

**TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE *COFFEA ARABICA* L. VIA *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS* DAS CULTIVARES CATIGUÁ MG2 E CATUAÍ AMARELO**

KALYNKA GABRIELLA DO LIVRAMENTO<sup>1</sup>, FERNANDA CARVALHO L. DE MEDEIROS<sup>2</sup>;  
LUCIANO VILELA PAIVA<sup>3</sup>, LILIAN MAYUMI KURIBAYASHI<sup>4</sup>, FABRÍCIO LELIS DA SILVA<sup>5</sup>

## RESUMO

O café é o mais tradicional produto de exportação brasileiro, mas, apesar disso, a cafeicultura sofre enormes prejuízos causados por pragas e doenças. Como alternativa adicional ao melhoramento clássico, a transformação genética dessa espécie perene pode levar a obtenção de plantas resistentes em curto espaço de tempo. Este trabalho foi realizado com o objetivo de testar o protocolo descrito por Leroy et al. (2006) em duas cultivares de *Coffea arabica* L. Calos embriogênicos das cultivares Catiguá MG2 e Catuaí Amarelo foram imersos por duas horas em suspensão de *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 contendo o plasmídeo pCambia3301, que contém genes de  $\beta$ -glucuronidase (*gus*) e fosfinotricina acetiltransferase (*bar*), que confere resistência ao glufosinato de amônio (PPT). E posteriormente, co-cultivados em meio sólido por seis dias a 31°C. Após esse período, uma parcela dos calos embriogênicos foi submetida à análise histoquímica do gene *gus* e a atividade do gene foi detectada em 80% dos tecidos. Os calos foram regenerados em meio descrito por Teixeira et al. (2004), com PPT em crescentes concentrações ao longo de 25 dias. Os resultados obtidos demonstram aplicabilidade do sistema de regeneração e transformação para essas duas cultivares, embora ainda exista a necessidade de definir a concentração ideal de PPT para auxiliar no processo de seleção dos transformados.

**Palavras-chaves:** *Coffea arabica*; transformação genética; *Agrobacterium tumefaciens*

Agradecimento: FAPEMIG, CAPES E CNPq

## INTRODUÇÃO

O melhoramento vegetal, através da transformação genética, oferece interessantes perspectivas em direção a produção de variedades de café tolerantes a estresses biótico e abióticos, mais produtivos e de melhor qualidade, em curto espaço de tempo. Para o estabelecimento da transformação genética de *Coffea arabica* L. é necessário a obtenção de explantes competentes e de um protocolo de cultura *in vitro* que permita a alta frequência de regeneração. Além de um sistema de transferência genética simples, barato, reprodutível, independente de genótipo e que insira a seqüência gênica de forma estável (Birch, 1997).

Os primeiros relatos da transformação genética de café se referem ao co-cultivo de protoplastos com diferentes cepas de *Agrobacterium tumefaciens*. Barton et al. (1991) reportaram a eletroporação como método de transferência de gene para protoplastos e embriões. Ocampo & Manzanera (1991) demonstraram que os tecidos de *Coffea arabica* L. também podem ser infectados por *Agrobacterium tumefaciens*. Ao longo dos anos, os trabalhos de transformação genética do café

---

<sup>1</sup> Pesquisadora Msc, LCBM/ UFLA, kalynkagabriella@yahoo.com.br

<sup>2</sup> Doutora em Fitopatologia, fcalopes@hotmail.com

<sup>3</sup> Professor, DQI/UFLA, luciano@dqf.ufla.br

<sup>4</sup> Engenheira de alimentos, lilinhamk@gmail.com

<sup>5</sup> Pesquisador, LCBM/UFLA, fabriciolelis@dgp.ufla.br

têm continuado com diferentes abordagens, no entanto, os resultados mostram que o processo é cultivar-dependente.

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi testar o protocolo de transformação genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, descrito por Leroy et al (2006), para duas cultivares de *C. arabica*, usando o gene *bar*, que confere tolerância ao herbicida glufosinato de amônio, como agente seletivo.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Material vegetal**

Folhas de *C. arabica* cultivares Catiguá MG2 e Catuaí Amarelo foram coletadas de plantas cultivadas em casa de vegetação e lavadas em água corrente. Em seguida, foram imersas em solução de hipoclorito de cálcio 6% por 20 minutos e enxaguadas três vezes com água destilada esterilizada. Explantes (0,5 cm<sup>2</sup>) foram cortados em ambiente asséptico, em seguida, foram colocados com a face adaxial em contato com o meio de cultura em placas de Petri de 100 × 20 mm contendo 25 mL do meio PM (Teixeira et al., 2004), a 25° C no escuro. Após quatro semanas, os explantes foram transferidos para o meio SM (Teixeira et al., 2004) no qual permaneceram até a formação dos primeiros calos embriogênicos. Estudos preliminares no Laboratório Central de Biologia Molecular (LCBM)/UFLA demonstraram que os cultivares Catuaí Amarelo e Catiguá MG2 levam cerca de 4 meses para produzir os primeiros calos embriogênicos nos referidos meios.

### **Linhagem de bactéria e vetores**

A linhagem desarmada EHA105 de *Agrobacterium tumefaciens* contendo o plasmídeo binário pCambia3301 foi utilizada nos ensaios de transformação. O plasmídeo pCambia3301 contém o gene da  $\beta$ -glucuronidase (*gus*) e o gene da fosfotricina acetiltransferase (*bar*), que confere tolerância ao herbicida glufosinato de amônio (PPT), ambos sob controle do promotor CaMV35S.

### **Transformação e regeneração**

Calos embriogênicos das cultivares Catiguá MG2 e Catuaí Amarelo foram transformados seguindo o protocolo descrito por Leroy et al., (2006), com algumas modificações. Nesse ensaio, o tempo de co-cultivo líquido foi de 2 horas, a 31°C, em solução NaCl 0,9% e o co-cultivo sólido foi de 6 dias em meio Yasuda, no escuro e a 25°C. Após esse período, os calos embriogênicos foram transferidos para meio de regeneração proposto por Teixeira et al., (2004). Foi utilizado meio com timentin nos primeiros 25 dias após o co-cultivo para controle da *A. tumefaciens*. Calos embriogênicos de ambas cultivares, não transformados, foram mantidos nas mesmas condições constituindo o controle negativo.

### **Análise histoquímica do gene *gus***

Ensaio histoquímico de GUS foram realizados 48 horas após a transformação seguindo o protocolo descrito por van Boxtel et al., (1995). Para tal, o material foi incubado em tampão X-gluc (2mm X-gluc, 100mM de tampão fosfato de sódio pH 8,0, 10mM EDTA, 1mM de ferricianeto de potássio, 1mM de ferrocianeto de potássio e 20% v/v de metanol) por 24 horas a 37° C no escuro, e a expressão transitória do gene *uidA* foi determinado pela contagem do número de manchas azul com um estereoscópio binocular.

### **Seleção dos calos embriogênicos transformados**

Os calos embriogênicos foram transferidos para meio de regeneração contendo concentrações crescente de PPT a cada cinco dias, sendo as concentrações utilizadas de 1 $\mu$ MPPT, 2,5 $\mu$ MPPT, 5,0 $\mu$ MPPT, 7,5 $\mu$ MPPT e 10 $\mu$ MPPT.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os calos embriogênicos foram observados durante dois meses após a infecção. Após 48 horas do período de co-cultivo, os calos foram testados histoquimicamente para a atividade do gene *gus* e cerca de 80%, co-cultivados a apresentaram reação *gus*-positiva (Figura 1), enquanto calos controle negativo (não-transformados) não mostraram nenhuma reação.

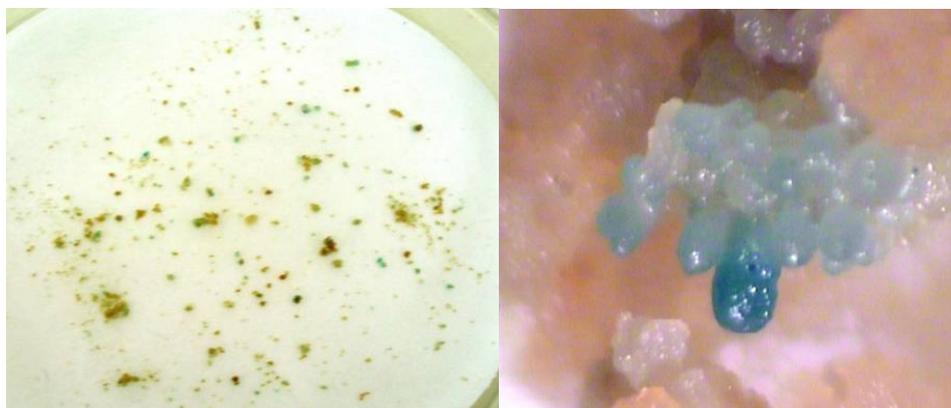


Figura 1. Imagens de calos embriogênicos revelando teste positivo para a presença do gene repórter GUS.

Amostras de calos *gus*-positivo foram submetidas à seleção com concentrações crescente de PPT, a cada cinco dias, até a concentração final de 10 $\mu$ MPPT em meio de regeneração. Dessa forma, foi possível observar, a formação de embriões normais, com cotilédones e radícula, provenientes dos calos embriogênicos da cultivar Catuaí (figura 2A), sendo o mesmo processo não observado para cultivar Catiguá (Figura 2B).

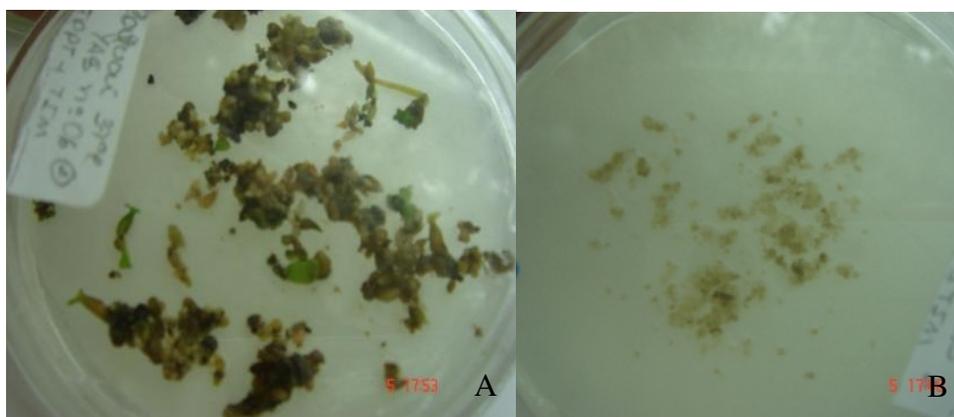


Figura 2. Embriões normais proveniente de calos embriogênicos submetidos a seleção em meio de regeneração com PPT (A); Calos embriogênicos não regenerados em embriões da cultivar Catiguá (B).

Esses resultados confirmam que os processos de transformação para *Coffea arabica* L. são cultivar dependente, corroborando com outros trabalhos já realizados (Etienne & Bertrand, 2003).

Ao final do período de seleção, as plântulas de Catuaí e calos embriogênicos de Catiguá não sobreviveram (Figura 3A e 3B, respectivamente), o que pode ser explicado pela alta concentração de PPT (10 $\mu$ M) utilizado no final da seleção ou pelo tempo prolongado (5 dias) de contato dos explantes com o herbicida. Diante desses resultados, será necessário a realização de estudos preliminares para determinar a concentração ideal de PPT, que seleciona os explantes transformados dos não-transformados, e o tempo ideal de contato dos mesmo com o meio seletivo.

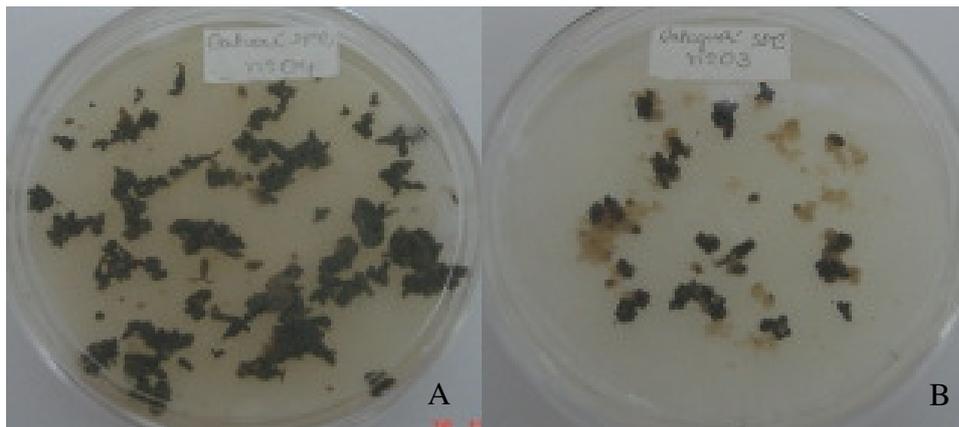


Figura 3. Plântulas de Catuaí (A) e calos embriogênicos de Catiguá (B) não resistentes à seleção em meio de regeneração com 10µM PPT.

## CONCLUSÃO

Os resultados preliminares mostraram potencial de utilização do protocolo descrito por Leroy et al (2006) para transformação das cultivares estudadas. Embora os resultados relativos à eficiência de transformação não sejam conclusivos, a detecção positiva da expressão de *gus* e a regeneração dos embriões transformantes sugerem a aplicabilidade do sistema de regeneração e transformação já estabelecidos. Contudo, existe a necessidade de se estabelecer um sistema eficiente de seleção, ou seja, que permita estabelecer a concentração ideal de PPT e o tempo necessário de contato dos explantes, calos embriogênicos e embriões, com o meio seletivo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BIRCH, R.G. Plant transformation: Problems and strategies for practical application. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology** n.48 p. 297-326.1997.

BARTON, C. R; ADAMS, T. L; ZAROWITZ, M. A. Stable transformation of foreign DNA into *C. arabica* plants. In: ASIC (ed) Proceeding of **14th Colloquium of International Coffee Science Association**, 1991,Paris. Anais... Paris: ASIC,1991. p. 460-464.

ETIENNE, H.; BETRAND, B. Somaclonal variation in *Coffea arabica*: effects of genotype and embryogenic cell suspension age on frequency and phenotype of variants. **Tree physiology**, 23 (6): 419-426. 2003.

LEROY, T. et al. **Agrobacterium protocols – Methods in Molecular Biology**. v. 02. Montpellier, 2006. DOI: 10.1385/1-59745-131-2:191

OCAMPO, C.A., MANZANERA, L.M. Advances in genetic manipulation of the coffee plant. In: **Proceedings of 14<sup>th</sup> ASIC Colloquim**. San Francisco, USA, p.378-382. 1991

TEIXEIRA, J. B. ; JUNQUEIRA, C. S. ; PEREIRA, A. J. da COSTA ; MELLO, R. I. S.; SILVA, A. P. D. ; MUNDIM, D. A. **Multiplicação clonal de café (*Coffea arabica* L.) via embriogênese somática**. EMBRAPA, Documentos 121 .Brasília: EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2004. 39p.