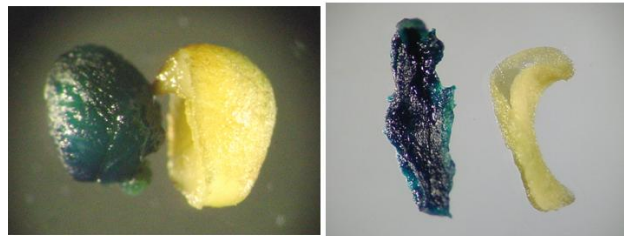
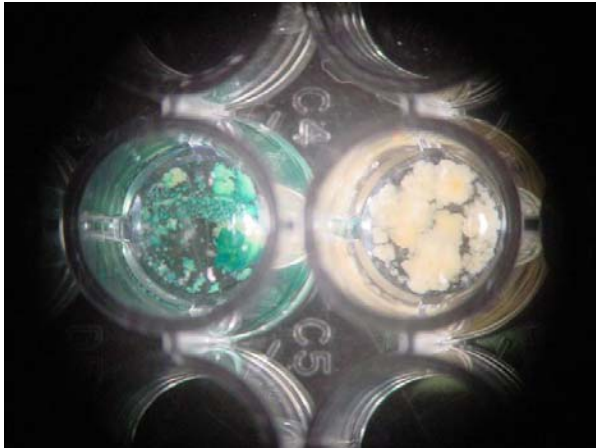


Boletim de Pesquisa 58 **e Desenvolvimento**

ISSN 1676 - 1340

Março, 2004



**Metodologia para obtenção de plantas transformadas de
Coffea canephora por co-cultivo de calos embriogênicos com
Agrobacterium tumefaciens.**

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 Antonio 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 58

Metodologia para obtenção de plantas transformadas de *Coffea canephora* por co-cultivo de calos embriogênicos com *Agrobacterium tumefaciens*.

A. R. R. Cruz
A. L.D. Paixão
F. R.Machado
M.F. de F. Barbosa
C. S.Junqueira
G. B. Cabral
J. B.Teixeira
A. K. Kobayashi
A. C. M. Brasileiro
É. V. S. A.Barros

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*

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

1ª edição

1ª impressão (2004): 150 unidades

M 593 Metodologia para obtenção de plantas transformadas de *Coffea Canephora* por co-cultivo de calos embriogênicos com *Agrobacterium Tumefaciens* / A. R. R. Cruz ... [et al.]. – Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2004.

15 p. – (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1676-1340; 58)

1. Café. 2. Transformação genética. 3. Bactéria. 4. Embriogênese indireta. I. Cruz, A. R. R. II. Série.

633.73 – CDD 21

INTRODUÇÃO

O sistema cafeeiro do Brasil é um dos mais importantes complexos agroindustriais. O café é produzido em cerca de 1.700 municípios, abrangendo aproximadamente 300 mil unidades produtivas, sendo que 18% destas são de *Coffea canephora* (de Melo *et al.*, 1998). O mercado cafeeiro gera sete milhões de empregos, diretos ou indiretos, com a produção média de 28 milhões de sacas (Carvalho e Silva, 2003).

A busca por novas cultivares que correspondam às necessidades de controle de pragas tem sido uma constante para que o Brasil aumente a produtividade e a qualidade de seus cafés. Assim, o desafio é reunir em uma variedade as características superiores dos parentais, uma vez que no cruzamento ocorre também a transferência de muitos caracteres indesejáveis. Geralmente são necessários 20 a 30 anos para o melhoramento de variedades e geração de uma nova cultivar de café. A cafeicultura brasileira ainda sofre enormes prejuízos causados por insetos-praga, sendo a espécie *Coffea arabica* susceptível à maioria delas. Os principais danos são devidos ao ataque do bicho mineiro (*Perileucoptera coffeella*), da broca do café (*Hypothenemus hampei*), das cigarras (*Quemda gigas*, *Carineta* sp, *Fidicina pronoe* e *Dorisiana* spp) e das cochonilhas de raiz (*Dismicoconrs criphrs*). O manejo destas pragas por produtos químicos contribui para aumentar o custo de produção da cultura e exige especial atenção em relação à época e às condições de aplicação. Além disso, excessivas aplicações de inseticidas poluem o meio ambiente e ameaçam a saúde humana. Em relação ao desenvolvimento de variedades resistentes ao bicho mineiro, encontramos atualmente trabalhos utilizando tanto os métodos,de seleção clássica como os de modificação genética por transgenia (Guerreiro Filho, 1999).

A transformação genética surgiu como uma ferramenta para o melhoramento genético clássico que permite a introdução de genes de interesse em genótipos-elite. Desta forma, é possível a obtenção de variedades superiores em um menor espaço de tempo. As metodologias de transformação genética geralmente são dependentes da cultura de tecidos para a regeneração de células transformadas. A regeneração pode ocorrer via organogênese ou embriogênese somática. A regeneração via embriogênese somática foi bastante documentada a partir de 1970 para várias espécies e genótipos de café (Starisky, 1970), sendo este sistema *in vitro* considerado modelo por sua alta

eficiência (Sondahl e Loh, 1988). A embriogênese somática pode ocorrer de forma direta, na qual os embriões são formados diretamente do explante ou com pouca formação de calos primários, ou por via indireta, onde há formação de calos secundários de onde surgem os embriões (Sondahl e Sharp, 1977; Dublin, 1984; Pierson *et al.*, 1983). Os principais fatores que determinam que as células sigam a via direta ou indireta da embriogênese são os reguladores de crescimento. Estudos realizados em café mostram que reguladores de crescimento tipo citocininas, como 2iP e BAP, induzem a embriogênese direta, como relatado por Yasuda e colaboradores (1985), trabalho no qual foi utilizado 5 μ M de BAP para produzir embriões somáticos em explantes foliares de *C. arabica*. Por outro lado, reguladores de crescimento tipo auxinas são necessários para a indução de calos e posteriormente de embriões; este efeito foi observado em café, no qual a utilização de 2,4-D resulta em embriogênese indireta (Sondahl & Sharp, 1977).

Os primeiros trabalhos de transformação genética de café foram realizados com *C. arabica* via eletroporação de protoplastos ou mediada por *Agrobacterium* sp. (Feng *et al.*, 1992; Spiral *et al.*, 1993). Mais recentemente, Leroy e colaboradores (2000) obtiveram plantas transgênicas de café resistentes ao bicho mineiro (*Perileucoptera coffeella*) através da co-cultura de embriões somáticos com *Agrobacterium tumefaciens* pela introdução do gene de resistência *cry1Ac* proveniente de *Bacillus thuringiensis*.

Este trabalho descreve a transformação genética de calos embriogênicos de *C. canephora* utilizando uma linhagem desarmada de *Agrobacterium tumefaciens*. A obtenção de embriões foi baseada, com algumas modificações, no método de embriogênese indireta estabelecido por van Boxtel & Berthouly (1996) a partir de explantes foliares. Os procedimentos de seleção aplicados favoreceram a regeneração das células de cafeeiro transformadas geneticamente, que deram origem a plantas transgênicas de *C. canephora*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Material Vegetal

Plântulas de *C. canephora*, mantidas *in vitro* em sala de cultura sob fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 25°C, foram utilizadas como fonte de explantes. Outra fonte de explantes utilizada foi de plantas mantidas em casa de vegetação, cujas folhas foram desinfestadas com etanol 70% por 1 min e hipoclorito de sódio 2% por 20 min, e lavadas três vezes com água destilada autoclavada.

Massa embriogênica de C. canephora

Segmentos foliares de aproximadamente 0,8 x 0,8 cm foram incubados com a face adaxial voltada para o meio de cultura C 10, meio C modificado (van Boxtel & Berthouly, 1996), contendo 2% de sacarose e 2,4-D (10 µM). Os explantes foram cultivados em placas de Petri a 25°C no escuro até a formação de calos embriogênicos (aproximadamente 4 meses). A massa de calos embriogênicos friáveis foi pré-incubada por 7 dias em placa de Petri contendo meio C10, agrupando-se os calos sobre filtro Millipore estéril na superfície do meio de cultura.

Co-cultivo com Agrobacterium tumefaciens

Uma colônia isolada da linhagem desarmada EHA105 de *A. tumefaciens*, contendo o vetor binário pCAMBIA 3301, foi inoculada em 3 mL meio LB líquido (NaCl 10 mg/L, Extrato de levedura 5 mg/L, Triptona ou Peptona 10 mg/L) na presença dos antibióticos rifampicina 50mg/L e canamicina 100mg/L. Este pré-inóculo foi incubado a 28° C em agitador orbital (200 rpm) por 16 h. A cultura foi mantida a 4°C em meio LB semi-sólido contendo rifampicina 50mg/L e canamicina 100mg/L e repicada mensalmente. Para o inóculo, utilizou-se aproximadamente 1ml do pré-inóculo em um Erlenmeyer de 125ml com 50ml de meio LB líquido + antibióticos. Este inóculo foi incubado overnight a 28°C em agitador orbital (200 rpm) até atingir densidade ótica (D.O.) entre 0,6 e 0,8. A cultura

foi centrifugada a 7500rpm por 10 minutos em tubos estéreis. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspenso em 15ml do meio líquido de cultivo da planta (C10) em agitação no vortex por 20 seg. A D.O. (A_{600nm}) foi medida e ajustada por diluição com o meio C10 para D.O. final de 0,2. Foi adicionado neste meio uma solução de acetoseringona (3',5'-Dimetoxi-4'-hidroxi-acetofenona, Aldrich Chem. Co.) para uma concentração final de 200 μ M. A co-cultura líquida procedeu-se nesse meio onde as agrobactérias e aproximadamente 150mg de massa embriogênica, foram agitados no vortex por 20 segundos e incubados à temperatura ambiente por 30 minutos. O meio líquido foi descartado por inversão do tubo e a massa embriogênica foi transferida para filtro Millipore sobre meio C10, onde foi incubada por 4 dias a 25°C no escuro para a fase de co-cultivo sólido.

Seleção

Após este período, a massa de calos foi lavada com cefotaxima 500mg/L em meio C10 líquido suplementado com PPT 1 μ M (fosfinotricina) e transferida para meio C10 sólido contendo PPT 1 μ M + Cefotaxima 250mg/l + Timentin 250mg/l, onde foi cultivada a 25 ° C no escuro por 2 semanas. Em seguida, a massa embriogênica foi transferida para meio C10 contendo PPT 10 μ M + Tim 200mg/l. Após estes procedimentos, a massa embriogênica foi subcultivada mensalmente para o mesmo meio seletivo até o surgimento de embriões ou calos embriogênicos resistentes.

Regeneração

O material resistente foi selecionado e cultivado em meio líquido de regeneração "R" (van Boxtel & Berthouly, 1996) contendo 2mg/l PPT sob agitação e luz. Posteriormente, foram cultivados em EG + 2mg/l PPT na fase de torpedo (van Boxtel & Berthouly, 1996).

Germinação dos embriões

Os embriões emitindo o primeiro par de folhas foram cultivados em placa de Petri contendo WPM (Lloyd e McCown, 1981) com carvão ativado até a formação de plântula enraizada.

Análise histoquímica

Após o co-cultivo, amostras provenientes de diferentes fases foram analisadas por métodos histoquímicos. Porções de calos e fragmentos foliares ou radiculares foram incubados em tampão X-Gluc (McCabe *et al.*, 1988) a 37°C por 16 horas.

Análise molecular por PCR (Polimerase Chain Reaction)

Foram utilizados dois pares de *primers* para a amplificação do gene *gus*. O primeiro par (*gusA*) amplifica uma seqüência de 420pb TTGGGCAGGCCAGCGTATCGT (*gus* 251) e ATCACGCAGTTCAACGCTGAC (*gus* 671c). O segundo par (*gusB*) amplifica um fragmento de 864pb CTACACCACGCCGAACACCT e CAGGCACAGCACATCAAAGA. Nas reações de amplificação, foram utilizados 200ng de DNA genômico extraído de folhas pelo método CTAB, 0,06U de enzima Taq Polimerase (Pht), *primers* 0,2 μ M, MgCl₂ 1,2mM, dNTPs 0,128mM, tampão de reação 10x e H₂O para um volume final de 25 μ L. 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.

Southern Blot do PCR:

O gel de agarose resultante da análise do PCR foi transferido para uma membrana de nylon (Hybond-N⁺ Amersham Pharmacia Biotech) por capilaridade, como o descrito por Southern (1975). A membrana foi hibridizada com uma sonda do fragmento de 420pb amplificada por PCR com os *primers* 251 e 671c, marcada

radioativamente com [$\infty^{32}\text{P}$]dCTP, conforme recomendado pelo fabricante do kit Ready-to-go (Pharmacia Biotech).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O cultivo dos fragmentos foliares de *C. canephora* gerou uma massa embriogênica bastante uniforme após 5 meses de cultivo em meio C10. Aproximadamente 150mg desta massa embriogênica foi cocultivada e selecionada por dois meses em meio C10 contendo PPT 10 μM . A maior parte dos calos embriogênicos que sobreviveu expressou o gene repórter *gus*, indicando a transformação das células de cafeeiro (figura 1).

Os calos selecionados foram transferidos para meio líquido de regeneração “R” + PPT e formaram embriões em diversos estádios (figura 2). Após dois meses de cultivo, foram obtidos embriões de *C. canephora* em estágio de torpedo expressando o gene *gus* (figura 3) que foram posteriormente transferidos para o enraizamento em WPM (figura 4). Foram aclimatados 54 embriões com atividade de GUS (figura 5). Fragmentos foliares de 2 dessas plantas foram utilizados para as análises de PCR do gene *gus*. Os resultados indicaram a presença do gene *gus* nas plantas analisadas (figura 6), que foi amplificado pelos dois pares de *primers* (*gusA* e *gusB*) e gerou fragmentos de 420 pb e 864 pb, respectivamente. Apesar da amplificação de algumas bandas inespecíficas com os *primers* *gusB* no gel do PCR, somente as bandas de tamanho esperado hibridizaram com a sonda radioativa no Southern Blot (figura 7).

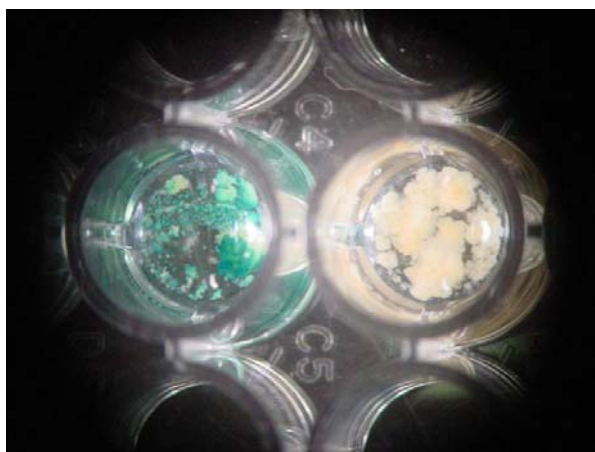


Figura 1: Ensaio histoquímico de calos embriogênicos: (a) expressando o gene *gus* após co-cultivo com *A. tumefaciens* e seleção em PPT; (b) controle não co-cultivado.



Figura 2: Embriões somáticos derivados de calos resistentes a PPT regenerando em meio R líquido seletivo.

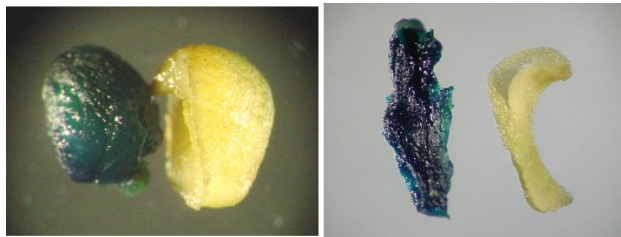


Figura 3: Teste histoquímico de (a) embriões somáticos globulares e (b) folhas de plântulas crescidas no meio líquido R seletivo, demonstrando a expressão do gene *gus* em tecidos transformados (esquerda) e não transformados (direita).



Figura 4: Plântulas selecionadas em PPT enraizando em meio WPM .

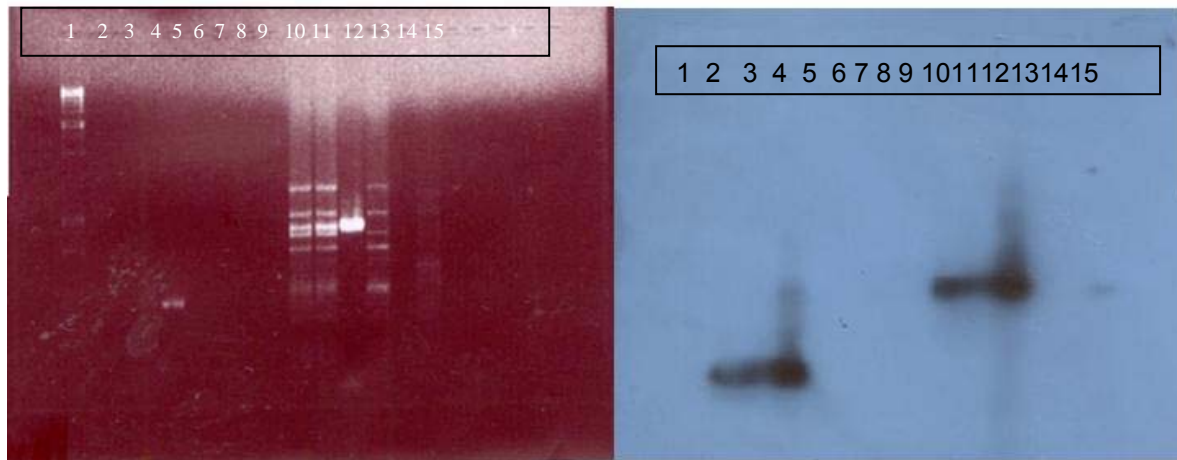


Figura 5: (a) PCR com os *primers* *gusA* que amplificam o fragmento de 420 pb e *gusB* de 864 pb, sendo: (1) 1Kb ladder, (3 e 4) amostras das plantas 1 e 2 selecionadas em PPT, (5) controle positivo do plasmídeo pBI426, (6) controle negativo do DNA de planta não transformada, (7) controle negativo de amplificação sem DNA, (10 e 11) amostras

das plantas 1 e 2 selecionadas em PPT, (12) controle positivo do plasmídeo pBI426, (13) controle negativo do DNA de planta não transformada e (17) controle negativo de amplificação sem DNA; (b) Southern blot do PCR utilizando como sonda o fragmento de 420 pb.

CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Foi estabelecida a transformação genética de *C. canephora* via *A. tumefaciens* no laboratório de *Agrobacterium* da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia visando à introdução de genes de interesse em café. Calos embriogênicos co-cultivados e selecionados com fosfinotricina (PPT) originaram cinquenta e quatro plantas positivas para o ensaio histoquímico de detecção da expressão do gene *gus*. Outros embriões putativos continuam sendo cultivados *in vitro*. Foi confirmada a presença do gene *gus* por PCR (figura 3a) e Southern Blot do PCR em duas das plantas em fase de desenvolvimento na casa de vegetação.

Apesar de haverem relatos na literatura de métodos de transformação genética de cafeeiro utilizando o co-cultivo com *A. tumefaciens*, o processo de obtenção de plantas transformadas ainda é laborioso e dominado por poucos grupos no mundo. Devido à importância do agronegócio café no Brasil, é estratégico que a Embrapa possa desenvolver a pesquisa de transformação genética de cafeeiro, tendo em vista a inserção de genes disponíveis, bem como os prováveis genes que estão sendo estudados no Projeto Genoma Café e em outros projetos do Consórcio Brasileiro de Pesquisa dos Cafés do Brasil. Assim, o estabelecimento da transformação de cafeeiro na Embrapa como um processo de rotina pelo nosso grupo possibilitará a inserção de diversos genes para a modificação genética de cafeeiro, visando resistência a pragas e doenças e melhoria da qualidade do produto.

O procedimento aqui descrito vem sendo utilizado em nosso laboratório para introduzir o gene do inibidor de alfa-amilase denominado α -AI1 (Powers e Culbertson, 1983), isolado de *Phaseolus vulgaris*, que demonstrou ser efetivo em experimentos “*in vitro*” contra as amilases digestivas da broca-do-Café (Valencia *et al.*, 2000). O gene α -AI1 está sendo utilizado na transformação via *Agrobacterium* de *C. canephora* advindo

do Espírito Santo, o maior estado produtor de conilon, onde a broca-do-café ocasiona, em média, 50% dos defeitos do café. O desenvolvimento de plantas de café expressando o gene do inibidor α AI-1 poderá ser uma das alternativas para o manejo integrado de pragas. Estas plantas deverão proporcionar uma redução nos custos de produção, melhor equilíbrio ecológico pela redução do uso excessivo de pesticidas e, conseqüentemente, aumento da qualidade do produto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BERTHOULY, M.; MICHAUX-FERRIERE, N. M. High frequency somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v. 44, p. 169-176, 1996.

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

DUBLIN, P. Techniques de reproduction végétative *in vitro* et amélioration génétique chez les caféiers cultivés. **Café Cacao Thé**, v. 25, p. 237-244, 1984.

FENG, Q.; YANG, M. Z.; ZHENG, X. Q.; ZHEN, X. S.; PAN, N. S. *Agrobacterium*-mediated transformation of (*Coffea arabica* L.). **Chinese J. Biotech.**, v. 8, n. 3, p. 255-260, 1992.

GUERREIRO FILHO, O. Melhoramento do cafeeiro visando resistência às pragas. In: SIMPÓSIO DE ATUALIZAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS, 1999, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA. Núcleo de Estudos em Cafeicultura, 1999. p. 36-49.

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**, v. 19, p. 382-389, 2000.

LLOYD, G.; MCCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **Comb. Proc. Int. Plant Prop. Soc.**, v. 30, p. 421-427, 1981.

MCCABE, E. E.; SWAIN, W. F.; MARTINELLI, B. J.; CHRISTOU, P. Stable transformation of soybean (*Glycine max*) by particle bombardment. **Bio/Technology**, v. 6, p. 923-926, 1988.

MELO, B. de; BARTHOLO, F. G.; MENDES, A. N. G. Café: variedades e cultivares. **Informe Agropecuário**, v. 19, p. 92-96, 1998.

PIERSON, E. S.; VAN LAMMEREN, A. A. M.; SCHEL, J. H. N.; STARISKY, G. *In vitro* development of embryoids from punched leaf discs of *Coffea canephora*. **Protoplasma**, v. 15, p. 208-216, 1983.

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

SÖNDAHL, M. R.; LOH, W. H. T. Coffee biotechnology. In: CLARKE, R. J.; MACRAE, R. (Ed.). **Coffee**. London: Elsevier Applied Science Publishers, 1988. p. 235-261.

SONDAHL, M. R.; SHARP, W. R. High frequency induction of somatic embryos in cultured leaf explants of *Coffea arabica*. **L.Z. Pflanzenphysiol.**, v. 81, p. 395-408, 1977.

SOUTHERN, E. M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. **Journal of Molecular Biology**, v. 98, p. 503-517, 1975.

SPIRAL, J.; THIERRY, C.; PAILLARD, M.; PÉTIARD, V. Regeneration of plantlets of *Coffea canephora* Pierre (Robusta) transformed by *Agrobacterium rhizogenes*. **Comptes Rendus de L'Academie des Sciences Serie III: Sciences de la Vie**, v. 316, p. 1-6, 1993.

STARISKY, G. Embryoid formation in callus tissues of coffee. **Acta botanica Neerlandica**, v. 19, p. 509-514, 1970.

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**, p. 207-213, 2000.

YASUDA, T.; FUJII, Y.; YAMAGUCHI, T. Embryogenic callus induction from *Coffea arabica* leaf explants by benzyladenine. **Plant and Cell Physiology**, v. 26, p. 595-597, 1985.