

## TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE CAFÉ MEDIADA POR *Agrobacterium tumefaciens*

RIBAS, A.F.<sup>2</sup>; KOBAYASHI, A.K.<sup>2</sup>; BESPALHOK FILHO, J.C.<sup>2</sup>; GALVÃO, R.M.<sup>2</sup>; PEREIRA, L.F.P.<sup>2</sup>  
e VIEIRA, L.G.E

- IAPAR - Laboratório de Biotecnologia Vegetal, Caixa Postal 481, CEP 86001-970, Londrina-PR -

<sup>1</sup> Apoio financeiro: CONSÓRCIO BRASILEIRO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DO CAFÉ; <sup>2</sup> Autor para correspondência: <alessandra\_ribas@hotmail.com>

**RESUMO:** O objetivo deste trabalho foi estabelecer protocolos de transformação genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens* para as espécies *C. canephora* e *C. arabica*, usando o herbicida glufosinato de amônio como agente seletivo. Explantes de *C. canephora* foram cultivados em meio para indução de embriogênese direta, suplementados com 5 µM de 2-iP por três semanas. Para *C. arabica*, tecidos embriogênicos foram induzidos em meio WPM suplementado com 1,7 µM de BA e 0,7 µM de GA<sub>3</sub>. Os explantes e os tecidos embriogênicos foram imersos em suspensão de *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 contendo o plasmídeo pCambia3301, que contém genes de b-glucuronidase (*gus*) e fosfinotricina acetiltransferase (*bar*), que confere resistência ao glufosinato de amônio, ou pIB13, que contém o genes *bar* e ACC-oxidase de melão na orientação anti-senso. Os explantes foram submetidos à sonicação por 2 segundos e transferidos para meio ED no escuro e co-cultivados por quatro dias a 24 °C. Após esse período, foram transferidos para meio ED fresco contendo 10 µM de glufosinato e 400 mg.L<sup>-1</sup> de cefotaxima. Tecidos embriogênicos de *C. canephora* e *C. arabica* resistentes ao glufosinato de amônio foram submetidos à análise histoquímica do gene *gus*. A atividade do gene *gus* foi detectada em 82,2% dos tecidos de *C. canephora* testados e nos calos recém-formados de *C. arabica* resistentes ao glufosinato de amônio. A integração do gene *bar* foi confirmada em tecidos embriogênicos de *C. canephora* pela análise de PCR.

**Palavras-chave:** transformação genética, *Agrobacterium tumefaciens*, café, glufosinato de amônio, gene *bar*.

**GENETIC TRANSFORMATION WITH COFFEE MEDIATED BY *Agrobacterium tumefaciens***

**ABSTRACT:** The objective of this work was to establish a protocol for *Agrobacterium-mediated* transformation of *C. canephora* and *C. arabica* using the herbicide ammonium glufosinate as selective agent. Explants of *C. canephora* were cultured on medium to induce direct embryogenesis supplemented with 5 $\mu$ M 2-iP for 3 weeks. Embryogenic tissue of *C. arabica* were induced on WPM medium supplemented with 1.7  $\mu$ M BA and 0.7  $\mu$ M GA<sub>3</sub>. The explants and embryogenic tissue were soaked in *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 harboring the binary vector pCambia3301 containing b-glucuronidase (*gus*) and phosphinotricin acetyltransferase (*bar*) genes, which confers resistance to ammonium glufosinate, or pIBI3 containing the *bar* gene antisense sequence of the gene coding for ACC oxidase from mellon. The explants were submitted to sonication for 2 seconds, and co-cultured on ED medium for 4 days in the dark at 24° C and transferred to selective ED medium containing 10  $\mu$ M ammonium glufosinate and 400 mg.l<sup>-1</sup> cefotaxime. Ammonium glufosinate-resistant embryogenic tissue of *C. canephora* and *C. arabica* were submitted to histochemical assay of *gus* gene. *Gus* gene activity was detected on 82.2 % of *C. canephora* tissue and on the newly formed ammonium glufosinate-resistant callus of *C. arabica*. The integration of *bar* gene was confirmed by PCR analysis.

**Key words:** genetic transformation, *Agrobacterium tumefaciens*, coffee, ammonium glufosinate, *bar* gene

## INTRODUÇÃO

O uso da engenharia genética para introduzir características selecionadas em plantas perenes é de grande importância para reduzir o tempo para obtenção de novas cultivares.

Os avanços obtidos nas técnicas de cultura *in vitro* de café têm permitido a sua manipulação em níveis celular e molecular, fazendo do café uma planta apropriada para aplicação da biotecnologia em programas de melhoramento, incluindo transformação genética (Carneiro, 1999). No atual estágio de desenvolvimento do processo de transformação de plantas, o sistema mais usado é o da transferência de DNA via *Agrobacterium*. Esta técnica é rotineiramente usada e muitas espécies foram transformadas com este sistema (Brasileiro e Dusi, 1999). Os primeiros protocolos de transformação em café baseavam-se na integração e expressão de genes em protoplastos (Barton et al., 1991). Devido aos resultados pouco satisfatórios obtidos através deste método, tentativas para a transformação de café foram feitas usando-se *Agrobacterium* como vetor (Spiral et al., 1993). A partir desse trabalho, vários outros relatos sobre a transformação genética de café têm sido publicados, mediados por *Agrobacterium rhizogenes* em *C.*

*arabica*, *C. canephora*, Arabusta (Spiral & Pétiard, 1993) e *C. arabica* (Sugiyama et al., 1995) e mediados por *A. tumefaciens* em *C. arabica* e *C. canephora* (Leroy et al., 1997; Hatanaka et al., 1999).

O objetivo deste trabalho foi estabelecer um protocolo de transformação genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens* para as espécies *Coffea canephora* e *C. arabica*, usando o gene *bar*, que confere tolerância ao herbicida glufosinato de amônio, como agente seletivo.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Material vegetal

Folhas de café, *C. canephora* P. e *C. arabica* cv. Iapar 59, foram coletadas de plantas cultivadas a campo e em casa de vegetação, respectivamente. Folhas jovens e completamente expandidas foram utilizadas como fonte de explantes. As folhas foram lavadas em água corrente, tratadas com etanol 70% por alguns segundos e, em seguida, imersas em solução de hipoclorito de sódio 1% por 30 minutos e enxaguadas quatro vezes com água destilada esterilizada. Explantes com 1 cm<sup>2</sup> foram cortados em solução de cisteína 250 mg.L<sup>-1</sup> e transferidos para meio de cultura com a face adaxial em contato com o meio.

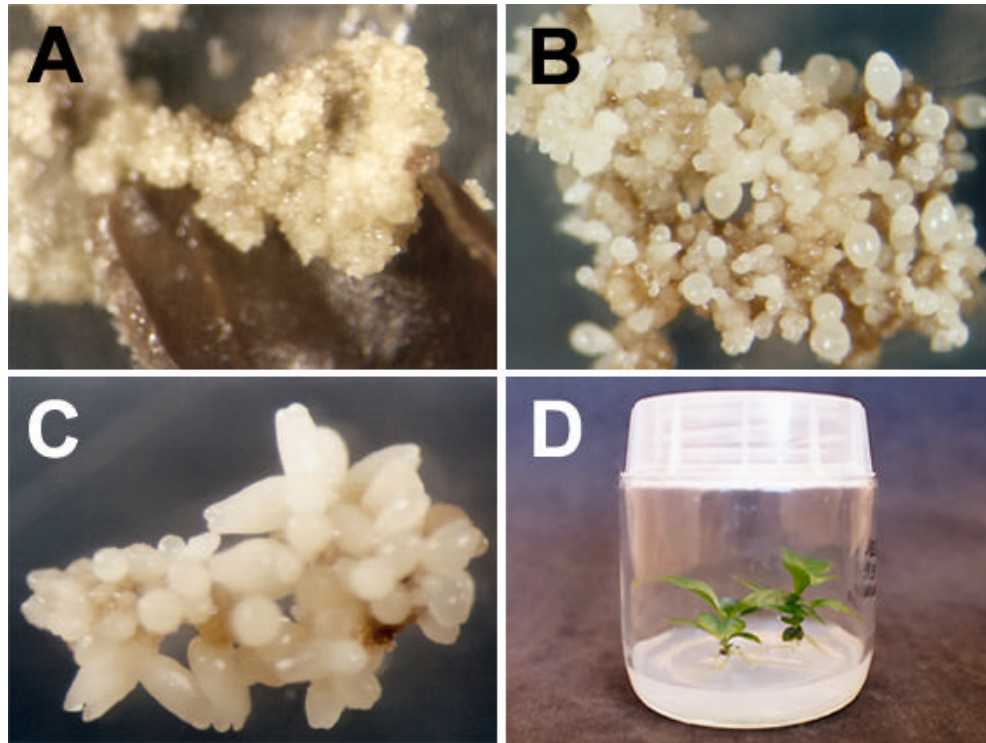
### Protocolos de regeneração

***C. canephora*:** Explantes de *C. canephora* foram cultivados em meio de indução de embriogênese direta (ED) descrito por Hatanaka et al. (1991) suplementado com 5 µM de 2-iP, 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose e 8 g.L<sup>-1</sup> de ágar. Culturas foram mantidas no escuro a 27±2 °C.

***C. arabica*:** A indução de tecido embriogênico em explantes de *C. arabica* (Figura 1A) foi obtida em WPM (Wood Plant Medium) descrito por Loyd & McCown (1980) suplementado com 1,7 µM de BA, 0,7 µM de GA<sub>3</sub>, 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose e 8 g.L<sup>-1</sup> de ágar. Os tecidos embriogênicos foram isolados e transferidos para meio ED para indução e desenvolvimento de embriões (Figura 1B e 1C). Os embriões formados foram transferidos para meio de cultura contendo a metade da concentração dos sais e vitaminas de MS (Murashige e Skoog, 1962) para regeneração de plantas (Fig. 1D).

### Linhagem de bactéria e vetores

A linhagem desarmada EHA105 de *Agrobacterium tumefaciens* contendo o plasmídeo binário pCambia3301 ou pIBI3 foi utilizada nos ensaios de transformação. O plasmídeo pCambia3301 contém em seu T-DNA o gene da β-glucuronidase (*gus*) sob controle do promotor constitutivo CaMV35S e o gene da fosfotricina acetiltransferase (*bar*) que confere tolerância ao herbicida glufosinato de amônio, sob controle do promotor CaMV35S (Figura 2A). O plasmídeo pIBI3 contém em seu T-DNA o gene *bar* e o gene da ACC oxidase de melão, na orientação anti-senso (Figura 2B).

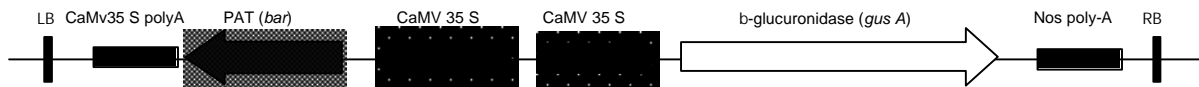
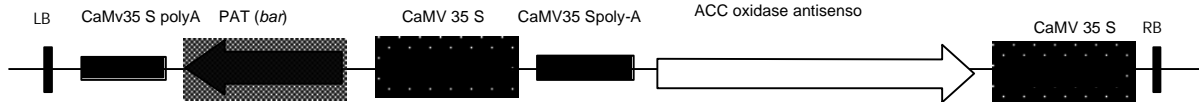


**Figura 1** - Protocolo de regeneração de *C. arabica* cv. Iapar-59. (A) Tecido embriogênico induzido em meio de cultura WPM. (B) Indução de embriogênese em meio ED. (C) Embriões regenerados transferidos para meio de germinação. (D) Plantas regeneradas.

### Transformação e regeneração

***C. canephora*:** Explantes foliares foram pré-cultivados no escuro a  $27 \pm 2$  °C em meio ED por três semanas antes da infecção. Após o pré-cultivo, os explantes foram imersos em suspensão bacteriana ( $A_{600}$  0,1-0,2) em meio líquido YMB contendo 0,2 mM de acetosiringona. Os explantes foram submetidos a sonicação por 2 segundos, para facilitar a penetração da bactéria, permanecendo por 30 minutos na suspensão após este tratamento. Os explantes foram drenados e co-cultivados em meio ED contendo  $5 \mu\text{M}$  de 2iP a  $24^\circ\text{C}$  no escuro por quatro dias. Após esse período, foram transferidos para meio ED fresco contendo  $10 \mu\text{M}$  de glufosinato de amônio e  $400 \text{ mg.L}^{-1}$  de cefotaxima, para indução e regeneração seletiva de transformantes.

***C. arabica*:** Tecidos embriogênicos (Figura 2A) foram pré-cultivados por uma semana em meio de multiplicação de tecido embriogênico (MTE) constituído pelos sais do meio MS (Murashige & Skoog, 1962), suplementado com constituintes orgânicos do meio B<sub>5</sub> (Gamborg et al., 1968),  $30 \text{ g.L}^{-1}$  de sacarose,  $2 \text{ mg.L}^{-1}$  de 2,4 D e  $8 \text{ g.L}^{-1}$  de ágar. As condições de transformação e regeneração foram as mesmas descritas anteriormente.

**A. pCambia3301****B. pIBI3**

**Figura 2** - Construções usadas para os experimentos de transformação (A) T-DNA do plasmídeo pCambia3301; (B) T-DNA do plasmídeo pIBI3.

**Análise histoquímica do gene *gus*:** Tecidos embriogênicos ou calos originados no meio seletivo foram isolados e transferidos para meio seletivo fresco. Uma parte do material foi analisada por ensaios histoquímicos de GUS. A solução contendo o substrato X-Gluc consiste de 2 mM de X-Gluc, 100 mM de tampão fosfato (pH 8,0), 10 mM de EDTA, 1 mM de  $K_4Fe(CN)_6$  e 20% de metanol. Os tecidos foram corados por 24 h a 37°C, fixados em uma solução contendo 10% de ácido acético, 50% de etanol e 7,4% formaldeído e observados sob microscópio estereoscópio.

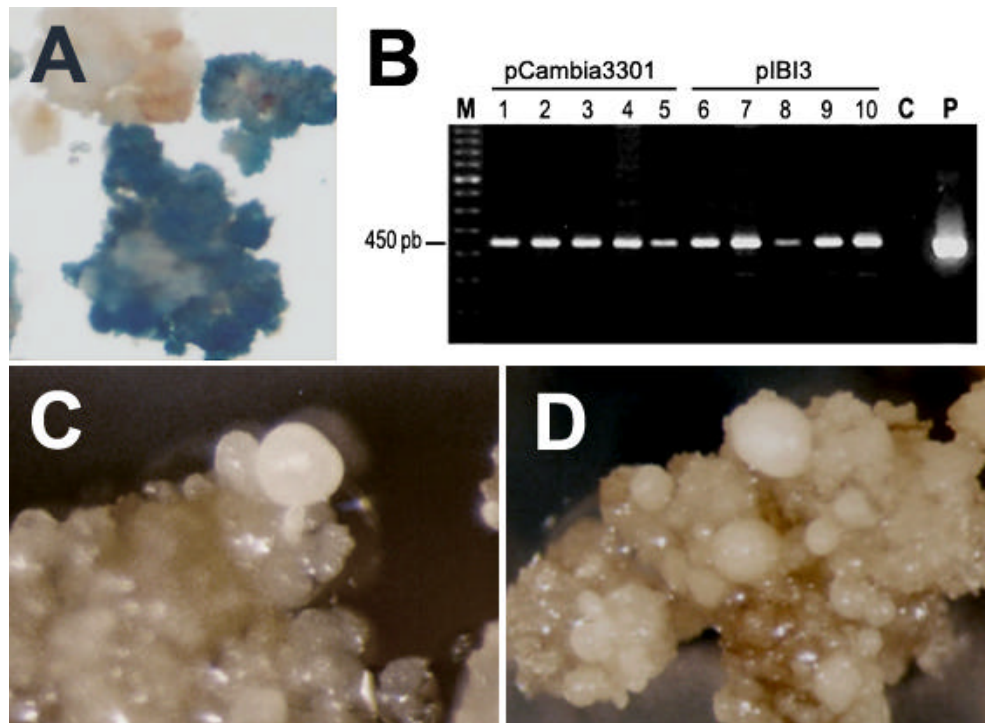
**Análise molecular:** A análise molecular foi conduzida para a detecção do gene *bar* através de PCR. DNA de tecidos putativamente transformados e de tecido embriogênico controle (não-transformado) foi obtido usando o tampão de extração (100 mM de Tris HCl, 50 mM de EDTA, 500 mM de NaCl, 140 mM de  $\beta$ -mercaptoetanol e 40  $\mu$ l de SDS 20%). Os *primers* utilizados para amplificação do gene *bar* foram: 5'-GTCTGCACCATGGTCAACC-3' e 5'-GAAGTCCAGCTGCCAGAAAC-3'. O mix de reação para PCR foi incubado em termociclador sob as seguintes condições: 94°C por 4 min, seguidos por 30 ciclos de 94°C 1 min, 56°C 1 min, 72°C 1 min, com 5 min de extensão final a 72°C. O produto de PCR foi analisado por eletroforese em gel de agarose (1,2%), corado com brometo de etídio.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

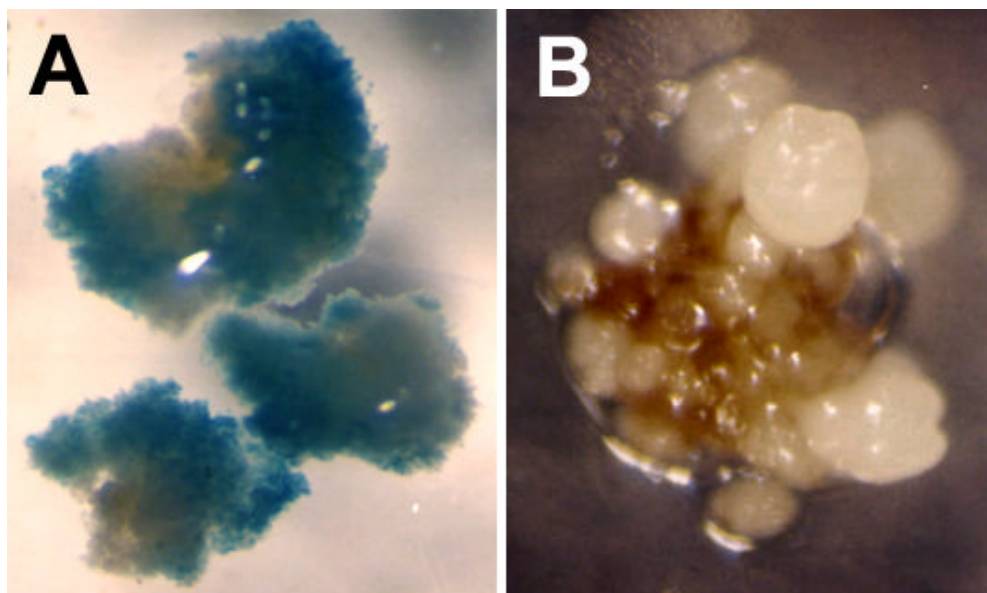
**Transformação de *Coffea spp*:** Em *C. canephora*, tecidos embriogênicos foram observados quatro meses após a infecção. No experimento com o plasmídeo pCambia3301, 118 explantes foram utilizados para transformação, dando origem a 45 calos embriogênicos resistentes ao glufosinato. Estes calos foram testados histoquimicamente para a atividade do gene *gus*, e 82,2% deles apresentaram reação *gus*-positiva (Figura 3A), enquanto calos controle (não-transformados) não mostraram nenhuma reação. Amostras de calos *gus*-positivo foram submetidas à análise molecular por PCR utilizando *primers* específicos para o

gene *bar*, e fragmentos amplificados coincidindo com o gene *bar* (450 pb) foram detectados (Figura 3B). Utilizando o plasmídeo pIBI3, 87 explantes foram co-cultivados e 18 calos embriogênicos resistentes ao glufosinato foram analisados por PCR, sendo a presença do gene *bar* detectada em todos os calos putativamente transformados (Figura 3B). Indução embriogênica pode ser observada em calos transformados utilizando ambos plasmídeos pCambia3301 ou pIBI3 (Figura 3C e D, respectivamente).

Devido às maiores dificuldades para regeneração de plantas em *C. arabica*, inicialmente foi estabelecido um novo protocolo de regeneração de embriões somáticos, com o qual foi possível obter grande número de embriões que se desenvolveram em plantas normais (Figura 1). Os resultados preliminares têm demonstrado a possibilidade de utilização desse sistema para transformação. Quatro meses após o co-cultivo de tecidos embriogênicos (Figura 1A) com *Agrobacterium* contendo o plasmídeo pCambia3301, massas esbranquiçadas de calos crescendo em meio ED seletivo foram testadas histoquimicamente para a atividade do gene *gus*, demonstrando reação *gus*-positiva (Figura 4A). Embora os resultados relativos à eficiência de transformação sejam ainda inconclusivos, a detecção positiva da expressão de *gus* e a regeneração dos embriões transformantes putativos (Figura 4B) sugerem a aplicabilidade em potencial do sistema de regeneração, transformação e seleção já estabelecidos.



**Figura 3** - Transformação de *C. canephora*. (A) Ensaio histoquímico de GUS em tecido transformado com pCambia3301. (B) Análise PCR para detectar a presença do gene *bar* em tecidos transformados com pCambia3301 e pIBI3: linha M corresponde ao marcador de peso molecular; linha C, à planta controle não-transformada; e P, ao plasmídeo pCambia3301. (C e D) Embriões de *C. canephora*/pCambia3301 e *C. canephora*/pIBI3 em estágio globular de desenvolvimento, respectivamente.



**Figura 4** - Transformação de *C. arabica* com pCambia3301. (A) Ensaio histoquímico de GUS. (B) Embriões transformantes putativos em estádios cordiforme e globular de desenvolvimento.

As plantas regeneradas de todos os eventos de transformação descritos neste trabalho serão, futuramente, investigadas através de análise molecular, bem como de estudos fisiológicos das possíveis características adquiridas. Atualmente, experimentos de transformação mediada por *Agrobacterium* estão sendo conduzidos utilizando o plasmídeo pIBI23 (Galvão et al., 2001). Este plasmídeo contém em seu T-DNA os genes *bar* como marcador seletivo e o gene que codifica a enzima ACC oxidase de *C. arabica* na orientação anti-senso.

## CONCLUSÃO

O glufosinato de amônio como agente seletivo demonstrou ser eficiente na seleção de transformantes tanto em *C. canephora* como em *C. arabica*.

A transformação mediada por *Agrobacterium* investigada neste trabalho produziu embriões transformantes putativos de *C. canephora* utilizando duas diferentes construções gênicas.

O protocolo de regeneração descrito para *C. arabica* demonstrou, em resultados preliminares, ser compatível com condições de transformação e seleção estabelecidas para *C. canephora*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARTON, C. R; ADAMS, T. L; ZAROWITZ, M. A. Stable transformation of foreign DNA into *C. arabica* plants. 14th **Colloq. Sci. Int. Café**, ASIC, Paris, p. 460-464, 1991.
- BRASILEIRO, A.C.M. & DUSI, D.M.A. Transformação genética de plantas. In: **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Ed. Torres, A.C., Caldas, L.S. & Buso, J.A. EMBRAPA CNPH, 1999, vol 2. p. 679-735.
- CARNEIRO, M. F. Advances in coffee biotechnology. **AgBiotechNet**. vol I. p.1-7, 1999.
- GALVÃO, R. M; KOBAYASHI, A. K; RIBAS, A. F; BESPALHOK FILHO, J. C; PEREIRA, L. F. P; VIEIRA, L. G. E. Cloning and gene expression analysis of the acc oxidase cDNA from *Coffea arabica* by RT-PCR. **IV Encontro Latino-Americano de Biotecnologia Vegetal**. Goiânia, GO, 4-8 jun, p.169, 2001. (Resumo).
- GAMBORG, O.L.; MILLER, R.A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean cells. **Journal of Experimental Research**, 50:151-158, 1968.
- HATANAKA, J.; ARAKAWA, O.; YASUDA, T.; USHIDA, N.; YAMAGUCHI, I. Effect of plant growth regulators on somatic embryogenesis in leaf cultures of *Coffea canephora*. **Plant Cell reports**. 10:179-182, 1991.
- HATANAKA, T.; CHOI, Y. E.; KUSANO, T.; SANO, H. Transgenic plants of *Coffea canephora* from embryogenic callus via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. **Plant Cell Reports**. 19:106-110, 1999.
- LEROY, T.; PAILLARD, M.; ROYER, M.; SPIRAL, J.; BERTHOULY, M.; TESSEREAU, S.; LEGAVRE, T.; ALTOSAR, I. Introduction de gènes d'intérêt agronomique dans l'espèce *Coffea canephora* Pierre par transformation avec *Agrobacterium* sp. In: **17ème Colloque Scientifique sur le Café**, Nairobi, 439-446, 1997.
- LOYD, G. & McCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **Comb. Proc. Intl. Plant Prop. Soc.** 30:421-427, 1981.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue culture. **Plant Physiology**. 15: 473-497, 1962.
- SPIRAL, J. & PETIARD, V. Développement d'une méthode de transformation appliquée a différentes espèces de caféier et régénération de plantules transgéniques. In: **ASIC, 15ème Colloque Scientifique sur le Café**, Montpellier, p. 115-122, 1993.
- SPIRAL, J.; THIERRY, C.; PAILLARD, M.; PETIARD, V. Obtention de plantules de *Coffea canephora* Pierre (Robusta) transformées par *Agrobacterium rhizogenes*. **C. R. Acad. Sci. Paris**, 316, série III, p. 1-6, 1993.



SPIRAL, J.; LEROY, T.; PAILLARD, M.; PETIARD, V. Transgenic coffee (*Coffea* sp.). In: **Biotechnology in Agriculture and Forestry. Transgenic Trees**, v. 44, p. 55-76, 1999.

SUGIYAMA, M.; MATSUOKA, C.; TAKAGI, T. Transformation of *Coffea* with *Agrobacterium rhizogenes*. In: **ASIC, 16ème Colloque Scientifique sur le Café**. Kyoto, p. 853-859, 1995.