] found K = 5.

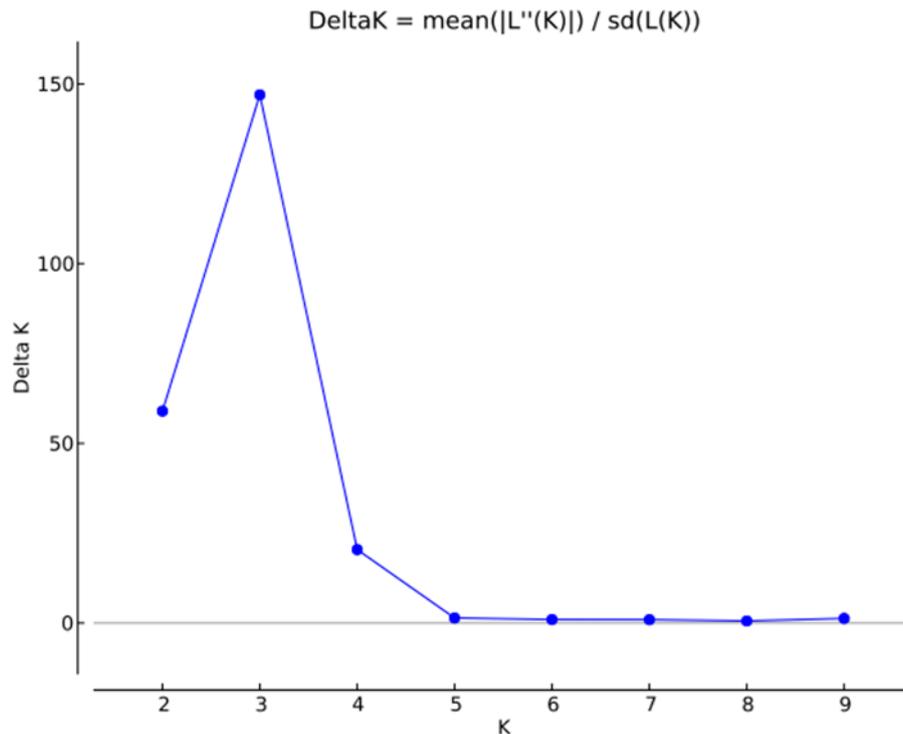


Figure 3. ΔK peak, indicating the optimal number of genetic clusters for Bayesian analysis with software Structure 2.3.4. UENF, Campos dos Goytacazes, RJ, 2021.

An adherence probability of 70% that each genotype belongs to a certain group was assumed. The 45 genotypes evaluated were grouped as follows: 25 genotypes in group I (red), four in group II (green) and 16 in group III (blue) (Figure 4). Some plants have mixed probabilities, i.e., they have alleles in common, which belong to the three groups (Figure 3 and Supplementary Material Table S1).

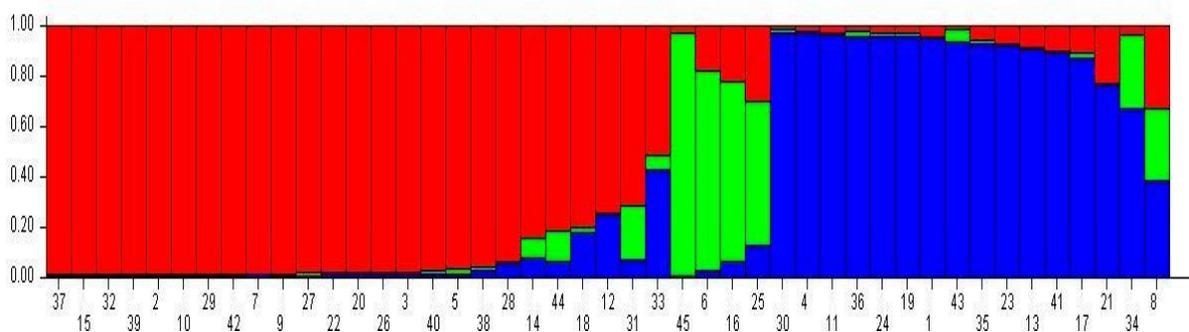


Figure 4. Bayesian inference clustering of 44 *Coffea canephora* and 1 *Coffea arabica* genotype. Genotypes are represented in the horizontal line and each genetic group is represented by a color.

Genotypes 37, 15, 32, 39, 2, 10, 29, 42, 7, 9, 27, 22, 20, 26, 3, 40, 5 and 28 have 100% adherence to the red group and genotypes 30, 4, 11, 36, 24, 19, 1, 43, 35 and 23 have 100% adherence to the blue group. This organization means that the genotypes in the red/blue/green group have sets of alleles that differentiate them for the set of markers used.

The plants 33, 16, 25, 34 and 8 have characteristics of all three groups, that means, less than 70% adherence to any of the three groups. Therefore, some plants are more likely to adhere to the red or the blue group, which could indicate that they share alleles. The SSR markers proved efficient in differentiating the different genotypes from the different locations, according to their genetic variability. The presence of genotypes with mixed probabilities can be explained by the genetic structure of the population, which comprises a small number of genotypes that share alleles with each other, due to their form of reproduction.

Using a Bayesian analysis, the groups were distinguished with regard to the analyzed loci and the plants that shared the same analyzed genomic regions were detected. This kind of clustering is promising as an orientation for crosses between *C. canephora* genotypes that belong to different groups, as they are genetically distant. It is important to combine these data with agronomic performance data of these genotypes, to select the plants with the greatest agronomic potential.

MATERIALS AND METHODS

Experimental Area

The experiment was carried out in a plantation of 43 *C. canephora* genotypes, most of which had been selected by coffee growers in the region. Planting occurred in April 2014 in Nova Venécia, a county in northern Espírito Santo, Brazil, on a private property (lat. 18°66'23" S, long. 40°43'07" W; at least 199 m asl), where the mean annual temperature is 23 °C. The regional climate is tropical, characterized by hot and humid summers and dry winters, classified as

Aw by Köppen (Alvares et al., 2013). The soil of the site was classified as a Latossolo Vermelho-Amarelo, distrófico, with clayey texture and wavy relief [27].

The genotypes were arranged in a randomized complete block design, with three replications, and each treatment consisted of seven plants of each genotype. The 44 genotypes (Table 3) were propagated from cuttings, planted at a spacing of 3 m between rows and 1 m between plants (3 1), equivalent to 3333 plants per hectare, and four stems per plant were left to grow. Two genotypes, identified as Clone 1 and Clone 2, were taken from another area to compare their genetic divergence with the above genotypes. For this reason, no yield-related data from previous scientific research was available. One *Coffea arabica* genotype of a cultivar (Catucaí 2SL) was also used, resulting in a total of 45 genotypes.

Management practices were applied according to the crop-specific technical guidelines and consisted basically of weed control with herbicides and brush cutters, preventive phytosanitary management, liming, fertilization and drip irrigation [27].

Sampling of Plant Material

Five light green (young) leaves were collected from the apex of each genotype (of one plant per genotype). The samples were immediately wrapped in aluminum foil, labelled and first frozen in liquid nitrogen. The samples were then transported on dry ice to the laboratory and stored at 80°C until DNA extraction.

DNA Extraction

Genomic DNA was extracted and analyzed at the DNA Marker Sector of the Plant Breeding Laboratory of the Center of Agricultural Science and Technologies, State University of Northern part of Rio de Janeiro State Darcy Ribeiro (LMGV/CCTA/UENF), Campos dos Goytacazes, RJ.

The frozen samples were ground with a pestle in crucibles with liquid nitrogen and stored in 2.0 mL microtubes. Genomic DNA was extracted by the method proposed by [34], with adaptations.

Table 3. Identification of *Coffea canephora* and *Coffea arabica* genotypes used for molecular evaluation

Sample number	Name	Sample number	Name
1	AP	24	Clone 1
2	Ouro negro 2	25	Z40
3	18	26	CH1
4	Ouro negro 1	27	Emcapa 143
5	Graudão HP	28	Verdim R
6	Peneirão	29	Tardio C
7	Ouro Negro	30	Clone 2
8	Z18	31	700
9	Clementino	32	Z29
10	Beira Rio 8	33	Emcapa 02
11	Verdim D	34	Pirata
12	Z39	35	A1
13	Bamburral	36	Z36
14	P2	37	Z37
15	Imbigudinho	38	B01
16	AT	39	Tardio V
17	Emcapa 153	40	Z21
18	Bicudo	41	Z35
19	Alecrim	42	LB1
20	Z38	43	L80
21	122	44	P1
22	Sementes	45	Arabica
23	Valcir P		

Note: Genotype 33 belongs to cultivar Emcapa 8111, genotypes 17 and 22 to cv. Emcapa 8131 [31], genotypes 28, 10, 13, 34, 35 and 09 to cv. 'Tributun' [32], genotypes 35 and 44 to cv. 'Andina' [33], and genotype 22 were derived from seed-propagated plants. The other genotypes do not belong to any cultivar.

After extraction, the DNA was analyzed on 1% agarose gel with 1X TAE buffer (Tris, Sodium acetate, EDTA, pH 8.0), using a 100 bp Lambda (λ) marker (100 ng/ μ L⁻¹) (Invitrogen, Waltham, MA, USA) and stained with a mixture of Gel

Red™ and Blue Juice (1:1). The samples were photo-documented with the DNR MiniBIS Pro® bio-imaging system. Based on the images, the DNA concentration was estimated in comparison with the 100 bp marker and the DNA samples were diluted to a working concentration of 10 ng/μL⁻¹.

Primer Screening

The microsatellite and genomic primers for this study were selected from coffee cultivars for being polymorphic [35].

For the polymerase chain reaction (PCR), a total of 58 primer pairs were tested and used to amplify SSR and EST loci of *C. canephora* and *C. arabica*, within a temperature gradient of 50 °C to 60 °C. After screening, a set of 21 primer pairs was selected for the amplification reactions (Table 4).

Polymerase Chain Reaction (PCR)

A 35-cycle PCR amplification was carried out in an (Applied Biosystems™ Veriti™, Waltham, MA, USA) 96-Well Thermal Cycler, as follows: 94°C for 4 min (initial denaturation); 94°C for 2 min (cyclic denaturation); primer-specific temperature, in °C, for 1 min (annealing); 72°C for 2 min (cyclic extension); 72°C for 10 min (final extension); and holding step at 4°C for unlimited time. The final volume of each sample was 13 μL, containing 2 μL DNA (5 ng/μL), 1.50 μL 10X Buffer (NH₄SO₄), 1.5 μL MgCl₂ (25 mM), 1.5 μL dNTPs (2 mM), 1 μL primer (R + F) (5 μM) and 0.12 μL Taq-DNA polymerase (5 U/μL) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

The PCR products were diluted at a ratio of 6 μL sample to 18 μL buffer E of kit DNF 900, and subjected to capillary electrophoresis (Fragment Analyzer, AATI, Santa Clara, CA, USA), where amplified fragments between 35 and 500 bp long were separated at a resolution of approximately 2 bp. Each run lasted 2 h 20 min at 8 kW.

Table 4. Sequence of 21 microsatellite primer pairs used to analyze 44 *C. canephora* and 1 *C. arabica* genotype

LOCUS	SEQUENCE (5'3')	AT	REFERENCE
CaEST-010	F: CTTCTTCATCCAACAACACG	54 °C	Souza et al. 2013
	R: TGCCATTCCACTGTGTCACT		
SSR-08 ¹	F: CACTGGCATTAGAAAGCACC	55 °C	Souza et al. 2013
	R: GGCAAAGTCAATGATGACTC		
SSR-30 ³	F: ATGGGGCCAACCTTGAATATG	55 °C	Souza et al. 2013
	R: CAGGGCATCTATCTACTTCTCTTT		
SSR-34 ³	F: GGAGACGCAGGTGGTAGAAG	55 °C	Souza et al. 2013
	R: TCGAGAAGTCTTGGGGTGTT		
SSR-35 ³	F: CTGGCATTAGAAAGCACCTTG	54 °C	Souza et al. 2013
	R: GCTTGGCTCACTGTAGGACTG		
SSR-37 ³	F: CAACACTATCTCTTGATTTTTCACT	53 °C	Souza et al. 2013
	R: CGTGCAAGTCACATACTTTACTAC		
SSR-43 ³	F: TTTTCTGGGTTTTCTGTGTTCTC	50 °C	Souza et al. 2013
	R: TAACTCTCCATTCCCGCATT		
SSR-46 ³	F: AATGAAGAAGAGGGTGGTG	53 °C	Souza et al. 2013
	R: CGAGGGTATTGTTTTCCAG		
SSR-48 ²	F: AGCAAGTGGAGCAGAAGAAG	56 °C	Souza et al. 2013
	R: CGGTGAATAAGTCGCAGTC		
SSR-49 ³	F: TGGAGAAGGCTGTTGAAACC	56 °C	Souza et al. 2013
	R: GCGTGGAAGCAAAAAGGTAT		
SSR-55 ²	F: GCAGGTATTTGAAGGATGAACC	56 °C	Souza et al. 2013
	R: GTGTAGGTGGTGCGATGTGT		
SSR-59 ³	F: CCAGCTCTCCTCACTCTTTTCA	58 °C	Souza et al.

	R: GGTGGTGGAGGGGTAATAGG		2013
SSR-70 ⁴	F: GTAACCACCACCTCCTCTGC	59 °C	Souza et al.
	R: TGGAGGTAACGGAAGCTCTG		2013
SSR-71 ⁴	F: GCTAAGTTCAATTGCCCTGT	55 °C	Souza et al.
	R: GGGTTAATTTGATTGCGTGA		2013
SSR-74 ⁴	F: TGGGGAAAAGAAGGATATAGACAAGAG	59 °C	Souza et al.
	R: GAGGGGGGCTAAGGGAATAACATA		2013
SSR-84 ⁵	F: AAGTAGATTGGTGAAAGGGAAGC	57 °C	Souza et al.
	R: TCCTTCATTTTCTCCTCTTGGTT		2013
SSR-87 ⁵	F: ATTCGACGACTCCAAAGCATA	58 °C	Souza et al.
	R: CCTTGCTGGCCCTTCCTT		2013
SSR-100 ⁵	F: ACCCTTTACTACTTATTTACTCTC	50 °C	Souza et al.
	R: ACATCCCCTTGCCATTTCTTC		2013
SSR-106 ¹	F: CCCTCCCTCTTTCTCCTCTC	56 °C	Souza et al.
	R: TCTGGGTTTTCTGTGTTCTCG		2013
SSR-114 ⁶	F: TAACAGAAGCACCAAACC	53 °C	Souza et al.
	R: TCTAAACCCACCTCACAAC		2013
SSR-119 ³	F: TTGCCATCATCGTTCATTCT	56 °C	Souza et al.
	R: GCATAGTGTCGGTTGTGTTGTT		2013

Statistical Analysis of Molecular Variables

The data of the 21 amplified SSR and EST markers were converted into numerical codes for each allele per locus. This numerical matrix was constructed by assigning values from one to the maximum number of alleles per locus, as described below: one locus with three alleles in homozygous form is represented as 11, 22 and 33 (A1A1, A2A2 and A3A3) and 12, 13 and 23 for those in

heterozygous form (A1A2, A1A3 and A2A3). Based on the numerical matrix, three indices were tested: unweighted index, weighted index and the Smouse and Peakall index [23]. Based on the highest cophenetic correlation, the weighted index was used, and the analyses were run on GENES software [36].

where:

$$L$$

$$\sum_{j=1}^L p_j c_j$$

$p_j = a_j/A$: weight associated with locus j , determined by: a_j : total number of alleles at locus j

A : total number of alleles studied

$$L$$

$$\sum_{j=1}^L p_j = 1$$

c_j : number of common alleles between accession pairs i and i' .

The index represents similarity measures, while for cluster analysis, dissimilarity measures are recommended, defined by:

$$D = 1 - S$$

Once the distance matrix was calculated, dendrogram clustering was performed using the UPGMA method (Unweighted Pair-Group Method Average), on Mega software version 6 [37]. The optimal number of markers was estimated with GENES software [36] and the graph plotted with SigmaPlot software v14.

The genetic variability among the 45 genotypes was estimated with Genalex 6.5 software [23], based on the following parameters: number of alleles per polymorphic locus (NA), observed heterozygosity (H_o), expected heterozygosity (H_e), information index (I) and fixation index (f). Relative kinship (K) among samples was calculated using 21 SSR markers by SPAGeDi software [38], and the Loiselle coefficient [39] was used to create the pair-wise kinship matrix (45×45).

Genetic Structure of the Population

To assess the structure of the 45 genotypes, a method based on Bayesian clustering algorithms was used, on STRUCTURE version 2.3.4 software [40]. To this end, we used the admixture model and independent allele frequencies, with a burn-in period of 250,000, followed by a final extension (Markov Chain Monte Carlo) of 750,000 iterations. Twenty simulations were run for each possible value of k (1–10).

The Δk statistical test was performed using Structure Harvester software and the Evanno criterion [41]. This criterion is based on the mean and standard deviation from the mean posterior probability ($\text{LnP}(D)$) values estimated at each of the 10 interactions per k . The Δk_i values were estimated as:

$$\Delta k_i = \text{ABS} (k_i + 1 - (2 \times k_i) + k_i - 1) / \text{standard deviation of } K_i$$

where:

i is the number of simulated groups, from $i = 1$ to $i = 10$; and ABS is the control module. This Δk value was estimated for each k and the highest Δk selected. After choosing the optimal Δk , the simulation with the lowest $\text{LnP}(D)$ value was chosen from a run of 10 simulations. In the resulting graph, each color represents a possible group of structured plants.

CONCLUSIONS

The SSR markers used in this study discriminated the *C. canephora* genotypes efficiently and were useful to make headway in breeding of Conilon coffee. Genetic variability was confirmed in the evaluated population, which was structured into six distinct groups by UPGMA clustering and into three groups using a Bayesian analysis. Crosses between Bamburral and Z21 (Group I), A1 (Group II), L80 (Group III) and AT (Group IV) individuals are recommended in order to maintain the genetic variability of the population and high productivity. There is no kinship between the indicated genotypes.

SUPPLEMENTARY MATERIALS

The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/plants11223023/s1>, Figure S1: Structure cluster graphs of 44 *C. canephora* and 1 genotype of *C. arabica* in Brazil with minor and major modes for the data. The runs were performed for $K = 1$ to 10 with 20 replicates, and division for runs by mode is provided below the graphs. In the graph, each horizontal bar represents an individual palm tree, and the proportion of each color in the bar corresponds to the proportion of the individual genotypes assigned to a given cluster. Codes correspond to their identification. Individuals labels: 1 = AP; 2 = Ouro negro 2; 3 = 18; 4 = Ouro negro 1; 5 = Graudão HP; 6 = Peneirão; 7 = Ouro Negro; 8 = Z18; 9 = Clementino; 10 = Beira Rio 8; 11 = Verdim D; 12 = Z39; 13 = Bamburral; 14 = P2; 15 = Imbigudinho; 16 = AT; 17 = Emcapa 153; 18 = Bicudo; 19 = Alecrim; 20 = Z38; 21 = 122; 22 = Sementes; 23 = Valcir P; 24 = Clone 1; 25 = Z40; 26 = CH1; 27 = Emcapa 143; 28 = Verdim R; 29 = Tardio C; 30 = Clone 2; 31 = 700; 32 = Z29; 33 = Emcapa 02; 34 = Pirata; 35 = A1; 36 = Z36; 37 = Z37; 38 = B01; 39 = Tardio V; 40 = Z21; 41 = Z35; 42 = LB1; 43 = L80; 44 = P1; 45 = Arábica; Table S1: The average in percentages of estimated membership coefficients of each individual to the inferred K cluster for 45 *C. canephora* genotypes and 1 *C. arabica* genotype.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceptualization, P.S., H.V., A.V. and F.P.; methodology, P.S., E.S., M.B., H.V., A.V. and F.P. software, P.S., E.S. and M.B.; validation, P.S., H.V., A.V., F.P. and E.S.; formal analysis, P.S.; E.S. and M.B.; investigation, P.S. and E.S.; resources, P.S. and E.S.; data curation, P.S., E.S. and A.V.; writing—original draft preparation, P.S. and E.S.; writing—review & editing, P.S., E.S. and H.V.; visualization, P.S., E.S. and H.V.; supervision, H.V., E.S., A.V. and F.P.; project

administration, H.V., A.V. and F.P.; funding acquisition, H.V., A.V. and F.P. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

REFERENCES

1. Companhia Nacional de Abastecimento—CONAB. Acompanhamento da Safra Brasileira de Café—Safra 2021. Brasília. 2021. Available online: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cafe> (accessed on 24 March 2022).
2. Moraes, M.S.; Teixeira, A.L.; Ramalho, A.R.; Espíndula, M.C.; Ferrão, M.A.G.; Rocha, R.B. Characterization of gametophytic self-incompatibility of superior clones of *Coffea canephora*. *Genet. Mol. Res.* 2018, 17, 16039876. [CrossRef]
3. Ramalho, A.R.; Rocha, R.B.; Souza, F.F.; Veneziano, W.; Teixeira, A.L. Genetic gain in the productivity of processed coffee from the selection of clones of ‘Conilon’ coffee. *Rev. Cienc. Agron.* 2016, 47, 516–523. [CrossRef]
4. Bergo, C.L.L.; Miqueloni, D.P.; Lunz, A.M.P.; De Assis, G.M.L. Estimation of genetic parameters and selection of *Coffea canephora* progenies evaluated in Brazilian Western Amazon. *Coffee Sci.* 2020, 15, e151663. [CrossRef]
5. Babova, O.; Occhipinti, A.; Maffei, M.E. Chemical partitioning and antioxidant capacity of green coffee (*Coffea arabica* and *Coffea canephora*) of different geographical origin. *Phytochemistry* 2016, 123, 33–39. [CrossRef] [PubMed]
6. Toppa, E.V.B.; Jadoski, C.J. O Uso dos Marcadores Moleculares no Melhoramento Genético de Plantas. *Sci. Agrar. Parana.* 2013, 12, 1–5. [CrossRef]
7. Sousa, T.V.; Caixeta, E.T.; Alkimim, E.R.; de Oliveira, A.C.B.; Pereira, A.A.; Zambolim, L.; Sakiyama, N.S. Molecular markers useful to discriminate *Coffea arabica* cultivars with high genetic similarity. *Euphytica* 2017, 213, 75. [CrossRef]

8. Alkimim, E.R.; Caixeta, E.T.; Sousa, T.V.; Pereira, A.A.; de Oliveira, A.C.B.; Zambolim, L.; Sakiyama, N.S. Marker-assisted selection provides arabica coffee with genes from other *Coffea* species targeting on multiple resistance to rust and coffee berry disease. *Mol. Plant Breed.* 2017, 37, 6. [CrossRef]
9. Gartner, G.A.L.; McCouch, S.R.; Moncada, M.D.P. A genetic map of an interspecific diploid pseudo testcross population of coffee. *Euphytica* 2013, 192, 305–323. [CrossRef]
10. Alkimim, E.R.; Caixeta, E.T.; Sousa, T.V.; da Silva, F.L.; Sakiyama, N.S.; Zambolim, L. High-throughput targeted genotyping using next-generation sequencing applied in *Coffea canephora* breeding. *Euphytica* 2018, 214, 50. [CrossRef]
11. Anagbogu, C.F.; Bhattacharjee, R.; Ilori, C.; Tongyoo, P.; Dada, K.E.; Muyiwa, A.A.; Gepts, P.; Beckles, D.M. Genetic diversity and re-classification of coffee (*Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner) from South Western Nigeria through geno-typing-by-sequencing- single nucleotide polymorphism analysis. *Genet. Resour. Crop Evol.* 2019, 66, 685–696. [CrossRef]
12. Baltazar, M.D.; Fabella, J.M.A.O. Assessment of the genetic diversity of Philippine Arabica coffee (*Coffea arabica* L.) using SSR markers. *Philipp. J. Sci.* 2020, 149, 993–1003.
13. da Silva, B.S.R.; Sant'Ana, G.C.; Chaves, C.L.; Androcioli, L.G.; Ferreira, R.V.; Sera, G.H.; Charmetant, P.; Leroy, T.; Pot, D.; Domingues, D.S.; et al. Population structure and genetic relationships between Ethiopian and Brazilian *Coffea arabica* genotypes revealed by SSR markers. *Genetica* 2019, 147, 205–216. [CrossRef] [PubMed]
14. Ferrão, M.A.G.; Ferrão, R.G.; Fonseca, A.F.A.; Verdin Filho, A.C.; Volpi, P.S. Origin, geographical dispersion, taxonomy and genetic diversity of *Coffea canephora*. In *Conilon Coffee*; Ferrão, R.G., Fonseca, A.F.A., Ferrão, M.A.G., De Muner, L.H., Eds.; Incaper: Vitória, Brazil, 2019; pp. 85–110.
15. Zucchi, M.I.; Brondani, R.P.V.; Pinheiro, J.B.; Chaves, L.J.; Coelho, A.S.G.; Vencovsky, R. Genetic structure and gene flow in *Eugenia dysenterica* DC in the Brazilian Cerrado utilizing SSR markers. *Genet. Mol. Biol.* 2003, 26, 449–457. [CrossRef]

16. Caballero, A.; Rodríguez-Ramilo, S.T.; Ávila, V.; Fernández, J. Management of genetic diversity of subdivided populations in conservation programmes. *Conserv. Genet.* 2010, 11, 409–419. [CrossRef]
17. Kiwuka, C.; Goudsmit, E.; Tournebize, R.; de Aquino, S.O.; Douma, J.C.; Bellanger, L.; Crouzillat, D.; Stoffelen, P.; Sumirat, U.; Legnaté, H.; et al. Genetic diversity of native and cultivated Ugandan Robusta coffee (*Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner): Climate influences, breeding potential and diversity conservation. *PLoS ONE* 2021, 16, e0245965. [CrossRef]
18. Sánchez, E.; Solano, W.; Gatica-Arias, A.; Chavarría, M.; Araya-Valverde, E. Microsatellite DNA fingerprinting of *Coffea* sp. germplasm conserved in Costa Rica through singleplex and multiplex PCR. *Crop Breed. Appl. Biotechnol.* 2020, 20, 1–9. [CrossRef]
19. Botstein, D.; White, R.L.; Skolnick, M.; Davis, R.W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* 1980, 32, 314–331.
20. De Moura, T.M.; Sebbenn, A.M.; Chaves, L.J.; Coelho, A.S.G.; Oliveira, G.C.X.; Kageyama, P.Y. Diversidade e estrutura genética espacial em populações fragmentadas de *Solanum* spp. do Cerrado, estimadas por meio de locos microssatélites. *Sci. For.* 2009, 37, 143–150.
21. Labouisse, J.-P.; Cubry, P.; Austerlitz, F.; Rivallan, R.; Nguyen, H.A. New insights on spatial genetic structure and diversity of *Coffea canephora* (Rubiaceae) in Upper Guinea based on old herbaria. *Plant Ecol. Evol.* 2020, 153, 82–100. [CrossRef]
22. Alves, A.L.; Leitão, A.E.B.; de Souza, P.E.N.; Santos, M.D.F.P.D.; Moscon, P.S.; Pessoa, M.S.; Pinheiro, C.A.; Moraes, P.C.; Partelli, F.L. Antioxidant Activity and Stable Free Radicals in Robusta Green Coffee Genotypes/Atividade antioxidante e Radicais Estáveis Livres em Genótipos de Café Verde Robusta. *Braz. J. Dev.* 2021, 7, 37312–37330. [CrossRef]
23. Peakall, R.; Smouse, P.E. GenA1Ex 6, 5: Genetic analysis in Excel, Population genetic software for teaching and research an update. *BMC Bioinform.* 2012, 28, 2537–2539. [CrossRef] [PubMed]
24. Cruz, C.D.; Ferreira, F.M.; Pessoni, L.A. *Biometria Aplicada ao Estudo da Diversidade Genética*, 1st ed.; Produção Independente: Viçosa, Brazil, 2011.

25. Morgante, M.; Hanafey, M.; Powell, W. Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes. *Nat. Genet.* 2002, 30, 194–200. [CrossRef]
26. Mojena, R. Hierarchical grouping methods and stopping rules: An evaluation. *Comput. J.* 1977, 20, 359–363. [CrossRef]
27. Partelli, F.L.; Oliosi, G.; Dalazen, J.R.; da Silva, C.A.; Vieira, H.D.; Espindula, M.C. Proportion of ripe fruit weight and volume to green coffee: Differences in 43 genotypes of *Coffea canephora*. *Agron. J.* 2021, 113, 1050–1057. [CrossRef]
28. Fazuoli, L.C.; Mistro, J.C.; Braghini, M.T. Melhoramento de café robusta no Instituto Agronômico de Campinas. In *Tecnologia para Produção do Café Conilon*; Zambolim, L., Ed.; UFV: Viçosa, Brazil, 2009; Volume cap.8, pp. 201–248.
29. Cruz, C.D.; Carneiro, P.C.S.; Regazzi, A.J. *Modelos Biométricos Aplicados ao Melhoramento Genético*, 3rd ed.; UFV: Viçosa, Brazil, 2014; 668p.
30. Carmona, P.A.; Peixoto, J.R.; Amaro, G.B.; Mendonça, M.A. Divergência genética entre acessos de batata-doce utilizando descritores morfoagronômicos das raízes. *Hortic. Bras.* 2015, 33, 241–250. [CrossRef]
31. Bragança, S.M.; Carvalho, C.H.S.; Fonseca, A.F.A.F.; Ferrão, R.G. Clonal varieties of Conilon coffee for the Espírito Santo State, Brazil. *Pesq. Agropec. Bras.* 2001, 36, 765–770. [CrossRef]
32. Partelli, F.L.; Giles, J.A.D.; Oliosi, G.; Covre, A.M.; Ferreira, A.; Rodrigues, E.V.M. Tributun: A coffee cultivar developed in partnership with farmers. *Crop Breed. Appl. Biotechnol.* 2020, 20, 30002025. [CrossRef]
33. Partelli, F.B.; Golynski, A.; Ferreira, A.; Martins, M.Q.; Mauri, A.L.; Ramalho, J.C.; Vieira, H.D. Andina—First clonal cultivar of high-altitude Conilon coffee. *Crop Breed. Appl. Biotechnol.* 2019, 19, 476–480. [CrossRef]
34. Diniz, L.E.C.; Sakiyama, N.S.; Lashermes, P.; Caixeta, E.T.; Oliveira, A.C.B.; Zambolim, E.; Loureiro, M.E.; Pereira, A.A.; Zambolim, L. Analysis of AFLP markers associated to the Mex-1 resistance locus in Icatu progenies. *Crop Breed. Appl. Biotechnol.* 2005, 5, 387–393. [CrossRef]
35. Souza, F.D.F.; Caixeta, E.T.; Ferrão, L.F.V.; Pena, G.F.; Sakiyama, N.S.; Zambolim, E.M.; Zambolim, L.; Cruz, C.D. Molecular diversity in *Coffea*

canephora germplasm conserved and cultivated in Brazil. *Crop Breed. Appl. Biotechnol.* 2013, 13, 221–227. [CrossRef]

36. Cruz, C.D. *Genes: A Software Package for Analysis in Experimental Statistics and Quantitative Genetics.* *Acta Sci.* 2013, 35, 271–276.

37. Kumar, S.; Nei, M.; Dudley, J.; Tamura, K. MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Brief. Bioinform.* 2008, 9, 299–306. [CrossRef] [PubMed]

38. Hardy, O.J.; Vekemans, X. spagedi: A versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. *Mol. Ecol. Notes* 2002, 2, 618–620. [CrossRef]

39. Loiselle, B.A.; Spork, V.L.; Nason, J.; Graham, C. Spatial genetic structure of a tropical understory shrub. *Psychotria officinalis* (Rubiaceae). *Am. J. Bot.* 1995, 82, 1420–1425. [CrossRef]

40. Pritchard, J.K.; Stephens, M.; Donnelly, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 2000, 155, 945–959. [CrossRef]

41. Evanno, G.; Regnaut, S.; Goudet, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: A simulation study. *Mol. Ecol.* 2005, 14, 2611–2620. [CrossRef]

3.2 DIVERSIDADE GENÉTICA EM GENÓTIPOS DE *Coffea canephora* VIA FENOTIPAGEM DIGITAL

RESUMO

O Brasil é o segundo maior produtor de *Coffea canephora*, e o mesmo é amplamente utilizado em blends e na indústria de café solúvel. *C. canephora* apresenta alta variabilidade genética e para estimar essa variabilidade genética são utilizados descritores morfológicos associados à qualidade do café, e o tamanho do grão é uma característica física de grande importância para a classificação do café. A classificação manual é conhecida por ser imprecisa e demorada, e por isso os pesquisadores começaram a usar a técnica de imagem digital para aumentar a eficiência na classificação. Com isso, o objetivo desse trabalho foi quantificar a diversidade genética em 43 clones de *C. canephora* por meio de estratégia Ward-MLM, estimar parâmetros genéticos e correlações a partir da fenotipagem digital de grãos e frutos. O experimento foi conduzido em uma lavoura composta por 43 genótipos de *C. Canephora*, onde os frutos foram despulpados manualmente e colocados para secar até atingirem 12 % de umidade, com o auxílio do equipamento *GroundEye*®, foram avaliadas quatro repetições de 50 grãos e frutos para cada tratamento, e o *software* gerou

planilhas com os resultados das características geométricas. Para analisar a existência de variabilidade genética entre os genótipos, os dados obtidos foram submetidos a análise de variância, estimativas de parâmetros genéticos, análise de ward-mlm, correlação de Pearson. Verificou-se que a variância genotípica foi superior em relação à variância ambiental em todas as variáveis analisadas, tanto de grãos quanto de frutos, indicando que os genótipos avaliados apresentam alta variabilidade genética. A maior distância genética, foi observada entre os grupos I e IV, indicando situação favorável para realização de cruzamentos entre os genótipos desses grupos. A análise de correlação fenotípica revelou correlações significativas positivas e negativas entre as variáveis. As variáveis analisadas por meio da análise digital de sementes foram eficientes em detectar a divergência genética entre os 43 clones de *C. canephora*. As variáveis área, diâmetro máximo e mínimo são as mais indicadas para realização da seleção para obtenção de genótipos de grãos maiores.

GENETIC DIVERSITY IN GENOTYPES OF *Coffea canephora* VIA DIGITAL PHENOTYPING

ABSTRACT

Brazil is the second largest producer of *Coffea canephora*, and it is widely used in blends and in the soluble coffee industry. *C. canephora* presents high genetic variability and to estimate this genetic variability, morphological descriptors associated with coffee quality are used, and grain size is a physical characteristic of great importance for coffee classification. Manual sorting is known to be imprecise and time-consuming, so researchers have started using digital imaging technique to increase sorting efficiency. Therefore, the objective of this work was to quantify the genetic diversity in 43 clones of *C. canephora* using the Ward-MLM

strategy, estimate genetic parameters and correlations based on digital phenotyping of grains and fruits. The experiment was conducted in a field composed of 43 genotypes of *C. Canephora*, where the fruits were manually pulped and placed to dry until they reached 12% moisture, with the aid of the GroundEye® equipment, four replications of 50 grains and fruits were evaluated. For each treatment, and the software generated spreadsheets with the results of the geometric characteristics. To analyze the existence of genetic variability among the genotypes, the data obtained were subjected to analysis of variance, estimates of genetic parameters, ward-mlm analysis, Pearson correlation. It was found that the genotypic variance was higher than the environmental variance in all analyzed variables, both for grains and fruits, indicating that the evaluated genotypes present high genetic variability. The greatest genetic distance was observed between groups I and IV, indicating a favorable situation for carrying out crosses between the genotypes of these groups. Phenotypic correlation analysis revealed significant positive and negative correlations between variables. The variables analyzed through digital seed analysis were efficient in detecting the genetic divergence among the 43 clones of *C. canephora*. The variables area, maximum and minimum diameter are the most suitable for carrying out the selection to obtain genotypes with larger grains.

Keywords: phenotyping, Conilon, GroundEye®.

INTRODUÇÃO

Coffea canephora, é a segunda espécie de café mais produzida no mundo, e o Brasil é o segundo maior produtor desta espécie, representando cerca de 20% da produção mundial (ICO, 2022). Diariamente, milhares de pessoas consomem café, a bebida carrega consigo diferentes nuances e características, e o mercado de café está sempre à procura de novas maneiras de oferta-lo, seja por blends, cafés expressos e gourmets. O café Conilon é amplamente utilizado em blends

com café arábica e na indústria de café solúvel, devido ao seu maior teor de sólidos solúveis (Ferrão et al., 2019).

C. canephora é uma espécie que se reproduz por alogamia obrigatória devido à sua característica de autoincompatibilidade gametofítica (Moraes et al., 2018). Portanto há alta variabilidade genética, resultando em plantas com diferentes potenciais (Ramalho et al., 2016, Bergo et al., 2020).

Conhecimentos sobre a divergência genética de uma população são essenciais em qualquer programa de melhoramento, pois contribuem na diferenciação de acessos, identificação de genótipos contrastantes para realização de futuros cruzamentos, além de banco de dados para identificação de possíveis grupos com maior grau de heterose (Silva et al., 2014).

Para estimar a variabilidade genética, descritores morfológicos de várias partes da planta podem ser utilizados, como aqueles relacionados a folha, flor, fruto e semente (Krause et al., 2017). Em relação aos descritores morfológicos associados à qualidade do café, o tamanho do grão é uma característica física de grande importância para a classificação do café durante o beneficiamento e formação de lotes homogêneos, pois no mercado de grãos, os de maiores tamanhos são associados aos cafés de melhor qualidade e maior preço.

Como a classificação manual é conhecida por ser imprecisa e demorada, os pesquisadores começaram a usar a técnica de imagem digital para aumentar a eficiência na classificação, considerando que a técnica de imagem é a prática mais eficiente na classificação de grãos, e com os avanços da tecnologia da computação, tornou-se possível avaliar características morfológicas de sementes e grãos relacionadas a cor, textura e geometria através da fenotipagem digital para quantificar a divergência genética, pois a mesma é uma técnica rápida, confiável, não destrutiva (Krause et al, 2017).

A análise de imagens é um método que requer menos de um minuto para digitalização e medição e também é uma técnica muito facilmente reproduzível (Venora et al, 2007).

A empresa Tbit desenvolveu o equipamento Groundeye® System Mini em 2011 com a finalidade de realizar capturas de imagens, histogramas e gráficos que facilitem a análise de sementes, grãos e plântulas (Andrade et al., 2016; Ferreira et al., 2018). A morfometria de frutos e grãos é uma informação útil e

importante para fenotipagem e caracterização genética de espécies vegetais com potencial econômico.

Abreu et al. (2016) fizeram análise computadorizada para avaliar a qualidade fisiológica de sementes de café submetidas à secagem e constataram que a utilização de imagem através da análise do programa SAS (Groundeye®) é uma alternativa viável e promissora para avaliar a viabilidade e vigor de sementes e mudas de café. A aplicação do processamento de imagens na agricultura deve ser utilizada, pois estabelece eficiência e precisão em práticas como classificação e inspeção, diminuindo a incerteza dos dados obtidos (Armstrong e Saxena, 2014).

Nos programas de melhoramento genético existem algumas ferramentas facilitadoras para o trabalho do melhorista, como os parâmetros genéticos e a análise de correlação, pois as estimativas são utilizadas como estratégia de seleção, uma vez que são representativas para a população na qual se está trabalhando. Com isso, o objetivo desse trabalho foi quantificar a diversidade genética em 43 clones de *C. canephora* por meio de estratégia Ward-MLM, estimar parâmetros genéticos e correlações a partir da fenotipagem digital de grãos e frutos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Área Experimental

O experimento foi conduzido em uma lavoura composta por 43 genótipos de *C. Canephora*, e a maioria foi selecionada por cafeicultores da região. O plantio foi realizado em abril de 2014 no município de Nova Venécia, região norte do Espírito Santo, Brasil, em propriedade particular localizada a uma latitude 18°66'23" sul e longitude 40°43'07" oeste, e acima de 199m do nível do mar, temperatura média anual é de 23°C. A região possui clima tropical, caracterizado pelo verão quente e úmido, e inverno seco, classificado como Aw, de acordo com a classificação de Köppen (Alvares et al., 2013). O solo do local é classificado

como Latossolo Vermelho-Amarelo, distrófico e com textura argilosa, com relevo ondulado (Partelli et al, 2021).

Os genótipos foram dispostos em um delineamento experimental de blocos ao acaso, com três repetições, e cada tratamento foi constituído por sete plantas de cada genótipo. O plantio foi realizado no espaçamento de 3 metros entre linhas e 1 metro entre plantas (3x1), o que equivale a 3.333 plantas por hectare. 42 genótipos são oriundos de propagação clonal via estaquia e apenas o genótipo 39 é oriundo de sementes e ambos foram conduzidos com quatro hastes por planta (Tabela 1).

Os tratos culturais foram feitos conforme as orientações técnicas para cultura e consistiram basicamente no controle de plantas daninhas com herbicidas e roçadeira, manejo fitossanitário preventivo, calagem, adubação e irrigação por gotejamento (Partelli et al, 2021).

Tabela 1. Identificação dos 43 genótipos de *Coffea canephora*. Nova Venécia-ES, 2022

ID	NOME	ID	NOME	ID	NOME
1	Verdim R	15	Bamburral	29	Tardio C
2	B01	16	Pirata	30	A1
3	Bicudo	17	Peneirão	31	Cheique
4	Alecrim	18	Z39	32	P2
5	700	19	Z35	33	Emcapa 02
6	CH1	20	Z40	34	Emcapa 153
7	Imbigudinho	21	Z29	35	P1
8	AD1	22	Z38	36	LB1
9	Graudão HP	23	Z18	37	122
10	Valcir P	24	Z37	38	Verdim D
11	Beira Rio 8	25	Z21	39	Sementes
12	Tardio V	26	Z36	40	Emcapa 143
13	AP	27	Ouro Negro	41	Ouro negro 1
14	L80	28	18	42	Ouro negro 2
				43	Clementino

Genótipo 33 pertence à cultivar Emcapa 8111 e genótipos 34 e 40 à cultivar Emcapa 8131 (Bragança et al., 2001). Genótipos 30 e 35 pertencem à cultivar Andina (Partelli et al., 2019), 8, 7, 13, 17, 32, 36 pertencem à cultivar Monte Pascoal (Partelli et al., 2020a), 1, 11, 15, 16, 30 e 43 pertencem à cultivar Tributun (Giles et al., 2019, Partelli et al., 2020b). ID: identificação. Genótipo 9, 33, 29, 12 e 24 pertencem à cultivar Salutar (Partelli et al., 2022).

Fenotipagem digital dos frutos

Com o auxílio do equipamento *GroundEye*[®], foram avaliadas quatro repetições de 50 frutos para cada genótipo, os frutos foram dispostos em bandeja acrílica para a captura da imagem, em seguida, por meio do sistema de análise de imagens o *software* gerou planilhas com os resultados das características geométricas: área (cm²) (F. ÁREA), circularidade (F. CIRCULARIDADE), diâmetro máximo (F. DIÂMETRO MÁX.), diâmetro mínimo (F. DIÂMETRO MÍN.), esfericidade (F. ESFERICIDADE), extensão (F. EXTENSÃO), irregularidade (F. IRREGULARIDADE) e perímetro (cm) (F. PERÍMETRO).

Caracterização do grão

Após a chegada do material, os frutos foram despolidos manualmente, em seguida as sementes ainda com o pergaminho foram colocadas para secar em bandejas de plástico até atingirem 14 a 15% de umidade, determinada com o auxílio do determinador de umidade DOLE 500. Posteriormente foi feita a retirada do pergaminho de cada uma das sementes com auxílio de bisturi e estilete, e em seguida as mesmas foram acondicionadas em sacos de papel devidamente identificados para secagem em estufa de circulação forçada de ar até atingirem 12% de umidade e passarem a ser grãos.

Fenotipagem digital dos grãos

Com o auxílio do equipamento *GroundEye*[®], foram avaliadas quatro repetições de 50 grãos para cada tratamento, os grãos foram dispostos em bandeja acrílica para a captura da imagem, em seguida, por meio do sistema de análise de imagens o *software* gerou planilhas com os resultados das características geométricas: área (cm²) (G. ÁREA), circularidade (G. CIRCULARIDADE), diâmetro máximo (G. D. MÁX), diâmetro mínimo (G. D. MÍN), esfericidade (G. ESFERICIDADE), extensão (G. EXTENSÃO), irregularidade (G. IRREGULARIDADE), número de quinas (G. NÚM DE QUINAS) e perímetro (cm) (G. PERÍMETRO).

Caracterização das variáveis do GroundEye[®]

Área – corresponde à quantidade de espaço que a superfície de um objeto possui.

Circularidade – é um fator de forma circular mais sensível ao alongamento do objeto e com menor dependência a suavidade do contorno. Vale 1 para objetos circulares e menos que 1 para objetos com outras formas, pois qualquer outra forma possuindo mesmo diâmetro máximo possui menor área.

Diâmetro Máximo – é a maior reta que passa pelo centroide da semente em centímetros.

Diâmetro Mínimo – é a menor reta que passa pelo centroide da mostrada em centímetros.

Esfericidade da forma – define o quão circular é o objeto, quanto mais próximo do valor de 12,56 mais o objeto se aproxima da forma da circunferência.

Extensão – também conhecido como retangularidade, representa o quão retangular a forma é.

Irregularidade do contorno - define o nível de afinamento do objeto, sua definição é baseada em uma formalização termodinâmica.

Número de quinas – utiliza o conceito de ponto de interesse ou pontos que representem um máximo local para função da imagem considerada.

Perímetro – é a medida do contorno de um objeto bidimensional, ou seja, a soma de todos os lados de uma figura geométrica.

Análise de variância e estimativas dos parâmetros genéticos

Para analisar a existência de variabilidade genética entre os genótipos, os dados obtidos pela fenotipagem digital de grãos e frutos foram submetidos a análise de variância e estimativas de parâmetros genéticos.

Modelo estatístico adotado foi:

$$Y_{ij} = \mu + G_i + B_j + E_{ijk}$$

Onde:

Y_{ij} = observação referente a i-ésimo genótipo na j-ésima repetição;

μ = constante geral;

G_i = efeito da i-ésima família, $i = 1, 2, \dots, g$;

B_j = efeito do j-ésimo bloco, $j = 1, 2, \dots, r$;

E_{ijk} = erro experimental.

A partir do modelo, foi possível elaborar o Quadro de análise de variância, e a partir dessa análise foram obtidas as estimativas dos parâmetros genéticos,

de variância ambiental (σ^2_e), variância fenotípica (σ^2_f), variância genotípica (σ^2_g), herdabilidade (h^2) e o índice de variação genética (CV_g / CV_e), considerando as expressões propostas por Cruz et al. (2014):

Variância genotípica entre médias dos genótipos

$$\hat{\sigma}_g^2 = QMG - QMR/r$$

Onde: QMG é o quadrado médio dos genótipos;

QMR é o quadrado médio do erro;

r é o número de repetições.

Variância fenotípica entre médias dos genótipos $\hat{\sigma}_f^2 = QMG/r$

Variância ambiental entre médias dos genótipos $\hat{\sigma}_e^2 = QMR/r$

Herdabilidade em nível de média dos genótipos $h^2 = \hat{\sigma}_g^2 / \hat{\sigma}_f^2$

Índice de variação $Iv = CV_g / CV_e$

$CV_g = 100 \times$ raiz quadrada da variância genética / pela média da característica

$CV_e = 100 \times$ a raiz quadrada da variância ambiental / pela média da característica

Ward-MLM

A quantificação da divergência genética foi realizada através do método Ward-MLM (*Modified Location Model*) propostos por Franco et al. (1998) e empregada por Viana e Resende (2014). Para isso, primeiramente foi utilizado o índice de Gower (1971), gerando a estimativa do índice de dissimilaridade que varia de 0 a 1.

Com base nos critérios do pseudo-F e pseudo-T² combinado com o perfil da verossimilhança associado com o teste da razão da verossimilhança foi definido o número ideal de grupos. Posteriormente, foi obtido o gráfico logaritmo da função da verossimilhança, maximizada, conforme o método MLM, para diferentes números prováveis de grupos. De acordo com os picos de verossimilhança para os diferentes números de grupos formados pelo gráfico, definiu-se o melhor número de grupos para a análise. Por último, foi realizada a análise MLM completa para o número de grupos definidos, descrevendo os resultados da classificação, com uma tabela da descrição dos grupos formados e a análise canônica para as variáveis quantitativas, sendo utilizado, para estas últimas o arquivo canfile, onde contém as coordenadas canônicas para as observações. As diferenças entre os grupos, e as variáveis canônicas (VC) foram

analisadas graficamente. Todas as análises foram realizadas usando o software estatístico SAS (SAS 2000). Os diagramas foram realizados utilizando o software Sigma Plot, versão 14.0.

Correlação de Pearson

Foi estimado o coeficiente de correlação linear de Pearson das dez variáveis estudadas sendo cinco de grãos e cinco de frutos. Foi utilizado o programa R e o pacote Corrplot para a realização da análise. Os valores limites de r são -1 e +1. Se $r = +1$ a correlação é perfeita positiva. Se $r = -1$ a correlação é perfeita negativa e se $r = 0$ não há correlação entre os pontos, ou a correlação não é linear. A magnitude do coeficiente de correlação pode ser classificada em nula ($r = 0$), fraca ($0 < |r| < 0,30$), média ($0,30 < |r| < 0,60$), forte ($0,60 < |r| < 0,90$), fortíssima ($0,90 < |r| < 1$) e perfeita ($|r| = 1$) (Carvalho et al, 2004).

RESULTADOS E DISCUSSÕES

*Estimativa de parâmetros genéticos em frutos e grãos de *C. canephora**

Foram selecionadas nove características relacionadas à geometria de grãos e frutos de *C. canephora* para a análise de divergência visando selecionar os genótipos que apresentam frutos e grãos maiores.

Houve diferença significativa entre os genótipos para todas as variáveis analisadas pertinentes a grãos (Tabela 2) e frutos (Tabela 3). Verificou-se que a variância genotípica foi superior em relação à variância ambiental em todas as variáveis analisadas, tanto de grãos quanto de frutos, indicando que os genótipos avaliados apresentam alta variabilidade genética. Dessa forma, pode-se deduzir que há possibilidade de selecionar genótipos com grãos de tamanho maiores baseados nas variáveis geométricas analisadas.

Tabela 2: Resumo da análise de variância para as variáveis Área (ÁREA), Circularidade (CIRC.), Diâmetro máximo (D. MÁX.), Diâmetro mínimo (D. MÍN.), Esfericidade (ESF.), Extensão (EXT.), Irregularidade (IRREG.), Número de Quinas (NUM. QUINAS) e Perímetro (PER.), juntamente com a estimativa de parâmetros genéticos da variância fenotípica, variância ambiental, variância genética, herdabilidade e índice de variação em grãos de *C. canephora*

FV	GL	QM								
		ÁREA	CIRC.	D. MÁX.	D. MÍN.	ESF.	EXT.	IRREG.	QUINAS	PER.
BLOCOS	3	0,203	0,0032	0,0002	0,00019	46,926	0,00007	0,00092	899,858	0,088
GEN	42	0,334**	0,0655**	0,0834**	0,0426**	126,24**	0,0575**	0,0039**	14566,632**	1,148**
RES	126	0,114	0,0008	0,00016	0,00013	17,841	0,00001	0,00053	439,630	0,041
TOTAL	171									
CV%		8,048	1,25	1,612	1,994	20,644	0,5190	30,043	11,101	7,543
PARÂMETROS GENÉTICOS										
VF		0,004	0,0163	0,0208	0,0106	31,561	0,0143	0,00098	3641,658	0,2871
VA		0,0003	0,00021	0,00004	0,0003	4,460	0,000004	0,00013	109,907	0,0103
VG		0,0074	0,0163	0,0208	0,0106	27,100	0,0143	0,00085	3531,750	0,2768
h ²		99,56	99,87	99,80	99,68	85,868	99,972	86,344	96,981	96,3894
lv		75,215	13,94	1,128	8,925	1,232	30,105	1,257	2,834	2,5834

*, ** - significativo em 5% e 1% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F.

Tabela 3: Resumo da análise de variância para as variáveis Área (ÁREA), Circularidade (CIRC.), Diâmetro máximo (D. MÁX.), Diâmetro mínimo (D. MÍN.), Esfericidade (ESF.), Extensão (EXT.), Irregularidade (IRREG.) e Perímetro (PER.), juntamente com a estimativa de parâmetros genéticos da variância fenotípica, variância ambiental, variância genética, herdabilidade e índice de variação em frutos de *C. canephora*

FV	GL	QM							
		ÁREA	CIRC.	D. MÁX	D. MÍN	ESF.	EXT.	IRREG.	PER.
BLOCOS	3	0,0203	0,00242	0,0024	0,0040	391,160	0,00016	0,0049	2,7311
GENÓTIPOS	42	0,3348**	0,0810**	0,2619**	0,1624**	4691,685**	0,0558**	0,0028**	29,3073**
RESÍDUO	126	0,0114	0,0016	0,0040	0,0034	1357,386	0,00029	0,0035	5,2493
TOTAL	171								
CV%		8,048	4,914	4,554	5,055	62,755	2,292	28,710	27,950
PARÂMETROS GENÉTICOS									
VF		0,0837	0,0202	0,0654	0,0406	1172,921	0,0139	0,0070	7,3268
VA		0,0028	0,00040	0,0010	0,00086	339,346	0,00007	0,0008	1,3123
VG		0,0808	0,0198	0,0644	0,0397	833,574	0,0138	0,0061	6,0145
h ²		96,5682	97,999	98,4349	97,8839	71,068	99,4655	87,4405	82,0887
lv		2,6523	3,4991	3,9653	3,4006	0,783	6,821	1,3193	1,0704

*, ** - significativo em 5% e 1% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F.

Por conseguinte, os valores para herdabilidade no sentido amplo foram altos e acima de 80% em quase todas as variáveis, com exceção da Esfericidade em frutos. Para a variável extensão tanto em grãos quanto em frutos, nota-se que quase toda a variação observada é de natureza genética resultando em uma herdabilidade de quase 100%, isso indica que essas características foram menos influenciadas pelo ambiente, podendo trazer resultados eficazes na seleção baseada apenas no fenótipo.

Os Índices de Variação alcançaram valores superiores à unidade, exceto para esfericidade em frutos, (0,783), sugerindo maior influência ambiental em relação às outras variáveis. Isso ocorre porque os frutos e consequentemente os grãos apresentam variações em seus tamanhos e formatos devido às condições ambientais durante o processo de formação dos mesmos. Por outro lado, os maiores valores de IV foram encontrados para as variáveis área e extensão em grãos e extensão e diâmetro máximo em frutos, indicando que a seleção para estes caracteres apresenta as condições mais favoráveis em termos de ganhos genéticos imediatos. O índice de variação é um parâmetro bastante importante para o melhoramento, pois permite identificar características com variações predominantemente associadas a fatores genéticos e não ambientais (Nascimento et al., 2014).

Divergência entre genótipos de C. canephora com base em fenotipagem digital

De acordo com os critérios de pseudo-F e pseudo-t², combinados com o perfil da verossimilhança foi determinado em quatro o número ideal de grupos. Esse número foi verificado onde ocorreu maior incremento na função logarítmica, sendo verificado o maior valor absoluto no quarto grupo (Figura 1).

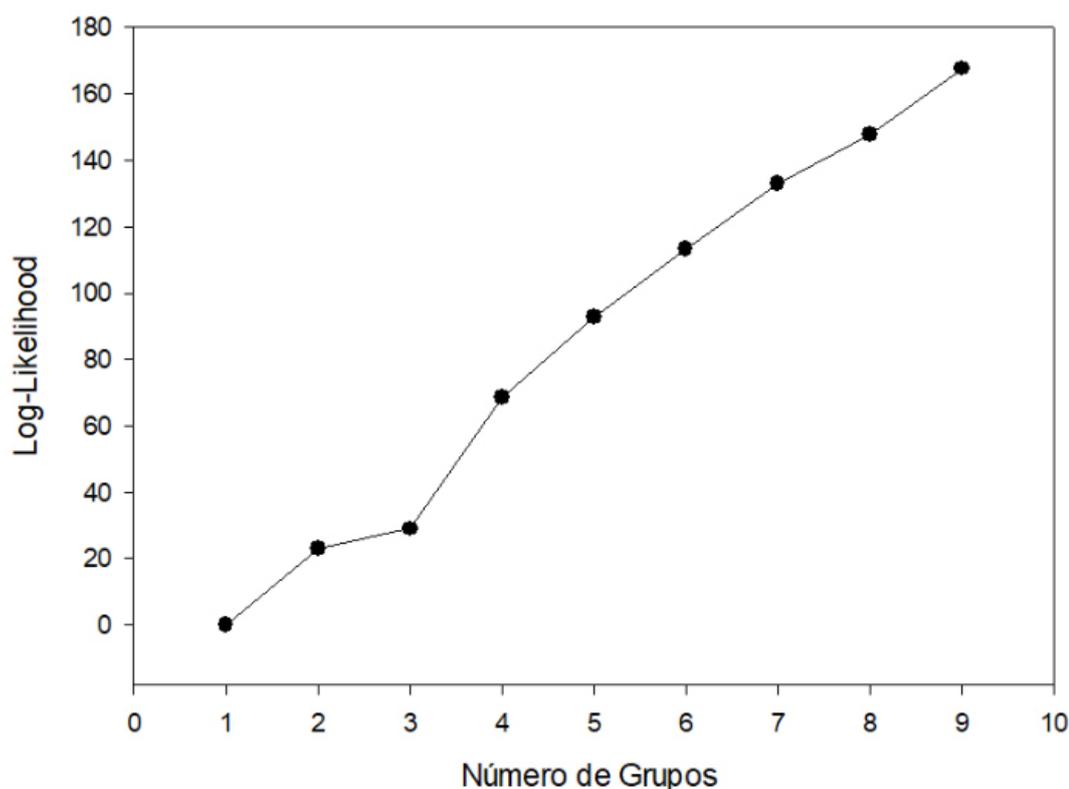


Figura 1 - Gráfico da função logarítmica da probabilidade (Log-likelihood) em relação ao número de grupos formados pela estratégia Ward MLM em grãos e frutos de *Coffea canephora*.

A formação de quatro grupos demonstra que existe variabilidade genética a ser explorada na população e que a utilização das variáveis referentes à geometria, mensuradas por meio da análise digital de sementes foi eficiente na quantificação da divergência genética.

O grupo I foi composto por 17 genótipos, o grupo II apresentou 13, o grupo III conteve 09 genótipos e o grupo IV foi formado por quatro genótipos. As variáveis que mais contribuíram para a divergência genética com base na primeira variável canônica, foram: esfericidade (56%) irregularidade (57%) e afinamento de grãos (50%) (Tabela 4).

O grupo I caracterizou-se por apresentar grãos com as maiores extensões, com maior número de quinas e maior afinamento, além de apresentar frutos com maior esfericidade (Tabela 4). A maioria dos genótipos que pertencem ao grupo I apresentou produtividade e rendimento de médio a alto, com destaque para os genótipos AD1 e L80 que apresentaram produtividade maior que 100 sacas/ha (Tabela 5).

Partelli et al. (2021) avaliaram essa mesma população e encontraram maior porcentagem de sementes por frutos nos genótipos Z36, Ouro Negro 2, P2 e AD1, que apresentaram maior esfericidade de frutos e elevada produtividade nesse estudo.

Silva et al. (2020) estudaram a diversidade de características radiculares nesses mesmos indivíduos e observaram que o genótipo P2 apresentou o maior volume radicular, principalmente concentrado no solo superficial. Isso pode ter contribuído para que esses genótipos tivessem maior capacidade de produzir frutos e grãos com diâmetros maiores.

Tabela 4. Médias das variáveis quantitativas para cada um dos três grupos formados pelo método Ward-MLM e as duas variáveis canônicas, em grãos e frutos de *Coffea canephora*

VARIÁVEIS	GRUPOS				CAN	
	G I	G II	GIII	G IV	CAN I	CAN II
G. ÁREA	0,3512	0,4292	0,4211	0,3175	0,173131	0,69723
G. CIRCULARIDADE	0,7506	0,7731	0,68	0,7925	0,311236	0,297117
G. D. MÁX	0,7718	0,8415	0,89	0,7125	0,29108	0,746936
G. D. MÍN	0,5676	0,6346	0,5933	0,555	0,037303	0,498843
G. ESFERICIDADE	17,8841	20,9515	24,0800	27,7150	0,562638	0,369202
G. EXTENSÃO	0,7906	0,7869	0,7833	0,7825	0,371059	0,418348
G. IRREGULARIDADE	0,0576	0,0838	0,0978	0,12	0,576385	0,439309
G. NUM QUINAS	195,669	191,7046	192,6933	167,1575	0,155414	0,010412
G. PERÍMETRO	24,688	29,185	30,844	28,200	0,250193	0,7832
G. AFINAMENTO	0,7529	0,68	0,6256	0,5875	0,501549	0,472493
F. ÁREA	12,718	14,862	14,478	11,300	0,2077	0,573342
F. CIRCULARIDADE	0,86	0,8531	0,7644	0,885	0,218075	0,489773
F. D. MÁX	13,741	14,908	15,556	12,775	0,262336	0,67339
F. D. MÍN	11,606	12,523	11,722	11,100	0,116307	0,34097
F. ESFERICIDADE	75,9541	70,9931	37,1989	22,2325	0,38711	0,224035
F. EXTENSÃO	0,7724	0,7685	0,7767	0,7825	-0,20564	0,054719
F. IRREGULARIDADE	0,2453	0,2562	0,1556	0,1075	0,419295	0,135833
F. PERÍMETRO	90,976	98,108	68,522	49,400	0,418204	-0,03929

O grupo II apresentou os genótipos com maior área de grãos e frutos, maior diâmetro mínimo de grãos e frutos, maior irregularidade de frutos e maior perímetro (Tabela 1). Os genótipos LB1 e Z21 se destacaram com produtividade de 118,08 e 102,49 sacas/ha, respectivamente.

O grupo III caracterizou-se por apresentar indivíduos com maior diâmetro máximo de frutos e grãos e maior perímetro de grãos. Em relação a produtividade e rendimento, os genótipos que mais se sobressaíram no grupo III foram A1 e Peneirão, com 108,19 e 99,22 sacas/ha cada.

O grupo IV foi constituído pelos genótipos com maior circularidade de grãos e frutos, maior esfericidade e irregularidade de grãos e maior extensão de frutos. Nesse grupo o genótipo Clementino foi o que apresentou maior produtividade, com 97,86 sacas/ha.

Esses resultados são de fundamental importância para selecionar os genótipos mais promissores em relação ao tamanho dos frutos e grãos, com o objetivo de realizar cruzamentos visando à seleção de genótipos de *C. canephora* com grãos maiores aliados à alta produtividade.

Tabela 5. Identificação dos genótipos de cada um dos quatro grupos (GI, GII, GIII e GIV), formados pela estratégia Ward-MLM e rendimento médio em litros de café por saca de 60kg e produtividade dos genótipos de *Coffea canephora*

Grupos	Genótipos	Rendimento Litros/saca	Produtividade Sacac/ha
I	Verdim R	398,32	82,35
	B01	418,21	43,11
	AD1	303,49	128,93
	L80	364,68	105,53
	Bamburral	357,23	86,6
	Z35	402,23	72,48
	Z29	366,61	70,15
	Z37	363,78	86,84
	Z36	316,62	91,45
	18	422,67	49,3
	Tardio C	345,15	74,73
	P2	316,7	92,32
	122	330,03	81,07
	Verdim D	336,65	90,43
	Sementes	218,17	70,32

	Ouro Negro 1	359,87	72,23
	Ouro Negro 2	316,46	74,7
	Beira rio 8	439,72	61,81
	Tardio V	329,95	69,84
	AP	313,53	86,28
	Z39	339,92	95,48
	Z40	356,18	74,55
	Z18	330,2	80,05
II	Z21	294,01	102,49
	Ouro Negro	346,39	75,24
	Cheique	372,10	70,77
	Emcapa 02	323,18	97,1
	P1	332,5	93,47
	LB1	312,21	118,08
	Emcapa 143	312,26	94,65
	Verdim R	398,32	82,35
	700	303,23	89,19
	CH1	359,87	81,40
	Imbigudinho	324,82	79,67
III	Graudão HP	317,59	86,13
	Pirata	379,63	76,22
	Peneirão	326,6	99,22
	A1	365,44	108,19
	Emcapa 153	322,45	85,52
	Alecrim	341,46	54,37
IV	Valcir P	341,11	87,93
	Z38	372,53	74,94
	Clementino	355,48	97,86

Fonte: Partelli et al, 2021.

As duas primeiras variáveis canônicas representaram 82,37% da variância total, o que possibilita explicar de maneira satisfatória a variabilidade existente entre os genótipos de *C. canephora* em um gráfico de dispersão bidimensional (Figura 2). Para que ocorra uma interpretação razoável da variabilidade genética existente entre os genótipos é necessário que as duas primeiras variáveis canônicas apresentem estimativas mínimas de 80% da variação total contida no conjunto de variáveis (Cruz et al, 2012).

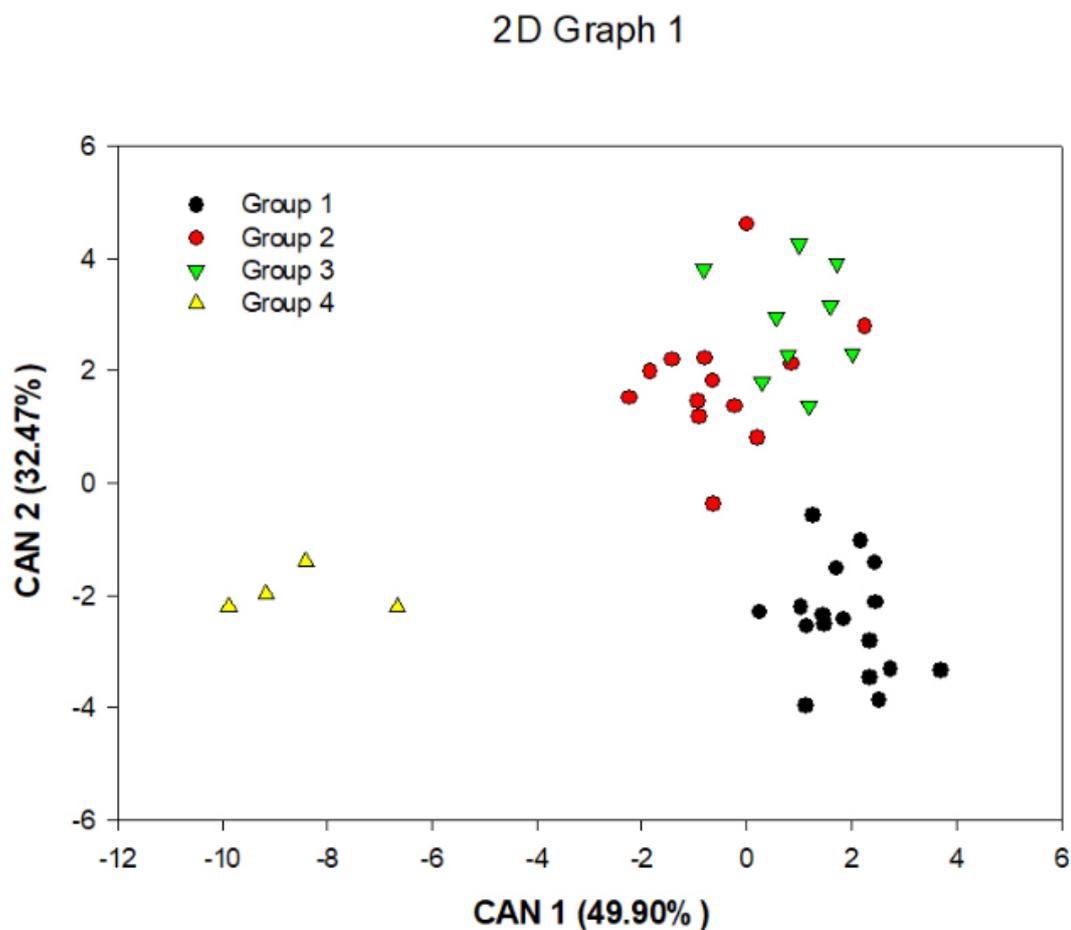


Figura 2. Gráfico das duas primeiras variáveis canônicas para os quatro grupos formados pela análise Ward-MLM em grãos e frutos de *Coffea canephora*.

A maior distância genética, foi observada entre os grupos I e IV, indicando situação favorável para realização de cruzamentos entre os genótipos desses grupos (Tabela 6 e Figura 2). A distância entre os genótipos do grupo IV com os demais grupos reforça a perspectiva de obtenção de genótipos produtivos e com grãos maiores com o cruzamento de indivíduos de grupos divergentes a fim de explorar a heterose.

Tabela 6. Distância entre os grupos formados pelo procedimento Ward-MLM para grãos e frutos de *Coffea canephora*, proposto por Franco et al., (1998)

Grupos	I	II	III	IV
I	0			
II	2.942.499	0		
III	3.538.909	2.587.098	0	
IV	10.988.678	9.027.114	11.471.734	0

O propósito desse trabalho foi selecionar genótipos que apresentam grãos maiores, com as melhores características agronômicas, visando assim agregar valor na comercialização dos grãos e frutos. Dessa forma, a seleção de genótipos superiores em relação a essas características, principalmente em relação ao tamanho dos grãos e frutos, poderá contribuir para o desenvolvimento de uma nova cultivar.

Correlação entre grãos e frutos

A análise de correlação fenotípica revelou correlações significativas positivas e negativas entre as variáveis, (Figura 3), sendo que nesse trabalho as correlações significativas foram observadas na classificação moderada e forte

Dentre os 45 pares de combinações para as dez variáveis geométricas avaliadas, 21 apresentaram correlação genotípica significativa a 1% de probabilidade, sendo que 17 foram positivas. Correlações genotípicas positivas indicam que a seleção objetivando ganho em uma característica provocará o mesmo efeito na outra. Essas informações podem facilitar o processo de seleção de características de difícil determinação e identificação, e que além disso, possa ter baixa herdabilidade.

As correlações positivas moderadas corresponderam a 6,66% do total, sendo estas, diâmetro máximo de grãos x diâmetro mínimo de grãos (0,57), diâmetro mínimo de grãos x diâmetro máximo de frutos (0,50), diâmetro máximo de grãos x diâmetro mínimo de frutos (0,53). Com esses valores fica claro que quanto maior o diâmetro máximo e mínimo dos frutos, maior será o diâmetro dos grãos.

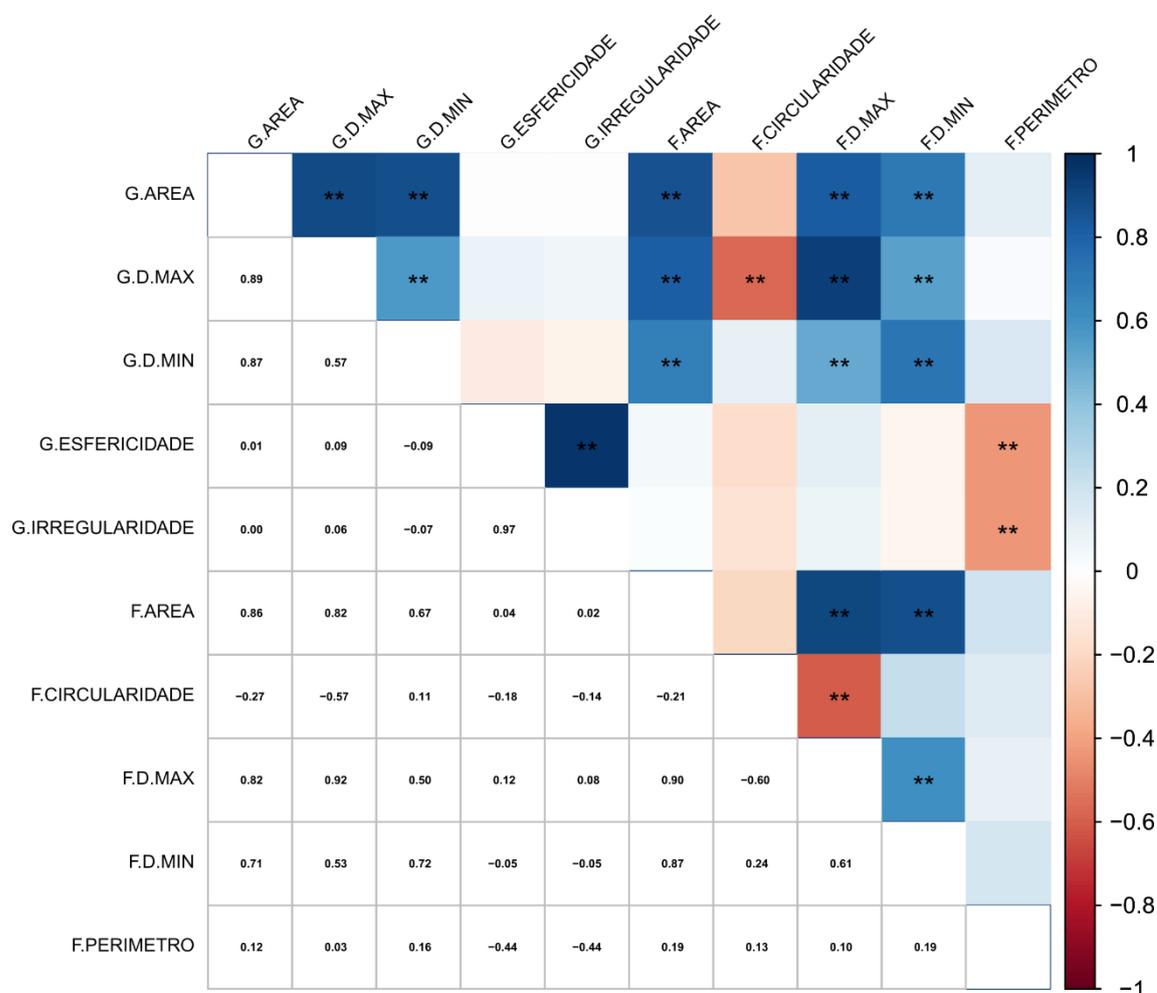


Figura 3: Correlação entre dez características geométricas de fenotipagem digital (G.ÁREA: área de grão; G.D.MAX: diâmetro máximo do grão; G.D.MIN: diâmetro mínimo do grão; G.ESFERICIDADE: esfericidade do grão; G.IRREGULARIDADE: irregularidade do grão; F.ÁREA: área do fruto; F.CIRCULARIDADE: circularidade do fruto; F.D. MAX: diâmetro máximo do fruto; F.D. MIN: diâmetro mínimo do fruto; F.PERÍMETRO: perímetro do fruto) de grãos e frutos de 43 genótipos de *C. canephora*. (* e ** correspondem a significância de $p < 0,05$, $p < 0,01$, respectivamente).

As correlações moderadas negativas foram encontradas nas variáveis esfericidade de grãos x perímetro de frutos (-0,44) e irregularidade de grãos x perímetro de frutos (-0,44). E, as correlações fortes e negativas foram encontradas nas variáveis diâmetro máximo de grãos x circularidade de frutos (-0,57) e circularidade de frutos x diâmetro máximo de frutos (-0,60). A circularidade é um fator mais sensível ao alongamento do objeto e com menor dependência à suavidade do contorno, valendo 1 para objetos circulares e menos que 1 para objetos de outras formas, pois qualquer outra forma que possua o mesmo

diâmetro máximo possui menor área (Silva et al, 2021). Assim, a circularidade do fruto interfere no diâmetro máximo do grão, ou seja, quanto mais circular o fruto, menor será o seu diâmetro máximo. E, o perímetro do fruto interfere na esfericidade e na irregularidade dos grãos, ou seja, quanto maior o perímetro do fruto, menor vai ser sua esfericidade e irregularidade. Com isso, é possível selecionar os genótipos que apresentam destaque nas variáveis circularidade e perímetro.

Correlações fortes e positivas corresponderam a 8,88% do total, as correlações positivas evidenciam que o aumento da área, diâmetro máximo e mínimo, esfericidade e irregularidade influenciam no tamanho do grão e do fruto de *C. canephora*, podendo assim ser feita uma seleção de genótipos que apresentam grãos maiores, pois quanto maior o fruto, maior será o grão. Isso pode ser observado na correlação entre diâmetro máximo de frutos e diâmetro máximo de grãos (0,92), que é considerada uma correlação fortíssima. Em estudos de melhoramento, fortes correlações com características de interesse permitem a seleção indireta usando uma característica mais simples e menos onerosa para fins de avaliação (Reis et al., 2017) e (Nascimento-Júnior et al., 2018). Esses resultados indicam que essas características podem ser usadas a fim de selecionar materiais superiores em programas de melhoramento genético, a fim de se obter genótipos com grãos maiores que sejam mais atrativos para o mercado consumidor, já que o Conilon normalmente apresenta grãos menores e pouco chamativos quando é comercializado na forma de grãos.

Silva et al. (2021) estudando a diversidade genética em sementes de goiaba através de fenotipagem digital também encontraram correlação positiva da variável diâmetro máximo com diâmetro mínimo e perímetro, corroborando com os resultados encontrados nesse trabalho.

As correlações observadas para as variáveis de geometria de grãos e frutos extraídos do equipamento de análise digital contribuirá para a escolha de genótipos que possuem grãos maiores, pois essas correlações, principalmente entre área e diâmetro, que é mais difícil de mensurar de outras formas, pois de acordo com Marcos Filho (2015), a classificação simples como a medida do tamanho dos grãos realizada através de peneiras não é capaz de indicar o potencial produtivo das cultivares, sendo este um critério importante para a

comercialização do café, e essas variáveis puderam ser avaliadas de forma precisa no equipamento, trazendo resultados confiáveis.

Com a utilização do sistema GroundEye® foi possível processar informações em relação ao tamanho dos frutos e grãos de *C. canephora*, que não seriam possíveis analisar a olho nu ou mesmo fazendo uso de paquímetros digitais. As informações extraídas do software do equipamento são de alta precisão, segurança e confiabilidade e não sofrem interferência do pesquisador. Além disso, ficam armazenadas em um banco de dados onde podem ser facilmente acessadas e analisadas.

Recomenda-se que a seleção seja realizada visando aumentar área, diâmetro máximo e mínimo, pois além do efeito positivo direto na produtividade, essas características contribuem de forma indireta para qualidade do grão de *C. canephora*, pois grãos maiores são visualmente mais atrativos e de maior qualidade para o consumidor.

CONCLUSÕES

As variáveis analisadas por meio da análise digital de sementes foram eficientes em detectar a divergência genética entre os 43 genótipos de *C. canephora*.

Os altos valores de herdabilidade observados para todas as variáveis indicam que a seleção é vantajosa para todas elas.

As variáveis que mais contribuíram para a divergência genética de frutos e grãos foram esfericidade, irregularidade e afinamento de grãos.

É possível indicar cruzamento entre os genótipos do Grupo I (AD1 e L80) e grupo IV (Clementino) de acordo com a análise de Ward-MLM, pois os mesmos apresentaram grãos com maiores extensões e esfericidades.

As variáveis área, diâmetro máximo e mínimo são as mais indicadas para realização da seleção para obtenção de genótipos de grãos maiores.

REFERÊNCIAS

- Abreu, L.A.S.; Andrade, D.B.; Marques, E.R.; Assis, J.G.R.; Lopes, C.A.; Carvalho, M.L.M.C.(2016) Computerized analysis in the physiological quality of coffee seeds. *International Journal of Current Research*, 11(8):40820-40823.
- Andrade, D.B, Oliveira, A dos S., Pinto, C.A.G., Pires, R.M.de O., (2016) Detection of green seeds in soybean lots by the seed analysis system (SAS). *International Journal of Current Research*, 26(8):462-465.
- Alvares, C.A., Stape, J.L., Sentelhas, P.C., Gonçalves, J.L.M., Sparovek, G.(2013) Köppen's climate classification map for Brazil. *Meteorologische Zeitschrift*, 22:711:728.
- Bergo, C.L.L., et al. (2020) Estimation of genetic parameters and selection of *Coffea canephora* progenies evaluated in Brazilian Western Amazon. *Coffee Science*, 15:e151663.
- CONAB. *Acompanhamento da Safra Brasileira: Café*. Boletim da Safra 2021 de café, v.8, n. Terceiro levantamento, p.59, 2021. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cafe>.
- Cruz, C.D., Regazzi, A.J., Carneiro, P.C.S. (2014) *Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético*. 3ed, Viçosa: Editora UFV, 2014, 560p.
- Cruz, C.D., Regazzi, A.J., Carneiro, P.C.S. (2012) *Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético*. Viçosa: Ed. UFV, 514p.
- Ferrão, M. A.G., Ferrão, R.G., Fonseca, A.F.A., Verdin Filho, A.C., Volpi, P.S. (2019) *Origin, geographical dispersion, taxonomy and genetic diversity of Coffea canephora*. In: Ferrão, R.G, Fonseca, A.F.A, Ferrão, M.A.G. and DeMuner LH (eds) *Conilon coffee*. Incaper, Vitória, p. 85-110.
- Ferreira, A.F.N., Krause, W., Faleiro, A.C., Miranda, A.F., Acha, A.J. (2018) Seleção de descritores de sementes de maracujazeiro azedoutilizando fenotipagem digital. *Conhecer*, 5(10):181-187.
- Franco, J., Crossa J., Villasenõr, J., Taba, S. (1998) Classifying genetic resources by categorical and continuous variables. *Crop Science*, Madison, 38(6):1688-1696.
- Gower J, (1971) "A general coefficient of similarity and some of its properties", *Biometrics*, 27:857-872.

- Krause, W., Viana, A.P., Cavalcante, N.R., Ambrósio, M., Santos, E.A., Vieira, H.D. (2017) Digital phenotyping for quantification of genetic diversity in inbred guava (*Psidium guajava*) families. *Genetic and Molecular Research*, 16:1-11.
- Marcos Filho, J. (2015) *Fisiologia de sementes de plantas cultivadas*. (FEALQ. Biblioteca de Ciências Agrárias Luiz de Queiroz), Piracicaba, 2.ed., 495p
- Moraes, M.S., Teixeira, A.L., Ramalho, A.R., Espíndula, M.C., Ferrão, M.A.G., Rocha, R.B. (2018) Characterization of gametophytic selfincompatibility of superior clones of *Coffea canephora*. *Genetics and Molecular Research*, 17:1-10.
- Nascimento-Júnior, I., Môro, G.V., Môro, F.V. (2018) Indirect selection of maize genotypes based on associations between root agronomic and anatomical characters. *Chil Journal of Agriculture Research*, 78:39-47.
- Partelli, F.L., Oliosi, G., Dalazen, J.R., da Silva, C.A., Vieira, H.D., Espindula, M.C. (2021). Proportion of ripe fruit weight and volume to green coffee: Differences in 43 genotypes of *Coffea canephora*. *Agronomy Journal*, 113(2):1050–1057.
- Partelli, F.L., Oliosi, G., Farah, A., Paula, J., Oliveira, H. F., Salvador, H. P. (2022) Salutar: First cultivar bred for soluble coffee production and health. v.4:2. DOI: <http://dx.doi.org/10.35418/2526-4117/v4n2a7>
- Ramalho A.R, Rocha R.B., Souza F.F., Veneziano W. et al. (2016). Genetic gain in the productivity of processed coffee from the selection of clones of 'Conilon' coffee. *Revista Ciencia Agronomica* 47(3):516-523.
- Reis, M., Cardoso, D., Júnior, E.S., Gomes, B., Pereira, L., Gomes, D., Sousa, L. (2017) Research Article Correlation among traits as criterion of cotton genotypes indirect selection. *Genetic Molecular Research*, 16(4) gmr16039805
- SAS Institute (2009). *Statistical Analysis System: User's Guide*. SAS, Cary, 5140p.
- Silva, C.C.A., Vieira, H.D, Viana, A.P, Azevedo, S.E., Quintas, M.M. (2021) Digital Phenotyping in Inbred Guava Lines: Seed Characterization. *Functional Plant Breeding Journal*, 3(2):33-50.
- Silva, F.H.L., Viana, A.P., Ferreira R.T., Freitas, J.C.O., Santos, J.O., Rodrigues, D.L. (2014) Measurement of genetic diversity in progenies of sour passion fruit by Ward-MLM methodology: a strategy for heterotic group formation. *Ciência e Agrotecnologia*, 38:240-246.
- Venora, G., Grillo, O., Shahin, M.A., Symons, S.J. (2007) Identification of Sicilian landraces and Canadian cultivars of lentil using an image analysis system. *Food Research International*, 40:161-166.
- Silva, G.O., Carvalho, J.O.M., Vieira, J.V., Carvalho, A.D.F. (2014) Parâmetros genéticos para germinação de sementes e produção de raízes de cenoura sob altas temperaturas. *Magistra*, 26:524-531.

3.3 MAGNUS GRANO: QUALIDADE MÁXIMA EM TAMANHO DE GRÃOS

RESUMO

A cultivar Magnus Grano é composta por cinco genótipos que foram selecionados por cafeicultores no Estado do Espírito Santo, Brasil. A cultivar apresenta altas produtividades, os grãos apresentam tamanhos maiores e os genótipos mostram boa adaptação às condições de cultivos.

ABSTRACT

The cultivar Magnus Grano is composed of five genotypes that were selected by coffee growers in the State of Espírito Santo, Brazil. The cultivar has high yields, the grains are larger and the genotypes show good adaptation to growing conditions.

INTRODUÇÃO

O *Coffea canephora* apresenta grande diversidade genética, o que permite novas oportunidades para o cultivo e uso dessa espécie. Além disso, a cafeicultura tem passado por constantes inovações, com foco no manejo, produtividade, sustentabilidade, qualidade e também no consumo, o que demanda novas tecnologias.

Diariamente, milhares de pessoas espalhadas pelo mundo inteiro consomem café, e essa bebida carrega consigo diferentes nuances e características, e devido a isso o mercado está sempre à procura de novas maneiras de ofertá-lo, seja ele por blends, café expresso ou gourmet, sendo que ele pode ser ofertado de forma moída ou em grãos.

O Brasil apresenta destaque no cenário mundial como o maior produtor mundial de café (CONAB, 2022), e o café Conilon vem ganhando cada vez mais espaço no mercado mundial, pois com a forte valorização do café arábica em 2021 houve uma demanda ainda maior do café Conilon (CONAB, 2023). Uma particularidade que pode ser observada é a demanda crescente por cafés Conilon de qualidade, um mercado até então pouco explorado. Com o melhoramento genético, melhoria nas técnicas de colheita e beneficiamento, o mesmo passou a ser apreciado e o mercado tem buscado esse café (COOPEAVI, 2022).

O café Conilon ainda possui um grande espaço a ocupar, pois o mesmo pode apresentar uma bebida diferenciada, com características sensoriais próprias ao invés de atuar apenas na produção de blends (Vignoli; Bassoli; Benassi, 2011). E, para que seja ofertado um produto com maior qualidade é necessário observar o conjunto de processos que vão desde o desenvolvimento e melhoramento das variedades, manejo e os cuidados com a colheita e pós-colheita.

O mercado de cafés especiais tem crescido ao redor do mundo e um dos critérios usados para classificar um café verde como especial é a análise de acordo com a uniformidade do grão, que é feita através da utilização de diferentes peneiras, cor, forma e tipos de grãos. A classificação por peneiras é um processo importante para garantir a qualidade do café, e um dos principais motivos para essa separação é a diferença na uniformidade no momento da torração do café,

pois os grãos menores tendem a torrar em tempos diferentes dos grãos maiores (Oliveira et al. 2014), e, com isso, a separação por peneiras melhora a execução da torra, melhorando a qualidade do café (Baggenstoss et al., 2008; Pereira et al., 2019).

Diversos procedimentos têm sido implementados com a finalidade de incentivar o consumo de café entre diferentes camadas sociais, para Spers et al (2004) o estímulo que tem surgido na melhoria da qualidade do produto tem colaborado para novas formas de consumo. Segundo Lucia et al. (2007), o consumidor fundamenta sua escolha para comprar e consumir determinado produto em diferentes critérios e níveis de importância. Dentre esses fatores, o tamanho do grão do café está diretamente ligado à qualidade física buscada pelos consumidores que têm preferência por comprar o grão e moer ao invés de comprar o café moído. Pretendendo atender a estes consumidores, os produtores brasileiros começaram a se preocupar em produzir cafés com qualidade superior, incluindo o tamanho dos grãos.

A oferta do café em grãos é a forma mais original do café, ou seja, os grãos só passaram pelo processo de torrefação até chegar ao consumidor. Como o café é um produto muito sensível ao oxigênio, o mesmo oxida muito rápido, principalmente quando já está moído, e por isso, quando ele está na forma de grãos ele preserva o sabor e aroma original, além de ter uma vida útil maior em relação ao café já moído.

Assim, trabalhos sobre diferentes genótipos, realizados por meio de ensaios de competição no campo, somados a diversas análises da planta e análises laboratoriais de grãos e que possibilitem a obtenção de cultivares que apresentem grãos maiores para oferecer um produto final de maior qualidade são de fundamental importância para dar continuidade ao trabalho que já vem sendo desenvolvido de forma prática por cafeicultores. Este processo de seleção tem apresentado resultados muito promissores.

MÉTODOS

O plantio da lavoura de café foi composto por 42 genótipos propagados por estaca, iniciado o cultivo em abril de 2014 no município de Nova Venécia, Espírito Santo, a aproximadamente 200 metros de altitude. A área experimental está localizada na Latitude: 18° 39' 43" S, Longitude: 40° 25' 52"W (Figura 1). A região é caracterizada por um clima classificado como Aw, ou seja, tropical com inverno seco e verão chuvoso. Em geral, a temperatura média das mínimas fica acima de 16°C (meses de julho e/ou agosto) e média das máximas de até 32°C nos meses de janeiro e/ou fevereiro (Figura 1). Eventualmente ocorrem dias com temperatura inferior a 13°C ou superior a 36°C.

Foi utilizado delineamento em blocos casualizados, com três repetições de campo, sendo cada repetição composta por sete plantas. Foram realizadas adubações conforme a análise de solo. O espaçamento utilizado para plantio foi de 3,0m x 1m, ocupando 3,0 m² por planta. Foram realizadas podas para controle de ramos excessivos, mantendo o padrão de 12.000 a 15.000 hastes por hectare. Em todos os anos experimentais foram realizadas, uma capina manual (trilhar no local de adubação), uma capina mecanizada e uma capina química. Foram aplicados nutrientes, inseticidas e fungicidas, durante os anos de estudo.

A área experimental foi irrigada durante todos os anos. Para analisar a estabilidade e adaptabilidade dos materiais genéticos avaliados neste estudo foram utilizados dados de produtividade correspondentes a seis colheitas (2016, 2017, 2018, 2019, 2020 e 2021).

Para realizar a caracterização dos grãos por meio da fenotipagem digital os frutos foram despoldados manualmente, em seguida os grãos ainda com o pergaminho foram colocados para secar em bandejas de plástico até atingirem 14 a 15% de umidade, determinada com o auxílio do determinador de umidade DOLE 500. Posteriormente foi feita a retirada do pergaminho de cada um dos grãos com auxílio de bisturi e estilete, e em seguida os mesmos foram acondicionados em sacos de papel devidamente identificados para secagem em estufa de circulação forçada de ar até atingirem 12% de umidade (base úmida).

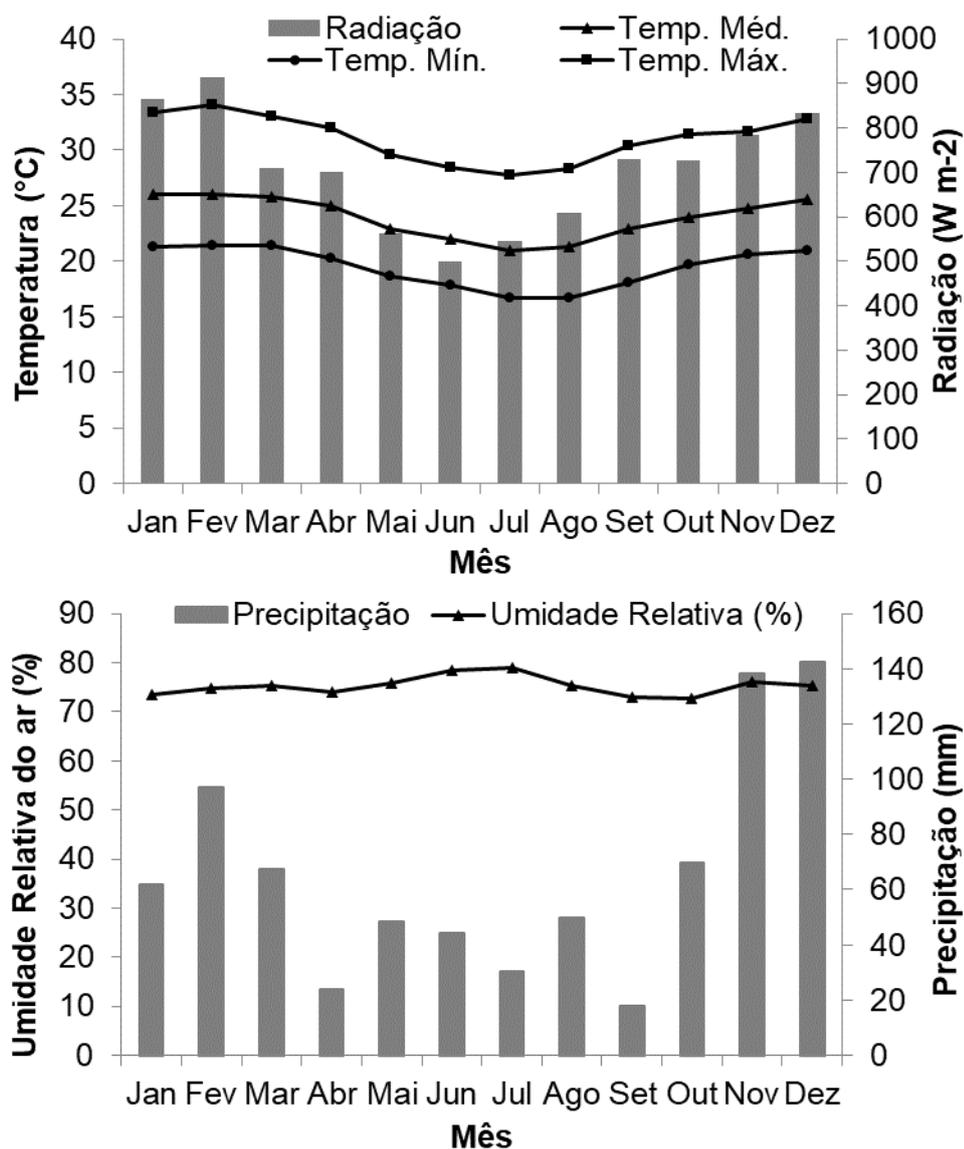


Figura 1. Valores médios de radiação solar e temperatura máxima, média e mínima do ar (A) e umidade relativa do ar e precipitação (B) em seis safras (2014 – 2020), registradas na estação meteorológica de Nova Venécia-ES.

Com o auxílio do equipamento GroundEye®, foram avaliadas quatro repetições de 50 grãos para cada tratamento, os grãos foram dispostos em bandeja acrílica para a captura da imagem, em seguida, por meio do sistema de análise de imagens o software gerou planilhas com os resultados das características geométricas: área (cm²), circularidade, diâmetro máximo, diâmetro mínimo, esfericidade, extensão, irregularidade, número de quinas, perímetro (cm), dentre outras características apresentadas nas tabelas 1 a 3.

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

Dentre todos os materiais avaliados no ensaio, considerando características como média do peso do grão, média da área do grão, média do maior diâmetro do grão, alta produtividade, arquitetura da planta, vigor e resistência a pragas e doenças, foram selecionados cinco genótipos julgados superiores (Bicudo, Graudão HP, Ouro Negro, P1 e Peneirão), para constituir a nova cultivar clonal, denominada de MAGNUS GRANO. A média do peso do grão foi de 0,19 g, enquanto a média dos demais genótipos foi de 0,13 g. A média da área do grão foi de 0,49 cm², enquanto a média dos demais foi de 0,37 cm². A média do maior diâmetro do grão foi de 0,93 cm, enquanto a média dos demais foi de 0,80 cm. A média das seis colheitas dos seis genótipos selecionados foi de 98,4 sacas por hectare por ano. Os demais genótipos apresentaram uma média de 85,9 sacas por hectare por ano. Os dados sobre os genótipos de forma individualizada e médias da Cultivar e do restante dos genótipos avaliados encontram-se nas Tabelas 1 a 3.

Durante os oito anos de avaliação foi verificada a boa adaptação dos genótipos às condições de cultivo, visto seu bom desempenho em crescimento e produção. Não foi verificado ataque severo das principais pragas e doenças que acometem o cafeeiro Conilon, sendo que as plantas se mantiveram vigorosas e com bom enfolhamento. Registra-se que em 2015 a área recebeu pouca água (irrigação), pois houve uma das maiores secas da história da região e o agricultor tinha pouca disponibilidade de água para irrigação, o que afetou, principalmente, a produtividade de 2017 (segunda colheita).

Dessa forma, a nova cultivar (variedade), apresenta características desejáveis, sobretudo, peso elevado e tamanho do grão (maior tamanho de peneira – que tem valor agregado na qualidade), somados a alta produtividade para as condições do norte do Estado do Espírito Santo, o que permitirá grande aceitação entre os cafeicultores, podendo ser cultivado em condições climáticas similares às que foram cultivadas (aproximadamente 200 metros de altitude).

Portanto, recomendada para o Estado do Espírito Santo em altitude inferior a 500 metros. Destaca-se também que foram realizadas diversas caracterizações de frutos e grãos.

Tabela 1. Média do peso do grão, média da área total do grão, média do maior diâmetro dos grãos chatos a 12% de umidade, produtividade média acumulada nas safras de 2016 a 2021 e período de maturação dos genótipos que compõem a cultivar

Genótipos	Peso do grão	Área do grão	Diâmetro máximo	Produtividade	Maturação
	gramas	cm ²	cm	sc ha ⁻¹	
Bicudo	0,170	0,487	0,971	111,84	Média
Graudão HP	0,166	0,451	0,948	88,19	Média
Ouro Negro	0,210	0,516	0,891	87,57	Média
P1	0,177	0,479	0,915	98,41	Média
Peneirão	0,204	0,497	0,907	105,79	Média
Média/Cultivar	0,1854	0,4860	0,9263	98,36	-
Média/demais	0,1338	0,3746	0,7992	85,95	-

Tabela 2. Média do diâmetro mínimo, esfericidade, extensão, irregularidade, número de quinas, perímetro, afinamento e circularidade de grãos chatos a 12% de umidade dos genótipos que compõem a cultivar

Genótipos	D.min	Esf.	Ext.	Irreg.	Quin.	Per.	Afin.	Circ.
	cm	-	-	-	Núm.	cm	-	-
Bicudo	0,63	22,0	0,78	0,09	316	3,20	0,65	0,66
Graudão HP	0,59	30,4	0,79	0,12	125	3,49	0,56	0,64
Ouro Negro	0,72	21,5	0,79	0,09	298	3,24	0,68	0,83
P1	0,66	16,9	0,79	0,05	115	2,83	0,76	0,73
Peneirão	0,69	26,9	0,78	0,12	260	3,53	0,58	0,77
Média/Cultivar	0,657	23,55	0,784	0,093	222,7	3,260	0,645	0,725
Média/demais	0,583	20,83	0,787	0,079	187,7	2,713	0,691	0,747

Tabela 3. Média da quantidade de kg (Kg/saca) e litros (L/Saca) de café maduro para se obter uma saca beneficiada de 60kg, relação peso maduro/peso seco (PM/PS), relação volume maduro/peso maduro (VM/PM), % de grão em relação ao fruto e porcentagens de grão chato e moca a 12% de umidade dos genótipos que compõem a cultivar

Genótipos	*Kg/saca	*L/Saca	*PM/PS	*VM/PM	*Grão	G.Chato	G.Moca
	kg	Litros	Relação	Relação	%	%	%
Bicudo	231	366	3,85	1,58	55,3	58,5	41,6
Graudão HP	206	318	3,44	1,54	59,5	88,5	11,5
Ouro Negro	225	346	3,74	1,54	55,3	90,3	9,7
P1	220	332	3,66	1,51	59,1	62,6	37,4
Peneirão	215	327	3,59	1,52	57,1	85,7	14,3
Média/Cultivar	219,4	337,9	3,656	1,538	57,27	77,11	22,89
Média/demais	223,9	348,9	3,732	1,779	57,35	84,26	16,81

* Dados completos publicados por Partelli et al. (2021). Agronomy Journal, 2021. DOI: 10.1002/agj2.20617.



Figura 1. Vista/localização da lavoura. Imagem de setembro de 2019 (A) e julho de 2021 (B). Retângulo abaixo da seta. Latitude: 18° 39' 4" S, Longitude: 40° 25' 52" W.

CLONE DE MANUTENÇÃO E DISTRIBUIÇÃO

A Cultivar Magnus Grano foi registrada com o número 52460 pelo Registro Nacional de Cultivares (Registro Nacional de Cultivares, RNC), pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). A Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) é responsável pela manutenção dos cinco genótipos que constituem a cultivar Magnus Grano.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem aos primeiros criadores, ou seja, os cafeicultores, que iniciaram a seleção da maioria dos genótipos superiores disponíveis atualmente. Agradecemos também a Universidade Estadual Norte Fluminense (UENF) e a Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) pelo apoio a este estudo; a Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Desenvolvimento Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

- Baggenstoss, J., Poisson, L., Kaegi, R., Perren, R., Escher, F. (2008) Coffee roasting and aroma formation: Application of different time-temperature conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(14):5836–5846.
- Companhia Nacional do Abastecimento. *Acompanhamento da Safra Brasileira*. Boletim da Safra 2021, v. 9, n. Terceiro levantamento, p. 60, 2022. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/>.
- Conab. Acompanhamento da Safra Brasileira: Café. *Boletim da Safra 2021 de café*, v. 8, n. Terceiro levantamento, p. 59, 2021. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cafe>.
- Coopeavi. 2013. Disponível em: http://coopeavi.coop.br/?noticias/0/1584/Cresce_a_demanda_por_cafe_Conilon_especial. Acesso em: 9 ago. 2022.
- Lucia, S.M.D., Minim, V.P.R., Silva, C.H.O., Minim, L.A. (2007) Fatores da embalagem de café orgânico torrado e moído na intenção de compra do consumidor. *Ciência Tecnologia de Alimentos*. Campinas, 27(3):485-491.
- Oliveira, G.H.H., Corrêa, P.C., Santo, F.L., Vasconcelos, W.L., Calil Júnior, C., Machado, F.B., Vargas, G.A.E. (2014) Caracterização física de café após torrefação e moagem. *Semina: Ciências Agrárias*, 35(4):1813-1827.

- Partelli, F.L., Oliosi, G., Dalazen, J.R., da Silva, C.A., Vieira, H.D., Espindula, M.C. (2021). Proportion of ripe fruit weight and volume to green coffee: Differences in 43 genotypes of *Coffea Canephora*. *Agronomy Journal*, 113(2):1050–1057.
- Pereira, L.L., Moreli, A.P., Júnior, D.B., Sousa, L.H.B.P.S., Marcate, J.P.P., Oliveira, G.F. de O., Debona, D.G., Guarçoni, R.C. (2019) Construção de perfil sensorial para o café Conilon fermentado. *Ciência*, 5(2):242–252.
- Vignoli, J.A., Bassoli, D.G., Benassi, M.T. (2011) Antioxidant activity, polyphenols, caffeine and melanoidins in soluble coffee: The influence of processing conditions and raw material. *Food Chemistry*, 124(3):863-868.
- Spers, E.E., Saes, M.S.M., Souza, M.C.M. (2004) Análise das preferências do consumidor brasileiro de café: Um estudo exploratório dos mercados de São Paulo e Belo Horizonte. *Revista de Administração*, São Paulo, 39(1):53-61

RESUMO E CONCLUSÕES

É indiscutível a importância do café na economia mundial, pois ele é um dos produtos primários mais valiosos comercializados no mundo. É cultivado em mais de 80 países, e o Brasil se destaca como o maior produtor mundial de café, onde são cultivados tanto o Arábica (*Coffea arabica*) quanto o Conilon/Robusta (*Coffea canephora*). A espécie *C. canephora* é bastante utilizada na indústria de café solúvel devido ao maior teor de sólidos solúveis. O *C. canephora* é uma planta alógama, que apresenta autoincompatibilidade e alta variabilidade genética, e em programas de melhoramento a presença da variabilidade genética é necessária para se obter ganhos genéticos com a seleção, pois os estudos de diversidade genética são importantes para identificar a variabilidade genética existente, proporcionando parâmetros para identificar genótipos promissores. No primeiro experimento foi feita a caracterização molecular de *C. canephora* por meio de marcadores microssatélites e os resultados confirmaram a existência de diversidade genética, variabilidade genética e potencial de seleção em futuros programas de melhoramento envolvendo os 45 genótipos estudados. No segundo experimento foi feita a fenotipagem digital de grãos e frutos de 43 genótipos de *C. canephora* com o auxílio do equipamento *GroundEye*[®], e com isso verificou-se que as variáveis analisadas por meio da análise digital de sementes foram eficientes em detectar a divergência genética entre os 43 clones de *C. canephora* e, as variáveis área, diâmetro máximo e mínimo são as mais indicadas para realização da seleção para obtenção de genótipos de grãos maiores. No terceiro

experimento foi feito o lançamento da Cultivar Magnus Grano, que apresenta características desejáveis, sobretudo, peso elevado e tamanho de grãos maiores, que tem valor agregado na qualidade, somados a alta produtividade para as condições do norte do Estado do Espírito Santo.

Com base nos resultados acima, conclui-se que:

- Os marcadores SSR utilizados neste estudo discriminaram os genótipos de *C. canephora* com eficiência e foram úteis para avançar no melhoramento do café Conilon;
- A variabilidade genética foi confirmada na população avaliada, que foi estruturada em seis grupos distintos por agrupamento UPGMA e em três grupos pela análise bayesiana;
- Cruzamentos entre os indivíduos Bamburral e Z21 (Grupo I), A1 (Grupo II), L80 (Grupo III) e AT (Grupo IV) são recomendados para manter a variabilidade genética da população e alta produtividade;
- Não há parentesco entre os genótipos indicados;
- As variáveis analisadas por meio da análise digital de sementes foram eficientes em detectar a divergência genética entre os 43 clones de *C. canephora*;
- Os altos valores de herdabilidade observados para todas as variáveis indicam que a seleção é vantajosa para todas elas;
- As variáveis que mais contribuíram para a divergência genética foram esfericidade, irregularidade e afinamento de grãos;
- É possível indicar cruzamento entre os genótipos do Grupo I (AD1 e L80) e IV (Clementino) de acordo com a análise de Ward-MLM, pois os mesmos apresentaram grãos com maiores extensões e esfericidades;
- As variáveis área, diâmetro máximo e mínimo são as mais indicadas para realização da seleção para obtenção de genótipos de grãos maiores;
- A cultivar Magnus Grano apresenta características desejáveis, sobretudo peso elevado e tamanho de grão maior que tem valor agregado na qualidade e alta produtividade para as condições do norte do estado do Espírito Santo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abreu, L.A.S., Andrade, D.B., Marques, E.R., Assis, J.G.R., Lopes, C.A., Carvalho, M.L.M.C. (2016) Computerized analysis in the physiological quality of coffee seeds. *International Journal of Current Research*. 8(11):40820-40823.
- Alves, A.L., Leitão, A.E.B., Souza, P.E.N.de., Santos, M.de F.P.dos., Moscon, P.S., Pessoa, M.S., Pinheiro, C.A., Morais, P.C., Partelli, F.L. (2021) Antioxidant Activity and Stable Free Radicals in Robusta Green Coffee Genotypes/ Atividade antioxidante e Radicais Estáveis Livres em Genótipos de Café Verde Robusta. *The Brazilian Journal of Development* 7:37312–37330.
- Alekcevetch, J.C. (2013) *Estudo da diversidade genética, por meio de marcadores moleculares de uma população de Coffea canephora var. Conilon*. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 92 p.
- Anagbogu, C.F., Bhattacharjee, R., Ilori, C., Tongyoo, P., Dada, K.E., Muyiwa, A.A., Gepts, P., Beckles, D.M. (2019) Genetic diversity and re-classification of coffee (*Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner) from South Western Nigeria through genotyping-by-sequencing-single nucleotide polymorphism analysis. *Genetic Resources and Crop Evolution* 66:685–696.
- 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*. 37:6.
- Alvares, C.A., Stape, J.L., Sentelhas, P.C., Gonçalves, J.L.M., Sparovek, G. (2013) Köppen's climate classification map for Brazil. *Meteorologische Zeitschrift*, 22:711-728.
- Andrade, D.B., Oliveira, A.S., Pinto, C.A.G., Pires, R.M.O. (2016) Detection of green seeds in soybean lots by the seed analysis system (SAS). *International Journal of Current Research*. 8(26):462-26,465.

- Asquini, E., Gerdol, M., Gasperini, D., Igic, B., Graziosi, G., Pallavicini, A. (2011) S-RNase-like Sequences in Styles of *Coffea* (*Rubiaceae*). Evidence for S-RNase Based Gametophytic Self-Incompatibility. *Tropical Plant Biology* 4:237–249.
- Babova, O., Occhipinti, A., Maffei, M.E. (2016) Chemical partitioning and antioxidant capacity of green coffee (*Coffea arabica* and *Coffea canephora*) of different geographical origin. *Phytochemistry*, 123:33-39.
- Baggenstoss, J., Poisson, L., Kaegi, R., Perren, R., Escher, F. (2008) Coffee roasting and aroma formation: Application of different time-temperature conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(14):5836-5846.
- Baltazar, M.D., Fabella, J.M.A. O. (2020) Assessment of the genetic diversity of Philippine Arabica coffee (*Coffea Arabica* L.) using SSR markers. *Philippine Journal of Science*, 149:993-1003.
- Belan, L.L., Silva, K.G., Tomaz, M.A., Jesus Junior, W.C.de., Amaral, J.A.T., Amaral, J.F.T. (2011) Aspectos Fisiológicos Do Cafeeiro Conilon: Uma Abordagem Sistemática. *Nucleus*, 8: 225-240.
- Bergo, C.L.L., et al. (2020) Estimation of genetic parameters and selection of *Coffea canephora* progenies evaluated in Brazilian Western Amazon. *Coffee Science*, e151663.
- Berthaud, J. (1980) Incompatibility in *Coffea Canephora*: test method and genetic determinism. *Cafe Cacao*, 24(4):267-274.
- Berthaud, J. (1986) *Les ressources génétiques pour l'amélioration des caféiers africains diploïdes. Evaluation de la richesse génétique des populations sylvestres et de ses mécanismes organisateurs. Conséquences pour l'application.* Paris, 379p.
- Botstein, D., White, R.L., Skolnick, M., Davis, R.W. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*, 32(3):314-331.
- Bragança, S.M., Carvalho, C.H.S., Fonseca, A.F.A., Ferrão, R.G. (2001). Variedades clonais de café Conilon para o estado do Espírito Santo. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 36:765-770.
- Brige, F.A.A., Celestino, S.M.C., Amabile, R.F., Fagioli, M., Delvico, F.M.dos S., Montalvão, A.P.L., Sala, P.I.A.L. (2019) Genetic variability in Conilon coffee related to grain attributes in an irrigated crop in the Cerrado. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 54:e00358
- Brighenti, C.R.G., Cirillo, M.A. (2018). Analysis of defects in coffee beans compared to biplots for simultaneous tables. *Revista Ciência Agronômica*, 49(1):62-69.

- Caballero, A., Rodríguez-Ramilo, S.T., Ávila, V., Fernández, J. (2010) Management of genetic diversity of subdivided populations in conservation programmes. *Conservation Genetics* 11:409-419.
- Caixeta, E.T., Borém, A. (2016) *Tipos de marcadores moleculares. Marcadores Moleculares*. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, p. 9–93.
- Carmona, P.A.O., Peixoto, J.R., Amaro, G.B., Mendonça, M.A. (2015) Divergência genética entre acessos de batata-doce utilizando descritores morfoagronômicos das raízes. *Horticultura Brasileira*, 33(2):241-250.
- Carvalho, A., Monaco L.C. (1965) Natural cross polination in *Coffea arábica*. In: International Horticultural Congress, 26. *International Horticultural Congress Society*, 20:787-804.
- Castric, V., Vekemans, X. (2004) Plant self-incompatibility in natural populations: A critical assessment of recent theoretical and empirical advances. *Molecular Ecology* 13:2873-2889.
- Cecafe - *Conselho dos Exportadores de Café do Brasil*. Disponível em: <www.cecafe.com.br> Acesso em 20 de agosto de 2019
- Cecon, P.R., Silva, F.F., Ferreira, A., Ferrão, R.G., Carneiro, A.P.S., Detmann, E., Faria, P.N., Morais, T.S.D.S. (2008) Análise de medidas repetidas na avaliação de clones de café “Conilon.” *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 43:1171-1176.
- Clemente, A.A., Maciel, G.M., Siquieroli, A.C.S., Gallis, R.B.A., Pereira, L.M., Duarte, J.G. (2021) High-throughput phenotyping to detect anthocyanins, chlorophylls, and carotenoids in red lettuce germplasm. *International Journal of Applied Earth Observation and Geoinformation* 103:102533.
- Collard, B.C.Y., Mackill, D.J. (2008) Marker-assisted selection: An approach for precision plant breeding in the twenty-first century. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 363:557-572.
- COOPEAVI - Cooperativa Agropecuária Centro Serrana 2013. Disponível em:http://coopeavi.coop.br/?noticias/0/1584/Cresce_a_demanda_por_cafe_Conilon_especial. Acesso: 9 ago. 2022.
- CONAB. *Acompanhamento da Safra Brasileira: Café*. Boletim da Safra 2021 de café, v. 8, n. Terceiro levantamento, p. 59, 2021. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cafe>.
- Companhia Nacional De Abastecimento - CONAB. *Acompanhamento da safra brasileira de café – Safra 2021*. 2021. Brasília. Available in: Access in: Mar, 24, 2022.
- Conagin, C.H.T.M., Mendes, A.J.T. (1961) Pesquisas citológicas e genéticas em três espécies de *Coffea*. Auto-incompatibilidade em *Coffea canephora* Pierre ex Froehner. *Bragantia*, 20(34):787-804.

- Coste, R. (1992) *Coffea: the plant and the product*. London: Macmillan, 328 p.
- Cruz, C. D. (2013) Genes: A Software Package for Analysis in Experimental Statistics and Quantitative Genetics. *Acta Scientiarum*, 35(3):271-276.
- Cruz, C.D., Carneiro, P.C.S., Regazzi, A.J. (2014) *Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético*. 3. ed. rev. ampl. Viçosa: UFV, 2014. 668p.
- Cruz, C.D., Ferreira, F.M., Pessoni, L.A. (2011) *Biometria Aplicada ao Estudo da Diversidade Genética*. 1 Ed. Viçosa. Produção Independente.
- Cruz, C.D., Regazzi, A.J., Carneiro, P.C.S. (2012) *Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético*. Viçosa: Ed. da UFV, 514p.
- Cruz C.D., Regazzi A.J., Carneiro P.C.S. (2014) *Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético*. 3ed, Viçosa: Editora UFV, Viçosa, 560p.
- Davis, A.P., Govaerts, R., Bridson, D.M., Stoffelen, P. (2006) An annotated taxonomic conspectus of the genus *Coffea* (*Rubiaceae*). *Botanical Journal of the Linnean Society* 152:465–512.
- Davis, A.P., Chadburn, H., Moat, J., O'Sullivan, R., Hargreaves, S., and Lughadha, E. N. (2019). High extinction risk for wild coffee species and implications for coffee sector sustainability. *Sci. Adv.* 5, eaav3473. doi: 10.1126/sciadv.aav3473
- Davis, A.P., Tosh, J., Ruch, N. (2011) Growing coffee: *Psilanthus* (*Rubiaceae*) subsumed on the basis of molecular and morphological data; implications for the size, morphology, distribution and evolutionary history of *Coffea*. *Botanical Journal of the Linnean Society*, v.167, n.4, p.357-377.
- Damatta, F.M., Ramalho, J.D.C. (2006) Impacts of drought and temperature stress on coffee. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 18:55-81.
- 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. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 5(4):387-393.
- Da Silva, B.S.R., Sant'Ana, G.C., Chaves, C.L., Godoy Androcioli, L., Ferreira, R.V., Sera, G.H., Charmetant, P., Leroy, T., Pot, D., Domingues, D.S., Pereira, L.F.P. (2019) Population structure and genetic relationships between Ethiopian and Brazilian *Coffea arabica* genotypes revealed by SSR markers. *Genetica* 147:205-216.
- De Camargo, Â.P., De Camargo, M.B.P. (2001) Definição e Esquematização das Fases Fenológicas do Cafeeiro Arábica nas Condições Tropicais do Brasil. *Bragantia* 60:65-68.

- Decroocq, V., Favé, M.G., Hagen, L., Bordenave, L., Decroocq, S. (2003) Development and transferability of apricot and grape EST microsatellite markers across taxa. *Theoretical and Applied Genetics*, 106:912–922.
- De Moura, T.M., Sebbenn, A.M., Chaves, L.J., Coelho, A.S.G., Oliveira, G.C.X., Kageyama, P.Y. (2009) Diversidade e estrutura genética espacial em populações fragmentadas de *Solanum* spp. do Cerrado, estimadas por meio de locos microssatélites. *Revista Science*, Piracicaba, 37(82):143-150.
- Drumond Neto, A.P. (2017) *Qualidade física e sensorial de grãos de Coffea canephora Pierre Ex. Froehner de diferentes ambientes*. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Alegre, ES, Universidade Federal do Espírito Santo – UFES, 77p.
- Dubberstein D., Lidon F.C., Rodrigues A.P., Smedo J.N., Marques I, Rodrigues W.P., Gouveia D., Armengaud J, Smedo M.C, Martins S, Simões-Costa M.C, Moura I, Pais I.P, Scotti-Campos P, Partelli F.L, Campostrini E, Ribeiro-Barros A.I., DaMatta F.M and Ramalho J.C (2020) Resilient and Sensitive Key Points of the Photosynthetic Machinery of *Coffea* spp. to the Single and Superimposed Exposure to Severe Drought and Heat Stresses. *Front. Plant Sci.* 11:1049.
- 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.
- Fazuoli, L.C., Mistro, J.C., Braghini, M.T. Melhoria de café robusta no Instituto Agrônomo de Campinas. pp.201-247 In: Zambolim, L. (Ed.) *Tecnologia para produção do café Conilon*. Viçosa-MG
- 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*. Short Communication, 31-35.
- Ferrão, M.A.G., Ferrão, R.G., Fonseca, A.F.A., Verdin Filho, A.C., Volpi, P.S. (2019) *Origin, geographical dispersion, taxonomy and genetic diversity of Coffea canephora*. In: Ferrão, R.G, Fonseca, A.F.A, Ferrão, M.A.G. and DeMuner LH (eds) *Conilon coffee*. Incaper, Vitória, p. 85-110.
- Ferrão, R.G., Cruz, C.D., Ferreira, A., Cecon, P.R., Ferrão, M.A.G., Fonseca, A.F.A., Carneiro, P.C.de S., Silva, M.F.da. (2008) Parâmetros genéticos em café Conilon Genetic parameters in Conilon coffee. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 43:61–69.
- Ferreira, A.F.N., Krause, W., Faleiro, A.C., Miranda, A.F., Acha, A.J. (2018) Seleção de descritores de sementes de maracujazeiro azedo utilizando fenotipagem digital. *Agrarian Academy*, 5(10):, p.181-187.
- Fonseca, A.F.A, Sedyama, T., Cruz C.D., Sakiyama N.S., Ferrão, M.A.G., Ferrão, R.G., Bragança, S.M. (2006) Divergência genética em café Conilon. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 41:599-605.

- Franco, J., Crossa J., Villaseñor, J., TABA, S. (1998) Classifying genetic resources by categorical and continuous variables. *Crop Science*, Madison, 38(6):1688-1696.
- Gartner, G.A.L., Mccouch, S.R., Moncada, M.D.P. (2013) A genetic map of an interspecific diploid pseudo testcross population of coffee. *Euphytica*, 192:305-323.
- Gomes, J.F.S., Leta, F.R. (2012) Applications of computer vision techniques in the agriculture and food industry: a review. *European Food Research and Technology*, 235(6):989-1000.
- Gower, J. (1971) "A general coefficient of similarity and some of its properties". *Biometrics*, 27:857-872.
- ICO - INTERNATIONAL COFFEE ORGANIZATION. *Trade statistic tables*. Disponível em :< http://www.ico.org/trade_statistics.asp>. Acesso em: 5 set. 2022.
- Ivoglo, M.G., Fazuoli, L.L.C., Oliveira, A.C.B., Gallo, P.B., Mistro, J.C., Silvarolla, M.B., Braghini, M.T. (2008) Divergência genética entre progênies de café robusta. *Bragantia*, 67(4):823-831.
- Kiwuka, C., Goudsmit, E., Tournebize, R., De Aquino, S.O., Douma, J.C.; Bellanger, L.; Crouzillat, D., Stoffelen, P., Sumirat, U., Legnate, H., Marraccini, P., De Kochko, A., Andrade, A.C., Mulumba, J.W., Musoli, P., Anten, N.P.R., Poncet, V. (2021) Genetic diversity of native and cultivated Ugandan Robusta coffee (*Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner): Climate influences, breeding potential and diversity conservation. *PLoS One* 16(2): e0245965.
- Krause, W., Viana, A.P., Cavalcante, N.R., Ambrósio, M., Santos, E.A., Vieira, H.D. (2017) Digital phenotyping for quantification of genetic diversity in inbred guava (*Psidium guajava*) families. *Genetic and Molecular Research*, 16:1-11.
- Kumar, P., Rouphael, Y., Cardarelli, M., Colla, G. (2017) Vegetable Grafting as a Tool to Improve Drought Resistance and Water Use Efficiency. *Frontiers in Plant Science*. 8:1130.
- Labouisse, J.P., Cubry, P., Austerlitz, F., Rivallan, R., Nguyen, H.A. (2020) New insights on spatial genetic structure and diversity of coffeea canephora (*Rubiaceae*) in upper guinea based on old herbaria. *Plant Ecology and Evolution* 153(1):82–100.
- Lashermes, P., Couturon, E., Moreau, N., Paillard, M., Loarn, J. (1996) Inheritance and genetic mapping of self-incompatibility in *Coffea canephora* Pierre. *Theoretical and Applied Genetics*, 93(3):458-462.
- Li, Y.C., Korol, A.B., Fahima, T., Beiles, A., Nevo, E. (2002) Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Molecular Ecology*, 11:2453- 2465.

- Lucia, S.M.D., Minim, V.P.R., Silva, C.H.O., Minim, L.A. (2007) Fatores da embalagem de café orgânico torrado e moído na intenção de compra do consumidor. *Ciência Tecnologia de Alimentos*. 27(3):485-491.
- Maciel, G.M., Siquieroli, A.C.S., Gallis, R.B.de A., Pereira, L.M., Sales, V.F. (2019) Image phenotyping of inbred red lettuce lines with genetic diversity regarding carotenoid levels. *The International Journal of Applied Earth Observation and Geoinformation*, 81:154–160.
- Marcolan, A.L., Espindula, M. (2015) *Café na Amazônia*. 1 ed. Brasília, DF: Embrapa, 474p.
- Marcos Filho, J. *Fisiologia de sementes de plantas cultivadas*. (2015) (FEALQ. Biblioteca de Ciências Agrárias Luiz de Queiroz), Piracicaba, 2.ed., 495p.
- Marracini, P., Vinecky, F., Alves, G.S.C., Ramos, H.J.O., Elbelt, S., Vieira, N.G., Carneiro, F.A., Suji, P.S., Alekcevetch, J.C., Silva, V.A., Damatta, F.M., Ferrão, M.A.G., Leroy, T., Pot, D., Vieira, L.G.E., Silva, F.R., Martins, C.M., Xavier, G.R., Rumjanek, N.G. (2003) *Utilização de RAPD como marcador molecular em plantas*. Embrapa Agrobiologia. Documentos, 166, Seropédica, 39p.
- Martins, M.Q., Rodrigues, W.P., Fortunato, A.S., Leitão, A.E., Rodrigues, A.P., Pais, I.P., Martins, L.D., Silva, M.J., Reboredo, F.H., Partelli, F.L., Campostrini, E., Tomaz, M.A., Scotti-Campos, P., Ribeiro-Barros, A.I., Lidon, F.J.C., Damatta, F.M., Ramalho, J.C. (2016) Protective response mechanisms to heat stress in interaction with high [CO₂] conditions in *coffea* spp. *Frontiers in Plant Science*, 7:947.
- Matiello, J.B., Santinato, R., García, A.W.R., Almeida, S.R., Fernandes, D.R. (2002) *Cultura de café no Brasil: novo manual de recomendações*. Rio de Janeiro: MAPA/PROCAFÉ. 580p.
- Melo, B.de., Sousa, L.B.de. (2011) Biologia da reprodução de *Coffea arabica*. L. e *Coffea canephora*. *Revista Verde*, Limoeiro, 6(2):1-7.
- Melo, S.G.F., Andrade Junior, V.C., Pires, M.R.O., Andrade, D.B., Santana, R.A., Nery, M.C. (2022) Dormancy and evaluation of the physical-physiological quality in sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] seeds by image analysis. *Journal of Seed Sciences*, 44:e202244043.
- Milach, S.C.K. (1998a) *Uso de marcadores moleculares na caracterização de cultivares*. In: Borém, A. et al. Biossegurança, proteção de cultivares, acesso aos recursos genéticos e propriedade industrial na agropecuária. Viçosa: Ed. UFV, 43-58p.
- Milach, S.C.K. (1998b) *Marcadores moleculares em plantas*. Porto Alegre, 141p.
- Mojena R. (1977). Hierarchical grouping methods and stopping rules: an evaluation. *The Computer Journal* 20:359-363.

- Moraes, M.S., Teixeira, A.L., Ramalho, A.R., Espíndula, M.C., Ferrão, M.A.G., Rocha, R.B. (2018) Characterization of gametophytic selfincompatibility of superior clones of *Coffea canephora*. *Genetics and Molecular Research*, 7:1-10.
- Morgante, M., Hanafey, M., Powell, W. (2002) Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes. *Nature Genetics*, 30:194–200.
- Mota, J.W.S., Da Mata, F.M., Barros, R.S., Maestri, M. (1997) Vegetative growth in *Coffea arabica* L. as affected by irrigation, daylength and fruiting. *Tropical Ecology*, 38:73-79.
- Musoli, P., Cubry, P., Aluka, P., Billot, C., Dufour, M., De Bellis, F., Pot, D., Bieysse, D., Charrier, A., Leroy, T. (2009) Genetic differentiation of wild and cultivated populations: Diversity of *Coffea canephora* Pierre in Uganda. *Genome*, 52:634–646.
- Nascimento-Júnior, I., Môro, G.V., Môro, F.V. (2018) Indirect selection of maize genotypes based on associations between root agronomic and anatomical characters. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 78:39-47.
- Oliveira, G.H.H., Corrêa, P.C., Santo, F.L., Vasconcelos, W.L., Calil Júnior, C., Machado, F.B., Vargas, G.A.E. (2014) Caracterização física de café após torrefação e moagem *Semina: Ciências Agrárias*, 35(4):1813-1827.
- Oliveira, G.H.H., Oliveira, A.P.L.R., Freitas, H.M. (2019) Influência da granulometria sobre as propriedades físicas e o tempo de torrefação de grãos de café. In: X Simpósio de pesquisa dos cafés do Brasil 2019, Vitória. Anais [...]. Vitória: Embrapa Café, p. 4.
- Patel, K.K., Kar, A., Jha, S.N., Khan, M.A. (2012) Machine vision system: a tool for quality inspection of food and agricultural products. *Journal of Food Science and Technology*, Trivandrum, 49(2):123-141.
- Partelli, F.L., Giles, J.A.D., Oliosi, G., Covre, A.M., Ferreira, A., Rodrigues, V.M. (2020) Tributun: A coffee cultivar developed in partnership with farmers. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 20:e30002025.
- Partelli, F.L., Oliosi, G., Dalazen, J.R., Silva, C.A., Vieira, H.D., Espíndula, M.C. (2021) Proportion of ripe fruit weight and volume to green coffee: Differences in 43 genotypes of *Coffea canephora*. *Agronomy Journal*. 113:1050–1057.
- Partelli, F.L., Oliosi, G., Farah, A., Paula, J., Oliveira, H. F., Salvador, H. P. (2022) Salutar: First cultivar bred for soluble coffee production and health. v.4:2.
- Peakall, R., Smouse, P.E. (2012) GenAIEx 6, 5: genetic analysis in Excel, Population genetic software for teaching and research an update. *BMC Bioinformatics*, 28:2537-2539.

- Pereira, L.L., Cardoso, W.S., Silva, L.C., Brioschl, (2016) A. Interação da torra e das peneiras do café na preferência de consumidores. XXV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Gramado – RS, Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 11:14-17.
- Pereira, L.L., Moreli, A.P., Júnior, D.B., Sousa, L.H.B.P.S., Marcate, J.P.P., Oliveira, G.F. de O., Debona, D.G., Guarçoni, R.C. (2019) Construção de perfil sensorial para o café Conilon fermentado. *Ciência*, 5(2):242–252.
- Powell, W., Machray, G.C., Proven, J. (1996) Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends in Plant Science*, 1:215–222.
- Pritchard, J.K., Stephens, M., Donnelly, P. (2000) Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. *Genetics*, 155(2):945–959.
- Ramalho A.R., Rocha R.B., Souza F.F., Veneziano W. et al. (2016) Genetic gain in the productivity of processed coffee from the selection of clones of ‘Conilon’ coffee. *Revista Ciência Agronômica*, 47(3):516-523.
- Ramalho, M.A.P., Furtini, I.V. (2009) Técnicas biotecnológicas aplicadas ao melhoramento vegetal: alcance e limites. *Revista Ceres*, 56(4):473-479.
- Reis, M., Cardoso, D., Júnior, E.S., Gomes, B., Pereira, L., Gomes, D., Sousa, L. (2017) Research Article Correlation among traits as criterion of cotton genotypes indirect selection. *Genetics and Molecular Research*, 16(3):gmr16039805.
- Rocha, R.B., Teixeira, A.L., Ramalho, A.R, Souza, F.F. (2015) *Café na Amazônia*. Brasília, Df: Embrapa, 474p.
- Rodrigues, W.P., Vieira, H.D., Teodoro, P.E., Partelli, F.L., Barbosa, D.H.S.G. (2016) Assessment of genetic divergence among coffee genotypes by Ward-MLM procedure in association with mixed models. *Genetics and Molecular Research*, 15(2): gmr.15027889
- Sakiyama, N., Martinez, E., Tomaz, M., Borém, A. (2015) *Café arábica do plantio a colheita*. Viçosa: Editora UFV, 316p.
- 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*, 20:1-9.
- Santos, T.T., Yassitepe, J.E.de C.T. (2014) *Fenotipagem de plantas em larga escala: um novo campo de aplicação para a visão computacional na agricultura. Tecnologias da Informação e Comunicação e suas relações com a agricultura. Parte II - Capítulo 5, p 86-100. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/1010708/1/capitulo0508814.pdf> Acesso em: 18/12/2022*

- SAS Institute (2009). *Statistical Analysis System: User's Guide*. SAS, Cary, 5140p.
- Silva, C.C.A., Vieira, H.D., Viana, A.P., Santos, E.A., Maitan, M.Q. (2021) Digital Phenotyping in Inbred Guava Lines: Seed Characterization. *Functional Plant Breeding Journal* 3(2):33-50.
- Silva, F.H.L., Viana, A.P., Ferreira R.T., Freitas, J.C.O., Santos, J.O., Rodrigues, D.L. (2014) Measurement of genetic diversity in progênies of sour passion fruit by Ward-MLM methodology: A strategy for heterotic group formation. *Ciência e Agrotecnologia*, 38 (3):240-246.
- Silva, G.O., Carvalho, J.O.M., Vieira, J.V., Carvalho, A.D.F. (2014) Parâmetros genéticos para germinação de sementes e produção de raízes de cenoura sob altas temperaturas. *Magistra*, 26:524-531.
- Sousa, C.A.F., Cunha, B.A.D.B., Martins, P.K., Molinari, H.B.C., Kobayashi, A.K., Souza Júnior, M.T. (2015) Nova abordagem para a fenotipagem de plantas: conceitos, ferramentas e perspectivas. *Revista Brasileira de Geografia Física*, 8(IV SMUD):660-672.
- 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(75):5:15.
- Sousa, P., Vieira, H., Santos, E., Viana, A., Boechat, M., Partelli, F. *Coffea canephora*: Heterotic Crosses Indicated by Molecular Approach (2022) *Plants*, 11, 3023.
- Souza, F.F., Caixeta, E.T., Ferrão, L.F.V., Ferreira Pena, G.F., Sakiyama, N.S., Zambolim, E.M., Zambolim, L., Cruz, C.D. (2013) Molecular diversity in *Coffea canephora* germplasm conserved and cultivated in Brazil. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 13:221-227.
- Spers, E.E., Saes, M.S.M., Souza, M.C.M. (2004). Análise das preferências do consumidor brasileiro de café: Um estudo exploratório dos mercados de São Paulo e Belo Horizonte. *Revista de Administração*, 39(1):53-61
- Sturm, G.M. (2012) *Qualidade física e sensorial de Coffea canephora relacionadas à altitude, estágio de maturação e preparo pós-colheita*. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Alegre – ES, Universidade Federal do Espírito Santo – UFES, 83p.
- Sunarharum, W.B., Williams, D.J., Smyth, H.E. (2014) Complexity of coffee flavor: A compositional and sensory perspective. *Food Research International*, 62:315–325.
- Toppa, E.V.B., Jadoski, C.J. (2013) O Uso dos Marcadores Moleculares no Melhoramento Genético de Plantas. *Scientia Agraria Paranaensis*, 12(1):1-5.

- Torres, G.X. (2018) Diversidade genética em população segregante de *Passiflora* via características de sementes. Tese (Mestrado em Produção vegetal) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, 82p.
- Vega, F.E., Rosenquist, E., Collins, W. (2003) Global project needed to tackle coffee crisis. *Nature*, 425:425343a.
- Venora, G., Grillo, O., Shahin, M.A., Symons, S.J. (2007) Identification of Sicilian landraces and Canadian cultivars of lentil using an image analysis system. *Food Research International*, 40:161-166.
- Vignoli, J.A., Bassoli, D.G., Benassi, M.T. (2011) Antioxidant activity, polyphenols, caffeine and melanoidins in soluble coffee: The influence of processing conditions and raw material. *Food Chemistry*, 124(3):863-868.
- Vigouroux, Y., Jaqueth, J.S., Matsuoka, Y., Smith, O.S., Beavis, W.D., Smith, J.S.C., Doebley, J. (2002) Rate and pattern of mutation at microsatellite loci in maize. *Molecular Biology*, 19:1251-1260.
- Yam, K.L., Papadakis, S.E. (2004) A simple digital imaging method for measuring and analyzing color of food surfaces. *Journal of Food Engineering*, 61(1):137-142.
- Yuan, Y., Miao, J., Tao, Y., Ji, C., Du, P., Wang, J., Wang, Z., Chen, D., Gong, Z., Yi, C., Zhu, J., Dong, G., Gu, M., Zhou, Y., Liang, G. (2015) Identification and fine mapping of qPH6, a novel major quantitative trait locus for plant height in rice. *Molecular Breeding* 35:1-11.
- Zeferino, L.B., Saraiva, S.H., Cesar Da Silva, L., José, L., Teixeira, Q., Maria, S., Lucia, D. (2010) Efeito da concentração de sólidos solúveis do extrato de café Conilon no índice d refração, na densidade e na viscosidade do extrato. *Enciclopédia Biosfera* 6:1-8.
- Zucchi, M.I., Pereira, R., Brondani, V., Siqueira, A., Coelho, G., Vencovsky, R. (2003) Genetic structure and gene flow in *Eugenia dysenterica* DC in the Brazilian Cerrado utilizing SSR markers *Genetics and Molecular Biology*, 26(4):449-457.