



DESENVOLVIMENTO DE CULTIVO DE PROTOPLASTOS DE CAFÉ PARA USO NA TÉCNICA DE CRISPR-CAS9

Maria Clara de Oliveira **Marcondes**¹; Rodrigo Rocha **Latado**²; Oliveira Guerreiro **Filho**³

Nº 24131

RESUMO – O café é uma das bebidas mais consumidas no mundo, sendo o melhoramento genético desta espécie dificultado pelo ciclo longo. A técnica de CRISPR-Cas9 possibilita modificar geneticamente plantas sem a introdução de DNA-extra, facilitando a regulamentação e comercialização. Como a parede celular vegetal oferece resistência mecânica à inserção de DNA exógeno, uma alternativa seria o uso de protoplastos, células sem parede celular. O objetivo deste estudo foi desenvolver um protocolo eficiente para obtenção e regeneração de protoplastos de café visando o uso no método CRISPR-Cas9. Suspensões celulares de café var. Bourbon foram obtidas a partir de calos embriogênicos, originados inicialmente de discos foliares. O meio de indução de calos e de cultivo de suspensões foi composto por sais MS, 20 g/L sacarose, 0,4 g/L extrato malte, 0,1 g/L mio-inositol, 0,1 g/L caseína, 20 µM 2,4-D, 20,2 µM 2i-P e 6,5 g/L agar. Os protoplastos foram isolados utilizando solução enzimática contendo 2% Celulase, 0,2% Driselase, 0,2% Macerozyme e 0,7 M manitol, em condições de escuro, agitação (60 rpm), por 14h. O cultivo dos protoplastos foi feito em meio semi-sólido (T4 – 0,7M) com uso de 2 mL de meio banho (T4 - 0,7M). Semanalmente, a osmolaridade do meio de cultura foi reduzida adicionando gotas de meio T4 (0,088 M). Os protoplastos foram avaliados semanalmente, observando se houve restabelecimento da parede celular, divisões e formação de microcolônias. Até o momento calos e suspensões foram obtidas, protoplastos foram isolados mas ainda não se observou divisões celulares. Outros meios de cultivo serão testados.

Palavras-chaves: Edição genética, Cultura de tecidos, Regeneração.

1 Autor, Bolsista CNPq (PIBIC): Graduação em Bacharelado em Biotecnologia, UFSCar, Araras-SP, mmarcondes@estudante.ufscar.br.

2 Colaborador, Pesquisador Instituto Agrônomo de Campinas, Centro de Citricultura "Sylvio Moreira", Cordeirópolis-SP.

3 Orientador: Pesquisador Instituto Agrônomo de Campinas, Centro de Café "Alcides Carvalho", Campinas-SP, oliveiro.guerreiro@sp.gov.br.



ABSTRACT – Coffee is one of the most consumed beverages in the world, and the genetic improvement of this species is challenging due to its long life cycle. The CRISPR-Cas9 technique enables genetic modification of plants without introducing extra DNA, facilitating regulation and commercialization. Because the plant cell wall provides mechanical resistance to the insertion of exogenous DNA, an alternative can be the use of protoplasts, cells without a cell wall, as an explant. The aim of this study was to develop an efficient protocol for obtaining and regenerating coffee protoplasts for use in the CRISPR-Cas9 method. Coffee var. Bourbon cell suspensions were obtained from embryogenic calli, which were initially derived from leaf discs. The callus and cell suspension medium consisted of MS salts, 20 g/L sucrose, 0.4 g/L malt extract, 0.1 g/L myo-inositol, 0.1 g/L casein, 20 μ M 2,4-D, 20.2 μ M 2i-P, and 6.5 g/L agar. Protoplasts were isolated using an enzymatic solution containing 2% cellulase, 0.2% driselase, 0.2% macerozyme, and 0.7 M mannitol, under dark conditions, with agitation (60 rpm) for 14 hours. The protoplasts were cultivated in a semi-solid medium (T4 – 0.7 M) using 2 mL of the bath liquid medium (T4 – 0.7 M). Weekly, the osmolarity of the liquid medium was reduced by adding drops of T4 medium (0.088 M). Protoplasts were evaluated weekly to check for cell wall restoration, division, and microcolony formation. So far, calli and cell suspension have been obtained, protoplasts have been isolated, but cell divisions have not yet been observed. Other cultivation media will be tested.

Keywords: Genetic editing, Tissue culture, Regeneration.