

CARACTERIZAÇÃO DA AUTOINCOMPATIBILIDADE GAMETOFÍTICA DE ACESSOS DE BANCO ATIVO DE GERMOPLASMA DE *Coffea canephora*¹

Carolina Augusto de Souza², José Roberto Vieira Júnior³, Maurício Reginaldo Alves dos Santos⁴, Alexandro Lara Teixeira⁵, André Rostand Ramalho⁶, Marcelo Curitiba Espindula⁷, Maria Amélia Gava Ferrão⁸, Rodrigo Barros Rocha^{9*}

¹ Trabalho financiado pelo Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café – Consórcio Pesquisa Café

² Bolsista CAPES, Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal, Porto Velho-RO, carolina_augusto@hotmail.com

³ Pesquisador, DSc, Embrapa Rondônia, Porto Velho – RO, jose-roberto.vieira@embrapa.br

⁴ Pesquisador, DSc, Embrapa Rondônia, Porto Velho – RO, mauricio.santos@embrapa.br

⁵ Pesquisador, DSc, Embrapa Rondônia, Porto Velho – RO, alexsandro.teixeira@embrapa.br

⁶ Pesquisador, DSc, Embrapa Rondônia, Porto Velho – RO, andre.ramalho@embrapa.br

⁷ Pesquisador, DSc, Embrapa Rondônia, Porto Velho – RO, marcelo.espindula@embrapa.br

⁸ Pesquisador, DSc, Embrapa Café, Vitória– ES, maria.ferrao@embrapa.br

⁹ Pesquisador, DSc, Embrapa Rondônia, Porto Velho – RO, rodrigo.rocha@embrapa.br * Autor correspondente

RESUMO

O *Coffea canephora* é uma espécie alógama que apresenta autoincompatibilidade gametofítica (AIG), de expressão governada por um único gene multialélico, identificado pela letra S. Na cafeicultura clonal o plantio de clones não compatíveis pode reduzir a produtividade e a qualidade dos grãos devido a menor eficiência da polinização e aumento na taxa de grãos do tipo moça. O objetivo desse trabalho é caracterizar a autoincompatibilidade de acessos do Banco de Germoplasma da Embrapa quantificando a diversidade alélica e genotípica de uma população de melhoramento, fornecendo subsídios para manipulação dessa característica no desenvolvimento de novas variedades. Para isso foram realizadas hibridações *in vitro* entre 28 genótipos de um campo de hibridação contendo 80 matrizes das variedades botânicas Conilon e Robusta. Os procedimentos de hibridação *in vitro* se iniciaram um dia antes da antese, com a proteção dos ramos doadores utilizando sacos de papel do tipo kraft de 55x25cm e transferência dos estigmas das plantas receptoras para meio de cultura (sacarose 10%). Os genótipos doadores de grãos de pólen BRS 1216, BRS 2299 e BRS 3193 foram utilizados como plantas testadoras dos grupos de compatibilidade I, II e III respectivamente. A polinização *in vitro* foi realizada no dia da antese com a raspagem dos grãos de pólen que é colocado em contato com apenas um dos dois estigmas de cada pistilo bifido. A compatibilidade das hibridações foi avaliada utilizando coloração com azul de anilina a 1% para visualização do desenvolvimento dos tubos polínicos utilizando microscopia de fluorescência. A eficiência de polinização foi estimada pela relação entre o número de estigmas fertilizados e o número total de estigmas polinizados. A utilização de plantas testadoras dos grupos de compatibilidade permitiu reduzir o número de hibridações necessárias para caracterizar os genótipos das plantas. A polinização *in vitro* resultou em uma taxa média de pegamento de 60,3% com amplitude de 11 a 85% de pegamento nas hibridações compatíveis. Entre os 28 clones caracterizados 17 genótipos (61%) foram incompatíveis com a planta testadora do grupo I, 5 clones (18%) apresentaram incompatibilidade com a planta testadora do grupo II e 6 clones (21%) foram incompatíveis com o testador do grupo III. Os resultados parciais da caracterização dessa população de melhoramento indicam a distribuição dos genótipos em três grupos de compatibilidade com as frequências dos alelos S₁, S₂ e S₃, estimadas em 0,39, 0,41 e 0,20 respectivamente. Apesar da diferença observada entre as frequências alélicas, as frequências genotípicas não diferem das proporções esperadas para uma população em Equilíbrio de Hardy Weinberg (EHW), com 1% de probabilidade. A caracterização do genótipo do gene S é importante, impactando na eficiência de polinização desse cultivo, com o favorecimento natural de cruzamentos compatíveis.

PALAVRAS-CHAVE: Café canéfora, Conilon, Robusta, compatibilidade.

CHARACTERIZATION OF THE GAMETOPHYTIC AUTOINCOMPATIBILITY OF ACCESSES OF GERMOPLASMA ACTIVE BANK OF *Coffea canephora*

ABSTRACT: *Coffea canephora* is an allogeneic species that exhibits gametophytic autoincompatibility (AIG), an expression governed by a single multilevel gene, identified by the letter S. In clonal coffee cultivation, planting of non-compatible clones can reduce grain yield and quality due to lower efficiency of pollination and increase in the mocha-type grain rate. The objective of this work is to characterize the access autoincompatibility of Embrapa Germplasm Bank quantifying the allelic and genotype diversity of a breeding population, providing subsidies to manipulate this trait in the development of new varieties. For this purpose, *in vitro* hybridizations were performed between 28 genotypes of a hybridization field containing 80 matrices of the Conilon and Robusta botanical varieties. *In vitro* hybridization procedures were initiated one day prior to anthesis, with protection of the donor branches using 55x25cm kraft paper bags and transfer of the stigmas from the recipient plants to the culture medium (10% sucrose). The genotypes of pollen grains BRS 1216, BRS 2299 and BRS 3193 were used as test plants of compatibility groups I, II and III respectively. *In vitro* pollination was carried out the day before the scraping of the pollen grains which is placed in contact with only one side of the bifid stigma. Compatibility of the hybridizations was evaluated using 1% aniline blue staining to visualize the development of the pollen tubes using fluorescence microscopy. The pollination efficiency was estimated

by the relation between the number of fertilized stigmas and the total number of pollinated stigmas. The use of compatibility group testing plants allowed reducing the number of hybridizations required to characterize plant genotypes. In vitro pollination resulted in an average adhesion rate of 60.3% with an amplitude of 11 to 85% of glue in compatible hybridizations. Among the 28 clones characterized by 17 genotypes (61%) were incompatible with the test plant of group I, 5 clones (18%) presented incompatibility with the test plant of group II and 6 clones (21%) were incompatible with the tester of the group III. The partial results of the characterization of this breeding population indicate the distribution of the genotypes in three groups of compatibility with the frequencies of the S1, S2 and S3 alleles, estimated at 0,39, 0,41 and 0,20 respectively. Despite the observed difference between allelic frequencies, the genotypic frequencies do not differ from the expected proportions for a Hardy Weinberg Equilibrium (EHW) population, with a 1% probability. The characterization of the S gene genotype is important, impacting the pollination efficiency of this crop, with the natural favoring of compatible crosses.

KEY-WORDS: *Coffea canephora*, Conilon, Robusta, compatibility.

INTRODUÇÃO

A capacidade de se evitar a autofecundação é uma importante característica do sistema reprodutivo de várias espécies vegetais alógamas, incluindo a espécie *Coffea canephora*, e que evoluiu como uma forma de evitar os efeitos deletérios da endogamia (Castric e Vekemans, 2004). A autoincompatibilidade (AI) é um mecanismo fisiológico que impede uma planta fértil de formar sementes viáveis quando fertilizada por seu próprio pólen (Schifino-Wittmann e Dall'agnol, 2002). O impedimento à autofecundação deve-se a paralisação do desenvolvimento dos tubos polínicos, que impossibilita a fertilização do gametófito feminino (Berthaud, 1980).

O *C. canephora* apresenta autoincompatibilidade gametofítica e a reação de incompatibilidade ocorre entre o tubo polínico e o grão de pólen, que não deve compartilhar o mesmo alelo da planta receptora (Lashermes et al., 1996; Nowak et al., 2011). Nesta espécie, a autoincompatibilidade tem sua expressão governada por apenas um gene multialélico identificado pela letra S (Berthaud, 1980).

Na cafeicultura clonal, o plantio de clones não compatíveis pode comprometer a produtividade e a qualidade dos grãos devido a menor eficiência da polinização e aumento na taxa de grãos do tipo moca (Ferrão et al., 2007). Embora avaliações no centro de origem indiquem a existência de até cinco formas alélicas do gene S (Omolaia e Fawole, 2004), observações de campo indicam a ocorrência de apenas três formas alélicas na expressão desta característica em germoplasma brasileiro (S₁, S₂ e S₃) (Moraes et al., 2018; Conagin e Mendes, 1961; Ferrão et al., 2007a).

Apesar da incompatibilidade do *C. canephora* ter sido relatada ainda na década de 60, poucos trabalham se dedicaram a caracterizar a compatibilidade, entre os quais destacam-se: Devreux et al. (1959) observaram que após a autopolinização o tubo polínico para seu desenvolvimento. Conagin & Mendes (1961) e Berthaud (1980) levantaram evidências de que a autoincompatibilidade deve ser governada pela ação de um único gene, com três formas alélicas. No centro de origem e de diversificação desta espécie, Omolaia e Fawole (2004) quantificaram a interação de cinco formas alélicas na expressão desta característica. Lashermes et al., (1996) identificaram um marcador molecular associado a essa característica pelo desenvolvimento de populações duplo-haploídes, homozigotas para o gene S. De Franceschi et al. (2012) descreveram que a incompatibilidade se deve a interação de glicoproteínas específicas no estigma da flor e nos grãos de pólen, que se combinam para formação de dímeros. Nowak et al. (2011) caracterizaram o polimorfismo deste gene entre várias espécies do gênero *Coffea*. Mais recentemente Ferrão et al., (2017) apresentaram uma revisão sobre a importância da compatibilidade para programas de melhoramento. Moraes et al. (2018) caracterizaram a genealogia do gene S em progênies de *C. canephora*, agrupando os genótipos em três grupos de compatibilidade diferentes. Lopes (2015) identificou plantas de cada um dos grupos que podem ser utilizadas como plantas testadoras.

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

MATERIAL E MÉTODOS

Um campo de hibridação contendo 40 matrizes da variedade botânica Conilon e 40 matrizes da variedade botânica Robusta foi instalado no ano de 2017 no campo experimental da Embrapa no município de Porto Velho - RO. As matrizes foram selecionadas de acordo com a maior divergência genética estimada a partir da avaliação de descritores agrônomicos e morfológicos ao longo de três anos (Oliveira et al., 2018). As matrizes da variedade botânica Conilon, se caracterizam pelo seu menor porte, maior resistência ao déficit hídrico e maior suscetibilidade a pragas e doenças. E as matrizes da variedade botânica Robusta se diferenciam pelo maior porte, menor resistência ao déficit hídrico e maior resistência a pragas e doenças (Rocha et al., 2013).

A polinização de pistilos *in vitro* consiste na deposição de grãos de pólen assépticos no estigma dos pistilos das flores receptoras, mantidos em cultura de tecido (Lashermes et al., 1996). Essa estratégia permite eliminar a contaminação causada pela presença de grãos de pólen de plantas não doadoras.

Os procedimentos de hibridação *in vitro* foram realizados nos dias nos dias 25/04/2019, 17/05/2019, 05/06/2019 e 04/07/2019, acompanhando o florescimento das flores doadoras em campo. Um dia antes da abertura floral, os ramos doadores foram protegidos em campo utilizando sacos de papel do tipo kraft de 55x25cm e os pistilos foram retirados das flores de acordo com os procedimentos descritos Lashermes et al. (1996) e Berthaud (1980), e transferidos para meio de cultura com agar, sacarose e antibiótico para serem polinizados.

Os genótipos BRS 1216, BRS 2299 e BRS 3193 foram utilizados como plantas testadoras dos grupos de compatibilidade I, II e III respectivamente. No dia da antese ramos previamente protegidos dos genótipos testadores foram levados para laboratório para coleta e transferência dos grãos de pólen. Os grãos de pólen das testadoras foram transportados para o estigma das plantas receptoras de modo a polinizar apenas um dos dois estigmas de cada pistilo.

O diagnóstico da compatibilidade dos cruzamentos fundamenta-se na avaliação do desenvolvimento dos tubos polínicos diretamente no pistilo das plantas, trinta horas após a hibridação artificial. As amostras foram preservadas em solução de FAA (formaldeído a 10%, ácido acético glacial 10% e etanol 80%) após esse período.

No preparo das amostras os pistilos foram retirados do FAA, lavados com água destilada, foram imersos em NaOH 1N durante 2 horas, lavados com água destilada e corados durante 12 horas com azul de anilina de 1% preparada em K_2PO_4 0,1 M. Os pistilos foram colocados em lâminas com o auxílio de água destilada, visualizados e analisados em microscópio do modelo Leica DM2500, equipado com sistema de fotodocumentação. A visualização dos pistilos foi realizada em microscópio de fluorescência, em aumento de 10 e 20 vezes, contabilizando o número de pistilos que apresentaram tubos polínicos completamente desenvolvidos (Figura 1). Na avaliação da compatibilidade foram avaliadas duas lâminas por cruzamento com dez pistilos em cada lâmina, tendo sido considerados compatíveis os cruzamentos que apresentaram tubos polínicos completamente desenvolvidos no estilo do estigma polinizado. A eficiência de polinização foi estimada pela relação entre o número de estigmas fertilizados e o número total de estigmas polinizados.

No cruzamento entre plantas de diferentes grupos de compatibilidade, metade da descendência será do mesmo genótipo que planta doadora e a outra metade apresentará genótipo diferente de seus genitores (Tabela 1). Uma vez que o mecanismo de AIG impede o desenvolvimento dos tubos polínicos de grãos de pólen com o mesmo genótipo da planta receptora, não existe naturalmente genótipos homozigotos para essa característica. Do cruzamento entre plantas dos grupos I e III espera-se que metade da descendência seja do grupo I e a outra metade do grupo III. Considerando a ocorrência de três alelos, como sugerido por Moraes et al. (2018), pode ocorrer os seguintes cruzamentos (Tabela 1):

Tabela 1. Descendência esperada do cruzamento entre os genitores compatíveis, considerando três formas alélicas ao gene S em população de *C. canephora*.

Genitor Masculino ♂	Genitor Feminino ♀		
	S ₁ S ₂	S ₁ S ₃	S ₂ S ₃
S ₁ S ₂	Incompatível.	$\frac{1}{2} S_1S_2 + \frac{1}{2} S_2S_3$	$\frac{1}{2} S_1S_2 + \frac{1}{2} S_1S_3$
S ₁ S ₃	$\frac{1}{2} S_1S_3 + \frac{1}{2} S_2S_3$	Incompatível	$\frac{1}{2} S_1S_3 + \frac{1}{2} S_1S_2$
S ₂ S ₃	$\frac{1}{2} S_2S_3 + \frac{1}{2} S_1S_3$	$\frac{1}{2} S_2S_3 + \frac{1}{2} S_1S_2$	Incompatível

Na ocorrência de acasalamentos ao acaso as frequências alélicas e genotípicas se mantém de uma geração para outra (Falconer, 1981). Para determinar as frequências genotípicas e alélicas na população de melhoramento deve-se considerar a incompatibilidade no momento da polinização, de forma que as frequências p, q e r associadas às formas alélicas S₁, S₂ e S₃, são dadas por:

$$P(S_1S_1) = p^2 = 0 \text{ (cruzamento incompatível);}$$

$$P(S_1S_2) = 2pq$$

$$P(S_1S_3) = 2pr$$

$$P(S_2S_2) = q^2 = 0 \text{ (cruzamento incompatível)}$$

$$P(S_2S_3) = 2qr$$

$$P(S_3S_3) = r^2 = 0 \text{ (cruzamento incompatível)}$$

De forma que as probabilidades de ocorrência dos genótipos podem ser estimadas:

$$P(S_1S_2) = \frac{2pq}{1-p^2-q^2-r^2}; \quad P(S_1S_3) = \frac{2pr}{1-p^2-q^2-r^2}; \quad P(S_2S_3) = \frac{2qr}{1-p^2-q^2-r^2}$$

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A caracterização da autoincompatibilidade é um desafio para os programas de melhoramento de *C. canephora*. A avaliação de poucas dezenas de plantas resulta em um grande número de hibridações devido à relação exponencial entre

o número de genótipos e de grupos de compatibilidade (Lopes, 2015). A utilização de plantas testadoras dos grupos de compatibilidade permitiu reduzir o número de hibridações necessárias para caracterizar os genótipos das plantas.

A eficiência da polinização foi mensurada a partir da relação entre o número de estigmas polinizados e o número de estigmas fertilizados. A polinização *in vitro* resultou em uma taxa média de pegamento de 60,3% com amplitude de 11 a 85% de pegamento nas hibridações compatíveis. Comparativamente, no estudo da genealogia do gene S em progênes de irmãos completos e meios irmãos de *C. canephora*, Moraes et al. (2018) observaram uma taxa de pegamento de 44% com amplitude de 26 a 77%, na avaliação de 80 hibridações realizadas em campo (Tabela 2). Métodos de polinização *in vitro* são utilizados em diferentes espécies vegetais para manipular barreiras pré-zigóticas que podem impedir a fertilização das angiospermas (Torres et al, 1998). Maior eficiência da polinização *in vitro* também foi observada por Lopes (2015).

A utilização da microscopia de fluorescência para visualização do desenvolvimento dos tubos polínicos permitiu reduzir o tempo necessário para a avaliação da compatibilidade, não sendo necessário avaliar o desenvolvimento dos frutos em campo ao longo de aproximadamente 120 dias. O *C. canephora* produz grãos de pólen binucleados protegidos por duas camadas, uma camada interna de celulose chamada de intina e uma camada externa rugosa que favorece a fixação dos grãos de pólen, chamada de exina (Conagin e Mendes, 1961). Após a polinização os grãos de pólen que aderem ao estigma germinam formando um tubo polínico que cresce para dentro do estilete. O tubo polínico é um alongamento da célula do grão de pólen que cresce em direção ao ovário quimiotropicamente levando os núcleos vegetativo e germinativo. O azul de anilina apresenta alta afinidade pelas caloses, um polissacarídeo presente em menor concentração nas paredes celulares e em maior concentração nos andrósporos e ginósporos após a divisão meiótica, aumentando o contraste dos tubos polínicos, permitindo sua identificação das hibridações compatíveis.

Os genótipos avaliados neste trabalho foram selecionados de uma população de melhoramento contendo 80 matrizes das variedades botânicas Conilon e Robusta. Embora estudos mais recentes de mapeamento genético e de genômica funcional não tenham apresentado evidências de ligação entre características produtivas e o gene S (Lashermes et al., 1996; Nowak et al., 2011), deve-se considerar que por obra do acaso e erros de amostragem, a seleção pode reduzir a variabilidade deste gene.

Nessa população, entre os 28 clones caracterizados 17 genótipos (61%) foram incompatíveis com a planta testadora do grupo I, 5 clones (18%) apresentaram incompatibilidade com a planta testadora do grupo II e 6 clones (21%) foram incompatíveis com o testador do grupo III (Tabela 3). A distribuição dos genótipos nos diferentes grupos de compatibilidade foi interpretada para estimar as frequências dos alelos que determinam a expressão dessa característica monogênica (Tabela 3).

Apesar da diferença observada entre as frequências alélicas, as frequências genotípicas não apresentaram diferenças das proporções esperadas para uma população em Equilíbrio de Hardy Weinberg (EHW), de acordo com o teste de qui-quadrado com 1% de probabilidade. Segundo Vekeman e Slatkin (1994) o gene S apresenta genealogia semelhante à de genes neutros, que não têm sua frequência alterada pela seleção natural. Ao considerar essa característica, em uma população em EHW, em que as frequências alélicas são idênticas ($p=q=r\dots z$), a probabilidade de um cruzamento ser compatível é de 0% quando estão presentes apenas duas formas alélicas, de 66,7% quando estão presentes três formas alélicas e de 83,3% quando estão presentes quatro formas alélicas diferentes (Charlesworth e Guttman, 1997). De forma que, quanto maior a variabilidade para esse gene maior será a probabilidade de ocorrência de cruzamentos compatíveis.

Por se tratar de um mecanismo pré-zigótico que influencia na taxa de fecundidade dos grãos de pólen, a autoincompatibilidade contribui para que: nenhuma das formas alélicas do gene S possa se fixar na população, a taxa de mudança do gene S seja maior do que de um loco neutro e que os indivíduos sejam heterozigotos para esse gene. Em contraste com os resultados de Omolaja e Fawole, 2004, que observaram a ocorrência de cinco diferentes formas alélicas, avaliações em populações brasileiras tem indicado a existência de apenas três alelos (Moraes et al., 2018; Conagin e Mendes, 1961).

Ainda que poucos trabalhos tenham mensurado o efeito prejudicial da autoincompatibilidade em café canéfora (Ferrão et al., 2007b), o plantio de genótipos não compatíveis pode aumentar a taxa de grãos tipo moca e diminuir a produtividade de grãos devido ao isolamento de plantas não compatíveis. A possibilidade de identificar novos genótipos, com novos alelos do gene S em germoplasma brasileiro abre a possibilidade para um aumento na eficiência de polinização, com o favorecimento natural de cruzamentos totalmente compatíveis.

Tabela 2. Percentual de pegamento dos estigmas polinizados *in vitro* pelos grãos de pólen das plantas testadoras dos grupos de compatibilidade I, II e III respectivamente.

Clones	Testador I	Testador II	Testador III	Grupo
1	0	60	40	I
2	0	40	50	I
3	0	70	45	I
4	0	60	55	I
5	0	80	50	I
6	0	75	70	I
7	0	33	40	I
8	0	80	50	I
9	0	80	40	I
10	0	67	40	I
11	0	70	80	I
12	0	70	40	I
13	0	35	70	I
14	0	50	80	I
15	0	70	60	I
16	0	65	65	I
17	0	70	65	I
18	60	0	30	II
19	80	0	40	II
20	60	0	35	II
21	75	0	40	II
22	60	0	40	II
23	80	11	0	III
24	60	45	0	III
25	85	60	0	III
26	80	40	0	III
27	70	80	0	III
28	65	50	0	III
Eficiência média¹	70.5	59.2	51.1	60.3

Tabela 3. Distribuição dos acessos caracterizados de acordo em grupos de compatibilidade determinados pela visualização *in vitro* do desenvolvimento do tubo polínico.

Grupos	Genótipo	N _o	f(g)	N _e	Alelos	f(a)
I	S ₁ S ₂	17	0,61	14,15	S₁	0,39
II	S ₁ S ₃	5	0,18	6,77	S₂	0,41
III	S ₂ S ₃	6	0,21	7,08	S₃	0,20
Total		28	1,00	28		1,00
χ^2		1.10 ^{NS}				

χ^2 : Teste de chi-quadrado, N_o: número observado de plantas em cada um dos grupos de compatibilidade, f: frequência simples, N_e: Número esperado de plantas em cada um dos grupos de compatibilidade.

CONCLUSÕES

A utilização de plantas testadoras dos grupos de compatibilidade permitiu reduzir o número de hibridações necessárias para caracterizar os genótipos das plantas. Métodos de polinização *in vitro* permitiram aumentar a eficiência da polinização, sem apresentar contaminação causada pela presença de grãos de pólen de plantas não doadoras. A utilização da microscopia de fluorescência permitiu reduzir o tempo necessário para diagnosticar a compatibilidade entre as hibridações. Os resultados parciais da caracterização de uma população de melhoramento indicaram a distribuição dos genótipos em três grupos de compatibilidade com diferentes frequências alélicas. Apesar da diferença entre as frequências alélicas, as frequências genotípicas observadas não diferem das proporções esperadas para uma população em EHW. A caracterização da segregação do gene S nas populações é importante, impactando na eficiência de polinização desse cultivo com o favorecimento natural de cruzamentos compatíveis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BERTHAUD, J. Incompatibility in *Coffea canephora* - Test Method and Genetic Determinism. **Cafe Cacao The**, v.24, n.4, p.267-274, 1980.
- CASTRIC, V.; VEKEMANS, X. Invited Review: Plant self-incompatibility in natural populations: a critical assessment of recent theoretical and empirical advances. **Molecular Ecology**, v.13, n.10, p.2873-2889, 2004.
- CONAGIN, C.H.T.M.; MENDES, A.J.T. Pesquisas citológicas e genéticas em três espécies de *Coffea*; autoincompatibilidade em *Coffea canephora*. **Bragantia**, v.20, p.787-804, 1961.
- CHARLESWORTH, D.; GUTTMAN, D. S. Plant genetics: Seeing selection in S allele sequences. **Current Biology**, v.7, n.1, p.R34-R37, 1997.
- DEVREUX, M.; VALLAYES, G.; POCHER, P.; EBERHART, S. A.; RUSSEL, W. A. Stability parameters for comparing varieties. **Crop Science**, v.6, p.36-40, 1959.
- FALCONER, D.S. **Introdução à genética quantitativa**. Viçosa: UFV, p.279, 1981.
- FERRÃO, M. A. G. et al. Origem, dispersão geográfica, taxonomia e diversidade genética de *Coffea canephora*. In: FERRÃO, R. G. et al. **Café conilon**. Vitória, ES: Incaper, p.66-91, 2007a.
- FERRÃO, M. A. G.; RIVA-SOUZA, E. M.; FONSECA, A. F. A. da.; FERRÃO, R. G. Autoincompatibilidade e produção sustentável do café Conilon. In: FERRÃO, R. G.; FONSECA, A. F. A. da.; FERRÃO, M. A. G.; DE MUNER, L. H. (Ed.). **Café Conilon**. 2 ed. atual. ampli. Vitória, ES: Incaper, p. 177-191, 2017.
- FERRÃO, R. G. et al. Melhoramento genético do *Coffea canephora*. In: FERRÃO, R.G. et al. (Ed.). **Café Conilon**. Espírito Santo: Incaper, p.121-173, 2007b
- FRANCESCHI, P.; DONDINI, L.; SANZOL, J. Molecular bases and evolutionary dynamics of self-incompatibility in the *Pyrrinae* (Rosaceae). **Journal of Experimental Botany**, 63: 4015-4032, 2012.
- LASHERMES, P. et al. Inheritance and genetic mapping of self-incompatibility in *Coffea canephora* Pierre. **Theoretical and Applied Genetics**, v.93, n.3, p.458-462, 1996.
- LOPES, T. A. Caracterização da autoincompatibilidade gametofítica de clones superiores de *Coffea canephora*. **Dissertação** (Mestrado) Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente (PGDRA), Universidade Federal de Rondônia -UNIR. 64 f. Porto Velho.2015
- MORAES, M S ; TEIXEIRA, A L ; RAMALHO, A R ; ESPINDULA, M C ; FERRAO, M A G ; ROCHA, R B. Characterization of gametophytic self-incompatibility of superior clones of *Coffea canephora*. **Genetics and Molecular Research**, v. 17, p. 1-11, 2018. <https://www.geneticsmr.com/articles/18018>
- NOWAK, M. D. et al. Expression and Trans-Specific Polymorphism of Self-Incompatibility RNases in *Coffea* (Rubiaceae). **Plos One**, v.6, n.6, 2011.
- OLIVEIRA, L. N. L., ROCHA, R. B., FERREIRA, F. M., SPINELLI, V. M., RAMALHO, A. R., TEIXEIRA, A. L. Selection of *Coffea canephora* parents from the botanical varieties Conilon and Robusta for the production of intervarietal hybrids. **Ciência Rural**, 48(4), 2018.
- OMOLAJA, S. S.; FAWOLE, I. Determination of the number of self-incompatibility alleles (SIA) in *Coffea canephora* and the role of pollen-stylar protein in the expression of SIA. **20th International Conference on Coffee Science**. Bangalore, India Anais, 11-15, p.684–687, 2004.
- ROCHA, R. B.; SANTOS, D. V. ; RAMALHO, A. R. ; TEIXEIRA, A. L. . Caracterização e uso da variabilidade genética de banco ativo de germoplasma de *Coffea canephora* Pierre ex Froehner. **Coffee Science**, v. 8, p. 478-485, 2013.
- SCHIFINO-WITTMANN, M. T.; DALL'AGNOL, M. Autoincompatibilidade em plantas. **Ciência Rural**, v.32, p.1083-1090, 2002.
- TORRES, A.C. et al. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI: Embrapa-CNPq, 1998.
- VEKEMAN, X.; SLATKIN, M. Gene and allelic genealogies at a gametophytic self-incompatibility locus. **Genetics and Molecular Biology**, v.137, p.1157-1165, 1994.