



TATIANE CASARIN

**EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA E VALIDAÇÃO DO SISTEMA
CRISPR/CAS9 EM *Coffea canephora***

**LAVRAS-MG
2020**

TATIANE CASARIN

EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA E VALIDAÇÃO DO SISTEMA CRISPR/CAS9 EM
Coffea canephora

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, para obtenção do título de Doutora.

Dr. Leandro Eugenio Cardamone Diniz
Orientador

Prof. Dr. Luciano Vilela Paiva
Coorientador

LAVRAS-MG
2020

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Casarin, Tatiane.

Embriogênese somática e validação do sistema CRISPR/CAS9
em *Coffea canephora* / Tatiane Casarin. - 2020.

100 p. : il.

Orientador(a): Leandro Eugenio Cardamone Diniz.

Coorientador(a): Luciano Vilela Paiva.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2020.

Bibliografia.

1. Edição genômica. 2. PDS. 3. N-metiltransferase. I. Diniz,
Leandro Eugenio Cardamone. II. Paiva, Luciano Vilela. III. Título.

TATIANE CASARIN

**EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA E VALIDAÇÃO DO SISTEMA
CRISPR/CAS9 EM *Coffea canephora***

**SOMATIC EMBRYOGENESIS AND VALIDATION OF THE CRISPR/CAS9
SYSTEM IN *Coffea canephora***

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, para obtenção do título de Doutora.

APROVADA em 11 de maio de 2020.

Dr. Luciano Vilela Paiva, UFLA

Dr. Mário Lúcio Vilela de Resende, UFLA

Dr. Hugo Bruno Correa Molinari, EMBRAPA

Dra. Natália Chagas Freitas, EMBRAPA

Dr. Leandro Eugenio Cardamone Diniz
Orientador

Prof. Dr. Luciano Vilela Paiva
Coorientador

LAVRAS-MG

2020

Aos meus pais, com carinho e gratidão.
Dedico.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal pela oportunidade de realização do curso e deste trabalho;

À Capes pela concessão da bolsa de estudos e às demais agências de fomento pelo financiamento concedido à realização deste projeto;

Ao Dr. Leandro Eugenio Cardamone Diniz, pela orientação, apoio e paciência na condução deste trabalho;

Ao professor Luciano Vilela Paiva, pela coorientação e oportunidade de participar deste projeto;

Aos colegas do LCBM pela amizade e auxílio sempre que necessário, existe uma colaboração todos para o desenvolvimento deste trabalho, especialmente a Natália e Leonardo;

À Rossilvania que sempre se preocupou conosco e esteve sempre disposta a ajudar e ouvir;

A meus pais, Nelso e Marta, que me apoiaram e incentivaram ao longo de todos esses anos de jornada, e não pouparam esforços para que eu pudesse chegar até aqui;

Aos demais familiares que mesmo distantes sempre torceram por mim;

Aos amigos, de perto e de longe, pelo apoio e torcida;

Ao Paulo por todo apoio, paciência e incentivo ao longo dessa jornada;

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a construção deste trabalho;

Muito obrigada!

RESUMO

Coffea canephora é a segunda espécie mais cultivada do gênero *Coffea*, representando cerca de 25% da produção brasileira e sendo especialmente utilizada na indústria do café solúvel e em *blends* com *Coffea arabica*. A espécie apresenta alta variabilidade genética, tendo os programas de melhoramento buscado a identificação, seleção e propagação de genótipos com características superiores. Entretanto o melhoramento convencional demanda muito tempo e a aplicação de ferramentas biotecnológicas pode ajudar a acelerar este processo. Dessa forma, os objetivos deste trabalho foram testar diferentes protocolos de indução de embriogênese somática (ES) direta para *C. canephora* visando a sua aplicação em trabalhos futuros de transformação genética, a validação da aplicação de uma estratégia multiplex do sistema CRISPR/Cas9 através do silenciamento do gene CcPDS, e a obtenção de plantas com redução do teor de cafeína através do silenciamento, via CRISPR/Cas9, dos genes das enzimas de biossíntese da cafeína: xantosina metiltransferase (XMT), 7-metilxantina metiltransferase (MXMT) e 3,7-dimetilxantina metiltransferase (DXMT). Para a avaliação da indução de ES direta foram utilizados explantes provenientes de folhas de plântulas *in vitro* e de folhas de plantas de casa de vegetação de *C. canephora* clone 22, submetidos a três diferentes tratamentos de indução. O mais eficiente para indução de ES direta foi o Meio 3, com 96,25% de eficiência de indução e média de 34 embriões por explante de folhas *in vitro* e 67% de eficiência de indução e média de 67 embriões por explante de casa de vegetação. Em ambos experimentos de edição genômica, foram utilizados calos embriogênicos de *C. canephora* clone 14 e diferentes construções gênicas multiplex, nas quais os sgRNAs estavam sob a regulação de promotores U6 de *C. canephora* ou *Arabidopsis thaliana*. Plântulas e embriões apresentando os fenótipos albino, variegado e verde foram obtidas na transformação com as construções contendo sgRNAs para o gene CcPDS, sendo que 71,4% das plantas avaliadas apresentaram algum tipo de mutação, a maioria em homozigose. Seis plantas possivelmente transformadas para o silenciamento dos genes de síntese de cafeína foram analisadas e cinco estavam efetivamente transformadas. Destas, apenas uma apresentou mutações nas regiões reconhecidas pelos sgRNAs, sendo uma mutação em heterozigose no segundo alvo do gene XMT, uma mutação também em heterozigose nos dois alvos do gene DXMT e nenhuma mutação observada no gene MXMT. Com os resultados obtidos, é possível concluir que a ES direta é uma estratégia muito mais rápida de regeneração de embriões de cafeeiro e o genótipo parece ter forte influência no sucesso de estratégias de silenciamento gênico em *C. canephora*, assim como os genes a serem silenciados, que podem afetar o desenvolvimento das plantas editadas.

Palavras-chave: Edição genômica. PDS. N-metiltransferase. Clone 14. Clone 22.

ABSTRACT

Coffea canephora is the second most cultivated species of the genus *Coffea*, representing about 25% of the Brazilian production. It is used especially in the soluble coffee industry and in blends with *C. arabica*. Due to its high genetic variability, breeding programs have sought to identify, select, and propagate superior genotypes. However, conventional breeding takes a lot of time and the use of biotechnological tools can help to speed up this process. Thus, this study aimed to test different protocols for direct somatic embryogenesis induction of *C. canephora* aiming its application in future genetic transformation studies, the validation of the application of a multiplex strategy of the CRISPR-Cas9 system by silencing the CcPDS gene and obtaining plants with reduced caffeine content through silencing via CRISPR-Cas9 of the genes XMT, MXMT, and DXMT of the caffeine biosynthesis enzymes. To test the induction of direct embryogenesis, explants from *in vitro* leaves and leaves from the greenhouse of *C. canephora* clone 22 were used, submitted to three different induction treatments. Medium 3 was the most efficient, with 96.25% induction efficiency and an average of 33.99 embryos per greenhouse explant and 67% induction efficiency and an average of 66.93 embryos per *in vitro* leaf explant. For genome editing experiments, embryogenic calluses from *C. canephora* clone 14 were used and different multiplex gene cassettes, in which sgRNAs were under the regulation of U6 promoters from *C. canephora* and *Arabidopsis thaliana*. Plants and embryos showing the albino, variegated and green phenotypes were obtained by the transformation with the cassettes containing sgRNAs for the CcPDS gene, mutations were observed in 71.4% of the analyzed plants, most of them were homozygous. Six plants possibly mutated for caffeine synthesis were analyzed and five were effectively transformed. Of these, only one showed a mutation in the regions recognized by the sgRNAs, heterozygous mutations in the second target of the XMT gene, and a mutation also is heterozygous in the two targets of the DXMT gene. No mutations were observed in the MXMT gene. With these results, it is possible to conclude that direct embryogenesis is a much faster strategy for regenerating coffee embryos and the genotype seems to have a strong influence on the success of gene silencing strategies in *C. canephora*, as well as the genes to be silenced, which can affect the development of edited plants.

Keywords: Genomic edition, PDS, N-methyltransferase, clone 14, clone 22.

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO GERAL	8
1	INTRODUÇÃO.....	9
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	11
2.1	A cultura do cafeeiro.....	11
2.2	Cultura de tecidos vegetais.....	14
2.3	Embriogênese somática.....	15
2.4	Transformação genética de plantas.....	17
2.5	Sistema CRISPR/Cas9.....	19
2.6	Transformação genética de cafeeiro.....	24
2.7	Silenciamento do gene PDS e seus efeitos.....	26
2.8	Biossíntese de cafeína e o café descafeinado.....	28
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	32
	CAPÍTULO 2: INDUÇÃO DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA	
	DIRETA EM <i>Coffea canephora</i> CLONE 22.....	45
1	INTRODUÇÃO.....	47
2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	49
2.1	Material Vegetal.....	49
2.2	Indução de embriogênese somática direta.....	49
2.3	Germinação e manutenção dos embriões somáticos.....	50
2.4	Delineamento experimental e análise estatística.....	50
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
4	CONCLUSÕES.....	55
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56
	CAPÍTULO 3: SILENCIAMENTO DO GENE CCPDS EM <i>Coffea</i>	
	<i>canephora</i> UTILIZANDO O SISTEMA CRISPR/CAS9.....	59
1	INTRODUÇÃO.....	61
2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	62
2.1	Material Vegetal.....	62
2.2	Construções utilizadas.....	62
2.3	Transformação e seleção dos calos embriogênicos.....	63
2.4	Regeneração e desenvolvimento de embriões somáticos.....	64

2.5	Extração de DNA-genômico.....	64
2.6	Verificação da inserção do T-DNA.....	65
2.7	Detecção e sequenciamento de mutações.....	65
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	67
3.1	Regeneração de embriões somáticos.....	67
3.2	Confirmação da inserção do T-DNA.....	69
3.3	Detecção e sequenciamento de mutações.....	70
4	CONCLUSÕES.....	74
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75
	CAPÍTULO 4: SILENCIAMENTO DE GENES DA ROTA DE	
	BIOSSÍNTESE DE CAFEÍNA EM Coffea canephora UTILIZANDO	
	O SISTEMA CRISPR/CAS9.....	78
1	INTRODUÇÃO.....	80
2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	82
2.1	Material Vegetal.....	82
2.2	Construções utilizadas.....	83
2.3	Transformação e seleção dos calos embriogênicos.....	84
2.4	Regeneração e desenvolvimento de embriões somáticos.....	85
2.5	Extração de DNA-genômico.....	85
2.6	Verificação da inserção do T-DNA.....	87
2.7	Detecção e sequenciamento de mutações.....	88
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	88
3.1	Regeneração de embriões somáticos a partir de calos transformados.....	88
3.2	Confirmação da transformação.....	89
3.3	Verificação de mutações.....	90
4	CONCLUSÕES.....	94
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	95

CAPÍTULO 1
INTRODUÇÃO GERAL

1. INTRODUÇÃO

O café é uma importante *commodity* agrícola para muitos países na Ásia, África e América Latina, sendo fonte de subsistência para mais de 125 milhões de pessoas. Apesar do gênero *Coffea* ser formado por mais de 125 espécies, duas delas são amplamente cultivadas comercialmente, *Coffea arabica* e *C. canephora* (MISHRA, 2019). No Brasil, as duas espécies representam aproximadamente 75% e 25% da produção, respectivamente (CONAB, 2020).

C. canephora é especialmente utilizada na indústria do café solúvel e em *blends* com *C. arabica*. Por ser uma espécie mais rústica, geralmente apresentando maior resistência a pragas e doenças, *C. canephora* também é utilizada em programas de melhoramento que utilizam as duas espécies como fonte de variabilidade (FERRÃO *et al.*, 2019). Esta variabilidade torna importante a identificação, seleção e propagação de genótipos superiores.

Entretanto, o melhoramento convencional destas espécies leva muito tempo, o que dificulta o acompanhamento das demandas do mercado e das mudanças climáticas, as quais impõe desafios quanto ao cultivo sustentável do cafeeiro em escala global. Os avanços obtidos na aplicação de ferramentas biotecnológicas à cultura, como cultivo *in vitro*, marcadores moleculares, transgenia e edição genômica, podem acelerar os programas de melhoramento (GAMBOA-BECERRA *et al.*, 2019; MISHRA, 2019).

Dentre as estratégias de propagação *in vitro*, a embriogênese somática (ES) é a mais explorada. É importante destacar que este é um processo altamente dependente do genótipo utilizado, o que evidencia a necessidade de investigação de protocolos específicos para cada genótipo de interesse (WINKELMANN, 2016). Para a propagação em larga escala a ES indireta, especialmente quando associada a regeneração em biorreatores, é uma excelente alternativa (DUCOS; LAMBOT; PÉTIARD, 2007; ETIENNE *et al.*, 2018), mas neste caso são necessários de 15 a 18 meses para a obtenção de embriões (BREITLER *et al.*, 2018; DUCOS *et al.*, 2003), o que pode tornar o processo oneroso. Em contrapartida, através de protocolos de ES direta é possível obter embriões somáticos com 3 a 6 meses (PRIYONO *et al.*, 2010; QUIROZ-FIGUEROA *et al.*, 2006), o que torna esta via muito interessante para a obtenção de plantas transformadas de forma mais rápida.

A transformação genética do cafeeiro tornou-se possível graças a estes avanços obtidos no cultivo *in vitro*, e tem como objetivo a introdução de características agrônômicas de interesse e a melhoria na qualidade de bebida (KUMAR *et al.*, 2006; MISHRA; SLATER, 2012). As principais técnicas disponíveis já foram exploradas, como eletroporação de protoplastos (BARTON; ADAMS; ZARWITZ, 1991), infecção via *A. tumefaciens* (OCAMPO;

MANZANERA, 1992; RIBAS *et al.*, 2011), infecção via *A. rhizogenes* (SPIRAL *et al.*, 1993), infiltração à vácuo (CANCHE-MOO *et al.*, 2006) e biobalística (RIBAS *et al.*, 2005), assim como a edição gênica através do sistema CRISPR/Cas9, a aplicação desta ferramenta poderá tornar possível a redução do tempo necessário para a obtenção de uma nova variedade de 25 a 30 anos para seis anos (BREITLER *et al.*, 2018).

O sistema CRISPR/Cas9 é uma ferramenta de edição gênica recentemente desenvolvida, de ocorrência natural, originária de bactérias, e se tornou uma das mais poderosas ferramentas para o silenciamento de genes, através da indução de mutações pontuais, bem como para a inserção de genes em sítios específicos e/ou para controlar a expressão gênica. A edição genômica via CRISPR-Cas9 pode ser utilizada em plantas para estudos funcionais, para o melhoramento de características relacionadas a produtividade e qualidade, já sendo aplicada na maioria das plantas cultivadas, como por exemplo arroz, milho, algodão, trigo, entre outras (DEMIRCI; ZHANG; UNVER, 2018).

Dessa forma, os objetivos deste trabalho foram testar diferentes protocolos de indução de ES direta em *C. canephora* visando sua aplicação em trabalhos futuros de transformação genética (Capítulo 2), a validação da aplicação de uma estratégia multiplex do sistema CRISPR/Cas9 através do silenciamento do gene CcPDS (Capítulo 3), e concomitantemente, a obtenção de plantas com redução do teor de cafeína através do silenciamento dos genes XMT, MXMT e DXMT envolvidos na biossíntese da cafeína (Capítulo 4).

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A cultura do cafeeiro

O primeiro registro conhecido referente ao café menciona seu efeito estimulante e data do ano de 575, em manuscritos do Iêmen. Estes manuscritos relatam que a África foi a região de origem, mas foram os árabes os primeiros a dominar a técnica de plantio e preparação do produto, quando o café encontrado na Etiópia foi levado para a península arábica. No século XIV iniciou-se a produção comercial no Iêmen, que manteve o monopólio de sua comercialização por muitos anos (MARTINS, 2012).

O gênero *Coffea* é originário da África, onde uma maior concentração de espécies foi encontrada ao longo do Rio Congo, da Ilha de Madagascar e também nas Ilhas Mascarenhas e é formado por 124 espécies com ocorrência principalmente em regiões tropicais e subtropicais do mundo (CARVALHO, 1946; DAVIS *et al.*, 2011, 2006). Trata-se de plantas dicotiledôneas, da família Rubiaceae, que apresentam folhas persistentes, flores hermafroditas, caule lenhoso e cujo porte vai do arbustivo ao arbóreo (LIVRAMENTO, 2010). Dentre as espécies conhecidas, duas delas são mais amplamente cultivadas comercialmente, atingindo quase 100% da produção mundial: *Coffea arabica* e *Coffea canephora* (DAVIS *et al.*, 2011). As duas espécies são muito distintas quanto aos aspectos agrônômicos, bioquímicos e sensoriais dos grãos, do mercado e da utilização dos respectivos produtos (FERRÃO *et al.*, 2016).

C. arabica é uma espécie tetraploide, autógama (taxa de autofecundação de 90 a 100%) e, portanto, apresenta menor diversidade genética e menores teores de cafeína, sendo, porém, mais aromática, além de apresentar sabor mais pronunciado e menor amargor, o que resulta em melhor qualidade de bebida. A espécie é bastante cultivada em regiões de maior altitude. Já *C. canephora* é diploide ($2n = 2 \times = 22$), alógama e uma das mais polimórficas espécies do gênero *Coffea*. A espécie é mais bem adaptada a regiões tropicais de menor altitude, de clima quente e úmido (CHARRIER; BERTHAUD, 1985; MONDEGO *et al.*, 2011).

C. canephora possui bebida mais neutra, de amargor mais pronunciado, além de maior teor de cafeína e sólidos solúveis. A espécie apresenta grande importância comercial pelo seu uso em *blends* com *C. arabica*, para dar corpo ao café expresso e na indústria de café solúvel. Além disso, é uma espécie mais rústica, apresentando maior resistência a pragas e doenças e também maior tolerância a elevadas temperaturas e ao déficit hídrico, sendo utilizada nos programas de melhoramento do cafeeiro (BERTRAND *et al.*, 2003; FERRÃO *et al.*, 2019b; LASHERMES; ANDRADE; ETIENNE, 2008).

A espécie também é menos afetada pela bienalidade de produção da cultura, além de apresentar produtividades mais elevadas. Em função da alta variabilidade genética resultante da alogamia da espécie, a seleção e propagação de clones com características de interesse são de grande importância para garantir melhorias na produtividade e qualidade do café (BRAGANÇA *et al.*, 2001; CONAB, 2017).

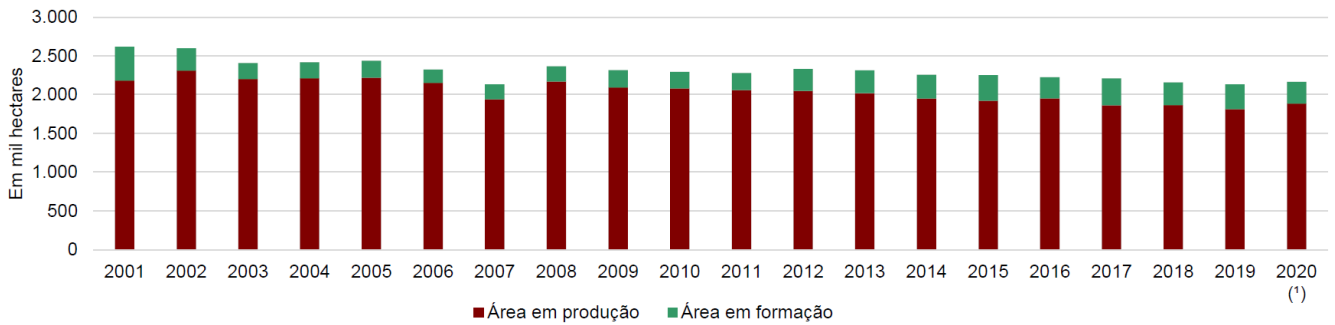
Através de diversos estudos morfológicos, fisiológicos e moleculares e considerando a sua origem geográfica, *C. canephora* foi subdividido em dois grupos: Guineano e Congolês, sendo este último dividido nos subgrupos SG1, SG2, B e C. O grupo Guineano concentra materiais genéticos originários do oeste da África (Guiné, Libéria e Costa do Marfim), que apresentam tolerância à seca, maior suscetibilidade às doenças e maior teor de cafeína; enquanto os do grupo Congolês têm origem República Centro-Africana, República Democrática do Congo, Camarões, Uganda, Gabão e Congo, os quais apresentam maior resistência a doenças (FERRÃO *et al.*, 2019a).

Dentre os subgrupos do grupo Congolês, SG1 é constituído principalmente por materiais do tipo Konillou, alguns tipos de robusta ou híbridos entre estes dois, apresentam maior teor de cafeína nos grãos (2,7%), moderada tolerância à seca, e qualidade de bebida superior às plantas classificadas no grupo Guineano; SG2 agrupa genótipos robusta e apresentam menores teores de cafeína (2,3%), maior resistência à ferrugem, maturação dos frutos de média a tardia e maior suscetibilidade à seca (FERRÃO *et al.*, 2019a).

O café é o segundo produto que mais movimenta riqueza na economia global, estando atrás apenas do petróleo, movimentando mais de 90 bilhões de dólares anualmente. Devido à complexidade de sua constituição química e sensorial, tem sido consumido em diferentes formas e preparos, desde bebidas quentes e frias, como ingrediente da preparação de cervejas, bolos, sorvetes, balas e mesmo cosméticos e medicamentos, devido às suas propriedades nutracêuticas (FERRÃO *et al.*, 2019b; MISHRA; SLATER, 2012).

No Brasil, o cultivo de café conta com uma área total de 2,16 milhões de hectares, sendo 1,75 milhões de hectares (81,3%) destinados a *C. arabica* tendo o estado de Minas Gerais como o principal produtor, 1,22 milhão de hectares, correspondendo, nesta safra, a 72,1% da área ocupada com café arábica em âmbito nacional. Para *C. canephora*, a área estimada em 404,3 mil hectares, da qual o estado do Espírito Santo é o maior produtor com 265,2 mil hectares. Nas últimas duas décadas a área produtiva de café no país vem apresentado redução (figura 1.1), entretanto essa tendência vem sendo compensada pelo ganho de produtividade obtido pelos produtores, devido a aplicação de novas tecnologias nessa cultura. Na safra de 2020 é possível, no entanto, perceber leve retomada no crescimento da área total nos principais estados produtores de café, como Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo e Bahia (CONAB, 2020).

Figura 1.1 – Gráfico representando a evolução da área total de café (*C. arabica* e *C. canephora*) produzida no Brasil nos últimos anos.

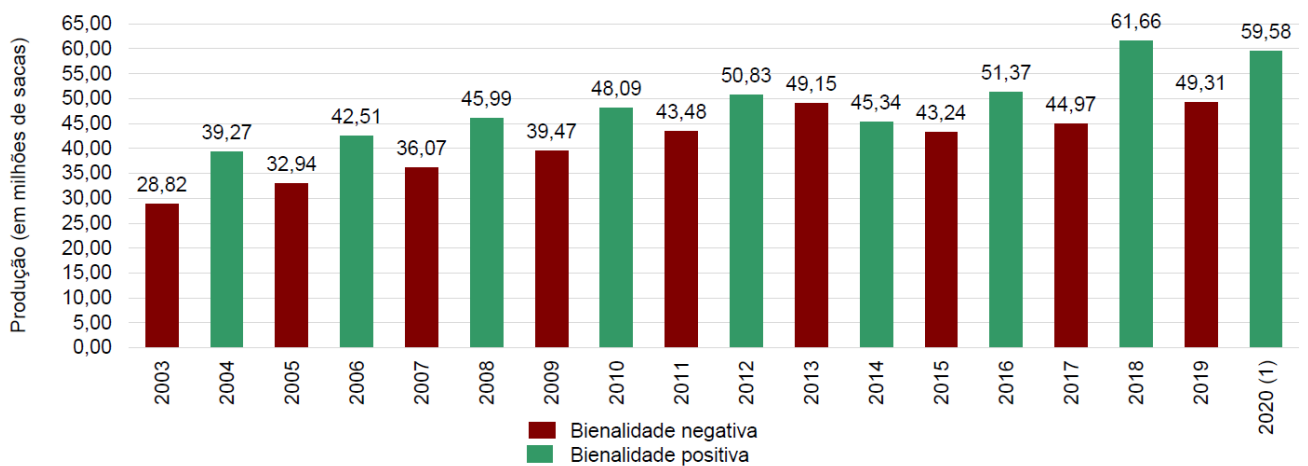


Nota: Estimativa em janeiro/2020(1).

Fonte: CONAB (2020).

A estimativa total para a produção brasileira de café para 2020 é entre 57,15 e 62,02 milhões de sacas de 60 quilos de café beneficiado, sendo que esta safra é de bienalidade positiva, resultando em uma produtividade estimada entre 30,31 a 32,89 scs/ha. Estas projeções representam um incremento de até 25,8% em comparação ao volume colhido na temporada passada (figura 1.2). Nesta safra, *C. arabica* representa cerca de 75% da produção nacional total e *C. canephora* 25%. A posição de maior exportador mundial de café ocupada pelo Brasil reflete a importância econômica da cultura para o país (CONAB, 2020).

Figura 1.2 – Produção total nacional de café (*C. arabica* e *C. canephora*) nos últimos anos.



Legenda: Ponto médio. Estimativa em janeiro/2020 (1).

Fonte: CONAB (2020).

A fim de acessar a diversidade genética das espécies do gênero *Coffea* cultivadas no Brasil, marcadores morfológicos e moleculares foram utilizados ao longo dos anos, a fim de caracterizar diferentes acessos e identificar genótipos com características superiores (FERRÃO *et al.*, 2014). O Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural

(INCAPER) é um dos principais responsáveis pela identificação e caracterização de clones e variedades de *Coffea canephora* no país (FERRÃO *et al.*, 2009, 2000; TATAGIBA *et al.*, 2001). Dentre alguns destes genótipos identificados, pode-se destacar, por exemplo, os clones 14 e 22, os quais possuem características contrastantes de resistência e susceptibilidade a seca, respectivamente, sendo utilizados em estudos para a identificação de genes relacionados a estas características (REICHEL, 2016; TORRES *et al.*, 2019).

2.2 Cultura de tecidos vegetais

O cultivo *in vitro* de plantas é composto por um conjunto de técnicas e consiste no cultivo de células, tecidos ou órgãos de plantas em um meio de cultura sintético sob condições assépticas em ambiente controlado de luminosidade, temperatura e umidade. O desenvolvimento destas técnicas deve-se à descoberta e caracterização dos hormônios vegetais, e tem sido uma ferramenta tanto para o cultivo quanto para o estudo do comportamento fisiológico de órgãos, tecidos, células e até mesmo organelas vegetais. Além disso, os avanços obtidos com as técnicas de cultura de tecidos como ferramenta biotecnológica tem permitido grandes desenvolvimentos tanto na agricultura, como também na indústria (DAGLA, 2012; SHAHZAD *et al.*, 2017a).

O conceito de cultura de tecidos vegetais foi proposto claramente pela primeira vez em 1902 por German Haberlandt, e apesar de não ter obtido sucesso devido a utilização de meios nutricionalmente inadequados, algumas informações importantes puderam ser coletadas. As principais dificuldades encontradas inicialmente foram em relação aos aspectos bioquímicos da técnica, como a nutrição orgânica e inorgânica, relações entre os reguladores de crescimento, necessidade de suplementação vitamínica, entre outros (SHAHZAD *et al.*, 2017a; WHITE, 1942).

Atualmente as diferentes técnicas disponíveis têm sido de grande valia nos programas de melhoramento de plantas, para a conservação de recursos genéticos, propagação de diversas espécies e para a produção de moléculas de interesse biológico. Estas técnicas são fundamentais para o desenvolvimento de outras ferramentas como a transformação genética de plantas, a obtenção de plantas livres de vírus, a produção de duplo-haploides, a produção de híbridos somáticos via fusão de protoplastos, a produção em larga escala de metabólitos secundários ou proteínas recombinantes em células vegetais em suspensão (DAGLA, 2012; MORAIS *et al.*, 2012; NETO; ANDRADE, 2011; SHAHZAD *et al.*, 2017b).

O desenvolvimento de uma nova planta a partir de uma única célula, tecido ou órgão vegetal pode ocorrer por diferentes rotas morfogênicas: embriogênese ou organogênese, sendo que ambas podem ser diretas ou indiretas. Estes processos podem sofrer influência de diversos

fatores, como o tipo e qualidade fisiológica do explante, bem como a composição do meio de cultura utilizado. A embriogênese somática (ES) compreende o processo em que uma célula somática vegetal, sob os estímulos necessários, se diferencia para formar um embrião somático, já na organogênese um conjunto de células se reorganiza para dar origem a um novo órgão, brotação ou raízes adventícias, a partir de um explante. Estes dois processos são considerados indiretos quando a partir do explante inicial são formados calos, massas celulares indiferenciadas e desorganizadas, e diretos quando isso não ocorre (NETO; ANDRADE, 2011).

Ainda que os princípios básicos da cultura de tecidos vegetais sejam claramente estabelecidos, como a composição geral dos meios de cultura e o papel de cada regulador de crescimento utilizado, cada espécie ou genótipo específico necessita de estudos direcionados a fim de estabelecer as condições ótimas para o seu cultivo, uma vez que as respostas obtidas são fortemente dependentes do genótipo utilizado (WINKELMANN, 2016).

2.3 Embriogênese somática

A embriogênese em plantas geralmente é um processo resultante de dupla fecundação, no qual estão envolvidas uma célula espermática haploide e uma célula ovo haploide que após a sua fusão darão origem a um embrião zigótico. Entretanto essa não é a única via de embriogênese em plantas, esta pode ocorrer assexuadamente, sem a ocorrência de fertilização, tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Células somáticas ou gametas podem ser induzidos a diferenciar-se em embriões *in vitro* através da aplicação de tratamentos com reguladores de crescimento e/ou de estresse (GERMANÀ; WALKER, 2016).

Esse processo pelo qual células somáticas, submetidas a condições adequadas de indução, geram células embriogênicas é chamado de embriogênese somática (ES). Para tanto, precisam passar por uma série de alterações morfológicas e bioquímicas, permitindo o desenvolvimento de uma estrutura bipolar sem conexão vascular com o tecido originário (SOLÍS-RAMOS *et al.*, 2012).

Devido a essa possibilidade, é amplamente aceito que todas as células vegetais são totipotentes e podem regenerar um organismo completo. Apesar de incontáveis experimentos demonstrando a regeneração de plantas inteiras a partir de diversos explantes, inclusive células individuais, recentemente tem sido observada que a regeneração de plantas talvez ocorra em função da transdiferenciação de meristemas ou tecidos de calos semelhantes a meristemas presentes devido a presença de células meristemáticas adultas em toda a planta, não se iniciando a partir de uma única célula totipotente. Assim, a totipotência não poderia ser considerada uma característica intrínseca de células vegetais, mas algumas delas podem readquirir esta totipotência sob determinadas

condições (FEHÉR; BERNULA; GÉMES, 2016).

De qualquer forma, a ES pode ser considerada uma das ferramentas mais poderosas da biotecnologia de plantas, permitindo a propagação em larga escala de variedades de interesse, ou servindo de suporte para estudos de biologia do desenvolvimento vegetal ou para ensaios de transformação genética (LOYOLA-VARGAS; OCHOA-ALEJO, 2016). Essa estratégia se destaca frente à organogênese, pois permite a obtenção de um grande número de regenerantes, baixa frequência de quimeras e limitada ocorrência de variação somaclonal (VS) (SAHIJRAM; BAHADUR, 2015). No caso do cultivo *in vitro* do cafeeiro, a ocorrência de VS pode variar de 0 a 93% e depende do genótipo, fonte do explante, tipo e concentração dos reguladores de crescimento das plantas no meio e principalmente o tempo de cultivo (CAMPOS; PANIS; CARPENTIER, 2017).

Plantas lenhosas normalmente são menos responsivas ao cultivo *in vitro* do que outras espécies, especialmente plantas adultas, ainda assim a utilização da ES tem demonstrado ser uma importante ferramenta para a propagação clonal de espécies lenhosas. A ES é extremamente útil ainda para a produção de sementes sintéticas, conservação de germoplasma e criopreservação dessas espécies. O ponto chave para o sucesso dessa estratégia é a transição de um estado de célula somática para célula embriogênica (GUAN *et al.*, 2016).

Na cultura do cafeeiro, os estudos de ES têm sido de grande ajuda no desenvolvimento e propagação de cultivares comerciais de café. Os trabalhos pioneiros em cultura de tecidos foram publicados por Staritsky (1970), que obteve êxito na indução de calos a partir de folhas de várias espécies e produção de embriões somáticos na espécie *C. canephora*. Posteriormente, diversos trabalhos envolvendo a espécie *C. arabica* foram desenvolvidos, no intuito de aumentar a taxa de indução, a multiplicação de calos embriogênicos e a regeneração e desenvolvimento de plântulas (BARTOS, 2012; CARVALHO *et al.*, 2011; NEUENSCHWANDER; BAUMANN, 1992; QUIROZ-FIGUEROA; KÚ-RODRÍGUEZ; LOYOLA-VARGAS, 2002; ZAMARRIPA *et al.*, 1991). Ao longo de mais de 50 anos, diferentes grupos de pesquisa ao redor do mundo desenvolveram diferentes protocolos de ES, buscando eficiência, reprodutibilidade e confiabilidade no processo, além de buscar a elucidação da regulação gênica do processo (ARROYO-HERRERA *et al.*, 2008; BARRETO *et al.*, 2012; FREITAS *et al.*, 2019; KAHIA; MANTELL, 2016; NIC-CAN *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2013; YASUDA; FUJII; YAMAGUCHI, 1985). Muitos fatores que influenciam a resposta vêm sendo estudados, observando-se um importante papel das auxinas e do genótipo utilizado. O desenvolvimento de protocolos de ES tem possibilitado ainda a aplicação de técnicas de transformação genética, visando à melhoria de características agronômicas, como redução dos níveis endógenos de

caféina e resistência a pragas e doenças (LOYOLA-VARGAS *et al.*, 2016).

2.4 Transformação genética de plantas

Em biologia molecular, transformação genética pode ser definida como a alteração dos genes de uma célula através da inserção de um DNA exógeno pela membrana celular e a sua incorporação bem sucedida ao genoma da célula em questão. A transformação genética se tornou uma ferramenta versátil e amplamente utilizada tanto para o melhoramento quanto para o estudo de função dos genes em plantas. O sucesso no emprego dessa tecnologia é resultado de muitos anos de esforços dos pesquisadores em aprimorar as técnicas de cultivo *in vitro*, os próprios métodos de transformação genética e à engenharia genética, não esquecendo de mencionar os estudos para identificação de genes candidatos (HANSEN, 1999; SAEED; SHAHZAD, 2015).

A produção de plantas transgênicas tornou-se rotineira para diversas espécies cultivadas, como arroz, trigo, milho, soja, algodão, canola, entre outras (ZIEMIENOWICZ, 2014). Transgenes são introduzidos nas plantas visando conferir as mais diversas características de interesse agrônomo como: aumento da qualidade nutricional, tolerância a estresses abióticos, resistência a patógenos, entre outros. O desenvolvimento de técnicas de transformação permitiu que fosse possível utilizar genes de espécies evolutivamente distantes das plantas, como bactérias, fungos, vírus e até mesmo animais, aumentando infinitamente as possibilidades de melhoramento de características das plantas. Para tanto, o transgene precisa ser inserido na célula vegetal e atingir o núcleo, o que pode ser facilitado por métodos biológicos ou físicos (RIVERA *et al.*, 2012).

O principal método físico utilizado para transformação de plantas é a biobalística ou bombardeamento de partículas. Esse método foi desenvolvido na Cornell University em 1987 com o objetivo de melhorar a transformação de cereais (SANFORD *et al.*, 1987), já que a eficiência de transformação mediada por *Agrobacterium* era particularmente baixa em monocotiledôneas. O método consiste no aceleramento de pequenas partículas ligadas ao gene de interesse contra a célula vegetal, permitindo que este complexo penetre na parede celular e atinja o núcleo, possibilitando a integração do DNA inserido ao genoma da célula vegetal (RIVERA *et al.*, 2012; SANFORD, 1990).

A transformação mediada por *A. tumefaciens* é a técnica mais utilizada para a inserção de genes exógenos em plantas, sendo um processo bastante complexo e requer o envolvimento de componentes celulares tanto vegetais quanto bacterianos. Basicamente a *Agrobacterium* irá infectar a célula vegetal, copiar um trecho de seu plasmídeo Ti (do inglês, “*tumor-inducing*”) e o transportar para o interior da célula vegetal até o núcleo onde esse fragmento poderá ser integrado ao genoma vegetal. A versatilidade e eficiência da técnica é refletida na variedade de

grupos de plantas para quais já foi aplicada: espécies de cereais, leguminosas, tubérculos, lenhosas, ornamentais e medicinais, entre outras (GELVIN, 2003; ZIEMIENOWICZ, 2014).

Independentemente da técnica utilizada na transformação genética de plantas, a principal limitação encontrada é a integração aleatória da construção gênica de interesse no genoma vegetal. Tentando superar esse gargalo, novas técnicas de edição de genomas vêm sendo desenvolvidas, como a utilização de nucleases programáveis, que é o caso das nucleases zinc-finger (ZFN) e das nucleases efetoras semelhantes a ativadores de transcrição (TALENs), que possuem a capacidade de clivar o DNA genômico em sítios específicos e, através do sistema de reparo endógeno, permitem gerar edições altamente precisas no genoma (KIM; KIM, 2014).

As proteínas ZFN apresentam um sítio de ligação ao DNA no qual, naturalmente, diversos aminoácidos entram em contato com 3pb da fita de DNA. As nucleases ZFN são fusões do domínio não específico de clivagem de DNA da endonuclease de restrição FokI com proteínas de ZFN, as quais foram engenheiradas para possuírem um sítio de ligação ao DNA com 9-18pb, permitindo assim clivar o DNA genômico com especificidade. TALENs são fusões do domínio de clivagem FokI e domínios de ligação ao DNA derivados das proteínas TALE, as quais contêm diversos domínios repetitivos de 33 a 35 aminoácidos, cada um reconhecendo um único par de bases. Ambos induzem quebras na dupla fita de DNA (DSB, do inglês “double-strand breaks”) que ativam as vias de resposta a danos no DNA e permitem alterações personalizadas. Apesar de promissoras, essas duas técnicas apresentam um problema em comum: são necessárias duas proteínas de ligação ao DNA relativamente grandes, para cada alvo, o que torna o processo de *design* complexo e oneroso (GAJ; GERSBACH; BARBAS, 2013; JINEK *et al.*, 2012).

Mais recentemente, uma técnica baseada no sistema imune de bactérias foi desenvolvida: CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)/Cas (CRISPR-associated), sendo considerado um sistema notavelmente mais fácil de projetar, altamente específico, eficiente e adequado para edição de múltiplos genes em uma ampla variedade de tipos de células e organismos. Pode-se classificar este como um sistema baseado em nucleases engenheiradas guiadas por RNA (RGENs, do inglês “RNA-guided engineered nucleases”) (KIM; KIM, 2014; RAN *et al.*, 2013).

Os primeiros relatos de utilização da técnica para edição de genomas envolveram bactérias (JIANG *et al.*, 2013a), cultivos de células humanas e de camundongo (CONG *et al.*, 2013; RAN *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2014), animais modelo (FRIEDLAND *et al.*, 2013; HWANG *et al.*, 2013), e também plantas (BELHAJ *et al.*, 2013; LI *et al.*, 2013; UPADHYAY *et al.*, 2013). O sistema CRISPR/Cas tem sido uma plataforma altamente eficiente de edição de genomas sítio-dirigida, uma vez que permite a clivagem de regiões específicas do DNA

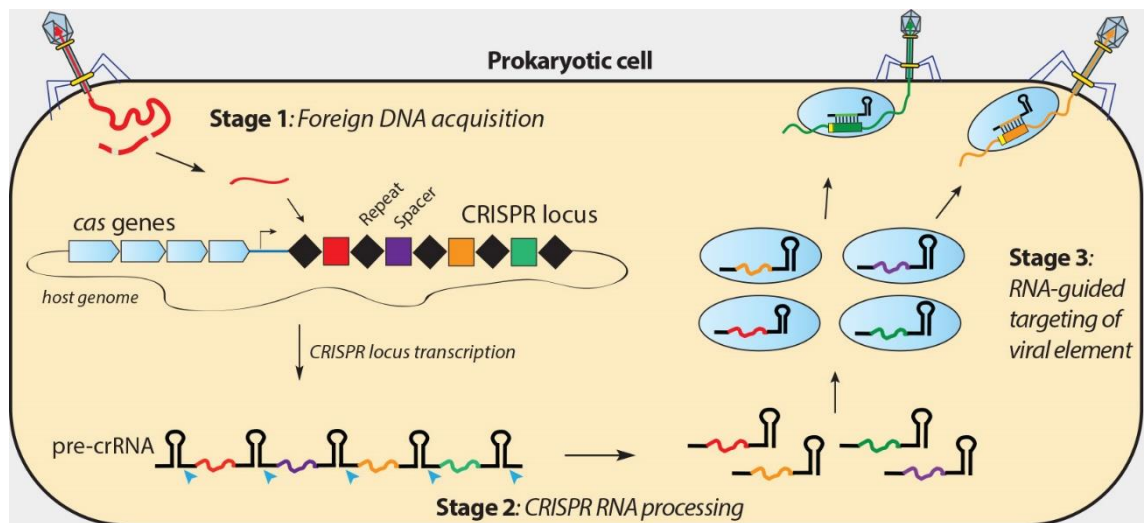
genômico guiado por um pequeno RNA não codificante, resultando em modificações gênicas seja pela via de reparo de extremidades não homólogas (NHEJ, do inglês “Non-homologous end joining”) como pela recombinação homóloga (HDR, do inglês “Homology directed repair”) (RIVERA *et al.*, 2012; TANG; TANG, 2016).

2.5 Sistema CRISPR/Cas9

As repetições palindrômicas curtas agrupadas e regularmente interespaçadas (CRISPR)- e as proteínas associadas a CRISPR (Cas) fazem parte de um sistema imune adaptativo de procariotos encontrado principalmente em *Archaeas* e muitas bactérias. O locus genômico CRISPR-Cas apresenta uma complexidade e diversidade até então não observada entre os sistemas de defesa procariotos conhecidos atualmente (MAKAROVA; KOONIN, 2015). A partir do entendimento do funcionamento desse sistema foi desenvolvida uma técnica de edição genômica que ficou conhecida pelo mesmo nome.

Nesse sistema procarioto (figura 1.3), pequenos fragmentos de DNA exógenos (provenientes de vírus e plasmídeos que anteriormente atacaram a célula), chamados de “espaçadores” são integrados ao locus genômico CRISPR entre as sequências repetitivas (estágio 1: adaptação/aquisição) e então, quando há uma nova infecção, estes são transcritos (estágio 2: expressão/processamento) (JINEK *et al.*, 2012). Os espaçadores geram o precursor do CRISPR RNA (pre-crRNA), e as sequências repetitivas o *trans-activating CRISPR RNA* (tracrRNA), os quais se hibridizam devido à similaridade em parte de suas sequências, ativando o processamento do pre-crRNA para gerar o CRISPR RNA maduro (crRNA) (HORVATH; BARRANGOU, 2010). A molécula híbrida crRNA: tracrRNA e sua estrutura tridimensionais são essenciais para o seu reconhecimento pela porção efetora do sistema, que será responsável pela identificação e clivagem do DNA exógeno (estágio 3).

Figura 1.3 – Representação esquemática do funcionamento do sistema CRISPR/Cas9 em procarionotos.



Representação do sistema CRISPR/Cas em procarionotos, *locus* CRISPR e as etapas de aquisição (Estágio 1), expressão e processamento (Estágio 2) e direcionamento (Estágio 3). Estágio 1: fragmentos de DNA do vírus invasor são incorporados no *locus* CRISPR do genoma da bactéria. Estágio 2: expressão e hibridização dos pre-crRNAs (precursores dos pequenos CRISPR RNA) e *tracrRNA* (chamado *trans-activating CRISPR RNA*), que passam pelo processamento da RNase III, gerando os pequenos CRISPR RNA (crRNAs). Estágio 3: Uma nucleáse de Cas (proteína associada ao CRISPR) liga-se ao crRNA, guiando a nucleáse para destruir o DNA dos vírus invasores.

Fonte: <http://rna.berkeley.edu/crispr.html> (2017).

Os sistemas CRISPR podem ser classificados em Classe 1, quando utilizam diversas proteínas Cas juntamente do crRNA, formando um grande complexo efetor, no reconhecimento e clivagem do sítio alvo, ou Classe 2, quando essa função é desempenhada por uma única grande proteína juntamente do crRNA, como é o caso da Cas9 (MAKAROVA; KOONIN, 2015). Uma outra classificação diz respeito ao estágio 2, de processamento do complexo pre-crRNA: *tracrRNA*, onde os chamados tipos I e III o processamento é realizado por endonucleases Cas, enquanto no tipo II é realizado pela RNase III, na presença da Cas9 (JINEK *et al.*, 2012).

Os trabalhos mais recentes demonstraram que existe uma região essencial para o reconhecimento do crRNA pela proteína Cas9: uma sequência de "semente" dentro do crRNA e uma sequência conservada de *motifs* adjacentes ao *protospacer* contendo o dinucleótido (PAM) *upstream* da região de ligação do crRNA. Mantendo-se essa região de reconhecimento, o sistema CRISPR/Cas pode ser manipulado para cortar praticamente qualquer sequência de DNA ao modificar-se o crRNA. Este complexo crRNA e *tracrRNA* pode ser chamado de RNA guia (gRNA, ou RNA guia simples: sgRNA, no sistema sintético) (GAJ; GERSBACH; BARBAS, 2013; JINEK *et al.*, 2012; YANAGUI, 2016).

Portanto, diferentemente das técnicas de ZNFs e TALENs, nesta técnica o único componente que precisa ser engenheirado é o gRNA para cada sítio alvo, o que torna o design do sistema muito mais simples e reduz custos para a edição de genes (JAO; WENTE; CHEN, 2013).

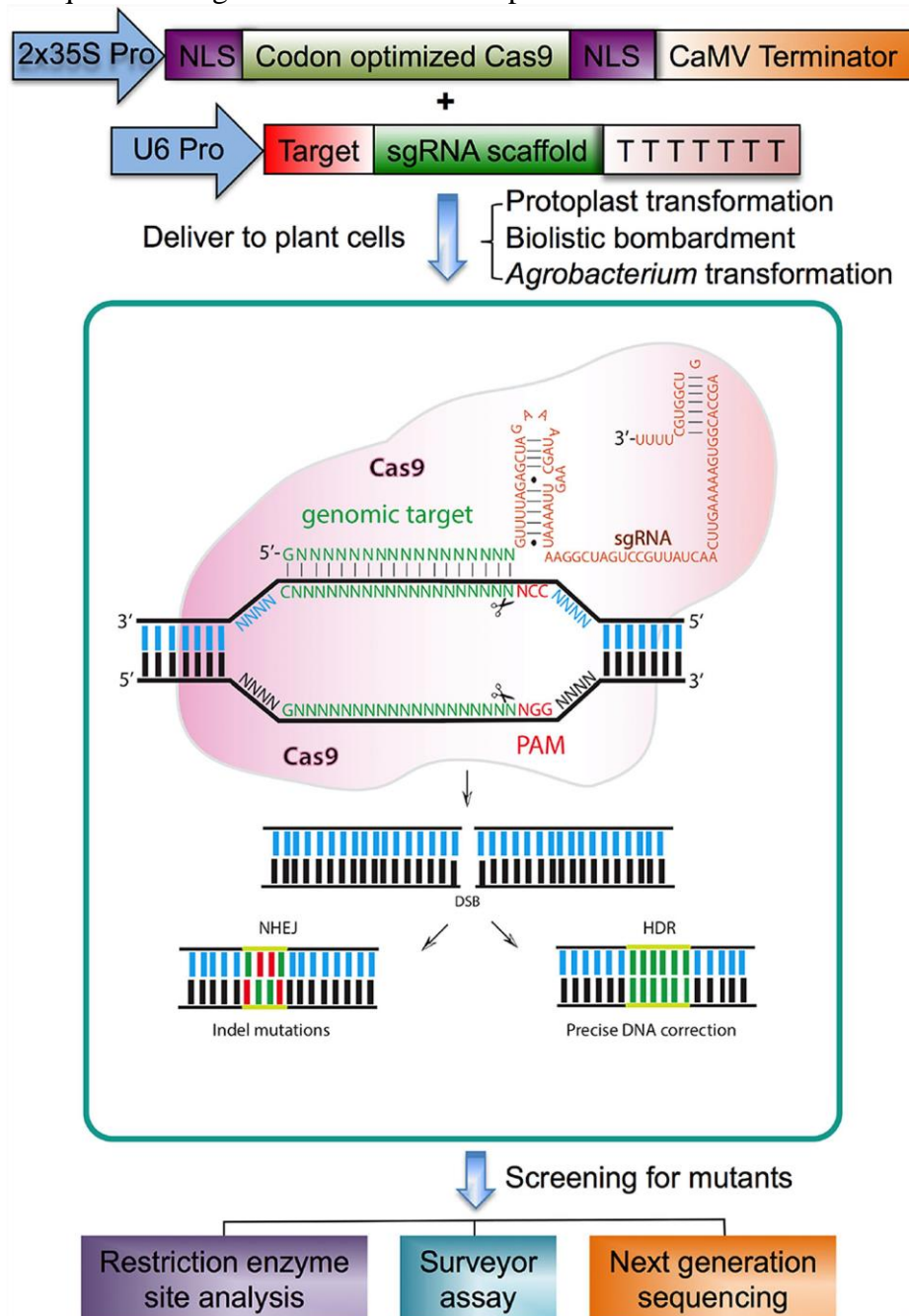
Após a clivagem da fita dupla de DNA pela Cas9, resultado da atuação dos dois sítios ativos da enzima, RuvC e HNH (JINEK *et al.*, 2012), o lócus alvo normalmente sofre uma das duas vias principais para o reparo de dano do DNA: o NHEJ, propenso a erros, ou a via HDR, de alta fidelidade, ambas as quais podem ser usadas para alcançar um efeito de edição desejado, como silenciamento ou inserção da sequência gênica, respectivamente (RAN *et al.*, 2013).

Não havendo uma sequência com homologia para a recombinação a DSB será reparada pela via NHEJ, na qual ao serem religadas as extremidades pode haver mutações por inserções/deleções (*indels*). Se essas mutações ocorrerem em éxons, poderão levar a uma mudança no *frame* de leitura ou códon de parada prematuro e, portanto, ao silenciamento do gene. Pode-se utilizar mais de um gRNA com o intuito de gerar diferentes DSB e consequentemente maiores deleções no genoma (MALI *et al.*, 2013).

A via de reparo HDR normalmente ocorre em frequências muito mais baixas e variáveis, entretanto pode ser utilizada para gerar inserções de sequências de interesse em sítios específicos do genoma, desde que essas sequências apresentem extremidades homólogas às da região clivada. Podem ser utilizados ainda oligonucleotídeos de DNA de cadeia simples (ssODNs), que permitem pequenas edições no genoma, como a introdução de mutações de um único nucleotídeo para provar variações genéticas causais (CHEN *et al.*, 2011).

Na figura 1.4 podemos observar uma representação esquemática dos passos necessários para a obtenção de plantas mutantes através do sistema CRISPR/Cas9. A construção gênica a ser utilizada precisa apresentar os seguintes elementos: promotor e terminador para a sequência codante otimizada da proteína Cas9, sendo um dos mais comumente utilizado o promotor 35S e o terminador de Vírus do mosaico de couve-flor (BELHAJ *et al.*, 2013); promotor para a sequência alvo e o *scaffold* do sgRNA, normalmente são utilizados os promotores da RNA polimerase III de plantas, U3 e U6 de *Arabidopsis* ou da própria espécie a ser utilizada. Outro aspecto importante é a fusão da Cas9 a um sinal de localização nuclear (do inglês, nuclear localization signal: NLS), para garantir a sua entrega no núcleo (BELHAJ *et al.*, 2013).

Figura 1.4 – Visão geral do mecanismo de edição do genoma pelo sistema CRISPR/Cas9 e subsequente mutagênese direcionada em plantas.



Legenda: Visão geral do mecanismo de edição do genoma pelo sistema CRISPR/Cas9 e subsequente mutagênese direcionada. Depois que Cas9 e sgRNA são entregues na célula da planta por transformação de protoplastos, biobalística ou transformação mediada por *Agrobacterium*, a Cas9 estimula a separação das cadeias de DNA e permite que um sgRNA hibridize com uma sequência específica no gene alvo para clivagem de DNA direcionada. O sistema posiciona o DNA alvo no sítio ativo da Cas9 na orientação adequada em relação ao sítio PAM e permite que domínios RuvC e HNH clivem independentemente cada segmento da sequência de DNA-alvo 3 nucleotídeos *upstream* a PAM. A quebra do DNA de fita dupla passa então pelo sistema de reparo via junção de extremidades não homólogas (NHEJ, do inglês) ou pela recombinação homóloga (HDR), quando ocorrem frequentemente deleções ou inserções de alguns nucleotídeos. Os mutantes são examinados por diferentes abordagens, incluindo ensaios com enzima de restrição, ensaio de sobrevivência e sequenciamento. O cassete que

expressa Cas9 é regulado pelo promotor 35S do vírus do mosaico de couve-flor e a sequência alvo e de *scaffold* do gRNA é regulada pelo promotor U6. A sequência PAM (NGG; vermelha) é essencial para a atividade da nuclease Cas9. Letras verdes representam a molécula genômica do DNA; tesouras indicam locais de clivagem; Cas9; PAM: motivos adjacentes do protospacer; sgRNA, RNA guia único; NLS, sinal de localização nuclear.

Fonte: TANG; TANG (2016).

Para a inserção do cassete gênico no genoma da planta pode ser utilizada quaisquer das técnicas conhecidas, como transformação do protoplastos, biobalística ou infecção por *A. tumefaciens*. Uma vez que haja a clivagem pela enzima Cas9 e o reparo da região, seja pela via NHEJ ou HDR, leve a alguma mutação é necessário fazer-se a identificação dos mutantes. Para tanto pode-se utilizar enzimas de restrição para os sítios de clivagem, ensaios de sobrevivência a agentes seletivos e por fim, o sequenciamento das regiões alvo (TANG; TANG, 2016).

Desde a elucidação do sistema, este já foi manipulado para utilização em diferentes espécies. Dentre as plantas já foram manipuladas plantas modelo como *A. thaliana*, na qual foram avaliadas diversas gerações de mutante para 12 diferentes alvos a fim de determinar os padrões, eficiência, especificidade e herdabilidade de mutações ou correções genéticas induzidas por CRISPR/Cas, obtendo eficiência de até de 79,4% (FENG *et al.*, 2014); culturas comerciais como milho, no qual edição do gene ALS2 usando oligonucleotídeos de fita simples ou dupla como modelos de reparo produziu plantas resistentes ao clorossulfuron. Além disso, as quebras de fita dupla geradas pela endonuclease Cas9 guiada por RNA também estimularam a inserção de um gene de característica em um local próximo a LIG1 por HDR (SVITASHEV *et al.*, 2015); plantas frutíferas como citrus, no qual investigou-se se a agroinfiltração facilitada por *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xcc) pode ser usada para acelerar os ensaios de função de transgene, utilizando os sistema CRISPR/Cas9 (JIA; WANG, 2014); plantas lenhosas como *Populus*, no qual a validação do sistema foi feita através do silenciamento do gene PDS (FAN *et al.*, 2015); gramíneas como arroz e sorgo, nas quais foi testada a transformação transiente de protoplastos para avaliar e a eficiência do sistema (JIANG *et al.*, 2013b).

Muitos estudos utilizam como alvo o gene da fitoeno desaturase (PDS). Uma vez esse gene esteja silenciado, observa-se nas plantas a ausência de pigmentação verde, portanto este gene é amplamente utilizado em ensaios de validação de tecnologias de silenciamento gênico, como o sistema CRISPR/Cas9, já que sua função é conhecida e pela facilidade de identificação dos mutantes (JEONG *et al.*, 2005; SHAO *et al.*, 2008).

Em *C. canephora* a técnica foi aplicada recentemente, sendo obtidos mutantes para o gene PDS, sem apresentar, entretanto o fenótipo albino esperado. Foram testadas construções com sgRNAs individuais e em multiplex, sendo obtidos mutantes apenas para um dos alvos, no

éxon 14 (pCOFFEDIT-14). A eficiência da mutação no local alvo estimada foi de 30,4% (BREITLER *et al.*, 2018).

A maioria das primeiras estratégias de edição genômica utilizando sistemas CRISPR/Cas visavam os alvos em um ou dois *loci* gênicos simultâneos. Entretanto posteriormente tornou-se comum a co-expressão de múltiplos sgRNAs em sistemas chamados multiplex, que poderiam visar alvos em diferentes regiões no mesmo gene, aumentando as chances de induzir uma mutação, ou ainda sgRNAs para diferentes genes em uma mesma construção e podendo gerar grandes deleções cromossômicas (DEMIRCI; ZHANG; UNVER, 2018).

Existem sistemas CRISPR que utilizam outras endonucleases associadas, apresentando características diferentes da Cas9, as quais também já foram utilizados para edição genômica. A identificação dessas variantes amplia as possibilidades de aplicação do sistema. Um exemplo é a Cpf1, que induz DSB gerando extremidades coesivas e reconhece um sítio PAM rico em T (ZETSCHE *et al.*, 2015).

Para além da edição genômica, o sistema CRISPR/Cas já foi utilizado para regular a expressão gênica (CRISPR activation/interference (CRISPRa/i), visualizar dinâmicas de elementos genéticos (Cas9 inativa fusionada a uma proteína fluorescente), entre outros. Tais relatos demonstram que o sistema pode ser uma ferramenta molecular com aplicações bastante amplas (KUMAR; JAIN, 2015).

Assim como ZFNs e TALENs, a tecnologia CRISPR/Cas é considerada uma das novas técnicas de melhoramento de plantas (NPBTs), as quais geram debates ao redor do mundo quanto a regulamentação e legislação de organismos geneticamente modificados (OGMs). São técnicas que podem gerar modificações do genoma de plantas indistinguíveis daquelas geradas através de melhoramento convencional ou mutagênese induzida física ou quimicamente, o que levaria à classificação das plantas obtidas por estas técnicas como não-GM, possibilitando um impacto positivo na aceitação das tecnologias no mercado (BELHAJ *et al.*, 2013; KLETER; KUIPER; KOK, 2019). No Brasil, segundo a Resolução Normativa nº16 (RN16), as técnicas de edição genômica estão classificadas como Técnicas Inovadoras de Melhoramento de Precisão (TIMP) e a depender da avaliação da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio), o produto obtido por estas técnicas poderá ser registrado como de melhoramento convencional ou mutagênese ou se deve seguir regulamentação de OGM (Organismo Geneticamente Modificado) ou transgênico (NEPONUCENO, 2020).

2.6 Transformação genética de cafeeiro

Devido aos avanços obtidos no desenvolvimento de técnicas de cultivo *in vitro* de espécies do gênero *Coffea* se tornou possível a manipulação a nível molecular e celular das espécies, tornando-as elegíveis para aplicação de técnicas biotecnológicas em programas de melhoramento inclusive para a transformação genética. A utilização destas técnicas é de extrema importância para auxiliar na redução do tempo e custo necessários no melhoramento da espécie (KUMAR *et al.*, 2006). Os principais objetivos da utilização da transformação de *Coffea* são a introdução de características agronômicas de interesse em genótipos de elite, para o desenvolvimento de novas cultivares apresentando resistência a pragas e doenças, resistência a herbicidas, tolerância a seca e congelamento, melhoria na qualidade de bebida, entre outras características as quais não são possíveis introduzir através do melhoramento clássico (MISHRA; SLATER, 2012).

Entre as primeiras estratégias de transformação genética aplicada ao cafeeiro estão a eletroporação de protoplastos em *C. arabica* (BARTON; ADAMS; ZARWITZ, 1991), na qual não foi obtido sucesso quanto a regeneração de plantas; a transformação de *C. canephora* a partir de hipocótilos por infecção com *A. tumefaciens* para expressão de genes marcadores de seleção e o gene repórter *uidA* (GUS – β -glucuronidase) (OCAMPO; MANZANERA, 1992); a transformação de embriões somáticos de *C. canephora* por infecção com *A. rhizogenes* (SPIRAL *et al.*, 1993); a expressão transiente do gene repórter *uidA* através de bombardeamento de partículas em *C. arabica*, *C. canephora* e Arabusta (VAN BOXTEL *et al.*, 1995).

No decorrer dos anos, diversos foram os trabalhos visando a otimização dos parâmetros das diferentes técnicas de transformação na tentativa de superar os problemas iniciais de baixa eficiência de transformação e regeneração (HATANAKA *et al.*, 1999). Para tanto, utiliza-se principalmente a transformação com genes repórteres, como *uidA*, *gfp* e *DsRFP*. Além disso, tem-se buscado a seleção de genes candidatos para transformação e avaliação de diferentes promotores, como CaMV35S (derivado do vírus do mosaico da couve-flor e amplamente utilizado em construções gênicas), EF-1 α (obtido do EF-1 α fator de alongação da tradução de *A. thaliana*), além de promotores endógenos como α - tubulina e α -arabicina (MISHRA; SLATER, 2012).

Existem também relatos de transformação transiente por infiltração a vácuo, com o objetivo de validar a técnica como uma forma rápida de obter-se plantas transformadas de *C. canephora*, no qual houve 33% de eficiência de transformação (CANCHE-MOO *et al.*, 2006) e de transformação estável dessa espécie obtida por bombardeio de partículas de tecido embriogênico (RIBAS *et al.*, 2005).

Em trabalhos mais recentes, a transformação genética de *C. arabica* foi otimizada pelo estabelecimento de cultivos de calos embriogênicos, demonstrando relação positiva entre o tempo de cultivo e a eficiência de transformação (RIBAS *et al.*, 2011), também há estudos para o

desenvolvimento de plantas com resistência a broca do café (ALBUQUERQUE *et al.*, 2015); a transformação de *C. canephora* foi utilizada para silenciamento de genes na rota biossintética da cafeína (MOHANAN *et al.*, 2014), e também utilizada para avaliar a atividade de haplótipos de promotores do gene CcDREB1D sob estresse hídrico (ALVES *et al.*, 2017); o efeito da composição da parede das células a serem infectadas com *Agrobacterium* e como inibidores de etileno podem afetar esse fator e melhorar a aderência da bactéria às células embriogênicas de *C. canephora* já foi estudado (KUMAR; SIMMI; GIRIDHAR, 2018), transformação de *C. arabica* com o gene Cry10Aa de *Bacillus thuringiensis* visando a possível utilização destas plantas transgênicas no controle da broca do café (VALENCIA-LOZANO *et al.*, 2019) e a transformação transiente através de agroinfiltração de folhas de *C. arabica* (VARGAS-GUEVARA *et al.*, 2018) são alguns exemplos de aplicações de técnicas de transformação genética em cafeeiro.

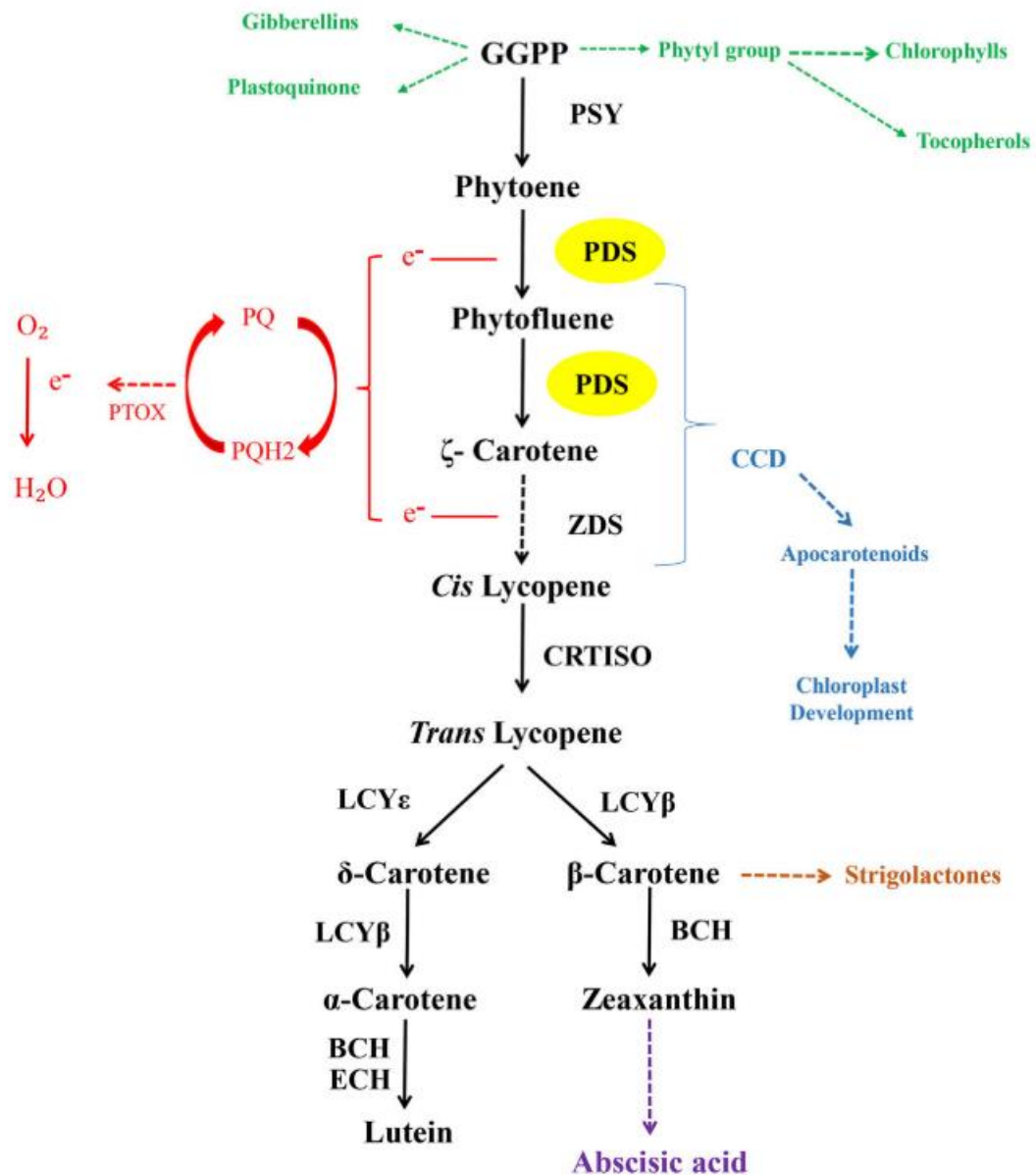
2.7 Silenciamento do gene PDS e seus efeitos

Como mencionado anteriormente, o gene PDS é uma das principais alternativas quando se deseja validar uma técnica de silenciamento gênico em plantas, devido ao fenótipo facilmente identificável que a ausência ou deficiência de expressão desse gene gera: plantas albinas (JEONG *et al.*, 2005; SHAO *et al.*, 2008). O silenciamento desse gene já foi obtido em diversas espécies, com diferentes técnicas como RNA interferente (RNAi) (TRAVELLA; KLIMM; KELLER, 2006; WANG *et al.*, 2009, 2005), silenciamento induzido por vírus (VIGS) (HOLZBERG *et al.*, 2002; VELÁSQUEZ; CHAKRAVARTHY; MARTIN, 2009; ZHOU *et al.*, 2018), TALENs (DU *et al.*, 2016) e CRISPR/Cas9 (BERNARD *et al.*, 2019; KAUR *et al.*, 2018).

Esse fenótipo é obtido pois este gene é essencial e limitante na rota biossintética dos carotenoides em plantas (figura 1.5), a enzima por ele codificada, a fitoeno desaturase, catalisa a introdução de duas ligações duplas no incolor 15-cis-fitoeno, produzindo 9,15,9'-tri-cis- ζ -caroteno, através do intermediário 9,15-di-cis-fitoflueno, o qual posteriormente é convertido em licopeno (KAUR *et al.*, 2018; KOSCHMIEDER *et al.*, 2017).

Além dos efeitos na própria rota, o silenciamento de genes de síntese de carotenoides tem efeitos de desregulação em rotas que compartilham do mesmo precursor, geranyl difosfato (GGPP). É o caso de ácido giberélico (GA), cadeia fitol de clorofila, plastoquinonas e tocoferóis. São observados efeitos ainda na síntese de compostos produzidos a partir de carotenoides, como o ácido abscísico (ABA) e estringolactonas, como mostrado na figura 1.5 (KAUR *et al.*, 2018).

Figura 1.5 – Via esquemática da biossíntese de carotenoides.



Legenda: As reações enzimáticas são representadas por setas; linhas tracejadas representam várias etapas enzimáticas. Enzimas: PSY, fitoeno sintase; PDS, fitoeno desaturase; ZDS, ζ-caroteno desaturase; LCYp, licopeno p-ciclase; LCYε, licopeno e-ciclase; CRTISO, isomerase carotenóide; BCH, hidroxilase de anel β, ECH, hidroxilase de anel ε; CCD, clivagem carotenóide dioxigenase. Compostos: GGPP, difosfato de geranyl geranyl; PQ, plastoquinona; PQH2, plastoquinol; PTOX, oxidase terminal plastídea.

Fonte: KAUR *et al.* (2018).

Os efeitos do silenciamento do PDS já foram estudados em tabaco, no qual foi observado: redução da eficiência do fotossistema II (PSII), redução do conteúdo total de carotenoides, clorofila a e b e aumento da concentração da proteína de membrana do tilacóide. Resultados que sugerem que a correspondência exata de pigmentos e proteínas é importante para a absorção e transferência de energia na fotossíntese, e a incompatibilidade delas podem causar mau funcionamento do PSII (WANG *et al.*, 2009). Um estudo em *Eschscholzia californica*, mostrou que o silenciamento, realizado com silenciamento induzido por vírus (do inglês: Virus-induced gene silencing, ou VIGS), de apenas os genes PDS e ZDS gerou fotobranqueamento extenso nas folhas, enquanto com o silenciamento do gene PSY, foi observado fotobranqueamento parcial. Para os genes das etapas finais da via de carotenoides, β OH e ZEP não foi observado fotobranqueamento (ZHOU *et al.*, 2018).

Mutantes *pds3* de *Arabidopsis* apresentaram fenótipo albino e anão e alta acumulação de fitoeno; a aplicação de ácido giberélico (GA3) endógeno restaurou parcialmente o fenótipo anão, sugerindo que essa alteração foi consequência da deficiência de giberelina (GA), possivelmente em função da perturbação da rota de carotenoides. Análises de microarray e RT-qPCR (do inglês: Real-Time Quantitative Reverse Transcription PCR) mostraram que a interrupção do gene PDS3 resultou em alterações na expressão gênica envolvidas em pelo menos 20 vias metabólicas, incluindo a inibição de muitos genes nas vias de biossíntese de carotenoides, clorofila e GA (QIN *et al.*, 2007).

O cDNA de genes da rota biossintética dos carotenoides (PSY, PDS, ZDS, PTOX, LCY-E, CRTR-B, ZEP e VDE) de *C. canephora* foram identificados em 2008, juntamente com dois membros da família da desoxigenase de clivagem de carotenoides (NCED3 e CCD1) e várias fibrilinas diferentes envolvidas no sequestro de carotenoides (FBI) (SIMKIN *et al.*, 2008).

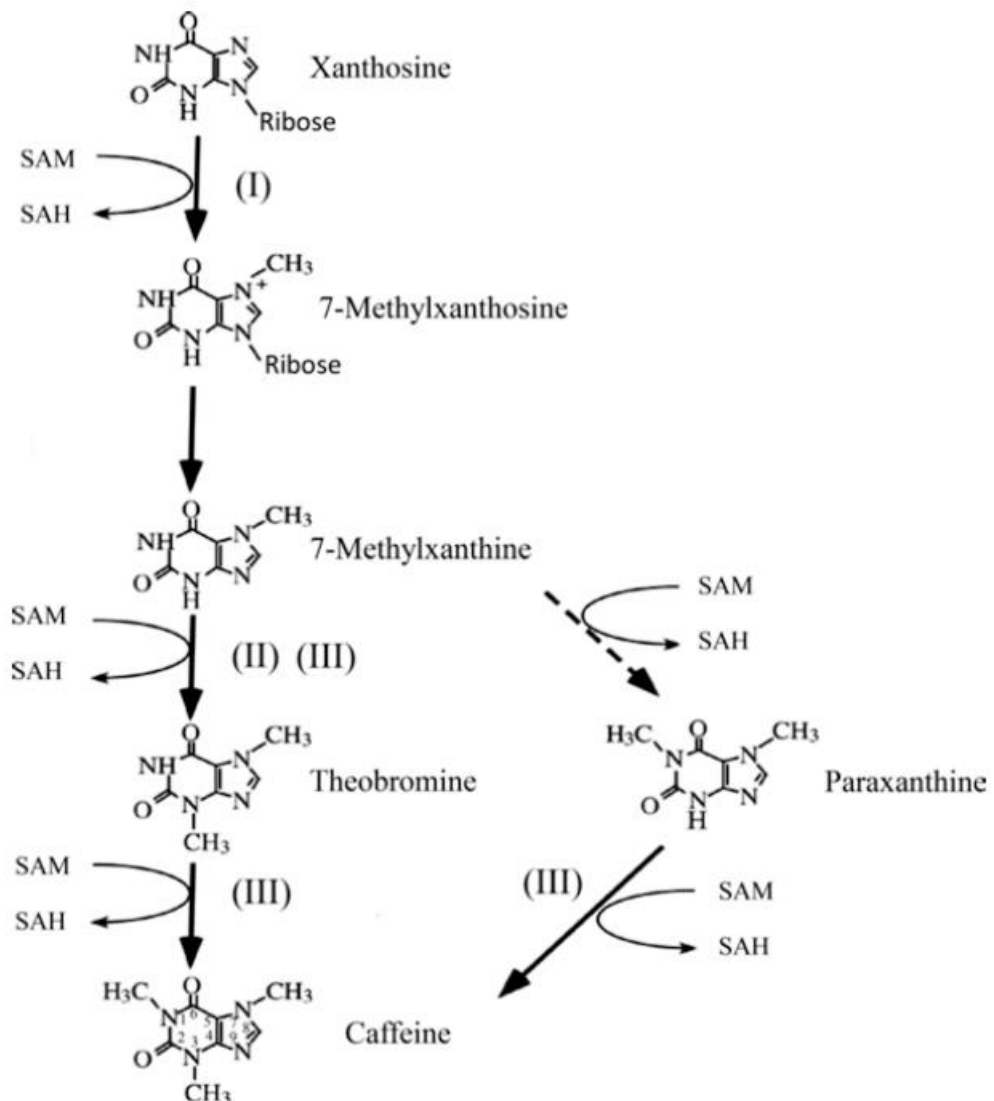
2.8 Biossíntese de cafeína e o café descafeinado

A cafeína (1,3,7-metilxantina) é um alcaloide púrico, um dos mais consumidos no mundo devido a suas atividades biológicas e efeitos como aumento da capacidade de alerta e redução da fadiga, o que resulta em melhor desempenho em atividades que exijam maior vigilância. Efeitos negativos também podem vir a ser observados como redução do controle motor e da qualidade do sono, além de poder causar irritabilidade em indivíduos com quadro de ansiedade (DE MARIA; MOREIRA, 2007).

Este é um composto que é sintetizado em grandes quantidades em um número reduzido de espécies dos gêneros: *Camellia*, *Coffea*, *Theobroma*, *Paullinia*, *Ilex* e *Cola*. A principal via

de biossíntese da cafeína (figura 1.6) consiste em três etapas de metilação e inicia-se pela conversão de xantosina a 7-metilxantosina pela enzima xantosina-N7-metiltransferase (XMT), a primeira exclusiva desta via. Esta enzima metila exclusivamente a xantosina na posição N7, apresentando alta similaridade entre as demais proteínas da mesma rota e os demais membros da família gênica. A sequência do gene que a codifica foi identificada em *C. arabica* em 1998 (KATO; NAKAYAMA, 2017; MOISYADI; NEUPANE; STILES, 1998).

Figura 1.6 – Rota de biossíntese de teobromina e cafeína em chá e café.



Legenda: Setas sólidas indicam a principal via de biossíntese. **I**: 7-Metilxantosina sintase [xantosina metiltransferase (XMT)], **II**: teobromina sintase [7-metilxantina metiltransferase (MXMT)], **III**: cafeína sintase [3,7-dimetilxantina metiltransferase (DXMT)]. SAM: S-adenosilmetionina; HAS: S-adenosilhomocisteína.

Fonte: KATO; NAKAYAMA (2017).

O gene que codifica a MXMT foi isolado e identificado em 2001, em *C. arabica*, esta catalisa o segundo passo de metilação da rota para produzir teobromina. Este apresenta uma similaridade com a cafeína-sintase do chá (35,8%) e a metiltransferase do ácido salicílico (34,1%) (OGAWA *et al.*, 2001). A terceira reação de metilação é realizada pela cafeína sintase, ou 3,7-dimetilxantina metiltransferase (DXMT), cuja sequência gênica em *C. canephora* foi clonada em 2007 (MCCARTHY *et al.*, 2007).

A partir do conhecimento dessas enzimas e suas sequências gênicas em cafeeiro, abre-se portas para a utilização de técnicas de DNA recombinante e silenciamento gênico para a obtenção de plantas de café sem cafeína, eliminando a necessidade de utilização de métodos químicos para a obtenção desse tipo de produto. Uma abordagem oposta também pode ser aplicável, uma vez que a cafeína é um composto muito utilizado na indústria cosmética e alimentícia e a obtida naturalmente não é suficiente para suprir este mercado, necessitando de produção sintética (MAZZAFERA, 2012; OGAWA *et al.*, 2001).

A popularidade do café como bebida se deve às propriedades estimulantes da cafeína. No entanto, um mercado para café descafeinado começou a se desenvolver quando problemas de saúde pareciam estar relacionados ao consumo de cafeína. Os processos de descafeinação utilizados podem alterar as propriedades sensoriais e a concentração dos compostos bioativos presentes na bebida do café. Ainda assim, o café descafeinado torrado é um produto de valor agregado que passou a se tornar uma categoria importante no mercado recentemente, estando entre os produtos que apresentam maiores vantagens competitivas (ABRAHÃO *et al.*, 2008; MAZZAFERA, 2012; TOROK; MIZIK; JAMBOR, 2018).

Ao longo do último século, diversos solventes foram utilizados para a obtenção de café descafeinado, sendo que os quatro em operação atualmente são: diclorometano (DCM), água, acetato de etila (EA) e dióxido de carbono, este último podendo ser utilizado tanto em sua forma supercrítica (scCO₂) quanto líquida (liCO₂). O processo ideal seria aquele em que a cafeína é removida das células do grão sem causar nenhuma outra alteração, mas devido à natureza da molécula e a sua localização celular, isso pode ser uma grande dificuldade. Os efeitos indesejados nesse processo podem ser a perda de aroma ou moléculas precursoras, alterações na estrutura, tamanho e aparência dos grãos, perda de massa e a presença de solventes residuais (PIETSCH, 2017).

Algumas alternativas para a obtenção de uma bebida descafeinada que não dependa destes processos químicos já foram relatadas. Acessos de *C. arabica* provenientes da Etiópia que apresentam quase nenhuma cafeína foram identificados pelo Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), nestas plantas foi identificado um acúmulo de teobromina, precursor imediato

da cafeína, o que pode indicar uma possível deficiência da enzima DXMT; esta característica poderia ser introduzida em variedades comerciais através de hibridação intraespecífica, mas este é um processo bastante lento, podendo levar mais de 30 anos (SILVAROLLA; MAZZAFERA; FAZUOLI, 2004). Também é conhecido o mutante Laurina de *C. arabica*, que apresenta cerca de metade (0,6%) do teor de cafeína de outras variedades da mesma espécie (em torno de 1,2%) (CARVALHO; TANGO; MONACO, 1965), entretanto este mutante também apresenta diversos problemas de desenvolvimento e produtividade muito baixa (KRUG; CARVALHO; ANTUNES FILHO, 1954). A utilização de tecnologias de silenciamento gênico pode ser uma alternativa para acelerar este processo. Através da repressão da expressão do gene *CaMXMT1* em *C. canephora*, foi possível obter plantas com redução de até 70% no conteúdo de cafeína, em folhas. Tais resultados indicam que pode ser viável produzir grãos intrinsecamente deficientes em cafeína (OGITA *et al.*, 2003a).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHÃO, Sheila Andrade; PEREIRA, Rosemary Gualberto Fonseca Alvarenga; LIMA, Adriene Ribeiro; FERREIRA, Eric Batista; MALTA, Marcelo Ribeiro. Compostos bioativos em café integral e descafeinado e qualidade sensorial da bebida. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 12, p. 1799–1804, 2008. DOI: 10.1590/S0100-204X2008001200022.

ALBUQUERQUE, Érika V. S. *et al.* Seed-Specific Stable Expression of the α -AI1 Inhibitor in Coffee Grains and the *In Vivo* Implications for the Development of the Coffee Berry Borer. **Tropical plant biology**, v. 8, n. 3–4, p. 98–107, 2015.

ALVES, Gabriel Sergio Costa *et al.* Differential fine-tuning of gene expression regulation in coffee leaves by CcDREB1D promoter haplotypes under water deficit. **Journal of Experimental Botany**, v. 68, n. 11, p. 3017–3031, 2017.

ARROYO-HERRERA, A. *et al.* Expression of WUSCHEL in *Coffea canephora* causes ectopic morphogenesis and increases somatic embryogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, [S. l.], v. 94, n. 2, p. 171–180, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11240-008-9401-1>

ARROYO-HERRERA, A.; KU GONZALEZ, A.; CANCHE MOO, R.; QUIROZ-FIGUEROA, F. R.; LOYOLA-VARGAS, V. M.; RODRIGUEZ-ZAPATA, L. C.; BURGEFF D'HONDT, C.; SUÁREZ-SOLÍS, V. M.; CASTAÑO, E. Expression of WUSCHEL in *Coffea canephora* causes ectopic morphogenesis and increases somatic embryogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 94, n. 2, p. 171–180, 2008. DOI: 10.1007/s11240-008-9401-1.

BARRETO, Horlyls Gomes *et al.* In Silico and Quantitative Analyses of the Putative FLC-like Homologue in Coffee (*Coffea arabica* L.). **Plant Molecular Biology Reporter**, [S. l.], v. 30, n. 1, p. 29–35, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11105-011-0310-9>. Acesso em: 20 jul. 2020.

BARTON, C. R.; ADAMS, T. L.; ZARWITZ, M. A. Stable transformation of foreign DNS into *Coffea arabica* plants. In: **Colloque Scientifique International Sur Le Café**, 14. San Francisco (Estados Unidos), Juillet 14-19, 1991.. 1991, Anais [...]. [s.l: s.n.]

BARTOS, Patrícia Monah Cunha. **Embriogênese Somática Do Cafeeiro (*Coffea arabica* L.) E Caracterização Bioquímica E Anatômica Das Diferentes Etapas Envolvidas**. 2012. Universidade de Brasília, 2012.

BELHAJ, Khaoula; CHAPARRO-GARCIA, Angela; KAMOUN, Sophien; NEKRASOV, Vladimir. Plant genome editing made easy: targeted mutagenesis in model and crop plants using the CRISPR/Cas system. **Plant Methods**, v. 9, n. 1, p. 39, 2013. DOI: 10.1186/1746-4811-9-39.

BERNARD, Guillaume; GAGNEUL, David; DOS SANTOS, Harmony Alves; ETIENNE, Audrey; HILBERT, Jean Louis; RAMBAUD, Caroline. Efficient genome editing using CRISPR/Cas9 technology in chicory. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 5, 2019. DOI: 10.3390/ijms20051155.

BRAGANÇA, Scheilla Marina; DE CARVALHO, Carlos Henrique Siqueira; DA FONSECA, Aymbiré Francisco Almeida; FERRÃO, Romário Gava. Variedades clonais de café Conilon

para o Estado do Espírito Santo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, n. 5, p. 765–770, 2001. DOI: 10.1590/S0100-204X2001000500006.

BREITLER, Jean Christophe; DECHAMP, Eveline; CAMPA, Claudine; ZEBRAL RODRIGUES, Leonardo Augusto; GUYOT, Romain; MARRACCINI, Pierre; ETIENNE, Hervé. CRISPR/Cas9-mediated efficient targeted mutagenesis has the potential to accelerate the domestication of *Coffea canephora*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 134, n. 3, p. 383–394, 2018. DOI: 10.1007/s11240-018-1429-2.

CAMPOS, Nádia A.; PANIS, Bart; CARPENTIER, Sebastien C. Somatic Embryogenesis in Coffee: The Evolution of Biotechnology and the Integration of Omics Technologies Offer Great Opportunities. **Frontiers in Plant Science**, [S. l.], v. 8, n. August, p. 1–12, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01460>

CANCHE-MOO, R. L. R.; KU-GONZALEZ, A.; BURGEFF, C.; LOYOLA-VARGAS, V. M.; RODRÍGUEZ-ZAPATA, L. C.; CASTAÑO, E. Genetic transformation of *Coffea canephora* by vacuum infiltration. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 84, n. 3, p. 373–377, 2006. DOI: 10.1007/s11240-005-9036-4.

CARVALHO, A. Distribuição geográfica e classificação botânica do gênero *Coffea* com referência especial a espécie arábica, 5: Origem e classificação botânica do *C. arabica* L. **Boletim da Superintendencia dos Servicos do Café (Brasil)** v. 21 (230) p. 174-184, 1946.

CARVALHO, A.; TANGO, J. S.; MONACO, L. C. Genetic Control of the Caffeine Content of Coffee. **Nature**, [S. l.], v. 205, n. 4968, p. 314–314, 1965. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/205314a0>. Acesso em: 27 jul. 2020.

CARVALHO, Carlos Henrique Siqueira de *et al.* Características agrônômicas e morfológicas de cafeeiro “Catuaí Vermelho” propagado por embriogênese somática. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, [S. l.], v. 46, n. 4, p. 378–383, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2011000400006>. Acesso em: 20 jul. 2020.

CHARRIER, André; BERTHAUD, Julien. Botanical classification of coffee. In: **Coffee**. [s.l.] : London : Croom Helm, c1985., 1985. p. 13–47. DOI: 10.1007/978-1-4615-6657-1. Disponível em: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201302691785>. Acesso em: 10 ago. 2017.

CHEN, Fuqiang; PRUETT-MILLER, Shondra M.; HUANG, Yuping; GJOKA, Monika; DUDA, Katarzyna; TAUNTON, Jack; COLLINGWOOD, Trevor N.; FRODIN, Morten; DAVIS, Gregory D. High-frequency genome editing using ssDNA oligonucleotides with zinc-finger nucleases. **Nature Methods**, v. 8, n. 9, p. 753–755, 2011. DOI: 10.1038/nmeth.1653. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21765410>. Acesso em: 11 ago. 2017.

CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira: café**. V. 6 – Safra 2020 – N.1 – Primeiro levantamento, Brasília, p. 1-62, Janeiro 2020. ISSN 2318-7913. Disponível em: <http://www.conab.gov.br>.

CONG, Le *et al.* Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. **Science**, v. 339, n. 6121, p. 819–823, 2013. DOI: 10.1126/science.1231143.

DAGLA, H. R. Plant tissue culture. **Resonance**, v. 17, n. 8, p. 759–767, 2012. DOI: 10.1007/s12045-012-0086-8. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s12045-012-0086-8>. Acesso em: 21 jan. 2016.

DAVIS, Aaron P.; GOVAERTS, Rafael; BRIDSON, Diane M.; STOFFELEN, Piet. An annotated taxonomic conspectus of the genus *Coffea* (Rubiaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 152, n. 4, p. 465–512, 2006. DOI: 10.1111/j.1095-8339.2006.00584.x. Disponível em: <https://academic.oup.com/botlinnean/article-lookup/doi/10.1111/j.1095-8339.2006.00584.x>. Acesso em: 12 maio. 2017.

DAVIS, Aaron P.; TOSH, James; RUCH, Nicolas; FAY, Michael F. Growing coffee: *Psilanthus* (Rubiaceae) subsumed on the basis of molecular and morphological data; implications for the size, morphology, distribution and evolutionary history of *Coffea*. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 167, n. 4, p. 357–377, 2011. DOI: 10.1111/j.1095-8339.2011.01177.x. Disponível em: <https://academic.oup.com/botlinnean/article-lookup/doi/10.1111/j.1095-8339.2011.01177.x>. Acesso em: 14 maio. 2017.

DE MARIA, Carlos A. B.; MOREIRA, Ricardo F. A. Caféina: Revisão sobre métodos de análise. **Química Nova**. SBQ, 2007. DOI: 10.1590/S0100-40422007000100021.

DEMIRCI, Yeliz; ZHANG, Baohong; UNVER, Turgay. CRISPR/Cas9: An RNA-guided highly precise synthetic tool for plant genome editing. **Journal of Cellular Physiology**, v. 233, n. 3, p. 1844–1859, 2018. DOI: 10.1002/jcp.25970.

DU, Hongyang; ZENG, Xuanrui; ZHAO, Meng; CUI, Xiaopei; WANG, Qing; YANG, Hui; CHENG, Hao; YU, Deyue. Efficient targeted mutagenesis in soybean by TALENs and CRISPR/Cas9. **Journal of Biotechnology**, v. 217, p. 90–97, 2016. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2015.11.005.

DUCOS, J. P.; ALENTON, R.; REANO, J. F.; KANCHANOMAI, C.; DESHAYES, A.; PÉTIARD, V. Agronomic performance of *Coffea canephora* P. trees derived from large-scale somatic embryo production in liquid medium. **Euphytica**, [S. l.], v. 131, n. 2, p. 215–223, 2003. DOI: 10.1023/A:1023915613158.

DUCOS, Jean-Paul; LAMBOT, Charles; PÉTIARD, Vincent. Bioreactors for coffee mass propagation by somatic embryogenesis. **International Journal of plant developmental biology**, [S. l.], v. 1, n. 1, p. 1–12, 2007.

ETIENNE, Hervé *et al.* Coffee Somatic Embryogenesis: How Did Research, Experience Gained and Innovations Promote the Commercial Propagation of Elite Clones From the Two Cultivated Species? **Frontiers in Plant Science**, [S. l.], v. 9, n. November, p. 1–21, 2018. DOI: 10.3389/fpls.2018.01630. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2018.01630/full>.

FAN, Di; LIU, Tingting; LI, Chaofeng; JIAO, Bo; LI, Shuang; HOU, Yishu; LUO, Keming. Efficient CRISPR/Cas9-mediated Targeted Mutagenesis in *Populus* in the First Generation. **Scientific reports**, v. 5, p. 12217, 2015. DOI: 10.1038/srep12217. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26193631>.

FEHÉR, Attila; BERNULA, Dóra; GÉMES, Katalin. The Many Ways of Somatic Embryo Initiation. In: **Somatic Embryogenesis: Fundamental Aspects and Applications**. Cham: Springer International Publishing, 2016. p. 23–37. DOI: 10.1007/978-3-319-33705-0. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-33705-0_3. Acesso em: 12 maio. 2017.

FENG, Zhengyan *et al.* Multigeneration analysis reveals the inheritance, specificity, and

patterns of CRISPR/Cas-induced gene modifications in *Arabidopsis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 12, p. 4632–4637, 2014.

FERRÃO, M. A. G. *et al.* Comportamento de clones promissores de café conilon em condição de déficit hídrico e irrigação. [S. l.], 2009. Disponível em: <https://biblioteca.incaper.es.gov.br/digital/handle/123456789/3702>. Acesso em: 28 jul. 2020.

FERRÃO, M. A. G.; FERRÃO, R. G.; FONSECA, A. F. A. da.; VERDIN FILHO, A. C.; VOLPI, P. S. Origin, geographical dispersion, taxonomy and genetic diversity of *Coffea canephora*. In: FERRÃO, Romário Gava; FONSECA, Aymbiré Francisco Almeida Da; FERRÃO, Maria Amélia Gava; MUNER, Lúcio Herzog De (org.). **Conilon Coffee**. 3 edition updated and expanded. 3. ed. Vitória, ES: Incaper, 2019. a. p. 85–109.

FERRÃO, R. G. *et al.* Divergência genética entre clones de *Coffea canephora* utilizando marcadores moleculares. In: 2014, **Anais [...]**. : In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 5., 2009, Guarapari. O ..., 2014.

FERRÃO, R. G.; FERRÃO, M. A. G.; FONSECA, A. F. A. da.; VOLPI, P. S.; VERDIN FILHO, A. C.; PACOVA, B. E. V.; FERRÃO, L. F. V. *Coffea canephora* breeding. In: FERRÃO, R. G. .. FONSECA, A. F. A. da. .. FERRÃO, M. A. G. .. DE MUNER, L. H. (Ed. .. (org.). **Conilon Coffee**. 3. ed. Vitória, ES: Incaper, 2019. p. 145–201.

FERRÃO, Romário Gava *et al.* Comportamento de clones elites de café conilon em condições de alta tecnologia no estado do Espírito Santo. [S. l.], 2000.

FERRÃO, Romário Gava; FONSECA, Aymbiré Francisco Almeida Da; FERRÃO, Maria Amélia Gava; MUNER, Lúcio Herzog De. *Coffea canephora*. In: FERRÃO, R. G.; FONSECA, A. F. A. da.; FERRÃO, M. A. G.; DE MUNER, L. H. (org.). **Café Conilon**. 2. ed. Vitória, ES: Incaper, 2016. p. 786.

FERRÃO, Romário Gava; FONSECA, Aymbiré Francisco Almeida Da; FERRÃO, Maria Amélia Gava; MUNER, Lúcio Herzog De. *Coffea canephora*. In: FERRÃO, R. G.; FONSECA, A. F. A. da.; FERRÃO, M. A. G.; DE MUNER, L. H. (org.). **Conilon Coffee**. 3. ed. Vitória, ES: Incaper, 2019. b. p. 974.

FREITAS, Natália Chagas *et al.* In silico and in vivo analysis of ABI3 and VAL2 genes during somatic embryogenesis of *Coffea arabica*: competence acquisition and developmental marker genes. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, [S. l.], v. 137, n. 3, p. 599–611, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11240-019-01594-7>. Acesso em: 20 jul. 2020.

FRIEDLAND, Ari E.; TZUR, Yonatan B.; ESVELT, Kevin M.; COLAIÁCOVO, Monica P.; CHURCH, George M.; CALARCO, John A. Heritable genome editing in *C. elegans* via a CRISPR-Cas9 system. **Nature methods**, v. 10, n. 8, p. 741–743, 2013.

GAJ, Thomas; GERSBACH, Charles A.; BARBAS, Carlos F. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. **Trends in Biotechnology**, v. 31, n. 7, p. 397–405, 2013. DOI: 10.1016/j.tibtech.2013.04.004. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167779913000875>. Acesso em: 15 maio. 2017.

GAMBOA-BECERRA; HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ; GONZÁLEZ-RÍOS; SUÁREZ-QUIROZ; GÁLVEZ-PONCE; ORDAZ-ORTIZ; WINKLER. Metabolomic Markers for the Early Selection of *Coffea canephora* Plants with Desirable Cup Quality Traits. **Metabolites**,

[S. l.], v. 9, n. 10, p. 214, 2019. DOI: 10.3390/metabo9100214. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2218-1989/9/10/214>. Acesso em: 10 abr. 2020.

GELVIN, Stanton B. *Agrobacterium*-Mediated Plant Transformation: the Biology behind the “Gene-Jockeying” Tool. **Microbiology and molecular biology reviews** : MMBR, v. 67, n. 1, p. 16–37, table of contents, 2003. DOI: 10.1128/MMBR.67.1.16-37.2003. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12626681>. Acesso em: 12 maio. 2017.

GERMANÀ, Maria Antonietta; WALKER, John M. **In Vitro Embryogenesis in Higher Plants**. New York, NY: Springer New York, 2016. v. 1359 DOI: 10.1007/978-1-4939-3061-6. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-3061-6>.

GUAN, Yuan; LI, Shui-Gen; FAN, Xiao-Fen; SU, Zhen-Hong. Application of somatic embryogenesis in woody plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 07, n. June, p. 1–12, 2016. DOI: 10.3389/fpls.2016.00938. Disponível em: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fpls.2016.00938/abstract>.

HANSEN, G. Recent advances in the transformation of plants. **Trends in Plant Science**, v. 4, n. 6, p. 226–231, 1999. DOI: 10.1016/S1360-1385(99)01412-0. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1360138599014120>. Acesso em: 9 jan. 2016.

HATANAKA, T.; CHOI, Y. E.; KUSANO, T.; SANO, H. Transgenic plants of coffee *Coffea canephora* from embryogenic callus via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. **Plant Cell Reports**, v. 19, n. 2, p. 106–110, 1999. DOI: 10.1007/s002990050719. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s002990050719>. Acesso em: 12 maio. 2017.

HOLZBERG, Steve; BROSIO, Paul; GROSS, Cynthia; POGUE, Gregory P. Barley stripe mosaic virus-induced gene silencing in a monocot plant. **Plant Journal**, v. 30, n. 3, p. 315–327, 2002. DOI: 10.1046/j.1365-313X.2002.01291.x.

HORVATH, Philippe; BARRANGOU, Rodolphe. CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. **Science (New York, N.Y.)**, [S. l.], v. 327, n. 5962, p. 167–170, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.1179555>. Acesso em: 28 jul. 2020.

HWANG, Woong Y.; FU, Yanfang; REYON, Deepak; MAEDER, Morgan L.; TSAI, Shengdar Q.; SANDER, Jeffry D.; PETERSON, Randall T.; YEH, J. R. Joanna; JOUNG, J. Keith. Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. **Nature biotechnology**, v. 31, n. 3, p. 227–229, 2013.

JAO, Li En; WENTE, Susan R.; CHEN, Wenbiao. Efficient multiplex biallelic zebrafish genome editing using a CRISPR nuclease system. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 34, p. 13904–13909, 2013. DOI: 10.1073/pnas.1308335110.

JEONG, Rae-Dong; HWANG, Sung-Hyun; KANG, Sung-Hwan; CHOI, Hong-Soo; PARK, Jin-Woo; KIM, Kook-Hyung. Virus-induced gene silencing as tool for functional genomics in a *Glycine max*. **The Plant Pathology Journal**, v. 21, n. 2, p. 158–163, 2005.

JIA, Hongge; WANG, Nian. Xcc-facilitated agroinfiltration of citrus leaves: a tool for rapid functional analysis of transgenes in citrus leaves. **Plant cell reports**, v. 33, n. 12, p. 1993–2001, 2014.

JIANG, Wenyan; BIKARD, David; COX, David; ZHANG, Feng; MARRAFFINI, Luciano A. RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. **Nature biotechnology**, v. 31, n. 3, p. 233–239, 2013a.

JIANG, Wenzhi; ZHOU, Huanbin; BI, Honghao; FROMM, Michael; YANG, Bing; WEEKS, Donald P. Demonstration of CRISPR/Cas9/sgRNA-mediated targeted gene modification in *Arabidopsis*, tobacco, sorghum and rice. **Nucleic acids research**, v. 41, n. 20, p. e188–e188, 2013b.

JINEK, M.; CHYLINSKI, K.; FONFARA, I.; HAUER, M.; DOUDNA, J. A.; CHARPENTIER, E. A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. **Science**, v. 337, n. 6096, p. 816–821, 2012. DOI: 10.1126/science.1225829.

KAHIA, Jane; MANTELL, Sinclair. High-frequency Direct Somatic Embryogenesis and Plantlet Regeneration from Leaves Derived from *In Vitro*-Germinated Seedlings of a *Coffea arabica* Hybrid Cultivar. **HortScience**, v. 51, n. 9, p. 1148–1152, 2016. DOI: 10.21273/HORTSCI10771-16.

KAHIA, Jane; MANTELL, Sinclair. High-frequency Direct Somatic Embryogenesis and Plantlet Regeneration from Leaves Derived from In Vitro-Germinated Seedlings of a *Coffea arabica* Hybrid Cultivar. **HortScience**, [S. l.], v. 51, n. 9, p. 1148–1152, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.21273/HORTSCI10771-16>

KATO, Misako; NAKAYAMA, Fumiyo. Caffeine. **Biotechnology of Natural Products**, p. 131–143, 2017. DOI: 10.1007/978-3-319-67903-7_6.

KAUR, Navneet; ALOK, Anshu; SHIVANI; KAUR, Navjot; PANDEY, Pankaj; AWASTHI, Praveen; TIWARI, Siddharth. CRISPR/Cas9-mediated efficient editing in phytoene desaturase (PDS) demonstrates precise manipulation in banana cv. Rasthali genome. **Functional and Integrative Genomics**, v. 18, n. 1, p. 89–99, 2018. DOI: 10.1007/s10142-017-0577-5.

KIM, H.; KIM, J. S. A guide to genome engineering with programmable nucleases. **Nat Rev Genet**, v. 15, n. 5, p. 321–334, 2014. DOI: 10.1038/nrg3686. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24690881>.

KOSCHMIEDER, Julian; FEHLING-KASCHEK, Mirjam; SCHAUB, Patrick; GHISLA, Sandro; BRAUSEMANN, Anton; TIMMER, Jens; BEYER, Peter. Plant-type phytoene desaturase: Functional evaluation of structural implications. **PLoS ONE**, v. 12, n. 11, p. 1–26, 2017. DOI: 10.1371/journal.pone.0187628.

KRUG, C. A.; CARVALHO, A.; ANTUNES FILHO, H. Genética de *Coffea*: XXI. Hereditariedade dos característicos de *Coffea arabica* L. var. *laurina* (Smeathman) DC. **Bragantia**, [S. l.], v. 13, n. unico, p. 247–255, 1954. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0006-87051954000100021>. Acesso em: 27 jul. 2020.

KUMAR, Avinash; SIMMI, P. S.; GIRIDHAR, Parvatam. Cell wall remodelling involving galactomannan de-branching influence *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Coffea canephora* somatic embryos. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 134, n. 3, p. 369–382, 2018. DOI: 10.1007/s11240-018-1428-3.

KUMAR, Vinay; JAIN, Mukesh. The CRISPR–Cas system for plant genome editing: advances and opportunities. **Journal of Experimental Botany**, v. 66, n. 1, p. 47–57, 2015. DOI:

10.1093/jxb/eru429. Disponível em: <https://academic.oup.com/jxb/article-lookup/doi/10.1093/jxb/eru429>. Acesso em: 15 fev. 2020.

KUMAR, Vinod; SATYANARAYANA, K. V.; SARALA ITTY, S.; INDU, E. P.; GIRIDHAR, P.; CHANDRASHEKAR, A.; RAVISHANKAR, G. A. Stable transformation and direct regeneration in *Coffea canephora* P ex. Fr. by *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation without hairy-root phenotype. **Plant Cell Reports**, v. 25, n. 3, p. 214–222, 2006. DOI: 10.1007/s00299-005-0045-x. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00299-005-0045-x>. Acesso em: 12 maio. 2017.

KUMAR, Vinod; SATYANARAYANA, K. V.; SARALA ITTY, S.; INDU, E. P.; GIRIDHAR, P.; CHANDRASHEKAR, A.; RAVISHANKAR, G. A. Stable transformation and direct regeneration in *Coffea canephora* P ex. Fr. by *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation without hairy-root phenotype. **Plant Cell Reports**, [S. l.], v. 25, n. 3, p. 214–222, 2006. DOI: 10.1007/s00299-005-0045-x. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00299-005-0045-x>. Acesso em: 12 maio. 2017.

LI, Jian-Feng Feng; NORVILLE, Julie E.; AACH, John; MCCORMACK, Matthew; ZHANG, Dandan; BUSH, Jenifer; CHURCH, George M.; SHEEN, Jen. Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana* using guide RNA and Cas9. **Nature biotechnology**, v. 31, n. 8, p. 688–691, 2013. DOI: 10.1038/nbt.2654.

LIVRAMENTO, D. E. Do. Morfologia e fisiologia do cafeeiro. **Café arábica: do plantio à colheita**. Lavras: EPAMIG, p. 87–161, 2010.

LOYOLA-VARGAS, Víctor M.; AVILEZ-MONTALVO, Johny R.; AVILÉS-MONTALVO, Randy N.; MÁRQUEZ-LÓPEZ, Ruth E.; GALAZ-ÁVALOS, Rosa M.; MELLADO-MOJICA, Erika. Somatic Embryogenesis in *Coffea* spp. In: **Somatic Embryogenesis: Fundamental Aspects and Applications**. Cham: Springer International Publishing, 2016. p. 241–266. DOI: 10.1007/978-3-319-33705-0_15. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-33705-0_15. Acesso em: 12 maio. 2017.

LOYOLA-VARGAS, Víctor M.; OCHOA-ALEJO, Neftalí. Somatic Embryogenesis. An Overview. In: **Somatic Embryogenesis: Fundamental Aspects and Applications**. Cham: Springer International Publishing, 2016. p. 1–8. DOI: 10.1007/978-3-319-33705-0. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-33705-0_1. Acesso em: 11 maio. 2017.

MAKAROVA, Kira S.; KOONIN, Eugene V. Annotation and Classification of CRISPR-Cas Systems. In: Lundgren M., Charpentier E., Fineran P. (eds) **CRISPR. Methods in Molecular Biology**, vol 1311. Humana Press, New York, NY; p. 47–75. DOI: 10.1007/978-1-4939-2687-9_4. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-2687-9_4. Acesso em: 15 maio. 2017.

MALI, P.; YANG, L.; ESVELT, K. M.; AACH, J.; GUELL, M.; DICARLO, J. E.; NORVILLE, J. E.; CHURCH, G. M. RNA-Guided Human Genome Engineering via Cas9. **Science**, v. 339, n. 6121, p. 823–826, 2013. DOI: 10.1126/science.1232033. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23287722>. Acesso em: 11 ago. 2017.

MARTINS, Ana Luiza. **História do café**. [s.l.] : Editora contexto, 2012.

MAZZAFERA, Paulo. Which is the by-product: Caffeine or decaf coffee? **Food and Energy**

Security, v. 1, n. 1, p. 70–75, 2012. DOI: 10.1002/fes3.4. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/fes3.4>. Acesso em: 15 fev. 2020.

MCCARTHY, Andrew A.; BIGET, Laurent; LIN, Chenwei; PETIARD, Vincent; TANKSLEY, Steve D.; MCCARTHY, James G. Cloning, expression, crystallization and preliminary X-ray analysis of the XMT and DXMT N-methyltransferases from *Coffea canephora* (robusta). **Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications**, v. 63, n. 4, p. 304–307, 2007. DOI: 10.1107/S1744309107009268.

MISHRA, M. K.; SLATER, A. Recent advances in the genetic transformation of coffee. **Biotechnology research international**, v. 2012, n. 1995, p. 580857, 2012. DOI: 10.1155/2012/580857.

MOHANAN, Shibin; SATYANARAYANA, Kandukuri V; SRIDEVI, V.; GOWDA, Kalpashree; GIRIDHAR, Parvatam; CHANDRASHEKAR, Arun; RAVISHANKAR, Gokare A. Evaluating the effect and effectiveness of different constructs with a conserved sequence for silencing of *Coffea canephora* N-methyltransferases. **Journal of plant biochemistry and biotechnology**, v. 23, n. 4, p. 399–409, 2014.

MOISYADI, S.; NEUPANE, K. R.; STILES, J. I. Cloning And Characterization Of A Cdna Encoding Xanthosine-N7-Methyltransferase From Coffee (*Coffea Arabica*). **Acta Horticulturae**, v. 461, n. 461, p. 367–378, 1998. DOI: 10.17660/ActaHortic.1998.461.42. Disponível em: https://www.actahort.org/books/461/461_42.htm. Acesso em: 16 fev. 2020.

MONDEGO, Jorge MC *et al.* An EST-based analysis identifies new genes and reveals distinctive gene expression features of *Coffea arabica* and *Coffea canephora*. **BMC Plant Biology**, v. 11, n. 1, p. 30, 2011. DOI: 10.1186/1471-2229-11-30. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21303543>. Acesso em: 15 maio. 2017.

MORAIS, T. P.; LUZ, J. M. Q.; SILVA, S. M.; RESENDE, R. F.; SILVA, A. S. Aplicações da cultura de tecidos em plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v. 14, n. 1, p. 110–121, 2012. DOI: 10.1590/S1516-05722012000100016.

NEPONUCENO, Alexandre. **CRISPR Cas9 marca evolução do melhoramento genético**. [s. l.], 2020. Disponível em: <https://croplifebrasil.org/noticias/crispr-cas9-melhoramento-genetico/>. Acesso em: 28 jul. 2020.

NETO, Sebastião Pedro da Silva; ANDRADE, Solange Rocha Monteiro De. Cultura de tecidos vegetais: princípios e aplicações. In: FALEIRO, Fábio Gelape; ANDRADE, Solange Rocha Monteiro De (org.). **Biotecnologia: estado da arte e aplicações na agropecuária**. 1a edição ed. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2011. p. 409–434.

NEUENSCHWANDER, Beat; BAUMANN, Thomas W. A novel type of somatic embryogenesis in *Coffea arabica*. **Plant Cell Reports**, [S. l.], v. 10, n. 12, p. 608–612, 1992.

NIC-CAN, Geovanny I.; LÓPEZ-TORRES, Adolfo; BARREDO-POOL, Felipe; WROBEL, Kazimierz; LOYOLA-VARGAS, Víctor M.; ROJAS-HERRERA, Rafael; DE-LA-PEÑA, Clelia. New Insights into Somatic Embryogenesis: LEAFY COTYLEDON1, BABY BOOM1 and WUSCHEL-RELATED HOMEBOX4 Are Epigenetically Regulated in *Coffea canephora*. **PLoS ONE**, v. 8, n. 8, 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0072160.

OCAMPO, C. A.; MANZANERA, L. M. Advances in genetic manipulation of the coffee plant. In: 14. COLLOQUE SCIENTIFIQUE INTERNATIONAL SUR LE CAFE, SAN FRANCISCO (ETATS UNIS), 14-19 JUL 1991 1992, Anais [...]. : ASIC, 1992.

OGAWA, Mikihiro; HERAI, Yuka; KOIZUMI, Nozomu; KUSANO, Tomonobu; SANO, Hiroshi. 7-Methylxanthine Methyltransferase of Coffee Plants. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 11, p. 8213–8218, 2001. DOI: 10.1074/jbc.M009480200. Disponível em: <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M009480200>. Acesso em: 16 fev. 2020.

OGITA, Shinjiro; UEFUJI, Hirotaka; YAMAGUCHI, Yube; KOIZUMI, Nozomu; SANO, Hiroshi. Producing decaffeinated coffee plants. **Nature**, v. 423, n. 6942, p. 823–823, 2003. DOI: 10.1038/423823a. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/423823a>. Acesso em: 17 fev. 2020.

PIETSCH, Arne. Decaffeination-Process and Quality. In: **The Craft and Science of Coffee**. Elsevier Inc., 2017. p. 225–143. DOI: 10.1016/B978-0-12-803520-7.00010-4.

PRIYONO *et al.* Somatic embryogenesis and vegetative cutting capacity are under distinct genetic control in *Coffea canephora* Pierre. **Plant Cell Reports**, [S. l.], v. 29, n. 4, p. 343–357, 2010. DOI: 10.1007/s00299-010-0825-9.

QIN, Genji; GU, Hongya; MA, Ligeng; PENG, Yiben; DENG, Xing Wang; CHEN, Zhangliang; QU, Li Jia. Disruption of phytoene desaturase gene results in albino and dwarf phenotypes in *Arabidopsis* by impairing chlorophyll, carotenoid, and gibberellin biosynthesis. **Cell Research**, v. 17, n. 5, p. 471–482, 2007. DOI: 10.1038/cr.2007.40.

QUIROZ-FIGUEROA, F. R.; KÚ-RODRÍGUEZ, S. C.; LOYOLA-VARGAS, V. M. Patrón proteico extracelular durante la embriogénesis somática en suspensiones celulares de *Coffea arabica* L. **Revista de la Sociedad Química de México**, [S. l.], v. 46, n. 3, p. 259–263, 2002.

QUIROZ-FIGUEROA, Francisco; MIRIAM MONFORTE-GONZÁLEZ; GALAZ-ÁVALOS, Rosa M.; LOYOLA-VARGAS, Victor M. Direct Somatic Embryogenesis in *Coffea canephora*. **Plant Cell Culture Protocols**, [S. l.], v. 318, n. 4, p. 111–116, 2006.

RAN, F. Ann; HSU, Patrick D.; WRIGHT, Jason; AGARWALA, Vineeta; SCOTT, David A.; ZHANG, Feng. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc*, v. 8, n. 11, p. 2281–2308, 2013. DOI: 10.1038/nprot.2013.143.

REICHEL, Tharyn. Análise da expressão dos genes da subfamília DREB em resposta à seca em plantas de *Coffea canephora* Conilon. [S. l.], 2016. Disponível em: <http://www.sbicafe.ufv.br/handle/123456789/8474>. Acesso em: 28 jul. 2020.

RIBAS, A. F.; KOBAYASHI, A. K.; PEREIRA, L. F. P.; VIEIRA, L. G. E. Genetic transformation of *Coffea canephora* by particle bombardment. **Biologia Plantarum**, v. 49, n. 4, p. 493–497, 2005. DOI: 10.1007/s10535-005-0038-1.

RIBAS, Alessandra F.; DECHAMP, Eveline; CHAMPION, Anthony; BERTRAND, Benoît; COMBES, Marie-christine; VERDEIL, Jean-luc; LAPEYRE, Fabienne; LASHERMES, Philippe; ETIENNE, Hervé. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of *Coffea arabica* (L.) is greatly enhanced by using established embryogenic callus cultures. **BMC plant biology**, v. 11, n. 1, p. 92, 2011. DOI: 10.1186/1471-2229-11-92. Disponível em: <http://www.biomedcentral.com/1471-2229/11/92>.

RIVERA, Ana Leonor; GÓMEZ-LIM, Miguel; FERNÁNDEZ, Francisco; LOSKE, Achim M. Physical methods for genetic plant transformation. **Physics of Life Reviews**, v. 9, n. 3, p. 308–345, 2012. DOI: 10.1016/j.plrev.2012.06.002. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.plrev.2012.06.002>. Acesso em: 12 maio. 2017.

SAEED, Taiba; SHAHZAD, Anwar. Basic principles behind genetic transformation in plants. In: **Biotechnological Strategies for the Conservation of Medicinal and Ornamental Climbers**. [s.l.] : Springer International Publishing, 2015. p. 327–350. DOI: 10.1007/978-3-319-19288-8_13.

SAHIJRAM, Leela; BAHADUR, Bir. Somatic Embryogenesis. In: **Plant Biology and Biotechnology**. New Delhi: Springer India, 2015. p. 315–327. DOI: 10.1007/978-81-322-2283-5_15. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/978-81-322-2283-5_15. Acesso em: 14 maio. 2017.

SANFORD, John C. Biolistic plant transformation. **Physiologia Plantarum**, v. 79, n. 1, p. 206–209, 1990. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1990.tb05888.x. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1399-3054.1990.tb05888.x>. Acesso em: 15 maio. 2017.

SANFORD, John C.; KEIN, Theodore M.; WOLF, Edward D.; ALLEN, Nelson. Delivery of Substances Into Cells and Tissues Using a Particle Bombardment Process. **Particulate Science and Technology**, v. 5, n. 1, p. 27–37, 1987. DOI: 10.1080/02726358708904533. Disponível em: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/02726358708904533>. Acesso em: 15 maio. 2017.

SHAHZAD, Anwar; PARVEEN, Shahina; SHARMA, Shiwali; SHAHEEN, Arjumend; SAEED, Taiba; YADAV, Vikas; AKHTAR, Rakhshanda; AHMAD, Zishan; UPADHYAY, Anamica. Plant tissue culture: Applications in plant improvement and conservation. In: **Plant Biotechnology: Principles and Applications**. Springer Singapore, 2017. a. p. 37–72. DOI: 10.1007/978-981-10-2961-5_2.

SHAHZAD, Anwar; SHARMA, Shiwali; PARVEEN, Shahina; SAEED, Taiba; SHAHEEN, Arjumend; AKHTAR, Rakhshanda; YADAV, Vikas; UPADHYAY, Anamica; AHMAD, Zishan. Historical perspective and basic principles of plant tissue culture. In: **Plant Biotechnology: Principles and Applications**. Springer Singapore, 2017. b. p. 1–36. DOI: 10.1007/978-981-10-2961-5_1.

SHAO, Y.; ZHU, H. L.; TIAN, H. Q.; WANG, X. G.; LIN, X. J.; ZHU, B. Z.; XIE, Y. H.; LUO, Y. B. Virus-induced gene silencing in plant species. **Russian journal of plant physiology**, v. 55, n. 2, p. 168–174, 2008.

SILVA, Anderson Tadeu *et al.* Characterization of a Putative Serk-Like Ortholog in Embryogenic Cell Suspension Cultures of *Coffea arabica* L. **Plant Molecular Biology Reporter**, [S. l.], v. 32, n. 1, p. 176–184, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11105-013-0632-x>. Acesso em: 10 maio. 2016.

SILVA, Anderson Tadeu; BARDUCHE, Douglas; DO LIVRAMENTO, Kalynka Gabriella; LIGTERINK, Wilco; PAIVA, Luciano Vilela. Characterization of a Putative Serk-Like Ortholog in Embryogenic Cell Suspension Cultures of *Coffea arabica* L. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 32, n. 1, p. 176–184, 2013. DOI: 10.1007/s11105-013-0632-x. Disponível em: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84892479648&partnerID=tZOtx3y1>. Acesso em: 10 maio. 2016.

SILVAROLLA, Maria B.; MAZZAFERA, Paulo; FAZUOLI, Luiz C. A naturally decaffeinated arabica coffee. **Nature**, v. 429, n. 6994, p. 826, 2004. DOI: 10.1038/429826a.

SIMKIN, Andrew J.; MOREAU, Helene; KUNTZ, Marcel; PAGNY, Galle; LIN, Chenwei; TANKSLEY, Steve; MCCARTHY, James. An investigation of carotenoid biosynthesis in *Coffea canephora* and *Coffea arabica*. **Journal of Plant Physiology**, v. 165, n. 10, p. 1087–1106, 2008. DOI: 10.1016/j.jplph.2007.06.016.

SOLÍS-RAMOS, Laura Yesenia; ANDRADE-TORRES, Antonio; ALFONSO, Luis; CARBONELL, Sáenz; SALÍN, Carlos M. Oropeza; RICA, Costa. Somatic Embryogenesis in Recalcitrant Plants Zygotic Embryogenesis Somatic Embryogenesis. **Embryogenesis**, v. 1958, p. 597–618, 2012. DOI: 10.5772/35967.

SPIRAL, J.; THIERRY, C.; PAILLARD, M.; PETIARD, V. Obtention de plantules de *Coffea canephora* Pierre (Robusta) transformés par *Agrobacterium rhizogenes*. **Comptes rendus de l'Académie des sciences**. Série 3, Sciences de la vie, v. 316, n. 1, p. 1–6, 1993.

SVITASHEV, Sergei; YOUNG, Joshua; SCHWARTZ, Christine; GAO, Huirong; FALCO, S. Carl; CIGAN, A. Mark. Targeted mutagenesis, precise gene editing and site-specific gene insertion in maize using Cas9 and guide RNA. **Plant physiology**, p. pp-00793, 2015.

TANG, Wei; TANG, Anna Y. Applications and roles of the CRISPR system in genome editing of plants. **Journal of Forestry Research**, v. 28, n. 1, p. 1–14, 2016. DOI: 10.1007/s11676-016-0281-7.

TATAGIBA, J. S. *et al.* Comportamento de clones de café conilon diante de doenças no Norte do Espírito Santo. [*S. l.*], 2001. Disponível em: <https://biblioteca.incaper.es.gov.br/digital/handle/item/301>. Acesso em: 28 jul. 2020.

TOROK, Aron; MIZIK, Tamas; JAMBOR, Attila. The Competitiveness of Global Coffee Trade. **International Journal of Economics and Financial Issues**, v. 8, n. 5, p. 1, 2018.

TORRES, Luana Ferreira *et al.* Expression of DREB-Like Genes in *Coffea canephora* and *C. arabica* Subjected to Various Types of Abiotic Stress. **Tropical Plant Biology**, [*S. l.*], v. 12, n. 2, p. 98–116, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12042-019-09223-5>. Acesso em: 28 jul. 2020.

TRAVELLA, Silvia; KLIMM, Theres E.; KELLER, Beat. RNA interference-based gene silencing as an efficient tool for functional genomics in hexaploid bread wheat. **Plant Physiology**, v. 142, n. 1, p. 6–20, 2006.

UPADHYAY, Santosh Kumar; KUMAR, Jitesh; ALOK, Anshu; TULI, Rakesh. RNA-Guided genome editing for target gene mutations in wheat. **G3: Genes, Genomes, Genetics**, v. 3, n. 12, p. 2233–2238, 2013. DOI: 10.1534/g3.113.008847.

VALENCIA-LOZANO, Eliana; CABRERA-PONCE, José L.; GÓMEZ-LIM, Miguel A.; IBARRA, Jorge E. Development of an Efficient Protocol to Obtain Transgenic Coffee, *Coffea arabica* L., Expressing the Cry10Aa Toxin of *Bacillus thuringiensis*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 21, p. 5334, 2019. DOI: 10.3390/ijms20215334. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/20/21/5334>. Acesso em: 15 fev. 2020.

VAN BOXTEL, Jos; BERTHOULY, Marc; CARASCO, Cathy; DUFOUR, Magali; ESKES,

Albertus. Transient expression of β -glucuronidase following biolistic delivery of foreign DNA into coffee tissues. **Plant Cell Reports**, v. 14, n. 12, p. 748–752, 1995.

VARGAS-GUEVARA, Cristian *et al.* A simple and efficient agroinfiltration method in coffee leaves (*Coffea arabica* L.): assessment of factors affecting transgene expression. **3 Biotech**, [S. l.], v. 8, n. 11, p. 471, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1495-5>. Acesso em: 26 jul. 2020.

VELÁSQUEZ, André C.; CHAKRAVARTHY, Suma; MARTIN, Gregory B. Virus-induced gene silencing (VIGS) in *Nicotiana benthamiana* and tomato. **Journal of Visualized Experiments**, n. 28, p. e1292, 2009. DOI: 10.3791/1292.

WANG, Min; WANG, Gang; JI, Jing; WANG, Jiehua. The effect of pds gene silencing on chloroplast pigment composition, thylakoid membrane structure and photosynthesis efficiency in tobacco plants. **Plant Science**, v. 177, n. 3, p. 222–226, 2009. DOI: 10.1016/j.plantsci.2009.04.006.

WANG, Tao; IYER, Lakshminarayan M.; PANCHOLY, Rakesh; SHI, Xiangyu; HALL, Timothy C. Assessment of penetrance and expressivity of RNAi-mediated silencing of the *Arabidopsis* phytoene desaturase gene. **New Phytologist**, v. 167, n. 3, p. 751–760, 2005.

WANG, Tim; WEI, Jenny J.; SABATINI, David M.; LANDER, Eric S. Genetic screens in human cells using the CRISPR-Cas9 system. **Science**, v. 343, n. 6166, p. 80–84, 2014.

WHITE, P. R. Plant Tissue Cultures. **Annual Review of Biochemistry**, v. 11, n. 1, p. 615–628, 1942. DOI: 10.1146/annurev.bi.11.070142.003151. Disponível em: <http://www.annualreviews.org/doi/pdf/10.1146/annurev.bi.11.070142.003151>. Acesso em: 21 jan. 2016.

WINKELMANN, Traud. Somatic Versus Zygotic Embryogenesis: Learning from Seeds. In: **Methods in Molecular Biology**. [S. l.]: Methods Mol Biol, 2016. v. 1359p. 25–46. *E-book*. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3061-6_2. Acesso em: 14 jul. 2020.

YANAGUI, Karina. Novas tecnologias, novos desafios. **Ciência e Cultura**, v. 68, n. 3, p. 08–11, 2016. DOI: 10.21800/2317-66602016000300004. Disponível em: http://cienciaecultura.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0009-67252016000300004&lng=pt&tlng=pt. Acesso em: 10 ago. 2017.

YASUDA, Takeshi; FUJII, Yoko; YAMAGUCHI, Tadashi. Embryogenic Callus Induction from *Coffea arabica* Leaf Explants by Benzyladenine. **Growth (Lakeland)**, v. 26, n. 3, p. 595–597, 1985. DOI: 10.1093/oxfordjournals.pcp.a076946.

ZAMARRIPA, A. *et al.* Production of somatic embryos of coffee in liquid medium: effects of inoculation density and renewal of the medium. **Café Cacao The (France)**, [S. l.], 1991.

ZETSCHKE, Bernd *et al.* Cpf1 Is a Single RNA-Guided Endonuclease of a Class 2 CRISPR-Cas System. **Cell**, v. 163, n. 3, p. 759–771, 2015. DOI: 10.1016/j.cell.2015.09.038.

ZHOU, Jun; HUNTER, Donald A.; LEWIS, David H.; MCMANUS, Michael T.; ZHANG, Huaibi. Insights into carotenoid accumulation using VIGS to block different steps of carotenoid biosynthesis in petals of *California poppy*. **Plant Cell Reports**, v. 37, n. 9, p. 1311–1323, 2018. DOI: 10.1007/s00299-018-2314-5. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s00299-018-2314-5>.

ZIEMIENOWICZ, Alicja. *Agrobacterium*-mediated plant transformation: Factors, applications and recent advances. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 3, n. 4, p. 95–102, 2014.
DOI: 10.1016/j.bcab.2013.10.004. Disponível em:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2013.10.004>.

CAPÍTULO 2
INDUÇÃO DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DIRETA EM *Coffea canephora*
CLONE 22

RESUMO

Coffea canephora é uma espécie do gênero *Coffea*, originária da África, e representa atualmente cerca de 25% da produção de café no Brasil. É uma espécie que apresenta alta rusticidade e variabilidade genética, portanto estudos de propagação vegetativa são importantes ferramentas no melhoramento da espécie. Dentre as estratégias disponíveis a embriogênese somática (ES) direta é uma das mais eficientes e rápidas. Portanto, o objetivo deste trabalho foi testar três diferentes protocolos de indução de ES direta utilizando o clone 22 de *C. canephora*. Foram utilizados como explantes secções de folhas de plantas mantidas em casa de vegetação e *in vitro*. As principais diferenças dos meios utilizados foram a concentração de sais do meio MS, vitaminas e tipo de citocininas utilizadas (BAP, 2iP ou cinetina). Para o tratamento utilizando o meio 1 houve uma etapa de pré-tratamento das plântulas *in vitro* com adição de reguladores de crescimento (0,54 μ M ANA e 2,32 μ M cinetina) durante 14 dias. Após 3 meses da inoculação foi avaliada a frequência de resposta e o número médio de embriões obtidos em cada tratamento. O tratamento do meio 3, utilizando cinetina, foi o mais eficiente tanto para explantes de plântulas *in vitro* (96,25% de frequência de indução e média de 34 embriões por explante) quanto de plantas de casa de vegetação (67% de frequência de indução e média de 67 embriões por explante) e poderá ser utilizado em estudos futuros de transformação genética.

Palavras-chave: clone 22; propagação vegetativa; cinetina; BAP; 2iP.

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Coffea* é originário da África e é formado por 124 espécies, as quais podem ser encontradas especialmente em regiões tropicais e subtropicais do mundo (CARVALHO, 1946; DAVIS *et al.*, 2006). Dentre estas, apenas duas são amplamente cultivadas comercialmente: *Coffea arabica* e *Coffea canephora* (DAVIS *et al.*, 2011). No Brasil, *C. arabica* representa aproximadamente 75% da produção total, enquanto *C. canephora* corresponde a cerca de 25% (CONAB, 2020).

C. canephora em geral é uma espécie mais rústica, com maior resistência a pragas e doenças além de maior tolerância ao déficit hídrico e a altas temperaturas, sendo de grande importância nos programas de melhoramento do cafeeiro. Devido à alta variabilidade genética da espécie, a seleção e propagação de clones com características de interesse são de grande importância para garantir melhorias na produtividade e qualidade do café (BRAGANÇA *et al.*, 2001; FERRÃO *et al.*, 2019b).

A propagação *in vitro* de plantas permite garantir a identidade genética das variedades e a produção de mudas em larga escala, além de tornar possível a aplicação de outras ferramentas biotecnológicas como a transformação genética de plantas, a obtenção de plantas livres de vírus, a produção de duplo-haploides, a produção de híbridos somáticos via fusão de protoplastos, a produção em larga escala de metabólitos secundários ou proteínas recombinantes em células vegetais em suspensão (DAGLA, 2012; MORAIS *et al.*, 2012; NETO; ANDRADE, 2011).

Dentre as estratégias de propagação *in vitro* de plantas, a embriogênese somática (ES) merece destaque pois permite a obtenção de um grande número de regenerantes, baixa frequência de quimeras e limitada ocorrência de variação somaclonal (SAHIJRAM; BAHADUR, 2015). Em cafeeiro, alguns protocolos já foram estabelecidos, tanto para a via direta, sem a formação de calos, quanto indireta, quando inicialmente é induzida a formação de calos a partir dos quais serão obtidos os embriões somáticos (DÉCHAMP *et al.*, 2006; FUENTES *et al.*, 2000; PRIYONO *et al.*, 2010; QUIROZ-FIGUEROA *et al.*, 2006). Apesar de haverem relatos de alta eficiência para ambas as estratégias, a ES direta permite a obtenção de embriões somáticos de maneira muito mais rápida, em cerca de 3 meses a partir da inoculação (QUIROZ-FIGUEROA *et al.*, 2006), enquanto através da ES indireta dispende-se pelo menos 18 meses desde a inoculação até a obtenção de embriões (BREITLER *et al.*, 2018). Além disso é importante observar que a resposta aos diferentes protocolos é altamente dependente do

genótipo utilizado, fazendo-se necessária a validação de cada protocolo para cada genótipo de interesse (WINKELMANN, 2016).

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi testar diferentes protocolos de indução de ES direta em *C. canephora* a fim de verificar qual deles é o mais eficiente para o clone 22, e que poderá ser utilizado em ensaios futuros de transformação genética de cafeeiro.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Material Vegetal

Plantas de *C. canephora* clone 22 (INCAPER) cultivadas em casa de vegetação e *in vitro* em meio Murashige & Skoog (MS) (MURASHIGE; SKOOG, 1962) sem adição de reguladores de crescimento e solidificado com 0,17% (p/v) de ágar, pH 5,8 e mantidas em condições de sala de crescimento (± 25 °C e 40 $\mu\text{mol.m}^2.\text{s}$) foram utilizadas como fonte inicial dos explantes.

2.2 Indução de embriogênese somática direta

As folhas foram seccionadas em explantes de 0,25 cm² evitando as bordas e a nervura central. Foram avaliados três diferentes tratamentos de indução de ES, conforme descrito na tabela 2.1, descritos por Fuentes *et al.* (2000), Quiroz-Figueroa *et al.* (2006) e Priyono *et al.* (2010).

Tabela 2.1 – Composição dos meios de cultura utilizados para indução de embriogênese somática direta.

Tratamentos	Meio 1	Meio 2	Meio 3
Referência	Quiroz-Figueroa <i>et al.</i> , 2006	Fuentes <i>et al.</i> , 2000	Priyono <i>et al.</i> , 2010
Macronutrientes	¼ MS	¼ MS	½ MS
Micronutrientes	¼ MS	½ MS	½ MS
Vitaminas e suplementos	4,86 μM piridoxina 8,12 μM ác. nicotínico 29,6 μM tiamina	vitaminas B5 0,8 μM cisteína 29,43 μM AgNO ₃	1/2 vitaminas Gamborg 100 mg/L caseína hidrolisada 21 μM pantetonato de cálcio 135,7 μM sulfato de adenina 8,25 μM cisteína
Regulador de crescimento	5 μM BAP	5 μM 2ip	23,23 μM cinetina
Sacarose	30 g/L	30 g/L	40 g/L
Agente gelificante (Phytigel)	2,5 g/L	2,5g/L	3 g/L

Fonte: da autora (2020).

Para o tratamento 1, antes da indução, as plântulas *in vitro* foram transferidas para mesmo meio suplementado com 0,54 μM ácido naftalenoacético (ANA) e 2,32 μM cinetina (kn) durante 14 dias sob as mesmas condições de cultivo (QUIROZ-FIGUEROA *et al.*, 2006).

2.3 Germinação e manutenção dos embriões somáticos

Quando os embriões obtidos atingiram o estágio cotiledonar foram isolados individualmente do tecido foliar e transferidos para meio MS sem adição de reguladores de crescimento e solidificado com 0,17% (p/v) de Phytigel, pH 5,8 e mantidos em condições de sala de crescimento, sendo subcultivados a cada 8 semanas. Plântulas com raiz foram transferidas para potes contendo meio T6 (ETIENNE, 2005), sendo transferidas para meio fresco a cada 8 semanas.

2.4 Delineamento experimental e análise estatística

O experimento foi implementado em delineamento experimental inteiramente casualizado com 15 repetições (frascos de vidro fechados com tampa plástica) para cada tratamento, sendo cada repetição constituída por 4 explantes. Os dados foram submetidos a análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5%, com o auxílio do programa de análise estatística Sisvar (FERREIRA, 2008). Foi avaliada a frequência de resposta (porcentagem de explantes apresentando embriões somáticos) e o número médio de embriões por explante de cada tratamento.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os tratamentos foram avaliados quanto a frequência de resposta dos explantes e número médio de embriões por explante aos 90 dias de indução. Os resultados para os três tratamentos utilizando explantes de plântulas *in vitro* podem ser observados na tabela 2.2. Os tratamentos 1 e 3 apresentaram as maiores frequências de resposta dos explantes, sendo significativamente superiores ao tratamento 2 e não diferindo entre si. Quanto ao número médio de embriões por explante, o tratamento 3 foi significativamente melhor que os demais, os quais não diferiram entre si.

Tabela 2.2 – Frequência de resposta à embriogênese dos explantes de plântulas *in vitro* e número médio de embriões obtidos em cada tratamento.

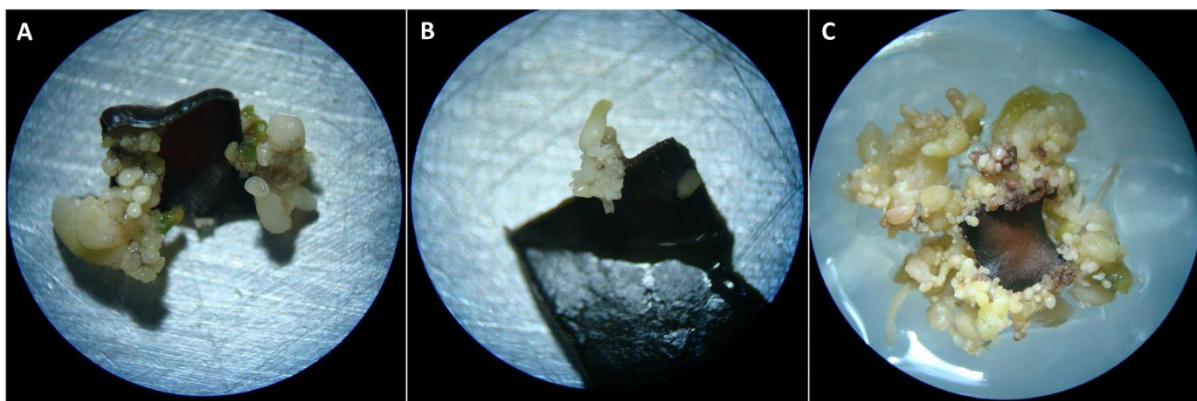
Tratamentos	Frequência	Nº embriões
Meio 1	82% a	4,41 b
Meio 2	44,75% b	3,43 b
Meio 3	96,25% a	33,99 a

Médias seguidas de letras diferentes apresentaram diferença significativa entre si no Teste de Tukey, $p < 0,5$.

Fonte: da autora (2020).

Na figura 2.1 podem ser observados exemplos de explantes responsivos à indução de cada tratamento, onde pode-se verificar a diferença visual entre eles. Os explantes do tratamento 3 (figura 2.1C) apresentaram intensa proliferação de embriões somáticos, seguido pelo tratamento 1 (figura 2.1A) e por fim o tratamento 2 (figura 2.1B), sendo o menos responsivo.

Figura 2.1 – Resposta de explantes de folhas de plântulas *in vitro* aos tratamentos de indução de embriogênese somática direta.



Legenda: A: meio 1; B: meio 2; C: meio 3.

Fonte: da autora (2020).

Os explantes provenientes de folhas de plântulas cultivadas *in vitro* apresentaram severa ocorrência de contaminação endógena, o que afetou a indução de ES direta. Foi relatado que o pré-tratamento das plântulas anteriormente à indução da ES é um fator crítico para a eficiência (QUIROZ-FIGUEROA *et al.*, 2006), o que não foi observado nesse estudo pois apesar do tratamento que utiliza um pré-tratamento ter sido eficiente na frequência de indução, o número de embriões foi significativamente menor a um tratamento que não utiliza. O nitrato de prata (AgNO_3) é um conhecido inibidor de etileno utilizado no cultivo *in vitro*, e o efeito positivo da sua adição ao meio de indução de ES direta já foi relatado (FUENTES *et al.*, 2000), entretanto o mesmo não pôde ser observado neste estudo, onde o tratamento com adição deste componente foi o que apresentou menor frequência de resposta e número de embriões. Em alguns casos a adição de íons de prata, através de AgNO_3 ou outros compostos, pode apresentar citotoxicidade para os tecidos em cultivo (BAGHERZADEH HOMAEI; EHSANPOUR, 2015; STEINITZ *et al.*, 2010), este pode ter sido um dos fatores que afetou a eficácia deste tratamento. Outra hipótese é que o etileno possua um possível papel na indução de ES e a utilização de um inibidor deste hormônio vegetal não foi benéfico nesse caso, como já relatado na indução de ES a partir de anteras de *C. arabica* (FIGUEIRA *et al.*, 2009).

Outros componentes já foram testados a fim de aprimorar a resposta à indução de ES direta. Dentre os inibidores de etileno, pode-se destacar o ácido salicílico, o cloreto de cobalto e o nitrato de prata, sendo este último o mais eficiente (KUMAR; RAMAKRISHNA; RAVISHANKAR, 2007). Outras substâncias como indolaminas, cálcio e ionóforo de cálcio já foram relatadas como eficientes em incrementar a indução de ES (RAMAKRISHNA *et al.*, 2012; RAMAKRISHNA; GIRIDHAR; RAVISHANKAR, 2011).

Os resultados das avaliações para os explantes de plantas de casa de vegetação podem ser observados na tabela 2.3. Quanto à frequência de resposta, o tratamento 3 foi superior apenas ao tratamento 2, enquanto em relação ao número de embriões, o tratamento 3 foi mais eficiente que os demais, que mais uma vez não diferiram estatisticamente entre si.

Tabela 2.3 – Frequência de resposta à embriogênese dos explantes e número médio de embriões obtidos em cada tratamento, para os explantes de plantas de casa de vegetação.

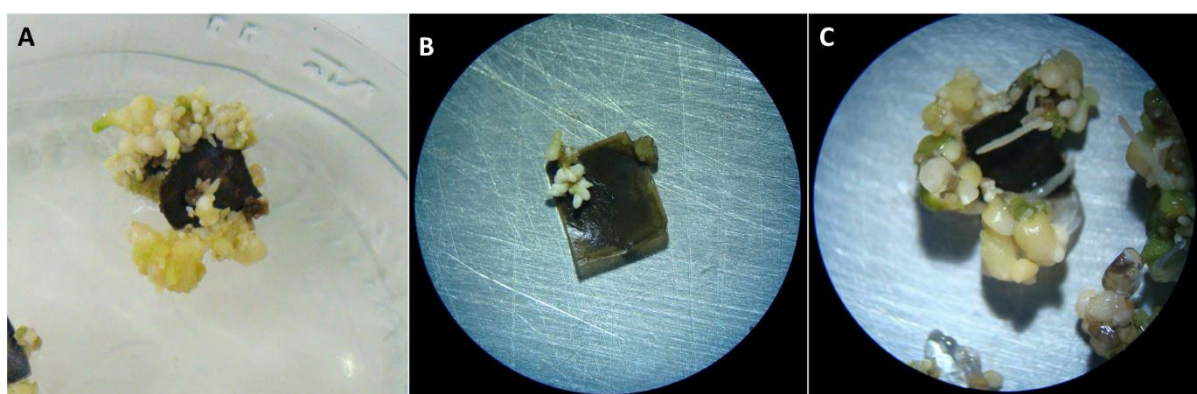
Tratamentos	Frequência	Nº embriões
Meio 1	50% ab	4,77 b
Meio 2	39,5 b	3,04 b
Meio 3	67% a	66,93 a

Médias seguidas de letras diferentes apresentaram diferença significativa entre si no Teste de Tukey, $p < 0,5$.

Fonte: da autora (2020).

Semelhantemente aos explantes de folhas *in vitro*, os explantes oriundos de folhas de casa de vegetação do tratamento 3 (figura 2.2C) se destacou dos demais e a diferença entre os tratamentos pode ser visualmente percebida. Os explantes desse tratamento apresentaram intensa proliferação de embriões somáticos em todas as bordas, e os embriões facilmente se desprendiam do explante inicial quando manipulados. Já nos explantes do tratamento 2 (figura 2.2B) apenas algumas regiões pontuais apresentaram desenvolvimento de embriões. E por fim, no tratamento 1 (figura 2.2A) alguns explantes foram responsivos em boa parte da área das bordas, mas não tão intensamente quanto no tratamento 3.

Figura 2.2 – Resposta de explantes de folhas de casa de vegetação aos tratamentos de indução de embriogênese somática direta.



Legenda: A: meio 1; B: meio 2; C: meio 3.
Fonte: da autora (2020).

A indução de ES em *C. canephora* já foi extensamente estudada. Além de altamente influenciada pelas condições de cultivo, especialmente quanto composição dos meios de cultura e os reguladores de crescimento utilizados. Nas condições deste estudo e para o genótipo estudado, a cinetina, utilizada como regulador de crescimento do tratamento 3, parece ser mais eficiente que outras citocininas na indução de ES direta.

Estudos demonstram que a resposta a indução de ES direta é fortemente influenciada pelo genótipo, e mesmo dentro de um mesmo subgrupo (Congolês ou Guineano) podem responder diferentemente (PRIYONO *et al.*, 2010). Assim faz-se necessário a avaliação de diferentes protocolos para cada genótipo a ser utilizado. Neste estudo foi utilizado o clone 22 de *C. canephora* e para este genótipo, dentre os tratamentos avaliados, o tratamento 3 foi o mais eficiente tanto para explantes de plântulas *in vitro* (96,25% de frequência de indução e média de 34 embriões por explante) quanto de plantas de casa de vegetação (67% de frequência de indução e média de 67 embriões por explante).

O tempo necessário para indução também é bastante variável, a depender da fonte de explante inicial, agente gelificante, condições de cultivo, entre outros. As diferenças se agravam especialmente quando é comparado a embriogênese indireta e direta, sendo que para a primeira são necessários cerca de 6 a 8 meses apenas para a obtenção de calos primários, totalizando cerca de 15 a 18 meses para a obtenção de embriões (BREITLER *et al.*, 2018; DUCOS *et al.*, 2003) enquanto que para a segunda isto é possível com 3 a 6 meses (obtendo-se até 200 embriões por explante) (FUENTES *et al.*, 2000; PRIYONO *et al.*, 2010; QUIROZ-FIGUEROA *et al.*, 2006). Quando se visa a propagação em larga escala, a embriogênese indireta, especialmente quando utilizado sistemas de biorreatores para regeneração, realmente é uma estratégia muito promissora (podem ser obtidos mais de 1000 embriões por sistema RITA® de 1L) (DUCOS *et al.*, 2007; ETIENNE *et al.*, 2018), mas o tempo e mão-de-obra despendidos também são altos. Para a obtenção de plantas transformadas de *C. canephora* de forma mais rápida, a embriogênese direta pode ser uma excelente alternativa.

4. CONCLUSÕES

Nas condições deste estudo o meio 3 (Priyono *et al.*, 2010) foi o mais eficiente na indução de embriogênese somática direta em *C. canephora* clone 22, para os dois tipos de explante, folhas *in vitro* e de casa de vegetação. Esta estratégia poderá ser testada para a transformação genética de *C. canephora* em estudos futuros, visto que apresenta uma maior rapidez na obtenção de embriões somáticos e plântulas em comparação com a estratégia utilizada atualmente, através de embriogênese indireta.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAGHERZADEH HOMAEE, Mozafar; EHSANPOUR, Ali Akbar. Physiological and biochemical responses of potato (*Solanum tuberosum*) to silver nanoparticles and silver nitrate treatments under *in vitro* conditions. **Indian Journal of Plant Physiology**, v. 20, n. 4, p. 353–359, 2015. DOI: 10.1007/s40502-015-0188-x.

BRAGANÇA, Scheilla Marina; DE CARVALHO, Carlos Henrique Siqueira; DA FONSECA, Aymbiré Francisco Almeida; FERRÃO, Romário Gava. Variedades clonais de café Conilon para o Estado do Espírito Santo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, n. 5, p. 765–770, 2001. DOI: 10.1590/S0100-204X2001000500006. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/pab/v36n5/5549.pdf>. Acesso em: 24 maio. 2017.

BREITLER, Jean Christophe; DECHAMP, Eveline; CAMPA, Claudine; ZEBRAL RODRIGUES, Leonardo Augusto; GUYOT, Romain; MARRACCINI, Pierre; ETIENNE, Hervé. CRISPR/Cas9-mediated efficient targeted mutagenesis has the potential to accelerate the domestication of *Coffea canephora*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 134, n. 3, p. 383–394, 2018. DOI: 10.1007/s11240-018-1429-2. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s11240-018-1429-2>.

CARVALHO, A. Distribuição geográfica e classificação botânica do gênero *Coffea* com referência especial a espécie arábica, 5: Origem e classificação botânica do *C. arabica* L. **Boletim da Superintendencia dos Servicos do Café (Brasil)** v. 21 (230) p. 174-184, 1946.

CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira: café**. V. 6 – Safra 2020 – N.1 – Primeiro levantamento, Brasília, p. 1-62, Janeiro 2020. ISSN 2318-7913. Disponível em: <http://www.conab.gov.br>.

DAGLA, H. R. Plant tissue culture. **Resonance**, v. 17, n. 8, p. 759–767, 2012. DOI: 10.1007/s12045-012-0086-8. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s12045-012-0086-8>. Acesso em: 21 jan. 2016.

DAVIS, AARON P.; GOVAERTS, RAFAEL; BRIDSON, DIANE M.; STOFFELEN, PIET. An annotated taxonomic conspectus of the genus *Coffea* (Rubiaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 152, n. 4, p. 465–512, 2006. DOI: 10.1111/j.1095-8339.2006.00584.x. Disponível em: <https://academic.oup.com/botlinnean/article-lookup/doi/10.1111/j.1095-8339.2006.00584.x>. Acesso em: 12 maio. 2017.

DAVIS, Aaron P.; TOSH, James; RUCH, Nicolas; FAY, Michael F. Growing coffee: *Psilanthus* (Rubiaceae) subsumed on the basis of molecular and morphological data; implications for the size, morphology, distribution and evolutionary history of *Coffea*. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 167, n. 4, p. 357–377, 2011. DOI: 10.1111/j.1095-8339.2011.01177.x. Disponível em: <https://academic.oup.com/botlinnean/article-lookup/doi/10.1111/j.1095-8339.2011.01177.x>. Acesso em: 14 maio. 2017.

DÉCHAMP, Eveline; BREITLER, Jean Christophe; LEROY, Thierry; ETIENNE, Hervé; KAN, Wang. Coffee (*Coffea arabica* L.). In: **Agrobacterium Protocols: Third Edition**. [s.l.] : Springer, New York, NY, 2006. v. 343p. 275–291. DOI: 10.1385/1597451304. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1385/1597451304>. Acesso em: 7 jan. 2019.

DUCOS, J. P.; ALENTON, R.; REANO, J. F.; KANCHANOMAI, C.; DESHAYES, A.; PÉTIARD, V. Agronomic performance of *Coffea canephora* P. trees derived from large-scale somatic embryo production in liquid medium. **Euphytica**, v. 131, n. 2, p. 215–223, 2003. DOI: 10.1023/A:1023915613158.

DUCOS, J. P.; LABBE, G.; LAMBOT, C.; PÉTIARD, V. Pilot scale process for the production of pre-germinated somatic embryos of selected robusta (*Coffea canephora*) clones. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v. 43, n. 6, p. 652–659, 2007. DOI: 10.1007/s11627-007-9075-0.

ETIENNE, H. Somatic Embryogenesis Protocol: Coffee (*Coffea arabica* L. and *C. canephora* P.). **In: Protocol for Somatic Embryogenesis in Woody Plants**. [s.l.] : Springer-Verlag, 2005. p. 167–179. DOI: 10.1007/1-4020-2985-3_14.

ETIENNE, Hervé *et al.* Coffee Somatic Embryogenesis: How Did Research, Experience Gained and Innovations Promote the Commercial Propagation of Elite Clones From the Two Cultivated Species? **Frontiers in Plant Science**, v. 9, n. November, p. 1–21, 2018. DOI: 10.3389/fpls.2018.01630. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2018.01630/full>.

FERRÃO, Romário Gava; FONSECA, Aymbiré Francisco Almeida Da; FERRÃO, Maria Amélia Gava; MUNER, Lúcio Herzog De. *Coffea canephora*. **In: FERRÃO, R. G.; FONSECA, A. F. A. da.; FERRÃO, M. A. G.; DE MUNER, L. H. (org.). Conilon Coffee**. 3. ed. Vitória, ES: Incaper, 2019. p. 974.

FERREIRA, Daniel Furtado. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. **In: REVISTA SYMPOSIUM 2008, Anais [...]**. : Lavras, 2008. p. 36–41.

FIGUEIRA, Elisângela Rodrigues; LONDE, Luciana Nogueira; MARQUES, Raquel Viegas; MARQUES, Soraia Viegas; SILVA, Adelaide Siqueira; LUZ, José Magno Queiroz. Influência do 2, 4-D, nitrato de prata e ácido acetilsalicílico no cultivo *in vitro* de anteras de cafeeiro (*Coffea arabica* L.). **Científica**, v. 36, n. 1, p. 27–33, 2009.

FUENTES, Sandra R. L.; CALHEIROS, Maria B. P.; MANETTI-FILHO, João; VIEIRA, Luiz G. E. The effects of silver nitrate and different carbohydrate sources on somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 60, n. 1, p. 5–13, 2000. DOI: 10.1023/A:1006474324652.

KUMAR, Vinod; RAMAKRISHNA, A.; RAVISHANKAR, G. A. Influence of different ethylene inhibitors on somatic embryogenesis and secondary embryogenesis from *Coffea canephora* P ex Fr. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v. 43, n. 6, p. 602–607, 2007. DOI: 10.1007/s11627-007-9067-0.

MORAIS, T. P.; LUZ, J. M. Q.; SILVA, S. M.; RESENDE, R. F.; SILVA, A. S. Aplicações da cultura de tecidos em plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 1, p. 110–121, 2012. DOI: 10.1590/S1516-05722012000100016.

NETO, Sebastião Pedro da Silva; ANDRADE, Solange Rocha Monteiro De. Cultura de tecidos vegetais: princípios e aplicações. **In: FALEIRO, Fábio Gelape; ANDRADE, Solange Rocha Monteiro De (org.). Biotecnologia: estado da arte e aplicações na agropecuária**. 1ª edição ed. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2011. p. 409–434.

PRIYONO *et al.* Somatic embryogenesis and vegetative cutting capacity are under distinct genetic control in *Coffea canephora* Pierre. **Plant Cell Reports**, v. 29, n. 4, p. 343–357, 2010. DOI: 10.1007/s00299-010-0825-9.

QUIROZ-FIGUEROA, Francisco; MIRIAM MONFORTE-GONZÁLEZ; GALAZ-ÁVALOS, Rosa M.; LOYOLA-VARGAS, Victor M. Direct Somatic Embryogenesis in *Coffea canephora*. **Plant Cell Culture Protocols**, v. 318, n. 4, p. 111–116, 2006.

RAMAKRISHNA, A.; GIRIDHAR, P.; JOBIN, M.; PAULOSE, C. S.; RAVISHANKAR, G. A. Indoleamines and calcium enhance somatic embryogenesis in *Coffea canephora* P ex Fr. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 108, n. 2, p. 267–278, 2012. DOI: 10.1007/s11240-011-0039-z.

RAMAKRISHNA, Akula; GIRIDHAR, Parvatam; RAVISHANKAR, Gokare Aswathanarayana. Calcium and calcium ionophore A23187 induce high-frequency somatic embryogenesis in cultured tissues of *Coffea canephora* P ex Fr. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v. 47, n. 6, p. 667–673, 2011. DOI: 10.1007/s11627-011-9372-5.

SAHIJRAM, Leela; BAHADUR, Bir. Somatic Embryogenesis. *In: Plant Biology and Biotechnology*. New Delhi: Springer India, 2015. p. 315–327. DOI: 10.1007/978-81-322-2283-5_15. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/978-81-322-2283-5_15. Acesso em: 14 maio. 2017.

STEINITZ, Benjamin; BARR, Nurit; TABIB, Yona; VAKNIN, Yiftach; BERNSTEIN, Nirit. Control of *in vitro* rooting and plant development in *Corymbia maculata* by silver nitrate, silver thiosulfate and thiosulfate ion. **Plant Cell Reports**, v. 29, n. 11, p. 1315–1323, 2010. DOI: 10.1007/s00299-010-0918-5.

WINKELMANN, Traud. Somatic Versus Zygotic Embryogenesis: Learning from Seeds. *In: Methods in Molecular Biology*. [S. l.]: Methods Mol Biol, 2016. v. 1359p. 25–46. *E-book*. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3061-6_2. Acesso em: 14 jul. 2020.

CAPÍTULO 3
SILENCIAMENTO DO GENE CcPDS EM *Coffea canephora* UTILIZANDO O
SISTEMA CRISPR/CAS9

RESUMO

Coffea canephora é uma espécie do gênero *Coffea* que apresenta extensa diversidade genética e características agronômicas desejáveis aos programas de melhoramento. Entretanto o melhoramento genético convencional do cafeeiro pode levar cerca de 30 anos, sendo difícil que o lançamento de novas variedades acompanhe as demandas de mercado. Assim a aplicação de ferramentas modernas de biotecnologia como as tecnologias de engenharia genética de precisão como sistema CRISPR/Cas9 pode ser de grande valia para acelerar este processo. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi avaliar a eficiência desse sistema para gerar mutações em *C. canephora* clone 14. Foram utilizados calos embriogênicos e diferentes construções gênicas multiplex, nas quais os sgRNAs estavam sob a regulação de promotores U6 de *C. canephora* ou *Arabidopsis thaliana*. Foram realizados 3 procedimentos de transformação, sendo que somente no segundo deles obteve-se a regeneração de muitos embriões, apenas para a construção usando promotor de *C. canephora*. Plântulas e embriões apresentando os fenótipos albino, variegado e verde foram confirmadas como transformadas pela verificação da inserção do gene da Cas9 e posteriormente as regiões para as quais foram desenhados os sgRNAs foram amplificadas, clonadas em *E. coli* e sequenciadas pelo método de Sanger. Das plântulas avaliadas, 71,4% apresentaram algum tipo de mutação, sendo que foram a maioria delas apresentou pelo menos um alvo com mutação em homozigose. O genótipo utilizado parece ter forte influência no sucesso da regeneração de plantas mutantes para o gene CcPDS.

Palavras-chave: edição genômica; clone 14; carotenoides; mutagênese dirigida.

1. INTRODUÇÃO

A cultura do café apresenta grande importância econômica nacional, a estimativa de produção da safra 2020 é de cerca de 60 milhões de sacas beneficiadas em uma área cultivada de aproximadamente 1,9 milhões de hectares. A produção nacional se divide em duas espécies, *Coffea arabica* (75%) e *Coffea canephora* (25%) (CONAB, 2020).

C. canephora é cultivada em regiões de baixa a média altitude intertropicais da África, América e Ásia, sendo uma espécie diploide auto incompatível, apresentando elevada diversidade genética (BRAGANÇA *et al.*, 2001; CUBRY *et al.*, 2013). A espécie apresenta resistência a pragas e doenças e maior tolerância a elevadas temperaturas e ao déficit hídrico, sendo utilizada nos programas de melhoramento do cafeeiro (FERRÃO *et al.*, 2019).

Entretanto, através do melhoramento convencional do cafeeiro, pode-se levar cerca de 30 anos para a obtenção de uma nova variedade e, portanto, tem-se dificuldade em acompanhar as mudanças no mercado e variações climáticas (GAMBOA-BECERRA *et al.*, 2019). Nesse sentido, a utilização de ferramentas biotecnológicas com técnicas de transformação genética, multiplicação *in vitro*, estudos de proteômica, metabolômica e marcadores moleculares podem auxiliar a acelerar a obtenção de variedades elite (MISHRA; SLATER, 2012).

Ainda sobre as estratégias que permitem a aceleração do melhoramento do cafeeiro, as técnicas de engenharia genética de precisão surgem como mais uma alternativa, permitindo a edições pontuais no genoma. Dentre as várias técnicas que permitem a mutagênese dirigida para inserção ou silenciamento de genes, o sistema CRISPR/Cas9 vem demonstrando ser um dos mais eficientes e confiáveis (FREITAS, 2019; VILLALTA-VILLALOBOS; GATICA-ARIAS, 2019). Esta é uma técnica baseada em um sistema imune adaptativo de bactérias e *Archaeas*, onde pequenos segmentos de RNA (sgRNAs) guiam a endonuclease Cas9 para a região do genoma que será clivada. A depender de erros no sistema de reparo de DNA da célula, mutações pontuais podem ser geradas (MAKAROVA; KOONIN, 2015).

A técnica já foi aplicada na espécie e apesar de terem sido obtidas mutações em homozigose e heterozigose, as plantas não apresentaram o fenótipo albino esperado quando se teve como alvo o gene da fioteno desaturase (CcPDS), um gene da rota biossintética dos carotenoides. Um extenso levantamento de todas as possíveis regiões alvo no genoma de *C. canephora* através do desenvolvimento de uma ferramenta web também foi relatado (BREITLER *et al.*, 2018).

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi verificar a eficiência da utilização de construções multiplex do sistema de edição genômica CRISPR/Cas9 para o silenciamento do gene CcPDS e gerar um fenótipo albino em *Coffea canephora* clone 14.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Material Vegetal

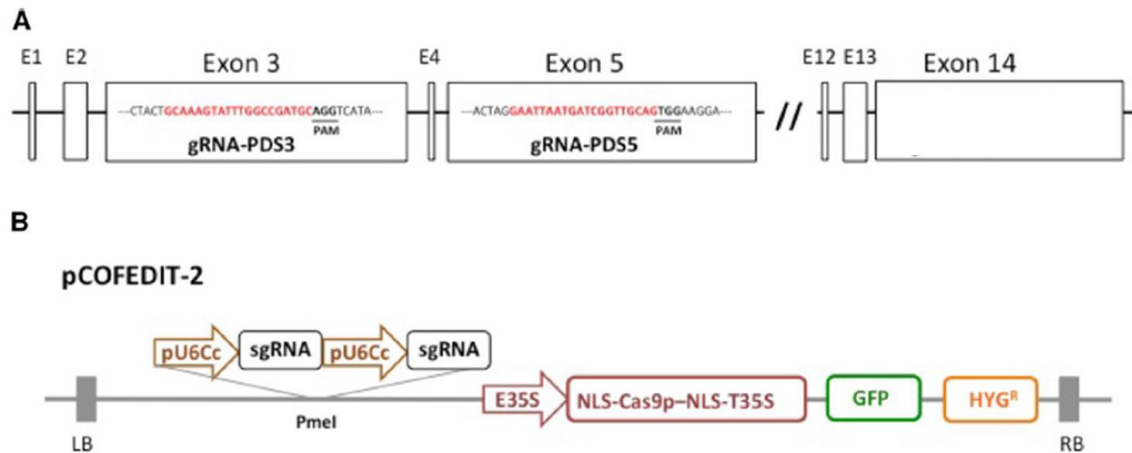
Calos embriogênicos obtidos de folhas jovens de *C. canephora* clone 14 foram utilizados para o processo de transformação via *Agrobacterium tumefaciens*. Para tal folhas de plantas mantidas em estufa foram desinfestadas superficialmente em câmara de fluxo laminar (FREITAS, 2019). As bordas e nervuras centrais foram retiradas, sendo inoculados explantes de cerca de 1 cm², contendo nervura secundária. Os explantes foram então inoculados em meio Yasuda (YASUDA; FUJII; YAMAGUCHI, 1985), e transferidos para meio Yasuda fresco depois de 4 semanas de inoculação. Após 9 meses de indução os calos foram isolados dos explantes iniciais e passaram a ser subcultivados a cada 3 semanas em meio Yasuda. Foram utilizados no procedimento de transformação calos embriogênicos com 6 a 10 meses de subcultivo. Durante todo o processo de indução e subcultivo, os explantes e calos foram mantidos no escuro em sala de crescimento a 25±2 °C.

2.2. Construções utilizadas

As construções gênicas utilizadas visando a edição genica foram cedidas pelo Centro de Cooperação Internacional em Pesquisa Agrônômica para o Desenvolvimento (CIRAD - França). O vetor de transformação pC-5300 (BREITLER *et al.*, 2004), derivado de pCAMBIA 1300, contendo as seguintes construções:

- Controle T1: sequência gênica da proteína Cas9;
- Controle T2: sequências gênicas das proteínas Cas9 e GFP;
- AtPDS: Cas9, GFP e dois alvos do gene PDS, sob a regulação do promotor U6 de *Arabidopsis thaliana*;
- CcPDS: Cas9, GFP e dois alvos do gene PDS, sob a regulação do promotor U6 de *C. canephora* (pCOFEDIT-2 por BREITLER *et al.*, 2018, figura 3.1).

Figura 3.1 – Representação esquemática dos sítios alvo da mutagênese mediada por CRISPR/Cas9 no gene PDS de *C. canephora* e vetor utilizado.



Legenda: (A) As caixas 3 e 5 representam as sequências de cada sgRNA em cada éxon. Em vermelho a sequência alvo de 20 pb e sublinhado a região PAM (NGG). (B) Representação esquemática do DNA-T a partir do vetor binários pCOFEDIT-2 para obtenção de transformação genética estável de café mediada por *Agrobacterium*. As bordas direita (RB) e esquerda (LB) são indicadas nas bordas do T-DNA.

Fonte: Breitler, *et al.* (2018), editado.

2.3. Transformação e seleção dos calos embriogênicos

Para o processo de transformação foi seguido o protocolo estabelecido por Ribas *et al.* (2011). Três semanas antes do procedimento de transformação, foram transferidos 10 calos para cada frasco de vidro contendo o meio Yasuda, sendo utilizados dois frascos para cada construção gênica. Para a infecção dos calos embriogênicos, estes foram incubados com a adição de suspensão bacteriana de *A. tumefaciens* ($OD_{600} = 0.6$) acrescida de acetoseringona $200 \mu\text{M}$ ao frasco durante 10 min. A suspensão bacteriana foi removida e os calos mantidos em co-cultivo no escuro a $20 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 3 a 5 dias, dependendo da intensidade do crescimento bacteriano. Após esse período, os explantes passaram por lavagens com água destilada estéril, meio Yasuda líquido acrescido de $1,2 \text{ g.L}^{-1}$ de Timentin e por fim apenas meio Yasuda líquido. Em seguida o líquido foi removido e o material seco em papel filtro estéril e então transferido para placas de petri contendo meio Yasuda semi-sólido acrescido de 500 mg.L^{-1} de Timentin, sendo mantido no escuro por 4 semanas em sala de crescimento ($25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$). O material foi transferido para mesmo meio acrescido de 300 mg.L^{-1} de Timentin e do agente de seleção, higromicina a 100 mg.L^{-1} , sendo transferido para luz indireta (cerca de $2 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) e subcultivado a cada 3 semanas. Após 6 meses de seleção dos calos, o agente seletivo foi removido do meio de cultivo. O processo

de transformação de calos embriogênicos foi realizado três vezes, aos TF1: aos 6 meses de subcultivo dos calos; TF2: aos 9 meses; e TF3: aos 11 meses.

2.4. Regeneração e desenvolvimento de embriões somáticos

Para a regeneração de embriões somáticos a partir dos calos embriogênicos transformados foi utilizado o meio Yasuda, sendo feitos subcultivos a cada 4 semanas, em placas de petri descartáveis e mantidos em sala de crescimento (25 ± 2 °C), com luz indireta (cerca de $2 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Após o aparecimento de embriões, estes foram transferidos para meio de maturação (DÉCHAMP *et al.*, 2006), sendo subcultivados para o mesmo meio a cada 4 semanas até a completa expansão dos cotilédones. Os embriões foram então transferidos para frascos de vidro contendo meio de enraizamento, constituído de sais e vitaminas do meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), acrescido de $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de adenina, $400 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ extrato de malte e $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sacarose, sem a adição de reguladores de crescimento e solidificado com $2,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de Phytigel™ (Sigma-Aldrich). A partir de então, os embriões/plântulas foram subcultivados a cada 30 a 40 dias. Após o enraizamento, as plântulas foram transferidas para o meio T6 (ETIENNE, 2005), no qual foram mantidas até a coleta de material para as análises posteriores, sendo transferidas para meio fresco no período de 40 a 60 dias.

Para a detecção de mutações causadas pelo sistema CRISPR/Cas9 foram selecionadas plântulas e embriões provenientes do processo de transformação, para as quais foi confirmada a inserção do T-DNA através da amplificação por PCR da sequência da Cas9. Foram selecionadas plântulas apresentando três diferentes fenótipos: completamente albinas (7 plântulas), variegadas (4 plântulas) e verdes (3 plântulas); além de duas plântulas controle não transformadas.

2.5. Extração de DNA-genômico

Para a extração de DNA genômico foram coletados embriões inteiros ou folhas de plântulas *in vitro*, dependendo do desenvolvimento destes. Devido ao fato de que a quantidade de material vegetal disponível era bastante limitada, o equipamento para maceração TissueLyser^{LT} (QIAGEN) foi utilizado para evitar perdas na maceração das amostras.

Foi utilizado o protocolo de extração de DNA utilizando o tampão CTAB (Cationic hexadecyl trimethyl ammonium bromide) (DOYLE; DOYLE, 1990), com modificações. Foi

adicionado ao tecido vegetal macerado, em microtubo de 2 mL, 700 µL de tampão CTAB, em seguida 28 µL de β-mercaptoetanol e então 700 µL de tampão CTAB restante. As soluções foram homogeneizadas por 30 segundos em vórtex e incubadas em Thermomixer R® (Eppendorf) por 40 minutos a 65 °C sendo homogeneizadas por inversão a cada 10 minutos; após as amostras foram transferidas para o gelo durante 5 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 10 min. a 11.000 rpm, a fase aquosa foi coletada e transferida para tubos limpos, aos quais foi adicionado 800 µL de solução de clorofórmio e álcool isoamílico, na proporção de 24:1 (v/v). As amostras foram homogeneizadas em vórtex, centrifugadas por 10 min a 11.000 rpm e o processo de lavagem com a solução de clorofórmio e álcool isoamílico foi repetido. O sobrenadante foi coletado (~600 µL) e transferido para um tubo de 1,5 mL, ao qual foi adicionado 600 µL de álcool isopropílico; as amostras foram homogeneizadas por inversão e incubadas a -20 °C por 1 h, para a precipitação do DNA genômico. Para a precipitação do DNA, as amostras foram centrifugadas por 20 min a 11.000 rpm, o sobrenadante foi descartado e adicionado 500 µL de etanol 75% para lavagem do pellet; as amostras foram centrifugadas por 5 min e a lavagem foi repetida. O precipitado foi seco no vácuo por 5 min e ressuspenso em 25 µL em água ultra pura adicionada de RNase (40µg.mL⁻¹).

2.6. Verificação da inserção do T-DNA

Para a confirmação da inserção do T-DNA no genoma das plantas de *C. canephora* foi realizada reação de PCR utilizando primers para a amplificação da sequência da *Cas9*, com as sequências: Fw1: 5' TATTCACGGGGTGCCTGCGG 3'; Rv1: 5' TGTGCCAGAGCGAGGTAGATCA 3'. As reações foram realizadas utilizando o NeoTaq DNA Polymerase Kit. As reações de PCR foram realizadas em termociclador Eppendorf Mastercycle, sendo o ciclo de amplificação composto de desnaturação inicial de 95 °C por 2 min, seguido por 35 ciclos compostos de três etapas: 95 °C, por 20 seg; temperatura de anelamento 60°C por 20 seg; 72 °C, por 20 seg, e uma extensão final a 72 °C durante 5 min. O produto da reação foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1% e documentado utilizando sistema Spectroline Ultraviolet Transilluminator acoplado a uma câmera.

2.7. Detecção e sequenciamento de mutações

Os DNAs genômicos previamente extraídos de plântulas e embriões transgênicos e controle foram utilizados para a amplificação de uma região de cerca de 500 pb contendo a

região alvo, utilizando-se primers específicos para cada uma delas (Tabela 3.1). A reação de PCR foi realizada utilizando a enzima Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific), em um volume total de 20 µL. Foram realizadas 3 reações independentes para cada amostra analisada. As reações de PCR foram realizadas em termociclador T100™ (Bio-rad), sendo o ciclo de amplificação composto de desnaturação inicial de 98 °C por 30 seg, seguido por 35 ciclos compostos de três etapas: 98 °C, por 30 seg; temperatura de anelamento por 30 seg; 72 °C, por 30 seg, e uma extensão final a 72 °C durante 5 min. A temperatura de anelamento foi ajustada conforme a necessidade de cada par de primers (Tabela 3.1). Os produtos de PCR foram purificados utilizando o kit comercial Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), seguindo as recomendações do fabricante. Os fragmentos foram então clonados no vetor pGEM®-T Easy (Promega). Após a transformação de *E. coli* TOP 10 com os vetores, o DNA plasmidial foi extraído e a inserção da sequência foi confirmada através de digestão com a enzima de restrição *EcoRI* (Promega). As mutações foram identificadas através de sequenciamento de Sanger (ACTGene Análises Moleculares), sendo sequenciados 4 clones de cada região alvo, para cada amostra.

Tabela 3.1 – Relação dos primers utilizados para amplificação da região alvo.

Região alvo	Éxon	Primers	Temp. de anelamento (°C)
Alvo 1	3	Fv1: TGAAAGGTTTCGTCACTGTACATGCA	66
		Rv1: TGCACACATATAGACCAACTCCCACA	
Alvo 2	5	Fw2: ATTTGCCTTATCTTGTTCCGTGCTT	69
		Rv2: TGGTTGCATACTTGCTTTCTCATCC	

Fonte: da autora (2020).

As sequências de plântulas/embriões possivelmente mutantes, controle e a sequência de referência foram alinhadas utilizando o alinhamento ClustalW, através do software MEGA-X (KUMAR *et al.*, 2018). As imagens dos resultados do alinhamento e mutações encontradas foram feitas através do software GeneDoc (NICHOLAS; NICHOLAS, 1997). A frequência de mutação nos eventos transformados foi calculada de acordo com a proporção de sequências clonadas apresentando mutações em relação ao total de sequências clonadas examinadas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Regeneração de embriões somáticos

Devido à ação do agente seletivo (higromicina), logo após à transformação os calos apresentaram intensa oxidação. Os calos da TF1 não apresentaram qualquer regeneração após nove meses de subcultivo, enquanto os calos das TF2 e TF3 começaram a apresentar o surgimento de pequenas porções de calos amarelos resistentes a higromicina cerca de 4 meses após a transformação. Este comportamento era esperado de acordo com o protocolo seguido (RIBAS *et al.*, 2011). Na TF2 obteve-se a regeneração de muitos embriões, apenas para a construção na qual os sgRNAs estavam sob a regulação de promotores U6 de *C. canephora* (pCOFEDIT-2). Já no TF3, foram obtidos poucos embriões para ambas as construções. Em nenhuma das transformações houve regeneração das construções controle T1 e T2. Já foi relatado que para *C. arabica* o tempo de subcultivo dos calos antes da transformação apresenta forte efeito sobre a eficiência da mesma, sendo o período ideal entre 7 e 9 meses (RIBAS *et al.*, 2011). Assim, este pode ter sido um dos fatores que influenciou os resultados de regeneração obtidos nos diferentes procedimentos de transformação realizados nesse trabalho, já que a TF2, que apresentou regeneração mais intensa foi realizada com 9 meses de subcultivo. Já a TF1 e TF3 foram realizadas com 6 e 11 meses de subcultivo dos calos, respectivamente.

A partir destes calos amarelos, cerca de 4 meses depois, começaram a ser observados os primeiros embriões globulares (figura 3.2A). Foram obtidos embriões com três fenótipos diferentes: totalmente verdes, totalmente albinos e parcialmente albinos (variegados) (figura 3.2B). Cerca de um ano após a transformação, os embriões cotiledonares começaram a apresentar crescimento mais significativo (figura 3.2C).

Figura 3.2 – Fotos representando o desenvolvimento de calos embriogênicos e embriões transformados e os diferentes fenótipos de embriões obtidos.

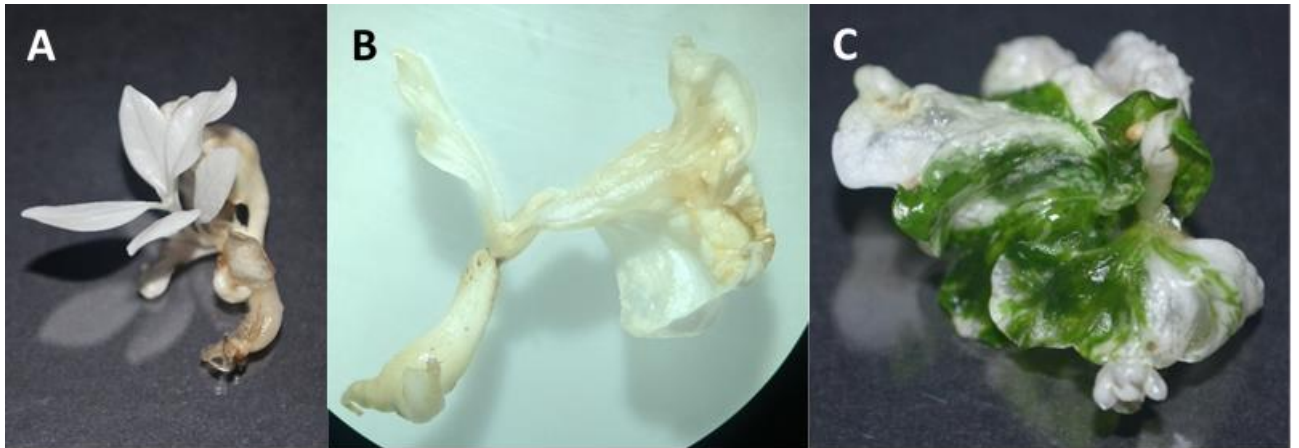


A: Calo amarelo resistente a higromicina crescendo a partir de um calo oxidado. B: embrião albino, verde e parcialmente albino, respectivamente. C: Embrião após cerca de 12 meses da transformação. Fonte: da autora (2020).

Estes resultados diferem do observado anteriormente em um estudo visando a mutagênese sítio dirigida do gene PDS em *C. canephora* (BREITLER *et al.*, 2018), no qual não foram obtidas plantas com mutações quando os sgRNAs foram desenhados para reconhecer regiões nos éxons 3 e 5, seja com vetores independentes para cada um dos alvos, seja com um único vetor multiplex para ambos. Neste último caso, os calos transformados não apresentaram qualquer regeneração. A hipótese levantada para justificar este fato foi de que, uma vez que já tenha sido observado que embriões somáticos de cafeeiro apresentam elevada taxa fotossintética, na ausência de pigmentos fotossintéticos estes embriões não seriam capazes de se desenvolver. Tais diferenças observadas entre os dois estudos poderiam ser justificadas pela diferença nos genótipos utilizados, sendo que a regeneração de calos embriogênicos do clone 14 de *C. canephora* utilizado neste estudo possivelmente seja menos afetada pela ausência de pigmentos fotossintéticos.

Alguns embriões albinos e variegados se desenvolveram em plântula (figura 3.3A) emitindo novos pares de folhas. Plântulas como essa puderam ser mantidas *in vitro*, nesse estágio de desenvolvimento, por cerca de 12 meses até que começaram a apresentar intensa fotoxidação e necrose, quando os tecidos saudáveis foram coletados e congelados em nitrogênio líquido para futuras análises. Outras plântulas albinas e variegadas obtidas (figuras 3.3B e 3.3C, respectivamente), apresentaram crescimento anormal dos cotilédones e se mantiveram dessa maneira até começarem a também oxidar e necrosar, também sendo coletados e congelados as porções ainda viáveis.

Figura 3.3 – Algumas das plântulas obtidas na TF2.



Legenda: A e B: albinas; C: variegada.
Fonte: da autora (2020).

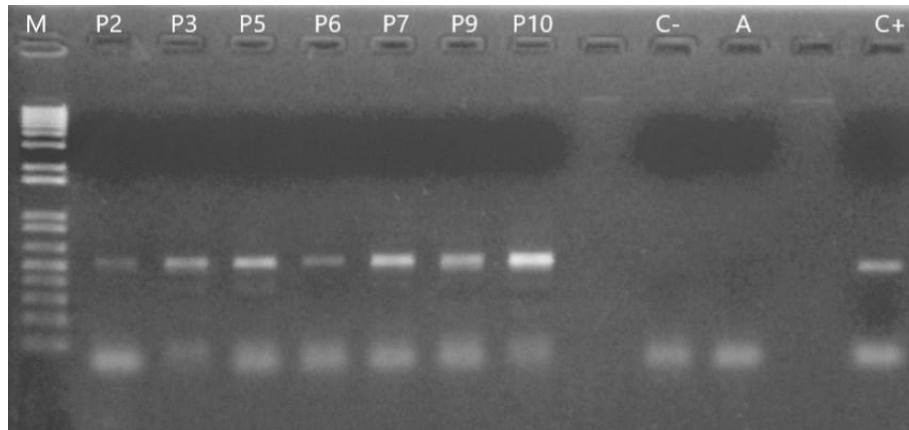
O primeiro relato de transformação estável e mutagênese induzida por CRISPR/Cas9 em plantas lenhosas ocorreu em *Populus*, no qual os mutantes também apresentaram tais variações fenotípicas (FAN *et al.*, 2015). O mesmo foi observado em maçã, na qual também se observou que as plantas transformadas apresentando fenótipo totalmente albino tinham crescimento limitado em relação às que não apresentaram tal fenótipo (NISHITANI *et al.*, 2016).

Embriões e plântulas de *C. canephora* apresentando mutações pelo sistema CRISPR/Cas9 no último éxon do gene *CcPDS* (éxon 14) não apresentaram fenótipo totalmente albino mas apresentaram uma série de alterações morfológicas como redução do tamanho, alterações no posicionamento, na organização, na pigmentação (amarelada, clorótica ou antociânica) e no número de folhas. Estes embriões também apresentaram dificuldades de enraizamento (BREITLER *et al.*, 2018).

3.2. Confirmação da inserção do T-DNA

Foram avaliadas quanto à inserção do T-DNA sete plântulas apresentando o fenótipo albino, quatro apresentando fenótipo variegados e três verdes. Todas apresentaram amplificação da banda de cerca de 500 pb esperada para o gene da Cas9 (figuras 3.4 e 3.5). Para as duas plântulas controle analisadas, não houve amplificação. Assim todas estas plântulas foram posteriormente avaliadas quanto à ocorrência de mutações nos genes alvo.

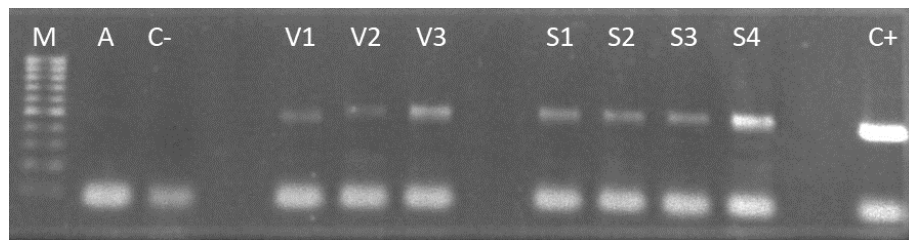
Figura 3.4 – PCR de confirmação da transformação de *C. canephora* com a construção pCOFEDIT-2, plântulas albinas.



Legenda: M: marcador de peso molecular; P2-P10: plântulas transformadas; C-: plântula controle; A: controle negativo da reação (água); C+: controle positivo (DNA plasmidial).

Fonte: da autora (2020).

Figura 3.5 – PCR de confirmação da transformação de *C. canephora* com a construção pCOFEDIT-2, plântulas verdes e variegadas.



Legenda: M: marcador de peso molecular; A: controle negativo da reação (água); C-: plântula controle; V1-V3: plântulas verdes; S1-S4: plântulas variegadas; C+: controle positivo (DNA plasmidial).

Fonte: da autora (2020).

3.3. Detecção e sequenciamento de mutações

O gene PDS de *C. canephora* possui 7.042 pb e 14 éxons, sendo que os alvos para silenciamento gênico foram desenhados para os éxons 3 e 5. Com essas construções espera-se obter o silenciamento do gene por mutações pontuais, como deleções e/ou inserções mediante sítios de corte da Cas9 e possivelmente a deleção do fragmento inteiro entre os dois éxons, aumentando a possibilidade de silenciamento. A fitoeno desaturase é uma proteína biossintética essencial de plantas, que catalisa a adição de duas duplas ligações ao 15-cis-fitoeno, gerando 9,15,9'-tri-cis- ζ -caroteno através do intermediário 9,15-di-cis-fitoflueno (KOSCHMIEDER *et al.*, 2017).

O resultado do alinhamento entre gene de referência (CcPDS), plântulas controle (C) e plântulas transformadas (figura 3.6) mostra que para o alvo 1 (figura 3.6A), foram observadas mutações em quatro das sete plântulas apresentando fenótipo albino, sendo duas com mutação

em homozigose (P5 com deleção de 70 nt e P7 com adição de 1 nt), uma em heterozigose (P6 com deleção de 3 nt em apenas um alelo) e uma plântula com mutação bialélica (P10 com deleção de 3 nt em ambos os alelos e trocas de base em duas posições em apenas um deles). Nenhuma das três plântulas com fenótipo verde avaliadas apresentou mutação para nenhum dos dois alvos (V). Já dentre as plântulas com fenótipo variegado, duas apresentaram mutações bialélicas (S2 com deleções de 3 e 70 nt em cada alelo e S4 com inserção de 1 base diferente em cada alelo) e uma apresentou mutação em heterozigose (S3 com deleção de 3 nt em apenas um alelo). Para ambos os sítios alvo, a maioria das pequenas mutações observadas ocorreu a uma distância de 3 a 4 nucleotídeos *upstream* ao sítio PAM, como esperado, resultantes do reparo de extremidades não homólogas (NHEJ, do inglês “Non-homologous end joining”) (BREITLER *et al.*, 2018; FAN *et al.*, 2015).

Figura 3.6 – Representação dos resultados dos alinhamentos entre gene de referência, plântulas controle e transformadas.



Legenda: CcPDS: gene de referência; A: alvo 1; B: alvo 2. Onde: C: plântulas controle; P: plântulas albinas; V: plântulas verdes; S: plântulas variegadas. Azul: Região para a qual foi desenhado o sg-RNA; Amarelo: PAM; Rosa: adições de bases; Verde: deleções de bases; Seta preta: sítio de clivagem da Cas9; Em parênteses: número de colônias sequenciadas, obtendo essa sequência.

Fonte: da autora (2020).

Quanto ao alvo 2 (figura 3.6B), seis plântulas com fenótipo albino apresentaram mutações, sendo todas em homozigose, das quais 4 com inserção de um nucleotídeo (P2, P3, P6 e P10), uma com deleção de um nucleotídeo (P5) e uma com deleção de 3 nt (P7). As plântulas de fenótipo verde também não apresentaram mutações para este alvo. Por fim, para a plântulas com fenótipo variegado, duas apresentaram mutação em heterozigose, com a inserção de um nucleotídeo em apenas um alelo para ambas (S1 e S4). Plântulas transformadas não representadas na imagem não apresentaram mutações.

As plântulas P2 e P3 apresentaram mutação apenas no alvo 2, mas apresentaram fenótipo totalmente albino, enquanto plântulas como S2 e S4 apresentaram mutações bialélicas para o alvo 1 (e no caso desta última, apresentou ainda mutação em heterozigose no alvo 2) e o fenótipo observado foi variegado. Em maçã, um estudo observou que mutantes regenerados de um mesmo disco foliar apresentavam o mesmo tipo de mutação, mas fenótipos diferentes (NISHITANI *et al.*, 2016). Já em *Populus*, mutantes completamente albinos apresentaram mutações em homozigose, enquanto mutantes parcialmente albinos apresentavam mutações bialélicas (FAN *et al.*, 2015). Dessa forma, surge a hipótese de que seriam necessárias mutações em homozigose em pelo menos um dos alvos do gene *CcPDS* para gerar plântulas com fenótipo completamente albino, mesmo que essas sejam deleções ou inserções de poucos nucleotídeos. Em relação as plântulas de fenótipo variegado S1 e S3, estas apresentaram mutação em heterozigose em apenas um dos alvos (alvo 2 e alvo 1, respectivamente), o que nos permite inferir que ao menos um dos alelos do gene não tenha sofrido nenhum tipo de mutação, permitindo que sua expressão ocorresse e pelo mesmo em parte a função da enzima fitoeno desaturase fosse realizada. Em relação a P9, este foi um dos primeiros embriões coletados e possivelmente o fenótipo albino apresentado estava relacionado ao estágio inicial de desenvolvimento, já que não foram observadas mutações nesta amostra.

As taxas de eficiência de mutação podem ser observadas na tabela 3.2. Para o alvo 1 (éxon 3), a taxa de mutação foi de 44,9%, sendo que a maioria das mutações observadas foi bialélica. Já para o alvo 2 (éxon 5), a taxa de mutação foi de 50%, a maior parte delas em homozigose. Considerando-se o total de *amplicons* analisados, 47,62% delas apresentaram mutações, a maioria em homozigose. Considerando-se o número total de plântulas, 71,4% apresentaram algum tipo de mutação em pelo menos uma das regiões alvo.

Tabela 3.2 – Análise da taxa e tipo de mutações obtidas com a transformação de plântulas de cafeeiro com o vetor pCOFEDIT-2.

Sequência alvo	Nº de plântulas analisadas	Nº de plântulas com mutações	Taxa de mutação* (%)	Tipo de mutação		
				Homozigose	Heterozigose	Bialélica
Alvo 1 (Éxon 3)	14	7	44,9%	2	2	3
Alvo 2 (Éxon 5)	14	8	50%	6	2	0
Total	14	10	47,62%			

Legenda: *Taxa de mutação calculada pela razão de *amplicons* com mutação sobre o total de *amplicons* analisados.

Fonte: da autora (2020).

Estes resultados estão entre os mais altos entre culturas perenes, acima dos relatos obtidos com uva com 30,6% (WANG *et al.*, 2018b), laranja com 34,5% (PENG *et al.*, 2017) e em *C. canephora* com 30,4% (BREITLER *et al.*, 2018), e abaixo dos resultados obtidos em *Populus* com 51,7% (FAN *et al.*, 2015), maçã com 84% (CHARRIER *et al.*, 2019) e algodão com valores entre 66 e 100% de eficiência de geração de mutações (WANG *et al.*, 2018a). Além das diferenças entre espécies e genótipos, que pode explicar estas variações, o uso de promotores da própria espécie no lugar de promotores de *Arabidopsis thaliana* e a adoção de estratégias multiplex parecem melhorar a probabilidade de ocorrência de mutação nas regiões alvo (CHARRIER *et al.*, 2019).

4. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos é possível confirmar a eficiência do sistema CRISPR/Cas9 para a indução de mutagênese sítio dirigida em *Coffea canephora*, sendo que 71,4% das plântulas avaliadas apresentaram algum tipo de mutação, e para geração do fenótipo esperado em decorrência da mutação. O genótipo utilizado parece ter forte influência no sucesso da regeneração de plantas mutantes para o gene CcPDS.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRAGANÇA, Scheilla Marina; DE CARVALHO, Carlos Henrique Siqueira; DA FONSECA, Aymbiré Francisco Almeida; FERRÃO, Romário Gava. Variedades clonais de café Conilon para o Estado do Espírito Santo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, n. 5, p. 765–770, 2001. DOI: 10.1590/S0100-204X2001000500006. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/pab/v36n5/5549.pdf>. Acesso em: 24 maio. 2017.
- BREITLER, Jean Christophe; DECHAMP, Eveline; CAMPA, Claudine; ZEBRAL RODRIGUES, Leonardo Augusto; GUYOT, Romain; MARRACCINI, Pierre; ETIENNE, Hervé. CRISPR/Cas9-mediated efficient targeted mutagenesis has the potential to accelerate the domestication of *Coffea canephora*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 134, n. 3, p. 383–394, 2018. DOI: 10.1007/s11240-018-1429-2. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s11240-018-1429-2>.
- BREITLER, Jean-Christophe; MEYNARD, Donaldo; VAN BOXTEL, Jos; ROYER, Monique; BONNOT, François; CAMBILLAU, Laurence; GUIDERDONI, Emmanuel. A novel two T-DNA binary vector allows efficient generation of marker-free transgenic plants in three elite cultivars of rice (*Oryza sativa* L.). **Transgenic research**, v. 13, n. 3, p. 271–287, 2004.
- CHARRIER, Aurélie; VERGNE, Emilie; DOUSSET, Nicolas; RICHER, Andréa; PETITEAU, Aurélien; CHEVREAU, Elisabeth. Efficient Targeted Mutagenesis in Apple and First Time Edition of Pear Using the CRISPR-Cas9 System. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, n. February, p. 1–12, 2019. DOI: 10.3389/fpls.2019.00040.
- CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira: café**. V. 6 – Safra 2020 – N.1 – Primeiro levantamento, Brasília, p. 1-62, Janeiro 2020. ISSN 2318-7913. Disponível em: <http://www.conab.gov.br>.
- CUBRY, Philippe; DE BELLIS, Fabien; POT, David; MUSOLI, Pascal; LEROY, Thierry. Global analysis of *Coffea canephora* Pierre ex Froehner (Rubiaceae) from the Guineo-Congolese region reveals impacts from climatic refuges and migration effects. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 60, n. 2, p. 483–501, 2013. DOI: 10.1007/s10722-012-9851-5.
- DÉCHAMP, Eveline; BREITLER, Jean Christophe; LEROY, Thierry; ETIENNE, Hervé; KAN, Wang. Coffee (*Coffea arabica* L.). In: **Agrobacterium Protocols: Third Edition**. [s.l.] : Springer, New York, NY, 2006. v. 343p. 275–291. DOI: 10.1385/1597451304. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1385/1597451304>. Acesso em: 7 jan. 2019.
- DOYLE, Jeff J.; DOYLE, Jane L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12, n. 13, p. 39–40, 1990.
- ETIENNE, H. Somatic Embryogenesis Protocol: Coffee (*Coffea arabica* L. and *C. canephora* P.). In: **Protocol for Somatic Embryogenesis in Woody Plants**. [s.l.] : Springer-Verlag, 2005. p. 167–179. DOI: 10.1007/1-4020-2985-3_14.
- FAN, Di; LIU, Tingting; LI, Chaofeng; JIAO, Bo; LI, Shuang; HOU, Yishu; LUO, Keming. Efficient CRISPR/Cas9-mediated Targeted Mutagenesis in *Populus* in the First Generation. **Scientific reports**, v. 5, p. 12217, 2015. DOI: 10.1038/srep12217. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26193631>.

FERRÃO, Romário Gava; FONSECA, Aymbiré Francisco Almeida Da; FERRÃO, Maria Amélia Gava; MUNER, Lúcio Herzog De. *Coffea canephora*. In: FERRÃO, R. G.; FONSECA, A. F. A. da.; FERRÃO, M. A. G.; DE MUNER, L. H. (org.). **Conilon Coffee**. 3. ed. Vitória, ES: Incaper, 2019. p. 974.

FREITAS, Natália Chagas. **Sistema CRISPR/Cas9 visando a edição genômica no alotetraploide *Coffea arabica***. 2019. Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2019.

GAMBOA-BECERRA; HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ; GONZÁLEZ-RÍOS; SUÁREZ-QUIROZ; GÁLVEZ-PONCE; ORDAZ-ORTIZ; WINKLER. Metabolomic Markers for the Early Selection of *Coffea canephora* Plants with Desirable Cup Quality Traits. **Metabolites**, v. 9, n. 10, p. 214, 2019. DOI: 10.3390/metabo9100214. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2218-1989/9/10/214>. Acesso em: 10 abr. 2020.

KOSCHMIEDER, Julian; FEHLING-KASCHEK, Mirjam; SCHAUB, Patrick; GHISLA, Sandro; BRAUSEMANN, Anton; TIMMER, Jens; BEYER, Peter. Plant-type phytoene desaturase: Functional evaluation of structural implications. **PLoS ONE**, v. 12, n. 11, p. 1–26, 2017. DOI: 10.1371/journal.pone.0187628.

KUMAR, Sudhir; STECHER, Glen; LI, Michael; KNYAZ, Christina; TAMURA, Koichiro. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. **Molecular Biology and Evolution**, v. 35, n. 6, p. 1547–1549, 2018. DOI: 10.1093/molbev/msy096.

MAKAROVA, Kira S.; KOONIN, Eugene V. Annotation and Classification of CRISPR-Cas Systems. In: Lundgren M., Charpentier E., Fineran P. (eds) **CRISPR. Methods in Molecular Biology**, vol 1311. Humana Press, New York, NY. p. 47–75. DOI: 10.1007/978-1-4939-2687-9_4. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-2687-9_4. Acesso em: 15 maio. 2017.

MISHRA, M. K.; SLATER, A. Recent advances in the genetic transformation of coffee. **Biotechnology research international**, v. 2012, n. 1995, p. 580857, 2012. DOI: 10.1155/2012/580857. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3437269&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

MURASHIGE, Toshio; SKOOG, Folke. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473–497, 1962. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>. Acesso em: 15 nov. 2014.

NICHOLAS, K. B.; NICHOLAS, H. B. Jr. GeneDoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments. Distributed by the author. **URL at: www.cris.com/~Ketchup/genedoc.shtml**, 1997.

NISHITANI, Chikako; HIRAI, Narumi; KOMORI, Sadao; WADA, Masato; OKADA, Kazuma; OSAKABE, Keishi; YAMAMOTO, Toshiya; OSAKABE, Yuriko. Efficient Genome Editing in Apple Using a CRISPR/Cas9 system. **Scientific Reports**, v. 6, n. January, p. 1–8, 2016. DOI: 10.1038/srep31481.

PENG, Aihong; CHEN, Shanchun; LEI, Tiangang; XU, Lanzhen; HE, Yongrui; WU, Liu; YAO, Lixiao; ZOU, Xiuping. Engineering canker-resistant plants through CRISPR/Cas9-targeted editing of the susceptibility gene *CsLOB1* promoter in citrus. **Plant Biotechnology**

Journal, v. 15, n. 12, p. 1509–1519, 2017. DOI: 10.1111/pbi.12733. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/pbi.12733>. Acesso em: 13 abr. 2020.

RIBAS, Alessandra F.; DECHAMP, Eveline; CHAMPION, Anthony; BERTRAND, Benoît; COMBES, Marie-christine; VERDEIL, Jean-luc; LAPEYRE, Fabienne; LASHERMES, Philippe; ETIENNE, Hervé. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of *Coffea arabica* (L.) is greatly enhanced by using established embryogenic callus cultures. **BMC plant biology**, v. 11, n. 1, p. 92, 2011. DOI: 10.1186/1471-2229-11-92. Disponível em: <http://www.biomedcentral.com/1471-2229/11/92>.

VILLALTA-VILLALOBOS, Jimmy; GATICA-ARIAS, Andrés. Una mirada en el tiempo: mejoramiento genético de café mediante la aplicación de la biotecnología. **Agronomía Mesoamericana**, v. 30, n. 2, p. 577–599, 2019. DOI: 10.15517/am.v30i2.34173. Disponível em: <https://revistas.ucr.ac.cr/index.php/agromeso/article/view/34173>. Acesso em: 11 fev. 2020.

WANG, Pengcheng *et al.* High efficient multisites genome editing in allotetraploid cotton (*Gossypium hirsutum*) using CRISPR/Cas9 system. **Plant Biotechnology Journal**, v. 16, n. 1, p. 137–150, 2018. a. DOI: 10.1111/pbi.12755.

WANG, Xianhang; TU, Mingxing; WANG, Dejun; LIU, Jianwei; LI, Yajuan; LI, Zhi; WANG, Yuejin; WANG, Xiping. CRISPR/Cas9-mediated efficient targeted mutagenesis in grape in the first generation. **Plant Biotechnology Journal**, v. 16, n. 4, p. 844–855, 2018. b. DOI: 10.1111/pbi.12832. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/pbi.12832>. Acesso em: 13 abr. 2020.

CAPÍTULO 4:
MUTAGÊNESE SÍTIO-DIRIGIDA DE GENES DA ROTA DE BIOSÍNTESE DE
CAFEÍNA EM *Coffea canephora* UTILIZANDO O SISTEMA CRISPR/CAS9

RESUMO

O café é uma das bebidas mais consumidas no mundo, mas apesar da grande popularidade alguns problemas relacionados ao consumo de cafeína são relatados. O café descafeinado é uma alternativa para esses casos, contudo o processo pelo qual é obtido reduz a qualidade da bebida. Assim, alternativas para a obtenção deste produto vêm sendo estudadas como, por exemplo, a obtenção de genótipos com redução intrínseca de cafeína. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi silenciar os genes das N-metiltransferases (NMTs): xantosina metiltransferase (XMT), 7-metilxantina metiltransferase (MXMT) e 3,7-dimetilxantina metiltransferase (DXMT), responsáveis pela síntese de cafeína nas espécies do gênero *Coffea*, utilizando o sistema CRISPR/Cas9. Construções multiplex contendo dois sgRNAs guias capazes de reconhecer duas regiões em cada gene foram utilizadas. O processo de transformação via *Agrobacterium tumefaciens* foi realizado utilizando calos embriogênicos de *Coffea canephora* clone 14, os quais posteriormente passaram pelo processo de seleção e regeneração. Folhas de plântulas *in vitro* foram coletadas para a análise de inserção do T-DNA e verificação das mutações. Dentre as seis plântulas analisadas, cinco estavam efetivamente transformadas. Destas, apenas uma apresentou mutações nas regiões reconhecidas pelos sgRNAs, sendo uma mutação em heterozigose no segundo alvo do gene XMT e uma mutação também em heterozigose nos dois alvos do gene DXMT. Nenhuma mutação foi observada no gene MXMT. Com base nos resultados obtidos foi possível concluir que o sistema CRISPR/Cas9 pode ser utilizado para induzir mutações sítio-dirigidas nos genes da rota biossintética de cafeína em *C. canephora*. Para avaliar o efeito de tais mutações nos níveis endógenos de cafeína, novas plantas devem ser analisadas.

Palavras-chave: Edição genômica. Café. Metiltransferases. Mutagênese dirigida. Engenharia genética de precisão.

1. INTRODUÇÃO

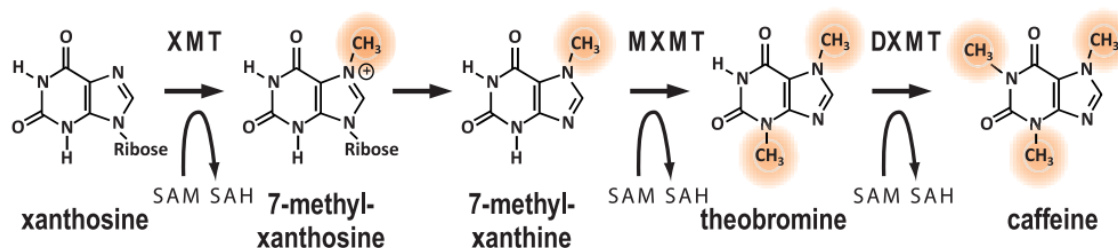
O café (*Coffea* sp.) tem origem na África, sendo que as espécies mais cultivadas *Coffea arabica* é originária da Etiópia e *Coffea canephora* do Congo (CHARRIER; BERTHAUD, 1985). O efeito estimulante da bebida é conhecido, pelo menos, desde o ano 575, de quando data o primeiro registro conhecido em manuscritos do Iêmen. Este claramente foi um dos motivos que levou a sua dispersão pelo mundo (MARTINS, 2012). Apesar da grande popularidade atingida pelo café como bebida, efeitos negativos como redução do controle motor e da qualidade do sono começaram a ser associados ao consumo, levando a busca por alternativas para os apreciadores da bebida que não ocasionassem tais efeitos. Dessa forma, criou-se um mercado para o café descafeinado (MAZZAFERA, 2012).

Mesmo que o café descafeinado seja um produto de valor agregado, que atingiu importância dentro do mercado, apresentando vantagens competitivas, os processos de descafeinação atualmente utilizados fazem uso de solventes que podem alterar as propriedades sensoriais e a concentração dos demais compostos bioativos presentes na bebida, além de poder deixar resíduos. Todos estes fatores prejudicam a qualidade do produto final (PIETSCH, 2017; TOROK; MIZIK; JAMBOR, 2018).

Devido a estas deficiências do processo de descafeinação, pesquisadores passaram a buscar novas formas de obter um produto descafeinado. Uma possibilidade levantada seria a identificação e/ou obtenção de genótipos com baixa produção de cafeína. Embora já tenham sido identificados acessos de *C. arabica* provenientes da Etiópia que apresentam naturalmente quase nenhuma cafeína, a introdução desta característica em variedades comerciais através de hibridação intraespecífica é muito lenta (SILVAROLLA; MAZZAFERA; FAZUOLI, 2004). A partir da identificação das enzimas da rota de biossíntese desta molécula e suas respectivas sequências gênicas, técnicas de DNA recombinante e silenciamento gênico podem ser utilizadas para a obtenção destes genótipos de forma mais rápida (OGAWA *et al.*, 2001),

Nas espécies do gênero *Coffea*, a cafeína é produzida a partir de três reações de metilação sequenciais dependentes de SAM, catalisadas por três N-metiltransferases (NMTs): XMT, MXMT e DXMT (figura 4.1) (SATYANARAYANA *et al.*, 2005).

Figura 4.1 – Rota de biossíntese de cafeína.



Legenda: **XMT**: 7-Metilxantosina sintase (xantosina metiltransferase), **MXMT**: teobromina sintase (7-metilxantina metiltransferase), **DXMT**: cafeína sintase (3,7-dimetilxantina metiltransferase). SAM: S-adenosilmetionina; HAS: S-adenosil-homocisteína.

Fonte: DENOEUDE *et al.* (2014).

A edição simultânea de múltiplos alvos no genoma de plantas pode ter diversas aplicações como o estudo de diferentes genes relacionados, o knockout de genes de função redundante ou múltiplos membros de uma família gênica bem como o melhoramento genético de múltiplas características agrônômicas. Para tanto diferentes estratégias para o desenvolvimento de cassetes gênicos expressando múltiplos sgRNAs em um único vetor binário juntamente com a *Cas9* já foram explorados (MA *et al.*, 2016). As estratégias multiplex já permitiram a edição de 5 diferentes genes na rota de ácido c-aminobutírico (GABA) em tomate (LI *et al.*, 2018), o silenciamento de diferentes enzimas responsáveis pela glicosilação de proteínas em células de tabaco (MERCX *et al.*, 2017), o silenciamento de três diferentes genes em trigo alopoliploide, visando melhorar características de produtividade, além de conferir resistência a oídio e *Fusarium graminearum* (WANG *et al.*, 2018) entre outros.

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi silenciar os três genes de NMTs da rota de biossíntese de cafeína através do uso do sistema CRISPR-Cas9, a fim de utilizar esta técnica para a obtenção de plantas com deficiência na produção de cafeína para a obtenção de café descafeinado diretamente da planta.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Material vegetal

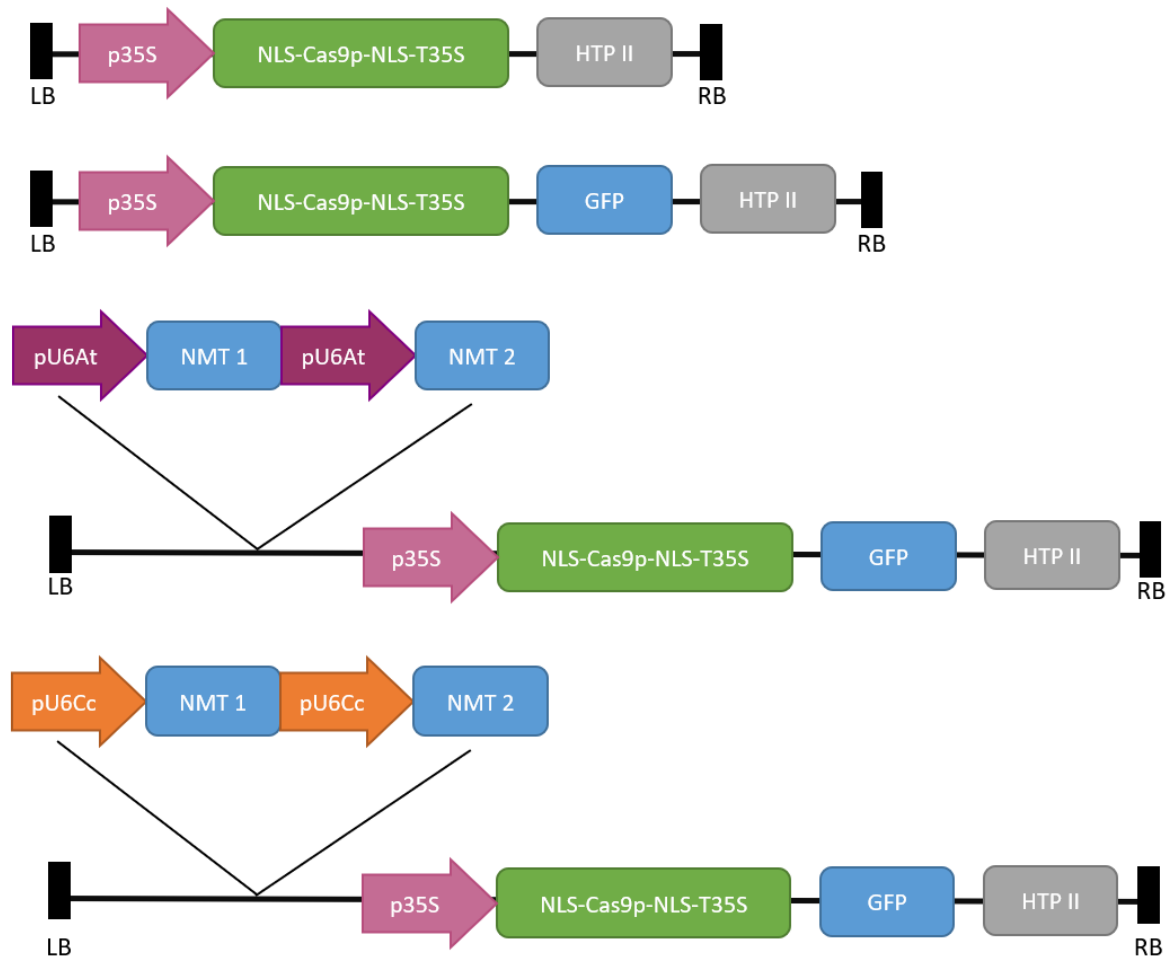
Foram utilizadas folhas jovens de *C. canephora* clone 14 mantidas em estufa para a indução de calos embriogênicos, estas foram desinfestadas superficialmente em câmara de fluxo laminar e posteriormente retiradas as bordas e nervuras centrais (FREITAS, 2019). Explantes de cerca de 1 cm² contendo ao menos uma nervura secundária foram inoculados em meio Yasuda (YASUDA; FUJII; YAMAGUCHI, 1985), e transferidos para meio fresco depois de 4 semanas de inoculação. Os calos embriogênicos obtidos foram isolados dos explantes iniciais após 9 meses de indução e subcultivados em meio fresco a cada 3 semanas. Os explantes foram mantidos no escuro em sala de crescimento a 25±2 °C. Para o procedimento de transformação os calos embriogênicos foram subcultivados por 6 a 10 meses.

2.2. Construções utilizadas

As construções gênicas utilizadas foram cedidas pelo Centro de Cooperação Internacional em Pesquisa Agronômica para o Desenvolvimento (CIRAD), na França. O vetor de transformação pC-5300 (BREITLER *et al.*, 2004), derivado de pCAMBIA 1300, foi utilizado, ao qual foram inseridas as seguintes sequências (figura 4.2):

- Controle pC-5300-T1: sequência gênica da proteína Cas9 e do gene de resistência ao agente seletivo higromicina, *hpt II*;
- Controle pC-5300-T2: sequências gênicas das proteínas Cas9, GFP e do gene *hpt II*;
- p-COFEDIT-At-XMT: 2 sgRNAs para o gene XMT, sob a regulação do promotor U6 de *Arabidopsis thaliana*; sequências gênicas das proteínas Cas9, GFP e do gene *hpt II*;
- p-COFEDIT-Cc-XMT: 2 sgRNAs para o gene XMT, sob a regulação do promotor U6 de *C. canephora*; sequências gênicas das proteínas Cas9, GFP e do gene *hpt II*;

Figura 4.2 – Representação esquemática das construções gênicas utilizadas.



Legenda: LB: borda esquerda; RB: borda direita; p35S: promotor 35S de vírus do mosaico da couve flor (CaMV); NLS: sinal de localização nuclear; HTP II: gene de resistência a higromicina; GFP: gene da proteína verde fluorescente; Cas9p: sequência otimizada para plantas da proteína Cas9; T35S: terminador 35S de CaMV; pU6At: promotor U6 de *Arabidopsis thaliana*; pU6Cc: do promotor U6 de *C. canephora*; NMT 1 e 2: sgRNAs para os genes de biossíntese de cafeína.

Fonte: da autora (2020).

2.3. Transformação e seleção dos calos embriogênicos

O procedimento de transformação foi baseado no protocolo estabelecido por Ribas *et al.* (2011). Os calos embriogênicos utilizados foram transferidos para frascos de vidro contendo o meio Yasuda 3 semanas antes da infecção por *A. tumefaciens*, sendo utilizados 2 frascos contendo 10 calos para cada construção gênica utilizada. Para a infecção dos calos embriogênicos, estes foram incubados com a adição de suspensão bacteriana de *A. tumefaciens* (OD600 = 0.6) acrescida de acetoseringona 200 μ M ao frasco durante 10 min. A suspensão

bacteriana foi removida e os calos mantidos em co-cultivo no escuro a 20 °C durante 3 a 5 dias, dependendo da intensidade do crescimento bacteriano. Após esse período, os explantes passaram por lavagens com água destilada estéril, meio Yasuda líquido acrescido de 1,2 g.L⁻¹ de Timentin e por fim apenas meio Yasuda líquido. Em seguida o líquido foi removido e o material seco em papel filtro estéril e então transferido para placas de petri contendo meio Yasuda semi-sólido acrescido de 500 mg.L⁻¹ de Timentin, sendo mantido no escuro por 4 semanas em condições de sala de crescimento. O material foi transferido para mesmo meio acrescido de 300 mg.L⁻¹ de Timentin e do agente de seleção, higromicina a 100 mg.L⁻¹, sendo transferido para luz indireta e subcultivado a cada 3 semanas. Após 6 meses de seleção dos calos, o agente seletivo foi removido do meio de cultivo. O processo de transformação de calos foi realizado três vezes, aos 6 (transformação 1 – TF1), 9 (transformação 2 - TF2) e 11 (transformação 3 - TF3) meses de subcultivo dos calos embriogênicos.

2.4. Regeneração de embriões somáticos

Os calos transformados foram regenerados em meio Yasuda, sendo subcultivados a cada 4 semanas em placas de petri de 90 mm descartáveis, mantidos em sala de crescimento inicialmente em luz indireta e posteriormente transferidos para luz. Para estimular a regeneração dos calos estes foram subdivididos em pequenas porções de aproximadamente 3 mm de diâmetro. Os embriões foram transferidos para meio de maturação (DÉCHAMP *et al.*, 2006), sendo subcultivados para o mesmo meio a cada 4 semanas até a completa expansão dos cotilédones, quando foram transferidos para frascos de vidro contendo meio de enraizamento, composto por sais e vitaminas do meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), acrescido de 100 mg.L⁻¹ de adenina, 400 mg.L⁻¹ extrato de malte e 30 g.L⁻¹ de sacarose, sem a adição de reguladores de crescimento e solidificado com 2,5 g.L⁻¹ de Phytigel™ (Sigma-Aldrich). A partir de então, os embriões/plântulas foram subcultivados a cada 30 a 40 dias. plântulas enraizadas foram transferidas para o meio T6 (ETIENNE, 2005), no qual foram mantidas até a coleta de material para as análises posteriores, sendo transferidas para meio fresco a cada 40 a 60 dias.

Para a detecção de mutações causadas pelo sistema CRISPR/Cas9 nos genes da rota de biossíntese da cafeína, foram selecionadas plântulas provenientes do processo de transformação, para as quais foi confirmada a inserção do T-DNA através da amplificação por PCR da sequência da Cas9. Foram coletadas folhas de 5 plântulas transformadas *in vitro* e duas plântulas controle não transformadas.

2.5. Extração de DNA genômico

As folhas coletadas para extração de DNA foram congeladas em nitrogênio líquido e maceradas no equipamento TissueLyser LT (QIAGEN) para evitar perdas das amostras.

Foi utilizado o protocolo de Extração CTAB (Cationic hexadecyl trimethyl ammonium bromide) (DOYLE; DOYLE, 1990) com modificações. Foi adicionado ao tecido vegetal macerado, em microtubo de 2 mL, 700 μ L de tampão CTAB, em seguida 28 μ L de β -mercaptoetanol e então 700 μ L de tampão CTAB restante. As soluções foram homogeneizadas por 30 segundos em vortex e incubadas em Thermomixer R® (Eppendorf) por 40 minutos a 65°C sendo homogeneizadas por inversão a cada 10 minutos; após as amostras foram transferidas para o gelo durante 5 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 11000 RPM, a fase aquosa foi coletada e transferida para tubos limpos, aos quais foi adicionado 800 μ L de solução de clorofórmio e álcool isoamílico, na proporção de 24:1 (v/v). As amostras foram homogeneizadas em vortex, centrifugadas por 10 minutos a 11000 RPM e o processo de lavagem com a solução de clorofórmio e álcool isoamílico foi repetido. O sobrenadante foi coletado (~600 μ L) e transferido para um tubo de 1,5mL, ao qual foi adicionado 600 μ L de álcool isopropílico; as amostras foram homogeneizadas por inversão e incubadas a -20°C por 1h, para a precipitação do DNA genômico. Para a precipitação do DNA, as amostras foram centrifugadas por 20 minutos a 11000 RPM, o sobrenadante foi descartado e adicionado 500 μ L de etanol 75% para lavagem do pellet; as amostras foram centrifugadas por 5 minutos e a lavagem foi repetida. O precipitado foi seco no vácuo por 5 minutos e ressuspendido em 25 μ L em água ultra pura adicionada de RNase (40 μ g.mL⁻¹).

2.6. Verificação da inserção do T-DNA

Para a confirmação da inserção do T-DNA no genoma das plantas de *C. canephora* foi realizada reação de PCR utilizando primers para a amplificação da sequência da *Cas9*, sendo as sequências destes: Fw1: 5' TATTCACGGGGTGCCTGCGG 3'; Rv1: 5' TGTGCCAGAGCGAGGTAGATCA 3'. As reações foram realizadas utilizando o NeoTaq DNA Polymerase Kit em termociclador Eppendorf Mastercycle, sendo o ciclo de amplificação composto de desnaturação inicial de 95 °C por 2 minutos, seguido por 35 ciclos compostos de três etapas: 95 °C, por 20 segundos; temperatura de anelamento de 60 °C por 20 segundos; 72

°C, por 20 segundos, e uma extensão final a 72 °C durante 5 minutos. O produto da reação foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1% e fotografado utilizando sistema fotodocumentador Spectroline Ultraviolet Transilluminator acoplado a uma câmera. Foram analisadas 6 plântulas quanto a inserção do T-DNA.

2.7. Detecção e sequenciamento de mutações nas plantas transgênicas

Foram realizadas reações de amplificação dos seguintes fragmentos: um fragmento de 881 pb do gene XMT compreendendo os dois sítios-alvo, um fragmento de 846 pb para o gene MXMT e um fragmento de 937 pb para o gene DXMT. As sequências de cada par de primers pode ser observada na tabela 4.1. Devido à alta similaridade dos genes XMT, MXTM e DXMT aos outros membros da família gênica a que pertencem, o desenho dos primers foi realizado manualmente, afim de utilizar a estratégia de um SNP (Single Nucleotide Polymorphisms) entre as sequências como última base na extremidade 3' do primer forward e/ou reverse, quando possível (FREITAS, 2019).

Tabela 4.1 – *Primers* utilizados para amplificação das regiões alvo.

Gene	Regiões Alvo	Primers (5' - 3')	Ta (°C)
<i>XMT</i>	1 e 2	Fw: GATACAAGCTACGCCAAGAATTCAG Rv: TACTGATCCCCAATTCAGTCACC	72
<i>MXMT</i>	1 e 2	Fw: TTTGTATTTTGGACTGGTATGTGTAA Rv: TCGAATGAATCCTTAGAAATGTGG	65
<i>DXMT</i>	1 e 2	Fw: GCGATACAAGCTACGCCAAGAAC Rv: TGGGCGGACGACTTGCTTT	72

Fonte: FREITAS, 2019.

As reações de PCR foram realizadas utilizando a enzima Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific), em um volume total de 20 µL. A fim de aumentar a recuperação do DNA amplificado após a purificação foram realizadas 3 reações independentes para cada amostra analisada. Foi utilizado um termociclador T100™ (Bio-rad), sendo o ciclo de amplificação composto de desnaturação inicial de 98 °C por 30 segundos, seguido por 35 ciclos compostos de três etapas: 98 °C, por 30 segundos; temperatura de anelamento por 30 segundos; 72 °C, por 30 segundos, e uma extensão final a 72 °C durante 5 minutos. A

temperatura de anelamento foi otimizada para cada par de primers (tabela 4.1). Para o fragmento referente ao gene XMT foi necessário a separação em gel de agarose a 2% do fragmento desejado de um fragmento inespecífico, com base no peso molecular deles.

Os produtos de PCR e fragmentos de gel foram purificados utilizando o kit comercial Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), seguindo as recomendações do fabricante. Os amplicons purificados foram clonados no vetor pGEM®-T Easy (Promega) e estes usados para transformação por choque térmico de células competentes de *E. coli* TOP 10 seguindo as recomendações para *One Shot™* TOP10 *Chemically Competent E. coli* (Invitrogen™). As células ultra competentes foram preparadas previamente de acordo com protocolo descrito por (SEIDMAN *et al.*, 2001). Após o crescimento de colônias isoladas em meio líquido overnight a 37 °C, o DNA plasmidial foi extraído e a inserção do fragmento no plasmídeo foi confirmada através da digestão com enzimas de restrição, sendo *NotI* (Jena Bioscience) para o gene XMT e *EcoRI* (Promega) para os demais. As mutações foram identificadas através de sequenciamento de Sanger (ACTGene Análises Moleculares), sendo que foram enviados para sequenciamento 4 clones de cada região alvo, para cada plântula.

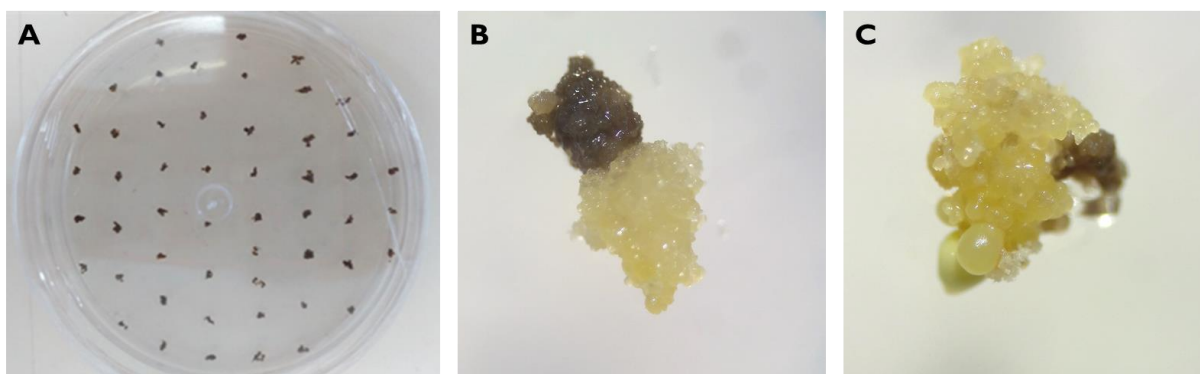
As sequências de plântulas possivelmente mutantes, controle e a sequência de referência foram alinhadas utilizando o alinhamento ClustalW, através do software MEGA-X (KUMAR *et al.*, 2018). As imagens dos resultados do alinhamento e mutações encontradas foram feitas através do software GeneDoc (NICHOLAS; NICHOLAS, 1997). A frequência de mutação nos eventos transformados foi calculada de acordo com a proporção de sequências clonadas apresentando mutações em relação ao total de sequências clonadas examinadas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Regeneração de embriões somáticos a partir de calos transformados

Após o procedimento de transformação, os calos apresentaram intensa oxidação. Após cerca de 9 meses da transformação, calos da TF1 não apresentaram qualquer regeneração. Já os calos das TF2 e TF3 começaram a apresentar o surgimento de pequenas porções de calos amarelos a partir de calos totalmente oxidados a partir de 4 meses após a transformação (figura 4.3). Tal comportamento já era esperado devido a ação do agente seletivo, higromicina, as porções que começaram a proliferar eram de células resistentes (RIBAS *et al.*, 2011). Os primeiros embriões globulares foram observados cerca de 4 meses após o aparecimento destes calos amarelos. Após o surgimento dos primeiros embriões, foi observada certa dificuldade em seu completo desenvolvimento. Apesar de serem obtidos numerosos embriões até o estágio cotiledonar, o enraizamento e desenvolvimento de novos pares de folhas foi bastante limitado.

Figura 4.3 – Evolução dos calos embriogênicos transformados ao longo dos meses após a transformação.



Legenda: A: 1 mês a após a transformação; B: 4 meses; C: 8 meses.

Fonte: da autora (2020).

Apesar do processo de transformação parecer não afetar negativamente a regeneração de calos embriogênicos de *C. arabica* e de altas taxas de regeneração e aclimatização de plantas serem obtidas (RIBAS *et al.*, 2011), o mesmo não pôde ser observado neste estudo. Em estudos envolvendo o silenciamento de genes na rota de biossíntese de cafeína por RNAi em *Camellia sinensis* (MOHANPURIA *et al.*, 2011) e *C. canephora* e *C. arabica* (OGITA *et al.*, 2004) não foram relatadas dificuldades na regeneração e desenvolvimento dos embriões somáticos. Ambos estudos utilizaram como explantes na transformação embriões somáticos previamente obtidos, os quais foram utilizados para regeneração por embriogênese direta. Assim, a redução dos índices

intrínsecos de cafeína parece não afetar o processo de embriogênese somática, pelo menos não na via direta. Em plantas de *C. canephora* em que a expressão do gene MXMT foi suprimida via RNAi foi observado significativa redução do conteúdo de cafeína, sem haver significativo acúmulo de xantosina, substrato da primeira reação específica da rota, sugerindo que não há acúmulo de qualquer composto que possa ser prejudicial nestas plantas (ASHIHARA *et al.*, 2006).

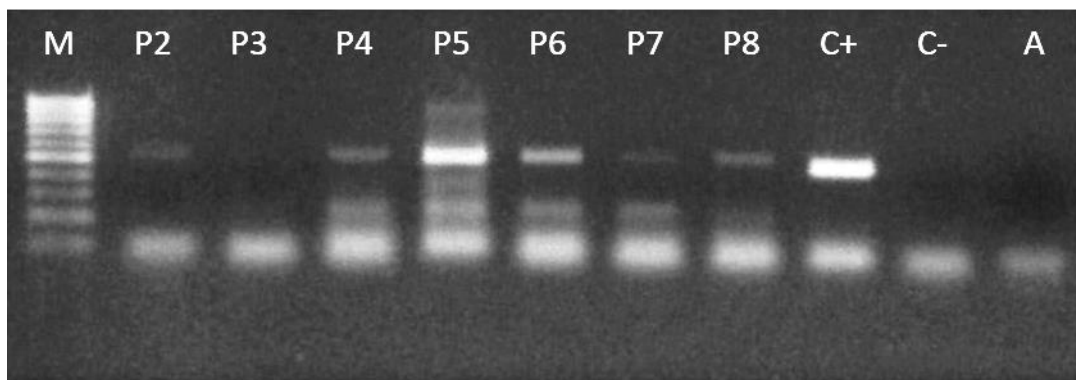
Entretanto um estudo demonstrou que, através de silenciamento gênico pós-transcricional (*post-transcriptional gene silencing* - PTGS) utilizando construções não específicas para os três genes da rota em *C. canephora*, foi possível obter embriões com redução de mais de 90% de cafeína, enquanto que em folhas de plantas de 7-8 meses a redução foi de 15-20%. A sobrevivência dos transformantes com maior redução dos índices de cafeína foi extremamente baixa, demonstrando que a cafeína e seus metabólitos são importantes para a sobrevivência e o desenvolvimento completo das plantas (MOHANAN *et al.*, 2014). Além disso, já foi demonstrado que a cafeína possui importante papel na defesa química e proteção de tecidos jovens de ataques de patógenos e herbívoros, bem como pode possuir função alelopática (ASHIHARA; SANO; CROZIER, 2008). Dessa forma, é possível supor que apenas os embriões/plântulas em que a redução não foi tão drástica sobreviveram também neste estudo.

Para TF2, apenas aqueles transformados com a construção p-COFEDIT-Cc-XMT apresentaram embriões regenerados, e em grande quantidade. Já na TF3, houve embriões regenerados com as construções p-COFEDIT-At-XMT e p-COFEDIT-Cc-XMT, em pequena quantidade para ambas. Por serem as que apresentaram melhor desenvolvimento *in vitro*, foram avaliadas posteriormente apenas plântulas da TF2.

3.2. Confirmação da transformação

Sete plântulas foram avaliadas quanto a inserção do T-DNA, estas foram obtidas na segunda transformação realizada, através de análise de PCR para amplificação da Cas9 (figura 4.4). Destas, 6 plântulas apresentaram amplificação da banda de cerca 500 pb esperada, as quais foram posteriormente avaliadas quanto à ocorrência de mutações nos genes alvo. Uma delas sofreu completa oxidação e seu DNA não foi utilizado para análises posteriores.

Figura 4.4 – Confirmação da integração do T-DNA em algumas plântulas via PCR utilizando primers específicos para Cas9. CORRIGIR IMAGEM



Legenda: M: marcador de peso molecular; P2-P8: plântulas transformadas; C-: plântula controle; A: controle negativo da reação (água); C+: controle positivo (DNA plasmidial).

Fonte: da autora (2020).

3.3. Verificação de mutações

Através da utilização de construções multiplex, com dois sgRNAs capazes de reconhecer duas regiões em cada um dos três genes, devido à alta similaridade entre eles, visou-se aumentar as chances de perturbações na rota e redução da produção de cafeína na planta. O gene XMT possui 1994 pb e 4 éxons, sendo os alvos nos éxons 2 e 3. Os mesmos sgRNAs também podem reconhecer regiões dos genes subsequentes da rota de biossíntese de cafeína MXMT e DXMT, os quais apresentam 1829 e 2006 pb, respectivamente, ambos com 4 éxons.

A partir do alinhamento dos fragmentos sequenciados de plântulas transformadas, plântulas controle e as sequências de referência dos genes XMT, MXMT e DXMT, foi possível verificar a ocorrência de mutações. Dentre as plântulas analisadas, para o gene XMT foi observada a ocorrência de mutação em apenas uma plântula (P5), em heterozigose, no alvo 1 (figura 4.5), sendo a inserção de apenas 1 nucleotídeo. Apesar de não ser observada edição bialélica nas plântulas analisadas até o momento, a técnica de mutagênese dirigida CRISPR/Cas9 é reconhecida pela sua elevada taxa de geração de mutações em homozigose ou bialélicas, havendo relatos de alta eficiência de edição em genomas diploides e octaplóides (WILSON *et al.*, 2019), em mono e dicotiledôneas (MA *et al.*, 2015).

Figura 4.5 – Representação do alinhamento das sequências obtidas para o gene CcXMT.

```

P5 (2) GCATTAAAGTTGCGGATTTGGGATGCGCTTCTGGACCAAACACACTTT
P5 (2) GCATTAAAGTTGCGGATTTGGGATGCGCTT-CTGGACCAAACACACTTT
C (2x4) GCATTAAAGTTGCGGATTTGGGATGCGCTT-CTGGACCAAACACACTTT

CcXMT GCATTAAAGTTGCGGATTTGGGATGCGCTT-CTGGACCAAACACACTTT

```

Legenda: plântulas controles (PC), plântula transformada (P5) e gene de referência (CcXMT) demonstrando as mutações obtidas para o gene XMT, alvo 1. Azul: Região para a qual foi desenhado o sgRNA; Amarelo: PAM; Rosa: adições de bases; Em parênteses: número de colônias sequenciadas, obtendo essa sequência.

Fonte: da autora (2020).

A eficiência do sistema CRISPR/Cas9 está relacionada a diversos fatores, entre eles os níveis de expressão tanto da *Cas9* quanto dos sgRNAs, sendo que este parece ter maior efeito limitante já que plântulas apresentando níveis muito baixos de expressão dos sgRNAs não apresentam mutações. Outros fatores importantes são a composição das sequências alvo (conteúdo CG, por exemplo) e a estrutura secundária dos sgRNAs (MA *et al.*, 2015).

Para o gene MXMT, não foram encontradas mutações em nenhuma das plântulas analisadas, em nenhum dos alvos. Já para o gene DXMT, apenas a plântula 5 apresentou mutações, sendo em heterozigose para os dois alvos (figura 4.6). No alvo 1 foi identificada a inserção de 1 nucleotídeo, enquanto no alvo 2 houve a deleção de 5 nucleotídeos. Como em outras espécies como *Populus* (FAN *et al.*, 2015), maçã e pera (CHARRIER *et al.*, 2019), as mutações foram pequenas deleções ou inserções nos nucleotídeos próximos ao sítio PAM.

Figura 4.6 – Representação do alinhamento das sequências obtidas para o gene CcDXMT.

```

P5 (3) .AAGTTGGGGATTTGGGATGCGCTTCTGGACCAA-----TCTTGAGAAAGAAAATGGACGCAAAATAGGATCGT
P5 (1) .AAGTTGCGGATTTGGGATGCGCTTCTGGACCAA-----ACTTGAGAAAGAAAATGGACGCAA-----GATCGT
PC (3) .AAGTTGGGGATTTGGGATGCGCTTCTGGACCAA-----TCTTGAGAAAGAAAATGGACGCAAAATAGGATCGT
PC (1) .AAGTTGCGGATTTGGGATGCGCTTCTGGACCAA-----ACTTGAGAAAGAAAATGGACGCAAAATAGGATCGT

CcDXMT .AAGTTGGGGATTTGGGATGCGCTTCTGGACCAA-----159pb-----TCTTGAGAAAGAAAATGGACGCAAAATAGGATCGT
          *                               *
          Alvo 1                           Alvo 2

```

Legenda: plântula controle (PC), plântula transformada (P5) e gene de referência (CcDXMT) demonstrando as mutações obtidas para o gene DXMT, alvos 1 e 2. Azul: Região para a qual foi desenhado o sgRNA; Amarelo: PAM; Rosa: adições de bases; Verde: deleções. Em parênteses: número de colônias sequenciadas, obtendo essa sequência; * representam *mismatches*; - traços representam uma distância de 159 pb entre as regiões representadas.

Fonte: da autora (2020).

Como também pode ser observado na figura 4.6, um dos alelos do gene CcDXMT do genótipo utilizado apresenta um *mismatch* em relação à sequência de referência e sgRNA utilizado. Apesar disso, o alelo apresentando mutação foi justamente o que apresenta *mismatch*,

corroborando com achados anteriores que demonstram que o sistema tolera até mesmo múltiplos *mismatches* na região distal a PAM no sgRNA e que apenas os 8-12 nt na região 3' terminal (sequência semente) são realmente necessários para o reconhecimento e clivagem da região alvo (BORTESI; FISCHER, 2015),

As taxas de eficiência de indução de mutações podem ser observadas na tabela 4.2, sendo que para o alvo 1 do gene XMT, alvo 1 e alvo 2 do gene DXMT foi obtido 10% de taxa de mutação em heterozigose. Para os demais alvos e mutações em homozigose a taxa foi zero. Assim, do total de alvos passíveis de mutação, nas plântulas analisadas, obteve-se uma taxa de 5% de mutações, apenas em heterozigose.

Tabela 4.2 – Taxas de cada tipo de mutação nos dois sítios-alvo por gene de NMTs.

Genes	Alvo 1		Alvo 2	
	Homozigoze	Heterozigose	Homozigoze	Heterozigose
XMT	0	10%	0	0
MXMT	0	0	0	0
DXMT	0	5%	0	5%
Total*		5%		

Legenda: Total* corresponde à taxa de mutações obtidas em razão de todos alvos em todos os genes.
Fonte: da autora (2020).

Mesmo com mutações apenas em heterozigose, poder-se-ia esperar que a P5 apresentasse deficiência na produção de cafeína, uma vez que foram detectadas mutações em dois dos genes da rota. Entretanto, essa hipótese não pôde ser testada pois a plântula oxidou completamente antes de atingir o desenvolvimento necessário para aclimatização e posterior quantificação dos níveis de cafeína. Atualmente, estão disponíveis para análises pelo menos outras 10 plântulas, além disso muitos embriões ainda vêm sendo obtidos a partir de calos transformados. Estes precisam passar pelas etapas de verificação de inserção do T-DNA e da ocorrência de mutações, aclimatização e quantificação de cafeína.

Já foi demonstrado que o silenciamento de genes da rota de biossíntese de cafeína, em diferentes espécies, através da técnica de RNAi, pode reduzir o teor de cafeína e teobromina em plântulas. Em *C. canephora* foi observada a redução de 30-80% dos teores de teobromina e 50-70% de cafeína com o silenciamento do gene MXMT em folhas jovens (OGITA *et al.*, 2003b), em *C. canephora* e *C. arabica*, tendo como alvo o mesmo gene, foi também observada redução dos transcritos de XMT e DXMT, além da redução de 30-50% de cafeína e teobromina

(OGITA *et al.*, 2004). Em *C. sinensis* foi observada significativa supressão dos transcritos do gene da cafeína sintase (CS) e redução de 44-67% os teores de cafeína e teobromina (MOHANPURIA *et al.*, 2011). Nenhum relato da utilização do sistema CRISPR/Cas9 para o silenciamento de genes dessa rota foi encontrado.

Para reduzir custos com o sequenciamento das plântulas obtidas e o tempo despendido no preparo das amostras para tal, poderá ser adotada alguma estratégia de *screening* de mutantes entre as plântulas a serem analisadas. Muitas técnicas já foram relatadas para este fim como reações de PCR seguidas de ensaios com enzimas de restrição, ensaios com a T7 endonuclease I, ensaios de *high-resolution melting* (HRM), modificações na técnica de PCR convencional como ACT-PCR (*Annealing at Critical Temperature - PCR*), entre outros (HUA *et al.*, 2017).

4. CONCLUSÕES

Considerando os resultados apresentados é possível concluir que a técnica de edição genômica CRISPR/Cas9 pode ser utilizada para promover mutações dirigidas e pontuais nos genes da rota de biossíntese de cafeína em *Coffea canephora*. Novas plantas devem ser avaliadas e análises complementares devem ser realizadas para confirmar a hipótese de que tais mutações são capazes de reduzir os níveis de cafeína produzido pelas plantas. Tais resultados poderão viabilizar a futura obtenção de genótipos comerciais com redução intrínseca de cafeína, gerando um produto de elevado valor agregado e sem concorrência direta no mercado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASHIHARA, Hiroshi; SANO, Hiroshi; CROZIER, Alan. Caffeine and related purine alkaloids: Biosynthesis, catabolism, function and genetic engineering. **Phytochemistry Pergamon**, 2008. DOI: 10.1016/j.phytochem.2007.10.029.

ASHIHARA, Hiroshi; ZHENG, Xin-Qiang; KATAHIRA, Riko; MORIMOTO, Masayuki; OGITA, Shinjiro; SANO, Hiroshi. Caffeine biosynthesis and adenine metabolism in transgenic *Coffea canephora* plants with reduced expression of N-methyltransferase genes. **Phytochemistry**, v. 67, n. 9, p. 882–886, 2006. DOI: 10.1016/j.phytochem.2006.02.016. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0031942206001154>. Acesso em: 11 mar. 2020.

BORTESI, Luisa; FISCHER, Rainer. The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 1, p. 41–52, 2015. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2014.12.006. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0734975014001931>.

BREITLER, Jean-Christophe; MEYNARD, Donaldo; VAN BOXTEL, Jos; ROYER, Monique; BONNOT, François; CAMBILLAU, Laurence; GUIDERDONI, Emmanuel. A novel two T-DNA binary vector allows efficient generation of marker-free transgenic plants in three elite cultivars of rice (*Oryza sativa* L.). **Transgenic research**, v. 13, n. 3, p. 271–287, 2004.

CHARRIER, André; BERTHAUD, Julien. Botanical classification of coffee. In: **Coffee**. London : Croom Helm, c1985., 1985. p. 13–47. DOI: 10.1007/978-1-4615-6657-1. Disponível em: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201302691785>. Acesso em: 10 ago. 2017.

CHARRIER, Aurélie *et al.* Efficient Targeted Mutagenesis in Apple and First Time Edition of Pear Using the CRISPR-Cas9 System. **Frontiers in Plant Science**, [S. l.], v. 10, n. February, p. 1–12, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00040>

DÉCHAMP, Eveline; BREITLER, Jean Christophe; LEROY, Thierry; ETIENNE, Hervé; KAN, Wang. Coffee (*Coffea arabica* L.). In: **Agrobacterium Protocols: Third Edition**. Springer, New York, NY, 2006. v. 343p. 275–291. DOI: 10.1385/1597451304. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1385/1597451304>. Acesso em: 7 jan. 2019.

DENOEUDE, France *et al.* The coffee genome provides insight into the convergent evolution of caffeine biosynthesis. **Science**, v. 345, n. 6201, p. 1181–1184, 2014. DOI: 10.1126/science.1255274.

DOYLE, Jeff J.; DOYLE, Jane L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12, n. 13, p. 39–40, 1990.

ETIENNE, H. Somatic Embryogenesis Protocol: Coffee (*Coffea arabica* L. and *C. canephora* P.). In: **Protocol for Somatic Embryogenesis in Woody Plants**. Springer-Verlag, 2005. p. 167–179. DOI: 10.1007/1-4020-2985-3_14.

FAN, Di *et al.* Efficient CRISPR/Cas9-mediated Targeted Mutagenesis in Populus in the First Generation. **Scientific reports**, [S. l.], v. 5, p. 12217, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/srep12217>

FREITAS, Natália Chagas. **Sistema CRISPR/Cas9 visando a edição genômica no alotetraploide *Coffea arabica***. 2019. Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2019.

HUA, Yufeng; WANG, Chun; HUANG, Jian; WANG, Kejian. A simple and efficient method for CRISPR/Cas9-induced mutant screening. **Journal of Genetics and Genomics**, 2017. DOI: 10.1016/j.jgg.2017.03.005.

KUMAR, Sudhir; STECHER, Glen; LI, Michael; KNYAZ, Christina; TAMURA, Koichiro. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. **Molecular Biology and Evolution**, v. 35, n. 6, p. 1547–1549, 2018. DOI: 10.1093/molbev/msy096.

LI, Rui Ran; LI, Rui Ran; LI, Xindi; FU, Daqi; ZHU, Benzong; TIAN, Huiqin; LUO, Yunbo; ZHU, Hongliang. Multiplexed CRISPR/Cas9-mediated metabolic engineering of γ -aminobutyric acid levels in *Solanum lycopersicum*. **Plant Biotechnology Journal**, v. 16, n. 2, p. 415–427, 2018. DOI: 10.1111/pbi.12781.

MA, Xingliang; CHEN, Letian; ZHU, Qinlong; CHEN, Yuanling; LIU, Yao-Guang; EDITOR, Dear. Rapid Decoding of Sequence-Specific Nuclease-Induced Heterozygous and Biallelic Mutations by Direct Sequencing of PCR Products. **Molecular Plant**, v. 8, n. 8, p. 1285–1287, 2015. DOI: 10.1016/j.molp.2015.02.012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molp.2015.02.012>. Acesso em: 12 fev. 2020.

MA, Xingliang; ZHU, Qinlong; CHEN, Yuanling; LIU, Yao Guang. CRISPR/Cas9 Platforms for Genome Editing in Plants: Developments and Applications. **Molecular Plant**, v. 9, n. 7, p. 961–974, 2016. DOI: 10.1016/j.molp.2016.04.009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molp.2016.04.009>.

MARTINS, Ana Luiza. **História do café**. [s.l.] : Editora contexto, 2012.

MAZZAFERA, Paulo. Which is the by-product: Caffeine or decaf coffee? **Food and Energy Security**, v. 1, n. 1, p. 70–75, 2012. DOI: 10.1002/fes3.4. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/fes3.4>. Acesso em: 15 fev. 2020.

MERCX, Sébastien; SMARGIASSO, Nicolas; CHAUMONT, François; DE PAUW, Edwin; BOUTRY, Marc; NAVARRE, Catherine. Inactivation of the $\beta(1,2)$ -xylosyltransferase and the $\alpha(1,3)$ -fucosyltransferase genes in *Nicotiana tabacum* BY-2 Cells by a Multiplex CRISPR/Cas9 Strategy Results in Glycoproteins without Plant-Specific Glycans. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 403, 2017. DOI: 10.3389/fpls.2017.00403. Disponível em: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2017.00403/full>. Acesso em: 18 mar. 2020.

MOHANAN, Shibin; SATYANARAYANA, Kandukuri V; SRIDEVI, V.; GOWDA, Kalpashree; GIRIDHAR, Parvatam; CHANDRASHEKAR, Arun; RAVISHANKAR, Gokare A. Evaluating the effect and effectiveness of different constructs with a conserved sequence for silencing of *Coffea canephora* N-methyltransferases. **Journal of plant biochemistry and biotechnology**, v. 23, n. 4, p. 399–409, 2014.

MOHANPURIA, Prashant; KUMAR, Vinay; AHUJA, Paramvir Singh; YADAV, Sudesh Kumar. Producing low-caffeine tea through post-transcriptional silencing of caffeine synthase mRNA. **Plant Molecular Biology**, v. 76, n. 6, p. 523–534, 2011. DOI: 10.1007/s11103-011-9785-x.

MURASHIGE, Toshio; SKOOG, Folke. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473–497, 1962. DOI:

10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>. Acesso em: 15 nov. 2014.

NICHOLAS, K. B.; NICHOLAS, H. B. Jr. **GeneDoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments**. Distributed by the author. URL at: www.cris.com/~Ketchup/genedoc.shtml, 1997.

OGAWA, Mikihiro; HERAI, Yuka; KOIZUMI, Nozomu; KUSANO, Tomonobu; SANO, Hiroshi. 7-Methylxanthine Methyltransferase of Coffee Plants. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 11, p. 8213–8218, 2001. DOI: 10.1074/jbc.M009480200. Disponível em: <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M009480200>. Acesso em: 16 fev. 2020.

OGITA, Shinjiro; UEFUJI, Hirotaka; MORIMOTO, Masayuki; SANO, Hiroshi. Application of RNAi to confirm theobromine as the major intermediate for caffeine biosynthesis in coffee plants with potential for construction of decaffeinated varieties. **Plant Molecular Biology**, v. 54, n. 6, p. 931–941, 2004. DOI: 10.1007/s11103-004-0393-x.

OGITA, Shinjiro; UEFUJI, Hirotaka; YAMAGUCHI, Yube; NOZOMU, Koizumi; SANO, Hiroshi. Producing decaffeinated coffee plants. **Nature**, v. 423, n. 6942, p. 823, 2003. DOI: 10.1038/423823a.

PIETSCH, Arne. Decaffeination-Process and Quality. In: **The Craft and Science of Coffee**. [s.l.] : Elsevier Inc., 2017. p. 225–143. DOI: 10.1016/B978-0-12-803520-7.00010-4.

RIBAS, Alessandra F.; DECHAMP, Eveline; CHAMPION, Anthony; BERTRAND, Benoît; COMBES, Marie-christine; VERDEIL, Jean-luc; LAPEYRE, Fabienne; LASHERMES, Philippe; ETIENNE, Hervé. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of *Coffea arabica* (L.) is greatly enhanced by using established embryogenic callus cultures. **BMC plant biology**, v. 11, n. 1, p. 92, 2011. DOI: 10.1186/1471-2229-11-92. Disponível em: <http://www.biomedcentral.com/1471-2229/11/92>.

SATYANARAYANA, K. V.; KUMAR, Vinod; CHANDRASHEKAR, A.; RAVISHANKAR, G. A. Isolation of promoter for N-methyltransferase gene associated with caffeine biosynthesis in *Coffea canephora*. **Journal of Biotechnology**, v. 119, n. 1, p. 20–25, 2005. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2005.06.008. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168165605002981>. Acesso em: 11 mar. 2020.

SEIDMAN, Christine E.; STRUHL, Kevin; SHEEN, Jen; JESSEN, Timm. Introduction of Plasmid DNA into Cells. In: **Current Protocols in Molecular Biology**. [s.l.] : John Wiley & Sons, Inc., 2001. v. Chapter 1. DOI: 10.1002/0471142727.mb0108s37.

SILVAROLLA, Maria B.; MAZZAFERA, Paulo; FAZUOLI, Luiz C. A naturally decaffeinated arabica coffee. **Nature**, v. 429, n. 6994, p. 826, 2004. DOI: 10.1038/429826a.

TOROK, Aron; MIZIK, Tamas; JAMBOR, Attila. The Competitiveness of Global Coffee Trade. **International Journal of Economics and Financial Issues**, v. 8, n. 5, p. 1, 2018.

WANG, Wei *et al.* Transgenerational CRISPR-Cas9 Activity Facilitates Multiplex Gene Editing in Allopolyploid Wheat. **The CRISPR Journal**, [S. l.], v. 1, n. 1, p. 65–74, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1089/crispr.2017.0010>. Acesso em: 29 jul. 2020.

WILSON, Fiona M.; HARRISON, Kate; ARMITAGE, Andrew D.; SIMKIN, Andrew J.;

HARRISON, Richard J. CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of phytoene desaturase in diploid and octoploid strawberry. **Plant Methods**, v. 15, n. 1, p. 1–13, 2019. DOI: 10.1186/s13007-019-0428-6. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13007-019-0428-6>.

YASUDA, Takeshi; FUJII, Yoko; YAMAGUCHI, Tadashi. Embryogenic Callus Induction from *Coffea arabica* Leaf Explants by Benzyladenine. **Growth (Lakeland)**, v. 26, n. 3, p. 595–597, 1985. DOI: 10.1093/oxfordjournals.pcp.a076946.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Os resultados obtidos neste trabalho permitirão a condução de novos experimentos, como transformação de explantes foliares para regeneração via embriogênese direta e a obtenção de plantas transformadas em um tempo muito mais curto do que foi necessário nos experimentos de transformação já realizados com calos embriogênicos de *Coffea canephora*;
- O genótipo utilizado tem forte influência no sucesso da regeneração de plantas mutantes para o gene CcPDS;
- Muitas plantas albinas ainda estão sendo mantidas *in vitro* e poderão ser utilizadas para novos estudos de genômica funcional;
- Análises complementares de quantificação de pigmentos fotossintéticos poderão ser realizadas com as plantas de diferentes fenótipos que foram obtidas;
- Novas plantas possivelmente mutantes para a síntese de cafeína poderão ser analisadas, a fim de verificar, além das mutações, a redução dos teores de cafeína. Uma estratégia de *screening* poderá ser adotada para identificação dos mutantes e reduzir o tempo e custo no preparo de amostras e sequenciamento.