

## TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE *Coffea arabica* ATRAVÉS DE BOMBARDEAMENTO<sup>1</sup>

Érika V. S. A. BARROS – Embrapa; Gisele B. ARAÚJO e Ana Cristina M. BRASILEIRO – Embrapa/CENARGEN (anacmb@cenargen.embrapa.br)

**RESUMO:** A manipulação genética de espécies de *Coffea* através de procedimentos de transformação constitui uma valiosa ferramenta para os programas de melhoramento de café. Vários estudos já foram desenvolvidos para o estabelecimento de um protocolo eficiente de transformação de *C. arabica*. Entretanto, os mais conhecidos, como uso de protoplastos e transformação mediada por *Agrobacterium*, foram dificultados por problemas de regeneração *in vitro*. Desta forma, o objetivo deste trabalho é testar o uso da biolística como uma estratégia alternativa para transformação da região do meristema apical de embriões zigóticos de *C. arabica*.

Neste trabalho são apresentados os resultados provenientes de experimentos preliminares de desenvolvimento de um protocolo de transformação via bombardeamento para obtenção de plantas transgênicas de *C. arabica*. Foram determinadas as condições básicas para a multibrotação *in vitro* de meristemas apicais de embriões zigóticos de *C. arabica* e posterior aclimação dos brotos obtidos. Além disso, são apresentados os resultados comparativos de reguladores de crescimento de plantas em dois cultivares de *C. arabica*. A dose seletiva de Imazapyr, a molécula de herbicida utilizada como agente seletivo na transformação de células meristemáticas, também foi estabelecida.

Em relação à expressão transiente do gene repórter *gus*, nossos resultados mostraram que não houve diferença entre três plasmídios testados. Por outro lado, uma variação foi observada em relação à idade do embrião no momento do bombardeamento. A expressão estável do gene *gus* observada em um broto derivado da região apical de embrião zigótico confirmou a possibilidade de monitoramento da transformação neste tipo de tecido.

**PALAVRAS-CHAVE:** Transformação genética, bombardeamento, meristema apical, expressão de transgenes.

**ABSTRACT:** The genetic manipulation of *Coffea* species through transformation procedures is a valuable tool for coffee breeding programs. Many studies have attempted to establish an efficient protocol of *C. arabica* transformation. However, the use of protoplasts and *Agrobacterium*-mediated process has been hindered by regeneration problems. For that, the aim of this work is to test the use of biolistics as an alternative strategy to transform the meristematic apical region of *C. arabica* zygotic embryos.

In this work, we present the results from some preliminary assays toward the development of a transformation method in order to obtain *C. arabica* transgenic plants. The *in vitro* conditions for successful multiple shooting induction and acclimatization of apical shoots from *C. arabica* zygotic embryos were determined. In addition, the effect of plant growth regulators on multiple shooting induction of the apical regions of two cultivars has been investigated. We have also determined the selective dose of Imazapyr, the herbicidal molecule used as selective agent in transformation of meristematic cells.

Regarding to the transient expression of *gus* reporter gene, our results showed that there was no difference among three plasmid tested. We have also observed a variation on the transformation efficiency related to the age of the embryo at bombardment. Some stable expression was observed a shoot derived from the apical region of a zygotic embryo, showing that transformed areas can be detected in this kind of tissue.

### INTRODUÇÃO

Baseado na importância da cultura do cafeeiro (*Coffea* spp.) no Brasil, é crescente o interesse em manipular essa planta utilizando técnicas de biologia celular e molecular. Esse interesse reside principalmente na possibilidade de obtenção de plantas de cafeeiro contendo características desejáveis, em um espaço de tempo mais curto, constituindo-se uma fonte adicional de variabilidade a ser integrada em programas de melhoramento genético (Söndahl et al., 1984; Söndahl e Loh, 1988). Para tanto, existe a necessidade

<sup>1</sup> Apoio financeiro: CONSÓRCIO BRASILEIRO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE CAFÉ

intrínseca do desenvolvimento de metodologias eficientes de manipulação genética deste arbusto, envolvendo as áreas de cultura de tecidos, transferência e clonagem de genes.

O desenvolvimento de uma metodologia de transformação genética para o cafeeiro torna-se essencial para o Brasil sustentar seu grau de capacitação tecnológica em relação a outros países produtores, mantendo uma posição de vanguarda na utilização de novas tecnologias. A tecnologia de transformação genética que se pretende incorporar aos processos convencionais de melhoramento possui um enorme potencial de retorno econômico (Carneiro, 1997). Isso ocorre basicamente em função de dois aspectos: (i) ganho no tempo necessário para se incorporar novas características em cultivares geneticamente superiores; e (ii) incorporação de características de interesse direto para o cultivo do cafeeiro, e que não estão disponíveis, ou dificilmente disponíveis, por variabilidade genética, como resistência a doenças e pragas, resistência a herbicidas e estresses abióticos, diminuição do porte das árvores, macho-esterilidade, controle da maturação do fruto, modificação na composição/conteúdo de cafeína etc.

O presente trabalho tem por objetivo o desenvolvimento de um sistema de transformação genética para cafeeiro utilizando-se estratégias de transferência direta de genes, através do processo biobalístico.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Indução de multibrotação.**

Embriões zigóticos foram isolados a partir de frutos maduros retirados de cultivares de cafeeiro de qualidade superior (Catuaí Vermelho e IAPAR 59). As sementes foram desinfestadas superficialmente por agitação em hipoclorito de sódio 2% por 20 minutos e lavadas em água estéril, permanecendo então em embebição por 2 dias. Os embriões foram extraídos e inoculados em meio WPM (*Wood Plant Medium*, Lloyd e McCown, 1981) e incubadas em sala de cultura por período de 2, 4, 6 ou 8 dias, com uma temperatura de  $25 \pm 2^\circ$  e fotoperíodo de 16 horas. Após o crescimento inicial, os cotilédones foram retirados e os eixos foram cultivados em meio SP (Barrueto Cid et al., 1999) contendo BAP 10 mg/L ou TDZ 1  $\mu$ M por 2 semanas. Em outro experimento, os eixos foram cultivados por 3 dias em TDZ 10 nM, 100 nM, ou 10  $\mu$ M e em seguida no meio com BAP 10 mg/L por 2 semanas. Também foi testada a indução a partir da embebição das sementes em TDZ 10 ou 20  $\mu$ M. Após o período de incubação com reguladores de crescimento, os eixos permaneceram em WPM por pelo menos 30 dias até serem avaliados. Os brotos obtidos foram enraizados em SP com IBA 2,5 ou 5 ou 10  $\mu$ M e aclimatados em casa de vegetação em potes de solo e vermiculita 1:1. A variação dos meios de cultura foi testada com a incubação dos eixos embrionários nos meios SP, WPM, MS (Murashige & Skoog, 1962), DKW (Driver & Kuniyuki, 1984) e PR (Li et al., 1998).

### **Aceleração de micropartículas.**

Os eixos embrionários foram posicionados com a região apical voltada para cima em uma placa de Petri contendo meio SP com fitagel 0,8%. A esterilização das micropartículas de tungstênio e a precipitação do DNA sobre as mesmas foram realizadas segundo o protocolo estabelecido por nosso grupo (Aragão *et al.*, 1996). As condições de bombardeamento dos meristemas apicais de embriões de café, assim como o estado fisiológico do tecido, plasmídeo utilizado e idade do explante foram avaliados.

### **Vetores utilizados.**

Nos ensaios iniciais de transformação foram utilizados os seguintes vetores: pBI 426 (Bommineni et al., 1994), contendo o gene repórter *gus*, que codifica para a enzima  $\beta$ -glucuronidase (GUS); pAG1 (Aragão et al., 2000) com o gene *gus* e o gene *ahas* de resistência ao herbicida Imazapyr; pAA4, baseado no pAG1 e contendo um gene inibidor de  $\alpha$ -amilase de insetos.

### **Seleção dos tecidos transgênicos.**

Um teste de sensibilidade foi realizado para se determinar qual é a melhor dose do agente seletivo Imazapyr a ser utilizada para a seleção das células transformadas. Os eixos embrionários foram colocados em meio SP contendo 100, 200 ou 300  $\eta$ M de Imazapyr e avaliados após 5 semanas de incubação.

### **Análise da expressão do gene *gus*.**

Após o bombardeamento, o teste histoquímico para a localização *in situ* da atividade da enzima GUS foi realizado segundo a metodologia descrita por Jefferson *et al.* (1987). A eficiência de transformação foi avaliada pelo número médio de pontos azuis 48 horas após o tecido ter sido bombardeado. A expressão estável do gene *gus* foi avaliada após a emergência de brotos em meio seletivo.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram estabelecidas as condições de esterilização, extração e cultivo de embriões zigóticos de *C. arabica*. Os brotos advindos da região apical enraizaram nas diferentes concentrações de IBA e desenvolveram-se normalmente nas condições *in vitro* descritas, dando origem a plantas fenotipicamente normais.

Os melhores resultados de multibrotação foram obtidos usando BAP 10 mg/L nas idades 2, 4 e 6 dias e pelo TDZ na idade 0. O tratamento de TDZ na embebição da semente mostrou melhor resultado na idade 0 com TDZ 20 µM. Aparentemente não houve diferença significativa nas diferentes concentrações de TDZ em relação à idade do embrião.

Os eixos bombardeados pré-induzidos com TDZ demonstraram maior número de pontos, tanto na região apical como no restante do eixo, na idade 2 com a concentração de 10 µM. Não foi observada diferença na expressão transiente entre os três plasmídios testados. No bombardeamento das diferentes idades de embriões cultivados em WPM, observamos um maior número total de pontos nos eixos da idade 2, enquanto que a expressão transiente na região apical foi melhor tanto na idade 2 como em 8 dias.

O desenvolvimento de brotos ficou extremamente reduzido desde 100 nM de Imazapyr, mas ainda foram observadas a presença de gemas e pequenos pares de folhas definhadas. A concentração de 200 nM inibiu a formação destas pequenas folhas, enquanto que em 300 nM o meristema apical foi completamente bloqueado e alguns eixos eventualmente morreram. Com base nestes dados, foi estabelecido que a faixa de seleção de brotos de *C. arabica* ocorre entre 100 e 200 nM de Imazapyr.

## CONCLUSÕES

A detecção da expressão do gene *gus* na região apical dos embriões zigóticos de *C. arabica* indicou que esta região é passível de transformação pelo método biobalístico.

Os parâmetros físicos e biológicos do bombardeamento, bem como a forma de seleção de células transformadas, devem ser ajustados para aumentar a eficiência do processo.

## AGRADECIMENTOS

Dr. Maria C. L. L. Dias (IAPAR-PR), Dr. Antônio A. Pereira (EPAMIG-MG), Dr. Antônio C. Fazuolli (IAC- SP), Dra. Mirian Eira (Embrapa Cenargen - DF) e Dra. Izulmé dos Santos (Embrapa Cenargen - DF), pelo envio de sementes de *C. arabica*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aragão FJL, Barros LMG, Brasileiro ACM, Ribeiro SG, Smith FD, Sanford JC, Faria JC, Rech EL: Inheritance of foreign genes in transgenic bean (*Phaseolus vulgaris* L.) co-transformed via particle bombardment. *Theor. Appl. Genet.* 93: 142-150 (1996).
- Aragão FJL, SAROKIN L, VIANNA GR, RECH EL: Selection of transgenic meristematic cells utilizing a herbicidal molecule results in the recovery of fertile transgenic soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) plants at high frequency. *Theoretical And Applied Genetics* 101: 1-6 (2000).
- Barrueto Cid LP, Machado ACMG, Carvalheira SBRC, Brasileiro ACM: Plant regeneration from seedling explants of *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*. *Plant Cell Tis. Org. Cult.* 56: 17-23 (1999).
- Bommineni VR, Datla RSS, Tsang EWT: Expression of *gus* in somatic embryo cultures of black spruce after microprojectile bombardment. *J. Exp. Bot.* 45: 491-495 (1994).
- Carneiro MF: Coffee biotechnology and its application in genetic transformation. *Euphytica* 96: 167-172 (1997).
- Driver JA, Kuniyuki AH: In vitro propagation of Paradox walnut rootstock. *HortScience* 19: 507-509 (1984).
- Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW: GUS fusions: β-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* 6: 3901-3907 (1987).
- Li Z, Traore A, Maximova S, Guiltinan MJ: Somatic embryogenesis and plant regeneration from floral explants of cacao (*Theobroma cacao* L.) using thidiazuron. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 34: 293-299 (1998).
- Lloyd G, McCown B: Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. *Comb. Proc. Int. Plant Prop. Soc.* 30: 421-427 (1981).
- Murashige T, Skoog F: A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497 (1962).
- Söndahl MR, Loh WHT: Coffee biotechnology. In: Clarke RJ, Macrae R (eds) *Coffee*, pp. 235-261. Elsevier Applied Science Publishers, London (1988).
- Söndahl MR, Nakamura T, Medina-Filho HP, Carvalho A, Fazuoli LC, Costa WM: Coffee. In: Ammirato PV, Evans DA, Sharp WR, Yamada Y (eds) *Handbook of Plant Cell Culture - Crop species*, pp. 564-590. Macmillan Publishing Company, New York (1984).

## **AVISO**

ESTA PUBLICAÇÃO PODE SER ADQUIRIDA NOS  
SEGUINTE ENDEREÇOS:

### **FUNDAÇÃO ARTHUR BERNARDES**

Edifício Sede, s/nº. - Campus Universitário da UFV  
Viçosa - MG  
Cep: 36571-000  
Tels: (31) 3891-3204 / 3899-2485  
Fax : (31) 3891-3911

### **EMBRAPA CAFÉ**

Parque Estação Biológica - PqEB - Av. W3 Norte (Final)  
Edifício Sede da Embrapa - sala 321  
Brasília - DF  
Cep: 70770-901  
Tel: (61) 448-4378  
Fax: (61) 448-4425