

PRODUÇÃO DE PLANTAS TRANSGÊNICAS DE CAFÉ RESISTENTES AO HERBICIDA GLUFOSINATO DE AMÔNIO

Alessandra F. Ribas¹, Adilson K. Kobayashi², Luiz F. P. Pereira³, Luiz G. E. Vieira¹ Email: lvieira@iapar.br

¹ IAPAR - Laboratório de Biotecnologia Vegetal, Instituto Agrônomo do Paraná, Caixa Postal 481, CEP 86001-970, Londrina, PR, Brazil. ² Embrapa Mandioca e Fruticultura (CNPMPF), Caixa Postal 007, CEP 44380-000, Cruz das Almas, BA, Brazil. ³ Embrapa Café, Laboratório de Biotecnologia Vegetal, Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR). Caixa Postal 481, CEP 86001-970, Londrina, PR, Brazil.

Resumo:

Plantas transgênicas de *Coffea canephora* P. resistentes ao herbicida glufosinato de amônio foram regeneradas a partir de explantes foliares co-cultivados com *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 contendo o plasmídeo pCAMBIA3301, que contém os genes *bar* e *uidA* ambos sob controle do promotor 35S ou pIB13 (3300 contendo o gene da *ACC oxidase*, antisenso) ou ainda bombardeados com o plasmídeo pCAMBIA3301. Embriogênese somática direta foi induzida no meio contendo ¼ dos macros e metade dos micronutrientes do meio MS, constituintes orgânicos do meio B₅ e 30 g.L⁻¹ de sacarose, suplementado com 5 µM N⁶ – (2-isopentenil)-adenina (2-iP) e 10 µM de glufosinato de amônio para seleção de embriões transgênicos putativos. A presença e a integração do gene *bar* foram confirmados pelas análises de PCR e Southern blot. As plantas transgênicas pulverizadas com 1600 mg.L⁻¹ do herbicida Finale™ que contém glufosinato como ingrediente ativo, não apresentaram sintomas de toxidez, mantiveram a coloração e continuaram crescendo normalmente na aclimação *ex vitro*.

Palavras-chave: Transformação genética, café, tolerância a herbicida, glufosinato de amônio

PRODUCTION OF TRANSGENIC COFFEE PLANT AMMONIUM GLUFOSINATE HERBICIDE-RESISTANT

Abstract:

Transgenic plants of Coffea canephora P. resistant to the herbicide ammonium glufosinate were regenerated from leaf explants after co-culture with Agrobacterium tumefaciens strain EHA105 harboring either pCambia3301, a plasmid that contains the bar and the uidA genes both under control of 35S promote or pIB13 (3300 containing the ACC oxidase gene) or bombarded with the pCAMBIA3301 plasmid. Direct somatic embryogenesis was induced on basal medium contained ¼ strength macro salts and half strength micro salts of MS medium, organic constituents of B₅ medium and 30 g.L⁻¹ sucrose supplemented with 5 µM N⁶ – (2-isopentenyl)-adenine (2-iP). Ten µM ammonium glufosinate was used for putative transgenic somatic embryos selection. Presence and integration of the bar gene were confirmed by PCR and Southern blot analysis. Selected transgenic coffee plants sprayed with up to 1600 mg.L⁻¹ of Finale™, a herbicide containing glufosinate as the active ingredient, not show any symptom of toxicity, retained their pigmentation and continued to grow normally during ex vitro acclimation.

Key words: Genetic transformation, coffee, herbicide tolerance, ammonium glufosinate

Introdução

O melhoramento genético do café por métodos convencionais é um processo longo podendo levar mais de 30 anos. A transformação genética pode ser utilizada para reduzir o tempo necessário para introdução de novas características em variedades elite. Os primeiros protocolos de transformação de café usavam o clorsulfuron (*csrl-1*) e higromicina (*htp*) como agente seletivo.

Tolerância das plantas ao glufosinato de amônio tem sido obtido pelo uso de genes bacterianos - *bar* e *pat* - isolados de *Streptomyces hygroscopicus* (Murakami et al., 1986) e *S. viridochromogenes* Tü494 (Strauch et al., 1988) respectivamente. A enzima fosfotricina acetiltransferase (PAT) codificada por esses genes, acetila o grupo NH₂ do PPT levando a sua inativação, portanto prevenindo autotoxicidade no organismo produtor (D'Haullin et al., 1992; Metz et al., 1998). A fosfotricina é um inibidor irreversível da glutamina sintetase (GS), a única enzima que detoxifica amônia produzida durante a redução do nitrato, fotorespiração e degradação de aminoácidos em células vegetais (D'Haullin et al., 1992). Inibição da GS leva a um rápido acúmulo de amônia intracelular nas folhas associado a um distúrbio da fotossíntese e a morte das células vegetais (Devine et al., 1993). A tolerância ao glufosinato de amônio é importante não somente como agente seletivo para estudos *in vitro* e o desenvolvimento de plantas transgênicas, mas também para o controle de plantas invasoras e a produção de sementes híbridas (Metz et al., 1998).

Este trabalho descreve a produção de plantas transgênicas de café expressando o gene *bar* que confere tolerância ao glufosinato de amônio utilizando diferentes construções mediadas por *A. tumefaciens* ou pelo bombardeamento de partículas.

Material e Métodos

Fonte de explantes e condições de cultura

Folhas jovens e completamente expandidas de *C. canephora* clone LMC 82-6 foram coletadas de plantas crescidas no campo. As folhas foram lavadas com água corrente, desinfestadas em etanol 70% (v/v) por alguns segundos e em seguida imersas em uma solução comercial de hipoclorito de sódio (1%) por 30 min. As folhas foram enxaguadas quatro vezes em água destilada estéril. Os explantes foram cortados (1 cm²) em uma solução de cisteína 250 mg.L⁻¹ e colocados em placas de Petri (90 mm x 10 mm) contendo meio para indução de embriogênese somática direta (Hatanaka et al., 1991) suplementado com 5 µM 2-iP, 3% sacarose e solidificado com 8 g.L⁻¹ de ágar. O pH foi ajustado a 5,7 e o meio foi autoclavado a 120°C por 20 min. Dez explantes foram colocados em cada placa de Petri com a face adaxial em contato com o meio. As placas foram mantidas no escuro a 27±2°C durante 3 semanas antes de inoculação com *Agrobacterium tumefaciens*, ou até a formação de embriões somáticos utilizados para o bombardeamento de partículas.

Transformação de plantas

O vetor pCAMBIA3301 contendo o gene repórter *uidA* (Jefferson et al., 1987) que codifica a β-glucuronidase (GUS) e o gene *bar* (DeBlock et al., 1987) que codifica a fosfotricina acetiltransferase, ambos dirigidos pelo promotor de CaMV-35S, foi utilizado tanto para os experimentos de bombardeamento quanto para transformação mediada por *A. tumefaciens* estirpe EHA105. Outro vetor denominado pIB3 (pCAMBIA 3300 contendo o gene heterólogo da ACC oxidase na orientação antisense, além do gene *bar*) foi utilizado somente para experimentos mediados por *A. tumefaciens*.

Após três semanas de pré-cultivo, os explantes foram imersos em suspensão de *Agrobacterium* (D O de 0.2 a 600 nm) contendo 0,2 mM de acetosiringona, e submetidos a um pulso de sonicação (2 s) permanecendo 30 min na suspensão. Os explantes foram co-cultivados em meio ED para embriogênese somática por 4 dias e então transferidos para o mesmo meio suplementado com 10 µM de glufosinato de amônio e 400 mg.L⁻¹ de cefotaxima para indução de calos embriogênicos e regeneração seletiva de embriões transformados. Depois de seis meses, calos embriogênicos resistentes foram isolados e cultivados no mesmo meio seletivo, sem fitoreguladores até o desenvolvimento das plântulas.

Para o bombardeamento de partículas, explantes contendo embriões somáticos e tecido embriogênico foram transferidos para ½ do meio MS suplementado com 9 µM 2,4-D. Após 2 semanas, os explantes foram bombardeados com partículas de tungstênio (M-25). O DNA do plasmídeo pCAMBIA3301 foi precipitado sobre as micropartículas segundo o protocolo descrito por Klein et al (1987). Os explantes foram bombardeados usando equipamento com alta pressão de hélio PDS-1000/He (BioRad Laboratories, CA). As condições usadas para o bombardeamento foram: 1300 psi pressão; 60 mm distância aos explantes alvo; tratamento osmótico com 0,4 M de manitol: 4 h pré e 24 h pós-bombardamento. Os explantes bombardeados foram submetidos a seleção com glufosinato de amônio conforme descrito acima.

Ensaio Histoquímico do gene GUS

Tecidos de embriogênicos e segmentos foliares foram infiltrados com solução de X-Gluc *overnight* a 37°C e fixados em uma solução que contém 10% ácido acético, 50% etanol e 7,4% formaldeído. Os tecidos foram descorados em etanol 70% e observados usando um microscópio. Também foram realizados ensaios para expressão de GUS em folhas de plantas aclimatadas.

Análises moleculares

Plantas regeneradas foram analisadas inicialmente por PCR. A extração de DNA de folhas foi conduzida de acordo com Doyle & Doyle (1987). Os *primers* usados para amplificação do gene de *bar* foram: 5'-GTCTGCACCATGGTCAACC-3' e 5'-GAAGTCCAGCTGCCAGAAAC-3. O mix da reação de PCR foi incubada em termociclador MJ como segue: 94°C por 4 min, seguido por 30 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 59°C, 1 min a 72°C com 5 min de extensão final a 72°C.

Análise de Southern blot foi conduzida para confirmar a integração estável do gene de *bar* e da *ACC oxidase* no genoma das plantas transgênicas. DNA genômico foi extraído de plantas aclimatadas utilizando o mesmo protocolo usado para PCR. Foram digeridos vinte µg de DNA com *EcoRI* para a hibridação com a sonda do gene *bar* e com as enzimas *EcoRI* e *HindIII* para a hibridação com a sonda do gene da *ACC oxidase*. O DNA digerido foi separado por eletroforese gel de agarose 0,8%. A transferência para as membranas de nylon ocorreu por capilaridade. As sondas foram marcadas radioativamente com P³² de acordo com Sambrook et al. (1989). Após hibridização *overnight* a 65°C, as membranas foram lavadas em 2X SSC, 0,1% SDS a temperatura ambiente e em 1X SSC, 0,1% SDS a 65°C, as membranas foram expostas em filme de radiografia (Kodak®) a -80°C por 48-72h.

Teste de tolerância ao herbicida

Plantas transformadas e plantas controle foram cultivadas durante 7 meses em casa de vegetação. As plantas foram pulverizadas (aproximadamente 3 ml por planta) com soluções aquosas da formulação comercial do herbicida (Finale® AgrEvo) nas seguintes concentrações 200, 400, 800 1200 e 1600 mg.L⁻¹ de glufosinato de amônio. Foi avaliada a tolerância das plantas ao herbicida visualmente uma semana depois de aplicação.

Resultados e Discussão

Inicialmente a estirpe desarmada EHA105 que contém pCAMBIA3301 foi usada para transformação de 118 explantes de café e 45 calos resistentes ao glufosinato foram produzidos. Ensaios histoquímico em pequenas porções dos calos demonstraram que 82% apresentaram reação GUS-positiva, enquanto os controles não mostraram nenhuma expressão do gene *uidA*. A atividade endógena de GUS não foi observada devido ao uso de metanol no ensaio de GUS o qual previne a atividade endógena do GUS (Kosugi et al., 1990). Hatanaka et al. (1999) relataram que 36% dos calos de café crescendo em meio seletivo com 5 mg.L⁻¹ higromicina, apresentaram reação GUS-positiva. Quando o gene de seletivo foi o chorsulfuron, a reação GUS-positiva foi observada em 50% de calos embriogênicos de café (Leroy et al., 2000). Nossos resultados mostraram que a concentração de glufosinato de amônio usado no meio de cultura foi eficiente para selecionar tecidos transformados.

Plantas regeneradas foram submetidas à análise de PCR para detecção do gene *bar*. Nos experimentos de transformação mediados por *A. tumefaciens*, o gene *bar* foi detectado em 18 das 26 plantas e 44 das 62 analisadas para os vetores pCAMBIA3301 e pIB13, respectivamente. As 4 plantas transformadas por meio do bombardeamento de partículas foram também PCR positivas.

A análise de Southern blot foi realizada em nove plantas regeneradas de cada construção transformada por *A. tumefaciens* e três plantas do ensaio de bombardeamento para confirmar a integração estável do gene de *bar* e da *ACC oxidase* no genome de café.

Quando o vetor pCAMBIA3301 foi usado para transformação das plantas, os resultados mostram a integração de única cópia independente do gene de *bar* em todas as plantas originadas a partir de calos distintos transformados por *A. tumefaciens*. Leroy et al. (2000) observou que em 51 eventos de café transgênicos também transformados por *Agrobacterium*, 69% apresentaram só uma cópia de T-DNA.

As plantas transgênicas de café apresentaram desenvolvimento normal durante a fase vegetativa e foram polinizadas manualmente para a produção de sementes. A geração F1 de plantas transformadas com pIB13 foi testada em relação à tolerância ao herbicida, das 36 plantas pulverizadas 20 mostraram tolerância a 200 mg.L⁻¹ de glufosinato de amônio, demonstrando segregação 1:1, sendo um indicativo da inserção de uma cópia do transgene. No entanto as plantas transformadas por bombardeamento apresentaram no mínimo 5 cópias do gene *bar* indicando que ocorreram inserções múltiplas independentes do gene ou rearranjos e concatenação do DNA, comumente mostrado em plantas produzidas por bombardeamento de partículas (Cabrera-Ponce et al., 1995; Bower et al., 1996). Em plantas transformadas por *Agrobacterium* contendo o vetor pIB13, a dupla digestão com as enzimas *EcoR* I e *Hind* III, liberou um fragmento de aproximadamente 1200 pb que hibridizou com a sonda correspondente ao gene da *ACC oxidase*.

A expressão do gene de *bar* foi verificada por aplicação localizada do herbicida em plantas aclimatadas. As plantas transgênicas e plantas controles (não-transformados) foram pulverizadas com diferentes concentrações do herbicida (Finale®). Em plantas não transformadas, a aplicação de 200 mg.L⁻¹ de glufosinato de amônio resultou em necrose das folhas após 48 h da aplicação e em alguns casos morte da planta inteira depois de poucos dias. Em contraste, plantas transgênicas não mostraram dano até mesmo na concentração de 800 mg.L⁻¹. Foram observadas pequenas manchas necróticas e uma leve perda de pigmentação somente na superfície abaxial de folhas quando 1200 e 1600 mg.L⁻¹ do glufosinato de amônio foi aplicado (dados não mostrados). Mesmo em concentrações altas do herbicida, todas as plantas transgênicas recuperaram-se do dano e continuaram crescendo, mostrando que plantas expressando o gene *bar* podem tolerar 8 vezes mais a concentração de glufosinato de amônio requerida para matar plantas não transformadas.

Conclusões

O uso do gene *bar* que confere tolerância ao glufosinato de amônio pode ser usado como agente seletivo para produzir plantas de café geneticamente modificadas. Além disso, plantas transformadas com este gene podem tolerar altas doses de herbicida podendo facilitar o controle de plantas daninhas em lavouras cafeeiras.

Agradecimentos

Os autores agradecem aos técnicos Fátima Borges Bustos e João Batista da Silva pela assistência. Apoio financeiro do Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café (CBP&D-Café).

Referências Bibliográficas

- Bower, R.; Elliot, A.R.; Pottier, B.A.M.; Birch, R.G.: High-efficiency, microprojectile-mediated co-transformation of sugarcane, using visible or selectable markers. - *Mol. breed.* 2: 239-249, 1996.
- Cabrera-Ponce, J.L.; Vegas-Garcia, A.; Herrera-Estrella, L.: Herbicide resistant transgenic papaya plants produced by an efficient particle bombardment transformation method. - *Plant Cell Rep.* 15: 1-7, 1995.
- DeBlock, M.; Botterman, J.; Vandewiele, M.; Dock, J.; Thoen, C.; Gosselé, V.; Rao, N.; Movva, C.; Thompson, M.; Van Montagu, M.; Leemans, J.; (1987), Engineering herbicide resistance in plants by expression of a detoxifying enzyme. *EMBO J.*, 6, 2513-2518.
- Devine, M. D.; Duke, S. O.; Fedtke, C. (1993), Physiology of herbicide action. Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ, pp. 251-294.
- D'Hauillin, K.; DeBlock, M. D.; Denecke, J.; Janssens, J.; Leemans, J.; Reynaerts, A.; Botterman, J. (1992), The *bar* gene as selectable and screenable marker in plant engineering. *Methods in Enzymol.*, 216, 415-26.
- Doyle, J. J.; Doyle, J. L. (1987), Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12, 13-15.
- Hatanaka, J.; Arakawa, O.; Yasuda, T.; Ushida, N.; Yamaguchi, I. (1991), Effect of plant growth regulators on somatic embryogenesis in leaf cultures of *Coffea canephora*. *Plant Cell Rep.*, 10, 179-182.
- Hatanaka, T.; Choi, Y.E.; Kusano, T.; Sano, H.: Transgenic plants of *Coffea canephora* from embryogenic callus via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. - *Plant Cell Rep.* 19: 106-110, 1999.
- Jefferson, R. A.; Kavanagh, T. A.; Bevan, M. W. (1987), Gus Fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.*, 6, 3901-3909.
- Klein, T.M.; Wolf, E.D.; Wu, R.; Sanford, J. C.: High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. - *Nature.* 327: 70-73, 1987.
- Kosugi, S.; Oshashi, Y.; Nakajima, K.; Arai, Y. (1990), An improved assay for β -glucuronidase in transformed cells: methanol almost completely suppresses a putative endogenous β -glucuronidase activity. *Plant Sci.*, 70, 133-140.
- Leroy, T.; Henry, A. M.; Royer, M.; Altosaar, I.; Frutos, R.; Duris, D.; Philippe, R. (2000), Genetically modified coffee plants expressing the *Bacillus thuringiensis cry1Ac* gene for resistance to leaf miner. *Plant Cell Rep.*, 19, 382-389.
- Metz, P.; Stiekema, W.; Nap, J. (1998), A transgene-centered approach to the biosafety of transgenic phosphinothricin-tolerant plants. *Mol Breed.*, 4, 335-341.
- Murakami, T.; Anzai, H.; Imai, S.; Saoh, A.; Nagaoka, K.; Thompson, C. J. (1986), The bialaphos biosynthetic genes of *Streptomyces hygroscopicus*: molecular cloning and characterization of gene cluster. *Mol Gen Genet.*, 205, 42-50.
- Sambrook, J.; Fritsch, E. F.; Maniatis, T (1989) Molecular cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed. Cold Spring Harbour Laboratory Press. New York.
- Strauch, E.; Wohllenben, W; Pühler, A. (1988) Cloning of a phosphinothricin N-acetyltransferase gene from *Streptomyces viridochromogenes* Tü494 and its expression in *Streptomyces lividans* and *Escherichia coli*. *Gene*, 63:65-74.