

EXPRESSÃO DO GENE *GUS* EM EMBRIÕES ZIGÓTICOS E CALOS EMBRIOGÊNICOS DE *Coffea arabica* E *C. canephora*

BARROS, E.V.S.A.¹; CUNHA, W.G.¹; TEIXEIRA, J.B.¹ e BRASILEIRO, A.C.M.

¹Embrapa - Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN) –Parque Estação Biológica – W5 Norte (final) – CEP 70.770-900 - Fone: (61) 448-4602 – FAX: (61) 340-3658¹ <anacmb@cenargen.embrapa.br>

Este trabalho foi financiado por Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento de Café. O material genético de *C. arabica* cv. IAPAR59, *C. arabica* cv. Mundo Novo IAC 388/17, *C. arabica* cv. Catuaí vermelho e *C. canephora* foi gentilmente cedido por M.C.Dias (IAPAR-PR), A. A. Pereira (EPAMIG) e L.C. Ramos (IAC).

RESUMO: A metodologia de biolística foi utilizada para a transformação genética de *Coffea* spp. Foram bombardeados embriões zigóticos de *C. arabica* e calos embriogênicos de *C. arabica* e de *C. canephora*. Embriões da cultivar IAPAR 59 foram testados nos dias 2, 5, 7, 9 e 12 do período de cultivo anterior ao bombardeamento. A expressão transiente foi observada em 30 embriões de cada idade após 48 horas do bombardeamento, através de teste histoquímico com X-glu. Outros 30 embriões foram mantidos em meio seletivo com imazapyr 300 nM por 15 d. O maior número de pontos azuis nas análises transiente e estável da expressão do gene *gus* foi observado na idade de 12 d. Com base neste resultado, foram testados 700 embriões da cultivar Mundo Novo nas mesmas condições, sendo a expressão estável analisada em brotos emergentes após 60 d. Verificou-se que partes de alguns brotos apresentaram coloração azul, indicando a formação de mosaicos. O material de calos embriogênicos proveniente de folhas de cafeeiro foi bombardeado em meio C contendo 0; 0,25; e 0,5 M de manitol. Observou-se o maior número de pontos azuis na análise transiente de amostras dos calos submetidos a pré-tratamento osmótico, sugerindo que esta etapa possa otimizar a transformação deste material.

Palavras-chave: *Coffea arabica*, *Coffea canephora*, transformação, imazapyr, calos embriogênicos, bombardeamento.

EXPRESSION OF THE *GUS* GENES IN ZYGOTIC EMBRYOS AND IN EMBRYOGENIC CALLUS

ABSTRACT: In order to establish an efficient transformation protocol for *Coffea* spp., it was investigated the *gus* expression in zygotic embryos of *C. arabica* and embryogenic calli of *C. arabica* and *C. canephora*. Embryos from cultivar IAPAR 59 were bombarded after 2, 5, 7, 9 or 12 d of cultivation. The transient expression was analyzed in 30 embryos of each age after 48 hours from bombardment. Another 30 embryos were maintained under selection of 300 nM imazapyr for 15 d. The results showed that the best expression was achieved with 12 day-old embryos. We have tested the cultivar Mundo novo with the same parameters, except that the transgenic shoots were selected for 60 d. The stable expression of gene *gus* revealed blue parts of the shoots, characterizing mosaics formation. Embryogenic calli from coffee leaves were bombarded on C medium containing mannitol 0, 0.25 or 0.5 M. We observed the number of blue spots was higher in the samples from calli on osmotic medium. This results suggest the osmotic treatment should enhance the transformation rate of the tested material.

Key words: *Coffea arabica*, *Coffea canephora*, transformation, imazapyr, embryogenic calli, bombardment.

INTRODUÇÃO

A intensa busca de novas cultivares de cafeeiro (*Coffea* spp). resistentes a pragas e doenças representa grande interesse agrônomo. Outras características que geram aumento de produtividade e qualidade dos frutos também são altamente importantes para o comércio de café. Nesse sentido, o Brasil possui grande demanda para o melhoramento de cafeeiro para resistência à broca-do-café. A transformação genética tem sido utilizada para a introdução de genes de interesse no genoma de plantas (Fazuoli et al., 2000). O gene do inibidor de α -amilase isolado de feijoeiro (Valencia et al., 2000) pode ser introduzido em plantas de cafeeiro visando o controle do inseto causador da broca (*Hypothenemus hampei*). Algumas técnicas de transformação genética têm sido testadas com diferentes tipos de explantes de cafeeiro. Em 1991, van Boxtel et al. iniciaram estudos de transformação de protoplastos, mas persiste até o momento a dificuldade de um processo eficiente de obtenção de plantas de *C. arabica* transgênicas (Leroy et al., 2000). O sistema de biolística tem sido empregado com sucesso na transformação de várias plantas (Luthra et al., 1997). Em 1995, van Boxtel et al. demonstraram que o gene *gus* apresenta expressão transiente sob controle de diferentes promotores através do bombardeamento de diversos tecidos de café. Neste trabalho são apresentados os resultados da análise de expressão do gene *gus* após bombardeamento de embriões zigóticos e de calos embriogênicos de *Coffea* spp.

MATERIAL E MÉTODOS

Bombardeamento de embriões zigóticos

Aproximadamente 500 sementes de *C. arabica* cv. IAPAR59 foram embebidas em água durante uma hora e depois lavadas em hipoclorito de sódio 2% (v/v) por 30 min. Os embriões zigóticos foram extraídos das sementes após embebição por 2 d e cultivados em meio SP (Barrueto Cid et al., 1999) contendo BAP 10 mg/L por 15 d. Durante este período, os cotilédones foram excisados após 2 d de cultura e então os embriões retornaram para a mesma placa de cultivo. Após 2, 5, 7, 9 ou 12 d de cultivo foram bombardeados 60 explantes em cada estágio de crescimento. Os embriões zigóticos foram posicionados no meio SP modificado para bombardeamento, contendo 8 mg/L de fitagel, seguindo os parâmetros de bombardeamento descritos por Rech e Aragão (1998). Metade dos explantes foi utilizada para análise da expressão transiente do gene *gus* (Jefferson et al., 1987), enquanto o restante foi incubado por 15 d na presença de 300 nM do agente seletivo imazapyr, para posterior análise da expressão estável. Este experimento foi executado em duplicata.

Embriões zigóticos de *C. arabica* cv. Mundo Novo IAC 388/17 foram cultivados pelo mesmo processo e bombardeados após 12 d de cultivo. A expressão estável do gene *gus* foi identificada após dois meses de cultivo em meio SP contendo imazapyr 300 nM. Aproximadamente 700 embriões foram bombardeados em seis repetições.

Bombardeamento de calos embriogênicos

Fragmentos de folhas de *C. arabica* cv. Catuaí Vermelho e *C. canephora* foram cultivados em meio C modificado com 2,4-D variando de 5 a 20 μ M (van Boxtel e Berthouly, 1996) por oito meses. Os calos embriogênicos derivados desses tratamentos foram espalhados sobre papel-filtro e pré-incubados por 24 h em meio osmótico contendo manitol a 0, 0,25 ou 0,5 M. Após 24 h, amostras dos calos bombardeados foram coletadas de cada placa, para análise da expressão de GUS.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados de expressão transiente e estável do gene *gus* em embriões zigóticos de IAPAR 59 revelaram que o cultivo por 12 d na presença de BAP foi o melhor tratamento para o bombardeamento

(Figura 1). Neste estágio observou-se o maior número de pontos tanto na expressão transiente como na estável, que se localizaram nas gemas já existentes neste estágio. Os embriões bombardeados foram mantidos em seleção até o surgimento de brotos. No entanto, os brotos obtidos apresentaram apenas regiões transformadas, caracterizando a formação de mosaicos (Figura 2). Com base neste resultado, esta estratégia de bombardeamento foi testada com a cultivar Mundo Novo (Figura 3). No entanto, os brotos resultantes da seleção também apresentaram mosaicos.

A facilidade de regeneração de brotos a partir de gemas apicais de embriões zigóticos de *C. arabica* incentivou a investigação da obtenção de brotos transgênicos através do bombardeamento desta região. Apesar da redução do tempo de cultura “in vitro” por esse processo, comparando-o à embriogênese a partir de folhas, o material derivado de sementes apresenta limitações devidas ao curto período de viabilidade das sementes, bem como à heterogeneidade dos embriões. Estas características dificultam os experimentos, por causarem grande amplitude de resposta aos tratamentos.

Os calos embriogênicos, tanto de *C. arabica* como de *C. canephora*, apresentaram expressão transiente do gene *gus*. Observou-se maior número de pontos azuis, em relação à quantidade de calos de cada amostra, nos pré-tratamentos com manitol 0,5 M (Figura 4). No entanto, esses dados não foram analisados quantitativamente, devido à diversidade de tamanho dos microcalos, bem como à impossibilidade de uniformização das amostras. A partir desses resultados iniciais, novos experimentos estão sendo formulados para investigar a regeneração de embriões transformados a partir de seleção de calos embriogênicos bombardeados.

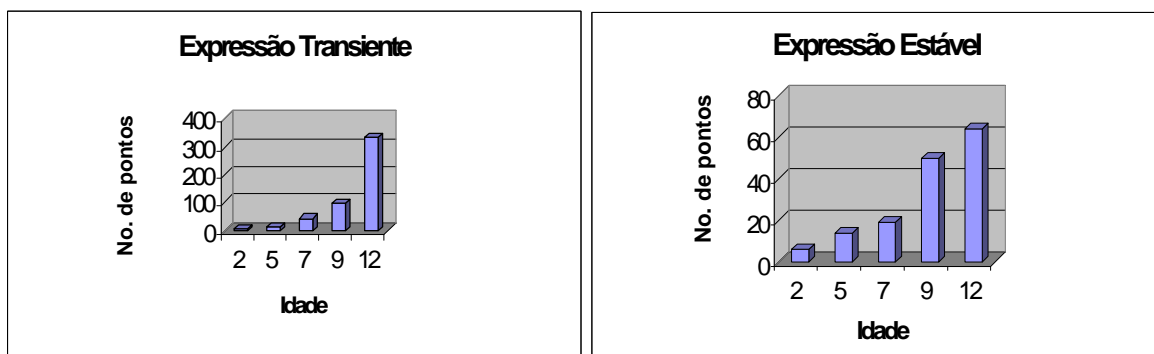


Figura 1 - Expressão transiente (a) e estável (b) do gene *gus* em embriões zigóticos bombardeados nos diferentes estágios testados. Cada coluna representa o número total de focos azuis em 60 explantes de cada estágio.



Figura 2 - Expressão do gene *gus* em uma região da folha de broto de *C.arabica* cv. IAPAR 59 após cinco meses de cultivo em meio seletivo.

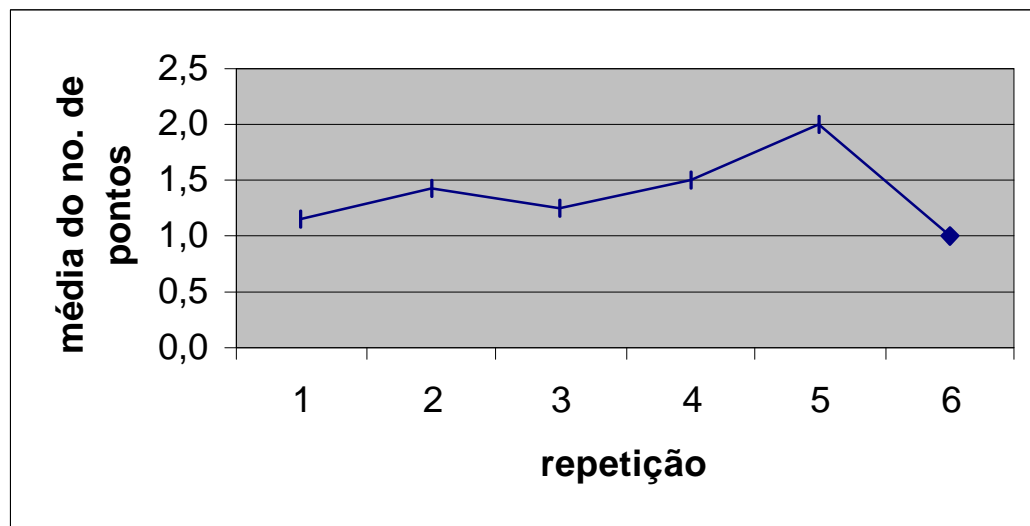


Figura 3 - Expressão estável do gene *gus* em embriões de *C. arabica* cv. Mundo Novo, bombardeados após 12 d de cultivo.

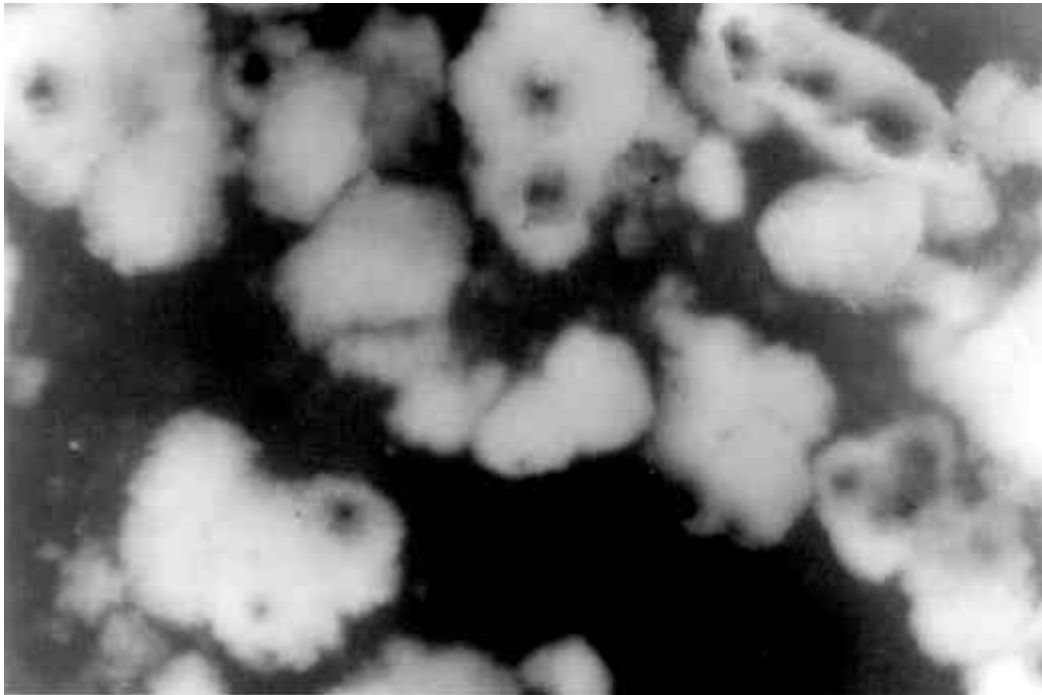


Figura 4 - Expressão transiente do gene *gus* em calos de *C. canephora* bombardeados em meio C osmótico contendo 0,5 M de manitol. As pontas de seta mostram os pontos azuis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Barrueto Cid, L. P., Machado, A. C. M. G., Carvalheira, S. B. R. C. & Brasileiro, A. C. M. (1999). Plant regeneration from seedling explants of *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*. *Plant Cell Tis. Org. Cult.* **56**, 17-23.
- Fazuoli LC, Maluf MP, Guerreiro Filho O, Medina Filho H, Silvarolla MB: Breeding and Biotechnology of Coffee. In: al. TSe (ed) Coffee Biotechnology and Quality, pp. 27-45. Kluwer Academic Publishers, Netherlands (2000).
- 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).
- Luthra, R., Varsha, Dubey, R. K., Srivastava, A. K. & Kumar, S. (1997). Microprojectile mediated plant transformation: a bibliographic search. *Euphytica* **95**, 269-294.
- Rech EL, Aragão FJL: Biobalística. In: Brasileiro ACM, Carneiro VTC (eds) Manual de Transformação Genética de Plantas, pp. 51-64. Embrapa/SPI, Brasília (1998).
- Valencia A, Bustillo AE, Ossa GE, Chispeels MJ: Amylases of the coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*) and their inhibition by two plant amylase inhibitors. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*: 207-213 (2000).
- van Boxtel, J., Dufour, M. & Eskes, A. (1991). Callus formation of isolated coffee protoplasts (*Coffea arabica* and *C. canephora*). *Physiol. Plant.* **82**(1), A14.
- van Boxtel, J., Berthouly, M., Carasco, C., Dufour, M. & Eskes, A. (1995). Transient expression of β -glucuronidase following biolistic delivery of foreign DNA into coffee tissues. *Plant Cell Rep.* **14**, 748-752.
- van Boxtel, J. & Berthouly, M. (1996). High frequency somatic embryogenesis from coffee leaves. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **44**, 7-17.