

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CASSIANA DE OLIVEIRA

ORGANOGENESE *IN VITRO* E TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE *Eucalyptus grandis*
x Eucalyptus urophylla VIA *Agrobacterium tumefaciens*

CURITIBA
2013

CASSIANA DE OLIVEIRA

ORGANOGENESE *IN VITRO* E TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE *Eucalyptus grandis*
x Eucalyptus urophylla VIA *Agrobacterium tumefaciens*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Produção Vegetal, Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Marguerite G. G. Quoirin
Co-orientadora: Dr.^a Juliana Degenhardt-Goldbach

CURITIBA
2013

O48 Oliveira, Cassiana de

Organogênese in vitro e transformação genética de
Eucalyptus grandis x *Eucalyptus urophylla* via *Agrobacterium*
tumefaciens / Cassiana de Oliveira. – Curitiba, 2013.
101 f. : il.

Orientador: Marguerite G. G. Quoirin

Co-orientador: Juliana Degenhardt-Goldbach

Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal
do Paraná. Setor de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação
em Agronomia – Produção Vegetal.

1. Eucalipto – Melhoramento genético. 2. Genética vegetal.
3. Plantas transgênicas. I. Quoirin, Marguerite G. G.
II. Degenhardt-Goldbach, Juliana. III. Universidade Federal do
Paraná. Setor de Ciências Agrárias. Programa de Pós Graduação
em Agronomia – Produção Vegetal. IV. Título.

CDU 631.528:582.776

Aos meus pais, Maria Regina e Henrique,
dedico como reconhecimento ao amor que
sempre a mim ofereceram e aos alicerces da
formação que têm orientado meu caminho!

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Prof.^a Dr.^a Marguerite Quoirin, por seu exemplo de profissionalismo e caráter, por todo aprendizado profissional e pessoal que me proporcionou.

À Dr.^a Juliana Degenhardt-Goldbach, pela orientação, amizade, apoio e contribuições.

Ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Produção Vegetal da Universidade Federal do Paraná pela oportunidade da realização deste trabalho.

À Embrapa Florestas, pelo suporte prestado durante as conduções dos experimentos.

À CAPES, pela bolsa concedida.

Ao Laboratório de Micropropagação de Plantas do Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo da UFPR.

À Prof.^a Dr.^a Erika Amano, pelo auxílio e orientação durante o estudo histológico.

Ao Laboratório de Botânica Estrutural do Departamento de Botânica da UFPR.

À banca da pré-defesa, Dr.^a Giovana Bomfim de Alcantara, Dr.^a Juliana Degenhardt-Goldbach e Prof.^a Dr.^a Marguerite Quoirin, pelas valiosas orientações e direcionamento prestado.

Ao Prof. Dr. João Carlos Bessalho Filho, pela ajuda, pelos conselhos e por me motivar quando ainda era uma graduanda.

Ao Roberson Dibax, nunca terei palavras para expressar meus agradecimentos por tudo, pela iniciação ao mundo acadêmico, pelos ensinamentos no laboratório, pelos conselhos na vida pessoal, pela amizade sincera.

À Yohana de Oliveira Cauduro, pela sempre disponibilidade em ajudar e, principalmente, por certa vez, em uma noite de trabalho no laboratório, me dizer palavras de conforto e motivação, que foram o incentivo que faltava para iniciar a vida acadêmica, jamais esquecerei, muito obrigada.

As queridas amigas Anne Caroline, Mayara e Ligia por ser meu porto seguro, sem vocês não teria chegado ao fim desta trajetória.

As maravilhosas amigas do laboratório, Laís, Vanessa, Caroline, Gabriela, Bruna, Yohana, Giovana, Valéria e Fernanda, por todos os momentos juntas nesses dois anos, pelo apoio, pela ajuda e pela amizade que será eternamente lembrada.

Aos amigos da Botânica, João, Rodrigo, Deni, Ligia, Cristina, Silvia e Sheila, que estiveram comigo em todos os momentos, que me ajudaram, me ensinaram muito e que sei que posso contar sempre.

A Bruna e Gisela, por toda a amizade, risadas, conselhos e auxílios prestados durante o estágio comigo.

Aos colegas da Pós-Graduação, hoje mais que colegas, amigos queridos.

Aos meus pais, por me aguentar durante o processo criativo, me apoiar e nunca me deixar desistir.

Meus sinceros agradecimentos.

Jamais poderemos ser suficientemente gratos a
Deus, nossos pais e nossos mestres.

Aristóteles

ORGANOGENESE *IN VITRO* E TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* VIA *Agrobacterium tumefaciens*

RESUMO GERAL

Eucalyptus grandis x *E. urophylla* se destaca em plantios brasileiros devido às características que herdou de seus parentais, como qualidade da madeira para a produção de papel e celulose. O objetivo deste trabalho foi desenvolver um protocolo de organogênese indireta com explantes foliares e aperfeiçoar aspectos da transformação genética mediante co-cultura com *Agrobacterium tumefaciens*. Para estabelecer o protocolo de organogênese indireta, na fase de calogênese, testaram-se diferentes concentrações de ANA e, em seguida, de TDZ combinado com ANA ou com 2,4-D no meio de cultura JADS por 30 dias, seguido de subcultura em meio de regeneração, contendo 5,0 μM de BAP e 0,5 μM de ANA por mais 30 dias. Nesses meios, os explantes tiveram alta oxidação. A fim de diminuir a oxidação, diferentes meios de cultura foram comparados: WPM, MS, JADS e QL. Obteve-se a maior porcentagem de regeneração e menor taxa de oxidação após cultura em meio WPM seguido de transferência a meio de regeneração. Assim, testaram-se ANA e 2,4-D combinado com TDZ, e em seguida, TDZ e BAP combinado com ANA no meio de cultura WPM. O tratamento mais eficiente em termos de regeneração de gemas foi o meio de cultura WPM e a combinação de 0,25 μM de TDZ e 0,1 μM de ANA por 30 dias para a calogênese e, em seguida, 5,0 μM de BAP e de 0,5 μM de ANA por outros 30 dias. Este protocolo proporcionou uma regeneração de brotos de até 46%, com uma baixa oxidação dos tecidos. Observou-se que a idade das brotações utilizadas como fonte de explantes não tinha efeito sobre a organogênese e que pode-se utilizar explantes de 3, 4 ou 5 semanas na última subcultura. Para determinar as concentrações dos agentes seletivos que seriam utilizadas durante a transformação genética, testaram-se diferentes concentrações de canamicina, glufosinato de amônio e manose combinada com sacarose. Os resultados mostraram que se deve iniciar a seleção das plantas transformadas com o gene *nptII* em 12,5 mg L⁻¹ de canamicina; para plantas transformadas com o gene *bar* em 0,5 mg L⁻¹ de glufosinato de amônio; para plantas transformadas com o gene *pmi* em 22,5 g de sacarose e 7,5 g de manose. Experimento visando testar Augmentin[®] e cefotaxima na eliminação de *Agrobacterium tumefaciens* também foi realizado. Na presença de Augmentin, os explantes formaram calos brancos e não oxidados, enquanto que, na presença de cefotaxima, os calos oxidaram. Para diminuir a oxidação imediata dos explantes transformados com o gene *bar*, esses foram deixados um mês sem glufosinato de amônio após a co-cultura, enquanto que no controle os explantes ficaram em meio de cultura com o agente seletivo. Neste experimento, todos os explantes do controle oxidaram e necrosaram, não formando calos, enquanto que os explantes que foram mantidos um mês sem glufosinato de amônio formaram calos. No entanto não houve regeneração de gemas o que impediu avaliar a eficiência da transformação genética. Além da transformação de explantes foliares com o gene *bar*, realizou-se transformação com o gene *nptII*, a qual originou brotações resistentes a 50 mg L⁻¹ de canamicina.

Palavras chave: Cultura de tecidos, plantas transgênicas, eucalipto.

**IN VITRO ORGANOGENESIS AND GENETIC TRANSFORMATION OF
Eucalyptus grandis x *Eucalyptus urophylla* VIA *Agrobacterium tumefaciens***

ABSTRACT

Eucalyptus grandis x *E. urophylla* stands out in plantations in Brazil due to the characteristics it inherited from its parents, such as wood quality for pulp and paper production. The aim of this study was to develop a protocol for indirect organogenesis in leaf explants and improve aspects of genetic transformation by co-cultivation with *Agrobacterium tumefaciens*. To establish the protocol for indirect organogenesis, during callogenesis stage, several concentrations of NAA and then NAA or 2,4-D combined with TDZ were tested in JADS culture medium for 30 days, followed by subculture of the explants on the regeneration medium, supplemented with 5,0 μM BAP and 0,5 μM NAA for another 30 days. In these media, the explants oxidation rate was high. Thus, in order to reduce oxidation, different culture media were compared: WPM, MS, JADS and QL, followed by transfer of the explants on regeneration medium. The highest percentage of regeneration and the lowest oxidation rate were obtained on WPM. Thus, we tested NAA and 2,4-D in combination with TDZ and then TDZ and BAP combined with NAA in WPM medium. The most efficient treatment in terms of bud and shoot regeneration was WPM and the combination of 0.25 μM TDZ and 0.1 μM NAA during 30 days for callus induction and then 5.0 μM BAP and 0.5 μM NAA for another 30 days. This protocol yielded a regeneration rate of 46%, with a low oxidation of tissues. We also sought to know if the culture time in the last subculture of shoots source of explants affected organogenesis. The result was that the subcultures of 3, 4 or 5 weeks had no influence on organogenesis process. To determine the concentrations of selective agents that would be used in genetic transformation, we tested three concentrations of kanamycin, glufosinate ammonium and mannose combined with sucrose. The results showed that *nptII* transformed plants may be selected in 12.5 mg L^{-1} kanamycin supplemented medium. For plants transformed with the *bar* gene 0.5 mg L^{-1} glufosinate ammonium is adequate and plant transformed with the *pmi* gene may be selected in a medium containing 22.5g sucrose and 7.5 g mannose. Experiment aimed at testing Augmentin[®] and cefotaxime in eliminating *Agrobacterium tumefaciens* was also performed. The antibiotic Augmentin provides explants with white and not oxidized callus, while callus oxidized in the presence of cefotaxime. To lessen the immediate oxidation of explants transformed with the *bar* gene, the explants were left one month without glufosinate ammonium after co-culture, while the control explants were cultured on a medium containing the selective agent. In this experiment, all explants on control medium oxidized, without forming callus, while the explants that were maintained one month without glufosinate ammonium formed calluses. However there was no regeneration of buds what impeded the evaluation of the efficiency of genetic transformation. In addition to transformation of leaf explants with the *bar* gene, transformation was also done with the *nptII* gene, which originated shoots resistant to 50 mg L^{-1} kanamycin.

Key words: Tissue culture, transgenic plant, eucalypts.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Corte longitudinal de um explante foliar com 20 dias de cultivo. Setas indicam a formação de calos no pecíolo (P) e no corte da ponta do explante foliar (PF).....61
- Figura 2 Cortes longitudinais de explantes foliares (A) com 30 dias de cultivo e (B, C, D, E, F, G e H) com 45 dias de cultivo. A – Detalhe do pecíolo com 30 dias, seta indica a formação de feixe vascular. B – Detalhe do pecíolo com 45 dias, setas indicam feixes vasculares. C – Pecíolo, setas indicam feixes vasculares. D, E – Setas indicam a alta divisão celular, com conseqüente formação de calos e o entumescimento na base do explante. F – Detalhe da formação de calos. G – Formação de massa calogênica no explante, setas indicam cada calo. H – Detalhe da formação de calos, setas indicam feixes vasculares em cada novo calo.....62
- Figura 3 Presença de antocianinas em calos originados de explantes foliares de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* após 60 dias de cultivo *in vitro* em meio de cultura WPM suplementado com 0,5 μM de TDZ e 0,1 μM de ANA por 30 dias e com 5,0 μM de BAP e 0,5 μM de ANA nos 30 dias seguintes. Barra = 5 mm..... 63
- Figura 4 Mapa da construção do T-DNA com o gene *bar* utilizado na transformação genética de explantes foliares de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*.....76
- Figura 5 Mapa da construção do T-DNA com o gene *nptII* utilizado na transformação genética de explantes foliares de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*.....78
- Figura 6 Efeito de baixas concentrações de canamicina (Km) na formação de calos, gemas e oxidação de explantes foliares de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*, avaliados após 60 dias. O meio de cultura foi o WPM com 0,5 μM de TDZ e 0,1 μM de ANA nos 30 primeiros dias e com 5,0 μM de BAP e 0,5 μM de ANA nos últimos 30 dias..... 80
- Figura 7 Efeito de baixas concentrações de canamicina na organogênese indireta de explantes foliares de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* após 60 dias de cultivo. O meio de cultura foi o WPM com 0,5 μM de TDZ e 0,1 μM de ANA nos 30 primeiros dias e com 5,0 μM de BAP e 0,5 μM de ANA nos últimos 30 dias. A: 0 mg L^{-1} , B: 3 mg L^{-1} , C: 6 mg L^{-1} , D: 9 mg L^{-1} e E: 12 mg L^{-1} . Barra = 5 mm..... 81

- Figura 8 Efeito da canamicina (Km) na formação de calos, gemas e oxidação de explantes foliares de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*, avaliados após 60 dias. O meio de cultura foi o WPM com 0,5 μM de TDZ e 0,1 μM de ANA nos 30 primeiros dias e com 5,0 μM de BAP e 0,5 μM de ANA nos últimos 30 dias.....82
- Figura 9 Efeito da canamicina na organogênese indireta de explantes foliares de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* após 60 dias de cultivo. O meio de cultura foi o WPM com 0,5 μM de TDZ e 0,1 μM de ANA nos 30 primeiros dias e com 5,0 μM de BAP e 0,5 μM de ANA nos últimos 30 dias. A: 0 mg L⁻¹, B: 12,5 mg L⁻¹, C: 25 mg L⁻¹, D: 50 mg L⁻¹ e E: 100 mg L⁻¹. Barra = 1 cm.....83
- Figura 10 Efeito de glufosinato de amônio na organogênese indireta de explantes foliares de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* após 60 dias de cultivo. . O meio de cultura foi o WPM com 0,5 μM de TDZ e 0,1 μM de ANA nos 30 primeiros dias e com 5,0 μM de BAP e 0,5 μM de ANA nos últimos 30 dias. A: 0 mg L⁻¹, B: 1 mg.L⁻¹, C: 2,5 mg.L⁻¹, D: 5 mg.L⁻¹, E: 7,5 mg.L⁻¹, F: 10 mg.L⁻¹ e G: 12,5 mg.L⁻¹ Barra = 5 mm.....84
- Figura 11 Efeito de baixas concentrações de glufosinato de amônio na formação de calos, gemas e oxidação de explantes foliares de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*, avaliados após 60 dias. O meio de cultura foi o WPM com 0,5 μM de TDZ e 0,1 μM de ANA nos 30 primeiros dias e 5,0 μM de BAP e 0,5 μM de ANA, nos últimos 30 dias.....85
- Figura 12 Efeito da combinação de sacarose e manose na organogênese indireta de explantes foliares de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* após 60 dias de cultivo. . O meio de cultura foi o WPM com 0,5 μM de TDZ e 0,1 μM de ANA nos 30 primeiros dias e 5,0 μM de BAP e 0,5 μM de ANA, nos últimos 30 dias. A: 30 g de sacarose + 0 g de manose, B: 0 g de sacarose + 30 g de manose, C: 15 g de sacarose + 15 g de manose, D: 22,5 g de sacarose + 7,5 g de manose e E: 27,5 g de sacarose + 2,5 g de manose. Barra = 1 cm.....87
- Figura 13 Efeito de combinações de sacarose e manose na formação de calos e gemas e na oxidação de explantes foliares de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* avaliados após 60 dias. Nos primeiros 30 dias o meio de cultura foi o WPM com 0,5 μM de TDZ e 0,1 μM de ANA e, nos 30 dias seguintes, com 5,0 μM de BAP e 0,5 μM de ANA.....87
- Figura 14 Efeito dos antibióticos (A) Augmentin[®] e (B) cefotaxima na organogênese indireta de explantes foliares de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* após 60 dias. Barra = 1 cm.....90
- Figura 15 Efeito do tempo de cultura dos explantes sem agente de seleção na transformação genética de explantes foliares de *Eucalyptus grandis* x *E.*

urophylla após 60 dias de cultivo. (A) Um mês sem agente de seleção e (B) com agente de seleção desde a co-cultura. Barra = 5 mm.....91

- Figura 16 Controle 2. Efeito da canamicina sobre explantes foliares de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* não transformados com 30 dias de cultivo. O meio de cultura foi o WPM com 0,5 μM de TDZ + 0,1 μM de ANA + 12,5 mg L^{-1} de Km. Barra = 1 cm.....93
- Figura 17 Formação de calos com 30 dias após a transformação genética de explantes foliares de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*. O meio de cultura foi o WPM com 0,5 μM de TDZ + 0,1 μM de ANA + 12,5 mg L^{-1} de Km. Barra = 5 mm.....93
- Figura 18 Gemas com 60 dias de cultivo regeneradas após a transformação genética de explantes foliares de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*. O meio de cultura foi o WPM com 0,5 μM de TDZ + 0,1 μM de ANA + 12,5 mg L^{-1} de Km nos 30 primeiros dias e 5,0 μM de BAP + 0,5 μM de ANA + 25 mg L^{-1} nos 30 dias seguintes. Barra = 5 mm.....94
- Figura 19 Gemas com 90 dias regeneradas após a transformação genética de explantes foliares de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*. O meio de cultura foi o WPM com 0,5 μM de TDZ + 0,1 μM de ANA + 12,5 mg L^{-1} de Km nos 30 primeiros dias, 5,0 μM de BAP + 0,5 μM de ANA + 25 mg L^{-1} nos 30 dias seguintes e em seguida 5,0 μM de BAP + 0,5 μM de ANA + 50 mg L^{-1} por mais 30 dias. Barra = 5 mm.....94
- Figura 20 Brotações em meio de multiplicação com 120 dias regeneradas após transformação genética de explantes foliares de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*. O meio de cultura foi o MS com 0,2 mg L^{-1} BAP + 50 mg L^{-1} de canamicina. Barra = 1 cm.....95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Efeito de diferentes concentrações de ANA combinadas com 0,5 µM de TDZ na formação de calos e gemas e na oxidação de explantes foliares de <i>Eucalyptus grandis</i> x <i>E. urophylla</i> cultivados por 30 dias em meios de cultura JADS, avaliados após 60 dias. Nos últimos 30 dias, os explantes foram cultivados em meios JADS adicionado de 5,0 µM de BAP e 0,5 µM de ANA.....50
Tabela 2	Análise de contrastes ortogonais para a presença de calos formando gemas e explantes oxidados de explantes foliares de <i>Eucalyptus grandis</i> x <i>E. urophylla</i> cultivados por 30 dias em meio de cultura JADS contendo diferentes concentrações de ANA combinado com 0,5 µM de TDZ, avaliados após 60 dias. Nos últimos 30 dias, os explantes foram cultivados em meio JADS com 5,0 µM de BAP e 0,5 µM de ANA.....50
Tabela 3	Efeito de combinações de TDZ (0,5 µM) e ANA ou 2,4-D em meio JADS na formação de calos, de gemas e explantes oxidados de explantes foliares de <i>Eucalyptus grandis</i> x <i>E. urophylla</i> , avaliados após 60 dias. Nos últimos 30 dias, o meio de cultura foi o JADS com 5,0 µM de BAP e 0,5 µM de ANA.....51
Tabela 4	Análise de contrastes ortogonais para a presença de calos formando gemas e explantes oxidados em explantes foliares de <i>Eucalyptus grandis</i> x <i>E. urophylla</i> cultivados por 30 dias em meios de cultura contendo ANA ou 2,4-D sempre combinados com 0,5 µM de TDZ, avaliados após 60 dias. Nos últimos 30 dias, os explantes foram cultivados em meio JADS com 5,0 µM de BAP e 0,5 µM de ANA.....52
Tabela 5	Efeito do meio de cultura na formação de calos, de gemas e na oxidação de explantes foliares de <i>Eucalyptus grandis</i> x <i>E. urophylla</i> após 60 dias. Todos os tratamentos continham 0,5 µM de TDZ e 0,1 µM de ANA nos 30 primeiros dias e 5,0 µM de BAP e 0,5 µM de ANA nos 30 dias seguintes.....54
Tabela 6	Análise de contrastes ortogonais para a presença de calos formando gemas e explantes oxidados de explantes foliares de <i>Eucalyptus grandis</i> x <i>E. urophylla</i> cultivados por 30 dias em diferentes meios de cultura contendo 0,5 µM de TDZ e 0,1 µM de ANA, avaliados após 60 dias. Nos últimos 30 dias, os explantes foram cultivados nos mesmos meios com 5,0 µM de BAP e 0,5 µM de ANA.....54
Tabela 7	Efeito de combinações de 0,5 µM de TDZ e ANA ou 0,5 µM de TDZ e 2,4-D na formação de calos, gemas e oxidação de explantes foliares de <i>Eucalyptus grandis</i> x <i>E. urophylla</i> , avaliados após 60 dias. O meio de cultura foi o WPM. Nos últimos 30 dias, os explantes foram cultivados com 5,0 µM de BAP e 0,5 µM de ANA.....56
Tabela 8	Análise de contrastes ortogonais para a presença de calos formando gemas e explantes oxidados de explantes foliares de <i>Eucalyptus grandis</i> x <i>E. urophylla</i>

cultivados por 30 dias em meio de cultura WPM contendo ANA ou 2,4-D combinado com 0,5 μM de TDZ, avaliados após 60 dias. Nos últimos 30 dias, os explantes foram cultivados em meio de cultura WPM com 5,0 μM de BAP e 0,5 μM de ANA.....57

Tabela 9 Efeito de combinações de 0,1 μM de ANA e TDZ e/ou BAP em meio de cultura WPM na formação de calos, de gemas e oxidação de explantes foliares de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*, avaliados após 60 dias. Nos últimos 30 dias, os explantes foram cultivados em meio WPM com 5,0 μM de BAP e 0,5 μM de ANA.....58

Tabela 10 Análise de contrastes ortogonais para a presença de calos formando gemas e explantes oxidados em explantes foliares de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* em meio de cultura WPM com diferentes combinações de TDZ e/ou BAP combinados com 0,1 μM de ANA, avaliados após 60 dias. Nos últimos 30 dias, os explantes foram cultivados em meio de cultura WPM com 5,0 μM de BAP e 0,5 μM de ANA.....59

Tabela 11 Efeito do número de semanas do último subcultivo na calogênese e regeneração de gemas em explantes foliares de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*, avaliados após 60 dias. O primeiro meio de cultura foi WPM com 0,5 μM de TDZ e 0,1 μM de ANA. Nos últimos 30 dias, os explantes foram cultivados em meio WPM com 5,0 μM de BAP e 0,5 μM de ANA.....60

Tabela 12 Análise de contrastes ortogonais para a presença de calos formando gemas e explantes oxidados de explantes foliares de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* sob efeito do número de semanas do último subcultivo, cultivados por 30 dias em meio de cultura WPM suplementado com 0,1 μM de ANA e 0,5 μM de TDZ, avaliados após 60 dias. Nos últimos 30 dias, os explantes foram cultivados com 5,0 μM de BAP e 0,5 μM de ANA.....60

LISTA DE ABREVIATURAS

2,4-D	ácido 2,4- diclorofenoxiacético
ANA	ácido naftaleno acético
B5	meio de cultura de Gamborg <i>et al.</i> (1968)
BAP	6-benzilaminopurina
<i>bar</i>	gene que codifica a enzima fosfinotricina-N-acetiltransferase
DNA	ácido desoxirribonucleico
DREB2A	Dehydration Responsive Element Binding
JADS	meio de cultura de Correia (1993)
Km	canamicina
LB	meio de cultura “Luria Broth” (SOMASEGARAN e HOBEN, 1994)
MS	meio de cultura de Murashige e Skoog (1962)
<i>P5CS</i>	gene que codifica a enzima pirrolina-5-carboxilato sintetase
P5CS	enzima pirrolina-5-carboxilato sintetase
PAT	enzima fosfinotricina-N-acetiltransferase
PMI	enzima fosfomanose isomerase
<i>pmi</i>	gene que codifica a enzima fosfomanose isomerase
PPT	glufosinato de amônio
PVC	cloreto de polivinil
PVP	polivinilpirrolidona
QL	meio de cultura de Quoirin e Lepoivre (1977)
<i>Rs-AFP2</i>	gene que codifica a proteína AFP2
TDZ	thidiazuron (1-fenil-3-(1,2,3-tiadizol-5-il) uréia)
<i>uidA</i>	gene codificante da enzima β -glucuronidase
WPM	meio de cultura “Woody Plant Medium” (Lloyd e McCown, 1980)

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1	Composição iônica dos meios de cultura.....	102
ANEXO 2	Composição do meio de cultura LB para crescimento bacteriano.....	102

SUMÁRIO

RESUMO GERAL	8
ABSTRACT	9
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABELAS	13
LISTA DE ABREVIATURAS	15
LISTA DE ANEXOS	16
1 INTRODUÇÃO GERAL	20
2 REVISÃO DE LITERATURA	23
2.1 O GÊNERO <i>Eucalyptus</i>	23
2.1.1 <i>Eucalyptus grandis</i>	24
2.1.2 <i>Eucalyptus urophylla</i>	25
2.1.3 O híbrido <i>Eucalyptus grandis</i> x <i>Eucalyptus urophylla</i>	25
2.2 CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS	26
2.3 TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA.....	29
2.3.1 Os métodos	29
2.3.2 A transformação de espécies de eucalipto	32
REFERÊNCIAS	34
3 ORGANOGÊNESE INDIRETA EM EXPLANTES FOLIARES DE <i>Eucalyptus grandis</i> x <i>Eucalyptus urophylla</i>	41
RESUMO	41
3.1 INTRODUÇÃO	43
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	45
3.2.1 Local de realização dos experimentos.....	45
3.2.2 Condições gerais de cultura <i>in vitro</i>	45
3.2.3 Fonte de explantes e meio de cultura de multiplicação.....	45
3.2.4 Delineamento experimental, variáveis analisadas e análises estatísticas	46
3.2.5 Organogênese indireta	46
3.2.5.1 Efeito de combinações de ácido naftaleno acético (ANA) e Thidiazuron (TDZ) no meio de cultura JADS.....	47
3.2.5.2 Efeito de combinações de Thidiazuron (TDZ) e ácido 2,4- diclorofenoxiacético (2,4-D) ou ácido naftaleno acético (ANA) adicionados ao meio de cultura JADS	47
3.2.5.3 Efeito de diferentes meios de cultura	47

3.2.5.4	Influência de combinações de Thidiazuron (TDZ), 6-benzilaminopurina (BAP) e ácido naftaleno acético (ANA) no meio de cultura de indução	48
3.2.5.5	Efeito de combinações de Thidiazuron (TDZ) e ácido 2,4- diclorofenoxiacético (2,4-D) ou ácido naftaleno acético (ANA) adicionados ao meio de cultura WPM	48
3.2.5.6	Efeito do número de semanas do último subcultivo na organogênese a partir de folhas	48
3.2.6	Estudo histológico	48
3.3	RESULTADOS E DISCUSSÕES	50
3.3.1	Efeito de combinações de ácido naftaleno acético (ANA) e Thidiazuron (TDZ) no meio de cultura JADS	50
3.3.2	Efeito de combinações de Thidiazuron (TDZ) e ácido 2,4- diclorofenoxiacético (2,4-D) ou ácido naftaleno acético (ANA) adicionados ao meio de cultura JADS	52
3.3.3	Efeito de diferentes meios de cultura	53
3.3.4	Efeito de combinações de Thidiazuron (TDZ) e ácido 2,4- diclorofenoxiacético (2,4-D) ou ácido naftaleno acético (ANA) adicionados ao meio de cultura WPM	56
3.3.5	Influência de combinações de Thidiazuron (TDZ), 6-benzilaminopurina (BAP) e ácido naftaleno acético (ANA) no meio de cultura de indução	58
3.3.6	Efeito do número de semanas do último subcultivo na organogênese a partir de folhas	61
3.3.7	Organogênese indireta e análise histológica	62
3.4	CONCLUSÕES	65
	REFERÊNCIAS	66
4	TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE <i>Eucalyptus grandis</i> x <i>Eucalyptus urophylla</i> VIA <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	70
	RESUMO	70
4.1	INTRODUÇÃO	72
4.2	MATERIAL E MÉTODOS	74
4.2.1	Local de realização dos experimentos	74
4.2.2	Condições gerais de cultura <i>in vitro</i>	74
4.2.3	Fonte de explantes	74
4.2.4	Delineamento experimental e variáveis analisadas	75
4.2.5	Regeneração dos explantes	75
4.2.6	Determinação das concentrações de agentes seletivos	76
4.2.6.1	Canamicina	76
4.2.6.2	Glufosinato de amônio	76
4.2.6.3	Manose	76

4.2.7	Transformação genética via co-cultura com <i>Agrobacterium tumefaciens</i> com gene marcador <i>bar</i>	77
4.2.7.1	Cepa bacteriana e vetor binário	77
4.2.7.2	Condições de crescimento bacteriano	77
4.2.7.3	Preparo e inoculação dos explantes foliares	78
4.2.7.4	Efeito dos antibióticos Augmentin® e cefotaxima na eliminação da <i>Agrobacterium tumefaciens</i> e formação de calos organogênicos	78
4.2.7.5	Efeito do tempo de cultura dos explantes em meio sem agente de seleção	79
4.2.8	Transformação genética via co-cultura com <i>Agrobacterium tumefaciens</i> com gene marcador <i>nptII</i>	79
4.2.8.1	Cepa bacteriana e vetor binário	79
4.2.8.2	Condições de crescimento bacteriano	80
4.2.8.3	Preparo e inoculação dos explantes foliares	80
4.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	81
4.3.1	Canamicina	81
4.3.2	Glufosinato de amônio	84
4.3.3	Manose.....	87
4.3.4	Efeito dos antibióticos Augmentin e Cefotaxima na eliminação de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> e formação de calos organogênicos	89
4.3.5	Efeito do tempo de cultura dos explantes sem agente de seleção na formação de calos	92
4.3.6	Transformação genética de <i>E. urograndis</i> via co-cultura com <i>Agrobacterium tumefaciens</i> carregando o gene <i>nptII</i>	93
4.4	CONCLUSÕES.....	96
	REFERÊNCIAS.....	97
5	CONCLUSÕES GERAIS	100
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	101
	ANEXOS	102

1 INTRODUÇÃO GERAL

As espécies florestais são de fundamental importância econômica, pois delas originam-se diversos produtos como papel e celulose, marcenaria, caixotaria, estruturas para construção civil, entre outros (CRUZ, 2007). Além disso, muitas espécies ofertam produtos não madeiráveis para a indústria alimentícia, cosmética e farmacêutica (STUDART-GUIMARÃES *et al.*, 2003).

O eucalipto pertence à família *Myrtaceae* e é, em sua maioria, originário da Austrália. Este gênero possui cerca de 600 espécies, as quais podem se adaptar a diferentes condições edafoclimáticas, o que possibilita sua plantação em diversas regiões com clima tropical e subtropical (MAURI, 2010). As espécies de eucalipto apresentam excelente potencial para a produção de madeira, já que suas características físico-mecânicas permitem inúmeras utilizações (GONZÁLEZ *et al.*, 2002). O híbrido *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* (*E. urograndis*) tem se destacado em plantios, principalmente no Brasil, por apresentar alta produtividade e potencial para indústrias de papel, celulose e fibras (ALCANTARA, 2008).

O Brasil possui cerca de 20% das áreas plantadas com *Eucalyptus* do mundo, atrás apenas da Índia que representa 22% (GFC, 2010). De acordo com a ABRAF, no ano base de 2011, no Brasil havia mais de 4.800.000 ha plantados de eucalipto, sendo que o Estado do Paraná estava em sexto lugar no ranking dos estados com a maior produção, com aproximadamente 188.000 ha. O uso extensivo de eucaliptos em reflorestamento se deve ao seu rápido crescimento (média de 45 m³/ha/ano em plantios clonais) e à produção de fibras e polpa de madeira de alta qualidade (GONZÁLEZ *et al.*, 2002). Além disso, o uso de madeira reflorestada contribui para a preservação de áreas de mata nativa.

Em função da já citada importância econômica do gênero *Eucalyptus*, os estudos e investimentos em programas de melhoramento genético vêm aumentando a cada ano. No entanto, tendo em vista os problemas inerentes ao melhoramento genético de espécies florestais, como o tempo para a maturidade fisiológica e a consequente floração, a biotecnologia surge como uma ferramenta para auxiliar nestes problemas (GOLLE *et al.*, 2010). A biotecnologia está dividida em três principais grupos quanto a suas aplicações em espécies florestais: cultura de tecidos, marcadores moleculares e transformação genética. Neste trabalho serão enfatizadas duas dessas tecnologias: a cultura de tecidos *in vitro* e a transformação genética.

A transformação genética permite a introdução de genes com características de interesse econômico, em um curto período de tempo e com alteração mínima do genoma (GONZÁLEZ, 2002). Para espécies de eucalipto, a transformação genética visa, principalmente, modificar o conteúdo de lignina, aumentar a tolerância a estresses abióticos, como frio e seca, e aumentar a resistência a insetos e doenças (QUOIRIN e QUISEN, 2006). De acordo com diversos autores, um dos fatores que podem afetar a eficiência da transformação genética via co-cultura com *Agrobacterium tumefaciens* é a escolha do gene marcador de seleção. Segundo Quisen (2007), este gene de seleção deve impedir a regeneração das células não transformadas, pois nem todas as células dos tecidos serão infectadas.

O gene *nptII* é o mais frequentemente usado para a seleção de células transformadas (DIBAX, 2007). Este gene é responsável pela produção da enzima neomicina fosfotransferase que inativa antibióticos do grupo dos aminoglicosídeos, como a canamicina (BRASILEIRO e DUSI, 1999). Além de genes que conferem resistência a antibióticos, pode-se utilizar também genes que conferem resistência a herbicidas, como o gene *bar*. Este gene codifica a enzima fosfinotricina acetiltransferase que confere resistência ao herbicida glufosinato de amônio (SARTORETTO *et al.*, 2008).

A inserção de genes que conferem resistência a antibióticos e herbicidas não é bem aceita pela população, assim, uma alternativa para a seleção das plantas transformadas é o uso do gene *pmi*, que codifica a enzima manose-6-fosfato isomerase, que converte a manose-6-fosfato para frutose-6-fosfato (ZHENGQUAN *et al.*, 2003). Como resultado, as células transformadas com o gene *pmi* adquirem uma vantagem metabólica, em comparação com as células não transgênicas que permanecem incapazes de metabolizar a manose-6-fosfato (JOERSBO *et al.*, 1998).

De acordo com Brasileiro e Lacorte (1998), a concentração do agente seletivo pode afetar tanto as células não transformadas como as transformadas. Sabe-se, dentro da prática laboratorial, que altas concentrações do agente seletivo causam a morte dos tecidos transformados. Assim, é necessária a adequação da concentração dos agentes de seleção no meio de cultura, para que selecione sem prejudicar os tecidos transformados.

Todo sistema de transformação genética requer protocolos de regeneração *in vitro* que permitam a recuperação de plantas a partir de células transgênicas. De acordo com Brasileiro e Lacorte (1998), a principal condição para o sucesso na eficiência da transformação via *Agrobacterium* é a existência de um método de cultura de tecidos e regeneração da espécie-alvo.

A cultura de tecidos *in vitro* é a técnica utilizada para essa regeneração de plantas transformadas, que utiliza tecidos de um organismo vegetal e, através da capacidade de totipotência das células vegetais, permite obter uma nova planta idêntica à original (STUDART-GUIMARÃES *et al.*, 2003). De acordo com Mroginski *et al.* (2004) a cultura de tecidos pode ser definida como a manutenção, propagação e regeneração de partes da planta em um ambiente livre de micro-organismos e em condições controladas, constituindo uma das áreas de maior êxito da Biotecnologia. A regeneração *in vitro* é influenciada por vários fatores, com o meio de cultura, os reguladores vegetais, o tipo de explante, entre outros (GIRI *et al.*, 2004).

Baseado neste contexto, este trabalho teve como objetivos obter um protocolo eficiente de organogênese indireta para o híbrido *Eucalyptus urograndis*, clone 3336, e avaliar agentes de seleção genética e diferentes antibióticos mediante co-cultura com *Agrobacterium tumefaciens*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O GÊNERO *Eucalyptus*

O gênero *Eucalyptus* L'Hér. pertence à família Myrtaceae e é originário da Austrália e de regiões próximas, como Timor, Indonésia e Filipinas (ELDRIDGE *et al.*, 1994). Existem mais de 600 espécies descritas, além de subespécies e híbridos naturais (BERTOLUCCI *et al.*, 1995; BROOKER, 2000). Segundo Mora e Garcia (2000), durante o processo evolutivo, o eucalipto se adaptou a condições de baixo conteúdo de nutrientes no solo. O Serviço Florestal da Austrália já identificou 670 espécies e apenas duas delas, *Eucalyptus urophylla* e *E. deglupta*, tem ocorrência natural fora do território australiano (SANTOS, 2011). O grande número de espécies, graças a sua ampla adaptação a diferentes condições climáticas e edáficas, possibilita sua plantação em regiões de clima tropical e subtropical (ALCANTARA, 2008).

No início do estabelecimento dos grandes plantios florestais de *Eucalyptus*, a produtividade era de aproximadamente $15 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$, porém, devido ao grande investimento em pesquisa e tecnologia, foi observado um aumento na qualidade genética dos indivíduos, elevando sua adaptabilidade às condições ambientais locais e um aprimoramento nas práticas silviculturais, disponibilizando mais recursos às florestas (CAMPOE, 2012).

Em 2011, a área de plantios de *Eucalyptus* totalizou 4,8 milhões ha no Brasil, representando crescimento de 2,5% frente ao indicador de 2010. O principal fator que alavancou esse crescimento foi o estabelecimento de novos plantios frente à demanda futura dos projetos industriais do segmento de Papel e Celulose (ABRAF, 2012). Ainda segundo dados de 2012 da Associação Brasileira de Produtores de Florestas Plantadas, com ano base 2011, em relação ao *Eucalyptus*, o segmento de papel e celulose concentra 71,2% da área plantada, seguido pelos segmentos de siderurgia a carvão vegetal (18,4%), painéis de madeira industrializada (6,8%) e produtores independentes (3,6%). Segundo dados do GIT Forestry Consulting de 2010, o Brasil corresponde a 20% das áreas plantadas com eucalipto do mundo, atrás apenas da Índia, que representa 22%. O plantio de eucalipto também é indicado para a ocupação de áreas impróprias à agricultura (GONZÁLEZ, 2002). As raízes profundas do gênero são capazes de buscar nutrientes nas camadas inferiores do solo, podendo controlar a erosão do solo (SBS, 2000).

No ranking mundial das espécies mais plantadas estão: *E. grandis*, *E. globulus* e *E. camaldulensis*, seguido de *E. saligna*, *E. tereticornis* e *E. urophylla* (POTTS, 2004). No Brasil, as espécies mais plantadas são *E. grandis* x *E. urophylla*, *E. grandis*, *E. saligna* e *E. urophylla* (BRACELPA, 2007). A produção brasileira concentra-se em Minas Gerais e São Paulo, os quais lideram a produção nacional com 28,8% e 21,2% da área de plantio de eucalipto, respectivamente. O Estado do Paraná conta com apenas 3,9% da produção nacional, devido às restrições climáticas para o gênero (ABRAF, 2012), mesmo tendo um clima subtropical, pois a amplitude térmica apresenta grande variação (aproximadamente 13° C).

Com as novas exigências do mercado consumidor, preocupado com a produção sustentada e a manutenção de florestas nativas, o consumo dos produtos florestais procedentes de florestas plantadas tem aumentado (FREITAG, 2007). No entanto, a implantação de reflorestamento de eucalipto exige a definição da espécie como primeira etapa, a qual deve ser adaptada às condições edafoclimáticas da região (ALCANTARA, 2008).

A importância econômica do gênero deve-se à versatilidade de suas aplicações econômicas, aliada a uma taxa de crescimento elevada, garantindo assim o crescente interesse pela produção que visa atender a demanda de polpa para a produção de celulose, combustível e madeira para construções (MACRAE e VAN STADEN, 1990 apud DIBAX, 2007). Além disso, este gênero tem outras vantagens como: produção de elevada quantidade de sementes e facilidade de propagação vegetativa, ciclos de corte muito curtos (6 a 7 anos), podendo atingir duas a três rotações, possibilidade de uso múltiplo, através da flexibilização de programas de manejo e diferenciação de idades de corte (EVANGELISTA, 2007).

2.1.1 *Eucalyptus grandis*

Eucalyptus grandis Hill ex Maiden é uma espécie nativa da Austrália, a qual se adapta muito bem em regiões com precipitações entre 1000 e 1750 mm e valores de temperaturas médias máximas entre 29 e 32 °C e mínimas entre 5 e 6 °C (FAO, 1981). Quando plantada em regiões tropicais úmidas torna-se sensível ao fungo *Cryphonectria cubensis*, agente causal do cancro (FERNANDES, 2012).

É uma das espécies mais plantadas no mundo devido às características silviculturais desejáveis, rápido crescimento e a aplicabilidade da madeira para diversos fins, além da

grande variabilidade genética e à facilidade de aquisição de sementes em quantidade e qualidade (DEUS, 2007). Seu principal uso está na produção de celulose e papel, seguido do uso na produção de painéis de fibra e aglomerado, como combustível industrial e doméstico e em produtos de serraria (SOARES *et al.*, 2004).

O Brasil é um dos mais promissores mercados mundiais dessa espécie, principalmente pelas condições favoráveis de clima, solo e a grande oferta de áreas para o plantio (BIZI, *et al.*, 2005). *E. grandis* supera qualquer outra espécie em incremento volumétrico em condições ambientais adequadas, sendo a mais plantada no Brasil devido à sua plasticidade genética, à obtenção de híbridos e à clonagem de árvores selecionadas (MORA e GARCIA, 2000).

2.1.2 *Eucalyptus urophylla*

Eucalyptus urophylla S. T. Blake é uma espécie nativa da Indonésia, onde as precipitações anuais variam de 600 a 2500 mm e a temperatura média máxima está entre 27-29 °C aos 400 m de altitude e 17-21 °C a 1900 m (MARTIN e COSSALTER, 1975 apud SOUZA, 2008), sendo uma das poucas espécies que ocorrem em latitudes inferiores a 10° S (SCANAVACA JUNIOR, 2001). É uma espécie tropical, com grande potencial para regiões de clima quente, além de apresentar porte elevado, forte dominância apical, excelente vigor e bom desenvolvimento (SOUZA, 2007; ALCANTARA, 2008).

O interesse por *E. urophylla* no Brasil foi proveniente, principalmente, da sua tolerância ao fungo causador do cancro (MORA e GARCIA, 2000), além de ser uma espécie que se adapta a diferentes condições de clima e solo (EVANGELISTA, 2007). Quando oriunda de plantações em ciclos curtos, a madeira desta espécie pode ser utilizada em caixotaria, paletes, celulose, carvão e mourões; já quando oriunda de plantações de ciclo longo, pode ser utilizada em construções, laminados e fabricações de móveis (SILVA *et al.*, 2008).

2.1.3 O híbrido *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*

O melhoramento de plantas consiste basicamente em modificar seu patrimônio genético, com a finalidade de obter genótipos capazes de se adaptar às condições de um determinado ambiente, além de exibirem resistência às pragas e doenças (SANTOS, 2005).

O híbrido de *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus urophylla*, conhecido como *E. urograndis*, possui uma madeira de maior densidade em relação às espécies que o originaram, sendo um dos híbridos mais plantados em reflorestamento no Brasil, devido a sua grande capacidade de produção de celulose. Este híbrido foi desenvolvido no Brasil, com o objetivo de agregar o rápido crescimento de *E. grandis* e à alta densidade da madeira e propriedades físicas de celulose de *E. urophylla* (QUILHÓ *et al.*, 2006). A primeira plantação com *E. urograndis* ocorreu no estado do Espírito Santo em 1979 e tomou grandes proporções na década de 1990 (LOPES, 2008).

De acordo com Mauri, 2010, as empresas do setor florestal brasileiro possuem milhares de hectares plantados com indivíduos clonados a partir de híbridos, sendo que *E. urograndis* foi o híbrido que mais se destacou, justamente pelo sucesso do melhoramento na apresentação das características desejáveis para a produção de celulose. *E. urograndis* é bastante valorizado no Brasil devido principalmente às propriedades da sua madeira, habilidade de enraizamento e resistência às doenças (ALCANTARA, 2008).

2.2 CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS

A aplicação de novas tecnologias associadas ao melhoramento genético convencional requer protocolos que permitam regenerar plantas a partir de grupos de células vegetais, explorando a totipotência das plantas (GONZÁLEZ, 2002). Conforme Taiz e Zeiger (2006), a totipotência é a conservação da capacidade genética total para o desenvolvimento de uma nova planta, em células já diferenciadas. Mediante essa competência, fragmentos de tecidos vegetais vivos (denominados explantes), são retirados de plantas e cultivados em meio nutritivo definido, sob condições assépticas (GOLLE, 2010). Os estudos de cultura de tecidos tem proporcionado a regeneração de plantas para todos os sistemas de cultura *in vitro*, tais como a cultura de calos, cultura de células em suspensão, indução da embriogênese somática, indução da organogênese e o isolamento e cultivo de protoplastos (MICHELUZZI, 2007).

O protocolo de regeneração de gemas adventícias a partir de um tecido já diferenciado – ou organogênese - deve ser adaptado para cada espécie, pois embora um protocolo seja estabelecido para uma espécie, ou até mesmo para um clone, normalmente não pode ser utilizado para outra espécie (ALCANTARA, 2008). Este protocolo é dividido em etapas que dependem do sistema de cultura utilizado e cada etapa necessita da combinação correta do

meio de cultura, reguladores vegetais, luminosidade, temperatura, fotoperíodo, entre outros aspectos. Além desses fatores, o genótipo e o estado fisiológico da planta matriz proporcionam diferentes respostas no processo de regeneração.

Um dos aspectos mais importantes para estabelecer um protocolo de regeneração de gemas adventícias é o meio de cultura, o qual deve atender às necessidades de cada vegetal. De acordo com Gonzalez (2002), o meio de cultura deve conter todas as substâncias que os tecidos normalmente obtêm do floema e do xilema.

Os componentes do meio de cultura são divididos em quatro grandes categorias: macronutrientes, micronutrientes, vitaminas e aminoácidos (ALVES, 2001). Existem muitas combinações destes quatro grupos, no entanto, muitos trabalhos se baseiam nos meios de White (1943), MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), B5 (GAMBORG *et al.*, 1968) e WPM (LLOYD e McCOWN, 1980). O meio MS e o B5 são os mais usados na grande maioria das espécies, enquanto que o meio WPM foi elaborado principalmente para espécies lenhosas (GEORGE, 1993; CALDAS *et al.*, 1998). Outro meio de cultura muito utilizado, principalmente para o eucalipto é o JADS (CORREIA, 1995), o qual foi desenvolvido para o cultivo *in vitro* de *Eucalyptus grandis*, onde a definição dos componentes se deu por informações bibliográficas sobre teores de nutrientes minerais em tecidos de *E. grandis* (CORREIA, 1995). Além desses, o meio QL (QUOIRIN e LEPOIVRE, 1977) foi desenvolvido para *Prunus* e também tem sido utilizado para espécies florestais.

No caso do eucalipto, existe uma grande variação genotípica, o que altera as respostas dos tecidos ao meio de cultura, sendo, portanto, necessária a adequação do meio de cultura para cada genótipo e para cada etapa do processo de regeneração (ALCANTARA, 2008).

Outro fator que influencia e determina a morfogênese nos tecidos em cultura é a ação dos reguladores vegetais mediante sua interação com receptores dentro da célula vegetal. Castro e Vieira (2001) definiram os reguladores como substâncias sintetizadas que, aplicadas exogenamente, possuem ações similares aos grupos de hormônios vegetais conhecidos. Os principais reguladores vegetais utilizados pertencem aos grupos das auxinas, citocininas e giberelinas. O balanço entre estes reguladores altera a resposta das células no cultivo, onde se pode induzir a formação de tecidos desejados. Por exemplo, quando a concentração de citocinina é baixa em relação às auxinas, há o favorecimento do crescimento de raízes.

É necessário também definir o explante utilizado na cultura de tecidos, que pode ser segmento de folha, hipocótilo, segmento nodal e internodal. Se as plantas que serão cultivadas tem reprodução por sementes, as partes embrionárias ou as plântulas germinadas em condições assépticas também podem ser usadas como explantes, o qual é uma técnica muito

comum em espécies lenhosas (VILLALOBOS e THORPE, 1991). Vários explantes foram testados para espécies e híbridos de *Eucalyptus*, como, por exemplo, segmento nodal e discos foliares. Devido às variações morfológicas, bioquímicas e fisiológicas resultantes da expressão diferenciada dos genes, cada genótipo e, até mesmo, cada clone, responde de maneira diferente ao um mesmo estímulo (SRIVASTAVA, 2001).

Segundo Villalobos e Thorpe (1991), o estado fisiológico da planta doadora influi significativamente na sua capacidade morfogenética. Plantas bem nutridas e sem sintomas de deficiência nutricional fornecem explantes com melhor capacidade regenerativa (GEORGE, 1993). A idade fisiológica da planta também influencia o seu potencial regenerativo, pois, em geral, explantes provenientes de tecidos juvenis apresentam maior facilidade de se desdiferenciar e rediferenciar do que explantes de plantas adultas. Quanto maior a determinação de um explante para uma via de desenvolvimento, menor será a competência para se desdiferenciar e formar um novo tecido (BONGA e ADERKAS, 1992).

A organogênese indireta é uma técnica que pode ser utilizada para regenerar plantas transformadas geneticamente. Pode ser dividida, basicamente, em duas etapas: formação de calos e regeneração de gemas e brotações. Uma das respostas mais comuns do tecido cultivado *in vitro* é a formação de calo, ocorrendo na fase de desdiferenciação. O calo não é um órgão com tecidos executando funções específicas, mas, sim, um sistema onde gradientes nutricionais e de reguladores vegetais estão orientados acropetamente (TERMIGNONI, 2005). Todo processo organogênico é controlado diretamente pelos reguladores vegetais, para que, após a formação dos calos, as células possam se rediferenciar em um novo tecido.

2.2.1 A organogênese indireta com *E. urograndis*

O protocolo de regeneração deve ser adaptado para cada espécie, pois embora um protocolo seja estabelecido para uma espécie, ou até mesmo para um clone, normalmente não pode ser utilizado para outra espécie (ALCANTARA, 2008). Assim, muitos trabalhos vêm sendo desenvolvidos para diversas espécies de eucalipto utilizando a organogênese indireta, como para *E. grandis* (WARRAG *et al.*, 1991; LAINÉ e DAVID, 1994; MACHADO *et al.*, 1997), *E. urophylla* (TIBOK *et al.*, 1995; SHENG-JIAN *et al.*, 2006; HUANG *et al.*, 2010), *E. saligna* (DIBAX *et al.* 2010), *E. benthamii* x *E. dunnii* (OLIVEIRA *et al.*, 2011). Já com relação aos trabalhos de organogênese com o híbrido *E. urograndis* poucos foram publicados.

Barrueto Cid *et al.* (1999) cultivaram hipocótilos, cotilédones, nós cotiledonares e folhas primárias de *E. urograndis* em meio de calogênese composto do meio MS modificado, chamado SP, suplementado com 2,0 µM de TDZ, por 30 dias. Em seguida, os calos obtidos foram transferidos para o meio de indução de brotações, por mais 30 dias. Esse meio era constituído do meio SP e adicionado de zeatina (ZEA) ou 6-benzil amino purina (BAP), dependendo do explante utilizado.

Tournier e colaboradores (2003) desenvolveram novos meios de cultura para regeneração de explantes foliares de *E. urograndis*. Primeiramente, os explantes foram mantidos por 5 dias no meio de reativação celular, chamado BIP, em seguida transferidos para o meio de indução de brotações – BIT. O mesmo procedimento foi utilizado por Alcantara *et al.* (2011) para dois clones do híbrido *E. urograndis*. Para o clone 11 até 30% dos explantes regeneram brotações enquanto que para o clone 827 foi 6%.

Alves *et al.* (2004) avaliaram o desempenho de 3 clones de *E. urograndis* na organogênese utilizando explantes foliares. Para os três genótipos o melhor meio de calogênese encontrado foi o meio LD (LAINÉ e DAVID, 1994) com TDZ e ANA, sendo a concentração de cada regulador dependente do clone utilizado. Já para o meio de regeneração de gemas a concentração de FeEDTA do meio LD foi alterada e os reguladores utilizados foram BAP e ANA, também com concentrações diferentes dependendo do clone utilizado. A melhor taxa de regeneração encontrada foi no clone 1 com 8% dos calos regenerando gemas.

Ouyang *et al.* (2012) usaram segmentos caulinares de *E. urograndis* em meio de cultura MS, testando diversos reguladores vegetais para calogênese e regeneração. Obtiveram maior taxa de formação de calos e brotos com 13,2 µM de PBU (N-fenil-N'-[6-(2-clorobenzotiazole)-yl] ureia) e 0,285 µM de AIA, transferindo-os para meio de regeneração contendo 0,25 µM de ANA e 4,4 µM de BAP.

2.3 TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA

2.3.1 Os métodos

O uso da engenharia genética para a introdução de genes em plantas é uma ferramenta muito importante no melhoramento vegetal, principalmente para espécies que apresentam um

longo ciclo, como o eucalipto (ANDRADE, 2001). Esta técnica permite também transpor a barreira da incompatibilidade sexual que algumas plantas apresentam (MORAES-FERNANDES, 1987).

A transformação genética permite a introdução de gene correspondente a alguma característica de interesse dentro do genoma de uma planta, proporcionando, desta forma, a aceleração do processo de melhoramento (SCHUCH e PETERS, 2002). A transformação genética é definida por Potrykus (1991) como sendo a introdução controlada de ácidos nucleicos em um genoma receptor. Após o processo de transformação, é necessário ter um protocolo de regeneração de plantas a partir dos tecidos transformados, sendo esta etapa a de maior dificuldade.

A transformação genética utiliza duas formas de transferência de genes para as plantas: a forma indireta, usando como vetor intermediário a bactéria *Agrobacterium*, e os métodos diretos, principalmente biobalística.

O método direto de transformação de plantas mais utilizado é o da biobalística, onde a pressão do gás hélio faz com que partículas de ouro ou tungstênio cobertas de DNA penetrem a parede e a membrana celular. Alguns autores acreditam que o uso de métodos diretos aumenta a frequência de integração de múltiplas cópias do transgene ao genoma vegetal, desencadeando processos de silenciamento gênico (ALCANTARA, 2008). Outros métodos diretos são: transformação por polietilenoglicol, eletroporação de protoplastos, micro e macroinjeção, utilização de raios laser, microfibras de carboneto de silício e ultra-som.

O método indireto de transformação de plantas utiliza a bactéria *Agrobacterium spp.* como vetor para a transferência do DNA. É um sistema simples, eficiente e relativamente barato (STAFFORD, 2000). Uma das bactérias que pode ser usada é a *Agrobacterium tumefaciens* é uma bactéria do solo que causa a formação de tumores na região da infecção e possui uma capacidade natural de introduzir seu DNA em plantas hospedeiras (SANTARÉM, 2000). Durante a infecção, uma parte do plasmídeo da bactéria, denominada T-DNA, é transferida para a célula vegetal e integrada no genoma (HOHN, 1992). Esta região é alterada e recebe o gene de interesse a ser inserido na planta que se deseja transformar. São vários os fatores que podem afetar o sucesso da transformação genética via *A. tumefaciens*, como a cepa da bactéria utilizada, a duração da co-cultura, o tipo de tecido usado como explante, a pré-cultura, entre outros aspectos.

A eficiência de transformação de uma espécie está ligada ao sistema de seleção dos transformantes, o qual deve inibir o desenvolvimento das células não transformadas, de forma diferencial, permitindo que somente as transformadas se desenvolvam e formem brotações

(GONZÁLEZ, 2002). O conhecimento sobre a tolerância relativa dos tecidos vegetais a agentes seletivos, como os antibióticos e os herbicidas, para os quais existem marcadores de resistência, facilita a transferência gênica (HUMARA e ORDÁS, 1999).

Os genes de seleção que conferem resistência a antibióticos ou a herbicidas podem ser divididos em dois grupos: os que produzem uma enzima funcional a qual não é afetada pelo agente seletivo e os que produzem um produto que permite a desintoxicação e eliminação do agente seletivo (WILMINK e DONS, 1993; DE BLOCK *et al.*, 1987). Ainda segundo Wilmink e Dons (1993) na maior parte dos casos o gene inserido codifica uma enzima que inativa o agente seletivo por transferência de grupos fosfatos ou por transacetilação.

A canamicina é um antibiótico usado para a seleção de plantas transgênicas com o gene de resistência neomicina fosfotransferase (*nptII*). Este é o gene de seleção mais utilizado na transformação de plantas, sendo responsável pela produção da enzima neomicina fosfotransferase II (NPTII) que inativa diferentes antibióticos do grupo dos aminoglicosilados, como a canamicina (BRASILEIRO e DUSI, 1999). Segundo Brasileiro e Aragão (2001), quando o antibiótico entra em contato com o tecido vegetal, reduz a síntese de clorofila, pois inibe a síntese de proteínas em mitocôndrias e cloroplastos, impedindo o desenvolvimento das células não transformadas.

O herbicida glufosinato de amônio, também conhecido como L-fosfinotricina (PPT), atua como inibidor competitivo da enzima glutamina sintetase (GS), a qual está envolvida na assimilação de amônia e possui uma função chave na regulação do metabolismo do nitrogênio (DE BLOCK *et al.*, 1987). A resistência a PPT é conferida pela enzima fosfinotricina-N-acetiltransferase (PAT), que o inativa por acetilação do grupo NH₂ livre, usando acetil coenzima A como cofator. O gene que codifica PAT é o gene *bar*, isolado de *Streptomyces hygroscopicus* (THOMPSON *et al.*, 1987). Este gene tem sido usado como uma alternativa para a seleção de plantas transformadas de várias espécies mono e dicotiledôneas (D'HALLUIN *et al.*, 1992). O gene *bar* já foi introduzido em *Arabidopsis thaliana* (AKAMA, PUCHTA e HOHN, 1995), *Populus alba* (CONFALONIERI *et al.*, 2000), *Picea abies* (BRUKHIN *et al.*, 2000), *Eucalyptus camaldulensis* (HARCOURT *et al.*, 2000) e *Pinus radiata* (BISHOP-HURLEY *et al.*, 2001).

Um “novo” princípio para a seleção de células vegetais transgênicas vem sendo pesquisado. No sistema tradicional, ocorre a chamada seleção negativa, onde os tecidos não transgênicos não conseguem sobreviver no meio com a seleção e, portanto morrem. Nesta nova estratégia de seleção só há um favorecimento de regeneração e crescimento dos tecidos transgênicos (JOERSBO e OKKELS, 2006). Há certa polêmica em relação à introdução de

genes usados na seleção de plantas transformadas que conferem resistência a antibióticos e herbicidas, isto por que alguns pesquisadores afirmam que as plantas transformadas com esses genes podem fazer mal ao ser humano quando utilizadas como alimentos (VIEIRA *et al.*, 2005). Não há pesquisas que comprovem esta teoria, no entanto alguns países criam barreiras na importação destes organismos geneticamente modificados. Neste sentido, buscam-se novas formas de seleção de brotações transgênicas. Uma forma é inserir o gene da fosfomanose isomerase (*pmi*) de *Escherichia coli*, que codifica a enzima fosfomanose isomerase (PMI, EC 5.3.1.8) a qual converte manose-6-fosfato em frutose-6-fosfato que, por sua vez, pode ser utilizada como fonte de carbono por células transformadas (JOERSBO e OKKELS, 1996). Plantas transformadas com esse gene podem utilizar manose como fonte de carbono, adquirindo assim uma vantagem comparativa quando cultivadas em meio contendo este carboidrato (VIEIRA *et al.*, 2005). Ainda de acordo com Vieira e colaboradores, esse sistema de seleção já foi utilizado para a seleção de plantas transgênicas em beterraba (JOERSBO *et al.*, 1998), arroz (LUCCA *et al.*, 2001), milho e trigo (WRIGHT *et al.*, 2001) e laranja doce (BOSCARIOL *et al.*, 2003). Não há relatos da inserção do gene *pmi* em eucalipto.

2.3.2 A transformação de espécies de eucalipto

Os primeiros resultados de transformação direta em eucalipto foram publicados em 1990 para *E. saligna* (KAWAZU, *et al.*, 1990) e em 1991 para *E. gunnii* (TEULIÈRES *et al.*, 1991) ambos usando protoplastos (QUOIRIN e QUISEN, 2006). O método biobalístico foi aplicado para a transformação genética do híbrido *E. urograndis* utilizando calos obtidos a partir de cotilédones e hipocótilos, sem resultados promissores (SARTORETTO *et al.*, 2002). Serrano e colaboradores (1996) utilizaram a técnica de biobalística em embriões zigóticos de *E. globulus* e conseguiram plantas transformadas, confirmadas através da análise de Southern blot.

E. camaldulensis foi a primeira espécie usada em experimentos de transformação de eucalipto via *A. tumefaciens* (KAWAZU *et al.*, 1990; CHEN *et al.*, 2003 apud QUOIRIN e QUISEN, 2006). Muitos trabalhos foram e estão sendo desenvolvidos para otimizar a transformação genética e posteriormente a regeneração de várias espécies de *Eucalyptus*. Tournier e colaboradores (2003) realizaram estudos de transformação do híbrido *E. urograndis* usando o gene de seleção *nptII*, e concluíram que a transformação deste híbrido é

limitada devido à recalcitrância combinada com a baixa regeneração *in vitro*. Gonzalez *et al.*, em 2002, conseguiram uma transformação estável de *E. grandis* e do híbrido *E. urograndis* com o gene *nptII* através da inoculação de *A. tumefaciens* em sementes.

Em 1998, Moralejo *et al.* descreveram uma eficiência de 1,2% de transformação para *E. globulus* usando o gene de seleção *nptII* e o gene marcador *uidA*. Matsunaga e colaboradores (2012) também usaram os genes *nptII* e *uidA* e relataram a dificuldade de regeneração e transformação genética de *E. globulus*, conseguindo apenas 3,98% de eficiência, a qual é considerada suficiente para transformação de espécies recalcitrantes.

Dibax *et al.* (2010) obtiveram sucesso na transformação de *E. saligna*, inserindo os genes *P5CS*, *nptII* e *uidA*. Alcantara *et al.* (2011) estudaram fatores que alteram a eficiência da transformação genética de dois clones do híbrido *E. urograndis*, onde inseriram o gene de seleção *nptII* e estabeleceram as melhores condições para a expressão do gene *uidA*. No caso de ápices caulinares de *E. saligna*, Silva e colaboradores (2011) estudaram o efeito da acetoseringona na co-cultura e, ao tentar inserir os genes *P5CS*, *uidA* e *nptII*, obtiveram expressão transiente do gene *uidA*. Ouyang e colaboradores (2012) publicaram o primeiro protocolo eficiente do gene *Rs-AFP2*, que confere resistência ao fungo *Phytophthora capsici*, além do gene de seleção *nptII*, a partir de transformação com *A. tumefaciens* em *E. urophylla*.

REFERÊNCIAS

- ABRAF – Associação Brasileira de Produtores de Florestas Plantadas (2012). Anuário estatístico da ABRAF: ano base 2011.
- Akama K, Puchta H, Hohn B (1995). Efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* using the bar gene as selectable marker. *Plant Cell Rep.* 14: 450-454.
- Alcantara GB (2008). Transformação genética de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* com o gene *gfp* sob controle de promotores cbfs induzidos pelo frio. Brazil: Federal University of Paraná, PhD. Thesis.
- Alcantara GB, Bessalho Filho JC, Quoirin M (2011). Organogenesis and transient genetic transformation of the hybrid *Eucalyptus grandis* × *Eucalyptus urophylla*. *Sci. Agric.* 68: 246-251.
- Alves ECSC (2001). Organogênese *in vitro* na regeneração de clones de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*. Brazil: Federal University of Viçosa, PhD Thesis.
- Alves ECSC, Xavier A, Otoni WC (2004). Organogênese de explante foliar de clones de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*. *Pesq. Agropec. Bras.* 39: 421-430.
- Andrade A (2001). Avaliação de parâmetros que influenciam a transformação genética do *Eucalyptus grandis* via *Agrobacterium*. Brazil: São Paulo University, Master Thesis.
- Barrueto Cid LP, Gomes ACM, Costa SBR, Brasileiro ACM (1999). Plant regeneration from seedling explants of *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 56: 17-23.
- Bertolucci F, Rezende G, Penchel R (1995). Produção e utilização de híbridos de eucalipto. *Silvicult.* 51: 12-16
- Bishop-Hurley SL, Zabkiewicz RJ, Grace L, Gardner RC, Wagner A, Walter C (2001). Conifer genetic engineering: transgenic *Pinus radiata* (D. Don) and *Picea abies* (Karst) plant are resistant to the herbicide Buster. *Plant Cell Rep.* 20: 235-243.
- Bizi RM, Júnior AG, Auer CG (2005). Seleção de fungicidas para controle de oídio em eucalipto. *Bol. Pesq. Fl.* 51: 165-170.
- Bonga JM, Aderkas PV (1992). *In vitro* culture of trees. Kluwer Academic Publishers: 57.
- Boscariol R.L. Almeida WA, Derbyshire MT, Mourão Filho FA, Mendes BM. (2003). The use of the PMI/mannose selection system to recover transgenic sweet orange plants (*Citrus sinensis* L. Osbeck). *Plant Cell Rep.* 22: 122–128.
- BRACELPA - Associação Brasileira de Celulose e Papel (2007). Desempenho do setor em 2007 e Projeções. Available: <http://www.bracelpa.org.br/bra/estatisticas/index.html>.
- Brasileiro ACM, Aragão FJL (2001). Marker genes for *in vitro* selection of transgenic plants. *J. Plant Biotech.* 3: 113-121.

- Brasileiro ACM, Dusi DMA (1999). Transformação genética de plantas. In: Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Embrapa: 679-735.
- Brasileiro ACM, Lacorte C (1998). Interação *Agrobacterium*-hospedeiro. In: Manual de transformação genética de plantas. 75-92
- Brooker MIH (2000). A new classification of the genus *Eucalyptus* L'Her. (Myrtaceae). Aust. Syst. Bot. 13: 79-148.
- Brukhin V, Clapham D, Elfstrand M (2000) Basta tolerance as a selectable and screening marker for transgenic plants of Norway spruce. Plant Cell Rep. 19: 899-903.
- Caldas LS, Haridasan P, Ferreira ME (1998). Meios nutritivos. In: Cultura de tecidos e transformação de plantas. Embrapa, 1: 87-132.
- Campoe OC (2012). Ecologia da produção e da competição intra-específica do *Eucalyptus grandis* ao longo de um gradiente de produtividade no Estado de São Paulo. Brazil: São Paulo University, PhD. Thesis.
- Castro PRC, Vieira EL (2001). Aplicação de reguladores vegetais na agricultura tropical. Ed. Agrop: 132.
- Chen M, Wang QY, Cheng XG, Xu ZS, Li LC, Ye XG, Xia LQ, MA YZ (2007). GmDREB2, a soybean DRE-binding transcription factor, conferred drought and high- salt tolerance in transgenic plants. Biochem. Bioph. Res. Co. 353: 299-305.
- Confalonieri M, Allegro G, Balestrazzi A, Fogher C, Delledonne M (1998) Regeneration of *Populus nigra* transgenic plants expressing a Kunitz proteinase inhibitor (*KTi₃*) gene. Mol. Breed. 4: 137-145.
- Cruz MB (2007). Efeitos do capim-colonião sobre o crescimento inicial de clones de eucalipto. Brazil: Federal University of State Paulista, Master Thesis.
- D'Halluin K, De Block M, Denecke J, Janssens J, Leemans J, Reynaerts A, Botterman J (1992). The bar gene as selectable and screenable marker in plant engineering. Meth. Enzymol. 216: 415-426.
- De Block M, Botterman J, Vandewiele M, Dockx J, Thoen C, Gossele V, Rao Movva N, Thompson C, Van Montagu M, Leemans J (1987). Engineering herbicide resistance in plants by expression of a detoxifying enzyme. Embo J. 6: 2513-2518.
- Deus DA (2007). Desenvolvimento de protocolo para produção e análise de calos de *Eucalyptus grandis* Hill ex. Maiden, visando estudo sobre a biossíntese da lignina. Brazil: Rural Federal University of Rio de Janeiro, Monograph Thesis.
- Dibax R (2007). Transformação genética de *Eucalyptus saligna* com o gene *P5CSF129A* via *Agrobacterium tumefaciens*. Brazil: Federal University of Paraná, PhD. Thesis
- Dibax R, Deschamps C, Bessalho Filho JC, Vieira LGE, Molinari HBC, De Campos MKF, Quoirin M (2010). Organogenesis and *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Eucalyptus saligna* with *P5CS* gene. Biol. Plant. 54: 6-12.
- Eldridge K, Davidson J, Hardwood C, Wyk GV (1994). Eucalypt domestication and breeding. Oxford: 228-246.

- Evangelista WV (2007). Caracterização da madeira de clones de *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh e *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake, oriunda de consórcio agrossilvipastoril. Brazil: Federal University of Viçosa, PhD. Thesis.
- FAO (1981). El eucalipto en la repoblación forestal. Roma: 747.
- Fernandes ET (2012). Fotossíntese e crescimento inicial de clones de eucalipto sob diferentes regimes hídricos. Brazil: State University of Southwest Bahia, Master Thesis.
- Freitag AS (2007). Freqüências de irrigação para *Eucalyptus grandis* e *Pinus elliottii* em viveiro. Brazil: Federal University of Santa Maria. Master Thesis.
- Gamborg OL, Miller RA, Ojima K (1968). Nutrient requirement of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* 50: 151-158.
- George EF (1993). Plant propagation by tissue culture – The technology. 2^a ed. England: Exegetics, 1:575.
- GFC - Git Forestry Consulting (2010). Global *Eucalyptus* map. Version 1.0.1. Available: http://git-forestry.com/download_git_eucalyptus_map_PT.htm.
- Giri CC, Shyamkumar B, Anjaneyulu C (2004). Progress in tissue culture, genetic transformation and application of biotechnology to trees: an overview. *Trees.* 18: 115-135.
- Golle DP (2010). Estabelecimento, multiplicação, calogênese, organogênese *in vitro* e análise da diversidade genética em acessos de *Eugenia involucrata* DC. Brasil: Universidade Federal de Santa Maria.
- Golle DP, Reiniger LRS, Curti AR, Hanauer JG, Waldow DAG (2009). Substratos alternativos e tratamentos pré-germinativos na germinação *in vitro* de sementes de *Pinus taeda* L. *R Arv.* 34: 39-48.
- González ER (2002). Transformação genética de *Eucalyptus grandis* e do híbrido *E. grandis* x *E. urophylla* via *Agrobacterium*. Brazil: University of São Paulo, Ph.D. Thesis.
- González ER, Andrade A, Bertolo AL, Carneiro RT, Lacerda GC, Defávani VAP, Labate MTV, Labate CL (2002). Transformação genética do eucalipto. *Biotec. Desenv.* 5: 18-22.
- Harcourt RL, Kyojuka J, Floyd RB, Bateman KS, Tanaka H, Decoocq V, Llewellyn DJ, Zhu X, Peacock WJ, Dennis ES (2000). Insect- and herbicide-resistant transgenic eucalypts. *Mol. Breeding* 6: 307-315.
- Huang ZC, Zeng FH, Lu XY (2010). Efficient regeneration of *Eucalyptus urophylla* from seedling-derived hypocotyls. *Biologia Plantarum* 54: 131-134.
- Humara JM, Ordás RJ (1999). The toxicity of antibiotics and herbicides on *in vitro* adventitious shoot formation on *Pinus pinea* L. cotyledons. *In Vitro Cell. Dev-Pl.* 35: 339-343.
- Joersbo M, Donaldson I, Kreiberg J, Petersen SG, Brunstedt J, Okkels FT (1998). Analysis of mannose selection used for transformation of sugar beet. *Mol. Breed.* 4: 111–117.
- Joersbo M, Okkels FT (1996). A novel principle for selection of transgenic plant cells: positive selection. *Plant Cell Rep.* 16: 219–221.

- Kasuga M, Miura S, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2004). A combination of the *Arabidopsis* DREB1A gene and stress-inducible rd29A promoter improved drought and low temperature stress tolerance in tobacco by gene transfer. *Plant Cell Phys.* 45: 346-350.
- Kawazu T, Doi K, Ohta T, Shinohara Y, Ito K, Shibata M (1990). Transformation of *Eucalyptus* (*Eucalyptus saligna*) using electroporation. In: 7^o International Congress on Plant Tissue and Cell Culture: 64.
- Lainé E, David A (1994). Regeneration of plants from leaf explants of micropropagated clonal *Eucalyptus grandis*. *Plant Cell Reports.* 13: 473–476.
- Lloyd G, McCown B (1980). Micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. *Int. Pl. Propagator's Soc.* 30: 421-427.
- Lopes JLW (2008). Qualidade de mudas clonais do híbrido de *Eucalyptus grandis* vs. *Eucalyptus urophylla*, submetidas a diferentes regimes hídricos. Brazil: São Paulo State University, PhD Thesis.
- Lucca P, Xudong Y, Potrykus I (2001). Effective selection and regeneration of transgenic rice plants with mannose as selective agent. *Mol. Breed.* 7: 43–49.
- Machado LOR, Penchel RM, Teulières C, Bertolucci FL, Boudet AM (1997). Transformation and regeneration studies of elite eucalypt hybrids: optimisation of physical and biological parameters. In: Iufro conference on silviculture and improvement of *Eucalypts*, Salvador.
- Matsunaga E, Nanto K, Oishi M, Ebinuma H, Morishita Y, Sakurai N, Suzuki H, Shibata D, Shimada T (2012). *Agrobacterium*-mediated transformation of *Eucalyptus globulus* using explants with shoot apex with introduction of bacterial choline oxidase gene to enhance salt tolerance. *Plant Cell Rep.* 31: 225-235.
- Mauri R (2010). Anatomia e densidade do lenho de clones de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis*, com variação de altitude e topografia, no Estado de Minas Gerais. Brazil: Federal University of Espírito Santo, Master Thesis.
- Micheluzzi FC (2007). Estudo da organogênese *in vitro* de explantes foliares de macieira (*Malus domestica* Borkh) Cv. Galaxy. Brazil: Federal University of Florianópolis, Master Thesis.
- Mora AL, Garcia CH (2000) A cultura do eucalipto no Brasil. Verso e Reverso Comunicações: 112.
- Moraes-Fernandes MIB (1987). Perspectivas da Biotecnologia para o Melhoramento de Plantas. *Pesq. Agrop. Bras.* 22: 881-896.
- Moralejo M, Rochange F, Boudet AM, Teulières C (1998). Generation of transgenic *Eucalyptus globulus* plantlets through *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation. *Aust. J Plant Physiol.* 25: 207-212.
- Mroginski LA, Roca WM (2004). Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales. In: *Biotecnología y mejoramiento vegetal.* 35-42.
- Murashige T, Skoog F (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plantarum.* 15: 473-497.

- Nepomuceno AL, Fuganti R, Kanamori N, Pereira SS, Rodrigues FA, Neumaier N, Farias JRB, Marcelino FC (2011). Estratégias de engenharia genética para tolerância à seca em plantas através da expressão de fatores de transcrição. In: Simpósio sobre Tolerância à Deficiência Hídrica em Plantas: Adaptando as Culturas ao Clima do Futuro: 103-109.
- Oliveira Y, Adamuchio LG, Oliveira C, Degenhardt-Goldbach J, Gerhardt I, Bessalho Filho JC, Dibax R, Quoirin M (2011). Indirect organogenesis from leaf explants of *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii* and shoot multiplication. In: Iufro tree biotechnology conference, Arraial d'Ajuda.
- Ouyang LJ, He WH, Huang ZC, Zhao LY, Peng SH, Sha YE, Zeng FH, Lu XY (2012). Introduction of the *RS-AFP2* gene into *Eucalyptus urophylla* for resistance to *Phytophthora capsici*. J. Trop. For. Sci. 24: 198-208.
- Pellegrineschi A, Ribaut JM, Trethowan R, Yamaguchi-Shinozaki K, Hoisintong D (2002). Progress in the genetic engineering of wheat for water-limited conditions. JIRCAS Work. Rep. 55-60.
- Potrykus I (1991). Gene transfer to plants: assessment of published approaches and results. Ann. Rev. Plant. Phys. 42: 205-225.
- Potts BM (2004). Genetic improvement of eucalypts. Enc. Forest Sci. p. 104-114.
- Qin F, Kakimoto M, Sajuma Y, Maruyama K, Osakabe Y, Tran LS, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2007). Regulation and functional analysis of ZMDREB2A in response to drought and heat stresses in *Zea mays* L. Plant J. 50: 54-69.
- Qin F, Sakuma Y, Tran LSP, Maruyama K, Kidokoro S, Fujita Y, Fujita M, Umezawa T, Sawano Y, Miyazono K, Tanokura M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2008). *Arabidopsis* DREB2A-Interacting Proteins Function as RING E₃ Ligases and Negatively Regulate Plant Drought Stress-Responsive Gene Expression. Plant Cell 20: 1693-1707.
- Quilhó T, Miranda I, Pereira H (2006). Within-tree variation in wood fibre biometry and basic density of the urograndis eucalypt hybrid (*Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*). IAWA J. 27: 243-254.
- Quoirin M, Quisen R (2006). Advances in genetic transformation of *Eucalyptus* species. Mol. Biol. Trop. Plant. p. 41-56.
- Santos MD (2011). Efeito do espaçamento de plantio na biomassa do fuste de um clone híbrido interespecífico de *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus urophylla*. Brazil: São Paulo State University, Master Thesis.
- Santos SR (2005). Influência da qualidade da madeira de híbridos de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* e do processo kraft de polpação na qualidade da polpa branqueada. Brazil: São Paulo University, Master Thesis.
- Sartoretto LM, Barrueto Cid LP, Brasileiro ACM (2002). Biolistic transformation of *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* callus. Funct. Plant Biol. 29: 917-924.
- Sartoretto LM, Saldanha CW, Corder MPM (2008). Transformação genética: estratégias e aplicações para o melhoramento genético de espécies florestais. Cienc. Rural 38: 861-871.

- SBF – Sociedade Brasileira de Silvicultura (2000). Eucalipto no Brasil e no mundo. Available: <http://www.floresta.ibef.br>.
- Scanavaca Junior L (2001). Caracterização silvicultural, botânica e tecnológica do *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake e de seu potencial para utilização em serraria. Brazil: University of São Paulo, Master Thesis.
- Schuch MW, Peters JA (2002). Regeneração de brotações de macieira (*Malus domestica*, Borkh.) cv. Gala. Rev. Bras. Frut. 24: 301-305.
- Serrano L, Rochange F, Semblat JP, Marque C, Teulières C, Boudet AM (1996). Genetic transformation of *Eucalyptus globulus* through biolistics: complementary development of procedures for organogenesis from zygotic embryos and stable transformation of corresponding proliferating tissue. J Exp. Bot. 47: 285-290.
- Sheng-jian MA, Quin-mei PAN, Zhi-hua WU, Fu-hua Z (2006). Tissue culture and plantlet regeneration of *Eucalyptus urophylla*. Eucalypt Science & technology. 01
- Silva ALL, Oliveira Y, Costa JL, Mudry CS, Procopiuk M, Scheidt GN, Brondani GE (2011). Preliminary results for genetic transformation of shoot tip of *Eucalyptus saligna* Sm. via *Agrobacterium tumefaciens*. J. Biotec. Biodivers. 2: 1-6.
- Silva JC (2005). Novos Valores estimulam consumo da madeira de reflorestamento. Vis. Agric. 4: 112-113.
- Silva JC, Castro VR, Xavier BA (2008). Eucalipto: manual prático do fazendeiro florestal. Viçosa: 72.
- Soares TS, Carvalho RMMA, Vale AB (2003). Avaliação econômica de um povoamento de *Eucalyptus grandis* destinado a multiprodutos. Rev. Arv. 27: 689-694.
- Souza KCA (2007). Atenuação do processo de lignificação em células de *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake, em suspensão, por 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético). Brazil: Rural Federal University of Rio de Janeiro, Master Thesis.
- Souza ND (2008). Identificação de madeiras de clones de *Eucalyptus grandis*, *Eucalyptus urophylla* e do híbrido *Eucalyptus urograndis* por RMN¹³C. Brazil: Rural Federal University of Rio de Janeiro, Master Thesis.
- Srivastava LM (2001). Plant growth and development. Ed. Academic Press: 722.
- Stafford HA (2000). Crown gall disease and *Agrobacterium tumefaciens*: a study of the history, present knowledge, missing information, and impact on molecular genetics. The Bot. Rev. 66: 99-118.
- Studart-Guimarães C, Lacorte C, Brasileiro ACM (2003). Transformação genética em espécies florestais. Cienc. Florest. 13: 167-178.
- Taiz L, Zeiger E (2006). Fisiologia Vegetal. 3ª Ed. Artmed: 677.
- Termignoni RR (2005). Cultura de tecidos vegetais. Ed. UFRGS: 182.
- Teulières C, Grima-Pettenati J, Curie C, Teissie J, Boudet AM (1991). Transient foreign gene expression in polyethylene/glycol treated or electropulsated *Eucalyptus gunnii* protoplasts. Plant Cell Tissue Organ. Cult. 25: 125.

- Thompson C J, Rao Movva N, Tizard R, Chameri R, Davies JE, Lauwereys M, Botterman J (1987). Characterization of the herbicide-resistant *bar* gene from *Streptomyces hygroscopicus*. *Embo J.* 6: 2519-2523.
- Tibok A, Blackhall NW, Power JB, Davey MR (1995). Optimized plant regeneration from callus derived from seedling hypocotyls of *Eucalyptus urophylla*. *Plant Science.* 110: 139-145.
- Tournier V, Grat S, Marque C, El Kayal W, Penchel R, Andrade GD, Boudet AM, Teulières C (2003). An efficient procedure to stably introduce genes into an economically important pulp tree (*Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*). *Transgenic Res.* 12: 403-411.
- Vieira JGZ, Faria RT, Vieira LGE, Molinari HBC (2005). Transformação genética de citrumelo Swingle (*Citrus paradisi* Macf. x *Poncirus trifoliata* L. Raf.) com o gene marcador fosfomanose isomerase (*pmi*). *Acta Sci. Agron.* 27: 41-547.
- Villalobos A, Thorpe TA (1991). Micropropagación: conceptos, metodología y resultados. In: *Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones*. Ed. Cali: 127-141.
- Warrag E, Lesney MS, Rockwood DJ (1991). Nodule culture and regeneration of *Eucalyptus grandis* hybrids. *Plant Cell Reports.* 9: 586-589.
- White PR (1943). Further evidence on the significance of glycine, pyridoxine and nicotinic acid in the nutrition of excised tomato roots. *Am. J. Bot.* 30: 33-36.
- Wilmink A, Dons JJM (1993). Selective agents and marker genes for use in transformation in monocotyledonous plants. *Plant Mol. Bio. Rep.* 11: 165-185.
- Wright M, Dawson J, Dunder E, Suttie J, Reed J, Kramer C, Chang Y, Novitzky R, Wang H, Artim-Moore L (2001). Efficient biolistic transformation of maize (*Zea mays* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.) using the phosphomannose isomerase gene, *pmi*, as the selectable marker. *Plant Cell Rep.* 20: 429-436.
- Yamagushi-Shinozaki K, Shinozaki K (1994). A novel cis-acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress. *Plant Cell* 6:251-264.
- Zhengquan H, Yaping F, Huamin S, Guocheng H, Shihong Z, Yonghong Y, Zongxiu S (2004). Phosphomannose-isomerase (*pmi*) gene as a selectable marker for rice transformation via *Agrobacterium*. *Plant Sci.* 166: 17-22

3 ORGANOGÊNESE INDIRETA EM EXPLANTES FOLIARES DE *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*

RESUMO

Os sistemas de transformação genética necessitam de protocolos que permitam regenerar plantas transgênicas a partir de tecidos transformados. Vários fatores influenciam a eficiência do protocolo de regeneração, inclusive o genótipo. Assim é necessário que este seja adaptado para cada espécie, ou até mesmo para cada clone. Este trabalho buscou estabelecer um protocolo de organogênese indireta a partir de explantes foliares do clone 3336 de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* (“*E. urograndis*”). Foram utilizados explantes foliares de brotações mantidas *in vitro*, em meio MS com 0,2 mg L⁻¹ de BAP. Para a formação de calos e regeneração de gemas, foram testados os meios de cultura JADS, MS, QL e WPM. Para a calogênese, diferentes concentrações e combinações de reguladores vegetais (2,4-D, ANA, BAP e TDZ) foram comparadas. O meio de cultura usado na regeneração de gemas sempre continha 5,0 µM de BAP e 0,5 µM de ANA e essa etapa foi de 30 dias em todos os experimentos. Primeiramente, na fase de indução de calos testaram-se diferentes concentrações de ANA em meio JADS por 30 dias. O melhor resultado em termos de formação de calos e diferenciação em gemas foi obtido com 0,1 µM de ANA no primeiro meio de cultura seguido de 30 dias no meio de regeneração de gemas. Em seguida, foi realizada comparação entre duas auxinas: ANA e 2,4-D no meio de cultura JADS por 30 dias, onde 0,1 µM de ANA proporcionou melhor resultado que o 2,4-D. Nas culturas realizadas em meio de cultura JADS houve alta taxa de oxidação dos explantes. Assim, a fim de diminuir a oxidação, testaram-se diferentes meios de cultura: WPM, MS, JADS e QL na etapa de alogênese e de regeneração de brotações. Obteve-se a maior porcentagem de regeneração e menor taxa de oxidação após cultura em meio WPM com 0,1 µM de ANA e 0,5 µM de TDZ por 30 dias, seguida de cultura no meio de indução de brotações, com 5,0 µM de BAP e 0,5 µM de ANA por mais 30 dias. Em seguida, testaram-se ANA ou 2,4-D combinado com TDZ no meio WPM. Os resultados obtidos no meio contendo 0,1 µM de ANA (43,6%) foram superiores aos obtidos com 2,4-D (28,5%). Além disso, utilizaram-se as citocininas TDZ e BAP combinadas com ANA no meio de cultura WPM e obteve-se melhores taxas de regeneração nos meios contendo TDZ e ANA (42,6%). Procurou-se também determinar se a idade das brotações utilizadas como fonte de explantes tinha efeito sobre a organogênese. Conclui-se que se pode utilizar as folhas das brotações cultivadas com 3, 4 ou 5 semanas na última subcultura. O tratamento mais eficiente em termos de regeneração de gemas foi o meio de cultura WPM e a combinação de 0,25 µM de TDZ e 0,1 µM de ANA por 30 dias para a calogênese e, em seguida, 5,0 µM de BAP e 0,5 µM de ANA por outros 30 dias. Este protocolo proporcionou uma regeneração de brotos em até 46% dos explantes, com uma baixa oxidação dos tecidos.¹

Palavras-chaves: calogênese, thidiazuron, meio WPM.

¹ Capítulo enviado para publicação seguindo as normas da revista

3 INDIRECT ORGANOGENESIS IN LEAF EXPLANTS OF *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*

ABSTRACT

The systems of genetic transformation require protocols that allow the regeneration of transgenic plants from transformed tissues. Regeneration - or organogenesis - is the morphogenetic response of an explant to a stimulus that enables differentiation of buds and, then, the formation of complete plants. Several factors influence the efficiency of regeneration protocol, including genotype, so it is necessary to adapt it to each species, or even to each clone. This study aimed to establish a protocol for indirect organogenesis in leaf explants clone 3336 of *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* ("*E. urograndis*"), testing several factors that can influence it. Leaf explants of *E. urograndis* shoots maintained *in vitro* were cultured on MS medium supplemented with 0.2 mg L⁻¹ BAP. Several culture media (JADS, MS, WPM and QL) and different concentrations and combinations of plant growth regulators (2,4-D, NAA, BAP and TDZ) were tested. First, during the callus induction stage different concentrations of NAA were added into the culture medium for 30 days, followed by subculture on regeneration medium containing 5.0 µM BAP and 0.5 µM NAA for 30 days. The best result was obtained with 0.1 µM NAA. Another experiment was undertaken comparing two auxins: NAA and 2,4-D in the JADS induction medium for 30 days. When 0.1 µM NAA was supplemented to JADS medium, the regeneration rate was higher than in the media containing 2,4-D. In JADS culture medium, the explants presented high oxidation rate. In order to reduce the oxidation, different culture media were tested: WPM, MS, JADS and QL. The highest percentage of regeneration and lowest oxidation rate were observed after culture on WPM medium supplemented with 0.1 µM NAA and 0.5 µM TDZ for 30 days, followed by a 30-day culture on the medium of shoot induction, that contains 5.0 µM BAP and 0.5 µM NAA. Then NAA or 2,4-D was combined with TDZ, 0.1 µM NAA (43,6%) providing a higher regeneration rate than 2,4-D (28,5%). During callus induction stage, TDZ and BAP were also individually combined with NAA in WPM medium. The results obtained 30 days after transfer into regeneration medium showed that the combination of TDZ and NAA was superior to BAP and NAA combination for shoot regeneration. We also investigated whether the culture duration of the shoots during the last subculture before leaf excision would affect the organogenesis. The conclusion is that leaves of shoots cultivated for 3, 4 or 5 weeks may be used without differences in callogenesis and regeneration rates. The most effective treatment in terms of bud regeneration was WPM and the combination of 0.25 µM TDZ and 0.1 µM NAA for callus induction for 30 days and then 5.0 µM BAP and 0.5 µM NAA for another 30 days. This protocol yielded a regeneration of shoots for up to 46% of the explants, with a low oxidation of tissues.

Key-words: callogenesis, thidiazuron, WPM medium.

3.1 INTRODUÇÃO

Originário da Austrália e da Indonésia, o eucalipto é hoje um dos gêneros florestais mais plantados no Brasil, totalizando 4.873.952 ha em 2011, segundo dados da ABRAF 2012. Em território brasileiro, o eucalipto encontrou ótimas condições de clima e solo para se desenvolver, com alto índice de produtividade. O eucalipto é usado para produção de celulose, é fonte de carvão vegetal para gerar energia e de madeira sólida usada em móveis, pisos, revestimentos e outras aplicações na construção civil (GONZÁLEZ, 2002). Entre mais de 600 espécies, o híbrido entre *Eucalyptus grandis* e *E. urophylla* (“*E. urograndis*”) se destaca por aliar duas principais características dos seus parentais: a alta densidade da madeira e as propriedades físicas de celulose (ALCANTARA, 2008).

As pesquisas com este gênero vêm aumentando consideravelmente em vista do seu valor econômico e da sua grande utilização. Assim, as técnicas da biotecnologia florestal aliadas ao melhoramento convencional, podem contribuir para obtenção de genótipos com novas características de interesse em um menor espaço de tempo (GOLLE *et al.*, 2009). Uma das técnicas biotecnológicas é a transformação genética, que permite inserir genes de interesse, de outra planta ou até mesmo de outros organismos, em um genoma receptor sem comprometer a viabilidade das células (STUARDT-GUIMARÃES *et al.*, 2003).

Para realizar a transformação genética é necessária a regeneração de plantas a partir dos tecidos nos quais a construção gênica foi inserida e é essa etapa a de maior dificuldade. Portanto, um pré-requisito essencial para a eficiência da transformação genética é um protocolo completo de regeneração de plantas por cultura de tecidos (McCOWN e SELLMER, 1987). As espécies lenhosas têm apresentado resultados de organogênese limitados, principalmente pela necessidade de adaptar os protocolos para cada espécie, já que existe uma grande variação genotípica. Portanto, é necessária uma adequação do protocolo para cada genótipo.

A regeneração por meio da organogênese tem apresentado avanços para diferentes espécies de eucalipto, como para *E. globulus* (AZMI *et al.*, 1997; MORALEJO *et al.*, 1998; BANDYOPADHYAY *et al.*, 1999), *E. gunnii* (HERVÉ *et al.*, 2001), *E. urophylla* (TIBOK *et al.*, 1995), *E. urograndis* (BARRUETO CID *et al.*, 1999; TOURNIER *et al.*, 2003; ALVES *et al.*, 2004; OUYANG *et al.*, 2012). O protocolo pode ser influenciado por diversos fatores, como meio de cultura, reguladores vegetais, períodos de subcultivo, genótipo, entre outros

(GEORGE, 1993). Portanto, a otimização e adaptação do protocolo de regeneração para cada material genético é necessária. Assim, este trabalho pretende estabelecer um protocolo de organogênese indireta para um clone de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* a partir de explantes foliares.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Local de realização dos experimentos

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais e Transformação pertencente a Embrapa Florestas – CNPF, localizada em Colombo, Paraná.

3.2.2 Condições gerais de cultura *in vitro*

Todas as culturas *in vitro* foram mantidas em BOD, sob luz fluorescente branca fria com irradiância de $40 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 16 h e temperatura de $23 \pm 2^\circ\text{C}$. As culturas foram realizadas em placas de Petri de 10 cm de diâmetro e 2 cm de altura, contendo 30 mL de meio de cultura e vedadas com filme de cloreto de polivinila (PVC).

Todos os meios de cultura tiveram o pH ajustado em 5,8 utilizando ácido clorídrico (0,1M) e hidróxido de sódio (0,1M), previamente à adição do ágar e em seguida foram autoclavados durante 20 min a 120°C . Os meios foram suplementados com 30 g L^{-1} de sacarose, 500 mg L^{-1} de polivinilpirrolidona (PVP) e 7 g L^{-1} de ágar.

Os reguladores vegetais 6-benzilaminopurina (BAP), ácido naftaleno acético (ANA) e ácido 2,4- diclorofenoxiacético (2,4-D) foram adicionados ao meio de cultura antes da autoclavagem. O thidiazuron (TDZ) foi esterilizado por filtração, utilizando filtro descartável Millex - GP® com membrana estéril de $0,22 \mu\text{m}$, e adicionado ao meio de cultura, logo após a autoclavagem.

3.2.3 Fonte de explantes e meio de cultura de multiplicação

Foram utilizadas folhas de brotações do clone 3336 do híbrido *E. urograndis*, mantidas *in vitro* na fase de multiplicação em meio de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) (Anexo 1) suplementado com 30 g L^{-1} de sacarose, $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP e $7,0 \text{ g L}^{-1}$ de ágar (Vetec®). As culturas tinham aproximadamente 24 subcultivos. As brotações foram

mantidas em sala de crescimento, sob luz fluorescente branca fria com intensidade de $40 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, com fotoperíodo de 16 h e temperatura de $23 \pm 2^\circ\text{C}$.

3.2.4 Delineamento experimental, variáveis analisadas e análises estatísticas

Cada tratamento era constituído de 6 repetições (placas de Petri), com 10 explantes em cada repetição, sendo dispostas em um delineamento inteiramente casualizado. Todos os experimentos foram realizados duas vezes.

Aos 60 dias após o início de cada experimento, foram avaliadas as porcentagens de formação de calos nos explantes, calos formando gemas e explantes oxidando. Foram consideradas apenas gemas adventícias e/ou brotações formadas a partir de calos, e não aquelas formadas diretamente das gemas axilares. Com relação a variável explantes oxidados foram considerados explantes não-responsivos, necrosados e/ou com calos oxidados.

A análise estatística foi realizada com teste do Qui-quadrado, sendo que as comparações entre os tratamentos foram realizadas por contrastes ortogonais e pela análise de *deviance* no programa estatístico SAS.

3.2.5 Organogênese indireta

Na fase de indução de calos, foram escolhidas folhas saudáveis retiradas de brotações com três a cinco semanas de cultivo em meio de multiplicação. As folhas foram selecionadas e em seguida retirada a região apical de cada folha, mantendo o pecíolo com a face adaxial em contato com o meio de cultura. Nesta etapa, as culturas foram mantidas em BOD com temperatura de $23^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, no escuro, por 30 dias, sendo transferidas a meios frescos a cada 14 dias. Os meios utilizados durante os primeiros 30 dias da cultura *in vitro* foram alterados de acordo com cada experimento.

Na etapa de indução de gemas, os explantes foram transferidos para o meio de indução, mantendo sempre $5,0 \mu\text{M}$ de BAP e $0,5 \mu\text{M}$ de ANA. Neste período, as culturas ficaram em fotoperíodo de 16h e foram também repicadas a cada 14 dias para o mesmo meio

fresco. Após 120 dias, os explantes foram colocados em meio de multiplicação (meio de cultura MS suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, 0,2 mg L⁻¹ de BAP e 7,0 g L⁻¹ de ágar).

3.2.5.1 Efeito de combinações de ácido naftaleno acético (ANA) e Thidiazuron (TDZ) no meio de cultura JADS

Foram utilizadas cinco concentrações da auxina ANA combinada com 0,5 µM de TDZ no meio de cultura JADS, sendo T1 com 0,1 µM, T2 com 0,2 µM, T3 com 0,5 µM, T4 com 0,75 µM e T5 com 1 µM. Os explantes permaneceram neste meio por 30 dias, sendo repicados a cada 15 dias e em seguida foram todos transferidos para o meio com 5,0 µM de BAP e 0,5 µM de ANA para indução de brotação.

3.2.5.2 Efeito de combinações de Thidiazuron (TDZ) e ácido 2,4- diclorofenoxiacético (2,4-D) ou ácido naftaleno acético (ANA) adicionados ao meio de cultura JADS

Foram testadas duas concentrações de 2,4-D e uma de ANA – adicionados ao meio de cultura JADS (em µM): 0,5 de TDZ + 0,1 de ANA, 0,5 de TDZ + 0,1 de 2,4-D e 0,5 de TDZ + 0,5 de 2,4D na fase de indução de calos. No meio de indução de brotações, foi adicionado 5,0 µM de BAP e 0,5 µM de ANA ao meio JADS.

3.2.5.3 Efeito de diferentes meios de cultura

Foram testados os seguintes meios de cultura (sais e compostos orgânicos): WPM (LLOYD e McCOWN, 1980), JADS (CORREIA, 1993), QL (QUOIRIN e LEPOIVRE, 1977) e MS (Anexo 1). As combinações dos reguladores vegetais foram as mesmas para todos os meios, sendo 0,5 µM de TDZ e 0,1 µM de ANA nos 30 primeiros dias e 5,0 µM de BAP e 0,5 µM de ANA nos 30 dias seguintes.

3.2.5.4 Influência de combinações de Thidiazuron (TDZ), 6-benzilaminopurina (BAP) e ácido naftaleno acético (ANA) no meio de cultura de indução

Foram avaliadas diferentes concentrações e combinações dos reguladores vegetais no meio de cultura WPM. O experimento consistiu de 5 tratamentos na fase de indução de calos, todos acrescentados de 0,1 μM de ANA, sendo: 0,25 μM de TDZ, 0,5 μM de TDZ, 0,25 μM de TDZ + 2,5 μM de BAP, 2,5 μM de BAP e 5,0 μM de BAP durante 30 dias. Já na fase de indução de brotações, o meio foi WPM com 5,0 μM de BAP e 0,5 μM de ANA para todos os tratamentos por mais 30 dias.

3.2.5.5 Efeito de combinações de Thidiazuron (TDZ) e ácido 2,4- diclorofenoxiacético (2,4-D) ou ácido naftaleno acético (ANA) adicionados ao meio de cultura WPM

Foram testadas duas concentrações da auxina 2,4-D, comparada com uma concentração de ANA. O experimento consistiu de três tratamentos (em μM): 0,5 de TDZ + 0,1 de ANA, 0,5 de TDZ + 0,1 de 2,4D e 0,5 de TDZ + 0,5 de 2,4 D na fase de indução de calos durante 30 dias. Em seguida, os calos foram transferidos a meio de indução de gemas WPM adicionado de 5,0 μM de BAP e 0,5 μM de ANA.

3.2.5.6 Efeito do número de semanas do último subcultivo na organogênese a partir de folhas

Neste experimento foi avaliado o efeito da duração dos subcultivos em meio de multiplicação MS sendo os tratamentos de 3, 4 e 5 semanas. O meio de organogênese foi o WPM e as combinações dos reguladores vegetais estão indicadas em 3.2.5.

3.2.6 Estudo histológico

O estudo histológico dos explantes em fase regenerativa foi conduzido no Laboratório de Botânica Estrutural do Departamento de Botânica, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Foram utilizados como amostras explantes do meio de cultura com WPM suplementado 0,5 μM de TDZ e 0,1 μM de ANA nos 30 primeiros dias e 5,0 μM de BAP e 0,5 μM de ANA nos 30 dias seguintes. Foram coletadas amostras a cada 15 dias durante 60 dias.

As amostras foram fixadas em solução de Karnovsky (KARNOVSKY, 1965), em seguida desidratadas em série butílica terciária (JOHANSEN, 1940) e emblocadas em Paraplast®. Os cortes longitudinais foram realizados em micrótomo de rotação de aproximadamente 8 μm e corados em azul de alcian e safranina (LUQUE *et al.*, 1996).

As fotomicrografias foram obtidas utilizando microscópio Olympus BX41, com câmera digital acoplada e programa de captura de imagem Analysis Getit.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.3.1 Efeito de combinações de ácido naftaleno acético (ANA) e Thidiazuron (TDZ) no meio de cultura JADS

O meio de cultura JADS foi desenvolvido para o cultivo *in vitro* de *Eucalyptus grandis* (CORREIA, 1995) e, em vista disso, foi utilizado inicialmente para o estabelecimento do protocolo de organogênese indireta neste trabalho. Ainda de acordo com Correia (1995) a definição dos componentes deste meio de cultura se deu por informações bibliográficas sobre teores de nutrientes minerais em tecidos de *E. grandis*.

Este experimento proporcionou uma taxa de regeneração máxima de 20% dos explantes regenerando gemas, em um dos tratamentos, sendo que esta taxa é considerada suficiente para a regeneração de espécies recalcitrantes. Quando comparado este resultado com o de outros autores, nota-se a dificuldade de regeneração do eucalipto. González (2002) utilizando explantes foliares de *E. urograndis*, obteve cerca de 14% de regeneração no meio contendo 2 μM de TDZ e 2,5 μM de ANA. Também em explantes foliares do mesmo híbrido, Alves e colaboradores (2004) obtiveram as melhores respostas de calogênese com 2,27 μM de TDZ e 0,53 μM de ANA com cerca de 8% de regeneração.

Quando observadas as porcentagens de explantes formando gemas, aparentemente, ocorreu uma tendência a diminuir com o aumento da concentração de ANA no meio de indução de calo (Tabela 1). Porém, após realizada a análise de contrastes ortogonais entre diferentes tratamentos, pode-se concluir, com base na variável calos formando gemas, que, para qualquer uma das concentrações de ANA testadas, obteve-se a mesma taxa de regeneração, já que não se observou diferença estatística (Tabela 2). Tanto quando comparadas as maiores concentrações (0,1 e 0,2 μM) com as menores (0,75 e 1,0 μM) de ANA quanto comparando a menor (0,1 μM) versus a maior (1,0 μM) não observa-se diferença estatística em calos formando gemas. Assim, optou-se por utilizar 0,1 μM de ANA durante o estabelecimento do protocolo de regeneração.

Tabela 1. Efeito de diferentes concentrações de ANA combinadas com 0,5 μM de TDZ na formação de calos e gemas e na oxidação de explantes foliares de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* cultivados por 30 dias em meios de cultura JADS, avaliados após 60 dias. Nos últimos 30 dias, os explantes foram cultivados em meios JADS adicionado de 5,0 μM de BAP e 0,5 μM de ANA.

ANA (μM)	Explantes formando Calos (%)	Calos formando Gemas (%)	Explantes oxidados (%)
0,1	100 \pm 0	20 \pm 6,32	66,6 \pm 8,61
0,2	100 \pm 0	18,3 \pm 7,52	58,3 \pm 7,52
0,5	100 \pm 0	15 \pm 5,47	75 \pm 13,78
0,75	100 \pm 0	18,3 \pm 7,52	81,6 \pm 9,83
1	100 \pm 0	11,6 \pm 4,08	88,3 \pm 11,69

Média \pm desvio padrão da média

Tabela 2. Análise de contrastes ortogonais para a presença de calos formando gemas e explantes oxidados de explantes foliares de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* cultivados por 30 dias em meio de cultura JADS contendo diferentes concentrações de ANA combinado com 0,5 μM de TDZ, avaliados após 60 dias. Nos últimos 30 dias, os explantes foram cultivados em meio JADS com 5,0 μM de BAP e 0,5 μM de ANA.

Contrastes avaliados: ANA (μM)	Valor de p para calos formando gemas	Valor de p para calos oxidados
0,1 vs demais	0,2463 ^{ns}	0,0877 ^{ns}
0,1 vs 1,0	0,2159 ^{ns}	0,0062 [*]
0,1 e 0,2 vs 0,75 e 1,0	0,1114 ^{ns}	0,0001 [*]
0,1 vs 0,2	0,8166 ^{ns}	0,3465 ^{ns}

^{ns}: Não significativo. ^{*}: Significativo a 5% de probabilidade.

Em todos os tratamentos houve perda elevada de explantes devido à alta oxidação, chegando a 88% (1,0 μM de ANA). As menores porcentagens de oxidação foram observadas nos dois tratamentos com as menores concentrações de ANA: 0,1 (66,6%) e 0,2 μM (58,3%),

onde não foi observada diferença estatística entre esses dois tratamentos (Tabela 2). Quando comparadas as maiores concentrações versus as menores se observa diferença estatística com relação a oxidação, sendo que as menores médias de oxidação foram obtidas nos meios de cultura com as menores concentrações de ANA, justificando, portanto, a utilização de 0,1 μM de ANA.

3.3.2 Efeito de combinações de Thidiazuron (TDZ) e ácido 2,4- diclorofenoxiacético (2,4-D) ou ácido naftaleno acético (ANA) adicionados ao meio de cultura JADS

ANA e 2,4-D são auxinas sintéticas e têm efeitos semelhantes às auxinas de ocorrência natural, sendo mais estáveis que as naturais (DEUS, 2007). A maior porcentagem de regeneração de gemas foi obtida no meio com ANA (20%), o qual diferiu estatisticamente dos dois tratamentos com 2,4-D (Tabelas 3 e 4). Em seus estudos sobre o efeito do TDZ em cultura *in vitro*, Lu (1993) observou que o TDZ apresenta maior eficiência na presença de ANA em várias espécies, principalmente em florestais. O sucesso do uso do ANA combinado com TDZ foi também observado em outros trabalhos, como no caso de *E. urophylla* (DEUS *et al.*, 2007), *E. saligna* (DIBAX, 2007) e *E. camaldulensis* (DIBAX *et al.*, 2010).

Tabela 3. Efeito de combinações de TDZ (0,5 μM) e ANA ou 2,4-D em meio JADS na formação de calos, de gemas e explantes oxidados de explantes foliares de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*, avaliados após 60 dias. Nos últimos 30 dias, o meio de cultura foi o JADS com 5,0 μM de BAP e 0,5 μM de ANA.

Tratamento		Explantes formando Calos (%)	Calos formando Gemas (%)	Explantes oxidados (%)
ANA (μM)	2,4-D (μM)			
0,1	-	95 \pm 5,47	20 \pm 10,952	81,6 \pm 7,52
-	0,1	96,6 \pm 5,16	8,3 \pm 7,57	86,6 \pm 8,16
-	0,5	98,3 \pm 4,08	5 \pm 8,36	95 \pm 8,36

Média \pm desvio padrão da média

Tabela 4. Análise de contrastes ortogonais para a presença de calos formando gemas e explantes oxidados em explantes foliares de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* cultivados por 30 dias em meios de cultura contendo ANA ou 2,4-D sempre combinados com 0,5 μ M de TDZ, avaliados após 60 dias. Nos últimos 30 dias, os explantes foram cultivados em meio JADS com 5,0 μ M de BAP e 0,5 μ M de ANA.

Contrastes avaliados: ANA e 2,4-D (μ M)	Valor de p para calos formando gemas	Valor de p para calos oxidados
0,1 de ANA vs 0,1 e 0,5 de 2,4-D	0,0096*	0,0594 ^{ns}
0,1 de ANA vs 0,1 de 2,4-D	0,0748 ^{ns}	0,4548 ^{ns}

^{ns}: Não significativo. *: Significativo a 5% de probabilidade.

Com relação à formação de calos, as médias encontradas variaram entre 95 e 98,3%. Ammirato (1983) afirmou que o 2,4-D é um dos reguladores de crescimento mais eficazes na indução de calos, isto pode ser visto nos resultados aqui apresentados nas concentrações testadas que mostraram que o 2,4-D tem uma boa formação de calos. No entanto, estes quase não foram capazes de induzir os mecanismos envolvidos na aquisição de competência no tecido foliar para formar gemas, com respostas quase nulas aos estímulos hormonais, a maior média de regeneração foi de 8,3% entre os tratamentos com 2,4-D.

As porcentagens de oxidação variaram entre 81 e 95% e não mostraram diferença estatística entre os tratamentos (Tabela 4). A oxidação influencia a capacidade regenerativa do tecido vegetal, visto que este processo pode ocorrer em todo o explante ou em regiões que contenham células competentes (QUISEN, 2007). Assim, se for possível diminuir a oxidação dos explantes, a taxa de regeneração pode ser aumentada. Um dos fatores que influencia a oxidação é a composição do meio de cultura.

3.3.3 Efeito de diferentes meios de cultura

A fim de diminuir a oxidação e, conseqüentemente, melhorar os resultados de regeneração de gemas, buscou-se testar novos meios de cultura. Como os explantes apresentaram as maiores porcentagens de regeneração após a indução de calos no meio WPM

– de 20% - (Tabela 5), realizou-se a análise estatística usando este meio versus os demais (Tabela 6).

Comparando o meio WPM com os demais em conjunto, houve diferença estatística nas duas variáveis analisadas, calos formando gemas e explantes oxidados. Quando comparado o meio WPM versus o meio MS, não houve diferença significativa em relação aos calos formando gemas (Tabela 6). O meio de cultura MS caracteriza-se por apresentar uma concentração iônica alta, de 94,25 mM, enquanto que o WPM, por exemplo, possui 42,49 mM de íons totais. A formulação salina do meio de cultura WPM apresenta na sua composição uma menor concentração de nitrogênio e potássio e uma menor força iônica total quando comparada com os meios de cultura MS, QL e JADS (Anexo 1).

Correia *et al.* (1995) verificaram a importância da especificidade do meio de cultura para cada material genético, quando se deseja a proliferação de gemas com uniformidade e vigor. O meio MS tem sido um dos mais usados para *Eucalyptus* e seus híbridos na cultura de tecidos, segundo Oliveira (2011), pois este meio apresenta elevadas concentrações de nitrogênio, potássio, zinco e cobre comparativamente a outros meios. Contudo, outros meios de cultura também têm sido empregados para eucalipto, como JADS (CORREIA, 1993; GABRIEL, 2009), QL (GLOCKE *et al.*, 2006) e WPM (MACHADO *et al.*, 1997; MULLINS *et al.*, 1997; GLOCKE *et al.*, 2006).

O meio de cultura JADS obteve a menor média de calos formando gemas, motivo esse que não foi realizado análise estatística deste meio separadamente. Quisen (2007) obteve resultado parecido estudando a influência de diferentes meios de cultura na organogênese indireta de *E. camaldulensis*, onde o meio WPM e o MS foram superiores ao meio JADS com relação a porcentagem de calos com gemas. Oliveira *et al.* (2011), ao comparar o meio JADS com o meio de cultura MS com a concentração de nitratos reduzida pela metade na organogênese indireta de *E. benthamii* x *E. dunnii*, obtiveram baixa regeneração de gemas em ambos os meios, sem diferenças estatísticas entre os resultados. Essa resposta ao tipo e composição do meio de cultura varia não somente de acordo com a espécie, mas entre genótipos de uma mesma espécie (SOUZA *et al.*, 2006).

Tabela 5. Efeito do meio de cultura na formação de calos, de gemas e na oxidação de explantes foliares de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* após 60 dias. Todos os tratamentos continham 0,5 µM de TDZ e 0,1 µM de ANA nos 30 primeiros dias e 5,0 µM de BAP e 0,5 µM de ANA nos 30 dias seguintes.

Meio de Cultura	Explantes formando calos (%)	Calos formando gemas (%)	Explantes oxidados (%)
WPM	100 ± 0	20 ± 8,94	35 ± 20,73
JADS	85 ± 17,60	6,6 ± 8,16	61,6 ± 3,56
QL	100 ± 0	11,6 ± 11,69	55 ± 37,28
MS	95 a ± 8,33	8,3 ± 7,52	95 ± 5,47

Média ± desvio padrão da média

Tabela 6. Análise de contrastes ortogonais para a presença de calos formando gemas e explantes oxidados de explantes foliares de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* cultivados por 30 dias em diferentes meios de cultura contendo 0,5 µM de TDZ e 0,1 µM de ANA, avaliados após 60 dias. Nos últimos 30 dias, os explantes foram cultivados nos mesmos meios com 5,0 µM de BAP e 0,5 µM de ANA.

Contrastes avaliados: Meios de Cultura	Valor de p para calos formando gemas	Valor de p para calos oxidados
WPM vs demais	0,0238*	< 0,0001*
WPM vs QL	0,2203 ^{ns}	0,0288*
WPM vs MS	0,0771 ^{ns}	< 0,0001*

^{ns}: Não significativo. *: Significativo a 5% de probabilidade.

O meio de cultura QL foi desenvolvido para cultura de tecidos de *Prunus*, onde apresentou alta proliferação das brotações sem apresentar hiperhidricidade (QUOIRIN). Este meio apresenta uma concentração mais baixa de cloro e menor quantidade de íon amônio. Na comparação entre os meios QL e WPM, a taxa de formação de gemas em calos não apresentou diferença estatística entre esses meios. No entanto, o meio WPM foi superior, apresentando menor oxidação dos explantes que o meio QL. Um dos aspectos da composição que pode ter influenciado a resposta do meio QL é a maior quantidade do íon fosfato quando comparado ao WPM. Lee e De Fossard (1977) afirmaram que o balanço de fósforo no meio de cultura é importante para o crescimento e a morfogênese dos explantes (RAMAGE e WILLIAMS 2002).

A taxa de oxidação dos explantes foi alta, em todos os tratamentos, exceto no meio WPM, o que pode explicar a baixa porcentagem de formação de gemas nesses meios, já que a oxidação influencia a capacidade de regeneração do tecido vegetal. Este processo pode ocorrer em todo o explante ou em regiões que contenham células competentes e principalmente nas extremidades dos explantes (QUISEN, 2007). Com relação a esta variável, o meio de cultura WPM diferiu estatisticamente dos demais. Quando comparado o WPM versus QL ou MS também houve diferença estatística.

Assim como neste experimento, González (2002) obteve alta taxa de oxidação em explantes de cotilédones, hipocótilos e folhas de *E. grandis* x *E. urophylla*, com calos apresentando coloração marrom. Barreto Cid *et al.* (1999) observaram que longas exposições à luz podem incrementar a presença de receptores específicos de indutores fenólicos. Não obstante, um fator importante que deve ser considerado quanto à estimulação à oxidação dos calos é a presença de elevados teores de micronutrientes cobre e ferro no meio de cultura (PASQUAL *et al.*, 1997). Segundo esses autores, estes micronutrientes podem favorecer a ativação de enzimas, como a peroxidase, nos tecidos feridos.

Em conclusão, o meio de cultura WPM apresentou a maior taxa de formação de gemas e a menor de oxidação quando comparado os três meios em conjunto.

3.3.4 Efeito de combinações de Thidiazuron (TDZ) e ácido 2,4- diclorofenoxiacético (2,4-D) ou ácido naftaleno acético (ANA) adicionados ao meio de cultura WPM

Na mais alta concentração de 2,4-D combinado com TDZ, apenas 8% dos calos formaram gemas após a cultura em meio de regeneração de gemas, resultado baixo em comparação com os demais tratamentos (Tabela 7 e 8). A análise estatística comprova esse resultado. O tratamento com 0,1 μ M de 2,4-D sendo superior ao tratamento com 0,5 μ M dessa auxina. O mesmo resultado foi obtido por Quisen (2007) em explantes de *E. camaldulensis*, onde os explantes apresentaram menor taxa e indução de gemas no meio com 2,4-D que nos outros tratamentos. Estes resultados indicam que a grande parte dos calos formados não é apta para rediferenciação em gemas adventícias. De acordo com George (1996), o 2,4-D tem efeito no metabolismo do RNA, induzindo a transcrição de RNAs mensageiros capazes de codificar proteínas para o crescimento e que podem induzir a proliferação celular

desordenada. No presente trabalho, a partir dessa proliferação celular desordenada houve uma baixa porcentagem de regeneração de gemas adventícias. Este resultado reafirma a necessidade da escolha dos reguladores vegetais como primeiro passo para um protocolo de regeneração completo. Pierik (1997) relata que o modo de interação entre auxinas e citocininas é frequentemente dependente da espécie da planta e do tipo de tecido utilizado na cultura.

Comparando os resultados de regeneração de gemas, a análise mostrou que as concentrações de 0,1 μM de 2,4-D versus 0,1 μM de ANA, para as duas variáveis analisadas, ANA teve melhores resultados, com uma taxa de regeneração de 43,3% e de oxidação de 16,6%. O tratamento com ANA e TDZ apresentou a menor média de oxidação, enquanto que nos dois meios contendo com 2,4-D houve 40% ou mais de explantes oxidados. Alguns trabalhos relatam a forte fitotoxicidade do 2,4-D em diversas culturas, mesmo em reduzidas concentrações. Na cultura de plantas lenhosas, é comum a ocorrência de compostos fenólicos, que podem estar ligados a processos de regulação de crescimento. As auxinas, por exemplo, dependendo da concentração endógena no tecido, induzem a síntese desses compostos (BASSAN *et al.*, 2006). Principalmente nas plantas lenhosas acumulam-se polifenóis e produtos de oxidação, como melanina, suberina, lignina, cutina e calose em torno da superfície incisada, que modificam a composição do meio de cultura e a absorção de metabólitos (ANDRADE *et al.*, 2000).

Tabela 7. Efeito de combinações de 0,5 μM de TDZ e ANA ou 0,5 μM de TDZ e 2,4-D na formação de calos, gemas e oxidação de explantes foliares de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*, avaliados após 60 dias. O meio de cultura foi o WPM. Nos últimos 30 dias, os explantes foram cultivados com 5,0 μM de BAP e 0,5 μM de ANA.

Tratamento (μM)		Explantes formando calos (%)	Calos formando gemas (%)	Explantes oxidados (%)
ANA	2,4 D			
0,1	-	100 \pm 0	43,3 \pm 10,32	16,6 \pm 10,32
-	0,1	100 \pm 0	21,6 \pm 7,52	36,6 \pm 12,11
-	0,5	100 \pm 0	8,33 \pm 7,52	48,3 \pm 7,52

Média \pm desvio padrão da média

Tabela 8. Análise de contrastes ortogonais para a presença de calos formando gemas e explantes oxidados de explantes foliares de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* cultivados por 30 dias em meio de cultura WPM contendo ANA ou 2,4-D combinado com 0,5 μM de TDZ, avaliados após 60 dias. Nos últimos 30 dias, os explantes foram cultivados em meio de cultura WPM com 5,0 μM de BAP e 0,5 μM de ANA.

Contrastes avaliados: ANA e 2,4-D (μM)	Valor de p para calos formando gemas	Valor de p para calos oxidados
0,1 de ANA vs 0,1 de 2,4-D	0,0126*	0,0152*
0,1 de 2,4-D vs 0,5 de 2,4-D	0,0479*	0,1973 ^{ns}

^{ns}: Não significativo. *: Significativo a 5% de probabilidade.

3.3.5 Influência de combinações de Thidiazuron (TDZ), 6-benzilaminopurina (BAP) e ácido naftaleno acético (ANA) no meio de cultura de indução

As interações auxinas/citocininas são consideradas como sendo as mais importantes para a regulação do crescimento e desenvolvimento organizado em culturas de células, tecidos e órgãos de plantas (GASPAR *et al.*, 1996).

Os explantes cultivados no meio de indução com TDZ e ANA formaram mais gemas que os cultivados no meio que continha BAP e ANA, propondo assim o uso do TDZ ao invés do BAP na etapa de indução de calos (Tabela 9). A comparação entre tratamentos através da análise de contrastes ortogonais mostrou diferença estatística para porcentagem de calos formando gemas, no caso do contraste entre os tratamentos que continham apenas TDZ versus os que continham apenas BAP (Tabela 10).

Estes resultados estão em concordância com os de Alves e colaboradores (2004) que testaram diferentes combinações de TDZ e BAP no meio de indução de calos e diferentes concentrações de BAP e ANA no meio de cultura para indução de gemas em explantes foliares de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*. Esses autores perceberam que o TDZ proporcionou uma maior taxa de formação de gemas quando comparada com aquelas obtidas com diferentes concentrações de BAP.

George (1993) afirmou que o excesso de citocinina no meio de cultura pode causar toxidez ao explante, resultando em sérios problemas nas próximas fases. Isto pode explicar porque quando utilizadas altas concentrações de BAP houve uma menor taxa de formação de

gemas. Bisht *et al.* (1999) observaram o decréscimo do número de gemas por explante de *E. tereticornis* x *E. camaldulensis* com o aumento da concentração de BAP. Dibax (2007) também obteve resultado semelhante, mostrando que o aumento da concentração de BAP foi indiretamente proporcional à taxa de multiplicação de gemas de *E. saligna*.

De acordo com Lu (1993), derivados de ureia tem sido mais frequentemente usados em experimentos de indução de gemas do que o BAP, particularmente em espécies lenhosas. Estes resultados podem ser explicados considerando que, possivelmente, o TDZ possui uma maior atividade citocinínica ou uma forma de ação diferente de outras citocininas durante os processos de desdiferenciação e rediferenciação celular (KANEDA *et al.*, 1997), ou ainda devido ao acúmulo de auxinas e citocininas endógenas nos tecidos pela sua ação (MURTHY *et al.*, 1995). Huetteman e Preece (1993) afirmaram que compostos derivados da ureia, como o TDZ, possuem efeito similar aos das citocininas, sendo capazes de estimular diferentes respostas morfológicas, inclusive a formação de brotos. González (2002) obteve resultados parecidos ao deste experimento, onde houve maior formação de gemas a partir de calos originados em meios com TDZ do que em meios com BAP, para o híbrido *E. grandis* x *E. urophylla* e *E. grandis*.

Tabela 9. Efeito de combinações de 0,1 μM de ANA e TDZ e/ou BAP em meio de cultura WPM na formação de calos, de gemas e oxidação de explantes foliares de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*, avaliados após 60 dias. Nos últimos 30 dias, os explantes foram cultivados em meio WPM com 5,0 μM de BAP e 0,5 μM de ANA.

Tratamento (μM)		Explantes formando calos (%)	Calos formando gemas (%)	Explantes oxidados (%)
TDZ	BAP			
0,25	-	90 \pm 6,32	35 \pm 8,36	30 \pm 14,41
0,50	-	100 \pm 0	41,6 \pm 14,71	23,3 \pm 8,16
0,25	2,5	81,6 \pm 14,71	28,3 \pm 9,83	36,6 \pm 10,32
-	2,5	75 \pm 10,48	23,3 \pm 15,05	31,6 \pm 9,83
-	5	73,3 \pm 8,16	10 \pm 6,32	43,3 \pm 12,11

Média \pm desvio padrão da média

Tabela 10. Análise de contrastes ortogonais para a presença de calos formando gemas e explantes oxidados em explantes foliares de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* em meio de cultura WPM com diferentes combinações de TDZ e/ou BAP combinados com 0,1 μ M de ANA, avaliados após 60 dias. Nos últimos 30 dias, os explantes foram cultivados em meio de cultura WPM com 5,0 μ M de BAP e 0,5 μ M de ANA.

Contrastes avaliados: TDZ e BAP (μ M)	Valor de p para calos formando gemas	Valor de p para calos oxidados
0,25 e 0,50 de TDZ vs 2,5 e 5,0 de BAP	0,002*	0,0761 ^{ns}
0,25 vs 0,50 de TDZ	0,4531 ^{ns}	0,4099 ^{ns}
0,25 e 0,50 de TDZ vs 0,25 de TDZ + 2,5 de BAP	0,1244 ^{ns}	0,1639 ^{ns}
0,25 de TDZ + 2,5 de BAP vs 2,5 e 5,0 de BAP	0,0831 ^{ns}	0,9325 ^{ns}

^{ns}: Não significativo. *: Significativo a 5% de probabilidade.

Neste experimento, houve altas taxas de oxidação dos explantes foliares, chegando a 43,3% após 30 dias no meio contendo 5 μ M de BAP e outros 30 dias em meio contendo BAP e ANA (Tabela 9). Contudo, a análise estatística não mostrou diferença significativa entre os tratamentos. As espécies lenhosas são ricas em substâncias derivadas do metabolismo secundário, como os polifenóis, que tem importante papel no metabolismo e na defesa contra predadores e micro-organismos. No entanto, *in vitro*, a presença destes metabólitos constitui um dos principais problemas, a oxidação fenólica (COSTA, 2006). Preece e Compton (1991) verificaram que as substâncias responsáveis pela oxidação de espécies lenhosas cultivadas *in vitro* eram fenóis, flavonóides e taninos. Estas substâncias podem se ligar a proteínas das membranas ou enzimas, acarretando toxidez e morte da célula, causando a inibição do crescimento e a morte dos explantes em grande número de espécies. Mok e colaboradores (1987) afirmaram que o TDZ é resistente às oxidases em concentrações menores que as demais citocininas, sendo estável e biologicamente ativo mesmo quando há oxidação dos explantes no meio de cultura.

3.3.6 Efeito do número de semanas do último subcultivo na organogênese a partir de folhas

A fim de identificar explantes que respondam melhor em termos de organogênese, avaliou-se quantas semanas de cultivo *in vitro* em meio de multiplicação estes deveriam ter. Com base na literatura, foram utilizados explantes foliares de brotações com 3, 4 e 5 semanas de subcultivo. Nenhum dos parâmetros avaliados apresentou diferença estatística, ou seja, em todos os tratamentos testados os explantes responderam da mesma maneira (Tabelas 11 e 12). Cao e Hammerschlag (2000) também não observaram diferenças quando testaram explantes provenientes de brotações com diferentes semanas de cultura em meio de multiplicação. Outros trabalhos encontrados mostram diferença na eficiência da transformação genética quando usados explantes com diferentes semanas em subcultivo (CAO *et al.*, 1998).

A partir deste resultado estabeleceu-se que os explantes foliares de 3 a 5 semanas poderiam ser utilizados em experimentos posteriores.

Tabela 11. Efeito do número de semanas do último subcultivo na calogênese e regeneração de gemas em explantes foliares de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*, avaliados após 60 dias. O primeiro meio de cultura foi WPM com 0,5 μ M de TDZ e 0,1 μ M de ANA. Nos últimos 30 dias, os explantes foram cultivados em meio WPM com 5,0 μ M de BAP e 0,5 μ M de ANA.

Tratamento	Explantes formando calos (%)	Calos formando Gemas (%)	Explantes oxidados (%)
3 semanas	100 \pm 0	35 \pm 10,48	25 \pm 8,36
4 semanas	100 \pm 0	40 \pm 14,14	35 \pm 10,48
5 semanas	100 \pm 0	36,6 \pm 12,11	28,3 \pm 9,83

Média \pm desvio padrão da média

Tabela 12. Análise de contrastes ortogonais para a presença de calos formando gemas e explantes oxidados de explantes foliares de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* sob efeito do número de semanas do último subcultivo, cultivados por 30 dias em meio de cultura WPM suplementado com 0,1 μ M de ANA e 0,5 μ M de TDZ, avaliados após 60 dias. Nos últimos 30 dias, os explantes foram cultivados com 5,0 μ M de BAP e 0,5 μ M de ANA.

Contrastes avaliados: Semanas	Valor de p para calos formando gemas	Valor de p para calos oxidados
3 vs 5	0,8490 ^{ns}	0,5322 ^{ns}
3 vs 4	0,5718 ^{ns}	0,1620 ^{ns}

^{ns}: Não significativo. *: Significativo a 5% de probabilidade.

3.3.7 Organogênese indireta e análise histológica

Após 15-20 dias de cultivo *in vitro*, foi observado o intumescimento dos explantes foliares em alguns tratamentos. Quisen (2007) e Dibax *et al.* (2005) também perceberam essa resposta para *Eucalyptus camaldulensis* e Azmi *et al.* (1997) em *E. globulus*. A formação de calos teve início aos 15 dias após a introdução do material *in vitro* e aos 30 dias já se podia observar que o local predominante de origem dos calos foi as regiões onde havia os cortes, ou seja, as duas extremidades (Figura 1).

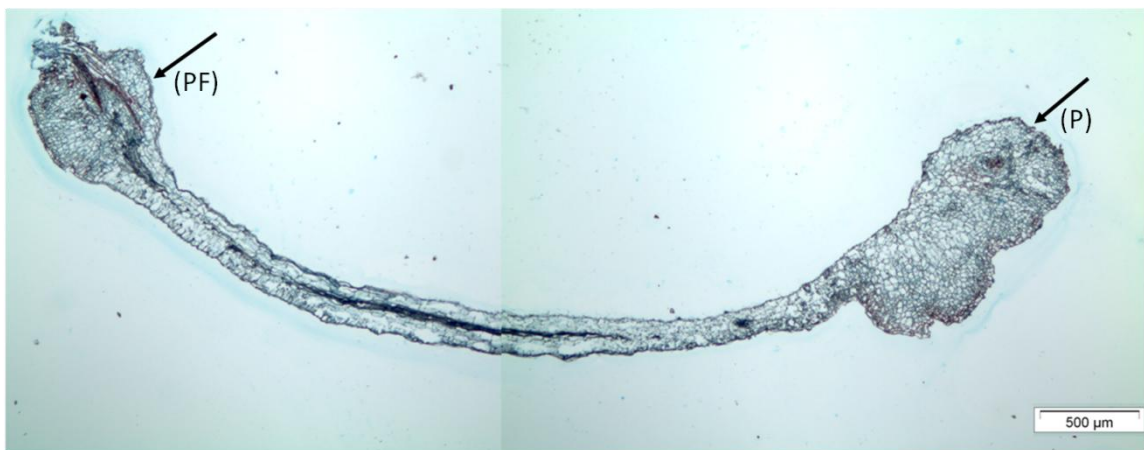


Figura 1. Corte longitudinal de um explante foliar com 20 dias de cultivo. Setas indicam a formação de calos no pecíolo (P) e no corte do ápice do explante foliar (PF).

Com 45 dias, calos recobrimo todo o explante foram também observados em alguns tratamentos (Figura 2-G). No caso da cultura de explantes foliares de *E. gunnii*, Hervé *et al.* (2001) observaram protuberâncias se formando na região próxima ao pecíolo e, quando transferidos para meio de regeneração, desenvolviam-se em gemas. Alves (2001) também obteve este resultado e um dos clones estudados de *E. grandis* x *E. urophylla* apresentou formação de gemas a partir de calos que se originaram na região do pecíolo.

O início da formação dos feixes vasculares acontece aos 30 dias (Figura 2-A) e a posterior multiplicação destes feixes aos 45 dias (Figura 2-B). Nas regiões associadas aos feixes vasculares, houve intensa divisão celular culminando na formação de calos (Figura 2-H).

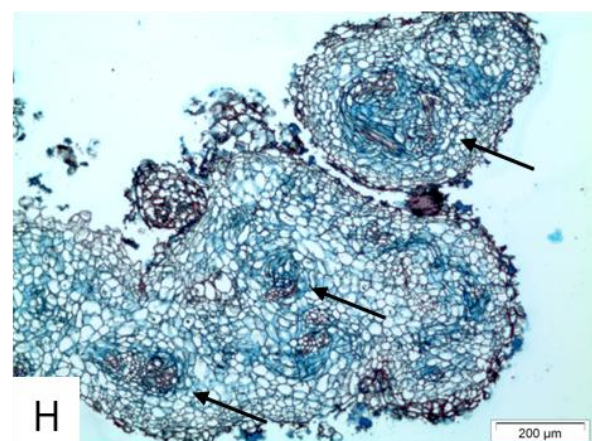
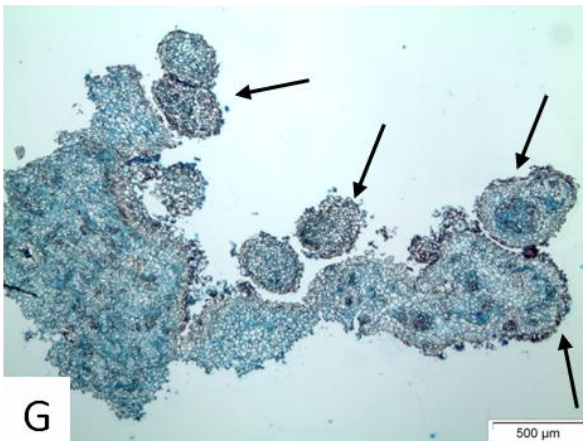
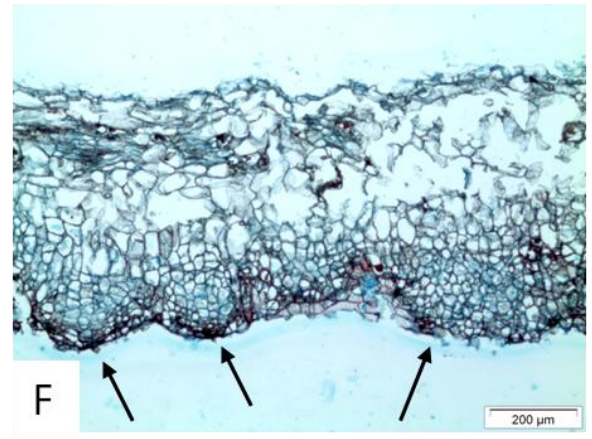
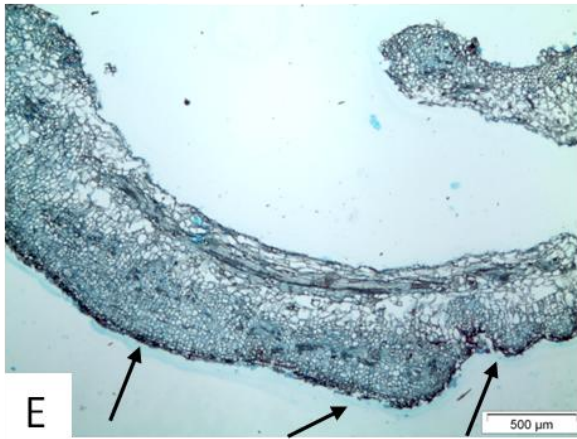
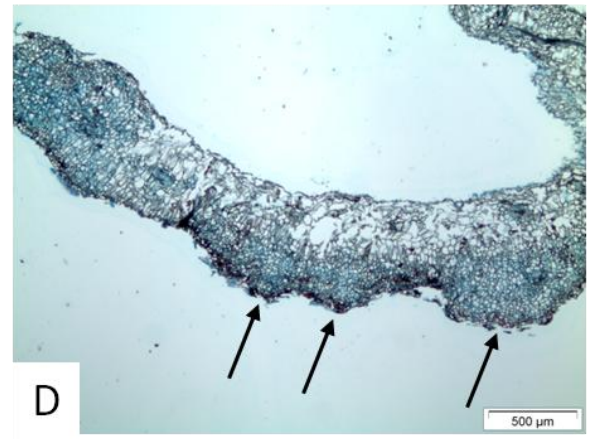
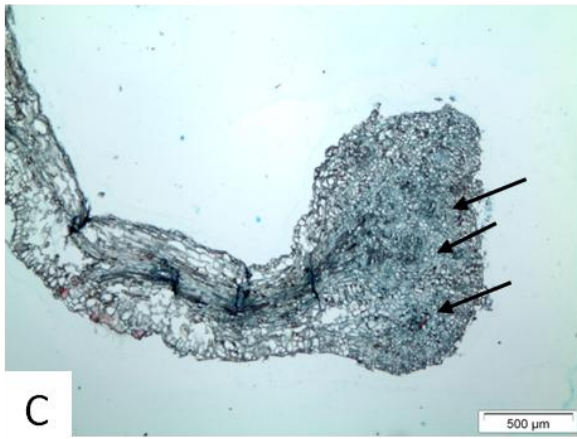
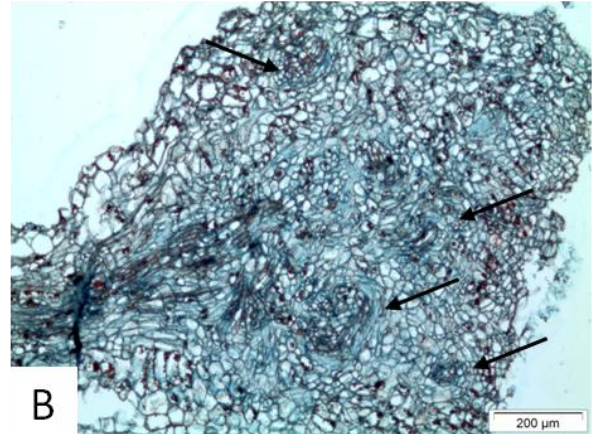
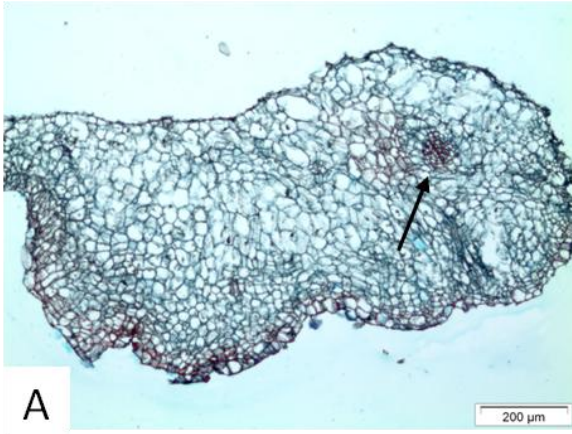


Figura 2. Cortes longitudinais (A,B,C,D,E,F) e transversais (G,H) de explantes foliares (A) com 30 dias de cultivo e (B, C, D, E, F, G e H) com 45 dias de cultivo. A – Detalhe do pecíolo com 30 dias, seta indica a formação de feixe vascular. B – Pecíolo, setas indicam feixes vasculares. C – Detalhe do pecíolo com 45 dias, setas indicam feixes vasculares. D, E – Setas indicam a alta divisão celular, com conseqüente formação de calos e o entumescimento na base do explante. F – Detalhe da formação de calos. G – Formação de massa calogênica no explante, setas indicam cada calo. H – Detalhe da formação de calos, setas indicam feixes vasculares em cada novo calo.

Após 45 dias também é possível observar a alta divisão celular, com conseqüente formação de calos e o entumescimento na base do explante (Figura 2-D e E). A Figura 2-F mostra os calos se formando na base do explante, na parte adaxial do explante foliar em contato com o meio de cultura. Após a troca de meio de cultura, com 30 dias, onde os explantes passam do meio de calogênese para o meio de regeneração, observa-se que a formação dos calos é mantida (Figura 2-G e H).

No presente trabalho foram também observadas regiões avermelhadas nos calos, as quais originaram as gemas, evidenciando a presença de antocianina (Figura 3). Muralidharan e Mascarenhas (1987) foram os primeiros a citar a relação entre a organogênese e a presença de antocianina, em tecidos de eucalipto cultivados *in vitro*. Eles verificaram que, em explante foliar de *E. camaldulensis*, os calos formados desenvolviam antocianina e, após quatro semanas de cultivo, gemas iniciais se desenvolviam nessas áreas de pigmentação (ALCANTARA, 2008). Subbaiah e Minocha (1990), estudando *E. tereticornis*, e Cuenca *et al.* (2000), estudando *Fagus sylvatica* e *F. orientalis*, constataram que os calos sempre se tornavam avermelhados antes do aparecimento dos primórdios de gemas.



Figura 3. Presença de antocianinas em calos originados de explantes foliares de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* após 60 dias de cultivo *in vitro* em meio de cultura WPM suplementado com 0,5 μM de TDZ e 0,1 μM de ANA por 30 dias e com 5,0 μM de BAP e 0,5 μM de ANA nos 30 dias seguintes. Barra = 5 mm

3.4 CONCLUSÕES

Após analisados todos os experimentos conclui-se que, para a regeneração de gemas do híbrido *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*, pode-se utilizar explantes foliares de brotos com 3 a 5 semanas no último subcultivo. O meio de cultura que se mostrou mais eficiente na regeneração de gemas foi o WPM com a sequência de reguladores vegetais a seguir: 0,25 µM de TDZ e 0,1 µM de ANA por 30 dias e, em seguida, 5,0 µM de BAP e de 0,5 µM de ANA por outros 30 dias. Estas combinações de meio de cultura e reguladores vegetais proporcionaram uma regeneração eficiente em até 46% dos calos, aliada a uma baixa oxidação dos explantes foliares.

REFERÊNCIAS

- ABRAF – Associação Brasileira de Produtores de Florestas Plantadas (2012). Anuário estatístico da ABRAF: ano base 2011.
- Alcantara GB (2008). Transformação genética de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* com o gene *gfp* sob controle de promotores cbfs induzidos. Brazil: Federal Unisersity of Paraná, PhD. Thesis.
- Alves ECSC (2001). Organogênese *in vitro* na regeneração de clones de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*. Brazil: Federal University of Viçosa, PhD Thesis.
- Alves ECSC, Xavier A, Otoni WC (2004). Organogênese de explante foliar de clones de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*. Pesq. Agropec. Bras. 39: 421-430.
- Ammirato PV (1983). Embryogenesis. In: Handbook of plant cell culture-techniques for propagation and breeding. Ed. Macmillan Publishing: 82-123.
- Andrade MW, Luz JMQ, Lacerda AS (2000). Micropropagação de aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. Allemao). Cienc. Agrot. 24: 174-180.
- ASSISTAT. Assistência estatística 2012. Versão 7.6 beta. Registro INPI 0004051-2.
- Azmi A, Dewitte W, Drevet C, Onckelen V, Landré P, Boudet Am, Jouanin L, Chriqui D (1997). Bud regeneration from *Eucalyptus globulus* clones and seedlings through hormonal imbalances induced by *Agrobacterium tumefaciens* strain 82.139. Plant Sci. 127: 81-90.
- Bandyopadhyay S, Cane K, Rasmussen G, Hamill J (1999). Efficient plant regeneration from seedling explants of two commercially important temperate eucalypt species- *Eucalyptus nitens* and *E. globulus*. Plant Science. 140: 189-198.
- Barrueto Cid LP, Gomes ACM, Costa SBR, Brasileiro ACM (1999). Plant regeneration from seedling explants of *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 56: 17-23.
- Bassan JS, Reiniger LRS, Rocha BHG, Severo CRP, Flôres AV (2006). Oxidação fenólica, tipo de explante e meios de cultura no estabelecimento *in vitro* de canafístula (*Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub.). Cienc. Flor. 16: 381-390.
- Bisht P, Sharma VK, Joshi I, Kapoor ML (1999). Micropropagation of newly produced F1 hybrid of *Eucalyptus* (*E. tereticornis* Sm. x *E. camaldulensis* Dehn. Southern Form). Silvae Gen. 48: 104-108.
- Cao H, Li X, Dong X (1998). Generation of broad-spectrum disease resistance by overexpression of an essential regulatory gene in systemic acquired resistance. Proc. Natl. Acad. Sci. 95: 6531-6536.
- Cao X, Hammerschlag FA (2000). Improved Shoot Organogenesis from Leaf Explants of Highbush Blueberry. Hortscien. 35: 945-947.

- Correia D (1993). Crescimento e desenvolvimento de gemas na multiplicação de *Eucalyptus* spp *in vitro* em meio de cultura líquido e sólido. Brazil: São Paulo University, Master Thesis.
- Correia D, Gonçalves NA, Couto HTZ, Ribeiro MC (1995). Efeito do meio de cultura líquido e sólido no crescimento e desenvolvimento de gemas de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* na multiplicação *in vitro*. IPEF 48/49: 107-116.
- Costa AS (2006). Sustentabilidade da Produção de Alecrimpimenta (*Lippia sidoides* Cham.): Micropropagação visando à conservação *in vitro*. Brazil: Federal University of Sergipe, Master Thesis.
- Cuenca B, Ballester A, Vieitez AM (2000). *In vitro* adventitious bud regeneration from internode segments of beech. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 60: 213-220.
- Deus DA (2007). Desenvolvimento de protocolo para produção e análise de calos de *Eucalyptus grandis* Hill ex. Maiden, visando estudo sobre a biossíntese da lignina. Brazil: Rural Federal University of Rio de Janeiro, Monograph Thesis.
- Dibax R (2007). Transformação genética de *Eucalyptus saligna* com o gene *P5CSF129A* via *Agrobacterium tumefaciens*. Brazil: Federal University of Paraná, PhD. Thesis.
- Dibax R, Dechamps C, Bessalho Filho JC, Vieira LGE, Molinari HBC, De Campos MKF, Quoirin M (2010). Organogenesis and *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Eucalyptus saligna* with *P5CS* gene. Biol. Plant. 54: 6-12.
- Gabriel MV (2009). Otimização da multiplicação de brotações de *Eucalyptus globulus* Labill. *in vitro*. Brazil: São Paulo University, Master Thesis.
- Gaspar T, Kevers C, Penel C, Greppin H, Reid DM, Thorpe TA (1996). Plant hormones and plant growth regulator in plant tissue culture. In Vitro Cell. Dev. Biol-Plant 32: 272-289.
- George EF (1993). Plant propagation by tissue culture – The technology. 2^a ed. England: Exegetics, 575.
- George EF (1996). Plant propagation by tissue culture - The technology. Edington: Exegetics, 1574.
- Glocke P, Delaporte K, Collins G, Sedgley M (2006). Micropropagation of juvenile tissue of *Eucalyptus erythronema* x *Eucalyptus stricklandii* cv. 'Urrbrae Gem'. In Vitro Cell. Dev. Biol-Plant 42: 139-143.
- Golle DP, Reiniger LRS, Curti AR, Hanauer JG, Waldow DAG (2009). Substratos alternativos e tratamentos pré-germinativos na germinação *in vitro* de sementes de *Pinus taeda* L. R Arv. 34: 39-48.
- González ER (2002). Transformação genética de *Eucalyptus grandis* e do híbrido *E. grandis* x *E. urophylla* via *Agrobacterium*. Brazil: University of São Paulo, PhD. Thesis.
- González ER, Andrade A, Bertolo AL, Carneiro RT, Lacerda GC, Defávani VAP, Labate MTV, Labate CL (2002). Transformação genética do eucalipto. Biotec. Desenv. 5: 18-22.

- Hare PD, Van Staden J (1994). Inhibitory effect of thidiazuron on the activity of cytokinin oxidase isolated from soybean callus. *Plant Cell Phys.* 35: 1121-1125.
- Hervé P, Jauneau A, Pâques M, Marien JN, Boudet AM, Teulière C (2001). A procedure for shoot organogenesis *in vitro* from leaves and nodes of an elite *Eucalyptus gunnii* clone: comparative histology. *Plant Sci.* 161: 645-653.
- Huetteman CA, Preece JE (1993). Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 33: 105-119.
- Johansen DA (1940). *Plant microtechnique*. McGraw-Hill.
- Kaneda Y, Tabei Y, Nishimura S, Harada K, Akihama T, Kitamura K (1997). Combination of thidiazuron and basal media with low salt concentrations increases the frequency of shoot organogenesis in soybeans [*Glycine max* (L.) Merr.]. *Plant Cell Rep.* 17: 8-12.
- Karnovsky M (1965). A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *J Cell Biol.* 27: 137-138.
- Lloyd G, McCown B (1980). Micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. *Int. Pl. Propagator's Soc.* 30: 421-427.
- Lu CY (1993). The use of thidiazuron in tissue culture. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 29: 92-96.
- Luque R, Sousa HC, Kraus JE (1996). Métodos de coloração de Roeser (1972) - modificado - e Kropp (1972) visando a substituição do azul de astra por azul de alciano 8GS ou 8GX. *Acta Botanica Brasílica* 10: 199-212.
- Machado LOR, Andrade GM, Barreto Cid LP, Penchel RM (1997). Agrobacterium strain specificity and shooty tumour formation in eucalypt (*Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*). *Plant Cell Rep.* 16: 299-303.
- McCown BH, Sellmer JC (1987). General media and vessels suitable for woody plant microculture. In: *Cell and tissue culture in forestry*: 4-14.
- Mok MC, Mok DWS, Turner JE, Mujar CV (1987). Biological and biochemical effects of cytokinin-active phenylurea derivatives in tissue culture systems. *HortSci.* 22: 1194-1197.
- Moralejo M, Rochange F, Boudet AM, Teulière C (1998). Generation of transgenic *Eucalyptus globulus* plantlets through *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation. *Aust. J Plant Physiol.* 25: 207-212.
- Mullins KV, Llewellyn DJ, Hartney VJ, Strauss S, Dennis ES (1997). Regeneration and transformation of *Eucalyptus camaldulensis*. *Plant Cell Rep.* 787-791.
- Murashige T, Skoog F (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plantarum.* 15: 473-497.
- Murthy BNS, Murch SJ, Saxena PK (1995). Thidiazuron-induced somatic embryogenesis in intact seedlings of peanut (*Arachis hypogaea*): endogenous growth regulator levels and significance of cotyledons. *Phys. Plant.* 94: 268-276.

Oliveira LS (2011). Micropropagação, microestaquia e miniestaquia de clones híbridos de *Eucalyptus globulus*. Brazil: Federal University of Viçosa, Master Thesis.

Ouyang LJ, He WH, Huang ZC, Zhao LY, Peng SH, Sha YE, Zeng FH, Lu XY (2012). Introduction of the *RS-AFP2* gene into *Eucalyptus urophylla* for resistance to *Phytophthora capsici*. J. Trop. For. Sci. 24: 198-208.

Pasqual M, Hoffmann A, Ramos JD (1997). Cultura de tecidos vegetais: tecnologia e aplicação. Ed. UFLA: 159.

Pierik RLM (1990). Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Ed. Martins: 326.

Preece FE, Compton MEI (1991). I. Problems with explant exudation in micropropagation. In: Biotechnology in agriculture and forestry: 17- High-Tech and micropropagation I. Ed. Springer Verlag: 168-189.

Quisen RC (2007). Transformação genética de *Eucalyptus camaldulensis* via co-cultivo com *Agrobacterium tumefaciens*. Brazil: Federal University of Paraná, PhD Thesis.

Quoirin M, Lepoivre P (1977). Étude de milieux adaptés aux cultures *in vitro* de *Prunus* sp. Acta Hort. 78: 437-442.

Ramage CM, Williams RR (2002). Mineral nutrition and plant morphogenesis. In Vitro Cel. Dev. Biol. 38: 115-124.

Souza FVD, Faria GA, Silva Neto HP (2006). Micropropagação. In: Introdução à micropropagação de plantas. Ed. Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical: 38-52.

Subbaiah MM, Minocha SC (1990). Shoot regeneration from stem and leaf callus of *Eucalyptus tereticornis*. Plant Cell Rep. 9: 370-373.

Tibok A, Blackhall NW, Power JB, Davey MR (1995). Optimized plant regeneration from callus derived from seedling hypocotyls of *Eucalyptus urophylla*. Plant Science. 110: 139-145.

Tournier V, Grat S, Marque C, El Kayal W, Penchel R, Andrade GD, Boudet AM, Teulières C (2003). An efficient procedure to stably introduce genes into an economically important pulp tree (*Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*). Transgenic Res. 12: 403-411.

4 TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* VIA *Agrobacterium tumefaciens*

RESUMO

As espécies de eucalipto apresentam excelente potencial para produção de papel e celulose, marcenaria, caixotaria, entre outras, sendo o gênero florestal mais plantado no Brasil atualmente. Devido a sua importância econômica, este gênero tem sido objeto de várias pesquisas, inclusive de transformação genética. Com o objetivo de aprimorar o protocolo de transformação genética do clone 3336 de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*, este trabalho buscou avaliar o potencial de canamicina, glufosinato de amônio e manose como agentes de seleção de explantes transformados com os respectivos genes de seleção. A influência do agente seletivo foi estudada pela cultura de explantes foliares não transformados em meio de cultura WPM suplementado com 0,5 μM de TDZ e 0,1 μM de ANA por 30 dias e, em seguida, 5,0 μM de BAP e de 0,5 μM de ANA por outros 30 dias. Primeiro foram testadas diferentes concentrações de canamicina (Km), 3, 6, 9 e 12 mg L^{-1} e, em outro experimento, concentrações de 12, 25, 50 e 100 mg L^{-1} de Km, para a seleção de tecidos transformados. A dose ideal encontrada foi 12,5 mg L^{-1} . O ensaio seguinte foi com o agente seletivo glufosinato de amônio (PPT) onde as concentrações foram 1, 2,5, 5, 7,5, 10 e 12,5 mg L^{-1} ; em seguida outro experimento foi instalado com 0, 0,25, 0,5, 0,75 e 1 mg L^{-1} . A melhor concentração encontrada para a seleção dos tecidos transformados com o gene *bar* foi 0,5 mg L^{-1} . Também foi instalado um experimento para identificar a concentração e combinação adequada de sacarose e manose, onde as concentrações testadas foram 30/0, 0/30, 15/15, 22,5/7,5, 27,5/2,5 g de sacarose/manose. A concentração encontrada foi 22,5 g de sacarose + 7,5 g de manose para selecionar tecidos transformados com o gene *pmi*. Para eliminação de *Agrobacterium tumefaciens*, foram testados dois antibióticos: Augmentin® (300 mg L^{-1}) e cefotaxima (250 mg L^{-1}). Foi observado que os calos obtidos na presença de Augmentin tinham um aspecto melhor, com cor branca, enquanto que os calos cultivados no meio com cefotaxima eram escuros, aparentemente oxidados. A fim de diminuir a oxidação imediata dos explantes transformados com o gene *bar*, o qual confere resistência ao glufosinato de amônio (PPT), os explantes foram deixados um mês sem PPT após a co-cultura, enquanto que no controle, os explantes ficaram em meio de cultura com 1 mg L^{-1} de PPT. Neste experimento, todos os explantes que foram mantidos um mês sem PPT formaram calos, enquanto que no controle oxidaram e necrosaram, não formando calos. Não foi possível avaliar a eficiência da transformação genética pois não houve regeneração de gemas. No último ensaio, realizou-se a transformação genética de explantes foliares através do co-cultivo dos explantes com *Agrobacterium tumefaciens* contendo plasmídeo com gene *nptII*. Foram obtidas brotações em meio de cultura contendo Km, no entanto ainda não foram realizadas análises moleculares das brotações formadas para a comprovação da transformação.²

Palavras-chave: agentes seletivos, manose, glufosinato de amônio, canamicina.

² Capítulo enviado para publicação segundo as normas da revista African Journal of Biotechnology

4 GENETIC TRANSFORMATION OF *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* VIA *Agrobacterium tumefaciens*

ABSTRACT

The species of eucalyptus have excellent potential for production of pulp and paper, woodworking, boxes, among others. This forest genus is the most planted in Brazil today. Because of its economic importance, eucalypt species have been the object of several studies, including genetic transformation. Aiming to improve the genetic transformation protocol of *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*, this study aimed to evaluate the potential of kanamycin, glufosinate ammonium and mannose in the selection of clone 3336. The influence of selective agent was studied by culture of leaf explants in WPM medium supplemented with 0.5 μM TDZ and 0.1 μM NAA for 30 days and then 5.0 μM BAP and 0.5 μM NAA for another 30 days. First different concentrations of kanamycin (Km), 3, 6, 9 and 12 mg L^{-1} were used, then another experiment was carried out with, concentrations of 12, 25, 50 and 100 mg L^{-1} , in order to find an optimal dose for the selection of transformed tissues with the *nptII* gene. The optimal dose was 12.5 mg L^{-1} . The selective agent ammonium glufosinate (PPT) was also tested with concentrations of 1, 2.5, 5, 7.5, 10 and 12.5 mg L^{-1} and, in another experiment, 0, 0.25, 0.5, 0.75 and 1 mg L^{-1} were compared. The best concentration found for the selection of tissues transformed with *bar* gene was 0.5 mg L^{-1} . Moreover, an experiment was conducted to identify the adequate combination and concentration of sucrose and mannose testing combinations of 30/0, 0/30, 15/15, 22.5/7.5 and 27.5/2.5 g sucrose/mannose. The best combination to select transformed tissues with the *pmi* gene was 22.5 g sucrose + 7.5 g mannose. For elimination of *Agrobacterium tumefaciens*, two antibiotics were tested: Augmentin® (300 mg L^{-1}) and cefotaxime (250 mg L^{-1}). It was observed that callus cultured in the presence of Augmentin had a better appearance with white color, while calluses grown on medium with cefotaxime were dark and apparently oxidized. In order to reduce the oxidation of explants transformed with the *bar* gene, which confers resistance to ammonium glufosinate (PPT), the explants were left without PPT one month after co-culture, while control explants were left in culture media with 1 mg L^{-1} PPT. All explants that were kept one month without PPT formed callus, while those of control oxidized and died without forming callus. The efficiency of genetic transformation was not evaluated once no bud regeneration occurred. In the last test, genetic transformation of leaf explants by co-cultivation of explants with *Agrobacterium tumefaciens* was carried out. Shoots were obtained in a culture medium containing Km, however molecular analysis have not yet been realized in the shoots in order to demonstrate the transformation.

Key words: selective agents, mannose, ammonium glufosinate, kanamycin

4.1 INTRODUÇÃO

O melhoramento genético contribuiu significativamente para o aumento da produtividade em plantios florestais e para o ganho genético em espécies de grande valor econômico (QUISEN, 2007). No entanto, os programas de melhoramento genético de espécies florestais apresentam grandes dificuldades, como o longo ciclo de vida necessário para atingir a maturidade reprodutiva e fenotípica (STUDART-GUIMARÃES *et al.*, 2003). As técnicas biotecnológicas, como a cultura de tecidos, utilização de marcadores moleculares, transformação genética, dentre outras, uniram-se ao melhoramento convencional, permitindo a obtenção de genótipos com maior produtividade e qualidade (SARTORETTO *et al.*, 2008).

A biotecnologia pode ser utilizada para obtenção de ganhos em produtividade e sustentabilidade, considerando essas técnicas como prioridades mundiais frente à excessiva demanda por produtos oriundos de espécies vegetais (WATANABE e RAMAN, 1997). A transformação genética é uma das técnicas da biotecnologia mais importante nos programas de melhoramento genético. Esta pode ser definida pela inserção de um gene com uma característica ideal em um organismo alvo, aliando este gene às qualidades de um indivíduo específico, como alta produção de biomassa, resistência a estresse e a doenças (GIRI *et al.*, 2004).

Uma das técnicas de transformação genética de plantas é mediante co-cultura com *Agrobacterium tumefaciens*, um método indireto que utiliza a bactéria como vetor para a transferência do DNA (GOLLE, 2010). Este vetor necessita de uma construção gênica complexa, onde está inserido o gene de interesse, com a possibilidade de carregar também um gene marcador e/ou de seleção, além de promotores. Vários fatores podem influenciar a eficiência da transformação, como o gene de seleção e a concentração do agente de seleção no meio de cultura (GONZÁLVEZ, 2002).

Os principais fatores que devem ser considerados na escolha de um determinado gene de seleção são: i) a expressão não pode interferir no metabolismo dos tecidos transformados; ii) o produto da ativação do gene deve proteger as células transformadas das propriedades inibitórias dos agentes seletivos; iii) ter uma boa difusão nos tecidos para permitir uma distinção dos tecidos transformados e não transformados; iv) a exposição ao agente seletivo não deve afetar o crescimento e a regeneração de plantas férteis a partir dos tecidos transformados (POTRIKUS e SPANGENBERG, 1995 apud QUISEN, 2007).

Sabe-se, dentro da prática laboratorial, que altas concentrações do agente seletivo causam a morte dos tecidos transformados. Assim, é necessária a adequação da concentração dos agentes de seleção no meio de cultura, para que selecione sem prejudicar os tecidos transformados.

Os objetivos deste trabalho foram encontrar a dose ideal de três agentes seletivos e comparar sistemas utilizando os genes de seleção *bar* e *nptII* na transformação genética de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* mediante co-cultura com *Agrobacterium tumefaciens*, encontrar um antibiótico eficiente para eliminação da *A. tumefaciens* e regeneração de brotações.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Local de realização dos experimentos

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais e Transformação pertencente à Embrapa Florestas – CNPF, localizada em Colombo, Paraná, com CQB número 302/10.

4.2.2 Condições gerais de cultura *in vitro*

Todas as culturas *in vitro* foram mantidas em BOD, sob luz fluorescente branca fria com intensidade de $40 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 16 h e temperatura de $23 \pm 2^\circ\text{C}$.

As culturas foram realizadas em placas de Petri de 10 cm de diâmetro e 2 cm de altura, contendo 40 mL de meio de cultura e vedadas com filme de cloreto de polivinil (PVC).

Todos os meios de cultura tiveram o pH ajustado em 5,8 utilizando ácido clorídrico (0,1M) e hidróxido de sódio (0,1M), previamente à adição do ágar ao meio nutritivo, e em seguida, foram autoclavados durante 20 min a 120°C .

Os reguladores vegetais 6-benzil amino purina (BAP) e ácido naftaleno acético (ANA) foram adicionados ao meio de cultura antes da autoclavagem. O thidiazuron (TDZ) e os antibióticos foram esterilizados por filtração, utilizando filtro descartável Millex - GP® com membrana estéril de $0,22 \mu\text{m}$, e adicionados ao meio de cultura, ainda em fase líquida, logo após a autoclavagem.

4.2.3 Fonte de explantes

Foram utilizadas folhas de brotações do clone 3336 do híbrido *E. urograndis*, mantidas *in vitro* na fase de multiplicação em meio de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) suplementado com 30 g L^{-1} de sacarose, $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP e $7,0 \text{ g L}^{-1}$ de ágar (Anexo

1). As culturas tinham aproximadamente 24° subcultivos. As brotações foram mantidas em sala de crescimento, sob luz fluorescente branca fria com intensidade de $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, com fotoperíodo de 16 h e temperatura de $23 \pm 2^\circ\text{C}$.

4.2.4 Delineamento experimental e variáveis analisadas

Os experimentos consistiram de 6 repetições (placas de Petri), com 10 explantes em cada repetição e o delineamento experimental foi inteiramente casualizado. Aos 60 dias após o início de cada experimento, foram avaliadas as porcentagens de formação de calos nos explantes, calos formando gemas e explantes oxidados. Os experimentos foram realizados duas vezes.

4.2.5 Regeneração dos explantes

Na fase de indução de calos, foram escolhidas folhas saudáveis retiradas de brotações com três a cinco semanas de cultivo em meio de multiplicação. As folhas foram selecionadas e em seguida retiradas as pontas de cada folha, mantendo o pecíolo, e cultivadas com a face adaxial em contato com o meio de cultura. Nesta etapa, as culturas foram mantidas em BOD na temperatura de $23 \pm 2^\circ\text{C}$, no escuro, por 30 dias, sendo transferidas a meios frescos a cada 14 dias. O meio de cultura foi WPM (LLOYD e McCOWN, 1980) suplementado com $0,5 \mu\text{M}$ de TDZ e $0,1 \mu\text{M}$ de ANA.

Na segunda etapa, os explantes foram transferidos para o meio de indução de gemas, meio WPM adicionado de $5,0 \mu\text{M}$ de BAP e $0,5 \mu\text{M}$ de ANA. Neste período, as culturas ficaram em BOD em fotoperíodo de 16h e foram também repicadas a cada 14 dias para o mesmo meio fresco. Após 120 dias, os explantes foram colocados em meio de multiplicação (meio de cultura MS suplementado com $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP).

Todos os meios foram suplementados com 30 g L^{-1} de sacarose, 500 mg L^{-1} de polivinilpirrolidona (PVP) e 7 g L^{-1} de ágar.

4.2.6 Determinação das concentrações de agentes seletivos

4.2.6.1 Canamicina

Foram testadas as seguintes concentrações de canamicina (Km), sendo o tratamento controle sem Km, 3 mg L⁻¹, 6 mg L⁻¹, 9 mg L⁻¹ e 12 mg L⁻¹, tanto para a fase de indução de calos como para indução de brotações.

Após ser obtido o resultado deste experimento, foi realizado um novo teste com 12,5 mg L⁻¹, 25 mg L⁻¹, 50 mg L⁻¹ e 100 mg L⁻¹ e o controle sem Km. O meio de cultura e os reguladores vegetais estão descritos no item 4.2.5 – regeneração dos explantes.

4.2.6.2 Glufosinato de amônio

Para encontrar uma concentração adequada de glufosinato de amônio, foram testadas as seguintes concentrações: 1 mg L⁻¹, 2,5 mg L⁻¹, 5 mg L⁻¹, 7,5 mg L⁻¹, 10 mg L⁻¹ e 12,5 mg L⁻¹. O controle foi a ausência do glufosinato de amônio.

Com os resultados deste experimento, iniciou-se um segundo teste com doses menores de glufosinato de amônio, sendo testados: ausência, 0,25 mg L⁻¹, 0,5 mg L⁻¹, 0,75 mg L⁻¹ e 1 mg L⁻¹.

4.2.6.3 Manose

Foram testadas diferentes concentrações de manose e sacarose nas seguintes proporções: 30 g de sacarose + 0 g de manose, 0 g de sacarose + 30 g de manose, 15 g de sacarose + 15 g de manose, 22,5 g de sacarose + 7,5 g de manose e 27,5 g de sacarose + 2,5 g de manose.

4.2.7 Transformação genética via co-cultura com *Agrobacterium tumefaciens* com gene marcador *bar*

4.2.7.1 Cepa bacteriana e vetor binário

Foi utilizada a cepa EHA105 de *Agrobacterium tumefaciens*, pertencente ao grupo de opina succinamopina (HOOD *et al.*, 1993), contendo o vetor RD29Apro - DREB2A. Este vetor contém o gene marcador de seleção *bar* sob controle do promotor NOS e o gene *DREB2A* sob o controle do promotor *RD29A* (Figura 4).

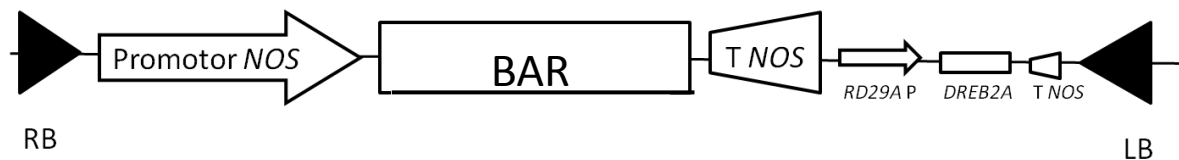


Figura 4. Mapa da construção do T-DNA com o gene *bar* utilizado na transformação genética de explantes foliares de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*.

4.2.7.2 Condições de crescimento bacteriano

A bactéria foi cultivada em meio LB sólido contendo os antibióticos canamicina (50 mg L⁻¹) e rifampicina (25 mg L⁻¹) (Anexo 2). Após a solidificação do meio de cultura, as bactérias foram inoculadas na superfície do meio de cultura com o auxílio de uma alça e incubadas durante 48h a 28°C. Com a ajuda de palitos estéreis, 2 a 4 colônias isoladas e recém-crescidas foram transferidas em 25 ml de meio LB líquido com antibiótico. Em seguida, as bactérias foram mantidas em um agitador orbital por 16h (overnight) a uma velocidade de 150 rpm e uma temperatura entre a 28°C, até a cultura atingir a fase exponencial de crescimento. Após oito horas foi determinada absorvância (Densidade Ótica) a 600 nm (DO₆₀₀) da suspensão bacteriana. A cultura deve estar em fase exponencial de crescimento (DO₆₀₀ entre 0,5 e 1,0). Após a determinação da absorvância, a cultura foi centrifugada a 1500 rpm durante 20 min. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 40 mL de meio MS líquido para transformação das plantas.

4.2.7.3 Preparo e inoculação dos explantes foliares

Os explantes usados na transformação foram folhas saudáveis de brotações micropropagadas, sem o ápice, mantendo o pecíolo. Após o corte, os explantes foram transferidos imediatamente para a suspensão bacteriana (meio MS líquido). Após 10 min, os explantes foram retirados da suspensão e inoculados em meio WPM sólido, sem reguladores vegetais, onde foram mantidos por 48 h, a uma temperatura de $23 \pm 2^\circ\text{C}$. Esta etapa é conhecida como co-cultura.

Após a co-cultura, os explantes foram lavados três vezes em água estéril, sendo adicionados 300 μL de Augmentin na última água. Em seguida, as folhas foram secas em papel filtro estéril, para eliminar o excesso de bactéria. Foram realizados 14 experimentos com 400 explantes em cada.

Iniciou-se então a regeneração dos explantes, em meio de cultura WPM adicionado de 0,5 μM de TDZ, 0,1 μM de ANA, 300 μL de Augmentin e 1 mg L^{-1} de glufosinato de amônio.

Utilizou-se dois controles nesta fase, que não foram inoculados com a bactéria. No controle 1, os explantes se mantiveram em meio sem glufosinato enquanto que, no controle 2, o meio continha as mesmas concentrações de antibiótico dos explantes que passaram pelo processo de transformação.

4.2.7.4 Efeito dos antibióticos Augmentin® e cefotaxima na eliminação da *Agrobacterium tumefaciens* e formação de calos organogênicos

Para identificar qual dos dois antibióticos eliminaria *Agrobacterium tumefaciens* após a co-cultura, foi realizado um teste com Augmentin® (5 amoxicilina: 1 ácido clavulânico) e cefotaxima. No tratamento T1, foi adicionado 300 mg.L^{-1} de Augmentin ao meio de cultura utilizado após a co-cultura e, no T2, 250 mg.L^{-1} de cefotaxima. Foi avaliada a presença ou ausência de *Agrobacterium tumefaciens*, a presença de calos e de explantes oxidados após 60 dias.

4.2.7.5 Efeito do tempo de cultura dos explantes em meio sem agente de seleção

Realizou-se experimento para diminuir a necrose dos explantes foliares, após o processo de co-cultura e antes da formação de calos. Para isso, os explantes ficaram um mês no meio de formação de calos sem adição do agente de seleção (glufosinato de amônio) apenas com 300 μM de Augmentin para a eliminação da bactéria. Em seguida, foram transferidos para o meio de indução de gemas onde foi adicionado 1 mg L^{-1} de glufosinato de amônio para selecionar os tecidos transformados. Já no controle os explantes foram cultivados na presença de 1 mg L^{-1} de glufosinato de amônio imediatamente após a co-cultura. Estes ensaios foram realizados quatorze vezes, com 400 explantes em cada ensaio. Os experimentos foram conduzidos segundo o item 4.2.5 – regeneração dos explantes.

4.2.8 Transformação genética via co-cultura com *Agrobacterium tumefaciens* com gene marcador *nptII*

4.2.8.1 Cepa bacteriana e vetor binário

Foi utilizada a cepa EHA105 de *Agrobacterium tumefaciens*, contendo o vetor pBI RD29A pro - DREB2A. Este vetor contém o gene marcador de seleção *NPTII* sob controle do promotor NOS e o gene *DREB2A* sob o controle do promotor *RD29A* (Figura 5).

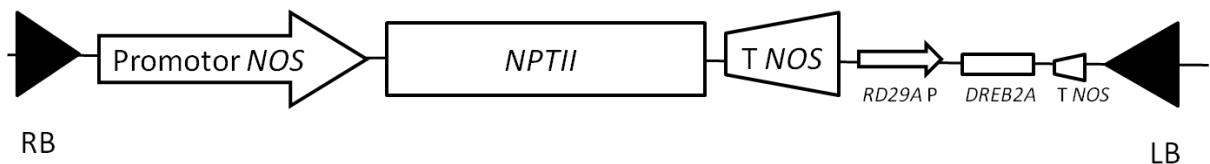


Figura 5. Mapa da construção do T-DNA com o gene *nptII* utilizado na transformação genética de explantes foliares de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*.

4.2.8.2 Condições de crescimento bacteriano

As condições de crescimento bacteriano foram as mesmas do ensaio anterior, item 4.2.7.2.

4.2.8.3 Preparo e inoculação dos explantes foliares

O preparo e a inoculação dos explantes foram realizados da mesma maneira que no experimento anterior, item 4.2.7.3. Até o momento foram realizados 15 repetições deste ensaio, sendo que cada continha 400 explantes foliares.

Iniciou-se então a regeneração dos explantes, em meio de cultura WPM adicionado de 0,5 μM de TDZ, 0,1 μM de ANA, 300 μL de Augmentin e 12,5 mg L^{-1} de canamicina. Foram realizados 14 experimentos com 400 explantes cada. A cada mês os explantes foram transferidos para meios de cultura com maiores concentrações de canamicina, a fim de selecionar as plantas transformadas. Assim, as doses foram de 25 e 50 mg L^{-1} de Km. Após 30 dias no meio com 50 mg L^{-1} de Km as brotações regeneradas passaram para o meio de multiplicação (MS com 0,2 mg L^{-1} de BAP) e futuramente os explantes passarão pelos testes de PCR e Southern Blot.

Utilizou-se dois controles nesta fase, que não foram inoculados com a bactéria. No controle 1, os explantes se mantiveram em meio sem canamicina enquanto que, no controle 2, o meio continha as mesmas concentrações de antibiótico dos explantes que passaram pelo processo de transformação.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Canamicina

Para determinar a concentração ideal da canamicina (Km) no processo de transformação genética, testaram-se quatro concentrações deste agente seletivo durante o processo de organogênese. A concentração ideal do agente seletivo durante a transformação genética é aquela que permite a regeneração de gemas transformadas, ou seja, que não seja tão tóxica que não permita a regeneração e nem tão baixa que regenere escapes. Segundo Wilmink e Dons (1993) a concentração do agente seletivo deve assegurar a proliferação celular, o desenvolvimento de estruturas organizadas e permitir a recuperação de plantas transgênicas. Portanto, neste experimento buscou-se a dose ideal de Km para a seleção inicial de tecidos transformados com o gene *iptII*.

No primeiro experimento pôde-se observar que a concentração de 12 mg L⁻¹ foi a mais fitotóxica, com apenas 1,6% dos explantes foliares regenerando gemas. Nesta concentração também foi observada a maior média de necrose com 45%, (Figura 6 e 7). Pode-se perceber que em todas as concentrações de Km a divisão celular dos explantes para a formação de calos foi mantida, contudo quanto maior a concentração utilizada menor foi a porcentagem de regeneração. Os tratamentos com 3, 6 e 9 mg L⁻¹ obtiveram alta calogênese e uma taxa de regeneração igual do controle, quando observado o desvio padrão das amostras (Figura 6).

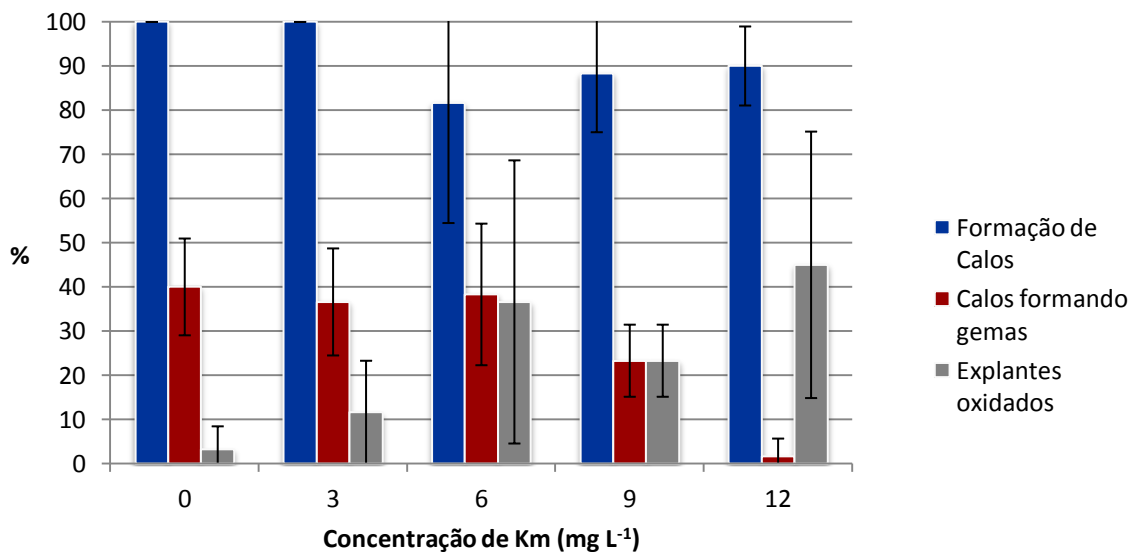


Figura 6. Efeito de concentrações de canamicina (Km) na formação de calos, gemas e oxidação de explantes foliares de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*, avaliados após 60 dias. O meio de cultura foi o WPM com 0,5 µM

de TDZ e $0,1 \mu\text{M}$ de ANA nos 30 primeiros dias e com $5,0 \mu\text{M}$ de BAP e $0,5 \mu\text{M}$ de ANA nos últimos 30 dias. Barra representa o desvio padrão.

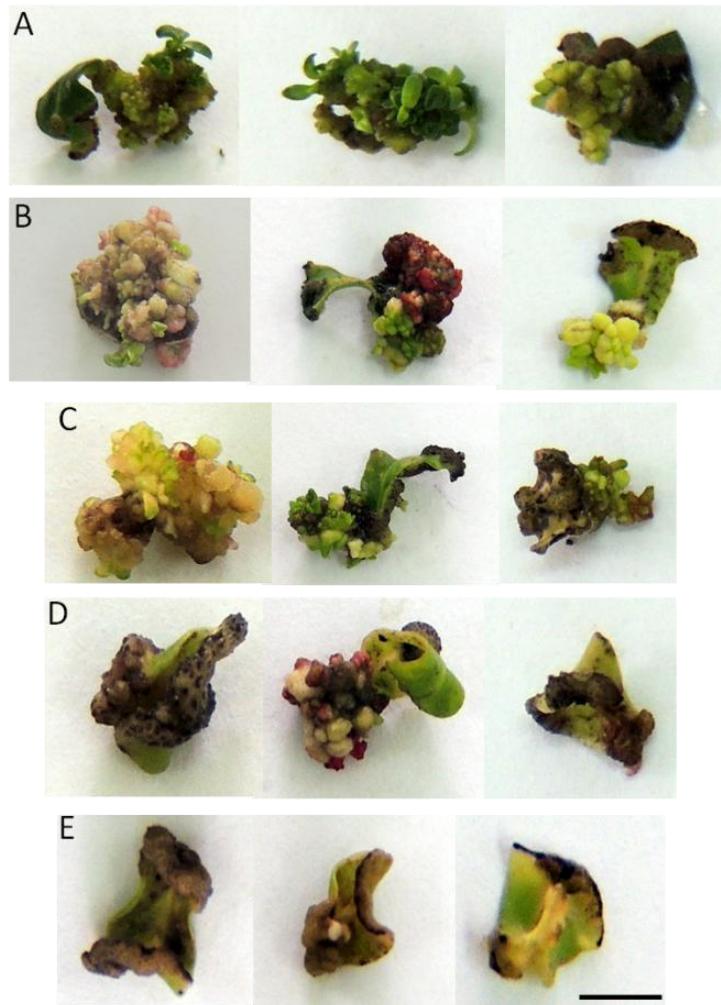


Figura 7. Efeito de concentrações de canamicina na organogênese indireta de explantes foliares de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* após 60 dias de cultivo. O meio de cultura foi o WPM com $0,5 \mu\text{M}$ de TDZ e $0,1 \mu\text{M}$ de ANA nos 30 primeiros dias e com $5,0 \mu\text{M}$ de BAP e $0,5 \mu\text{M}$ de ANA nos últimos 30 dias. A: 0 mg L^{-1} , B: 3 mg L^{-1} , C: 6 mg L^{-1} , D: 9 mg L^{-1} e E: 12 mg L^{-1} de Km. Barra = 5 mm

Em todos os tratamentos deste experimento houve formação de calos e regeneração de gemas, mostrando que os tecidos do híbrido *E. urograndis* são tolerantes às concentrações testadas (Figura 7). De acordo com González (2002), no gênero eucalipto existe uma variabilidade genética para tolerância/resistência a determinados antibióticos, possibilitando a ocorrência de escapes. Com o objetivo de saber se este híbrido é tolerante/resistente a concentrações mais altas de Km, foi realizado novo experimento.

Somente na ausência de Km e na menor concentração ($12,5 \text{ mg L}^{-1}$) foi observada regeneração de gemas (40 e 6%, respectivamente). Este resultado mostra que todos os outros tratamentos aplicados foram altamente fitotóxicos para os explantes foliares (Figura 8 e 9). De

acordo com Brasileiro e Aragão (2001), quando o antibiótico entra em contato com o tecido vegetal, atua na síntese de proteínas em mitocôndrias e cloroplastos, reduzindo a síntese de clorofila e, portanto, causando oxidação dos explantes não transformados. Ao contrário, quando os tecidos são transformados e possuem o gene *nptII*, sintetizam a enzima NPTII promovendo a tolerância das células a dosagens dos antibióticos aminoglicosilados, como a canamicina (BRASILEIRO e LACORTE, 1998).

No presente trabalho, pôde-se observar a baixa formação de calo, principalmente quando comparado ao tratamento controle (ausência de Km). Nos tratamentos com 25, 50 e 100 mg L⁻¹ não houve regeneração dos calos em gemas aliado a uma taxa de oxidação muito alta, chegando a 100% no tratamento com 100 mg L⁻¹ (Figura 8). Esse resultado também foi encontrado por Quisen (2007) em seu estudo com *E. camaldulensis*, onde a concentração acima de 10 mg L⁻¹ de Km não possibilitou a calogênese. Da mesma maneira, González (2002) mostrou que a presença de Km nas concentrações de 50 e 100 mg L⁻¹ inibiu a formação de calos de *E. grandis*.

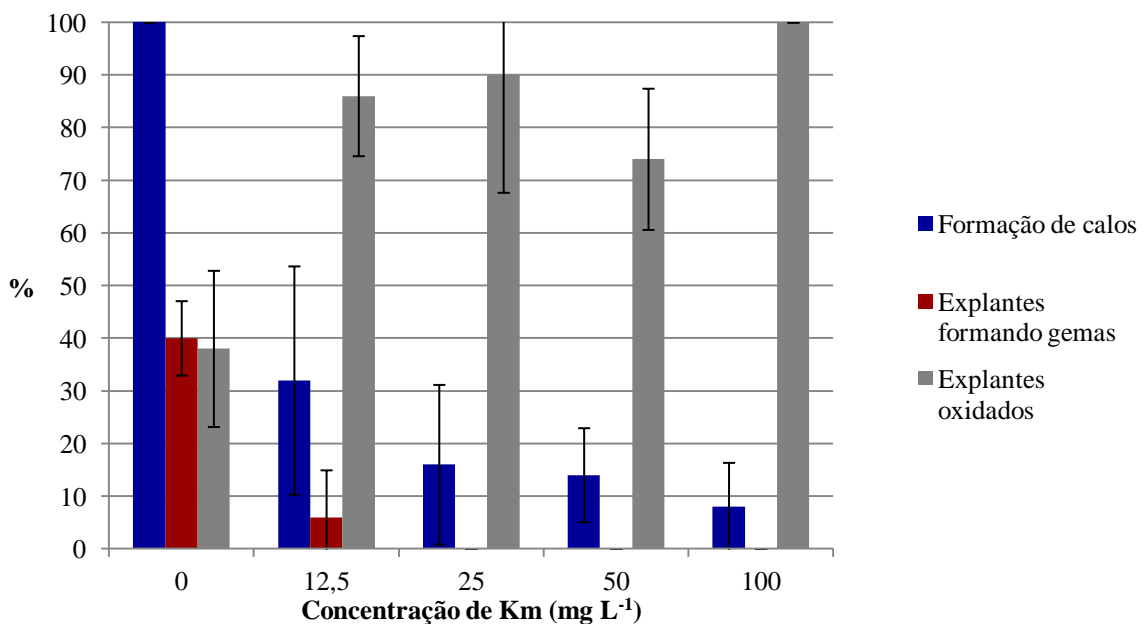


Figura 8. Efeito da canamicina (Km) na formação de calos, gemas e oxidação de explantes foliares de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*, avaliados após 60 dias. O meio de cultura foi o WPM com 0,5 µM de TDZ e 0,1 µM de ANA nos 30 primeiros dias e com 5,0 µM de BAP e 0,5 µM de ANA nos últimos 30 dias. Barra represente desvio padrão.



Figura 9. Efeito da canamicina na organogênese indireta de explantes foliares de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* após 60 dias de cultivo. O meio de cultura foi o WPM com 0,5 μM de TDZ e 0,1 μM de ANA nos 30 primeiros dias e com 5,0 μM de BAP e 0,5 μM de ANA nos últimos 30 dias. A: 0 mg L^{-1} , B: 12,5 mg L^{-1} , C: 25 mg L^{-1} , D: 50 mg L^{-1} e E: 100 mg L^{-1} . Barra = 1 cm

A concentração ideal do agente de seleção de plantas transformadas é espécie-dependente, o que explica a alta variação de doses encontradas em diversos trabalhos, como no de Moralejo e colaboradores (1998), com *E. globulus*, onde a concentração letal mínima foi de 75 mg L^{-1} ; Matsunaga *et al.* (2012) utilizaram 50 mg L^{-1} de Km para a seleção da mesma espécie; já para *Eucalyptus camaldulensis*, Ho *et al.* (1998) verificaram que a concentração de 20 mg L^{-1} provocou uma redução na formação de calos e brotações de hipocótilos, enquanto que acima de 40 mg L^{-1} a inibição da regeneração foi completa. De outro lado, Mullins e colaboradores (1997) e Quisen (2007) concluíram que 9 mg L^{-1} de Km é suficiente para inibir a regeneração de explantes de *E. camaldulensis*. Assim, as respostas dos tecidos aos antibióticos são diferentes dentro do gênero *Eucalyptus* e podem variar entre espécies e até mesmo, para clones diferentes da mesma espécie.

Com os resultados deste experimento optou-se por utilizar 12 mg L^{-1} no início do cultivo de explantes transformados, passando os explantes sobreviventes para 25 mg L^{-1} e em seguida 50 mg L^{-1} para tentar regenerar somente explantes transformados sem promover a oxidação imediata dos explantes.

4.3.2 Glufosinato de amônio

No primeiro experimento para identificar a dose ideal de glufosinato de amônio, todos os explantes, exceto o controle (ausência), necrosaram, morrendo todos os explantes. As concentrações usadas não permitiram nem mesmo a calogênese dos explantes foliares, como se pode observar na Figura 10. Ao contrário, Harcourt e colaboradores (2000) identificaram a dose de 10 mg L^{-1} para selecionar tecidos transformados com o gene *bar* de *E. camaldulensis*. Já para selecionar as plantas transformadas de *Oryza sativa* L, Cao *et al.* (1992) utilizaram 4

mg L⁻¹ em meio MS, enquanto que Dekeyser *et al.* (1989) usaram 10 mg L⁻¹, mostrando que a concentração deste agente seletivo depende diretamente da espécie e até do clone utilizado na transformação.

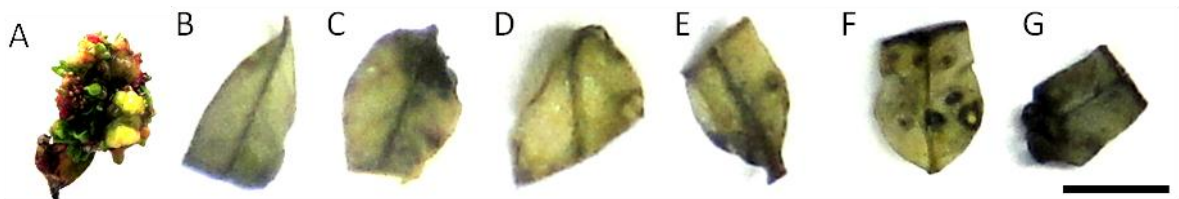


Figura 10. Efeito de glufosinato de amônio na organogênese indireta de explantes foliares de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* após 60 dias de cultivo. . O meio de cultura foi o WPM com 0,5 µM de TDZ e 0,1 µM de ANA nos 30 primeiros dias e com 5,0 µM de BAP e 0,5 µM de ANA nos últimos 30 dias. A: 0 mg L⁻¹, B: 1 mg.L⁻¹, C: 2,5 mg.L⁻¹, D: 5 mg.L⁻¹, E: 7,5 mg.L⁻¹, F: 10 mg.L⁻¹ e G: 12,5 mg.L⁻¹ Barra = 5 mm

Concluiu-se que o intervalo utilizado entre as concentrações definidas não foi adequado já que todos os explantes necrosaram. Para uma dose adequada do agente de seleção é preciso que haja uma pequena taxa de regeneração, visto que quando usada altas concentrações, mesmo tecidos transformados não são capazes de regenerar, devido a sua alta toxicidade. Assim, buscou-se encontrar a concentração ideal no intervalo entre 0,25 e 1mgL⁻¹.

Com o aumento gradativo na concentração do glufosinato de amônio no segundo experimento, a divisão celular foi reduzida, diminuindo de 100% no controle para 68,3% na concentração com 0,25 mg L⁻¹ e para 48,3% na concentração com 0,5 mg L⁻¹ (Figura 11). As duas maiores concentrações, de 0,75 e 1 mg L⁻¹, inibiram a calogênese e a organogênese dos explantes foliares, obtendo 100% dos explantes oxidados.

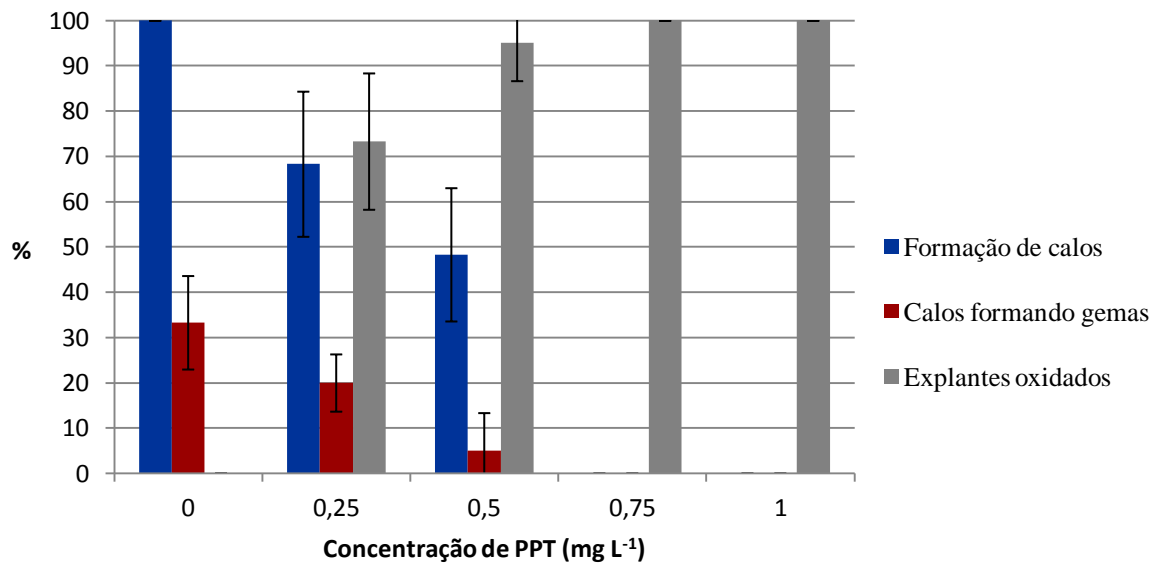


Figura 11. Efeito de baixas concentrações de glufosinato de amônio na formação de calos, gemas e oxidação de explantes foliares de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*, avaliados após 60 dias. O meio de cultura foi o WPM com 0,5 μ M de TDZ e 0,1 μ M de ANA nos 30 primeiros dias e 5,0 μ M de BAP e 0,5 μ M de ANA, nos últimos 30 dias. Barra representa desvio padrão.

O glufosinato de amônio (PPT) é um princípio ativo herbicida que age como inibidor competitivo da enzima glutamina sintase, promovendo acúmulo de amônio e a morte das células (LILGE *et al.*, 2003). O gene *bar* introduzido que confere resistência ao PPT é uma versão sintética do gene *Pat* que codifica a enzima Fosfotricina-N-Acetiltransferase (PAT) obtida da bactéria *Streptomyces viridochromogenes* pertencente à família *Actinomycetaceae* (DEKEYSER *et al.*, 1989). O gene *pat* confere resistência através da acetilação (introdução do grupo acetil – CH₃CO em molécula orgânica contendo grupos hidroxilas – OH ou amônia – NH₂) do PPT, utilizando como co-fator acetil-coenzima A, fazendo com que o PPT perca a ação inibidora (WILMINK e DONS, 1993; LILGE *et al.*, 2003).

Além da concentração do glufosinato de amônio, outros fatores influenciam a resposta organogênica de explantes transformados. Segundo D'Halluin *et al.* (1992), a exposição dos explantes foliares à luz aumenta a sensibilidade ao PPT, o que pode conduzir à morte celular rápida, mesmo antes de selecionar as células transformadas. A incubação dos discos foliares, no escuro ou sob luz baixa, pode reduzir a sensibilidade ao PPT, mas também reduz a eficiência da seleção e uma quantidade mais elevada de brotos não transformados pode ser obtida. Neste experimento, os explantes foram mantidos por 30 dias no escuro e em seguida transferidos para luz.

Portanto, a dose ideal sugerida foi de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$, na qual os explantes tiveram uma baixa regeneração, sendo agora necessários testes com explantes transformados para poder obter apenas brotos transformados.

4.3.3 Manose

A fim de encontrar a combinação ideal de manose e sacarose para que ocorra a regeneração de plantas transformadas com o gene *pmi*, cinco combinações foram testadas. Wrignt e colaboradores (2001) relatam o uso combinado de manose e sacarose durante a fase de regeneração de milho transformado com o gene *pmi*. Segundo este autores, a combinação de manose e sacarose proporcionou calos verdes e regeneração alta de plantas sem escapes, enquanto que usando apenas manose diminuiu o número de regeneração. Vieira *et al.* (2005) afirmaram que a presença de sacarose no meio de cultura aumenta a pressão de seleção proporcionada pela manose.

A presença de manose no meio de cultura causou uma visível alteração na capacidade de regeneração dos explantes, quando comparados com o controle (Figura 12). As combinações de 0/30 e 15/15 sacarose/manose foram totalmente letais aos explantes, não promovendo a calogênese e organogênese, com 100% dos explantes oxidados nos dois tratamentos (Figura 13). As combinações de 22,5/7,5 e 27,5/2,5 sacarose/manose, possibilitaram a divisão celular e a regeneração de explantes, com 10 e 18%, respectivamente, de explantes com gemas. Para arroz, Zhengquan e colaboradores (2004) definiram a concentração de 15 g L^{-1} de manose combinada com 5 g L^{-1} de sacarose no meio de cultura para a seleção de plantas transformadas, conseguindo 5,7% de frequência de regeneração. Lucca *et al.* (2001) conseguiram uma frequência de transformação de 41%, também para arroz. Negrotto *et al.* (2000) obteve 30% de frequência de transformação com 1g de manose combinado com 0,5g de sacarose, em milho. Para *Citrus paradisi* x *Poncirus trifoliata*, Vieira *et al.* (2005) obtiveram uma eficiência de transformação de 11%. Não há relatos da inserção do gene *pmi* em eucalipto, sendo de extrema importância a adequação do protocolo de seleção para seu uso.

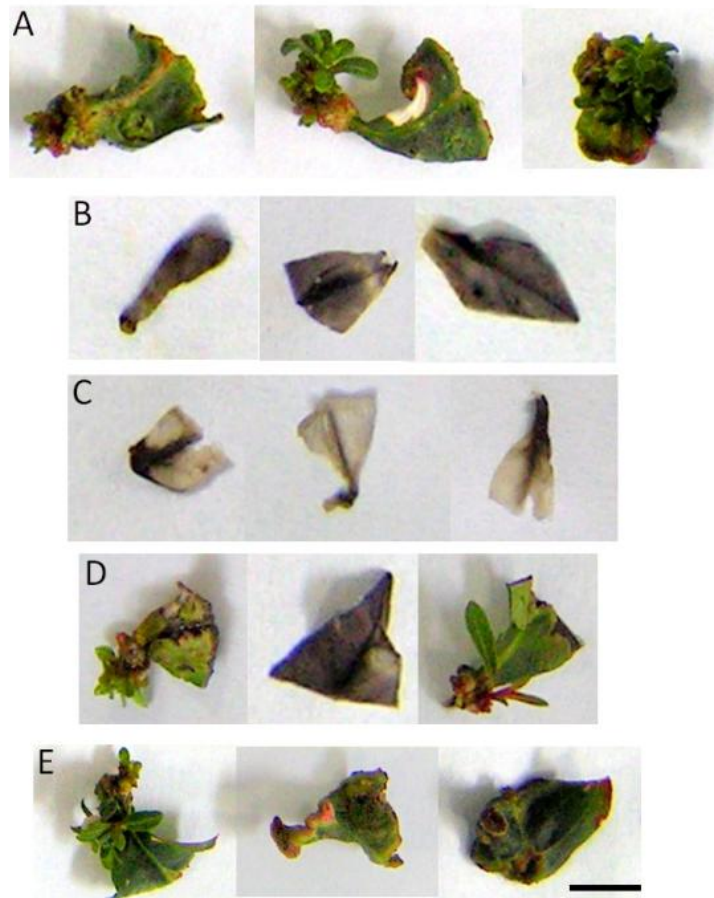


Figura 12. Efeito da combinação de sacarose e manose na organogênese indireta de explantes foliares de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* após 60 dias de cultivo. . O meio de cultura foi o WPM com 0,5 μM de TDZ e 0,1 μM de ANA nos 30 primeiros dias e 5,0 μM de BAP e 0,5 μM de ANA, nos últimos 30 dias. A: 30 g de sacarose + 0 g de manose, B: 0 g de sacarose + 30 g de manose, C: 15 g de sacarose + 15 g de manose, D: 22,5 g de sacarose + 7,5 g de manose e E: 27,5 g de sacarose + 2,5 g de manose. Barra = 1 cm.

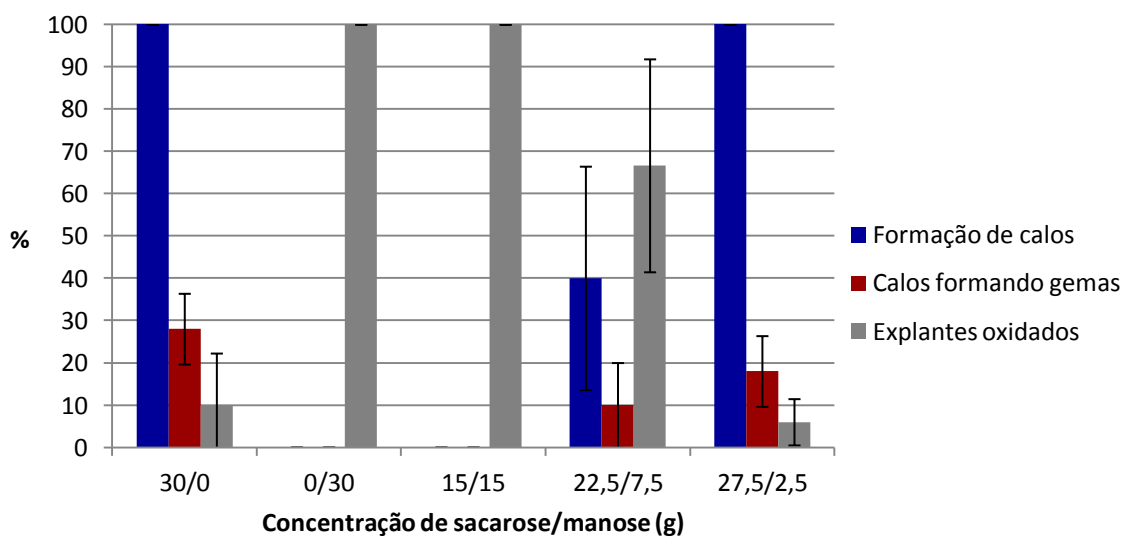


Figura 13. Efeito de combinações de sacarose e manose na formação de calos e gemas e na oxidação de explantes foliares de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* avaliados após 60 dias. Nos primeiros 30 dias o meio de cultura foi o WPM com 0,5 μM de TDZ e 0,1 μM de ANA e, nos 30 dias seguintes, com 5,0 μM de BAP e 0,5 μM de ANA. Barra representa desvio padrão.

Com altas concentrações de manose nos tecidos não transformados ocorre o acúmulo da manose-6-fosfato e, conseqüentemente, inibição da enzima fosfoglucose isomerase, a qual bloqueia a glicólise (GOLDSWORTHY e STREET, 1965), diminui o “pool” de pirofosfato necessário para produção de ATP (HEROLD e LEWIS, 1977), reprime a transcrição de genes associados com a fotossíntese e o ciclo do glioxalato (JANG e SHEEN, 1997) e causa a apoptose (STEIN e HANSEN, 1999).

Quando comparados os sistemas de seleção com os genes *pmi* e *bar* em milho e trigo, houve maior regeneração de plantas transformadas com o gene *pmi*, com um aumento de quase quatro vezes na frequência de transformação (WRIGHT *et al.*, 2001). Joersbo *et al.* (1998) também obtiveram um aumento da frequência de transformação de *Beta vulgaris* em quatro vezes quando comparado com o sistema com *nptII*. Segundo Lucca *et al.* (2001) a explicação para o aumento da frequência de transformação com o gene *pmi* é a ausência ou diminuição do tecido necrosado, que normalmente ocorre na seleções com antibióticos e herbicidas. De acordo com Lindsay e Gallois (1990), a liberação de metabólitos tóxicos pelas células não transformadas pode prejudicar a regeneração e crescimento das células transgênicas.

Os resultados do presente trabalho sugerem que *E. urograndis* não é capaz de metabolizar manose. Como consequência disso, o sistema *manA*/manose pode ser usado em programas de transformação genética. Outras espécies são capazes de metabolizar a manose como fonte de carboidrato, como por exemplo, *Carica papaya* (SOUZA JUNIOR *et al.*, 2001). São necessários mais experimentos para adequar a concentração de manose e sacarose para selecionar explantes transformados. Com este experimento é possível sugerir as doses de 22,5 g de sacarose e 7,5 g de manose para a seleção de tecidos transformados de *E. urograndis*, já que esses tecidos apresentam uma baixa taxa de regeneração (10%).

4.3.4 Efeito dos antibióticos Augmentin e Cefotaxima na eliminação de *Agrobacterium tumefaciens* e formação de calos organogênicos

Após a transformação genética com *Agrobacterium tumefaciens*, é realizada a remoção da bactéria através da utilização de antibióticos. Segundo Öz *et al.* (2009), uma alta frequência de transformação usando *Agrobacterium* depende não só da eficiência de regeneração, mas também da eliminação da bactéria nas células transformadas. A ação dos

antibióticos sobre as bactérias pode se dar de diversas maneiras, sendo que as mais comuns são por interferência na síntese da parede celular ou na síntese proteica e por inibição de enzimas específicas (POLLOCK *et al.*, 1983).

Muitos trabalhos indicam a interação entre antibiótico e o tecido vegetal durante a cultura *in vitro*. De acordo com Ieamkhang e Chatchawankanphanich (2005) os tecidos vegetais são afetados por diferentes componentes do meio de cultura, por isso os antibióticos usados não devem ter um efeito negativo na regeneração. Ainda de acordo com esses autores, o uso de altas concentrações de cefotaxima reduziu o crescimento dos calos, a regeneração de brotos e a eficiência de transformação em diversos trabalhos.

Portanto, para que um antibiótico possa ser utilizado em programas de transformação genética de plantas, além de ser eficiente na supressão de *Agrobacterium* e manter sua ação bactericida no meio de cultura, ele deve ser testado para que não seja tóxico e para que contribua para o sucesso da regeneração (POLLOCK *et al.*, 1983).

Neste experimento, testou-se o efeito de dois antibióticos na eliminação de *Agrobacterium tumefaciens* e na resposta dos explantes. Como pode ser observado na Figura 14, os explantes mantidos em 300 mg L⁻¹ de Augmentin[®] formaram calos com uma coloração branca, enquanto que os explantes mantidos em 250 mg L⁻¹ de cefotaxima formaram calos com coloração marrom, aparentemente oxidados. Öz *et al.* (2009) testaram cefotaxima e Augmentin na regeneração e eliminação de *Agrobacterium* em *Cicer arietinum* e não observaram diferenças na quantidade de brotos por explante obtida com quatro concentrações dos bactericidas, enquanto que Ieamkhang e Chatchawankanphanich (2005) observaram diferenças na regeneração de cotilédones de *Lycopersicon esculentum* usando diversas concentrações de Augmentin (100, 200, 300 400 e 500 mg L⁻¹) e 500 e 1000 mg L⁻¹ de cefotaxima. Esses autores ainda afirmam que Augmentin é eficaz para eliminar *Agrobacterium* para a transformação de tomate e nenhuma toxicidade foi observada para os tecidos com a concentração utilizada nessa experiência. No presente trabalho, pode-se observar que os calos provenientes do meio com Augmentin têm um melhor aspecto do que os do controle (Figura 14-A).



Figura 14. Efeito dos antibióticos (A) 300 mg L⁻¹ de Augmentin® e (B) 250 mg L⁻¹ de cefotaxima na organogênese indireta de explantes foliares de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* após 60 dias. Barra = 1 cm

Quisen *et al.* (2009), ao comparar Augmentin e cefotaxima por 60 dias em tecidos de *E. camaldulensis* transformados com a cepa C58C1, concluíram que é necessário o uso do antibiótico durante todo o processo de regeneração para manter as plantas livres de bactéria. Ainda segundo estes autores as altas concentrações de cefotaxima (500 mg L⁻¹) e de Augmentin (300 mg L⁻¹) causaram oxidação dos explantes. Já neste trabalho, a concentração de 250 mg L⁻¹ de cefotaxima causou mais oxidação do que 300 mg L⁻¹ de Augmentin. Tournier e colaboradores (2003) utilizaram 300 mg L⁻¹ de Augmentin na transformação do *E. urograndis*, sem prejuízos na sua regeneração e transformação. Mullins *et al.* (1997) e Harcourt *et al.* (2000) trabalharam com *E. camaldulensis* e perceberam que 200 mg L⁻¹ de cefotaxima não alterou a regeneração dos explantes, mostrando que é necessária a adequação do antibiótico e sua concentração para cada espécie e cada cepa bacteriana. De acordo com Quisen (2007) os antibióticos têm apresentado comportamento distinto, podendo melhorar a eficiência da transformação ou exercer caráter fitotóxico.

Nenhuma das duas concentrações usadas dos antibióticos foi eficiente para a eliminação total da bactéria. São necessários testes com novas concentrações e tempo de exposição para eliminação da *Agrobacterium*. Há poucos relatos do uso de Augmentin para eucalipto, apesar dos resultados satisfatórios para outras culturas (QUISEN, 2007). Após este experimento, a concentração de 300 mg L⁻¹ de Augmentin foi adotada nos ensaios de transformação genética.

4.3.5 Efeito do tempo de cultura dos explantes sem agente de seleção na formação de calos

Após a co-cultura, os explantes usados na transformação são cultivados em meio de seleção, para regenerar apenas plantas transformadas. Geralmente, o agente seletivo é adicionado ao meio de cultura logo após o término do co-cultivo (GUIDOLIN, 2003). No entanto, há relatos de maior eficiência de seleção e frequência de transformação quando há um intervalo de alguns dias entre o término do co-cultivo e o início da seleção com canamicina. Em *Vitis vinifera*, por exemplo, a adição de canamicina ao meio seis semanas após a inoculação da bactéria permitiu a seleção, onde todos os brotos regenerados eram transgênicos (SCORZA *et al.*, 1995). Este fato também foi relatado para seleção com o gene *pmi*, que confere resistência a manose, em citrumelo Swingle (VIEIRA *et al.*, 2005).

Neste ensaio de transformação genética, procurou-se diminuir a oxidação imediata dos explantes transformados com o gene *bar*, que confere resistência ao herbicida glufosinato de amônio. Assim adicionou-se o glufosinato de amônio, após um mês de cultivo *in vitro*. No tratamento controle (presença de 1 mg L^{-1} de glufosinato de amônio imediatamente após a co-cultura) não houve a formação de calos, enquanto que no T1 (1 mês sem adição do agente de seleção) houve calogênese dos explantes (Figura 15). No entanto, não se pode verificar se estes tratamentos influenciaram a seleção de plantas transformadas, já que neste experimento não houve a formação de brotações.

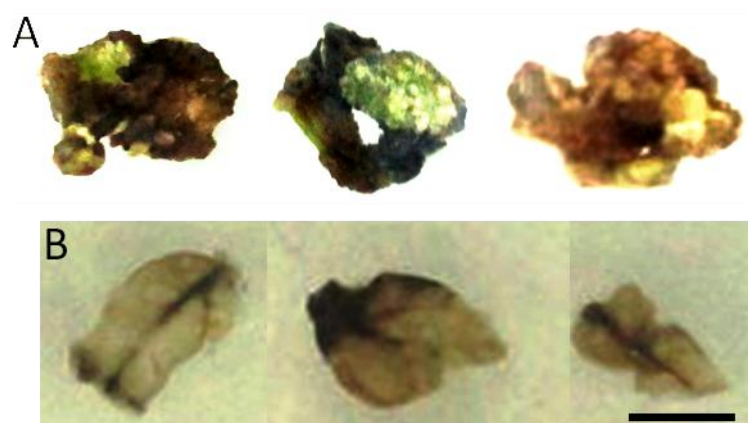


Figura 15. Efeito do tempo de cultura dos explantes sem agente de seleção na transformação genética de explantes foliares de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* após 60 dias de cultivo. (A) Um mês sem agente de seleção e (B) com agente de seleção desde a co-cultura. Barra = 5 mm

Na literatura, existem alguns trabalhos comparando a utilização do gene *bar* versus o gene *nptII*. Para ervilha, os resultados são contraditórios, onde Schroeder *et al.* (1993) e Grant *et al.* (1998) concluíram que a canamicina não foi eficiente para a seleção, enquanto que Davies *et al.* (1993) apontaram a canamicina como um efetivo agente de seleção. Ainda segundo Grant *et al.* (1998), ao analisar o uso da canamicina como agente de seleção, sua expressão foi eficaz para a seleção de tecidos transformados com o gene *nptII*. Nadolska-Orczyk e Orczyk (2000) ao compararem os genes de seleção perceberam que o uso do *nptII* proporcionou um número médio de plantas transgênicas maior do que o gene *bar*, e a proporção de transgênicos resistentes a Km foi maior do que entre as plantas resistentes a PPT (35% versus 28%).

Em *Populus*, Busov e colaboradores (2011) obtiveram uma eficiência de transformação duas vezes maior usando o gene *nptII* comparando com o gene *bar*. Para transformação de eucalipto, os genes de seleção mais utilizados são o *nptII* e o *bar*. Não foram encontradas comparações entre esses dois métodos de seleção na literatura; no entanto, avaliando-os separadamente no presente estudo, nota-se uma maior taxa de oxidação dos explantes transformados com o gene *bar*, além de não haver gemas regeneradas em nenhum dos ensaios de transformação.

4.3.6 Transformação genética de *E. urograndis* via co-cultura com *Agrobacterium tumefaciens* carregando o gene *nptII*

Nos resultados preliminares dos experimentos de transformação a partir de explantes foliares de *E. urograndis*, foram obtidos explantes exibindo formação de calos e regeneração de gemas após a inoculação e em meio de seleção. Os explantes estão regenerando em meio de seleção com 50 mg L⁻¹ de Km, o que pode sugerir que o gene que confere resistência a canamicina foi inserido no DNA da planta.

A formação de calos dos explantes do controle 1 ocorreu com cerca de 30 dias, enquanto que no controle 2, que continha canamicina, os explantes começaram a necrosar logo nos primeiros 15 dias (Figura 16). Após 60 dias se pode observar a presença de calos com pontos avermelhados e a formação de gemas e brotações no controle 1.

Na Figura 17 pode-se observar a presença de calos após 30 dias de cultivo dos explantes transformados e a oxidação de alguns explantes, possivelmente não transformados e

sendo afetados pela presença de $12,5 \text{ mg L}^{-1}$ de canamicina. Após 60 dias, os explantes foram transferidos para o meio com 25 mg L^{-1} , onde alguns explantes apresentaram regeneração de gemas, enquanto que outros explantes se mostravam oxidados (Figura 18).

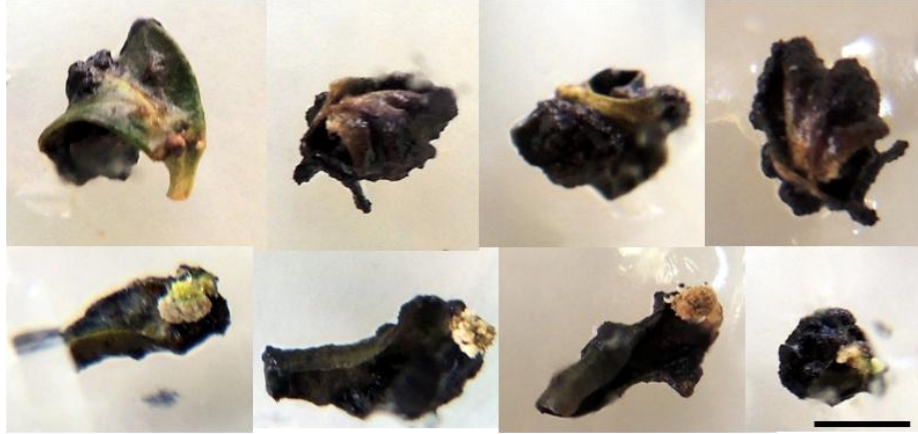


Figura 16. Controle 2. Efeito da canamicina sobre explantes foliares de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* não transformados com 30 dias de cultivo. O meio de cultura foi o WPM com $0,5 \mu\text{M}$ de TDZ + $0,1 \mu\text{M}$ de ANA + $12,5 \text{ mg L}^{-1}$ de Km. Barra = 1 cm

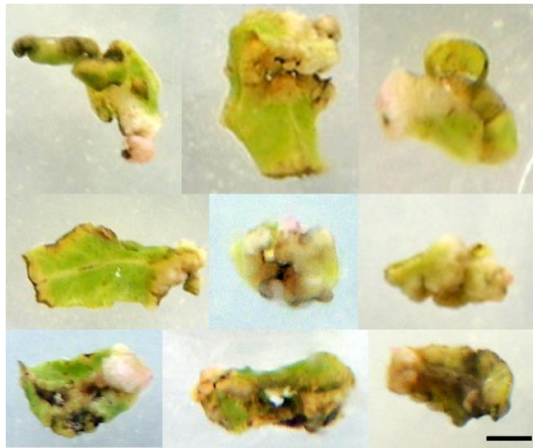


Figura 17. Formação de calos em explantes foliares de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* 30 dias após a transformação genética. O meio de cultura foi o WPM com $0,5 \mu\text{M}$ de TDZ + $0,1 \mu\text{M}$ de ANA + $12,5 \text{ mg L}^{-1}$ de Km. Barra = 5 mm

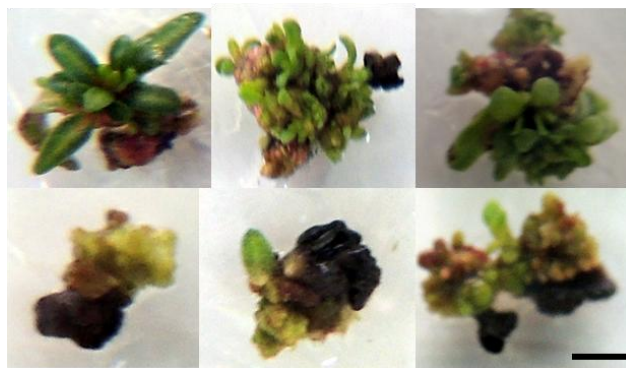


Figura 18. Gemas com 60 dias de cultivo, regeneradas após a transformação genética de explantes foliares de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*. O meio de cultura foi o WPM com $0,5 \mu\text{M}$ de TDZ + $0,1 \mu\text{M}$ de ANA + $12,5$

mg L⁻¹ de Km nos 30 primeiros dias e 5,0 μM de BAP + 0,5 μM de ANA + 25 mg L⁻¹ de canamicina nos 30 dias seguintes. Barra = 5 mm

Com dois meses de cultivo, os explantes oxidados foram eliminados para que os compostos fenólicos liberados por eles não impeçam o desenvolvimento dos explantes transformados. Com 90 dias, os explantes foram transferidos para meio de cultura contendo 50 mg L⁻¹ de Km, onde formaram gemas e brotações, como pode ser visto na Figura 19. Após 120 dias, os explantes com brotações foram transferidos para o meio de multiplicação com 50 mg L⁻¹ (Figura 20). Estes explantes estão sendo usados para a realização das análises moleculares para a confirmação da transformação genética.



Figura 19. Gemas com 90 dias regeneradas após a transformação genética de explantes foliares de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*. O meio de cultura foi o WPM com 0,5 μM de TDZ + 0,1 μM de ANA + 12,5 mg L⁻¹ de Km nos 30 primeiros dias, 5,0 μM de BAP + 0,5 μM de ANA + 25 mg L⁻¹ de Km nos 30 dias seguintes e em seguida 5,0 μM de BAP + 0,5 μM de ANA + 50 mg L⁻¹ de Km por mais 30 dias. Barra = 5 mm

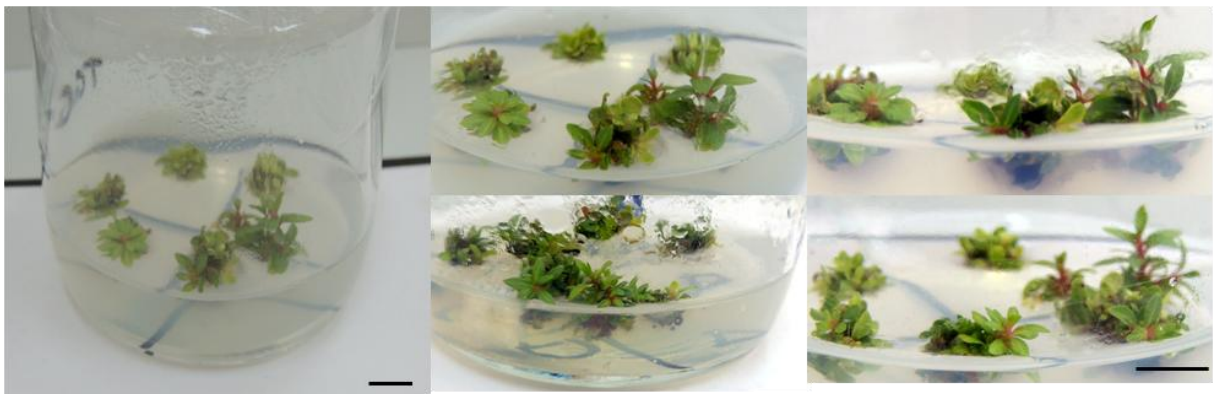


Figura 20. Brotações de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* de 120 dias em meio de multiplicação regeneradas após transformação genética de explantes foliares. O meio de cultura foi o MS com 0,2 mg L⁻¹ BAP e 50 mg L⁻¹ de canamicina. Barra = 1 cm

4.4 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos para *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*, pode-se concluir que:

- a concentração ideal de canamicina para o início da seleção de tecidos transformados com o gene *nptII* é 12 mg L^{-1} ;
- a concentração ideal de glufosinato de amônio para o início da seleção de tecidos transformados com o gene *bar* é $0,5 \text{ mg L}^{-1}$;
- a concentração ideal da combinação de sacarose e manose para o início da seleção de tecidos transformados com o gene *pmi* é $22,5 \text{ g}$ de sacarose + $7,5 \text{ g}$ de manose;
- O antibiótico Augmentin® proporciona um aspecto melhor dos calos em comparação com o antibiótico cefotaxima;

Portanto, o protocolo de transformação genética foi aperfeiçoado e pode ser utilizado com diferentes genes marcadores de seleção.

REFERÊNCIAS

- Andrade A (2001). Avaliação de parâmetros que influenciam a transformação genética do *Eucalyptus grandis* via *Agrobacterium*. Brazil: São Paulo University, Master Thesis.
- Brasileiro ACM, Aragão FJL (2001). Marker genes for *in vitro* selection of transgenic plants. *J. Plant Biotech.* 3: 113-121.
- Brasileiro ACM, Lacorte C (1998). Interação *Agrobacterium*-hospedeiro. In: Manual de transformação genética de plantas. 75-92
- Busov V, Yordanov Y, Gou J, Meilan R, Ma C, Regan S, Strauss S (2011). Activation tagging is an effective gene tagging system in *Populus*. *Tree Genetics Gen.* 7:91–101.
- Cao J, Duan X, McElroy D, Wu R (1992). Regeneration of herbicide resistant transgenic rice plants following microprojectile-mediated transformation of suspension culture cells. *Plant Cell Rep.* 11: 586-591.
- D'Halluin K, De Block M, Denecke J, Janssens J, Leemans J, Reynaerts A, Botterman J (1992). The bar gene as selectable and screenable marker in plant engineering. *Meth. Enzymol.* 216: 415-426.
- Davies DR, Hamilton J, Mullineaux P (1993). Transformation of peas. *Plant Cell Rep.* 12: 180–183.
- Dekeyser D, Claes B, Marichal M, Montagu MB, Caplan A (1989). Evaluation of selectable markers for Rice transformation. *Plant Phys.* 90: 217-223.
- Giri CC, Shyamkumar B, Anjaneyulu C (2004). Progress in tissue culture, genetic transformation and application of biotechnology to trees: an overview. *Trees.* 18: 115-135.
- Goldsworthy A, Street HE (1965). The carbohydrate nutrition of tomato roots - The mechanism of the inhibition by d-mannose of the respiration of excised roots. *Ann. Bot., London* 29: 45-58.
- Golle DP (2010). Estabelecimento, multiplicação, calogênese, organogênese *in vitro* e análise da diversidade genética em acessos de *Eugenia involucrata* DC. Brazil: Federal University of Santa Maria, PhD Thesis.
- González ER, Andrade A, Bertolo AL, Carneiro RT, Lacerda GC, Defávvari VAP, Labate MTV, Labate CL (2002). Transformação genética do eucalipto. *Biotech. Desenv.* 5: 18-22.
- Grant JE, Cooper PA, Gilpin BJ, Høglund SJ, Reader JK, Pither-Joyce MD, Timmerman-Vaughan GM (1998). Kanamycin is effective for selecting transformed peas. *Plant Sci.* 139: 159–164.
- Harcourt RL, Kyoizuka J, Floyd RB, Bateman KS, Tanaka H, Decoocq V, Llewellyn DJ, Zhu X, Peacock WJ, Dennis ES (2000). Insect- and herbicide-resistant transgenic eucalypts. *Mol. Breeding* 6: 307-315.

- Herold A, Lewis DH (1977). Mannose and green plants: occurrence, physiology and metabolism, and use as a tool to study the role of orthophosphate. *New Phytol.* 79: 1-40.
- Ho CK, Chang SH, Tsay JY, Tsai CJ, Chiang VI, Chen ZZ (1998). *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of *Eucalyptus camaldulensis* and production of transgenic plants. *Plant Cell Rep.* 17: 675-680.
- Hood EE, Gelvin SB, Melchers Ls, Hoekema A (1993). New *Agrobacterium* helper plasmids for gene transfer to plants. *Transg. Res.* 2: 208-218.
- Ieamkhang S, Chatchawankanphanich O (2005). Augmentin as an alternative antibiotic for growth suppression of *Agrobacterium* for tomato (*Lycopersicon esculentum*) transformation. *Plant Cell T Org. Cul.* 82: 213–220.
- Jang JC, Sheen J (1997). Sugar sensing in higher plants. *Trends Plant Sci.* 2: 208-214.
- Lilge CG, Tillmann MAA, Villela FA, Dode LB (2003). Identificação de sementes de arroz transformado geneticamente resistente ao herbicida glufosinato de amônio. *Rev. Brás. Sementes* 25: 87-94.
- Lloyd G, McCown B (1980). Micropropagation of mountain laurel, *Kalsmia latifolia*, by use of shoot tip culture. *Int. Pl. Propagators's Soc.* 30: 421-427.
- Lucca P, Ye X, Potrykus I (2001). Effective selection and regeneration of transgenic rice plants with mannose as selective agent. *Molecular Breed.* 7: 43–49
- Matsunaga E, Nanto K, Oishi M, Ebinuma H, Morishita Y, Sakurai N, Suzuki H, Shibata D, Shimada T (2012). *Agrobacterium*-mediated transformation of *Eucalyptus globulus* using explants with shoot apex with introduction of bacterial choline oxidase gene to enhance salt tolerance. *Plant Cell Rep.* 31: 225-235.
- Moralejo M, Rochange F, Boudet AM, Teulières C (1998). Generation of transgenic *Eucalyptus globulus* plantlets through *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation. *Aust. J Plant Physiol.* 25: 207-212.
- Mullins KV, Llenwellyn DJ, Hartney VJ, Strauss S, Dennis ES (1997). Regeneration and transformation of *Eucalyptus camaldulensis*. *Plant Cell Rep.* 787-791.
- Murashige T, Skoog F (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plantarum.* 15: 473-497.
- Nadolska-Orczyk A, Orczyk W (2000). Study of the factors influencing *Agrobacterium*-mediated transformation of pea (*Pisum sativum* L.). *Molec. Breed.* 6:185-194.
- Negrotto D, Jolley M, Beer S, Wenck AR, Hansen G (2000). The use of phosphomannose-isomerase as selectable marker to recover transgenic maize plants (*Zea mays* L.) via *Agrobacterium* transformation. *Plant Cell Rep.* 19: 798-803.
- Öz MT, Eydogan F, Yücel M, Öktem HA (2009). Optimized selection and regeneration conditions for *Agrobacterium*-mediated transformation of chickpea cotyledonary nodes. *Pak. J. Bot.* 41: 2043-2054.

- Pollock K, Barfield DG, Shields R (1983). The toxicity of antibiotics to plant cell cultures. *Plant Cell Rep.* 2: 36-39.
- Quisen R, Oliveira Y, Pileggi M, Cuquel F, Quoirin M (2009). Selective Agent and *A. tumefaciens* Overgrowth-control Antibiotics in *Eucalyptus camaldulensis* Cotyledonary Culture. *Brazilian Arch. Bio. Tech.* 52: 1485-1492.
- Quisen RC (2007). Transformação genética de *Eucalyptus camaldulensis* via co-cultivo com *Agrobacterium tumefaciens*. Brazil: Federal University of Paraná, PhD Thesis.
- Sartoretto LM, Saldanha CW, Corder MPM (2008). Transformação genética: estratégias e aplicações para o melhoramento genético de espécies florestais. *Cienc. Rural* 38: 861-871.
- Sartoretto ML, Saldanha CW, Corder MPM (2008). Transformação genética: estratégias e aplicações para o melhoramento genético de espécies florestais. *Cienc. Rur.* 38: 861-871.
- Schroeder HE, Schotz AH, Wardley-Richardson T, Spencer D, Higgins TJ (1993). Transformation and regeneration of two cultivars of pea (*Pisum sativum* L.) *Plant Physiol.* 101: 751-757.
- Scorza R, Cordts JM, Ramming DW, Emershad RL (1995). Transformation of grape (*Vitis vinifera* L.) zygotic-derived somatic embryos and regeneration of transgenic plants. *Plant Cell Rep.* 14: 589-592.
- Stein JC, Hasen G (1999). Mannose induces an endonuclease responsible for DNA laddering in plant cells. *Plant Physiol.* 121: 1-9.
- Studart-Guimarães C, Lacorte C, Brasileiro ACM (2003). Transformação genética em espécies florestais. *Cienc. Florest.* 13: 167-178.
- Tournier V, Grat S, Marque C, El Kayal W, Penchel R, Andrade GD, Boudet AM, Teulières C (2003). An efficient procedure to stably introduce genes into an economically important pulp tree (*Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*). *Transgenic Res.* 12: 403-411.
- Vieira JGZ, Faria RT, Vieira LGE, Molinari HBC (2005). Transformação genética de citrumelo Swingle (*Citrus paradisi* Macf. x *Poncirus trifoliata* L. Raf.) com o gene marcador fosfomanose isomerase (*pmi*). *Acta Sci. Agron.* 27: 41-547.
- Watanabe KN, Raman KV (1997). Plant biotechnology and plant genetic resources: a global perspective. In: *Plant biotechnology and plant genetic resources for sustainability and productivity*. Ed. Academic Press: 1 – 13.
- Wilmink A, Dons JJM (1993). Selective agents and marker genes for use in transformation in monocotyledonous plants. *Plant Mol. Bio. Rep.* 11: 165-185.
- Zhengquan H, Yaping F, Huamin S, Guocheng H, Shihong Z, Yonghong Y, Zongxiu S (2004). Phosphomannose-isomerase (*pmi*) gene as a selectable marker for rice transformation via *Agrobacterium*. *Plant Sci.* 166: 17-22

5 CONCLUSÕES GERAIS

Com base nos resultados obtidos pode-se concluir que o melhor meio de cultura, dentre os testados, foi o WPM adicionado de 0,25 μM de TDZ e 0,1 μM de ANA por 30 dias e, em seguida, 5,0 μM de BAP e de 0,5 μM de ANA por outros 30 dias. Obteve-se uma regeneração considerada eficiente para espécies recalcitrantes.

Neste trabalho, identificaram-se as concentrações adequadas para iniciar a seleção de tecidos transformados e as concentrações letais de três agentes seletivos em explantes foliares não transformados, as quais podem auxiliar em futuros trabalhos. Com relação ao estudo dos três agentes de seleção é possível considerar que a manose/pmi é um sistema promissor para a seleção de células transformadas, visto que em algumas espécies aumenta a eficiência e a frequência da transformação. Além disso, não há a inserção de genes de seleção a antibióticos e herbicidas que sofrem barreiras de importação em diversos países.

Ainda com relação aos diferentes genes de seleção utilizados durante a transformação genética, observou-se uma melhor resposta de regeneração em tecidos transformados com o gene *nptII* quando comparados aos transformados com o gene *bar*.

O protocolo de transformação genética de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* ainda pode ser melhorado, no entanto, os resultados mostrados aqui parecem promissores, já que há brotações regenerando em meio de cultura com agente seletivo.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho é o início do processo do estabelecimento do protocolo completo de transformação genética do clone 3336 de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*.

O protocolo de regeneração é essencial para o processo de transformação genética e deve ser adaptado para cada genótipo, por isso a importância deste trabalho. O protocolo aqui obtido ainda pode ser melhorado, alterando outros fatores que não foram tratados neste trabalho, como as concentrações dos reguladores vegetais do meio de cultura de regeneração de gemas, o tempo de cultivo, a iluminação e a temperatura, entre outros fatores.

Com relação aos agentes de seleção de plantas transformadas, são necessários testes com explantes após o processo de transformação, para afirmar que as concentrações aqui encontradas selecionem somente plantas transformadas. Os resultados aqui obtidos auxiliam na busca por concentrações adequadas dos agentes de seleção, já que mostram um pequeno intervalo de concentrações.

Quanto à transformação genética, os trabalhos continuam sendo realizados em busca de uma planta transformada com gene de resistência a estresse abiótico. Atualmente, as gemas e brotações transformadas estão em meio seletivo para em seguida passarem por testes com PCR e Southern Blot e, posteriormente, testes em casa de vegetação.

ANEXOS

ANEXO 1 – Composição iônica dos meios de cultura.

Macronutrientes (mM)	MS	JADS	WPM	QL
NH ₄ ⁺	20,61	4,0	4,94	5,0
NO ₃ ⁻	39,4	22,0	9,64	33,0
K ⁺	20,04	11,0	12,61	19,8
Ca ⁺²	2,99	5,0	3,00	5,10
Mg ⁺²	1,50	3,0	1,50	1,5
SO ₄ ⁼	1,76	3,29	7,44	1,64
PO ₄ ⁼	1,25	3,0	1,25	2,0
Micronutrientes (μM)				
Mn ⁺²	132	70	132	5,0
Zn ⁺²	29	15	30	34
Na ⁺²	224	402	224	202
Fe ⁺²	110	200	110	100
Cl ⁻	6000	702	1310	0,2
Co ⁺²	0,105	1	---	100
Cu ⁺²	0,100	5	100	100
MoO ₄ ⁼	1030	0,6	1030	1000
B ⁺³	100	50	5000	5000
NH ₄ ⁺ / NO ₃ ⁻ (mM)	0,52	0,51	0,51	0,15
Total de íons (mM)	94,25	52,03	42,39	68,58

ANEXO 2 - Composição do meio de cultura LB para crescimento bacteriano

Componente	Concentração (g L ⁻¹)
Extrato de levedura	5
Triptona	10
NaCl	10
Ágar	16
pH	7,5