



Estratégias biotecnológicas e genômicas no melhoramento do cafeeiro

Oliveiro Guerreiro-Filho¹
Lilian Padilha¹
Mirian Perez Maluf¹
Lucas Mateus Rivero Rodrigues¹

Introdução

Melhoramento do cafeeiro no Instituto Agrônômico

A cafeicultura brasileira é reconhecidamente um modelo de eficiência.

Em 2020, o país deve produzir cerca de 60 milhões de sacas de café beneficiado, sendo aproximadamente 75% deste montante, proveniente de cafés do tipo arábica. Uma das mais importantes variáveis nesta equação é a diversidade de cultivares adaptadas às mais diversas condições edafoclimáticas que caracterizam nossas regiões produtoras. Há em 2020, 132 cultivares com características diversas registradas no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 67 delas, lançadas pelo IAC (Figura 1).

¹ IAC - Centro de Pesquisa de Café "Alcides Carvalho", Campinas (SP). oliveiro@iac.sp.gov.br

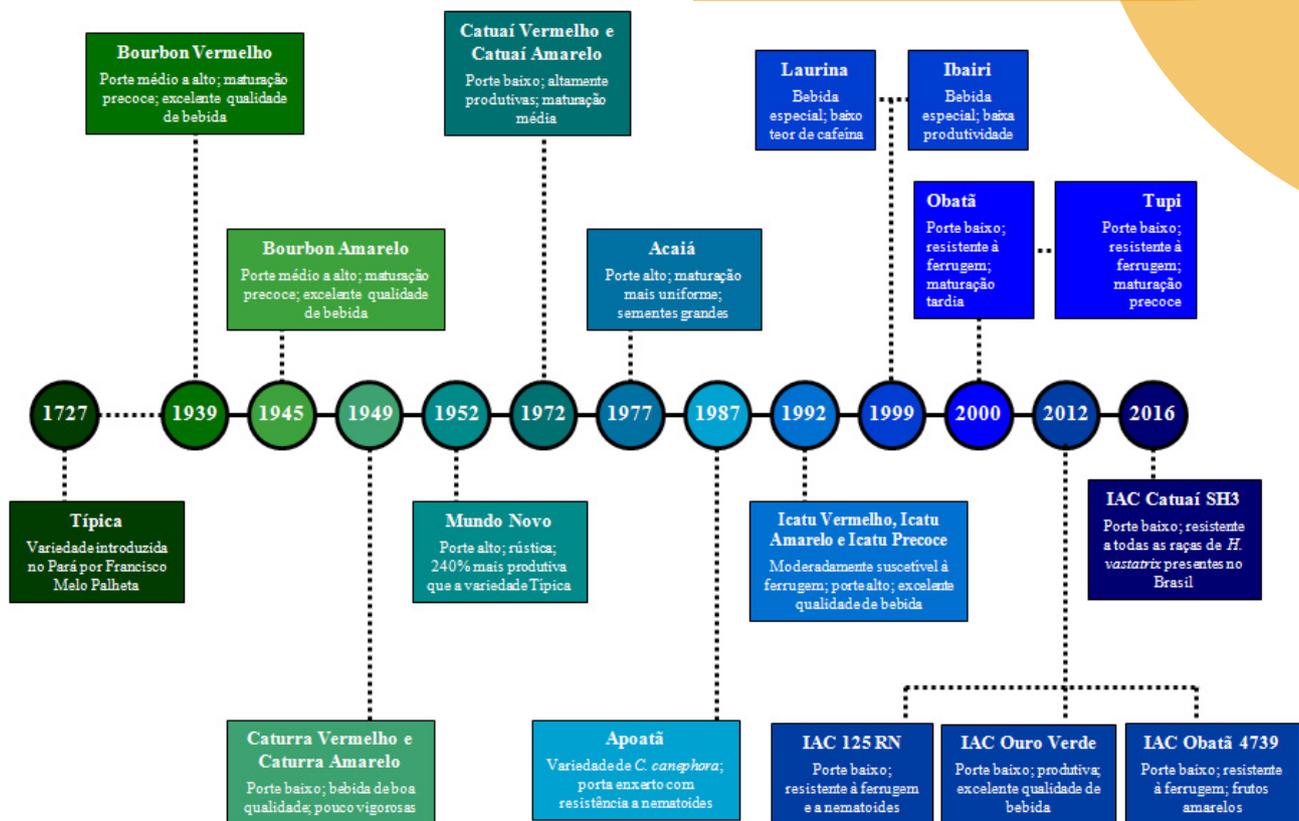


Figura 1. Cultivares de café arábica lançadas pelo Instituto Agrônomo e registradas no Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

O estabelecimento e a eficaz gestão de uma valiosa coleção de recursos genéticos e a continuidade das pesquisas de um programa de seleção varietal, elaborado pela instituição no início dos anos 30, foram fundamentais para a obtenção da quase totalidade

das cultivares nacionais. Cultivares bem mais produtivas do que a variedade Típica, introduzida e cultivada sem seleção no país, foram disponibilizadas em um curto período de vinte anos, com ganhos extraordinários na capacidade produtiva das plantas (Figura 2).

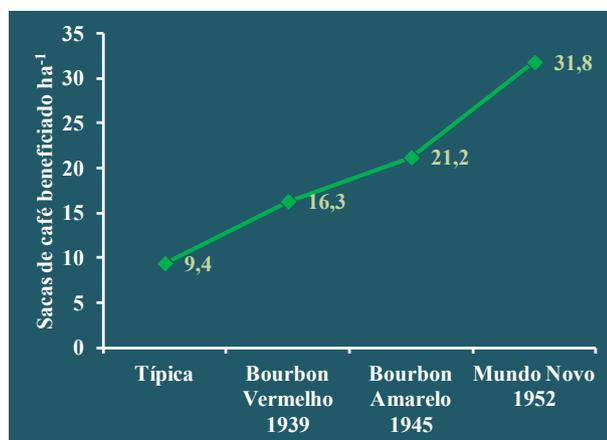


Figura 2. Aumento no potencial de produtividade - média de seis a oito anos - de cultivares brasileiras de café arábica lançadas entre 1932 e 1952. Fonte: Carvalho (1965).

Lançadas 20 anos depois, as seleções de Catuaí Vermelho e Catuaí Amarelo, são exemplos ainda atuais de inovações tecnológicas que revolucionaram a cafeicultura brasileira. As altas produtividades aliadas ao porte baixo e à arquitetura compacta das plantas tiveram impacto direto na densidade de plantio, no manejo e condução das lavouras e, especialmente, na redução do custo de produção, proporcionada pela maior facilidade de colheitas das plantas.

Entre as pesquisas básicas relacionadas à herança de caracteres das plantas destacam-se os estudos sobre a resistência do cafeeiro à ferrugem que tiveram início 20 anos antes da constatação do agente causador da doença, no Brasil e também aqueles referentes aos nematoides, praga disseminada por cafezais de todo país. Estas pesquisas

permitiram o lançamento do único porta-enxerto recomendado para cultivares suscetíveis a nematoides e de uma série de cultivares resistentes à ferrugem como Icatu, Obatã IAC 1669-20, Tupi IAC 1669-33, IAC Obatã 4739, IAC 125 RN e IAC Catuaí SH3. Estas duas últimas (Figura 3) são resistentes às 17 raças do fungo atualmente identificadas no Brasil e, respectivamente, resistente aos nematoides *Meloidogyne exigua* raças 1 e 2 e *M. incognita* raça 1 e tolerante ao déficit hídrico. Deve-se ressaltar o aumento contínuo no potencial produtivo das novas cultivares. Em 2019, em um concurso regional no Cerrado Mineiro, um produtor obteve prêmio de produtividade, na categoria 'irrigado safra anual', produzindo pouco mais de 160 sacas de café por hectare com a cultivar IAC 125 RN.



Figura 3. Cultivares IAC 125 RN - resistente à ferrugem e a nematoides (A) e IAC Catuaí SH3 - resistente à ferrugem e tolerante ao déficit hídrico (B).

Atualmente, uma importante vertente das pesquisas institucionais se dirige à agregação de valor, especialmente pelo aporte de qualidade ao produto, por meio da seleção de cultivares produtoras de cafés com características físicas, sensoriais e químicas, como a ausência quase completa de cafeína nos grãos. Embora ganhos expressivos

relacionados à eficiência e à qualidade (Figura 4) tenham sido obtidos até o momento pelo uso exclusivo de métodos clássicos de seleção, o Programa de Melhoramento do Cafeeiro do IAC vem utilizando técnicas e estratégias de natureza molecular visando maior eficácia no alcance de seus objetivos.

Ganhos	Mecanismo	Característica
Eficiência	Redução do custo de produção	Potencial produtivo Porte e arquitetura Resistência a pragas e doenças Tolerância ao déficit hídrico
Qualidade	Agregação de valor ao produto	Ciclo de maturação dos frutos Perfil sensorial Características físicas e químicas dos grãos Teor reduzido de cafeína

Figura 4. Características de cultivares de café selecionadas pelo IAC e ganhos relacionados à qualidade ou eficiência proporcionados respectivamente por meio da redução de custos de produção ou pela agregação de valor ao produto.

A associação da biologia molecular ao melhoramento do cafeeiro visa aprofundar o conhecimento dos caracteres genéticos estudados pelos melhoristas. Ela gera informações para subsidiar o processo de seleção de materiais genéticos e desenvolvimento de cultivares, somando a isso a expectativa de redução no tempo de obtenção desses produtos. As informações contidas nas moléculas de DNA e RNA dos acessos, genótipos elites, populações em

seleção, e cultivares de café são traduzidas em marcadores moleculares que irão aumentar o poder de análise genética realizada pelo melhorista. Isso é feito pela associação de marcas moleculares à característica de interesse, determinando o efeito genético sobre essa característica, e tornando desnecessária a estimativa da interferência do ambiente no qual as plantas estão sendo avaliadas. Assim, abre-se a possibilidade de otimização das áreas experimentais, dos recursos financeiros

e humanos dedicados às avaliações no campo. Isso porque o cafeeiro é uma cultura perene, e muitas características que seriam avaliadas ao longo dos anos, em vários locais e nas plantas em produção, poderão ser preditas a partir das marcas observadas no genoma delas.

As metodologias de avaliações genéticas que usam o DNA estão em contínuo aperfeiçoamento, e as formas de manipulação desta molécula progredem a uma velocidade sem precedentes. Dentre os marcadores de DNA, atualmente, os SNP ou “polimorfismo de único nucleotídeo” são os mais explorados pelo Programa de Melhoramento do Cafeeiro do IAC. Os SNP são modificações pontuais e herdáveis nas sequências do DNA, que ocorrem em abundância no genoma, resultam em elevado nível de variabilidade genômica, e sua detecção pode ser facilmente automatizada. Isso se deve à viabilização de análises em larga escala através de técnicas como a GBS ou “genotipagem pelo sequenciamento” que rapidamente sequenciam todo o genoma do cafeeiro. Acompanhando a GBS, grande revolução vem ocorrendo nos métodos de análises genéticas, de bioinformática e de acúmulo e disponibilização de informações em banco de dados. A abundância e o poder discriminatório dos SNP os tornam marcadores estratégicos para serem associados aos métodos de melhoramento da cultura, principalmente,

ao considerarmos a estreita base genética das cultivares de café arábica no Brasil, as quais inicialmente partiram de apenas dois materiais introduzidos - o Típica e o Bourbon.

Além do DNA, também as análises da molécula do mRNA podem fornecer subsídios ao programa de melhoramento na prospecção de genes de interesse. O mRNA é um produto da transcrição de um gene que será traduzido em uma proteína com função específica nas células. Tanto a PCR em tempo real quanto o RNA-Seq (sequenciamento do RNA) são métodos utilizados para detecção da expressão diferencial de genes a partir do mRNA. Na PCR em tempo real, o mRNA de determinado gene de interesse é extraído de plantas submetidas a condições experimentais contrastantes. Esse mRNA passa por um processo de transcrição reversa para obter o cDNA, correspondente ao gene de interesse, que será amplificado e terá o seu número de cópias quantificado. Dessa maneira, pode-se quantificar a expressão do gene nas condições avaliadas. Já no RNA-Seq, o genoma expresso nas condições biológicas experimentais é todo sequenciado em larga escala, a partir de pequenos fragmentos de mRNA e, com o uso de ferramentas de bioinformática, as sequências diferencialmente expressas são anotadas e inúmeros genes são identificados em banco de dados públicos.

Os genes são categorizados em função dos processos que participam e são identificadas as rotas metabólicas das quais participam, estabelecendo assim, sua relação com a resposta às condições estudadas. Num próximo passo, o RT-PCR é utilizado para validar os genes de interesse obtidos a partir do RNA-Seq. A seguir é descrito como as estratégias da biotecnologia e genômica estão associadas a importantes linhas do Programa de Melhoramento do Cafeeiro no Instituto Agrônomo do estado de São Paulo.

Caracterização do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de *Coffea* spp.

Os programas de melhoramento dependem diretamente da disponibilidade de populações e acessos de *Coffea* spp. bem caracterizados em relação ao seu potencial para transferência de características de interesse. Apesar do sucesso dos programas de melhoramento, a caracterização desses materiais muitas vezes é realizada de forma pontual, limitada apenas aos genótipos de maior interesse conhecidos como materiais elite, e após sua obtenção, a informação nem sempre será integrada a outros dados ou estará prontamente disponível a toda equipe do melhoramento. Deve ser considerado também que *C. arabica*, a principal espécie comercial do gênero, apresenta base genética estreita

limitando muito o alcance da avaliação da diversidade genética entre os genótipos elite. Neste contexto, abordagens genômicas que utilizam informações da GBS e RNA-Seq estão sendo integradas aos métodos tradicionais de fenotipagem para a caracterização do BAG Café. Essas novas plataformas para sequenciamento de alto desempenho, associadas à bioinformática, permitem a automatização da detecção e análise dos marcadores SNP, reduzindo o uso intensivo de mão de obra que tem sido considerada um dos grandes gargalos encontrados nas instituições públicas responsáveis pelo estudo e gestão dos recursos genéticos.

Seleção assistida de cafeeiro descafeinado através de marcador SNP

O IAC incorporou em seu programa de melhoramento o estudo genético de café sem cafeína com base em uma ampla triagem, baseada em análises químicas, dos acessos originalmente provenientes da Etiópia, com variações no teor de cafeína no grão do BAG de *Coffea* spp. Foram identificadas a partir de três plantas com reduzido teor de cafeína no endosperma, teores vinte vezes abaixo do normal de cafeína em café arábica, que é de 1,2%. O processo para transferir essa característica para outros cultivares é longo e oneroso. Com o auxílio de análises de

expressão diferencial de genes, foi possível observar que aqueles que codificavam as enzimas da via de biossíntese de cafeína eram menos expressos ao longo do desenvolvimento de frutos em

comparação com o acúmulo observado em cultivares com teores de cafeína regulares (Figura 5).

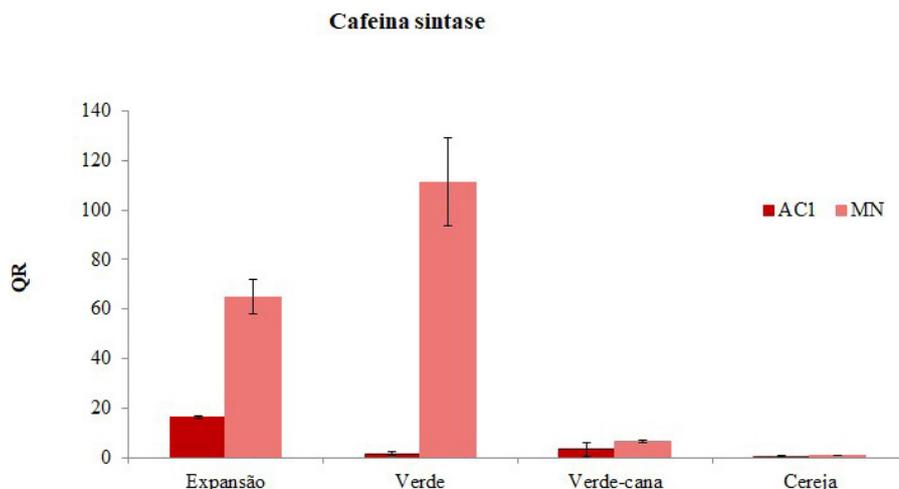


Figura 5. Variação no perfil de expressão do gene cafeína sintase ao longo da maturação de frutos da cultivar Mundo Novo (MN) e do acesso sem cafeína (AC).

A partir de comparações entre as sequências genômicas do gene *cafeína sintase* (*cs*) de plantas normais da cultivar Mundo Novo e do material sem cafeína detectamos a ocorrência de SNPs em domínios proteicos, incluindo um que resulta na substituição de um aminoácido valina por isoleucina no sítio ativo da enzima. Análises de segregação mostraram uma associação significativa entre a presença de três SNPs e a redução do teor de cafeína. Esses SNPs são atualmente utilizados como marcadores para a seleção-assistida de plantas sem cafeína pelo Programa de Melhoramento do Cafeeiro do IAC (Patente BR1020130323179).

Sua utilização permite que apenas as plantas que possuem as marcas de interesse sejam levadas a campo para serem avaliadas no melhoramento do café sem cafeína. O uso destes marcadores na seleção-assistida já é uma realidade no Programa de Melhoramento do Cafeeiro do IAC, e gerações avançadas de cruzamentos com teores de cafeína reduzidos estão em avaliações em campos experimentais.

Uma questão a ser considerada para o desenvolvimento de cultivares sem cafeína é como a falta deste composto afeta a planta como um todo, em especial, seu desempenho agrônomo. Com isto em mente, fizemos um estudo

utilizando a metodologia de RNA-Seq, para caracterização da expressão diferencial de genes em plantas com teor reduzido de cafeína. Estas análises permitiram a identificação de rotas metabólicas afetadas pela ausência de cafeína. Os resultados são bastante animadores, uma vez que poucos genes envolvidos em rotas essenciais apresentaram diferenças no perfil de expressão.

Identificação de cultivares e rastreabilidade de cafés especiais

Segundo o Conselho dos Exportadores de Café do Brasil (CECAFÉ), em 2019 o país gerou uma receita cambial de US\$ 1,2 bi com a exportação de 7,5 milhões de sacas de cafés diferenciados, aqueles com qualidade superior ou algum tipo de certificado de práticas sustentáveis. Além da origem, da sustentabilidade na produção e da avaliação dos cafés diferenciados quanto aos aspectos físicos e sensoriais, a rastreabilidade da produção é uma das principais exigências para a certificação do produto. Numa parceria entre o IAC e Embrapa Café, trabalhos foram focados no desenvolvimento de marcadores SNP, identificados em análises de genotipagem pelo sequenciamento (GBS), voltados à caracterização de cultivares comerciais e de uma coleção de Bourbons. Esses últimos são considerados materiais superiores para a produção de cafés de elevada qualidade de bebida. Já

foram identificados SNP que diferenciam grupos de cultivares de *C. arabica* em relação à uma coleção de Bourbons. Esses SNPs foram anotados e estão sendo validados para confirmar seu potencial para análises de pureza varietal e genética de amostras de grãos torrados de cultivares. Métodos de extração de DNA estão sendo otimizados em laboratório. A utilização de técnicas avançadas de sequenciamento e identificação de marcas no genoma de cultivares com qualidade sensoriais elevadas irá contribuir para a certificação do uso dessas no mercado de cafés especiais, permitindo a garantia da genética das cultivares envolvidas na cadeia de negócios do café. Este trabalho visa alcançar os setores envolvidos com a obtenção de cultivares, produtores agrícolas, exportadores e indústria de processamento dos grãos.

Investigação dos genes de defesa contra a bactéria da mancha-aureolada

A incidência da mancha-aureolada, doença de etiologia bacteriana, causada por *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* é fator limitante à formação de cafezais em regiões propícias ao desenvolvimento do patógeno e com alto potencial de inóculo. A manifestação da doença ocorre na forma de lesões irregulares, de coloração marrom escura e aspecto translúcido/encharcado com halo amarelado ao redor, em

decorrência de compostos tóxicos excretados pela bactéria que causam a transformação do tecido vegetal utilizado como substrato para sua multiplicação. A bactéria tem a capacidade de invadir o sistema vascular da planta, podendo ocasionar a morte da mesma.

O processo de seleção de cultivares resistentes à doença por métodos tradicionais de melhoramento, por meio de hibridações e seleção, pode se estender por mais de 20 anos. Com intuito de reduzir este período, o IAC em parceria com a FIOCRUZ e a Embrapa Café, Informática Agropecuária e Tabuleiros Costeiros - associou ao Programa de Melhoramento do Cafeeiro, análises de transcriptoma pela técnica de RNA-Seq, procurando desvendar os mecanismos de resistência das plantas à bactéria e desenvolver uma técnica molecular segura visando à seleção de cafeeiros resistentes, em larga escala. Após a triagem de milhares de genes potencialmente associados à resistência das plantas, alguns deles vêm sendo intensamente investigados em relação à participação do metabolismo de defesa das plantas e ao uso potencial em um processo de seleção assistida de cafeeiros resistentes. Entre estes, encontram-se genes ligados ao estresse oxidativo, transportadores de potássio e de fator de transcrição responsivo ao etileno.

Todos estes genes podem estar associados à indução da resposta de defesa dependente da sinalização por fitormônios.

Caracterização de mecanismos de resistência ao bicho-mineiro

Considerada a principal praga do cafeeiro, o bicho-mineiro (*Leucoptera coffeella*) aparece em todas as regiões produtoras de café do país. As lesões causadas pelo bicho-mineiro entre as epidermes, também denominadas galerias ou minas, têm bordos irregulares, são de coloração amarelo pálido e posteriormente tornam-se pardacentas. Todo germoplasma de *C. arabica* avaliado até o presente é altamente suscetível ao bicho-mineiro. Um dos objetivos do Programa de Melhoramento de Cafeeiro do IAC é o desenvolvimento de cultivar de *C. arabica* resistente a essa praga visando a sustentabilidade econômica e ambiental da produção do café. Para que isto se torne realidade, estudos sobre os mecanismos de resistência ao bicho-mineiro em cafeeiros estão em andamento, inclusive utilizando análises de expressão de genes em larga escala. Em um estudo pioneiro em parceria com a Embrapa Café caracterizamos a expressão diferencial de genes ao longo do ciclo de infestação do inseto em plantas resistentes e suscetíveis. Um total de 2.137 genes foram identificados com expressão diferencial, associados em sua maioria com processos do metabolismo primário das plantas e regulação de processos celulares. Também identificamos 10 vias metabólicas contendo genes com perfil de expressão diferencial entre plantas resistentes

e suscetíveis. Entre estas vias, selecionamos 3 para identificação de genes com SNPs: ciclos do citrato (Figura 6) e do ácido linoleico, e metabolismo de fenilpropanoides. Atualmente, estamos

avaliando SNPs em genes destas vias como candidatos a marcadores para seleção-assistida de cultivares resistentes ao bicho-mineiro.

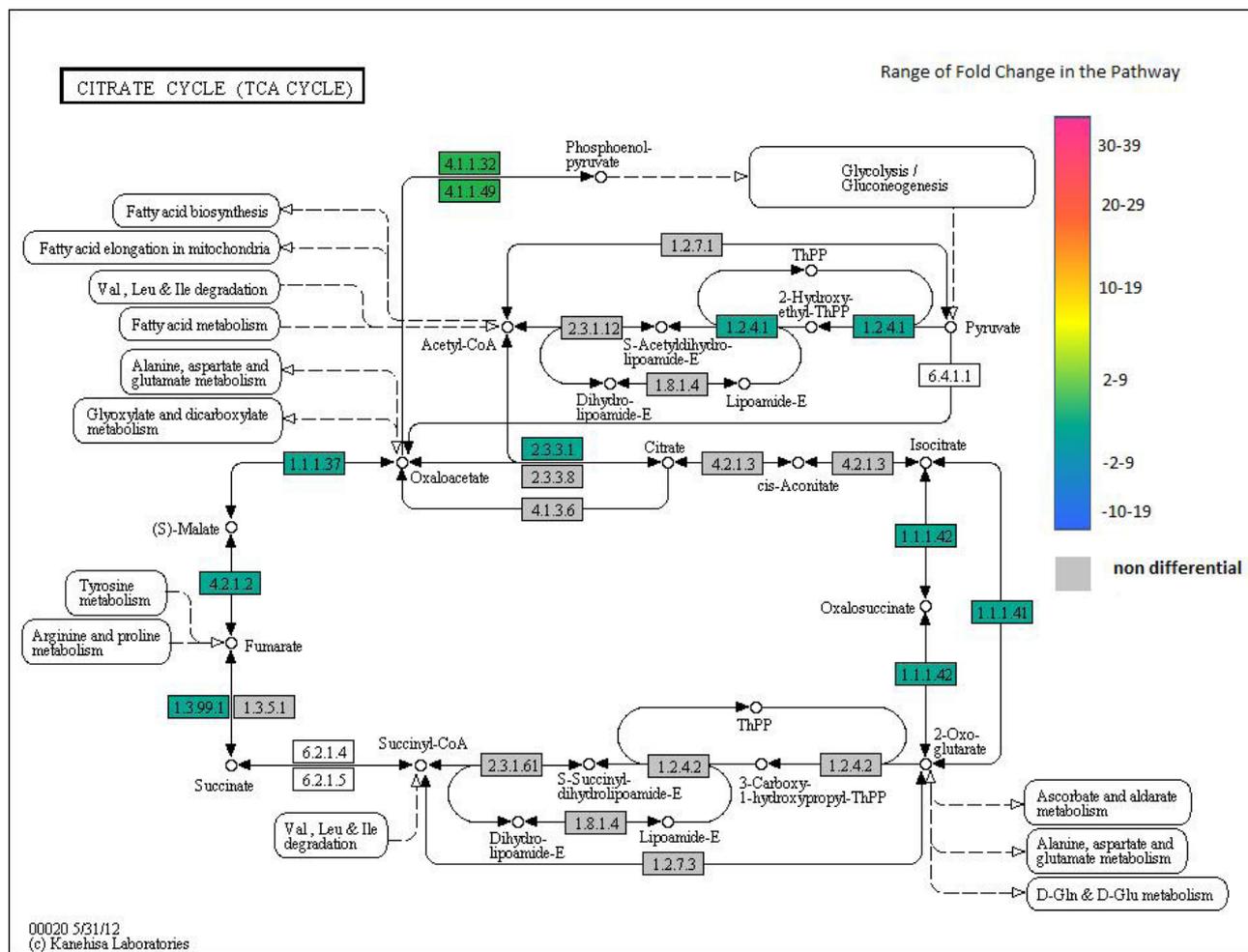


Figura 6. Ciclo do citrato (adaptado de Cardoso et al., 2014), indicando os genes com expressão diferencial entre plantas resistentes e suscetíveis infestadas pelo bicho-mineiro. A escala de cor indica a variação no nível de expressão.

Seleção genômica ampla (SGA) para estresses bióticos e considerações finais

O Programa de Melhoria do Cafeeiro do IAC conta com populações para seleção de diferentes características

de interesse agrônomo, em especial a resistência a estresses bióticos provocados por bicho-mineiro, nematoides, ferrugem e mancha-aureolada. Aspectos relacionados com a restrita variabilidade genética destas populações, alto custo de

manutenção e avaliação de progênes, o desenvolvimento tardio de características de interesse, a baixa disponibilidade de genótipos contrastantes adequados para estudos genômicos, uma vez que a maioria das populações mantidas se encontra em gerações avançadas de cruzamentos, limitam o desenvolvimento de novas cultivares de café. Neste contexto, o uso de abordagens genômicas integradas aos métodos tradicionais de melhoramento genético e estatística podem elevar a eficiência do processo de seleção e obtenção de novas cultivares.

Com o custo de fenotipagem cada vez mais elevado, a disponibilidade de dados genômicos com ampla cobertura dos genótipos favorece o desenvolvimento da chamada seleção genômica ampla, ou SGA. Na SGA há uma mudança no paradigma de seleção, e o instrumento principal é o polimorfismo genômico ao invés da análise fenotípica tradicional. Esta inversão é viabilizada por modelos estatísticos preditivos, desenvolvidos a partir da análise conjunta de dados de genotipagem e fenotipagem em larga-escala de populações estabelecidas para este fim. Para obtenção de dados de genotipagem em larga-escala estão sendo utilizadas estratégias com RNA-Seq e GBS. Para iniciar a integração da estratégia de SGA ao programa de melhoramento foi escolhido o bicho-mineiro como problema modelo a ser

estudado. Em experimentos realizados com populações avançadas no processo de seleção de materiais genéticos com resistência variável ao bicho-mineiro, a SGA tem se mostrado promissora na identificação de associações de SNP com a resistência ao bicho-mineiro.

Com resultados iniciais significativos para a associação de marcadores à resistência ao bicho-mineiro, a estratégia de desenvolvimento de modelos preditivos para seleção genômica ampla de cultivares com resistência a estresses bióticos é a maior e mais atual aposta para o aumento da eficácia do programa de melhoramento clássico do cafeeiro.

Referências

CARDOSO, D.C.; MARTINATI, J.C.; GIACHETTO, P.F.; VIDAL, R.O.; CARAZZOLLE, M.F.; PADILHA, L.; GUERREIRO-FILHO, O.; MALUF, M.P. Large-scale analysis of differential gene expression in coffee genotypes resistant and susceptible to leaf miner-toward the identification of candidate genes for marker assisted-selection. *BMC Genomics*, v. 15, p. 1-20, 2014.

CARVALHO, A. Genética e melhoramento do cafeeiro. *Ciência e Cultura*, v.17, n. 4, p. 549-554, 1965.