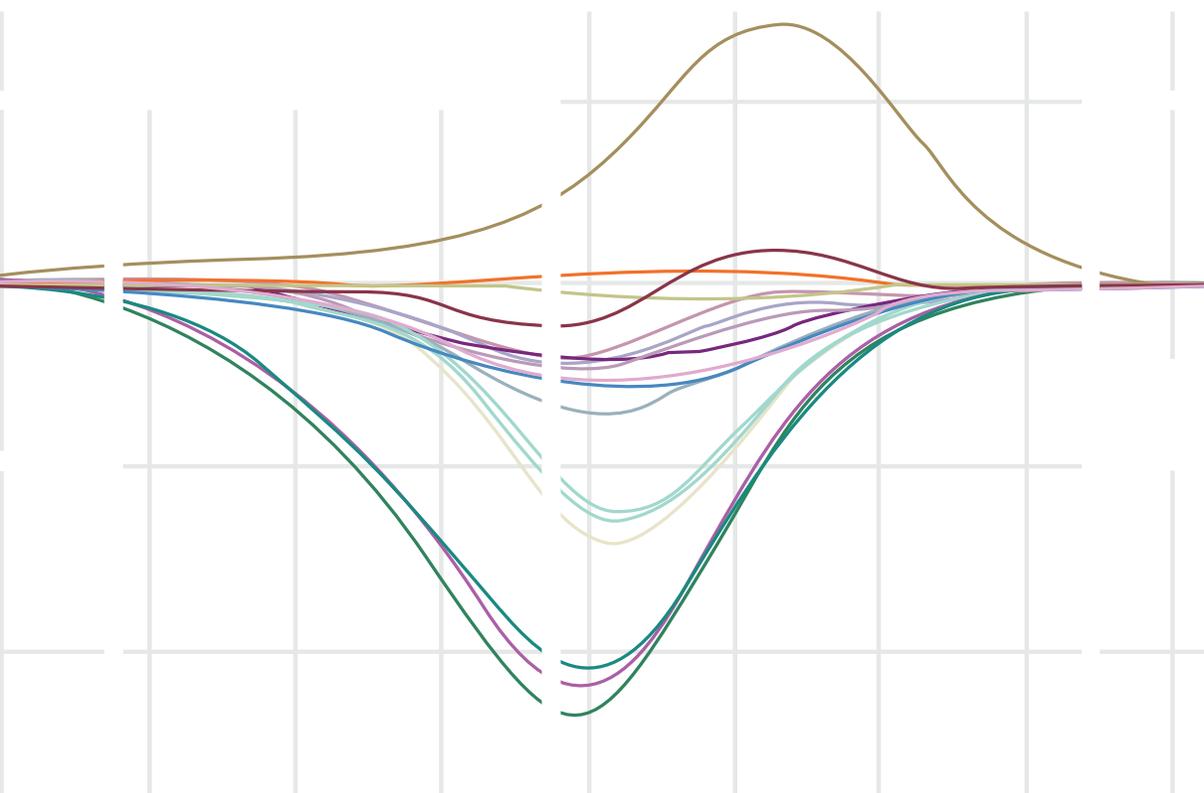


Identificação e Validação de Marcadores Moleculares para Seleção Assistida de Cafeeiros com Teores Reduzidos de Cafeína



Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Café
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

BOLETIM DE PESQUISA
E DESENVOLVIMENTO
5

Identificação e Validação de Marcadores
Moleculares para Seleção Assistida de
Cafeeiros com Teores Reduzidos de Cafeína

Mirian Perez Maluf

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Café
Parque Estação Biológica (PqEB)
Av. W3 Norte (final), Ed. Sede
CEP: 70770-901, Brasília, DF
Fone: +55 (61) 3448-4378 / 4010
Fax: +55 (61) 3448-1797
www.embrapa.br
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações da Embrapa Café

Presidente
Lucas Tadeu Ferreira

Vice-Presidente
Jamilsen de Freitas Santos

Secretária-Executiva
Adriana Maria Silva Macedo

Membros
Anísio José Diniz, Carlos Henrique Siqueira de Carvalho, Helena Maria Ramos Alves, Lucilene Maria de Andrade, Mauricio Sergio Zacarias, Milene Alves de Figueiredo Carvalho, Omar Cruz Rocha, Rogério Novais Teixeira, Roseane Pereira Villela.

Revisão de texto
Jane Baptistone de Araújo

Normalização bibliográfica
Rejane Maria de Oliveira Cechinel Darós

Tratamento das ilustrações
Thiago Farah Cavaton

Projeto gráfico da coleção
Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica
Thiago Farah Cavaton

Ilustração da capa
Mirian Perez Maluf

1ª edição
Publicação digital (2022): PDF

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610)

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa, Superintendência de Comunicação

Identificação e validação de marcadores moleculares para seleção assistida de cafeeiros com teores reduzidos de cafeína / Mirian Perez Maluf. – Brasília, DF : Embrapa Café, 2022.

PDF (16 p.). – (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Café, ISSN 2237-9738 ; 5)

1. *Coffea arabica*. 2. Germoplasma. 3. Melhoramento genético. 4. Cafeína. 5. Fisiologia. 6. Anatomia 7. Produtividade. I. Título. II. Série.

CDD (21.ed.) 633.73

Sumário

Resumo	5
Abstract	6
Introdução.....	7
Material e Métodos	9
Resultados e Discussão	13
Conclusões.....	15
Agradecimentos.....	15
Referências	15

Identificação e Validação de Marcadores Moleculares para Seleção Assistida de Cafeeiros com Teores reduzidos de Cafeína

Mirian Perez Maluf¹

Resumo – O uso de ferramentas genômicas para seleção assistida representa um avanço tecnológico para programas de melhoramento de espécies perenes, como o café. Aqui se apresenta um conjunto de marcadores moleculares para seleção de cafeeiros sem cafeína. O objetivo é validar marcadores moleculares para seleção assistida. Os marcadores foram identificados no gene *caffeine synthase*, comparando-se sequências de plantas normais e de AC1, uma planta naturalmente livre de cafeína. A análise molecular dessas sequências genômicas indicou a ocorrência de *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs) em domínios proteicos, potencialmente associados à síntese de cafeína. Progenies de populações do cruzamento entre AC e cultivares elite foram avaliados tanto em relação ao teor de cafeína em grãos quanto ao perfil de segregação genômica para os SNPs selecionados. Essa genotipagem permitiu a discriminação entre plantas homozigotas e heterozigotas para o alelo mutante. Análises estatísticas mostraram uma associação entre a presença dos SNPs e a redução do teor de cafeína. Além disso, essa associação ocorreu em todos os genótipos avaliados, com diferentes origens genéticas e gerações de cruzamentos, indicando uma estabilidade do padrão de herança da característica e dos marcadores. Os marcadores moleculares descritos representam um caso bem-sucedido de seleção assistida no café, indicando seu potencial uso para o desenvolvimento de cultivares livres de cafeína.

Termos para indexação: *Coffea arabica*, germoplasma, melhoramento genético, cafeína.

¹ Bióloga, PhD em Genética Molecular de Plantas, pesquisadora da Embrapa Café/Instituto Agronômico, Centro de Café Alcides Carvalho, Campinas, SP.

Molecular Markers Identification and Validation for Assisted Selection of Coffee Trees with Reduced Levels of Caffeine

Abstract – The use of genomic tools for assisted selection represents a technological advance for breeding programs of perennial species, such as coffee. This work presents a set of molecular markers for assisted selection of caffeine-free coffee cultivars. This work aims to validate molecular markers for assisted selection. The markers were at the caffeine synthase gene, identified from genomic sequences of normal plants and the mutant AC1, a naturally caffeine-free plant. Molecular analysis of normal and mutant genomic sequences indicated the occurrence of Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) in protein domains, potentially associated with caffeine synthesis. Population progenies resulting of the crossing between AC and elite cultivars were evaluated both in relation to the caffeine content in grains and the genomic segregation profile for the selected SNPs. This genotyping allowed the discrimination between homozygous and heterozygous plants for the mutant alleles. Statistical analyses of genotyping and phenotyping results showed a significant association between the presence of selected SNPs and the reduction of caffeine content. In addition, this association occurs in all genotypes evaluated, with different genetic origins and generations of crosses, indicating a stability of the pattern of inheritance of the characteristic and markers. The molecular markers described here represent a successful case of assisted selection in coffee, indicating its potential use for the development of caffeine-free cultivars.

Index terms: *Coffea*, germplasm, molecular breeding, caffeine.

Introdução

A cafeína é o composto mais conhecido e investigado do grão de café tanto por seus efeitos na saúde humana quanto por seu papel na fisiologia das plantas de café. Apesar de a cafeína produzir características sensoriais típicas em bebidas à base de café, em algumas situações seus efeitos sobre a saúde humana não são desejáveis. Para atender a demanda por cafés com teores reduzidos de cafeína nos grãos, a sua retirada é feita pela indústria de processamento de café a partir de lavagens com solventes e água. Nesse processo, além da cafeína são também removidos do grão outros compostos essenciais para compor o perfil sensorial do café, o que resulta em um café com qualidade inferior. Nesse contexto, vários esforços em programas de melhoramento de café de diferentes instituições buscam desenvolver cultivares de café naturalmente livres de cafeína, e que ainda mantenham outros atributos sensoriais e de qualidade.

Considerando o peso seco do grão, o teor de cafeína na maioria das cultivares de *Coffea arabica* é em torno de 1%, e as cultivares de *Coffea canephora* têm cerca de 2%. Esses valores são bem constantes. Variações nos teores de cafeína são encontradas em alguns genótipos de *C. arabica*, como a variedade Laurina, que tem cerca de 0,6% (Tango; Carvalho, 1963), e em outras espécies de *Coffea* que possuem teores mais baixos de cafeína em grãos, como *Coffea dewevrei* (1,0%), *Coffea eugenioides* (0,4%), *Coffea salvatrix* (0,7%) e *Coffea racemosa* (0,8%) (Mazzafera; Carvalho, 1991). Além disso, outras espécies como *Coffea pseudozangebariae* e *Coffea richardii* não têm cafeína em grãos (Campa et al., 2005).

Estudos demonstraram que o teor da cafeína resulta de um equilíbrio entre sua síntese e a degradação. A biossíntese da cafeína envolve passos de metilação de grupos de adeninas realizados por enzimas do grupo das metiltransferases. Três enzimas, 7-metilxanthosina sintase, teobromina sintase e cafeína sintase, são responsáveis por essa síntese, dos quais os principais intermediários são metilxanthosina e teobromina. Em Ashihara et al. (2008), há uma revisão abrangente da biossíntese da cafeína em plantas de café. Uma análise que utilizou compostos radioativos como substratos estabeleceu o perfil da atividade dessas metiltransferases em frutos de variedades de *C. arabica*, incluindo a Laurina. Os autores concluíram que

as taxas de síntese e degradação da cafeína nos grãos mudam ao longo da maturação do fruto (Mazzafera et al., 1994). Em outro estudo semelhante, Ashihara e Crozier (1999) demonstraram que os baixos níveis de cafeína observados em frutos de *C. eugenoides* resultam de uma lenta síntese associada a uma rápida degradação.

Para desenvolver cultivares de café com baixa cafeína, pode-se transferir a característica de espécies de *Coffea* com baixos teores de cafeína para *C. arabica*, por meio de cruzamentos interespecíficos controlados. No entanto, essa estratégia não teve sucesso principalmente devido a limitações nesses cruzamentos (Charrier, 1978; Mazzafera; Carvalho, 1991). Em outra estratégia, Silvarolla et al. (2000) focaram na variabilidade natural do teor de cafeína em acessos silvestres de *C. arabica* coletadas na Etiópia, país que é o centro de origem da espécie. A quantificação da cafeína nos grãos desses acessos revelou uma variabilidade diretamente associada à origem geográfica (Silvarolla et al., 2000). Posteriormente, Silvarolla et al. (2004) identificaram três plantas (AC1, AC2 e AC3) com um teor de cafeína em grãos de 0,076%, o que abriu a perspectiva para o desenvolvimento de cultivar naturalmente livre de cafeína. Apesar da ausência de cafeína, os grãos do AC1 têm composição química e qualidade de bebida semelhantes a cafés com teores regulares do composto (Benatti et al., 2012). Nesse contexto, cruzamentos entre AC1 e a cultivar Mundo Novo (MN) representaram o primeiro passo do programa de melhoramento com o objetivo de transferir a característica de baixa cafeína para cultivares de elite de *C. arabica*.

Análises moleculares do genótipo AC1 revelaram vários aspectos que interferem na característica de baixa cafeína. Benatti et al. (2012) verificaram que os frutos AC1 são menores que os de MN, e há redução na atividade das enzimas teobromina sintase e cafeína sintase. Análises moleculares do perfil de expressão gênica indicaram que, em AC1, há uma redução no acúmulo de transcritos dos genes que codificam as metiltransferases, ao longo de todo o desenvolvimento dos frutos (Maluf et al., 2009). Essa redução é bastante expressiva para o gene cafeína sintase, que apresenta níveis quase nulos de transcritos em frutos e folhas. Além disso, a sequência genômica do gene cafeína sintase em AC1 apresenta vários polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs), incluindo um polimorfismo que resulta em substituição de uma valina por uma isoleucina no sítio ativo da enzima (Maluf et al., 2009). Assim,

conclui-se que o baixo teor de cafeína em plantas AC1 é resultado de uma combinação de pelo menos dois fatores: expressão gênica reduzida e uma possível mutação *knock-out* do gene cafeína sintase.

A seleção de cafeeiros naturalmente livres de cafeína a partir de populações segregantes é uma tarefa árdua. O alto custo de manutenção de populações *in situ*, a eficácia limitada dos métodos analíticos para o teor de cafeína, e especialmente o longo período juvenil, que resulta em baixa correlação entre os níveis de cafeína detectados nas folhas e grãos das populações em seleção, são grandes desafios para os melhoristas. Atualmente, marcadores moleculares para seleção assistida são utilizados com sucesso como ferramentas na seleção de características de interesse agrônômico em várias espécies de plantas.

Os polimorfismos identificados em plantas AC1 representam potenciais marcadores moleculares para seleção assistida de cultivares descafeinadas. Para essa finalidade, é necessária a validação desses marcadores, ou seja, estabelecer uma associação direta entre a presença do SNP e a ausência de cafeína em tecidos das plantas, a partir de análises moleculares e químicas, em coleções de plantas especificamente desenvolvidas para essa finalidade. Assim, a disponibilidade tanto dos marcadores SNPs quanto das populações para análise é condição essencial para a confirmação dessa associação.

Nesse contexto, o objetivo principal deste trabalho é identificar e validar potenciais marcadores moleculares para seleção assistida de cafeeiros com teores reduzidos de cafeína, partindo dos SNPs observados no gene cafeína sintase.

Material e Métodos

Material vegetal

Foram coletadas folhas jovens e sadias de 161 plantas de café correspondentes às distintas fases do programa de seleção, desenvolvidas pelo programa de melhoramento de café do Instituto Agrônômico (IAC) de Campinas, e as seguintes plantas *in situ* em campos de avaliação: 106 plantas da geração F_2 , 20 de retrocruzamento ($F_1 \times RC_1$) e 27 acessos do BAG *Coffea*. A lista de genótipos avaliados é apresentada a seguir.

AC1 – Variedade de *C. arabica* naturalmente descafeinada, homozigota para o alelo SNP1.2, não segregante, com teor mínimo de cafeína em sementes e controle positivo (planta modelo).

AC2 – Variedade de *C. arabica* naturalmente descafeinada, heterozigota para o alelo SNP1.2, segregante para teores normais e reduzidos de cafeína.

AC3 – Variedade de *C. arabica* naturalmente descafeinada, heterozigota para o alelo SNP1.2 e segregante.

Mundo Novo IAC 376-4 (MN) – Cultivar de *C. arabica*, heterozigota, com três cópias do alelo SNP1.2, não segregante, teores normais de cafeína no grão e na folha e controle negativo.

Catuai Vermelho IAC144 (CA144) – Cultivar de *C. arabica*, heterozigota, número de cópias do alelo SNP1.2 desconhecido, não segregante e teores normais de cafeína no grão e na folha.

Obatã IAC1669 (OB) – Cultivar oriunda de cruzamento de *C. arabica* com *C. canephora*, número de cópias do alelo SNP1.2 desconhecido, não segregante e teores normais de cafeína no grão e na folha.

Extração de DNA

O DNA foi obtido a partir de folhas jovens de mudas e/ou plantas adultas de café, coletadas e imediatamente imersas em nitrogênio líquido. O protocolo de extração foi adaptado para o café de Doyle e Doyle (1990). As folhas foram maceradas também em nitrogênio líquido, o material vegetal foi transferido para microtubos e foi adicionado tampão de extração (2% PVP, 2% CTAB, 0,5M Tris-HCl pH 8,0, 0,25M EDTA pH 8, 0,2% β -mercaptoetanol e água ultrapura). Os macerados foram misturados com a utilização do equipamento Vórtex. Os produtos foram submetidos aquecidos em banho-maria a 65°C durante 30 minutos. Após esse período, foi adicionado 1 volume de clorofórmio: álcool isoamílico, na proporção 24:1, misturando-se gentilmente. A seguir, os tubos foram submetidos à centrifugação durante 10 minutos a 13.000 xg. Após a centrifugação, os sobrenadantes foram transferidos para novos microtubos, e foram adicionados 200 μ L de tampão de extração e 1 volume de clorofórmio: álcool isoamílico na proporção 24:1. As misturas foram então centrifugadas a 13.000 xg por 10 minutos.

Após esse período, iniciou-se o processo de lavagem das amostras e os sobrenadantes foram transferidos para novos microtubos, adicionando-se 1 volume de clorofórmio. As misturas foram submetidas à centrifugação a 13.000 xg por 10 minutos. O processo de lavagem foi repetido por três vezes. Após a lavagem, os sobrenadantes foram coletados e a esses adicionou-se 1 volume de isopropanol absoluto gelado. Imediatamente após a adição, os sobrenadantes foram misturados por inversão. Os tubos foram incubados por pelo menos três horas sob temperatura de -20°C. Após esse período de incubação, os tubos foram submetidos a centrifugação a 13.000 xg durante 3 minutos. Os sobrenadantes foram descartados e os precipitados foram lavados com 250 µL de etanol 70%. O processo de lavagem de cada pellet foi repetido três vezes. Após a lavagem, os precipitados foram ressuspensos com 40 µL de água ultrapura. Para eliminar vestígios de RNA, adicionaram-se 2 µL de RNase, e as amostras foram incubadas por 30 minutos a 37°C. Após esse período, o DNA ressuspensionado foi armazenado em freezer (-20 °C) para posteriores análises.

Análise e integridade do DNA extraído

A quantificação do DNA extraído foi verificada via espectrofotômetro, analisando-se as relações 260/280 e 260/230. A quantidade foi obtida a partir do cálculo da quantidade obtida na leitura da absorbância em 260. A integridade foi verificada via eletroforese em gel de agarose [1,5%] corado com brometo de etídeo.

Desenvolvimento de sondas aleloespecíficas

Foram realizados alinhamentos de sequências de DNA genômico e sequências expressas (ESTs) correspondentes ao gene *caffeine synthase*, provenientes tanto do banco de dados do Projeto Brasileiro do Genoma Café (CafEST) quanto do National Center for Biotechnology Information (NCBI). Por meio do alinhamento de sequências, é possível alcançar níveis máximos de identidade com o objetivo de estimar o grau de similaridade e possível homologia. O alinhamento das sequências permitiu a identificação de dois SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*) entre as sequências gênicas de AC1 e MN. Com base no alinhamento

das sequências, foram desenhados conjuntos de *primers* e sondas do tipo TaqMan para amplificarem por qPCR os produtos que contêm os SNPs de interesse, utilizando o programa Primer Express 3.0. As sequências desses conjuntos são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Sequências de *primers* e sondas, tipo de fluorescência, posição dos SNPs no gene *caffeine synthase* e tamanho esperado dos alelos para os SNPs AC e NR.

Primers	Sequência	T _m (°C)	Amplicon (bp)	Exon
CS SNP1.2	F: CAAAGGGTGCATTTACTCTTCC	63,5	87	2
	R: GGCCACGTGAAATCAACTCT	64		
Sondas	Sequência	Fluorescência	Base (bp)	Quencher
SNP1.2AC	CGTCCGCCCGTCCAGAAG	VIC	18	MGB
SNP1.2NR	GGTCCGCCCATCAAGAAG	FAM	18	MGB

Extração de DNA

Para análise de PCR em tempo real, utilizaram-se as amostras de DNA genômico (20 ng/μL), os *primers* específicos e uma sonda aleloespecífica para verificação da amplificação absoluta. Para cada amostra, foi adicionado um mix que continha 7,5 μL de Máxima Probe qPCR Master Mix (Applied Biosystems); 0,3 μL da sonda específica (10 μM); 1,35 μL de *primer forward* e 1,35 μL de *primer reverse* (10 μM); 2,0 μL de água ultrapura, 2,0 μL de DNA genômico, somando-se um volume final de 15 μL de mix por *well* da placa.

Após a preparação da placa, a análise de quantificação absoluta foi submetida a PCR em tempo real, utilizando-se o software 7300 System SDS da Applied Biosystems, na programação *Allelic Discrimination*, que é indicada no manual do fabricante. Cada genótipo foi avaliado em triplicata. A determinação da presença/ausência dos alelos AC e NR é feita pela análise do Ct. Na ausência de um alelo no genoma, o Ct da amostra é “indeterminado”, o que indica que não ocorre amplificação de nenhum fragmento de DNA na presença daquele conjunto de *primers*/sonda.

Resultados e Discussão

Os resultados das análises de genotipagem e dosagem de cafeína estão resumidos na Tabela 2.

Tabela 2. Genótipos avaliados, geração, presença de SNP por genótipo e variação no teor de cafeína do grão.

Genótipo	Geração	Tipo de condução	Número de plantas	SNP1.2 AC	SNP1.2 NR	Cafeína (%)
MN	S2	Livre	2	2	2	0,83–1,28
AC1	S2	Livre	2	2		0,06–0,44
AC1	Clone	Livre	2	2		0,07–0,08
AC1	S2	Autofecundação	8	8		0,03–0,27
AC2	S2	Livre	3	3	3	0,84–0,92
AC2	S2	Autofecundação	4	4	4	0,06–1,44
AC3	S2	Livre	2	2	2	0,75–0,94
AC3	S2	Autofecundação	6	6	5	0,38–1,32
(MN x AC1)	F2	Livre	38	38	36	0,07–1,24
(MN x AC1)	F2	Autofecundação	20	20	18	0,06–1,19
(AC1 x MN)	F2	Livre	4	4	2	0,25–0,96
(AC1 x MN)	F2	Autofecundação	2	2	2	0,06–0,90
(144 x AC1)	F2	Livre	8	8	7	0,06–1,36
(AC3 x MN)	F1	Controlada	5	5	5	1,25–1,36
OB x AC3	F1	Controlada	1	1	1	1,05
OB x AC2	F1	Controlada	1	1	1	1,2
144 x AC3	F1	Controlada	1	1	1	1,29
144 x AC2	F1	Controlada	1	1	1	1,43
(AC2 x AC1)	F1	Controlada	5	5	5	0,06–1,18
(AC1 x AC2)	F1	Controlada	9	9	4	0,02–1,20
(AC1 x ?)	F2	Livre	26	26	24	0,08–1,22
(OB x AC1)	F2	Livre	11	11	11	0,12–1,22
AC1 x (MN x AC1)	F1BC1	Controlada	30	30	15	0,03–1,21
(MN x AC1) x AC1	F1BC1	Controlada	10	10	7	0,05–0,97

Continua...

Tabela 2. Continuação.

Genótipo	Geração	Tipo de condução	Número de plantas	SNP1.2 AC	SNP1.2 NR	Cafeína (%)
(MN x AC1) x MN	F1BC1	Controlada	7	7	7	0,84–1,19
AC1 x (AC1 x MN)	F1BC1	Controlada	1	1	1	0,76
(BV x AC1)	F1	Controlada	1	1	1	1,06
MN x (AC1 x MN)	F1	Controlada	1	1	1	1,08
(81 x AC1)	F2	Livre	1	1	1	1,02
(OV x AC1)	F2	Livre	2	2	1	0,03–0,62
(AC3 x 144)	F1	Controlada	2	2	1	0,77–1,27

De um total de 161 plantas avaliadas, 31 apresentaram exclusivamente o alelo SNP1.2 AC e 130 apresentaram ambos os alelos SNP1.2 AC e SNP1.2 NR. Todas as 31 plantas que apresentaram exclusivamente o alelo SNP1.2 AC apresentaram teores de cafeína semelhantes aos da planta-modelo AC1, confirmando a associação do SNP com o desenvolvimento da característica ausência de cafeína. Entre as 130 plantas que continham os dois alelos (SNP1.2 AC e SNP1.2 NR), apenas 3 plantas não apresentaram teores normais de cafeína nos frutos, como seria esperado. Esse resultado sugere que a ausência de cafeína nessas plantas pode estar sob controle de outro mecanismo genético diferente do objeto deste estudo.

Os dois SNPs identificados foram validados neste estudo, o que indicou sua eficiência para discriminação alélica em plantas com teores normais e reduzidos de cafeína. As progênies genotipadas são originárias de vários cruzamentos do acesso ACs com a cultivar Mundo Novo e cultivares elites. O método de análise molecular testado aqui, o sistema TaqMan com os SNPs validados, foi utilizado para seleção assistida de gerações F3 do programa de melhoramento do IAC. Nesse caso, as análises moleculares podem ser comparadas com os resultados dos teores de cafeína obtidos por HPLC (dados não publicados). Para a genotipagem de 76 cafeeiros, a porcentagem de acerto que confrontou os resultados obtidos por RT-PCR e HPLC foi de 62%, considerando apenas os teores extremos de cafeína (0,07% e 1,2%). Aproximadamente 38% dos genótipos avaliados apresentaram teores intermediários de cafeína, portanto não puderam

ser utilizados para validação do marcador em análise. Nesse caso, novas dosagens serão realizadas quando as plantas tiverem alcançado a maturidade fisiológica.

Os resultados obtidos com esta genotipagem orientaram a seleção dos genótipos a serem transplantados para o campo. Esses genótipos, cujo teor de cafeína no fruto ainda é desconhecido, serão utilizados nos próximos passos do melhoramento.

Conclusões

Polimorfismos do tipo SNP em gene *cs* de *C. arabica* foram validados em populações segregantes para teores de cafeína, e sua associação com a característica de ausência de cafeína em populações foi estabelecida. Assim, propõe-se aqui o uso dos SNPs para seleção assistida de progênies descafeinadas em populações resultantes de cruzamentos dirigidos; e/ou para atuarem como alvos para mutação sítio-dirigida ou edição gênica.

Agradecimentos

À Financiadora de Estudos e Projetos (Finep), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e ao Consórcio Pesquisa Café pelo financiamento deste estudo.

Referências

ASHIHARA, H.; CROZIER, A. Biosynthesis and catabolism of caffeine in low caffeine-containing species of *Coffea*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 8, p. 3425-3431, July 1999. DOI <https://doi.org/10.1021/jf981209n>.

ASHIHARA, H.; SANO, H.; CROZIER, A. Caffeine and related purine alkaloids: Biosynthesis, catabolism, function and genetic engineering. **Phytochemistry**, v. 69, n. 4, p. 841-856, Feb. 2008. DOI <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.10.029>.

BENATTI, L. B.; SILVAROLLA, M. B.; MAZZAFERA, P. Characterization of AC1: a naturally decaffeinated coffee. **Bragantia**, v. 71, n. 2, p. 143-154, 2012. DOI <https://doi.org/10.1590/S0006-87052012000200001>.

CAMPA, C.; DOULBEAU, S.; DUSSERT, S.; HAMON, S.; NOIROT, M. Qualitative relationship between caffeine and chlorogenic acid contents among wild *Coffea* species. **Food Chemistry**, v. 93, n. 1, p. 135-139, Nov. 2005. DOI <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.10.015>.

CHARRIER, A. **La structure génétique des caféiers spontanés de la région Malgache**

(*Mascarocoffea*): leurs relations avec les caféiers d'origine africaine (*Eucoffea*). Paris: Orstom, 1978. 223 p. (Mémoires Orstom n° 87).

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12, p. 13-15, 1990.

MALUF, M. P.; SILVA, C. C. da; OLIVEIRA, M. de P. A. de; TAVARES, A. G.; SILVAROLLA, M. B.; GUERREIRO-FILHO, O. Altered expression of the caffeine synthase gene in a naturally caffeine-free mutant of *Coffea arabica*. **Genetics and Molecular Biology**, v. 32, n. 4, p. 802-810, 2009. DOI <https://doi.org/10.1590/S1415-47572009005000090>.

MAZZAFERA, P.; CARVALHO, A. Breeding for low seed caffeine content of coffee (*Coffea* L.) by interspecific hybridization. **Euphytica**, v. 59, p. 55-60, Nov. 1991. DOI <https://doi.org/10.1007/BF00025361>.

MAZZAFERA, P.; CROZIER, A.; SANDBERG, G. Studies on the metabolic control of caffeine turnover in developing endosperms and leaves of *Coffea arabica* and *Coffea dewevrei*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, n. 7, p. 1423-1427, July 1994. DOI <https://doi.org/10.1021/jf00043a007>.

SILVAROLLA, M. B.; MAZZAFERA, P.; FAZUOLI, L. C. A naturally decaffeinated arabica coffee. **Nature**, v. 429, n. 826, 2004. DOI <https://doi.org/10.1038/429826a>.

SILVAROLLA, M. B.; MAZZAFERA, P.; LIMA, M. M. A. de. Caffeine content of Ethiopian *Coffea arabica* beans. **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, n. 1, p. 213-215, Mar. 2000. DOI <https://doi.org/10.1590/S1415-47572000000100036>.

TANGO, J. S.; CARVALHO, A. Teor de óleo e de cafeína em variedades de café. **Bragantia**, v. 22, n. 65, p. 793-798, dez. 1963. DOI <https://doi.org/10.1590/S0006-87051963000100073>.

Embrapa

Café



MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO



CGPE 017771