

**Boletim de Pesquisa 73**  
**e Desenvolvimento** ISSN 1676 - 1340  
Novembro, 2004

---

**OBTENÇÃO DE PLANTAS DE *Coffea arabica*  
GENETICAMENTE MODIFICADAS POR BOMBARDEAMENTO  
DE CALOS EMBRIOGÊNICOS**



República Federativa do Brasil  
*Luiz Inácio Lula da Silva*  
Presidente

**Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**  
*Roberto Rodrigues*  
Ministro

**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**

**Conselho de Administração**

*José Amauri Dimárzio*  
Presidente

*Clayton Campanhola*  
Vice-Presidente

*Alexandre Kalil Pires*  
*Dietrich Gerhard Quast*  
*Sérgio Fausto*  
*Urbano Campos Ribeiral*  
Membros

**Diretoria-Executiva da Embrapa**  
*Clayton Campanhola*  
Diretor-Presidente

*Gustavo Kauark Chianca*  
*Herbert Cavalcante de Lima*  
*Mariza Marilena T. Luz Barbosa*  
Diretores-Executivos

**Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**

*José Manuel Cabral de Sousa Dias*  
Chefe-Geral

*Maurício Antônio Lopes*  
Chefe-Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento

*Maria Isabel de Oliveira Penteado*  
Chefe-Adjunto de Comunicação e Negócios

*Maria do Rosário de Moraes*  
Chefe-Adjunto de Administração

# **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 73**

## **OBTENÇÃO DE PLANTAS DE *Coffea arabica* GENETICAMENTE MODIFICADAS POR BOMBARDEAMENTO DE CALOS EMBRIOGÊNICOS**

Welcimar G. da Cunha<sup>1</sup>  
Flávia R. B. Machado<sup>2</sup>  
Giovanni R. Vianna<sup>3</sup>  
João B. Teixeira<sup>4</sup>  
Érika V.S.A. de Barros<sup>5</sup>

---

<sup>1</sup> Aluno de graduação em Ciências Agrárias, UnB

<sup>2</sup> Aluna de graduação em Ciências Biológicas, UnB

<sup>3</sup> Pesquisador, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

<sup>4</sup> Pesquisador, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

<sup>5</sup> Pesquisadora, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Serviço de Atendimento ao Cidadão

Parque Estação Biológica, Av. W/5 Norte (Final) –

Brasília, DF CEP 70770-900 – Caixa Postal 02372 PABX: (61) 448-4600 Fax: (61) 340-3624

<http://www.cenargen.embrapa.br>

e.mail:sac@cenargen.embrapa.br

### **Comitê de Publicações**

**Presidente:** *Maria Isabel de Oliveira Penteado*

**Secretário-Executivo:** *Maria da Graça Simões Pires Negrão*

**Membros:** *Arthur da Silva Mariante*

*Maria Alice Bianchi*

*Maria de Fátima Batista*

*Maurício Machain Franco*

*Regina Maria Dechechi Carneiro*

*Sueli Correa Marques de Mello*

*Vera Tavares de Campos Carneiro*

**Supervisor editorial:** *Maria da Graça S. P. Negrão*

**Normalização Bibliográfica:** *Maria Alice Bianchi e Maria Iara Pereira Machado*

**Edição eletrônica:** *Maria da Graça S. P. Negrão*

1ª edição

1ª impressão (2004): 150 unidades

O 14      Obtenção de plantas de *Coffea arabica* geneticamente modificadas por bombardeamento de calos embriogênicos / Welcimar G. da Cunha ... [et al.]. – Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2004.

15 p. – (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1676-1340; 73)

1. Café – transformação genética – bombardeamento de calos embriogênicos. 2. *Coffea arabica*. I. Cunha, Welcimar G. da. II. Série.

633.73 - CDD 21

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	6
<b>ABSTRACT</b> .....	7
<b>Introdução</b> .....	8
<b>Materiais e Métodos</b> .....	9
<b>Resultados e Discussões</b> .....	10
<b>Referências</b> .....	14

## RESUMO

O agronegócio café é uma das atividades financeiras mais importantes e tradicionais da economia brasileira. O Brasil produz 40% do café comercializado no Mercado internacional e é o segundo maior consumidor de café do mundo. O cafeeiro é um arbusto lenhoso de longo ciclo biológico. A espécie *Coffea arabica* é a mais valorizada economicamente, correspondendo a 70 % da produção total de café, mas é também a espécie mais susceptível a pragas e doenças. Entre os mais de 80 taxa do subgênero *Coffea* estudadas, *C. arabica* é o único representante alotetraplóide e autógamo. Estas características dificultam o cruzamento com outras espécies considerando-se que estes recursos genéticos são diplóides e geralmente alógamos. A caracterização molecular do genoma de *C. arabica* indica uma especiação relativamente recente. As cultivares de arábica introduzidas nos diversos países produtores do mundo são consideradas como tendo uma base genética estreita. Entretanto, estudos recentes revelam a existência de certo polimorfismo que pode ser utilizado no desenvolvimento de marcadores moleculares para melhoramento assistido. Variadas plantas de café originadas por programas de melhoramento estão disponíveis no Brasil, embora sejam necessárias décadas para a geração de uma nova cultivar. Existe grande interesse agrônomo na melhoria da qualidade de xícara e resistência ou tolerância a estresses bióticos e abióticos. Os estudos atualmente têm como foco a resistência à ferrugem, à broca-do-café, aos nematóides, ao bicho-mineiro; adaptabilidade e qualidade por intermédio da resposta à seca, controle da maturação de frutos e conteúdo de cafeína.

A transformação genética tem sido utilizada como uma eficiente ferramenta molecular do melhoramento. Novas características de interesse agrônomo são introduzidas em genótipos-elite em um período de tempo reduzido e sem o inconveniente da incorporação de genes indesejáveis. Tanto as técnicas de transformação direta como indireta foram testadas nos tecidos de cafeeiro, entretanto, somente pelo método indireto de co-cultivo com *Agrobacterium* foi demonstrada a obtenção de plantas de café transgênicas.

Ainda persiste a necessidade de um protocolo eficiente para a modificação genética de variedades de arábica, uma vez que a facilidade de obtenção de plantas transformadas de *C. canephora* é muito maior que em *C. arabica*. Neste trabalho nós descrevemos a obtenção de plantas transformadas de *C. arabica* por bombardeamento de calos embriogênicos.

## ABSTRACT

The coffee business is one of the most traditional and financially important activities of Brazilian economy. Brazil produces 40% of the coffee commercialized in the international market and is the second major world coffee consumer. Coffee is a woody shrub with a long biological cycle. The *Coffea arabica* is the most valuable species, corresponding to 70 % of the coffee production, but it is also susceptible to pests and diseases. Among more than 80 taxa of the subgenus *Coffea* studied so far, *C. arabica* is the only allotetraploid and autogamous. These characteristics hamper crossing with other species considering these genetic sources are diploid and generally allogamous. Molecular characterization of *C. arabica* genome indicates a relatively recent speciation. The arabica cultivars introduced worldwide are considered to have a very narrow genetic base. However, recent studies are revealing an existing polymorphism that can be used to develop molecular markers for marker-assisted breeding.

A variety of coffee plants are available in Brazil from conventional genetic breeding programs, although it takes a long time to create a new cultivar. There is a great agronomic interest in the improvement of cup quality and resistance or tolerance to biotic and abiotic stresses. Efforts are now focused on resistance to leaf rust, coffee berry borer, coffee berry disease, nematodes, leaf miner; adaptability and quality through drought response, fruit ripening control and reduced caffeine content.

The genetic transformation is being used as an efficient molecular breeding tool. New agronomic interesting features are introduced into elite genotypes within a reduced period of time and without incorporating undesired traits. Both direct and indirect techniques were essayed toward the transformation of coffee tissues. Transformed coffee plants were recently obtained by the *Agrobacterium*-mediated method.

There is still a need for an efficient protocol to genetically modify arabica varieties, considering transformed plants are easier to obtain from *C. canephora* than *C. arabica*. Here we describe the recovery of transgenic *C. arabica* plants from the bombardment of embryogenic calli.

## I. Introdução

O café é a principal *commodity* agrícola do comércio mundial. A maior safra colhida no mundo foi a de 2002/03 com um total de 120 milhões de sacas (Agroinformativos Café, 2004). O Brasil é responsável por cerca de 30 a 40% da produção mundial, sendo o maior produtor e exportador deste produto, bem como o segundo maior consumidor mundial.

Originário da Etiópia, o *Coffea arabica* L. é a espécie de cafeeiro mais cultivada no Brasil e no mundo. Aproximadamente 65% do café comercializado mundialmente é do tipo arábica, sendo o restante do café robusta (*Coffea canephora* Pierre). O Brasil participa com a produção de 40% do mercado de arábica. O *C. arabica* é uma espécie alotetraplóide, com  $2n = 44$  cromossomos e que se reproduz por autofecundação. É uma espécie perene, de porte arbustivo, com um longo período juvenil e acentuada oscilação anual de produção.

O melhoramento genético do cafeeiro, ao longo dos anos, vem desenvolvendo novas cultivares que se adaptem a diferentes regiões e sistemas de cultivo, com elevada produtividade de grãos, boa qualidade de bebida, maturação uniforme e resistência e, ou, tolerância a doenças, pragas e a condições adversas de meio ambiente. Contudo, o longo período juvenil, a necessidade de se avaliar vários anos de produções consecutivos e a introdução de características sem valor agrônomo juntamente com a característica de interesse, tornam o melhoramento demasiadamente demorado, cerca de 20 a 30 anos, e limitado à compatibilidade de cruzamentos.

A transformação genética constitui uma ferramenta do melhoramento genético que permite a introdução de genes específicos para a seleção de novas variedades. Métodos de transformação direta e indireta foram testados em tecidos de cafeeiro. Foram relatados estudos de expressão transiente após bombardeamento e eletroporação em diversos tipos de tecidos (BOXTEL et al., 1995; ROSILLO et al., 2003; FERNANDEZ da SILVA e MENÉNDEZ-YUFFÁ, 2003). A obtenção de plantas transformadas foi demonstrada nos trabalhos de Hatanaka et al. (1999) e Spiral et al. (1999) pela metodologia indireta de co-cultivo com *Agrobacterium rhizogenes*. Plantas de *C. arabica* resistentes ao bicho mineiro (*Perileucoptera coffeella*) foram obtidas após o co-cultivo de embriões somáticos com *A. tumefaciens* (LEROY et al. 2000). A redução do nível de cafeína foi demonstrada em células transformadas de *C. arabica* por co-cultivo de calos embriogênicos por Ogita et al. (2002). Esses trabalhos revelam a importância e a viabilidade da transformação genética no desenvolvimento de variedades superiores de *C. arabica*. Entretanto, apesar dos vários estudos já desenvolvidos e dos resultados utilizando-se o sistema de agroinfecção com *A. tumefaciens*, ainda não foi relatado um protocolo de eficiência comparável à espécie *C. canephora* para a obtenção de plantas transgênicas de *C. arabica*, que facilite a produção de diferentes eventos de transformação a serem avaliados por programas de melhoramento genético.

Como alternativa aos protocolos existentes, apresentamos neste trabalho uma metodologia para a transformação de *C. arabica* por bombardeamento de calos embriogênicos e posterior seleção em meio de cultivo contendo o antibiótico canamicina. Os resultados obtidos indicam que o uso do processo biobalístico permite a obtenção de plantas transgênicas de *C. arabica* com melhor eficiência de transformação em relação aos processos descritos até o momento.

## II. Materiais e Métodos

### ***Indução de calos embriogênicos***

Folhas de *C. arabica* L., cultivar Catuaí Vermelho coletadas de plantas cultivadas em casa de vegetação foram esterilizadas, segmentadas (0,5 x 0,5 cm) e cultivadas no escuro e em temperatura de 25 a 28 °C no meio C (BOXTEL e BERTHOULY, 1996) modificado com 2,4 – D 20µM (C20) durante 1 mês. Os calos foram repicados em meio fresco e incubados por mais 5 meses nas mesmas condições.

### ***Bombardeamento***

A massa embriogênica resultante foi espalhada em forma de halo sobre *Membranfilter* 0,45µm em placa de Petri contendo meio C com 2,4 – D 10µM (C10). Após 6 dias de incubação, a massa de calos embriogênicos sobre o *Membranfilter* foi transferida para meio C10 osmótico (Manitol 0,5M) e fitagel 8 g/l. Transcorridas 24 horas de tratamento osmótico, 12 placas contendo a massa de calos embriogênicos foram bombardeadas com o vetor pBI 426, que contém o gene repórter *gus* (β-glucuronidase) sob o controle de duas seqüências *in tandem* do promotor 35S CaMV e um *enhancer*, e o gene marcador de seleção *nptII* (neomicina fosfotransferase), que confere resistência ao antibiótico canamicina. Cada placa bombardeada foi considerada uma repetição. A esterilização das micropartículas de tungstênio e a precipitação do DNA sobre as mesmas foram realizadas segundo o protocolo estabelecido por Aragão et al. (1996).

### ***Seleção do material bombardeado***

A massa de calos bombardeados foi transferida para o meio C10 sem agente seletivo e cultivada por duas semanas. A massa bombardeada foi então subcultivada em meio C10 por uma semana em canamicina 200 mg/l e posteriormente uma semana em 300 mg/l. Após esse período, os calos foram repicados mensalmente no meio C10 em canamicina 400 mg/l até o surgimento de novos calos ou embriões. Os embriões regenerantes foram transferidos para o meio de cultivo WPM (LLOYD e MCCOWN, 1981) e as plantas enraizadas foram transferidas para a casa de vegetação.

### ***Análise histoquímica***

O teste histoquímico para a localização *in situ* da atividade da enzima β-glucuronidase (GUS) nos calos embriogênicos, embriões e plantas que regeneraram em meio seletivo foi realizado segundo a metodologia descrita por Jefferson et al. (1987) com as modificações sugeridas por Lacorte (1998).

### Análise por PCR

Plantas que apresentaram o resultado positivo quanto à atividade da enzima GUS foram utilizadas para a preparação em pequena escala do DNA total extraído de folhas pelo método CTAB (DOYLE e DOYLE, 1987). Para a detecção através da técnica de PCR (*polymerase chain reaction*) do gene *gus*, foram utilizados *primers* descritos por Moore et al. (1992) que amplificam um fragmento de 420 pb (forward: TTG GGC AGG CCA GCG TAT CGT and reverse: ATC ACG CAG TTC AAC GCT GAC). O programa utilizado seguiu as seguintes etapas: 95°C por 5 min, 35 ciclos de 95°C por 1 min, 55°C por 1 min e 73°C por 1 min; extensão final a 73°C por 7 min.

### III. Resultados e Discussão

O cultivo das folhas de cafeeiro no meio C20 gerou calos embriogênicos friáveis que foram utilizados nos experimentos de bombardeamento (Figura 1).

Os calos e embriões de cada placa de tiro foram separados fisicamente para permitir a identificação de plantas derivadas de diferentes eventos (Tabela 1). Se considerarmos que os embriões regenerantes são advindos de 44 eventos de transformação, podemos obter em média 3,7 eventos de transformação a partir do bombardeamento de uma única placa de tiro. Contudo, os resultados observados na tabela indicam que existe grande variação tanto do número de embriões regenerantes como do número de eventos em cada placa. Os dados apresentados foram gerados levando-se em consideração que os calos transformados resultam na formação tanto de embriões como de calos embriogênicos que posteriormente regeneram embriões. Como a embriogênese indireta a partir dos aglomerados de células contidas nos calos resistentes pode gerar clones de uma única célula transformada, o número de eventos foi determinado como sendo a soma de embriões que regeneraram diretamente dos calos selecionados e dos calos advindos de cada placa. Desta forma, pode existir mais de uma planta derivada do mesmo evento no número total de plantas. Para a análise dos resultados foram desconsiderados os embriões descartados ou que ainda estão em desenvolvimento *in vitro*. As plantas positivas para os testes histoquímicos e de detecção por PCR estão sendo cultivadas em casa de vegetação e serão futuramente analisadas por Southern Blot.

Placa	Plantas	Eventos
1	9	9
2	35	5
3	2	2
4	16	13
5	4	4
6	1	1
7	0	0
8	13	3
9	3	3
10	0	2
11	4	1
12	1	1
total	88	44
média	7,3	3,7

**Tabela 1:** Número de embriões regenerantes por placa bombardeada. Cada placa foi considerada uma repetição.



**Figura 1:** Formação de calos embriogênicos friáveis em explantes foliares cultivados no meio C20.



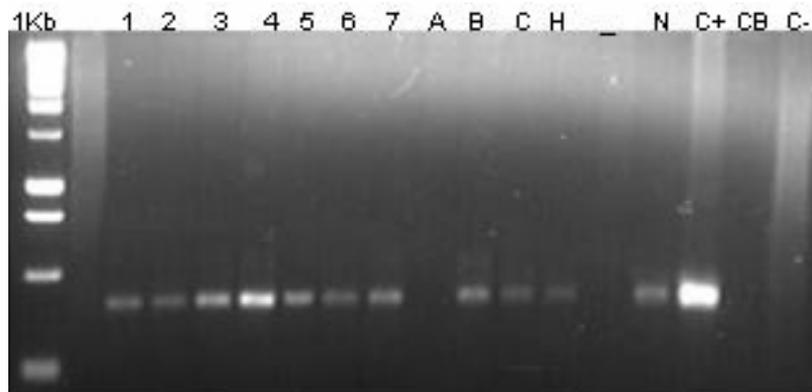
**Figura 2:** Expressão do gene *gus* em (a) embriões globulares, (b) embrião formando cotilédones, (c) raiz de plântula regenerante e (d) folhas de planta aclimatada. As amostras são derivadas de células bombardeadas e cultivadas em meio seletivo contendo canamicina.



**Figura 3:** Planta selecionada em canamicina, positiva para os testes de atividade de *gus* e PCR aclimatada em casa de vegetação.

A atividade da enzima GUS foi detectada por teste histoquímico nos diferentes tecidos analisados (Figura 2). A coloração azul observada variou em intensidade nos diferentes estádios do desenvolvimento das plantas transformadas.

O DNA das folhas de 12 das plantas crescidas em casa de vegetação (Figura 3), e que apresentaram resultado anterior positivo para o teste de expressão de *gus*, foi utilizado para análise por PCR. Uma banda de 420pb, indicando a presença do gene *gus*, foi amplificada em 11 das 12 plantas analisadas (Figura 4).



**Figura 4:** Gel de agarose para análise de PCR do DNA genômico das plantas bombardeadas. Ordem de aplicação das amostras: (1) 1 kb Ladder Promega; (3-15) plantas putativamente transformadas: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, A, B, C, H e N, respectivamente; (16) controle positivo de planta de *C. arabica* previamente testada por

Southern Blot; (17) controle negativo do PCR com água no lugar da amostra; (18) controle negativo de DNA de *C. arabica* não transformada.

#### **IV. Conclusões e Perspectivas**

Este é o primeiro relato de plantas transformadas obtidas por bombardeamento de *C. arabica*. Os resultados obtidos até o momento revelam que bombardeamento de calos embriogênicos na transformação genética de *C. arabica* é uma estratégia eficiente para a introdução de genes que codifiquem características agronômicas desejáveis para obtenção de variedades superiores que se adaptem às demandas de produção agrícola e de consumo do café.

Os genes de interesse para a cultura do cafeeiro poderão ser introduzidos em *C. arabica* pela metodologia aqui descrita. Atualmente, nosso grupo está utilizando esta estratégia para a obtenção de plantas resistentes à Broca do Café (*Hypothenemus hampei*) com o gene  $\alpha$ -A11 do inibidor de alfa-amilase de *Phaseolus vulgaris* (POWERS e CULBERTSON, 1983), cuja atividade *in vitro* contra essa praga foi demonstrada por Valencia et al. (2000).

O desenvolvimento por engenharia genética de plantas resistentes deverá contribuir para a redução do uso de agroquímicos, redução nos custos de produção, aumento da produtividade e da qualidade do café.

#### **Agradecimento**

Agradecemos ao pesquisador Antonio Alves Pereira da Epamig por ter gentilmente cedido o material genético utilizado neste trabalho.

## Referências

ARAGÃO, F. J. L.; BARROS, L. M. G.; BRASILEIRO, A. C. M.; RIBEIRO, S. G.; SMITH, F. D.; SANFORD, J. C.; FARIA, J. C.; RECH, E. L. Inheritance of foreign genes in transgenic bean (*Phaseolus vulgaris* L.) co-transformed via particle bombardment. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 93, n. 1/2, p. 142-150, 1996.

BOXTEL, J. van; BERTHOULY, M.; CARASCO, C.; DUFOUR, M.; ESKES, A. Transient expression of  $\beta$ -glucuronidase following biolistic delivery of foreign DNA into coffee tissues. **Plant Cell Reports**, New York, v. 14, p. 748-752, 1995.

BOXTEL, J. van; BERTHOULY, M. High frequency somatic embryogenesis from coffee leaves. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Hague, v. 44, p. 7-17, 1996.

DOYLE, J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v. 19, p.11-15, 1987.

FNP CONSULTORIA & AGROINFORMATIVOS (São Paulo, SP). **Agriannual 2004**: anuário da agricultura brasileira. São Paulo, 2003.

FERNANDEZ da SILVA, R.; MENÉNDEZ-YUFFÁ, A. Transient gene expression in secondary somatic embryos from coffee tissues electroporated with the genes *gus* and *bar*. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 6, n. 1, p. 29-38, 2003.

HATANAKA, T.; CHOI, Y. E.; KUSANO, T.; SANO, H. Transgenic plants of coffee *Coffea canephora* from embryogenic callus via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. **Plant Cell Reports**, New York, v. 19, p. 106-110, 1999.

JEFFERSON, R. A.; KAVANAGH, T. A.; BEVAN, M. W. GUS fusions:  $\beta$ -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. **EMBO Journal**, Oxford, Inglaterra, v. 6, p. 3901-3907, 1987.

LACORTE, C.  **$\beta$ -Glucuronidase (GUS)**. In: BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. C. (Ed.). Manual de transformação genética de plantas. Brasília: Embrapa-SPI: Embrapa-Cenargen, 1998. p. 127-141.

LEROY, T.; HENRY, A. M.; ROYER, M.; ALTOSAAR, I.; FRUTOS, R. Genetically modified coffee plants expressing the *Bacillus thuringiensis* cry1Ac gene for resistance to leaf miner. **Plant Cell Reports**, New York, v. 19, p. 382-389, 2000.

LLOYD, G.; MCCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **Combined Proceedings Annual Meeting International Propagation Society**, v. 30, p. 421-427, 1981.

MOORE, G. A.; JACONO, C. C.; NEIDIGH, J. L.; LAWRENCE, S. D.; CLINE, K. *Agrobacterium* mediated transformation of *Citrus* stem segments and regeneration of transgenic plants. **Plant Cell Reports**, New York, v. 11, p. 238-242, 1992.

OGITA, S.; UEFUJI, H.; CHOI, Y. E.; HATANAKA, T.; OGAWA, M. Genetic modification of coffee plants. **J. Plant Biotech**, v. 4, p. 91-94, 2002.

POWERS, J. R.; CULBERTSON, J. D. Interaction of a purified bean (*Phaseolus vulgaris*) glycoprotein with an insect amylase. **Cereal Chemistry**, Saint Paul, US, v. 60, p. 107-117, 1983.

ROSILLO, A. G.; ACUNA, J. R.; GAITAN, A. L.; DE PENA, M. Optimised DNA delivery into *Coffea Arabica* suspension culture cells by particle bombardement. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Hague, v. 74, p. 45-49, 2003.

SPIRAL, J.; LEROY, T.; PAILLARD, M.; PETIARD, V. **Transgenic coffee (Coffea Species)**. In: BAJAJ, Y. P. S. (Ed.). *Transgenic trees*. Berlin: Springer-Verlang, 1999. p. 55-76.

VALENCIA, A.; BUSTILLO, A. E.; OSSA, G. E.; CHISPEELS, M. J. Amylases of the coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*) and their inhibition by two plant amylase inhibitors. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, UK, v. 30, p. 207-213, 2000.