

## **TRANSFORMAÇÃO DE *Coffea canephora* P. COM GENE PARA RESISTÊNCIA À HERBICIDA ATRAVÉS DE BOMBARDEAMENTO DE PARTÍCULAS**

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, 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 desenvolver um protocolo de transformação de *Coffea canephora* P. através de bombardeamento de partículas, usando o herbicida glufosinato de amônio como agente seletivo. Explantes foliares de *C. canephora* foram usados para indução de embriogênese somática. Inicialmente, explantes foram cultivados em meio ED suplementado com 5 µM de 2iP por 40 dias. Explantes com embriões somáticos foram então transferidos para meio contendo a metade da concentração dos macro e micronutrientes dos sais de MS suplementado com 9 µM de 2,4 D. Após duas semanas, explantes com embriões somáticos e tecido embriogênico foram bombardeados com partículas de tungstênio (M-25) cobertas com o plasmídeo pCambia 3301 (contendo os genes *bar* e *gus*), usando um sistema de aceleração de partículas com alta pressão de hélio (PDS 1000/He - BioRad). As condições usadas para o bombardeamento foram: 1.300 psi de pressão; 60 ou 90 mm de distância percorrida pelas partículas; e pré e pós-cultivo dos explantes em meio com alta osmolaridade. Os explantes bombardeados foram submetidos a seleção em meio ED contendo 5 µM de glufosinato de amônio. Após seis meses, embriões transgênicos putativos foram transferidos para meio ED sem reguladores de crescimento para germinação. A análise histoquímica do gene *gus* nessas plântulas foi positiva, enquanto nenhuma atividade foi observada em plantas controle. A integração do gene *bar* foi confirmada pela análise de PCR.

**Palavras-chave:** bombardeamento de partículas, transformação genética, café, glufosinato de amônio.

**TRANSFORMATION OF *Coffea canephora* P. WITH RESISTENCE GENES TO HERBICIDES USING PARTICLES BOMBARDMENT**

**ABSTRACT:** Our objective was to develop a transformation protocol for *Coffea canephora* P. by particle bombardment using the herbicide ammonium glufosinate as selective agent. Leaf explants were cultured on ED medium supplemented with 5 M 2iP for 40 days. Explants with somatic embryos were transferred to half strength MS medium with 9 M 2,4 D. After 2 weeks, the explants with somatic embryos and embryogenic tissue were bombarded with tungsten particles (M-25) carrying the plasmid pCambia 3301 (containing the genes *bar* and *gus*) using a high pressure helium microprojectile device (PDS 1000/He - BioRad). The conditions used for bombardment were: 1300 psi pressure; 60 or 90 mm distance between sample and DNA particle holder; and pre and post-culture of explants on high osmolarity medium. The bombarded explants were submitted to selection on ED medium containing 5 M ammonium glufosinate. After 6 months, putative transgenic embryos were transferred to a growth regulator-free ED medium for germination. Histochemical assay of GUS in these plantlets was positive while no activity was observed in non-transgenic control. The integration of the *bar* gene was confirmed by PCR analysis.

**Key words:** particle bombardment, genetic transformation, coffee, ammonium glufosinate.

## INTRODUÇÃO

O melhoramento genético do cafeeiro por métodos convencionais é um processo longo. O desenvolvimento de novas variedades leva em torno de 30 anos (Carneiro, 1999). O uso da engenharia genética para introdução de novas características em genótipos-elite de café pode reduzir o tempo necessário para obtenção de novos cultivares (Spiral et al., 1999). A transformação genética de café mediada por *Agrobacterium rhizogenes* já foi obtida em *C. canephora* (Spiral et al., 1993; Spiral & Pétiard, 1993) e *C. arabica* (Sugiyama et al., 1995; Spiral & Pétiard, 1993), e por *A. tumefaciens* em *C. canephora* (Leroy et al., 1997; Hatanaka et al., 1999; Spiral et al., 1999) e *C. arabica* (Spiral et al., 1999).

O bombardeamento de partículas oferece algumas vantagens em relação à transformação via *Agrobacterium*, como o uso de construções mais simples de vetores e protocolos de transformação menos exigentes, já que as complexas inter-relações bactéria/planta são eliminadas (Gray & Finer, 1993). Em café, somente a expressão transiente do gene *gus* foi relatada usando o bombardeamento de partículas (Van Boxtel et al., 1995).

Experimentos preliminares de transformação genética em *C. canephora* P. demonstraram dificuldade na seleção de transformantes usando antibióticos (Spiral et al., 1999). Genes que conferem

resistência a herbicidas são alternativas para a seleção de plantas transformadas. Além do uso como marcador, a possibilidade do uso desses genes para alterar a amplitude de herbicidas que podem ser usados em determinada cultura foi uma das primeiras estratégias formuladas para a engenharia genética de plantas (Pfister et al., 1981). O herbicida glufosinato de amônio mostrou as melhores perspectivas para a seleção de tecidos transformados de café dos cinco agentes seletivos estudados por Van Boxtel et al. (1995).

O objetivo deste trabalho foi desenvolver um protocolo de transformação de *Coffea canephora* através do bombardeamento de partículas usando o gene *bar* que confere tolerância ao herbicida glufosinato de amônio.

## MATERIAL E MÉTODOS

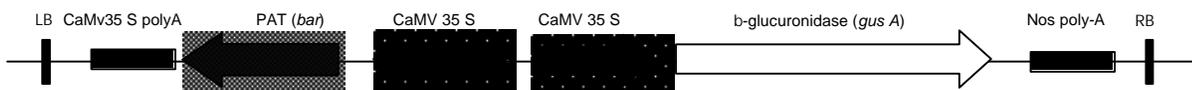
Explantos foliares de *C. canephora* P. foram usados para induzir embriogênese somática. Folhas de café recém-formadas e completamente expandidas foram coletadas de plantas cultivadas a campo. Estas folhas foram lavadas em água corrente e etanol 70% e, em seguida, imersas em solução de hipoclorito de sódio 1% por 30 minutos e enxaguadas quatro vezes com água destilada esterilizada. Explantes com aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> foram cortados em solução de cisteína 250 mg.L<sup>-1</sup>, excluindo a nervura central, as margens e as porções apicais e basais das folhas, e colocados com a face adaxial em contato com o meio para embriogênese direta (ED) descrito por Hatanaka et al. (1991), suplementado com 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, 100 mg.L<sup>-1</sup> de cisteína, 8 g.L<sup>-1</sup> de ágar e 5 µM de 2iP. O pH foi ajustado para 5,7 com KOH antes da autoclavagem a 120°C por 12 minutos. Após 40 dias, explantes com embriões somáticos foram, então, transferidos para meio de multiplicação de tecido embriogênico denominado MTE, o qual consiste dos sais e constituintes orgânicos do meio MS (Murashige & Skoog, 1962) diluídos pela metade, suplementados com 9 µM de 2,4 D. Em ambos os meios os explantes foram cultivados no escuro a 27 ± 2 °C. Após duas semanas de cultivo no meio TEM, as bordas dos explantes contendo embriões somáticos e tecido embriogênico foram excisadas e usadas no bombardeamento.

O plasmídeo pCambia 3301 foi usado para o bombardeamento (Figura 1). Este plasmídeo contém os genes da β-glucuronidase (*gus*) e fosfinotricina acetiltransferase (*bar*). A suspensão para bombardeamento foi preparada usando 25 µl de partículas (tungstênio M-25) em suspensão (60 mg.mL<sup>-1</sup>), 2,5 µl de CaCl<sub>2</sub> (2,5 M) e 10 µl de espermidina (0,1M). Seis µl da suspensão foram utilizados para o bombardeamento usando o sistema de aceleração de partículas com alta pressão de hélio (PDS 1000/He - BioRad). As condições usadas no bombardeamento foram: 1.300 psi de pressão e 60 ou 90 mm de distância percorrida

pelas partículas. Os explantes foram mantidos em meio ED com 0,4 M manitol 4 horas antes e 24 horas após o bombardeamento.

A análise da expressão transiente foi feita 24 horas após o bombardeamento por meio da incubação dos explantes em solução de X-Gluc, pH 8,0, por 24 h a 37°C. As culturas foram incubadas no escuro à 27 ± 2°C, em meio ED contendo 5 µM de glufosinato de amônio. Quatro meses após o bombardeamento, tecidos embriogênicos foram observados em alguns explantes. Amostras desses tecidos foram submetidas a análise histoquímica. Embriões somáticos regenerados a partir desse tecido embriogênico foram transferidos para meio sem regulador de crescimento para germinação. Segmentos foliares originados a partir desses embriões e de plântulas controle (não-transformadas) foram submetidos à análise da expressão estável do gene *gus*.

A análise molecular para detecção do gene *bar* foi realizada através de PCR. DNA foi extraído de segmentos foliares de plântulas *gus*-positivas e controle usando o tampão de extração (100 mM Tris HCl, 50 mM de EDTA, 500 mM de NaCl, 140 mM de β-mercaptoetanol e 40 µl 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 da PCR foi analisado por eletroforese em gel de agarose (1,2%), corado com brometo de etídio.



**Figura 1** - Construção usada para os experimentos de transformação.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos nossos experimentos a expressão transiente do gene *gus* foi observada em todos os explantes analisados, e na distância de 60 mm houve maior número de pontos azuis. Entretanto, o número de pontos azuis observado foi baixo (média de 35 por explante).

A atividade endógena de β-glucuronidase não foi observada em plantas controle (não-transformadas), apesar de alguns trabalhos sugerirem que essa atividade poderia existir em germoplasma de café (Spiral et al., 1999; Hatanaka et al., 1999; Van Boxtel et al., 1995).

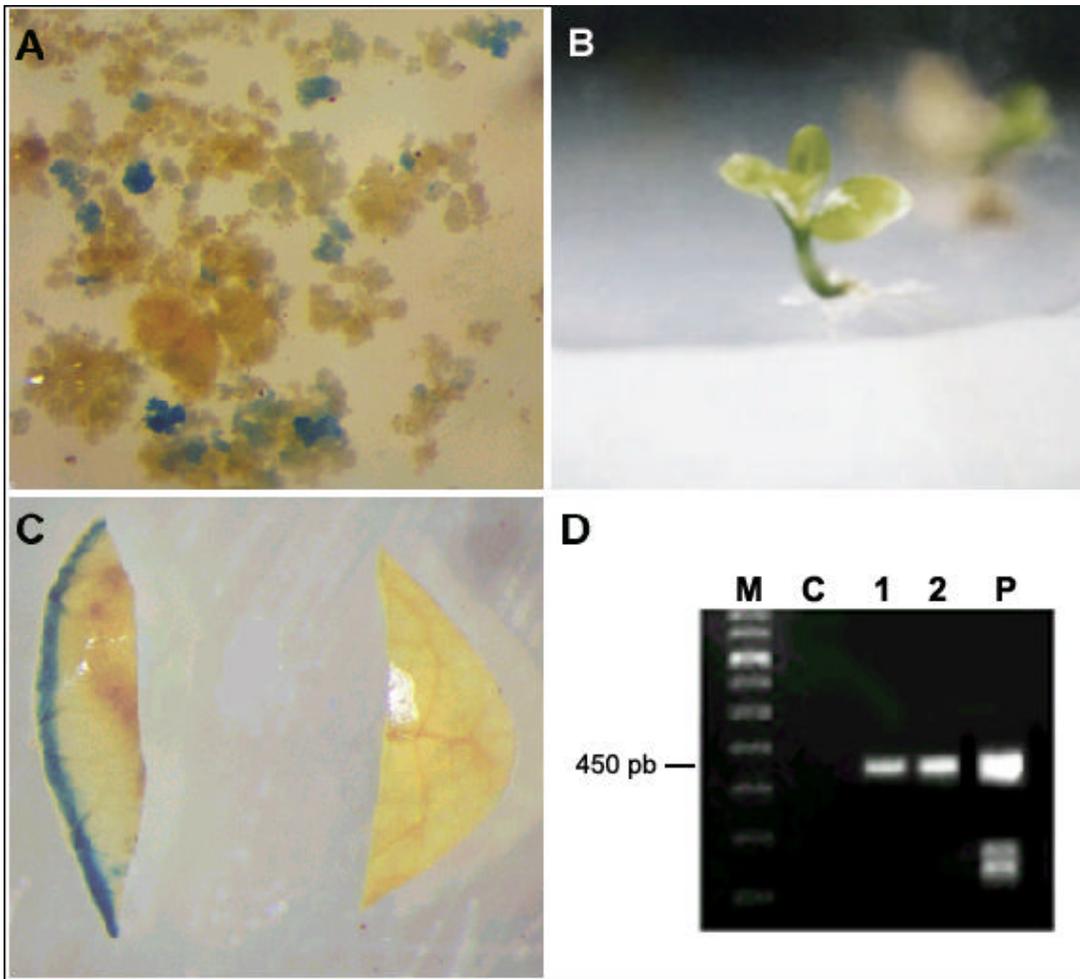
Para seleção, os explantes bombardeados foram cultivados em meio ED contendo 5  $\mu\text{M}$  de glufosinato de amônio. Após quatro meses em meio seletivo, o desenvolvimento de calos foi identificado visualmente na superfície de 12,5% dos explantes bombardeados. Esses calos foram isolados, cultivados e testados histoquimicamente para o gene *gus*, demonstrando reação *gus*-positiva em todos os agregados testados (Figura 2 A). Dois meses após a identificação dos calos transformados, embriões putativamente transformados foram transferidos para meio sem reguladores de crescimento para germinação (Figura 2 B). Segmentos foliares dessas plântulas foram positivos para reação histoquímica de  $\beta$ -glucuronidase, com uma coloração azul intensa, demonstrando expressão estável do gene *gus*, enquanto segmentos foliares de plântulas controle (não-transformadas) não apresentaram nenhuma atividade (Figura 3 C).

A análise de PCR mostrou fragmentos amplificados (450 bp) do plasmídeo pCambia 3301 usado como controle. Em plântulas não-transformadas o gene *bar* não foi detectado (Figura 3 D).

O glufosinato de amônio é um herbicida que inibe a atividade da enzima glutamina sintetase. Ele tem sido utilizado com frequência como agente seletivo na transformação de plantas, principalmente em gramíneas. Ao nosso conhecimento, este é o primeiro relato da transformação estável de café utilizando esse agente seletivo e através do bombardeamento de partículas. Experimentos estão sendo realizados em nosso laboratório para a transformação de *C. arabica* através de bombardeamento de partículas.

## CONCLUSÃO

A expressão estável do gene *gus* em tecidos embriogênicos, segmentos foliares de plântulas transformadas e a posterior confirmação da integração do gene *bar* no genoma através de PCR demonstraram que o bombardeamento de partículas é uma técnica viável para transformação genética de *C. canephora*.



**Figura 2** - Transformação genética de *C. canephora* via bombardeamento de partículas. (A) Tecido embriogênico mostrando reação *gus*-positiva; (B) Plântulas em desenvolvimento em meio sem reguladores de crescimento; (C) Análise histoquímica: à esquerda, planta transformada apresentando reação *gus*-positiva, e à direita planta controle; (D) Análise molecular através de PCR, detecção do gene *bar* (450 bp), M – marcador ladder 100, C – controle-planta não-transformada, 1 e 2 plantas transformadas, P – plasmídeo pCambia 3301.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CARNEIRO, M. F. Advances in coffee biotechnology. **AgBiotechNet**. vol I. p.1-7, 1999.
- GRAY, D. J. & FINER, J. J. Development and operation of five particle guns for introduction of DNA into plant cells. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.** 33:219, 1993.
- 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 Rep.** 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 Rep.** 19:106-110, 1999.
- LEROY, T.; PAILLARD, M.; ROYER, M.; SPIRAL, J.; BERTHOULY, M.; TESSERAU, 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.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue culture. **Plant Physiol.** 15: 473-497, 1962.
- PFISTER, K.; STEINBACK, K. E.; GARDNER, E.; ARNTZEN, C. J. Photoaffinity-labeling of an herbicide receptor protein in chloroplast membranes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 78:981-985, 1981.
- SPIRAL, J. & PETIARD, V. Développement d'une méthode de transformation appliquée à différentes espèces de caféier et régénération de plantules transgéniques. In: **ASIC, 15ème Colloque Scientifique sur le Café**, Montpellier, p. 115-122, 1993.
- SPIRAL, J.; LEROY, T.; PAILLARD, M.; PETIARD, V. Transgenic coffee (*Coffea* sp.) **Biotechnology in Agriculture and Forestry. Transgenic trees**, v. 44, p. 55-76, 1999.
- 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.
- 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.
- VAN BOXTEL, J.; ESKES, A.; BERTHOULY, M. Glufosinate as an efficient inhibitor of callus proliferation in coffee tissue. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, 33(1): p. 6-12, 1995.