

INIBIDORES DE α -AMILASE E SUA APLICAÇÃO NO CONTROLE DA BROCA-DO-CAFÉ

A. E. A. D. BARBOSA^{1,2}; E. V. S. A. BARROS¹; J. B. TEIXEIRA³; M. F. GROSSI DE SÁ¹

¹Laboratório Interação Molecular Planta-Praga. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Brasília, DF. ²Universidade Católica de Brasília. Brasília, DF. ³Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

Resumo:

O Brasil é o maior produtor mundial de café, detendo 36% do mercado, e as espécies *Coffea arabica* (65%) e *Coffea canephora* (35%) são as mais comercializadas. As plantações de café são atacadas por uma série de pragas agrícolas, sendo a principal delas a broca-do-café (*Hypothenemus hampei*). Este coleóptero é bastante difícil de ser controlado, pois passa todo o ciclo de vida protegido dentro do fruto do café. O controle é restrito a utilização de inseticida carcinogênico e tóxico para o meio ambiente. Recentemente, foi demonstrando em experimentos *in vitro* que o inibidor α -AII do feijão *Phaseolus vulgaris* inibe a atividade das duas α -amilases presentes no trato intestinal da broca-do-café. Em nosso grupo de trabalho foi demonstrado que um inibidor de α -amilase presente em acessos do feijão selvagem *Phaseolus coccineus* (α IPC) é altamente ativo contra α -amilases desta praga. A disponibilidade em nosso laboratório destes gene e de técnicas eficientes para transformar geneticamente *C. arabica* e *C. canephora* tornaram possível a obtenção de plantas de café transformadas com o gene do inibidor α -AII e de embriões selecionados com o inibidor α IPC para o controle da broca. Utilizando a técnica de biobalística em calos embriogênicos de *C. arabica* foram obtidas 6 plantas positivas para o gene α -AII, já identificadas via Southern Blot. Estas plantas apresentaram baixo número de cópias, 5 delas com 1 cópia e apenas uma planta com duas cópias do gene. Duas das plantas positivas por Southern Blot estão produzindo frutos e logo será possível avaliar o nível de expressão do inibidor α -AII e a atividade dos frutos transgênicos no controle da broca-do-café via bioensaios. Os calos embriogênicos de *C. arabica* e *C. canephora* transformados com o inibidor de alfa-amilase do feijão *Phaseolus coccineus* estão em meio de indução de regenerando embriões dos calos selecionados. O resultado deste trabalho poderá resultar em cultivares de café menos impactantes ao meio ambiente, tornando o café brasileiro mais competitivo no mercado internacional.

Palavras-chave: *Coffea arabica*, transformação, inibidores de alfa-amilase.

α -AMYLASE INHIBITORS AND ITS USE TO CONTROL COFFEE BERRY BORER

Abstract:

Coffee is one of the most important products to the Brazilian agribusiness, reaching 2.53 million of tons in the 2006's crop, corresponding to 36% of world market. The most cultivated species are *Coffea arabica* and *Coffea canephora*, which are both attacked by the coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*), the most damaging insect pest of this crop. Interestingly, *in vitro* experiments demonstrated that the α -amylase inhibitor (α -AII) of the common bean, *Phaseolus vulgaris* is able to inhibit the two α -amylases founded in the *H. hampei* digestive tract, turning the gene for this inhibitor a good candidate to be used in the control of this insect through plant genetic transformation. In this way, the main goal of this work is to obtain *C. arabica* plants genetically transformed with α -AII gene as an attempt to control the coffee berry borer. *C. arabica* calli were transformed through particle bombardment with pTA4 vector, containing the α -AII inhibitor gene under the control of phytohemagglutinin promoter and terminator, and the *nptII* gene for selection of transformed cells. After bombardment, the bombarded calli were transferred to the selection media in the presence of kanamycin as selection agent and maintained in the dark at 25°C \pm 2. After a 4 months selection period, the resistant calli were transferred to the regeneration media until the appearance of embryos and plantlets. Then, the plantlets were transferred to the green house and were evaluated through PCR and Southern blot analyzes. The genetic evaluations identified six transgenic plants containing the presence of α -AII inhibitor gene in the genome of the transformed coffee plants. Five of them exhibited one copy of the transgene, while one plant showed 2 copies. The data showed that the methodology applied was adequate to the introduction of new desirable traits with a low copy number in *Coffea arabica* plants. All the transformed plants are currently flowering and producing fruits, witch will allow the evaluation of expressed inhibitor level through ELISA and Western blot analysis and the insecticidal activity of transgenic fruits to the coffee berry borer.

Key words: *Coffea arabica*, plant transformation, alpha-amylase inhibitors.

Introdução

O café é uma importante fonte de renda para a economia do Brasil, tendo uma produção estimada para 2006 de 2.535.768 toneladas, sendo os estados de Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo, Paraná e Bahia, os maiores produtores nacionais (IBGE, 2006). Essa produção corresponde a 36% do mercado mundial e faz do Brasil o principal produtor e o segundo em consumo de café, atrás apenas dos Estados Unidos (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2003).

As espécies *C. arabica* e *C. canephora* são as mais cultivadas, correspondendo, respectivamente, a 65% e 35% do mercado internacional. Ambas as espécies são afetadas pela broca-do-café (*Hypothenemus hampei*) (Ferrari, 1867), que é a praga de maior importância para esta cultura.

As infestações da cafeicultura pela broca-do-café chegaram a causar muitos prejuízos. No estado do Espírito Santo, por exemplo, a broca-do-café causou, em termos quantitativos, a destruição de aproximadamente 154 mil sacas de café no ano 2000, totalizando cerca de R\$ 40 milhões, que deixam de circular anualmente na economia deste estado (Incaper, 2000). A espécie *C. canephora* é a mais susceptível ao ataque da broca, provavelmente porque apresenta uma floração irregular durante todo o ano, sempre com frutos em diferentes estágios de desenvolvimento e seu plantio é realizado em regiões quentes, características que favorecem o ciclo do inseto (Filho e Mazzafera, 2003).

Valencia e colaboradores (Valencia *et al*, 2000) demonstraram, em experimentos *in vitro*, que o inibidor α -AI1, isolado de sementes de *P. vulgaris*, inibe a atividade das duas α -amilases, presentes na broca-do-café, *H. hampei*. Recentemente, um outro inibidor de α -amilase, isolado de sementes de um acesso do feijão selvagem, *P. coccineus*, mostrou-se também bastante eficiente em inibir as α -amilases da broca-do-café (Pereira *et al*, 2006). Visando o controle dessa importante praga da cafeicultura, o objetivo deste trabalho é a utilização dos genes para os dois inibidores de α -amilases (α AI-I e α AI-Pc) no desenvolvimento de plantas de café transgênicas. Os estudos existentes envolvendo transformação de café (Hatanaka *et al*, 1999; Dufour *et al*, 2000; Ogita *et al*, 2002; Rosillo *et al*, 2003) e o recente estabelecimento da técnica de transformação genética de *C. arabica*, pelo nosso grupo (Cunha *et al*, 2006) contribuíram para a obtenção de plantas de café resistente a *H. hampei*, aqui apresentada.

Materiais e Métodos

Construção do Vetores

Foi construído um plasmídeo com o gene do inibidor α AI-1 de *Phaseolus vulgaris* no vetor pBIN19, sob controle do promotor e terminador da fitohemaglutinina (Figura 1A)(Grossi de Sá *et al*, 1997). Outra construção foi desenvolvida a partir do vetor pCAMBIA2300 com o inibidor de *P. coccineus*, também sob o controle do promotor semente específico da fitohemaglutinina (Figura 1B).

Transformação das plantas de café

A transformação de *C. arabica* cv Catuaí Vermelho foi feita por meio da técnica de biobalística utilizando protocolo publicado recentemente (Cunha *et al*, 2006). Cerca de 50 mg de calos embriogênicos, produzidos por indução de embriogênese somática de fragmentos foliares, foram utilizados em cada placa dos 6 experimentos de bombardeamento. Após o bombardeamento, os calos foram transferidos para meios seletivos e de regeneração, até o desenvolvimento de plântulas, as quais foram transferidas para casa de vegetação.

Análise molecular das plantas de café transformadas

As potenciais plantas de café transformadas foram analisadas via PCR e *Southern Blot*. Foram realizadas PCRs para verificar a presença do gene de resistência ao antibiótico canamicina e *Southern Blot* para identificar as plantas que integraram em seu genoma os respectivos genes de inibidores de α -amilases.

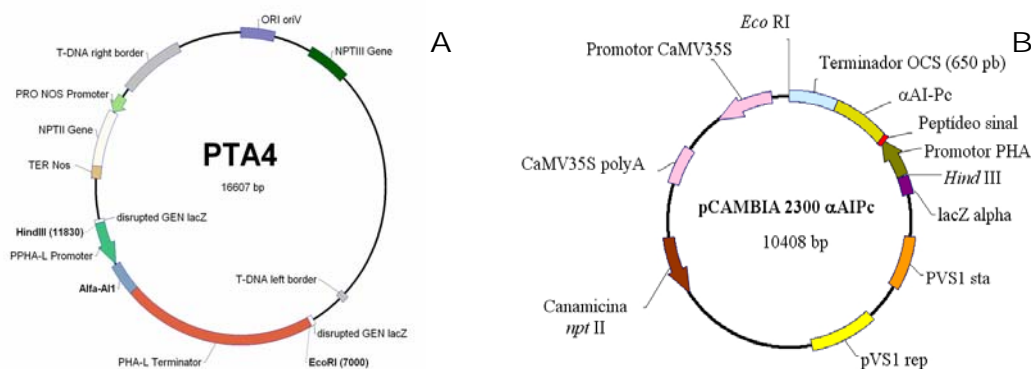


Figura 1. A - Plasmídeo pTA4 construído para a transformação de plantas de café. PHA-L (Fitohemaglutinina). B - Plasmídeo pCAMBIA2300 α AIPc.

Resultados e Discussão

O experimento de transformação de *C. arabica* com o vetor pCAMBIA2300 α AIPc gerou embriões primários mesmo sob seleção do antibiótico kanamicina a 400 mg/l, o que indica uma possível transformação dos calos embriogênicos (Figura 2A e B).

O experimento de transformação via biobalística gerou 15 plantas de café, sendo que em seis delas foi demonstrada a integração do gene do inibidor α AI-1 por *Southern blot*. Cinco das 6 plantas transformadas apresentaram uma única cópia do gene α AI-1 inserido no genoma da planta e uma apresentou duas cópias (Figura 3, linha 1). Este baixo número de cópias introduzido é incomum em métodos de transformação por biobalística, mas, por questões de biossegurança é ideal para em plantas que serão utilizadas na produção agrícola. Duas dessas plantas geneticamente modificadas estão em fase de frutificação, cujos frutos serão brevemente desafiados contra a broca-do-café (Figura 4).

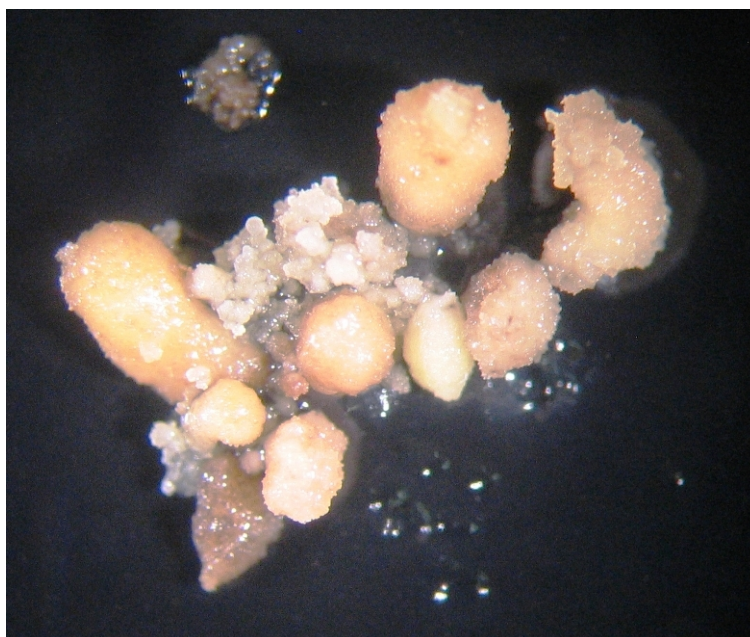


Figura 2. Embriões de *Coffea arabica* que foram transformados com o inibidor de α -amilase do feijão selvagem *Phaseolus coccineus* e o gene de resistência ao antibiótico kanamicina.

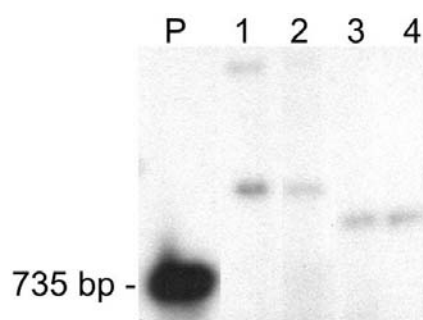


Figura 3. Análise por *Southern blot* de plantas de *C. arabica* transformadas. P: fragmento α AI-1 como controle positivo; 1-4: plantas de café transformadas.



Figuras 4. (A) Plantas, flores e frutos de café arábica positivas em “*Southern Blot*” para a presença do gene α AI-1 no genoma da planta.

Conclusões

Podemos concluir que a transformação de *C. arabica* via biobalística é adequada para a produção de plantas com novas características de interesse biotecnológico. Em nosso trabalho foram obtidas até o momento 6 plantas de café transgênicas para o inibidor α -AI1 de *P. vulgaris*, todas com baixo número de cópias. Este gene tem potencial para controlar a broca-do-café. As perspectivas para os estudos futuros incluem a análise molecular das plantas de *C. arabica* transformadas contendo o gene α AI-1 de *Phaseolus vulgaris* via Western Blot e os bioensaios desafiando os frutos com a broca-do-café para avaliar a eficiência do inibidor no controle do inseto.

Referência Bibliográfica

- Cunha, W.G., Machado, F.R.B., Barbosa, M.F.F., Teixeira, J.B., Vianna, G.R., Sá, M.F.G., Barros, E.V.S.A. (2006). *Coffea Arabica* Plants Genetically Modified Throug Bombardment. Plant Cell Reports (In press).
- Dufour, M., Leroy, T., Carasco-Lacombe, C., Philippe, R., Fenouillet, C. (2000). Coffee (*Coffea* SP.) Genetic Transformation for Insect Resistance. Coffee Biotechnology and Quality, 209-217.
- Filho, O.G., Mazzafera, P.(2003). Caffeine and Resistance of Coffee to the Berry Borer *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae). *J. Agric. Food Chem.* 51: 6987-6991.
- Hatanaka, T., Choi, Y. E., Kusano, T., Sano, H. (1999). Transgenic plants of coffee *Coffea canephora* from embryogenic callus via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. Plant Cell Reports, 19: 106-110.
- Ogita, S., Uefuji, H., Choi, Y.-E., Hatanaka, T., Ogawa, M., Yamaguchi, Y., Koizumi, N., Sano, H. (2002). Genetic Modification of Coffee Plants. Journal of Plant Biotechnology, 4(3): 91-94.
- Pereira, R.A., et al. (2006). An a-amylase inhibitor gene from *Phaseolus coccineus* encodes a protein with potential for control of coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*). Phytochemistry, 67:2009–2016.
- Valencia, A., Bustillo, A.E., Ossa, G.E., Chrispeels, MJ. (2000). α -Amylases of the coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*) and their inhibition by two plant amylase inhibitors. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 30:207–213.
- Rosillo, A.G., Acona, J.R., Gaitan, A.L., Pena, M. (2003). Optimized DNA delivery into *Coffea arabica* suspension culture cells by particle bombardment. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 74: 45-49.
- Sá, M.F.G., Mirkov, T.E., Ishimoto, M., Colucci, G., Bateman, K.S., Chrispeels, M.J. (1997). Molecular characterization of a bean a-amylase inhibitor that inhibits the a-amylase of the Mexican bean weevil *Zabrotes subfasciatus*. Planta (1997) 203: 295±303.