

**GIOVANA BOMFIM DE ALCANTARA**

**TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* COM O GENE *gfp* SOB CONTROLE DE PROMOTORES *CBFS* INDUZIDOS PELO FRIO**

Tese 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 a obtenção do grau de Doutor em Ciências.

**Orientadora: Profa. Dra. Marguerite Quoirin**

**Co-orientador: Prof. Dr. João Carlos Bespalhok Filho**

**CURITIBA**

**2008**



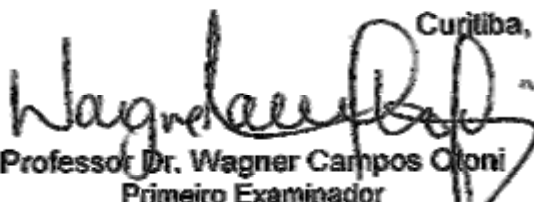
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA E FITOSSANITARISMO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA  
PRODUÇÃO VEGETAL


## PARECER


Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal, reuniram-se para realizar a arguição da Tese de DOUTORADO, apresentada pela candidata GIOVANA BOMFIM DE ALCANTARA, sob o título "TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* COM O GENE *gfp* SOB CONTROLE DE PROMOTORES *cbfs* INDUZIDOS PELO FRIO", para obtenção do grau de Doutor em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná.

Após haver analisado o referido trabalho e argüido a candidata são de parecer pela "APROVAÇÃO" da Tese.

Curitiba, 29 de Agosto de 2008.

  
Professor Dr. Wagner Campos Ottoni  
Primeiro Examinador

  
Professor Dr. Marcos Pileggi  
Segundo Examinador

  
Professor Dr. Cícero Deschamps  
Terceiro Examinador

  
Professor Dr. João Carlos Bessalho Filho  
Quarto Examinador

  
Professora Dra. Marguerite Germaine Ghislaine Quoirin  
Presidente da Banca e Orientadora

A meus pais, Cleri, pura dedicação e generosidade e Roldão, alegria e felicidade.

Ao Ricardo, meu esposo, luz em minha vida, amor, paciência e compreensão em mais esta etapa.

Dedicatória.....

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por me mostrar o caminho em mais esta etapa e por estar sempre presente.

À Universidade Federal do Paraná, pela possibilidade de realizar o doutorado.

À professora Dra. Marguerite Quoirin, pela orientação, oportunidade e confiança.

Ao professor, João Carlos Bernaldo Filho, pela co-orientação e importantes sugestões.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa sanduíche.

Ao Égide, Centro francês de auxílio a estudantes estrangeiros, pelo auxílio prestado.

Aos colegas de laboratório que se tornaram acima de tudo grandes amigos, Justina, Daniela, Yohana, Liege, André, Roberson e Regina, que além de grande amiga me ensinou muito no início do trabalho no laboratório.

Aos demais colegas do Doutorado.

Ao grupo de estudo Respostas Adaptativas ao frio da Universidade Paul Sabatier, Toulouse, França, em especial a pesquisadora chefe Chantal Teulière, pela orientação.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Agronomia – Produção Vegetal pelo apoio.

À banca de pré-defesa: Profa. Dra. Marguerite Quoirin, Prof. Dr. João Carlos Bernaldo Filho, Prof. Dr. Cícero Deschamps, e ao aluno de doutorado André Luiz, pelas valiosas sugestões.

Aos professores integrantes da banca de defesa: Dr. Wagner Otoni, Dr. Marcos Pileggi, Dra. Marguerite Quoirin, Dr. João Carlos Bernaldo Filho e Dr. Cícero Deschamps pelas importantes contribuições.

Aos colegas de laboratório na França, Gilles, Julie e principalmente Marie, pelos auxílios e contribuições prestadas.

Aos amigos que durante curto, mais intenso período estiveram tão presentes, Cláudia, Ricardo, Justine, Felipe e André.



## BIOGRAFIA DO AUTOR

GIOVANA BOMFIM DE ALCANTARA, filha de Roldão e Cleri Bomfim de Alcantara, nasceu em Curitiba, Estado do Paraná. Ingressou na Universidade Federal do Paraná, no curso de Ciências Biológicas, no ano de 1997, na qual recebeu o grau de Licenciatura e Bacharel em Ciências Biológicas no ano de 2001.

Fez estágios nos Departamentos de Biologia Celular, Zoologia e Botânica da Universidade Federal do Paraná, na qual teve bolsa de iniciação científica durante dois anos. No ano de 2001 foi professora em um curso de pré-vestibular, no qual lecionou aulas de Botânica e Ecologia. Em 2002 trabalhou com um projeto de propagação vegetativa de *Pinus taeda*. Fez o Mestrado em Botânica na área de Fisiologia Vegetal, na Universidade Federal do Paraná, entre o período de março de 2003 a dezembro de 2004.

Em março de 2005 iniciou o curso de Doutorado em Agronomia, no Programa de Pós Graduação em Produção Vegetal, no Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo da Universidade Federal do Paraná. Entre o período de abril de 2005 a dezembro de 2006, lecionou aulas como professora substituta nesta mesma instituição, nas disciplinas de Botânica Estrutural, para os Cursos de Agronomia e Zootecnia. No ano de 2007 fez um estágio de Doutorado Sanduíche no Laboratório de Superfície Celular e Sinalização dos Vegetais, Pólo de Biotecnologia Vegetal da Universidade Paul Sabatier, Toulouse, França.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	1
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	3
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	5
<b>LISTA DE ANEXOS</b> .....	7
<b>RESUMO GERAL</b> .....	9
<b>ABSTRACT</b> .....	10
<b>1 INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	11
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	13
2.1 O GÊNERO <i>Eucalyptus</i> .....	13
2.2 O HÍBRIDO <i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i> .....	14
2.3 ORGANOGÊNESE EM TECIDOS DE <i>Eucalyptus</i> spp. ....	15
2.4 TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA NO MELHORAMENTO DE <i>Eucalyptus</i> spp. ....	18
2.4.1 Transformação genética em <i>Eucalyptus</i> spp. ....	20
2.4.2 Fatores que influenciam a transformação genética via <i>A. tumefaciens</i> .....	21
2.4.2.1 Efeito da acetosiringona .....	21
2.4.2.2 Pré-cultura dos explantes .....	22
2.4.2.3 Co-cultura dos explantes .....	22
2.4.2.4 Cepas de <i>A. tumefaciens</i> .....	23
2.5 PROMOTORES INDUZIDOS PELO ESTRESSE NA TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA .....	23
2.6 ESTRESSE PELO FRIO E RESPOSTAS AOS ESTRESSES ABIÓTICOS .....	25
2.7 REFERÊNCIAS .....	30
<b>3 REGENERAÇÃO DE GEMAS A PARTIR DE EXPLANTES FOLIARES DO HÍBRIDO <i>Eucalyptus grandis</i> x <i>Eucalyptus urophylla</i></b> .....	41
<b>RESUMO</b> .....	41
<b>ABSTRACT</b> .....	42
3.1 INTRODUÇÃO .....	43
3.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	45
3.2.1 Material vegetal .....	45
3.2.2 Condições de cultura <i>in vitro</i> .....	45
3.2.3 Organogênese a partir de explantes foliares .....	46
3.2.3.1 Duração da subcultura em meio de multiplicação .....	46

3.2.3.2	Efeito do tipo de explante foliar .....	46
3.2.3.3	Duração da subcultura em meio BIT .....	47
3.2.3.4	Avaliações.....	47
3.2.3.5	Delineamento experimental e análise estatística .....	47
3.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	49
3.3.1	Descrição da organogênese a partir de explantes foliares .....	49
3.3.2	Efeito da duração da subcultura em meio de multiplicação.....	50
3.3.3	Efeito do tipo de explante foliar .....	53
3.3.4	Efeito da duração da subcultura em meio BIT .....	55
3.4	CONCLUSÕES.....	59
3.5	REFERÊNCIAS .....	60
<b>4</b>	<b>OTIMIZAÇÃO DA TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA EM <i>Eucalyptus grandis</i> x <i>Eucalyptus urophylla</i> VIA <i>Agrobacterium tumefaciens</i>.....</b>	<b>63</b>
	<b>RESUMO .....</b>	<b>63</b>
	<b>ABSTRACT .....</b>	<b>64</b>
4.1	INTRODUÇÃO.....	65
4.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	67
4.2.1	Material vegetal .....	67
4.2.2	Condições de cultura <i>in vitro</i> .....	67
4.2.3	Cepas de <i>A. tumefaciens</i> com diferentes construções gênicas.....	68
4.2.4	Crescimento bacteriano.....	68
4.2.5	Condições de inoculação dos explantes .....	69
4.2.6	Condições da pré-cultura dos explantes .....	69
4.2.7	Condições da co-cultura dos explantes .....	70
4.2.8	Acetosiringona (AS).....	70
4.2.9	Ensaio histoquímico da $\beta$ -glucuronidase .....	70
4.2.10	Desenho experimental e avaliação .....	71
4.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	72
4.3.1	Cepas de <i>A. tumefaciens</i> com diferentes construções gênicas.....	74
4.3.2	Efeito da pré-cultura dos explantes .....	76
4.3.3	Efeito da co-cultura dos explantes .....	78
4.3.4	Efeito da acetosiringona .....	80
4.4	CONCLUSÕES.....	83
4.5	REFERÊNCIAS .....	84

<b>5</b>	<b>TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE <i>Eucalyptus grandis</i> x <i>Eucalyptus urophylla</i> COM O GENE <i>gfp</i> SOB REGULAÇÃO DO PROMOTOR <i>cbf1a</i> OU <i>cbf1b</i> INDUZIDOS PELO FRIO.....</b>	<b>88</b>
	<b>RESUMO .....</b>	<b>88</b>
	<b>ABSTRACT .....</b>	<b>89</b>
5.1	INTRODUÇÃO.....	90
5.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	92
5.2.1	Material vegetal .....	92
5.2.2	Condições de cultura <i>in vitro</i> .....	92
5.2.3	Cepas de <i>A. tumefaciens</i> .....	93
5.2.4	Manutenção e crescimento da bactéria .....	94
5.2.5	Condições de inoculação e cultura dos explantes.....	94
5.2.6	Avaliação .....	96
5.2.7	Delineamento experimental.....	96
5.2.8	Expressão da GFP após tratamento com frio.....	96
5.2.8.1	Delineamento experimental.....	97
5.2.8.2	Avaliação .....	97
5.2.9	Análises moleculares.....	97
5.2.9.1	Extração de DNA e PCRs .....	97
5.2.9.2	RT-PCR em tempo real .....	101
5.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	103
5.3.1	Transformação genética.....	103
5.3.2	Expressão do gene <i>gfp</i> .....	107
5.3.3	Análises moleculares.....	111
5.3.3.1	PCR.....	111
5.3.3.2	RT-PCR em tempo real .....	113
5.4	CONCLUSÕES.....	115
5.5	REFERÊNCIAS .....	116
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES GERAIS .....</b>	<b>121</b>
<b>7</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>122</b>
	<b>ANEXOS.....</b>	<b>123</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
18S	Subunidade ribossômica
A2	Meio de co-cultura sólido (TOURNIER <i>et al.</i> , 2003)
ABA	Ácido abscísico
ANA	Ácido naftalenoacético
AS	Acetosiringona
BAP	6-benzilaminopurina
BIP	Meio de reativação celular (TOURNIER <i>et al.</i> , 2003)
BIT	Meio de indução de gemas (TOURNIER <i>et al.</i> , 2003)
C	Meio de co-cultura líquido (TOURNIER <i>et al.</i> , 2003)
<i>cad</i>	Gene que codifica álcool cinamil desidrogenase
CaMV	Vírus do mosaico da couve-flor
<i>cbf</i>	“C-repeat-binding factor”
<i>cor</i>	Gene regulado pelo frio
Ct	Número de ciclos para atingir um nível de transcritos
DAP	Diâmetro do tronco à altura do peito
DO	Densidade ótica
DNA	Ácido desoxirribonucléico
cDNA	Cadeia de DNA complementar a sequência do mRNA
dNTP	Desoxinucleotídeo trifosfato
<i>dreb</i>	Gene “dehydration-responsive element-binding protein”
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético
fmol	Femto mol = $10^{-15}$ mol
fw	“Primer forward”
GUS	Enzima $\beta$ -glucuronidase
HSP	Proteínas de choque térmico
ICE	Fator de transcrição indutor da expressão do <i>cbf</i>
<i>kin</i>	Gene induzido pelo frio
Km	Canamicina
LB	Meio de cultura para crescimento bacteriano, “Luria-Bertani”
LEA	Proteínas “late embryogenesis abundant”
<i>lti</i>	Gene induzido por baixa temperatura
M	Meio de cultura para multiplicação (TOURNIER <i>et al.</i> , 2003)

mRNA	RNA mensageiro
MS	Meio de cultura de Murashige e Skoog (1962)
MYA	Meio para crescimento bacteriano (TEPFER; CASSE-DELBART, 1987)
<i>nos</i>	Gene da nopalina sintetase
<i>nptII</i>	Gene da neomicina fosfotransferase II
pb	Pares de base
P5CS	? <sup>1</sup> -pirrolina-5-carboxilato sintetase
PCR	Reação de polimerase em cadeia
PVP	Polivinilpirrolidona
Reg	Regenerante
Rev	Primer reverse
Rif	Rifampicina
rpm	Rotações por minuto
RNA	Acido ribonucléico
RNAi	RNA interferência
rRNA	RNA ribossômico
RT-PCR	Reação da polimerase em cadeia mediada pela transcriptase reversa
SDM	Meio de desenvolvimento de gemas (TOURNIER <i>et al.</i> , 2003)
TAE	Tris-acetato-EDTA
Taq	DNA polimerase termoestável proveniente da bactéria <i>Thermus aquaticus</i>
T-DNA	DNA de transferência
TDZ	Thidiazuron
Tub	Tubulina
UV	Ultravioleta
<i>uidA</i>	Gene codificante da enzima $\beta$ -glucuronidase
Vir	Região de virulência
YEB	Meio de cultura para crescimento bacteriano, "Yeast Extract Broth" (MILLER, 1972).

## LISTA DE TABELAS

TABELA 01 - Calogênese em explantes foliares dos clones 11 e 827 de <i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i> , em função da duração da subcultura em meio de multiplicação, com avaliação após 30 dias de cultivo.....	50
TABELA 02 - Calogênese e regeneração de gemas em explantes foliares dos clones 11 e 827 de <i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i> , em função da duração da subcultura em meio de multiplicação, com avaliação após 90 dias de cultivo.....	51
TABELA 03 - Calogênese em explantes foliares dos clones 11 e 827 de <i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i> , em função do tipo de explante (parte basal, apical ou folha inteira), com avaliação após 30 dias de cultivo.....	54
TABELA 04 - Calogênese e regeneração de gemas em explantes foliares dos clones 11 e 827 de <i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i> , em função do tipo de explante foliar (basal, apical e folha inteira), com avaliação após 90 dias de cultivo.....	55
TABELA 05 - Calogênese e regeneração de gemas em explantes foliares dos clones 11 e 827 de <i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i> em função da duração da subcultura em meio BIT (5, 10 e 14 dias), com avaliação após 30 dias de cultivo.....	56
TABELA 06 - Calogênese e regeneração de gemas em explantes foliares dos clones 11 e 827 de <i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i> , em função do período (5, 10 e 14 dias) de permanência dos explantes sem repicagem em meio BIT, com avaliação após 90 dias de cultivo.....	57
TABELA 07 - Área foliar com expressão GUS em explantes de <i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i> , após 5 e 12 dias da inoculação com diferentes cepas e construções gênicas de <i>A. tumefaciens</i> .....	76
TABELA 08 - Área foliar com expressão GUS em explantes de <i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i> , após 5 e 12 dias da inoculação com <i>A. tumefaciens</i> , cepa AGL1, em função da ausência de pré-cultura, 1 e 2 dias de pré-cultura.....	78
TABELA 09 - Área foliar com expressão GUS em explantes de <i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i> , após 5 e 12 dias da inoculação com <i>A. tumefaciens</i> , cepa AGL1, em função da ausência de co-cultura, 3 e 5 dias de co-cultura.....	80
TABELA 10 - Área foliar com expressão GUS em explantes de <i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i> , após 5 e 12 dias da inoculação com <i>A. tumefaciens</i> , cepa AGL1, em função da presença ou não da acetosiringona no pré e co-cultivo.....	81

TABELA 11 - Sequências de primers utilizados nas reações de PCR de <i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i> .....	99
TABELA 12 - Ensaio de PCR realizados utilizando explantes transformados de <i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i> , testando diferentes construções, produtos, temperaturas de hibridização e primers.....	100
TABELA 13 - Resumo dos resultados obtidos na transformação genética de explantes foliares de <i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i> , com as construções promotor <i>cbf1a</i> e promotor <i>cbf1b</i> e com o tratamento controle.....	104
TABELA 14 - Porcentagem de calos e gemas formados, número de gemas por explante e porcentagem de oxidação em explantes foliares de <i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i> após a inoculação com <i>A. tumefaciens</i> , com a construção contendo o promotor <i>cbf1a</i> e <i>cbf1b</i> e o tratamento controle, com avaliação após 90 dias de cultivo.....	106
TABELA 15 - Efeito da exposição dos explantes foliares de <i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i> a 4 °C por diferentes períodos sobre a expressão do gene <i>gfp</i> , após cinco dias da inoculação com <i>A. tumefaciens</i> .....	108
TABELA 16 - Efeito da exposição de explantes foliares de <i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i> a 0 °C por 1, 2 e 3 horas sobre a expressão do gene <i>gfp</i> , após cinco dias da inoculação com <i>A. tumefaciens</i> .....	109
TABELA 17 - Nível de expressão do gene da <i>gfp</i> em tufo de gemas de <i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i> transformadas com o promotor <i>cbf1a</i> e <i>cbf1b</i> .....	114



## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 01 - Transdução de sinais em resposta ao estresse pelo frio, seca e salinidade, da percepção à expressão gênica (Adaptado de ZHANG *et al.*, 2004)..... 28
- FIGURA 02 - Explantes foliares de *E. grandis* x *E. urophylla* utilizados no ensaio 2. a) folha inteira, segmento distal e c) segmento proximal..... 47
- FIGURA 03 - Calogênese e regeneração de gemas do clone 11 de *E. grandis* x *E. urophylla*. a.1 e a.2) formação de calo, 14 dias após o isolamento; b.1 e b.2) início da formação de gemas, 30 dias em meio SDM; c.1 e c.2) desenvolvimento das gemas, 50 dias em meio SDM; d.1 e d.2) aspecto dos explantes após 90 dias de cultivo..... 49
- FIGURA 04 - Tufos de gemas de *E. grandis* x *E. urophylla*, dos quais os explantes foliares foram isolados aos 17, 26 e 35 dias após a repicagem..... 52
- FIGURA 05 - Expressão do gene *uidA* em explantes foliares de *E. grandis* x *E. urophylla*, 5 e 12 dias após a inoculação com a cepa AGL1 de *A. tumefaciens*. a e e) controles, sem inoculação com a bactéria; b e f) sem expressão; c e g) formação de pontos isolados de expressão; d e h) formação de áreas de expressão..... 72
- FIGURA 06 - Expressão transiente do gene *uidA* em explantes foliares de *E. grandis* x *E. urophylla*, 5 dias após a inoculação com a cepa AGL1 de *A. tumefaciens*. a.1 e a.2) sem expressão; b.1 e b.2) áreas de expressão de 5 a 39% da superfície da folha; c.1 e c.2) áreas de expressão de 40 a 69% da superfície da folha; d.1 e d.2) áreas de expressão de 70 a 100% da superfície da folha..... 73
- FIGURA 07 - Expressão transiente do gene *uidA* em explantes foliares de *E. grandis* x *E. urophylla*, 12 dias após a inoculação com a cepa AGL1 de *A. tumefaciens*. a.1 e a.2) sem expressão; b.1 e b.2) áreas de expressão de 5 a 39% da superfície da folha; c.1 e c.2) áreas de expressão de 40 a 69% da superfície da folha; d.1 e d.2) áreas de expressão de 70 a 100% da superfície da folha..... 74
- FIGURA 08 - Expressão do gene *uidA* em explantes foliares de *E. grandis* x *E. urophylla*, em função da cepa de *A. tumefaciens* e construção gênica, 5 e 12 dias após a inoculação com a bactéria..... 75
- FIGURA 09 - Expressão do gene *uidA* em explantes foliares de *E. grandis* x *E. urophylla*, em função da duração da pré-cultura, 5 e 12 dias após a inoculação com a *A. tumefaciens*..... 77
- FIGURA 10 - Expressão do gene *uidA* em explantes foliares de *E. grandis* x *E. urophylla*, em função da duração da co-cultura, 5 e 12 dias após a inoculação com a *A. tumefaciens*..... 79

- FIGURA 11 - Expressão do gene *uidA* em explantes foliares de *E. grandis* x *E. urophylla*, em função da adição de acetosiringona (50  $\mu$ M) na pré e co-cultura, cinco e doze dias após a inoculação com *A. tumefaciens*... 80
- FIGURA 12 - Mapa das construções do T-DNA com o plasmídeo binário pKGWFS7, utilizado na transformação genética de explantes foliares de *E. grandis* x *E. urophylla*. Ambos contêm as bordas esquerda (BE) e direita (BD), as regiões attR1 e attR2, que são os adaptadores onde irá ocorrer a recombinação e os genes *nptII*, *gfp* e *uidA*. a) Construção com o promotor *cbf1a* e b) Construção com o promotor *cbf1b*..... 93
- FIGURA 13 - Representação esquemática da sequência de cultivos dos explantes foliares de *E. grandis* x *E. urophylla*..... 95
- FIGURA 14 - Tufos de gemas de *E. grandis* x *E. urophylla* transformados com promotor *cbf1a* por meio de *A. tumefaciens* e mantidos em meio de multiplicação (Meio M)..... 98
- FIGURA 15 - Explante foliar de *E. grandis* x *E. urophylla*, cinco dias após a inoculação com *A. tumefaciens*. a) As setas indicam a expressão da GFP sob luz fluorescente verde; b) Expressão da GFP sob luz fluorescente vermelha..... 103
- FIGURA 16 - Regeneração de gemas em *E. grandis* x *E. urophylla*. a-b) Formação de calos e início da regeneração após 20 dias em meio de cultura SDM; c-d) Formação de gemas após 30 dias em meio de cultura SDM; e-f) Formação de gemas após 68 dias em SDM..... 105
- FIGURA 17 - Expressão do gene *gfp*, após a exposição ao frio de explantes foliares de *E. grandis* x *E. urophylla*, sob luz fluorescente verde, cinco dias após o contato com *A. tumefaciens*. a) Explantes transformados com o promotor *cbf1a*, 4 °C - 2 h; b) Promotor *cbf1b*, 4 °C - 2 h; c) Promotor *cbf1a*, 4 °C - 3 h; d) Promotor *cbf1b*, 4 °C - 3 h; e) Promotor *cbf1a*, 0 °C - 2 h; f) Controle negativo, sem expressão *gfp*..... 110
- FIGURA 18 - a) Tufos de gemas de *E. grandis* x *E. urophylla* utilizados no PCR; b) Produtos de PCR obtidos do DNA de *E. grandis* x *E. urophylla* com o promotor *cbf1a*, no qual 1A, 2A, 3A, 8A e 23 A são os eventos confirmados, o T+ o controle positivo, o T- o controle negativo e o Reg, não inoculado com *A. tumefaciens*..... 112
- FIGURA 19 - Produtos de PCR obtidos do DNA de *E. grandis* x *E. urophylla* transformados com o promotor *cbf1b*. 12, 17, 20, 21, 24, 26, 28, 29, 44, 48, 51 e 56B são os eventos confirmados, o T+ controle positivo, o T- o controle negativo, e o Reg, não inoculado com *A. tumefaciens*. 112

## LISTA DE ANEXOS

ANEXO 01 - Composição dos meios de cultura (TOURNIER <i>et al.</i> , 2003).....	123
ANEXO 02 - Composição dos meios de cultura para crescimento bacteriano.....	124
ANEXO 03 - Solução antioxidante (TOURNIER <i>et al.</i> , 2003).....	124
ANEXO 04 - Análise de variância para o número de explantes com calo e para o número de calos oxidados de <i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i> . Referentes a diferentes durações da subcultura (17, 26 e 35 dias) e dois clones (11 e 827), com avaliação após 30 dias de cultivo.....	125
ANEXO 05 - Análise de variância para o número de explantes com calo sem gema, com calo e com gema, número de gemas por explante e número de explantes oxidados de <i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i> . Referentes a diferentes durações da subcultura (17, 26 e 35 dias) e dois clones (11 e 827), com avaliação após 90 dias de cultivo.....	125
ANEXO 06 - Análise de variância para o número de explantes com calo e para o número de calos oxidados de <i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i> . Referentes a diferentes partes da folha (basal, apical e folha inteira) e dois clones (11 e 827), com avaliação após 30 dias de cultivo.....	126
ANEXO 07 - Análise de variância para o número de explantes com calo sem gema, com calo e com gema, número de gemas por explante e número de explantes oxidados de <i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i> . Referentes a diferentes partes da folha (basal, apical e folha inteira) e dois clones (11 e 827), com avaliação após 90 dias de cultivo.....	126
ANEXO 08 - Análise de variância para o número de explantes com calo e para o número de calos oxidados de <i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i> . Referentes aos dias que os explantes permaneceram sem repicagem em meio BIT (5, 10 e 14 dias) e dois clones (11 e 827), com avaliação após 30 dias de cultivo.....	127
ANEXO 09 - Análise de variância para o número de explantes com calo sem gema, com calo e com gema, número de gemas por explante e número de explantes oxidados de <i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i> . Referentes aos dias que os explantes permaneceram sem repicagem em meio BIT (5, 10 e 14 dias) e dois clones (11 e 827), com avaliação após 90 dias de cultivo.....	127
ANEXO 10 - Representação esquemática do sistema de construção gênica Gateway.....	128
ANEXO 11 - Protocolo utilizado para a construção gênica.....	129

ANEXO 12 - Exemplo do cálculo de RT-PCR, com base no valor de Ct, utilizando o método $2^{-Ct}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).....	132
ANEXO 13 - Resultados dos ensaios de PCR com explantes de <i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i> .....	133

## RESUMO GERAL

O híbrido *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* tem se destacado em plantios, principalmente no Brasil, devido às propriedades da sua madeira, habilidade de enraizamento e resistência ao cancro, resultando em alta produtividade e grande potencial para indústrias de papel, celulose e fibras. Programas de melhoramento genético têm propiciado avanços na produtividade florestal, redução de custos e melhorias na qualidade dos produtos. Porém, existem novas tecnologias que permitem potencializar ainda mais estes ganhos obtidos nos programas de melhoramento genético. A técnica de transformação genética pode contribuir com a introdução de caracteres de interesse econômico, que possibilitam o aumento na produtividade, melhora na qualidade da madeira e resistência ao estresse. Para o desenvolvimento de um sistema de transformação genética de plantas, além do entendimento de fatores relacionados com o processo de transformação, é fundamental um sistema de regeneração *in vitro* eficiente. Neste sentido, o presente trabalho teve como objetivo geral a transformação genética de explantes foliares de *E. grandis* x *E. urophylla* via *Agrobacterium tumefaciens*, com o gene *gfp* sob controle dos promotores *cbf1a* e *cbf1b*. O trabalho foi dividido em três etapas. A primeira parte visou o estudo de alguns fatores que influenciam a regeneração de explantes foliares. O clone 11 apresentou capacidade regenerativa superior à do clone 827. A regeneração foi superior nos explantes foliares coletados de brotações repicadas a cada 17 dias em comparação com as repicadas a cada 26 ou 35 dias, com a utilização da parte basal da folha e com o aumento da frequência de repicagem dos explantes foliares em meio BIT. Na segunda parte foram analisados alguns fatores para otimização da transformação genética em *E. grandis* x *E. urophylla*. As condições que mostraram-se mais eficientes na transformação genética foram dois dias de pré-cultura, três dias de co-cultura e a adição da acetosiringona (50 µM) nos meios de pré e co-cultura. A terceira etapa teve como objetivo a introdução do gene *gfp* sob regulação dos promotores *cbf1a* ou *cbf1b* e a verificação de qual o melhor tempo de exposição dos explantes transformados a temperaturas baixas, visando à indução dos promotores estresse-induzidos *cbf1a* ou *cbf1b*. Para isto foram testados diferentes tempos de exposição dos explantes a 0 e 4 °C. A comprovação da expressão do gene da *gfp* sob regulação dos promotores *cbf1a* ou *cbf1b* induzidos pelo frio foi realizada por meio da técnica de RT-PCR em tempo real.

**Palavras-chave:** espécie florestal, cultura de tecidos, planta transgênica, *gfp*, promotor *cbf1a*, promotor *cbf1b*.

## GENETIC TRANSFORMATION OF *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* HYBRID WITH *gfp* GENE UNDER CONTROL OF COLD INDUCED *cbfs* PROMOTORS

### ABSTRACT

*Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* hybrid has been largely used in planting, specially in Brazil, due to its wood proprieties, rooting habilities and tumor resistance that result in high levels of productivity and of performance for paper, cellulose and fibers industries. Breeding programs propiciated some advance in reforestation, reducing costs and guaranteeing the quality of the products. New technologies can potencialize gains of these programs. Genetic transformation techniques contribute to introduce genes that promote economic profits like more productivity and quality of wood or stress tolerance. Understanding the process and creating an efficient *in vitro* regeneration system are necessary steps to improve genetic transformation. This study aims at stablishing genetic transformation of leaf explants of *E. grandis* x *E. urophylla* via of *Agrobacterium tumefaciens*, with the *gfp* gene under control of promoters *cbf1a* and *cbf1b*. It consisted of three stages. First some characteristics that affect explants regeneration were studied. The clone 11 presented a higher regenerative capacity than 827. The regeneration was superior with leaf explants collected from shoots transferred each 17 days, compared with the shoots transferred each 26 or 35 days, by using basal section of the leaf and the increase of the frequency of transfer of the leaf explants on BIT medium. The second part some elements of otimization of *E. grandis* x *E. urophylla* genetic transformation were analyzed. The most efficient conditions during genetic transformation were two days of pre-culture and three days of co-culture and the use of acetosyringone (50 µM) in pre and co-culture media. Finally, *gfp* gene was introduced under *cbf1* or *cbf1b* regulation in order to verify the most indicated duration of explants exposition at low temperatures and induce *cbf1a* ou *cbf1b* stress-induced promoters. Different intervals of time exposition at 0 °C and 4 °C were tested. *gfp* gene expression under *cbf1a* or *cbf1b* induced by cold was demonstrated by RT-PCR technique.

**Key-words:** wood species, tissue culture, transgenic plant, *gfp*, *cbf1a* promoter, *cbf1b* promoter.

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

O eucalipto é a espécie florestal com maior área plantada no mundo, com mais de 17,8 milhões de hectares, sendo que o Brasil apresenta mais de três milhões de hectares (BRACELPA, 2007). O Estado de Minas Gerais e São Paulo lideram a produção nacional, seguido pelos Estados do Paraná, Santa Catarina, Espírito Santo e Rio Grande do Sul (FAO, 2000). O grande destaque do eucalipto na silvicultura mundial e brasileira deve-se ao seu rápido crescimento, curto período de corte, de cinco a sete anos, e a sua utilização em até três rotações sucessivas (HO *et al.*, 1998).

A grande demanda de matéria-prima, com espécies de *Eucalyptus* principalmente, para a produção de celulose, carvão vegetal e madeira sólida para serrarias, justifica o forte desenvolvimento dos plantios com algumas espécies do gênero (ALFENAS *et al.*, 2004). O híbrido *E. grandis* x *E. urophylla* tem se destacado em plantios, principalmente no Brasil, por apresentar alta produtividade e potencial para indústrias de papel, celulose e fibras.

Em função da importância econômica de algumas espécies de *Eucalyptus*, houve grande investimento em programas de melhoramento genético e no desenvolvimento de técnicas de propagação vegetativa. No entanto, existem outras técnicas que podem ser incorporadas a um programa tradicional de melhoramento genético, potencializando os ganhos obtidos, encurtando os ciclos e promovendo a geração de plantios de alta qualidade (DIOUF, 2003). Dentre estas tecnologias, destaca-se a transformação genética, visando 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; QUISEN, 2006).

Dentre os objetivos da transformação genética com espécies de *Eucalyptus*, destaca-se o aumento da tolerância ao frio, pois este se apresenta como um fator importante para a produção florestal. Muitas espécies de *Eucalyptus* sofrem danos quando expostas a temperaturas baixas, ocasionando desde a perda da área foliar até a mortalidade. A geada apresenta efeitos diretos em plantações de eucaliptos, que são observados com a queima superficial das folhas até desfolha total em plantas novas e em brotos (PALUDZYSZYN FILHO *et al.*, 2006; CARAMORI *et al.*, 2000). Sendo assim, muitos esforços têm sido direcionados ao entendimento do processo de aclimação ao frio (THOMASHOW, 2001).

A aclimação ao frio resulta de eventos integrados que ocorrem em todos os níveis de organização, desde o anatômico e morfológico até o bioquímico e molecular. O frio é traduzido a partir de uma complexa via de respostas em compostos bioquímicos e

metabólitos, gerando respostas fisiológicas ao estresse (GASPAR *et al.*, 2002; SUNG *et al.*, 2003). A indução de muitos genes em resposta ao frio inclui uma família de fatores de transcrição, os *cbfs* (C-repeat-binding factors), que já foram isolados de algumas plantas, incluindo *Eucalyptus gunnii* (EL KAYAL *et al.*, 2006) e que são bastante utilizados em estudos de resistência ao frio.

A transformação genética pode ser realizada por meio de métodos diretos e indiretos. O método indireto com o uso de *Agrobacterium tumefaciens* tem sido bastante utilizado em espécies de *Eucalyptus*. Para o desenvolvimento de um sistema adequado de transformação genética, além de um sistema eficiente de regeneração, outros fatores importantes devem ser levados em consideração, dentre os quais estão a utilização de compostos fenólicos e osmoprotetores, a pré-cultura e co-cultura dos tecidos vegetais e a cepa de *A. tumefaciens*. Além destes fatores, outros se destacam como a composição da suspensão bacteriana, o genótipo da planta e o tipo de tecido vegetal utilizado (QUOIRIN; QUISEN, 2006).

A grande maioria dos trabalhos de transformação genética se baseia na expressão constitutiva de transgenes. Contudo, o uso de promotores constitutivos causa uma expressão desnecessária do gene, ocasionando acúmulo de proteínas transgênicas e um gasto de energia dispensável. Além disso, a expressão constitutiva aumenta a possibilidade de interferência no crescimento e desenvolvimento da planta, com alterações no seu ciclo vegetativo e reprodutivo (PAOLI, 2007). Desta forma, o estudo de sistemas de expressão com promotores indutivos é de extrema importância para o avanço do desenvolvimento de plantas transgênicas. Neste sentido, existem estudos com *Arabidopsis* e alguns trabalhos com espécies de interesse agrícola, mas são escassos os estudos envolvendo espécies florestais.

O presente trabalho teve como objetivo verificar a expressão do gene *gfp*, sob controle dos promotores *cbfs* induzidos pelo frio. Para isto foram avaliados fatores que influenciam a regeneração e a transformação genética de explantes foliares, via co-cultivo com *A. tumefaciens*, em explantes foliares de *E. grandis* x *E. urophylla*.



## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 O GÊNERO *Eucalyptus*

O gênero *Eucalyptus* pertence à família Myrtaceae, existindo cerca de 700 espécies descritas, além de subespécies e híbridos naturais (BERTOLUCCI *et al.*, 1995; BROOKER, 2000). Embora existam muitas espécies de *Eucalyptus*, os plantios em larga escala dependem de poucas. 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).

O gênero possui sua origem na Austrália e regiões próximas, como Papua Nova Guiné, Timor, Indonésia e Filipinas (ELDRIDGE *et al.*, 1994). Atualmente, as espécies de *Eucalyptus* são também plantadas em regiões de clima tropical e subtropical, devido ao grande número de espécies e conseqüentemente a ampla adaptação a diferentes condições climáticas e edáficas.

Os maiores produtores mundiais de *Eucalyptus* são Índia, Brasil, Espanha, África do Sul e Portugal (FAO, 2000), com mais de 17,8 milhões de hectares plantados no mundo (BRACELPA, 2007). O Brasil é o maior produtor mundial de celulose, a partir de eucalipto, com 6,4 milhões de toneladas por ano, representando mais de 70% da produção nacional. Outro setor da indústria de eucalipto que se destaca é o da produção de carvão vegetal, com 18,8 milhões m<sup>3</sup>/ano, o que representa mais de 70% da produção nacional (SILVA, 2005).

No Brasil, a cultura é intensiva e baseada principalmente em florestas clonais formadas com materiais elite e de elevada produtividade média, chegando a atingir 45 a 60 m<sup>3</sup>/ha/ano (ALFENAS *et al.*, 2004). Dentre os Estados do Brasil com maior produtividade, estão São Paulo, Minas Gerais, seguidos do Espírito Santo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (FAO, 2000). A definição da espécie a ser plantada é a primeira etapa de um projeto de reflorestamento. Para isto devem-se levar em consideração as condições edafoclimáticas da região. Desta forma, dentre as espécies mais plantadas e que são as mais indicadas para clima úmido e quente estão *E. camaldulensis*, *E. tereticornis* e *E. urophylla*. Para clima úmido e frio, *E. globulus*, *E. grandis* e *E. saligna*. Para subúmido, *E. grandis*, *E. saligna* e *E. urophylla* (ANGELI *et al.*, 2005).

A cultura intensiva se deve em grande parte aos resultados obtidos em programas de melhoramento genético. A empresa de reflorestamento Aracruz Celulose S.A., obteve produtividade de 28 m<sup>3</sup>/ha/ano, com plantações principalmente de *E. grandis* em 1967. Este valor saltou para 45 m<sup>3</sup>/ha/ano com a identificação de procedências convenientes e a utilização de híbridos de crescimento rápido, resistentes a doenças, chegando a alcançar 70 m<sup>3</sup>/ha/ano, com a utilização do híbrido *E. grandis* x *E. urophylla* (CAMPINHOS, 1993). Além de seu rápido crescimento, o curto período de corte, de cinco a sete anos, é um fator importante que permite até três rotações sucessivas, com ciclos que podem chegar a 21 anos (HO *et al.*, 1998).

A expansão dos plantios nos últimos anos tem suprido a crescente demanda de matéria-prima para a produção de celulose e papel, carvão vegetal, óleos essenciais, madeira sólida para serraria, postes de eletricidade, mourões de cerca e para construção civil, entre outras (ALFENAS *et al.*, 2004).

## 2.2 O HÍBRIDO *E. grandis* x *E. urophylla*

A utilização de híbridos interespecíficos de *Eucalyptus* representa grande importância dentro dos programas de melhoramento genético deste gênero. A possibilidade de associar características diferenciadas em espécies importantes, bem como a manifestação de heterose, verificada nos cruzamentos entre vários pares de espécies, tem impulsionado a busca da hibridação, como um meio mais rápido de promover o melhoramento de características florestais desejáveis (ASSIS *et al.*, 1993).

Dentre os principais híbridos de *Eucalyptus*, destaca-se *E. grandis* x *E. urophylla* por apresentar alta produtividade e potencial para indústrias de papel, celulose e fibras (FERREIRA, 1992). No Brasil, este híbrido é bastante valorizado, devido principalmente às suas propriedades de madeira, habilidade de enraizamento e resistência à doenças. Este alto desempenho é consequência de uma boa interação genótipo e ambiente, sendo que clones do híbrido são intensivamente plantados no país, visando a indústria de papel e celulose (BARRUETO CID *et al.*, 1999). Segundo Assis (2000), o cruzamento entre as espécies *E. grandis* e *E. urophylla* foi o que apresentou maior crescimento e potencial na geração de indivíduos superiores para programas clonais. Este cruzamento tem apresentado o maior percentual de clones recomendados para uso comercial, devido principalmente ao seu crescimento volumétrico, constituindo a base da grande maioria dos plantios clonais para finalidades industriais no Brasil.

A espécie *E. grandis* é originária da Austrália, não é tolerante à seca, mas precipitações médias anuais de 900 mm são, geralmente, adequadas se bem distribuídas; não suporta geadas fortes, limitando o seu plantio em áreas com altas altitudes. Suas árvores são retas e fornecem excelente madeira para serraria, escoras e para a produção de celulose. Esta espécie caracteriza-se pela elevada produtividade, cerca de 73 m<sup>3</sup>/ha/ano em materiais selecionados, enquanto que *E. urophylla* é uma espécie tropical originária da Indonésia, com grande potencial para as regiões de clima quente, sendo bastante utilizada em programas de melhoramento, devido ao seu bom desenvolvimento, excelente vigor e a boa qualidade da madeira para carvão, celulose, serraria, capacidade de rebrota e principalmente resistência ao cancro (*Cryphonectria cubensis*) (ASSIS, 1996; ALFENAS *et al.*, 2004).

A hibridação entre essas espécies tem demonstrado superioridade para densidade básica da madeira, diâmetro do tronco na altura do peito (DAP), altura, viabilidade de produção de sementes, resistência ao cancro e homogeneidade na qualidade da madeira (IKEMORI, 1990). Para a produção de polpa para celulose e madeira sólida, *E. grandis*, *E. urophylla* e seus híbridos são mais favoráveis em regiões tropical e subtropical (POTTS, 2004).

### 2.3 ORGANOGÊNESE EM TECIDOS DE *Eucalyptus* spp.

Para a aplicação das técnicas de transformação genética é necessário que células de tecidos transformados regenerem plântulas que depois expressem os genes inseridos. Desta forma, o estabelecimento de um sistema eficiente de regeneração *in vitro* é fundamental no sucesso da transformação de plantas (BARRUETO CID *et al.*, 1999; McCOWN; SELLMER, 1987). 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.

A regeneração de *Eucalyptus* tem sido reportada por meio da embriogênese somática e da organogênese. Estudos de embriogênese somática foram realizados com *E. grandis* (WATT *et al.*, 1991), *E. dunnii* (TERMIGNONI *et al.*, 1996), *E. globulus* (PINTO *et al.*, 2002) e *E. tereticornis* (PRAKASH; GURUMURTHI, 2005). A organogênese tem apresentado avanços significativos com diferentes espécies: *E. urophylla* (TIBOK *et al.*, 1995), *E. grandis* (LAINÉ; DAVID, 1994), *E. camaldulensis* (MURALIDDHARAN;

MASCARENHAS, 1987; MULLINS *et al.*, 1997), *E. globulus* (SERRANO *et al.*, 1996) e *E. tereticornis* (SUBBIAH; MINOCHA, 1990).

Alguns trabalhos com o híbrido *E. grandis* x *E. urophylla* foram publicados (BARRUETO CID *et al.*, 1999; TOURNIER *et al.*, 2003; ALVES *et al.*, 2004). No entanto, a capacidade organogênica ou embriogênica é bastante reduzida após o contato com *A. tumefaciens*. Diversos são os fatores que ocasionam esta redução, dentre os quais destaca-se a utilização de meios de cultura contendo agentes seletivos (GONZÁLEZ, 2002). Uma outra causa pode estar relacionada com a utilização de antibióticos que são utilizados na eliminação da *A. tumefaciens* da cultura *in vitro*, após o período de co-cultura. Embora, estes antibióticos devam apresentar boa capacidade anti-microbiana e toxicidade seletiva, sendo tóxicos para as bactérias e não para as células dos tecidos. Nauerby *et al.*, (1997) relataram o efeito negativo dos antibióticos na regeneração dos tecidos vegetais. A cultura de tecidos muitas vezes é afetada por componentes diferentes no meio de cultura, os quais podem promover fitotoxicidade aos tecidos vegetais, reduzindo a eficiência da transformação em diversas espécies. A concentração do antibiótico requerida para a supressão da bactéria muitas vezes inibe o processo regenerativo (NAUERBY *et al.*, 1997).

A resposta organogênica pode variar de acordo com o genótipo, idade e estado fisiológico da planta matriz, composição do meio de cultura, condições da sala de crescimento, como temperatura, luminosidade e fotoperíodo, tempo de sub-cultivo e principalmente pela interação dos fatores mencionados acima (GEORGE, 1993).

Diversos tipos de explantes podem ser utilizados para a regeneração via organogênese, dentre os quais estão os discos foliares, hipocótilos, segmentos nodal e internodal. Para *E. gunnii*, foi verificada a formação de gemas por organogênese indireta a partir de discos foliares, nós e entrenós; no entanto, quando os nós foram utilizados como explantes, houve aumento na porcentagem de explantes regenerando gemas quando comparado aos outros explantes testados (HERVÉ *et al.*, 2001).

O genótipo é um dos principais fatores que interferem no potencial organogênico do tecido vegetal. Em geral, dois genótipos reagem a um mesmo estímulo de maneira diferente. Isto se dá pelas variações morfológicas, bioquímicas e fisiológicas resultantes da expressão diferenciada dos genes (SRIVASTAVA, 2001). Estudos sugerem considerável variação na regeneração dos explantes de acordo com as diferenças genéticas, ou até mesmo com a utilização de diferentes clones da mesma espécie. Em um estudo foram testados oito clones de *E. grandis*, sendo observadas diferenças no requerimento de reguladores de crescimento para o potencial organogênico dos diferentes clones testados (LAINÉ; DAVID, 1994).

A idade fisiológica e ontogenética da planta matriz apresentam influências no desenvolvimento vegetativo. Em geral, explantes provenientes de tecidos juvenis apresentam maior facilidade de expressar o potencial organogênico, quando comparados com explantes de plantas adultas. A influência destas alterações é marcante na reatividade inicial dos explantes *in vitro* e principalmente na fase de enraizamento (GREENWOOD, 1995; GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). A ausência de resposta a um regulador de crescimento é muitas vezes verificada quando explantes de plantas adultas são utilizados. Quanto maior a determinação de um explante para uma via de desenvolvimento, menor será a competência para se desdiferenciar e chegar a formar um outro tecido (BONGA; ADERKAS, 1992).

O estado fisiológico da planta matriz também exerce grande influência nas respostas organogênicas. Dentre os principais fatores relacionados estão o estado nutricional e hídrico, pois plantas bem nutridas e sem sintomas de deficiência nutricional fornecem explantes com melhor capacidade regenerativa (GEORGE, 1993).

Em geral a composição e as características físico-químicas dos meios de cultura têm sido bastante exploradas, em especial a utilização de reguladores do crescimento (GEORGE, 1993). Para as diferentes espécies de *Eucalyptus*, uma grande variedade de meios de cultura vêm sendo utilizados. No caso de *E. grandis* x *E. urophylla* foram descritos protocolos de regeneração por organogênese indireta (BARRUETO CID *et al.*, 1999; TOURNIER *et al.*, 2003; ALVES *et al.*, 2004). Para a formação de calos, diferentes tipos de explantes (hipocótilos, cotilédones e discos foliares) foram cultivados em meio MS modificado, com a metade da concentração dos sais e  $\frac{1}{4}$  de FeEDTA do MS, sendo denominado meio SP, suplementado com 2,0  $\mu\text{M}$  TDZ (BARRUETO CID *et al.*, 1999). Os explantes foram depois transferidos para meio SP com 0,5  $\mu\text{M}$  de ANA, combinado com diferentes concentrações (2,5; 5,0; 10  $\mu\text{M}$ ) de BAP ou zeatina, com a indução de brotações nas seis combinações de reguladores de crescimento testadas, com destaque para cotilédones em meio com 5,0  $\mu\text{M}$  de zeatina (BARRUETO CID *et al.*, 1999).

Em estudo com *E. grandis* x *E. urophylla* foi estabelecido um protocolo de regeneração a partir de discos foliares. Inicialmente, os discos permaneceram em meio de reativação celular (BIP) por cinco dias, posteriormente em meio de indução de brotações (BIT) e após 20 dias de cultivo inicial, foram incubados em meio de desenvolvimento das brotações (SDM), por 60 dias, com subcultivo a cada 14 dias, visando à utilização na transformação genética (TOURNIER *et al.*, 2003). No entanto, os autores relataram que a transformação genética do híbrido *E. grandis* x *E. urophylla*, visando à modificação do teor de lignina, é limitada devido à baixa capacidade de regeneração *in vitro*.

Alves *et al.* (2004) avaliaram os efeitos do TDZ e ANA na fase de indução de calos e BAP e ANA na regeneração de gemas em discos foliares de três híbridos de *E. grandis* x *E. urophylla*. As melhores respostas de calogênese para os três genótipos foram observadas nos tratamentos com TDZ (0,5 mg.L<sup>-1</sup>) e ANA (0,1 mg.L<sup>-1</sup>). Em relação à regeneração de gemas, houve variação na resposta de acordo com o clone utilizado, sendo que a melhor resposta foi obtida com 1 mg.L<sup>-1</sup> BAP, no qual 8% dos calos formados regeneraram gemas, com número médio de gemas por calo de 4,2.

#### 2.4 TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA NO MELHORAMENTO DE *Eucalyptus* spp.

No Brasil, nas décadas de 60 a 80, foi estabelecido um forte programa de incentivos fiscais para reflorestamento com *Eucalyptus*, permitindo rápida expansão nos plantios, principalmente como matéria-prima para a fabricação de papel, a partir da extração da celulose. Surgiu também a indústria de aglomerados, compensados e chapas de madeira, produtos utilizados na indústria moveleira. Porém, nos próximos anos, o crescimento das áreas plantadas tende a ser bem menor que o verificado nas últimas décadas. Desta forma, os esforços têm sido direcionados para aumentar a produtividade e a qualidade das áreas já existentes (TURNBULL, 1999; BRACELPA, 2007).

Nos últimos anos, os programas de melhoramento genético com *Eucalyptus* têm conseguido maior homogeneidade nos plantios e gerado ganho em produtividade, se comparado às plantações heterogêneas, que ocorreram com as primeiras plantações. Foram constatados ganhos em produtividade florestal e industrial, redução de custos de processos e melhorias na qualidade dos produtos. Por outro lado, existem outras tecnologias que permitem potencializar ainda mais estes ganhos obtidos nos programas de melhoramento genético tradicional (DIOUF, 2003).

Estas tecnologias englobam o campo da biotecnologia e incluem diversas técnicas, dentre as quais destacam-se a criopreservação e a conservação de germoplasma, o uso de marcadores moleculares, seleção *in vitro*, transformação genética, uso de variação somaclonal, fusão de protoplastos, culturas haplóides, dentre outras. A transformação genética apresenta-se como uma ferramenta importante em um programa de melhoramento genético, principalmente considerando as dificuldades deste programa, inerentes ao uso de espécies perenes, cujos ciclos de melhoramento são normalmente longos. Desta forma, torna-se fundamental a utilização de estratégias eficientes que promovem a geração de plantios de alta qualidade. Em espécies florestais, a transformação genética possibilita a

eliminação de etapas de um programa de melhoramento, possibilitando com isto avanços na obtenção dos resultados (DIOUF, 2003).

A transformação genética além de acelerar o processo de melhoramento, transpõe as barreiras de incompatibilidade sexual que algumas plantas apresentam, com a introdução de genes específicos em células vegetais (MORAES-FERNANDES, 1987). Entretanto, foi observado certo distanciamento entre os programas de melhoramento genético tradicional e os avanços biotecnológicos (HAINES, 1994). Contudo, com os progressos das pesquisas na área da biotecnologia, este distanciamento está se reduzindo.

A transformação genética já se apresenta como uma realidade em plantações agrícolas e poderá proporcionar um impacto ainda maior em determinadas espécies florestais, cujo objetivo final seja atender exigências específicas (TURNBULL, 1999). Nos últimos anos, alguns avanços já têm sido verificados neste sentido, o que pode ser constatado em trabalhos que visam ao aumento no crescimento, modificações nas propriedades das fibras, aumento na polimerização de celulose, modificações na biossíntese e/ou redução na quantidade de lignina, resistência a insetos e tolerância a estresses abióticos (QUOIRIN; QUISEN, 2006).

A redução na biossíntese de lignina é uma característica importante e que desperta interesse das indústrias que atuam na fabricação de papel. Neste contexto, Tournier *et al.* (2003), realizaram a transformação de *E. grandis* x *E. urophylla* com as construções anti-senso do gene *cad* (álcool cinamil desidrogenase), uma enzima chave no processo de lignificação, isolado de *E. gunnii* (GRIMA-PETTENATI *et al.*, 1993). Os autores verificaram inibição da atividade *cad* e redução na síntese de lignina, pela diminuição do monolignol, que é considerado importante modulador no processo de lignificação. Na produção de polpa de celulose para a fabricação do papel, é necessária a separação da lignina da celulose, um processo que apresenta custo elevado, consome energia e é poluente. Com a sub-regulação de genes envolvidos nas rotas metabólicas da lignificação, é possível alterar a quantidade e/ou a qualidade da lignina, facilitando o processamento da madeira e reduzindo assim o custo de produção (TOURNIER *et al.*, 2003).

Estudos que visam um melhor entendimento dos processos envolvidos no aumento da resistência a estresses abióticos, como o frio, as geadas, a seca e a salinidade, são de grande importância para muitas espécies de *Eucalyptus*. Neste sentido, Kondo *et al.* (2002) verificaram as respostas de genes relacionados ao estresse (*rd29a-dreb1a*) em *E. camaldulensis* e no híbrido *E. grandis* x *E. urophylla*. Estudos estão sendo realizados com plantas de *E. saligna* geneticamente transformadas com o gene *p5csf129a*, que codifica um mutante da enzima chave P5CS (?<sup>1</sup>-pirrolina-5-carboxilato sintetase) envolvido na síntese

do aminoácido L-prolina, cuja propriedade de aumentar a tolerância ao frio já foi confirmada em algumas espécies de plantas (DIBAX, 2007).

A transformação genética também pode ser empregada em estudos de fitorremediação, com a retirada de metais pesados pelas plantas de ambientes contaminados e a utilização em programas de recuperação ambiental. Para isto, genes de hiperacumulação podem ser inseridos em plantas que não possuem a capacidade de acumular metais pesados ou pode ocorrer a superexpressão de genes já existentes. Neste sentido, estudos foram iniciados com a transformação genética de *E. camaldulensis*, com o promotor do gene *cgmt1*. A proteína metalotioneína é codificada pelo gene *cgmt1* e atua na proteção das células quando em presença de concentrações excessivas de metais pesados (QUISEN, 2007).

#### 2.4.1 Transformação genética em *Eucalyptus* spp.

A transferência genética pode ser realizada por meio de métodos diretos e indiretos. Os métodos diretos de transferência de genes utilizam processos físicos ou químicos que causam modificações nas paredes e membranas celulares, facilitando a introdução do DNA exógeno. Já o método indireto é aquele no qual se utiliza um vetor biológico, como *A. tumefaciens*, para intermediar a transferência dos genes. 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. São relatados também a fragmentação e a recombinação do transgene, com o uso de métodos diretos (HADI *et al.*, 1996; SIEMENS; SCHIEDER, 1996). Por sua vez, a transformação por *Agrobacterium* é considerada um processo mais preciso, com integração de uma ou poucas cópias no genoma da planta (DE BLOCK, 1993).

Algumas espécies não são ou são pouco susceptíveis à infecção por *Agrobacterium*, ou os métodos indiretos interferem e causam problemas na regeneração. Para estas espécies, faz-se uso de métodos diretos de transferência. Diversos métodos diretos têm sido propostos, dentre os quais destacam-se a eletroporação de protoplastos (MORIKAWA *et al.*, 1986), o bombardeamento de partículas (SANFORD *et al.*, 1987) e o polietilenoglicol (BRADFORD, 1986).

A transformação direta tem sido relatada para algumas espécies de *Eucalyptus*, como *E. saligna* (KAWAZU *et al.*, 1990) e *E. citriodora* (MANDERS *et al.*, 1992), utilizando a técnica de eletroporação de protoplastos, e em *E. gunnii* (TEULIÈRES *et al.*, 1991), por meio



da eletroporação e polietilenoglicol. A técnica de biobalística foi utilizada com *E. globulus* (ROCHANGE, 1996; SERRANO *et al.*, 1996).

Estudos utilizando o método indireto por meio de *A. tumefaciens* são mais frequentes em *Eucalyptus* e já foram mencionados para *E. globulus* (CHRIQUI *et al.*, 1991; AZMI *et al.*, 1997; MORALEJO *et al.*, 1998); *E. grandis* (ESMERALDO *et al.*, 1997), *E. camaldulensis* (MULLINS *et al.*, 1997; HO *et al.*, 1998; VALÉRIO *et al.*, 2003); *E. gunnii* (CHRIQUI *et al.*, 1991) e *E. grandis* x *E. urophylla* (TOURNIER *et al.*, 2003; GONZALEZ *et al.*, 2002).

#### 2.4.2 Fatores que influenciam a transformação genética via *A. tumefaciens*

Além de um protocolo eficiente de regeneração *in vitro*, existem outros fatores que podem afetar o sucesso da transformação genética por meio de *A. tumefaciens*. Dentre eles, destacam-se a presença de compostos como fenólicos e osmoprotetores, a pré-cultura e co-cultura, as cepas de *A. tumefaciens* e a composição da suspensão bacteriana (QUOIRIN; QUISEN, 2006).

##### 2.4.2.1 Efeito da acetosiringona

O processo inicial de infecção da planta por *Agrobacterium* ocorre pelo reconhecimento e fixação desta ao tecido vegetal lesionado. Os genes responsáveis pela transferência do T-DNA para as células da planta estão presentes na região de virulência do plasmídeo Ti e são induzidos por compostos fenólicos liberados após o ferimento da planta. O principal indutor é um composto denominado acetosiringona (GARCÍA-RODRIGUEZ *et al.*, 2006). A adição de acetosiringona no meio de pré-cultura dos explantes antes da inoculação e/ou no meio de co-cultura com *A. tumefaciens* pode apresentar grande influência no processo de infecção, aumentando a virulência da bactéria.

Alguns autores recomendam para *E. grandis* x *E. urophylla* a utilização de acetosiringona (50 µM) em pré-cultura, adicionado ao meio de reativação celular (BIP), por dois dias e no meio de co-cultura (C), por cinco dias (TOURNIER *et al.*, 2003). Para *E. globulus* foi verificado que a concentração de acetosiringona mais eficaz depende do clone e do meio de cultura utilizados, sendo recomendado 20 ou 100 µM (VALÉRIO, 2000).

#### 2.4.2.2 Pré-cultura dos explantes

A pré-cultura é o período que antecede a inoculação da bactéria, varia de acordo com a espécie vegetal e a cepa utilizada. Alguns autores utilizam a pré-cultura pela possibilidade de aumento na eficiência da transferência de genes e formação de calos transgênicos. Já foram relatados períodos de pré-cultura variando de zero a oito dias, porém períodos de zero a cinco dias são mais comuns (QUOIRIN; QUISEN, 2006).

Para *Eucalyptus globulus* foi observado que, após quatro a seis dias de pré-cultura em meio contendo 2,4-D e BAP, o nível da expressão transiente foi superior ao observado nos explantes que não foram submetidos a pré-cultura ou que foram submetidos por oito dias (MORALEJO *et al.*, 1998). Já para *E. grandis* x *E. urophylla*, recomenda-se o uso de dois dias de pré-cultura em meio BIP, o qual é suplementado com 2,4-D e BAP (TOURNIER *et al.*, 2003). Sangwan *et al.* (1992) mostraram que a adição de auxina e citocinina na pré-cultura em *Arabidopsis thaliana* induzem a desdiferenciação celular, aumentando a frequência de transformação.

#### 2.4.2.3 Co-cultura dos explantes

A co-cultura consiste no cultivo de um explante vegetal em um meio de cultura juntamente com uma linhagem desarmada de *Agrobacterium* que contenha um vetor com os genes a serem introduzidos na planta. Durante a co-cultura, ocorre a ligação entre a bactéria e a célula vegetal no local do ferimento do explante, a indução dos genes da região *vir* e a transferência do T-DNA para o genoma vegetal (BRASILEIRO, 1998). Após o contato com a suspensão bacteriana, a co-cultura dos explantes pode ser realizada em meio de cultura sólido ou líquido, variando também sua duração, de algumas horas a muitos dias.

Para *E. camaldulensis* foi relatada co-cultura de três dias (HO *et al.*, 1998; MULLINS *et al.*, 1997). Para *E. grandis*, foi de três dias (GONZÁLEZ *et al.*, 2002). Já para *E. grandis* x *E. urophylla* o tempo relatado foi de três (GONZÁLEZ *et al.*, 2002), quatro (ESMERALDO *et al.*, 1997) e cinco dias (TOURNIER *et al.*, 2003).

#### 2.4.2.4 Cepas de *A. tumefaciens*

As cepas de *Agrobacterium* são classificadas de acordo com o tipo de opina produzida, como por exemplo, nopalina, octopina e agropina (BRASILEIRO; LACORTE, 1998). Na família da agropina estão as cepas AGL1 e EHA105; já a cepa C58C1 está incluída na família nopalina e a LBA na octopina. A escolha da cepa de *A. tumefaciens* mais adequada ao processo de transformação genética é um aspecto importante, pois irá determinar o sucesso da transformação. Em alguns casos, a eficiência do processo de transformação pode ser aumentada com o uso de cepas supervirulentas (HANSEN *et al.*, 1994).

Para *E. globulus* foram testadas quatro tipos de cepas quanto à expressão transiente do gene *uidA*, LBA 4404 pAL4404, C58C1 pMP90, EHA101 pEHA101 e AGL1 pTiBo542. As plantas transformadas com a cepa EHA101 apresentaram uma expressão quatro vezes maior que as transformadas com LBA 4404 e três vezes maior que com C58C1. Segundo os autores, as espécies florestais geralmente respondem melhor às linhagens produtoras de octopina e agropina (MORALEJO *et al.*, 1998). Em um outro estudo com *E. globulus*, as cepas C58C1, EHA101 e AGL1 apresentaram uma melhor expressão estável do gene *uidA* que a LBA 4404 (ROCHANGE, 1996).

## 2.5 PROMOTORES INDUZIDOS PELO ESTRESSE NA TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA

Um importante sistema de expressão com um promotor apropriado é um requisito para o sucesso da transformação genética. Um dos promotores mais utilizados no desenvolvimento de plantas transgênicas é o 35S do vírus do mosaico da couve-flor (CaMV) (OBERTELLO *et al.*, 2005), que exibe uma alta transcrição, na maioria dos tecidos e em uma ampla variedade de espécies de plantas. No entanto, o uso de promotores constitutivos causa uma expressão desnecessária do gene, aumentando a possibilidade de interferência em outras rotas do desenvolvimento da planta. Desta forma, o uso de promotores induzidos sob condições características, que confirmam à expressão dos genes em locais, tempo e intensidade específicos serão pré-requisitos em gerações futuras de transgênicos (PAOLI, 2007).

Alguns autores têm destacado características negativas com o uso de promotores constitutivos, dentre as quais são enfatizadas alterações fenotípicas (MATSUHARA *et al.*, 2000). Neste sentido, o uso de promotores tecido-específico ou de promotores induzidos

que expressem determinados genes em tempos e condições específicas, apresentam-se como alternativa acessível (ZUO *et al.*, 2002). Em *Arabidopsis*, a expressão constitutiva de genes *lec1* “Leafy cotyledon”, que codificam uma subunidade do complexo do fator transcricional, que atua no processo de embriogênese somática, originaram plantas com crescimento e desenvolvimento anormal e com formação ocasional de estruturas semelhantes a embriões somáticos (ZUO *et al.*, 2002). PINO *et al.* (2007) transformaram *Solanum tuberosum* utilizando um promotor constitutivo (CaMV35S) e um induzido pelo estresse, isolado do gene *rd29A*, com os genes *cbf* isolados de *Arabidopsis*. O mesmo nível de tolerância ao frio foi verificado em plantas com ambos promotores, quando expostas a poucas horas de estresse. Porém, nas plantas transgênicas, reguladas pelo promotor constitutivo, as folhas apresentaram tamanho reduzido, houve atraso no florescimento e redução e/ou falta de produção do tubérculo.

Estudos com o gene *dreb1A* (*cbf3*), sob controle do promotor CaMV35S indicaram forte expressão dos genes sob condições normais, de não estresse, assim como sob condições de seca, salinidade e baixas temperaturas (KASUGA *et al.*, 2004; GILMOUR *et al.*, 2000). Entretanto, estudo com promotor induzido pelo estresse, do gene *rd29A* foi utilizado para direcionar a expressão do gene *dreb1A* somente para condições de estresse, visando assim minimizar os efeitos negativos observados no crescimento da planta com relação ao promotor constitutivo (BEHNAM *et al.*, 2006). Melhoramento na resposta de tolerância ao estresse de plantas transgênicas e aumento no crescimento sob condições normais têm sido observados com estas construções (KASUGA *et al.*, 2004).

Genes *dreb/cbf*, ao serem expressos, têm melhorado as respostas da planta ao estresse. Entretanto, em vários momentos sob condições normais, a expressão de genes *dreb/cbf*, regulada por promotores constitutivos, tem sido associada com a redução no crescimento de algumas plantas (ITO *et al.*, 2006). Combinações de genes *dreb/cbf* com promotores induzidos por estresse possibilitam evitar a supressão no crescimento da planta sob condições normais. Neste sentido, a expressão do gene *hsdreb1a*, isolado de *Hordeum spontaneum*, sob regulação do promotor induzido por estresse, *hva1s*, não comprometeu o crescimento e desenvolvimento de *Paspalum notatum*, sob condições normais (JAMES *et al.*, 2008).

## 2.6 ESTRESSE PELO FRIO E RESPOSTAS AOS ESTRESSES ABIÓTICOS

O estresse pelo frio inclui a exposição da planta ao resfriamento, que corresponde a temperaturas que variam de zero a 15 °C, bem como a exposição ao congelamento, com temperaturas menores que zero grau. Plantas de regiões temperadas são tolerantes ao resfriamento, embora muitas não sejam tolerantes ao congelamento. Elas podem aumentar esta tolerância quando expostas previamente a temperaturas de resfriamento, processo este conhecido como aclimação ao frio. Já plantas de origem tropical ou sub-tropical são sensíveis a temperaturas de resfriamento e geralmente não possuem a capacidade de aclimação (ZHU *et al.*, 2007). Quando a temperatura é reduzida de forma lenta, algumas espécies conseguem aclimatar-se a tais condições por meio de alterações nas concentrações de solutos citoplasmáticos, prevenindo o congelamento intracelular e a morte das células (ALFENAS *et al.*, 2004).

O aumento do número de partículas de soluto (osmoprotetores), nas células das plantas, possibilita que o potencial hídrico das raízes fique menor que o potencial hídrico do solo, permitindo assim um movimento de água do solo para a planta, conservando alguns processos fisiológicos, como abertura estomática, fotossíntese e crescimento da planta (BLUM, 1996). O acúmulo de sacarose e outros açúcares simples tipicamente ocorre com a aclimação ao frio e contribui para o estabelecimento e proteção das membranas das células vegetais (LEBORGNE *et al.*, 1994).

Baixas temperaturas representam um fator limitante à produção agrícola e florestal e muitos esforços têm sido direcionados ao entendimento do processo de aclimação ao frio (THOMASHOW, 2001). No entanto, a base molecular da aclimação ainda é pouco conhecida. Estudos recentes, principalmente com *Arabidopsis*, têm sido desenvolvidos, visando ampliar o entendimento destes mecanismos (CHINNUSAMY *et al.*, 2007).

Muitas espécies de *Eucalyptus* sofrem danos quando expostas às temperaturas baixas, principalmente quando próximas ou abaixo de 0 °C, ocasionando desde a perda da área foliar até a mortalidade. Quanto mais jovem a planta maior o dano nas folhas, caules e ramos frente às geadas. Isto se deve ao fato das plantas jovens serem mais sensíveis, devido a sua menor lignificação e também devido a uma maior proximidade ao solo, onde a inversão térmica é mais pronunciada. A geada apresenta efeitos diretos em plantações de eucaliptos, que são observados com a queima superficial das folhas até desfolha total em plantas novas e em brotos (PALUDZYSZYN FILHO *et al.*, 2006; CARAMORI *et al.*, 2000). No Brasil, geadas são observadas na região Sul, Sudeste e Centro-Oeste do país (MOLION *et al.*, 1981).

As injúrias por geadas variam de acordo com a temperatura, tempo de exposição, órgão afetado, espécie cultivada e estágio fenológico (ALFENAS *et al.*, 2004). Como existe ampla variedade de espécies de *Eucalyptus*, originárias de muitas procedências, algumas são recomendadas para plantios em regiões de invernos e geadas rigorosas, outras são bastante sensíveis à temperaturas baixas. Dentre as espécies recomendadas para plantios em regiões frias, destacam-se *E. viminalis*, *E. dunnii* e *E. gunnii*. Já *E. saligna* e *E. urophylla* apresentam bastante sensibilidade à geadas e a invernos severos (AMBIENTE BRASIL, 2008).

Híbridos interespecíficos de várias combinações, incluindo *E. camaldulensis*, *E. grandis*, *E. tereticornis* e *E. urophylla* têm sido recomendados e plantados em áreas subtropicais; entretanto, em áreas onde ocorrem geadas é necessário se pensar no uso de outros híbridos, como o *E. nitens* x *E. globulus* (TURNBULL, 1999). Uma outra estratégia para aumentar a disponibilidade de espécies para plantios em regiões frias se dá com a utilização de espécies resistentes ao frio. Neste sentido, os estudos que visam um melhor entendimento dos processos envolvidos no aumento da tolerância aos estresses abióticos, como o frio e as geadas, são de grande importância a muitas espécies de *Eucalyptus*.

A aclimação ao estresse ambiental resulta de eventos integrados que ocorrem em todos os níveis de organização, desde o anatômico e morfológico até o bioquímico e molecular. O estresse abiótico é traduzido, a partir de uma complexa via de respostas, em compostos bioquímicos e metabólitos, gerando respostas fisiológicas ao estresse. Inicialmente ocorre a percepção do estresse, o qual desencadeia uma série de eventos moleculares para culminar nos níveis de respostas metabólicas, fisiológicas e de desenvolvimento (GASPAR *et al.*, 2002; SUNG *et al.*, 2003).

Existem diversas estratégias que podem ser utilizadas para aumentar a tolerância ao estresse abiótico. No entanto, muitos genes, proteínas e etapas das rotas metabólicas ainda não são conhecidos. De uma forma geral, a expressão gênica induzida pelo estresse pode ser classificada em dois grandes grupos. No primeiro grupo estão os genes que codificam proteínas que protegem a planta contra os estresses ambientais e que são denominadas de proteínas funcionais. No segundo, estão os genes que regulam a expressão gênica e a tradução de sinais em resposta ao estresse abiótico (YAMAGUCHI-SHINOZAKI; SHINOZAKI, 2005).

As proteínas expressas são denominadas regulatórias (SHINOZAKI; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2000), dentre as quais destacam-se as proteínas LEA ("Late embryogenesis abundant"), proteínas de choque térmico e enzimas envolvidas na biossíntese de osmoprotetores, tais como prolina, glicina, betaína e açúcar (THOMASHOW, 1999). As

proteínas LEA, localizadas no citoplasma de uma ampla variedade de plantas, são predominantemente hidrofílicas e possivelmente estejam relacionadas com a proteção das estruturas celulares, atuando no sequestro de íons, proteção da membrana e retenção de água. Existem pelo menos seis subgrupos de LEA, baseados nas sequências de aminoácidos e na sua expressão (ZHU *et al.*, 1997).

As proteínas de choque térmico (HSP - Heat-Shock Proteins) foram inicialmente identificadas como resposta ao estresse pelo calor. No entanto, posteriormente foram encontradas relacionadas a outros estresses abióticos, incluindo o frio. As HSP são altamente conservadas e parecem estar envolvidas em rotas de dobramento de proteínas, de eucariotos e procariotos. As HSP ligam-se às regiões não dobradas das cadeias peptídicas e mantêm a correta estrutura terciária de algumas proteínas (DEY; HARBORNE, 1997). As HSP são produzidas em condições normais pelas células vegetais, porém em situações de estresse ocorre aumento na produção das mesmas, provavelmente devido ao fato de que um aumento na síntese de HSP ajuda a proteger algumas proteínas contra a desnaturação e agregação durante o estresse (DHARIWAL *et al.*, 1998).

No segundo grupo estão os fatores de transcrição que desempenham papel fundamental na resposta da planta ao estresse. Em geral, diversos genes são induzidos por vários tipos de estresses, como o frio, a seca e a salinidade, havendo comunicação cruzada entre as vias de sinalização, com uma interação entre os diferentes elementos envolvidos na expressão gênica (GASPAR *et al.*, 2002; SHINOZAKI *et al.*, 2003).

Vias de transdução de sinais já foram descritas, com relação ao estresse por baixas temperaturas. De uma forma geral, existem duas vias principais, uma dependente do ácido abscísico (ABA) e a outra independente (SHINOZAKI *et al.*, 2003; ZHANG *et al.*, 2004) (Figura 01). A via ABA-dependente pode ser subdividida em duas subvias: uma delas requer a síntese de proteínas MYC/MYB para ativação dos fatores de transcrição e a outra a síntese de proteínas bZIP, Zn finger, CBF4, que se ligam a regiões do DNA, como os ABREs (“ABA – responsive elements”) e acionam a expressão gênica (ZHANG *et al.*, 2004).

A indução de muitos genes em resposta ao frio pela via ABA não dependente, inclui uma família de fatores de transcrição, os CBFs (“C - repeat-binding factors”), também conhecidos como DREBs (“dehydration-responsive element-binding protein”). Estas proteínas se ligam a um elemento regulatório conhecido como CRT/DRE (“C-repeat DNA regulatory element”). Estes elementos regulatórios estão presentes em promotores de genes induzidos pelo frio, tais como *cor* (“cold-regulated”), *kin* (“cold-induced”) e *lfi* (“low-temperature-induced”) e possuem uma sequência conservada GCCGAC, identificada como elemento em *cis* (ZHU *et al.*, 2007).

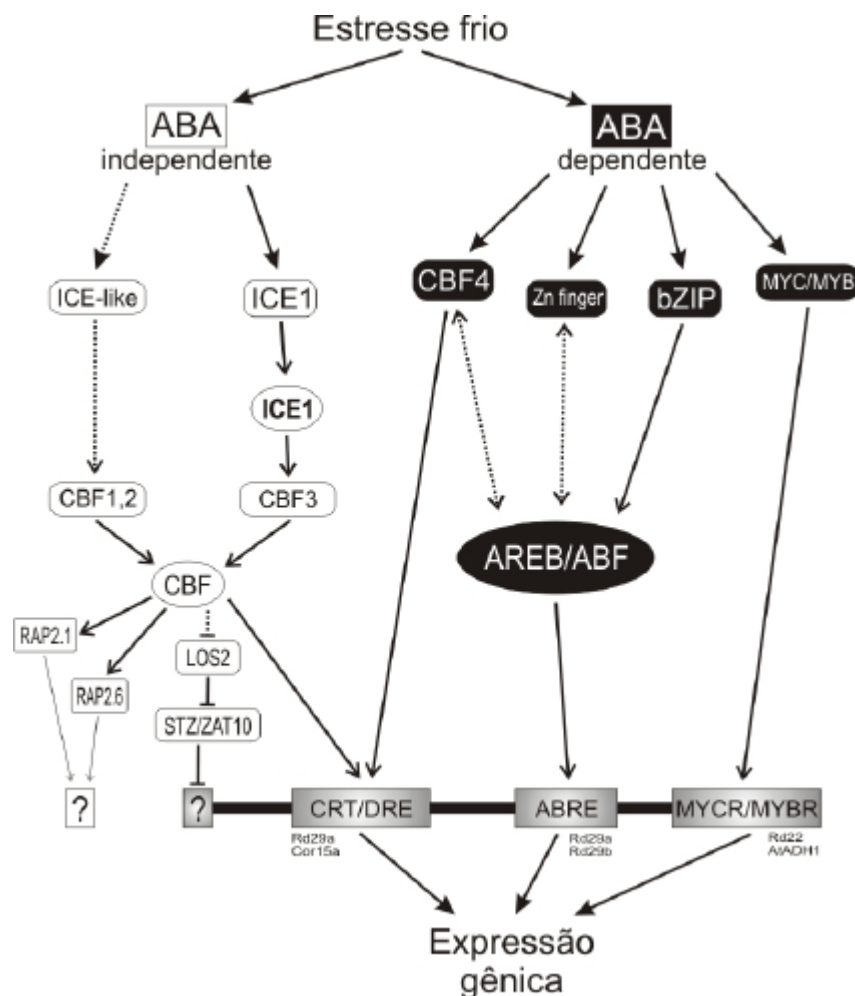


FIGURA 01 - Transdução de sinais em resposta ao estresse pelo frio, seca e salinidade, da percepção à expressão gênica (Adaptado de ZHANG *et al.*, 2004).

Os genes *cbfs* têm sido descritos para algumas espécies de plantas, dentre as quais estão *Arabidopsis*, canola, trigo, arroz, cevada e tomate (THOMASHOW, 2001; LIU *et al.*, 1998). Recentemente, genes *cbf* foram isolados de algumas espécies florestais, *Eucalyptus gunnii* (EL KAYAL *et al.*, 2006), *Populus balsamifera* (BENEDICT *et al.*, 2006) e *Betula pendula* (WELLING; PALVA, 2006).

Dentre os componentes do mecanismo regulatório que controlam a expressão dos *cbfs*, estão os fatores de transcrição, ICE1, recentemente identificados. O ICE1 é uma proteína que parece ter uma importância fundamental na regulação do gene *cbf3*. Em um estudo com *Arabidopsis* foi verificado que o ICE1 liga-se ao elemento regulatório MYC, presente na região promotora do *cbf3*, durante a aclimação ao frio (CHINNUSAMY *et al.*, 2007).

Existem algumas evidências que revelam que o frio e o mecanismo de estresse causado por este favorecem um influxo de cálcio no citosol, ocasionando a ativação de



fatores de transcrição, que estimulam a ativação do *cbf*. Dentre estes fatores de transcrição estão às proteínas kinases, denominadas de CDPKs (MARTIN; BUSCONI, 2001) e MAPK (TEIGE *et al.*, 2004). Sinais secundários, tais como ABA e espécies reativas de oxigênio também podem induzir o influxo de cálcio (CHINNUSAMY *et al.*, 2007).

## 2.7 REFERÊNCIAS

ALFENAS, A. C.; ZAUZA, E. A. V.; MAFIA, R. G.; ASSIS, T. F. **Clonagem e doenças do Eucalipto**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2004. 442 p.

ALVES, E. C. S. de C.; XAVIER, A.; OTONI, W. C. Organogênese de explante foliar de clones de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, p. 421-430, 2004.

AMBIENTE BRASIL. **Silvicultura do Eucalipto (*Eucalyptus* spp.)**. Disponível em <http://www.ambientebrasil.com.br/composer.florestal/eucalipto.html>. Acesso em 18/03/2008.

ANGELI, A.; BARRICHELO, L. E. G.; MULLER, P. H. **Indicações para escolha de espécies de *Eucalyptus*, 2005**. IPEF - Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais. Disponível em <http://www.ipef.br/identificacao/eucalyptus/indicacoes.asp>. Acesso em 10/03/2008.

ASSIS, T. F. de. Melhoramento genético do eucalipto. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 18, p. 32-51, 1996.

ASSIS, T. F. de. Production of and use of *Eucalyptus* hybrids for industrial purposes. In: Hybrid breeding and genetics of forest trees. QFRI/CRC-SPF Symposium. **Proceedings Department of Primary Industries**, p. 63-74, 2000.

ASSIS, T. F. de; BAUER, J. F. dos S.; TAFAREL, G. Sintetização de híbridos de *Eucalyptus* por cruzamentos controlados. **Ciência Florestal**, v. 3, p. 161-170, 1993.

AZMI, A.; DEWITTE, W.; DREVET, C.; ONCKELEN, V.; LANDRÉ, P.; BOUDET, A. M.; JOUANIN, L.; CHRIQUI, D. Bud regeneration from *Eucalyptus globulus* clones and seedlings through hormonal imbalances induced by *Agrobacterium tumefaciens* strain 82.139. **Plant Science**, v. 127, p. 81-90, 1997.

BARRUETO CID, L. P. B.; MACHADO, A. C. M. G.; CARVALHEIRA, S. B. R. C.; BRASILEIRO, A. C. M. Plant regeneration from seedling explants of *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 56, p. 17-23, 1999.

BEHNAM, B.; KIKUCHI, A.; CELEBI-TOPRAK, F.; YAMANAKA, S.; KASUGA, M.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; WATANABE, K. N. The *Arabidopsis* *DREBA* gene driven by the stress-inducible *rd29A* promoter increases salt-stress tolerance in proportion to its copy number in tetrasomic tetraploid potato (*Solanum tuberosum*). **Plant Biotechnology**, v. 23, p. 169-177, 2006.

BENEDICT, C.; SKINNER, J. S.; MENG, R.; CHANG, Y.; BHALERAO, R.; HUNER, N. P. A.; FINN, C. E.; CHEN, T. H. H.; HURRY, V. The *cbf1*-dependent low temperature signalling pathway, regulon, and increase in freeze tolerance are conserved in *Populus* spp. **Plant Cell and Environment**, v. 29, p. 1259-1271, 2006.

BERTOLUCCI, F.; REZENDE, G.; PENCHEL, R. Produção e utilização de híbridos de eucalipto. **Silvicultura**, v. 51, p.12-16, 1995.

BLUM, A. Crop responses to drought and the interpretation of adaptation. **Plant Growth Regulation**, v. 20, p. 135-148, 1996.

BONGA, J. M.; ADERKAS, P. V. **In vitro culture of trees**. Dordrecht: Netherlands, 1992, p. 57.

BRACELPA - Associação Brasileira de Celulose e Papel. **Desempenho do setor em 2007 e Projeções**. Disponível em <http://www.bracelpa.org.br/bra/estatisticas/index.html>. Acesso em 10/03/2008.

BRADFORD, K. J. Manipulation of seed water relations via osmotic priming to improve germination under stress. **Hortscience**, v.21, p.1105-1112, 1986.

BRASILEIRO, A. C. M. Co-cultura com linhagens desarmadas de *Agrobacterium*. In: BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. de C. **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPq, 1998, v.1, p. 111-125.

BRASILEIRO, A. C. M.; LACORTE, C. Interação *Agrobacterium* - hospedeiro. In: BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. de C. **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPq, 1998, v.1, p. 75-92.

BROOKER, M. I. H. A new classification of the genus *Eucalyptus* L'Her. (Myrtaceae). **Australian Systematic Botany**, v. 13, p. 79-148, 2000.

- CAMPINHOS, E. 1993. **Sustainable management of plantation forest in the tropics**. In: The Challenge of Sustainable Forest Management: technical papers. FAO, Rome (in press).
- CARAMORI, P. H.; MANETTI FILHO, J.; MORAIS, H.; LEAL, A. C. **Geada: técnicas para proteção dos cafezais**. Londrina: IAPAR, 2000. 35 p. (IAPAR. Circular, 112).
- CHINNUSAMY, V.; ZHU, J.; ZHU, J-K. Cold stress regulation of gene expression in plants. **Trends in Plant Science**, v. 12, p. 444-451, 2007.
- CHRIQUI, D.; ADAM, S.; CAISSARD, J. C.; NOIN, M.; AZMI, A. Shoot regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation of *Eucalyptus globulus* and *E. gunnii*. In: Intensive Forestry: The Role of Eucalypts (p. 70-80) **Proceedings IUFRO Symposium**, Durban, South Africa, 2-6 Sept. 1991.
- DE BLOCK, M. The cell biology of plant transformation: current state, problems, prospects and the implications for plant breeding. **Euphytica**, v. 71, p. 1-14, 1993.
- DEY, P. M.; HARBORNE, J. B. **Plant Biotechnology**, v. 15, p. 1-10, 1997.
- DHARIWAL, H. S.; KAWAI, M.; UCHIMIYA, H. Genetic engineering for abiotic stress tolerance in plants. **Plant Biotechnology**, v. 15, p. 1-10, 1998.
- DIBAX, R. **Transformação genética de *Eucalyptus saligna* com o gene *P5CSF129A* via *Agrobacterium tumefaciens***. (tese de doutorado). Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Produção Vegetal. Universidade Federal do Paraná, 2007.
- DIOUF, D. Genetic transformation of forest trees. **African Journal Biotechnology**, v. 2, p. 328-333, 2003.
- EL KAYAL, W.; NAVARRO, M.; MARQUE, G.; KELLER, G.; MARQUE, C.; TEULIÈRES, C. Expression profile of *cbf*-like transcriptional factor genes from *Eucalyptus* in response to cold. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, p. 2455-2469, 2006.
- ELDRIDGE, K.; DAVIDSON, J.; HARDWOOD, C.; VAN WYK, G. **Eucalypt domestication and breeding**. New York: Oxford University Press, 1994. p.288.
- ESMERALDO, M. V.; CARVALHEIRA, S. B. R. C.; BRASIL, A. A.; FIGUEIREDO, S. A.; BARRUETO CID, L. P.; BRASILEIRO, A. C. M. Analysis of different parameters affecting *Agrobacterium* -mediated transformation of *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*. In:

**IUFRO Conference on Silviculture and Improvement of Eucalypts** (p.19-23), Salvador, Brazil, 24-29 August, 1997.

FAO. **Global forest resources assessment 2000** – Main report. FAO Forestry paper. ISSN 0258-6150, 2000. 479p. Disponível em: [www.fao.org/forestry/fo/fra/main/index.jsp](http://www.fao.org/forestry/fo/fra/main/index.jsp).

FERREIRA, M. Melhoramento e a silvicultura intensiva clonal. **IPEF**, n. 45, p. 22-30, 1992.

GARCÍA-RODRÍGUEZ, F. M.; SCHRAMMEIJER, B.; HOOYKAAS, P. J. J. The *Agrobacterium* VirE3 effector protein: a potential plant transcriptional activator. **Nucleic Acids Research**, v. 34, p. 6496-6504, 2006.

GASPAR, T.; FRANCK, T.; BISBIS, B.; KEVERS, C.; JOUVE, L.; HAUSMAN, J. F.; DOMMES, J. Concepts in plant stress physiology. Application to plant tissue cultures. **Plant Growth Regulation**, v. 37, p. 263-285, 2002.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture**: the technology. Great Britain: Exegetics Limited, 1993. v.1, 574 p.

GILMOUR, S. J.; SEBOLT, A. M.; SALAZAR, M. P.; EVERAD, J. D.; TOMASHOW, M. F. Overexpression of *Arabidopsis cbf3* transcriptional activator mimics multiple biochemical changes associated with cold acclimation. **Plant Physiology**, v. 124, p. 1854-1865, 2000.

GONZÁLEZ, E. R. **Transformação genética de *Eucalyptus grandis* e do híbrido *E. grandis* x *E. urophylla* via *Agrobacterium***. Tese de doutorado. Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, São Paulo, Brasil, 2002.

GONZÁLEZ, E. R.; ANDRADE, A.; BERTOLO, A. L.; LACERDA, G. C.; CARNEIRO, R. T.; DEFÁVARI, V. A. P.; LABATE, M. T. V.; LABATE, C. A. Production of transgenic *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* using the sonication-assisted *Agrobacterium* transformation (SAAT) system. **Functional Plant Biology**, v.29, p.97-102, 2002.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: Embrapa - SPI/Embrapa, 1998. p.183-260.

GREENWOOD, M. S. Juvenility and maturation in conifers: current concepts. **Tree Physiology**, v. 15, p. 433-438, 1995.

GRIMA-PETTENATI J.; FEUILLET, C.; GOFFNER, D.; BORDERIES, G.; BOUDET, A.; Molecular cloning and expression of a *Eucalyptus gunnii* cDNA clone encoding cinnamyl alcohol dehydrogenase. **Plant Molecular Biology**, v. 21, p. 1085-1095, 1993.

HADI, M. Z.; MCMULLEN, M. D.; FINER, J. J. Transformation of 12 different plasmids into soybean via particle bombardment. **Plant Cell Reports**, v. 15, p. 500-505, 1996.

HAINES, R. **Biotechnology in forest tree improvement with special reference to developing countries**. In: FAO Forestry paper, n. 118, 1994.

HANSEN, G.; DAS, A.; CHILTON, M. D. Constitutive expression of the virulence genes improves the efficiency of plant transformation by *Agrobacterium*. **Proceedings of the National Academy of Science**, USA, v. 91, p. 7603-7607, 1994.

HERVÉ, P.; JAUNEAU, A.; PÂQUES, M.; MARIEN, J. N.; BOUDET, A. M.; TEULIÈRES, C. A procedure for shoot organogenesis *in vitro* from leaves and nodes of an elite *Eucalyptus gunnii* clone: comparative histology. **Plant Science**, v. 161, p. 645-653, 2001.

HO, C. K.; CHANG, S. H.; TSAY, C. J.; CHIANG, V. L.; CHEN, Z. Z. *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of *Eucalyptus camaldulensis* and production of transgenic plants. **Plant Cell Reports**, v. 17, p. 675-680, 1998.

IKEMORI, Y. K. **Genetic variation in characteristics of *Eucalyptus grandis* raised from micro-propagation and seed**. Oxford, 1990. 123p. (Tese-Doutorado).

ITO, Y.; KATSURA, K.; MARUYAMA, K.; TAJI, T.; KOBAYASHI, M.; SEKI, M.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Functional analysis of rice DREB1/CBF-type transcription factors involved in cold-responsive gene expression in transgenic rice. **Plant and Cell Physiology**, v. 45, p. 141-153, 2006.

JAMES, V. A.; NEIBAUR, I.; ALTPETER, F. Stress inducible expression of the *DREB1A* transcription factor from xeric, *Hordeum spontaneum* L. in turf and forage grass (*Paspalum notatum* Flugge) enhances abiotic stress tolerance. **Transgenic Research**, v. 17, p.93-104, 2008.

KASUGA, M.; MIURA, S.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. 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 Physiology**, v. 45, p. 346-350, 2004.

KAWAZU, T.; DOI, K.; OHTA, T.; SHINOHARA, Y.; ITO, K.; SHIBATA, M. Transformation of *Eucalyptus saligna* using electroporation. Abstracts: **VII International Congress on Plant Tissue and Cell Culture**. Amsterdam, Netherlands, p. 24-29, 1990.

KONDO, K.; KOSHIYAMA, J.; DOI, K.; ISHIGE, N.; SUKENO, S.; HIBINO, T.; KASUGA, M.; SHINOZAKI, K. Analysis of the stress response genes in *Eucalyptus* and effect of introducing a stress tolerance-giving gene (rd29A-DREB1A) into *Eucalyptus*. **Plant and Cell Physiology** v. 43, supplement, s113, 2002.

LAINÉ, E.; DAVID, A. Regeneration of plants from leaf explants of micropropagated clonal *Eucalyptus grandis*. **Plant Cell Reports**, v. 13, p. 473-476, 1994.

LEBORGNE, N.; TEULIÈRES, C.; LAFFITE, C.; BOUDET, A. M. Evolution des sucres solubles chez *Eucalyptus gunnii* au cours d'un cycle annuel: relation avec la résistance au froid. **Annales de Recherches Sylvicoles** - AFOCEL, 1994.

LIU, Q.; KASUGA, M.; SAKUMA, Y.; ABE, H.; MIURA, S.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Two transcription factors, *DREB1* and *DREB2*, with an EREBP/AP2 DNA-binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. **Plant Cell**, v. 10, p. 1391-1406, 1998.

MANDERS, G.; DOS SANTOS, A. V. P.; VAZ, F. B. D.; DAVEY, M. R.; POWER, J. B. Transient gene-expression in electroporated protoplasts of *Eucalyptus citriodora* Hook. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 30, p. 69-75, 1992.

MARTIN, M. L., BUSCONI L. A rice membrane-bound calcium-dependent protein kinase is activated in response to low temperature. **Plant Physiology**, v. 125, p.1442-1449, 2001.

MATSUHARA, S.; JINGU, F.; TAKAHASHI, T.; KOMEDA, Y. Heat-shock tagging: a simple method for expression and isolation of plant genome DNA flanked by T-DNA insertions. **The Plant Journal**, v. 22, p.79-86, 2000.

McCOWN, B. H.; SELLMER, J. C. General media and vessels suitable for woody plant microculture. In: BONGA, J. M.; DURZAN, D. J. (Ed.). **Cell and tissue culture in forestry**. Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers, p. 4-14, 1987.

MOLION, L. C. B.; FERREIRA, N. J.; MEIRA FILHO, L. G. **O uso de satélites ambientais para monitoramento de geadas**. INPE, São José dos Campos. Jun. (INPE-2128-RPE/352), 1981.

MORAES-FERNANDES, M. I. B. Perspectivas da Biotecnologia para o Melhoramento de Plantas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.22, p. 881-896,1987.

MORALEJO, M.; ROCHANGE, F.; BOUDET, A. M.; TEULIÈRES, C. Generation of transgenic *Eucalyptus globulus* plantlets through *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 25, p. 207-212, 1998.

MORIKAWA, H.; IIDA, A.; MATSUI, C.; IKEGAMI, M.; YAMADA, Y. Gene transfer into intact plant cells by electroinjection through cell walls and membranes. **Gene**, v. 41, p. 121-124, 1986.

MULLINS, K. V.; LLEWELLYN, D. J.; HARTNEY, V. J.; STRAUSS, S.; DENNIS, E. S. Regeneration and transformation of *Eucalyptus camaldulensis*. **Plant Cell Reports**, v. 16, p. 787-791, 1997.

MURALIDHARAN, E. M.; MASCARENHAS, A. F. *In vitro* plantlet formation by organogenesis in *Eucalyptus camaldulensis* and by somatic embryogenesis in *Eucalyptus citriodora*. **Plant Cell Reports**, v. 6, p. 256-259, 1987.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.

NAUERBY, B.; BILLING, K.; WYNDAELE, R. Influence of the antibiotic timentin on plant regeneration compared to carbenicillin and cefotaxime in concentrations suitable for elimination of *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Science**, v. 123, p. 169-177, 1997.

OBERTELLO, M.; SANTI, C.; SY, M-O.; LAPLAZE, L.; AUGUY, F.; BOGUSZ, D.; FRANCHE, C. Comparison of four constitutive promoters for the expression of transgenes in the tropical nitrogen-fixing tree *Allocasuarina verticillata*. **Plant Cell Reports**, v. 24, p. 540-548, 2005.

PALUDZYSZYN FILHO, E.; SANTOS, P. E. T. dos; FERREIRA, C. A. ***Eucalyptus* indicados para plantio no estado do Paraná**. Documentos Embrapa, 2006, v. 129, 45p.



PAOLI, L. G. de, CAMARGO, R. L. B., HAKAKAVA, R.; MENDES, B. M. J.; MOURÃO FILHO, F. de A. A. Transformação genética de laranja 'Valência' com o gene *cecropin* MB39. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, p.1663-1666, 2007.

PINO, M. T.; SKINNER, J. S.; PARK, E. J.; JEKNIC, Z.; HAYES, P. M.; THOMASHOW, M. F.; CHEN, T. H. Use of a stress inducible promoter to drive ectopic *Atcbf* expression improves potato freezing tolerance while minimizing negative effects on tuber yield. **Plant Biotechnology Journal**, v. 5, p. 591-604, 2007.

PINTO, G.; SANTOS, C.; NEVES, C.; ARAÚJO, C. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Eucalyptus globulus* Labill. **Plant Cell Reports**, v. 21, p. 208-213, 2002.

POTTS, B. M. **Genetic improvement of eucalypts**. In: Encyclopedia of Forest Sciences, edited by Elsevier, Oxford, UK, 2004, p. 104-114.

PRAKASH, M. G.; GURUMURTHI, K. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Eucalyptus tereticornis*. **Current Science**, v. 88, p. 1311-1316, 2005.

QUISEN, R. C. **Transformação genética de *Eucalyptus camaldulensis* via co-cultivo com *Agrobacterium tumefaciens***. (Tese de doutorado). Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Produção Vegetal. Universidade Federal do Paraná, 2007.

QUOIRIN, M.; QUISEN, R. **Advances in genetic transformation of *Eucalyptus* species**. In: FRANCHE, C. (edit) Molecular Biology of Tropical Plants. Research Signpost, Kerala, India, 2006, p. 41-56.

ROCHANGE, F. **Transformation génétique chez *Eucalyptus globulus* Labill.: étude comparée de différentes approches**. Tese de Doutorado, Université Paul Sabatier, Toulouse, France, 1996.

SANFORD, J. C.; KLEIN, T. M.; WOLF, E. D.; ALLEN, N. Delivery of substances into cells tissues using a particle bombardment process. **Particle Science Technology**, v. 5, p. 27-37, 1987.

SANGWAN, R. S.; BOURGEOIS, Y.; BROWN, S.; VASSEUR, G.; SANGWAN-NORREEL, B. Characterization of competent cells and early events of *Agrobacterium*-mediated genetic transformation in *Arabidopsis thaliana*. **Planta**, v. 188, p. 439-456, 1992.

SERRANO, L.; ROCHANGE, F.; SEMBLAT, J. P.; MARQUE, C.; TEULIÈRES, C.; BOUDET, A. M. Genetic transformation of *Eucalyptus globulus* through biobalistics: complementary development of procedures for organogenesis from zygotic embryos and stable transformation of corresponding proliferating tissue. **Journal of Experimental Botany**, v. 47, p. 285-290, 1996.

SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Molecular responses to dehydration and low temperature: difference and cross-talk between two stress signaling pathways. **Current Opinion in Plant Biology**. v. 3, p. 217-223, 2000.

SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SEKI, M. Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 6, p. 410-417, 2003.

SIEMENS, J.; SCHIEDER, O. Transgenic plants: genetic transformation-recent developments and the state of art. **Plant Tissue Culture & Biotechnology**, v.2, p. 66-75, 1996.

SILVA, J. de C. Cresce presença de eucalipto no Brasil. **Revista da Madeira**, n. 92, ano 15, 2005.

SRIVASTAVA, L. M. **Plant growth and development**. 1 ed.: Academic Press, 2001. 772 p.

SUBBAIAH, M. M.; MINOCHA, S. C. Shoot regeneration from stem and leaf callus of *Eucalyptus tereticornis*. **Plant Cell Reports**, v. 9, p. 370-373, 1990.

SUNG, D. Y.; KAPLAN, F.; LEE, K. J.; GUY, C. Acquired tolerance to temperature extremes. **Plant Science (Review)**, v. 8, p. 179-187, 2003.

TEIGE, M.; SCHEIKL, E.; EULGEM, T.; DOCZI, R.; ICHIMURA, K.; SHINOZAKI, K.; DANGL, J. L.; HIRT, H. The MKK2 pathway mediates cold and salt stress signaling in *Arabidopsis*. **Molecular Cell**, v. 15, p. 141-152, 2004.

TERMIGNONI, R. R.; WANG, P. J.; HU, C. Y. Somatic embryo induction in *Eucalyptus dunnii*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 45, p. 129-132, 1996.

TEULIÈRES, C.; GRIMA-PETTENATI, J.; CURIE, C.; TEISSIE, J.; BOUDET, A. M. Transient foreign gene expression in polyethylene/glycol treated or electropulsated *Eucalyptus gunnii* protoplasts. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 25, p.125-132, 1991.

THOMASHOW, M. F. Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 50, p.571-599, 1999.

THOMASHOW, M. F. So what's new in the field of plant cold acclimation? Lots! **Plant Physiology**, v. 125, p.89-93, 2001.

TIBOK, A.; BLACKHALL, N. W.; POWER, J. B.; DAVEY, M. R. Optimized plant regeneration from callus derived from seedling hypocotyls of *Eucalyptus urophylla*. **Plant Science**, v. 110, p. 139-145, 1995.

TOURNIER, V.; GRAT, S.; MARQUE, C.; EL KAYAL, W.; PENCHEL, R.; ANDRADE, G. de; BOUDET, A. M.; TEULIÈRES, C. An efficient procedure to stably introduce genes into an economically important pulp tree (*Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*). **Transgenic Research**, v. 12, p. 403-411, 2003.

TURNBULL, J. W. Eucalypt plantations. **New Forests**, v. 17, p. 37-52, 1999.

VALÉRIO, L. A. L. **Modulation of lignification in *E. globulus* and *E. camaldulensis* through genetic engineering**. (Tese de doutorado), Universidade Técnica de Lisboa, Instituto Superior de Agronomia, Portugal, 2000.

VALÉRIO, L.; CARTER, D.; RODRIGUES, J. C.; TOURNIER, V.; GOMINHO, J.; MARQUE, C.; BOUDET, AM.; MAUNDERS, M.; PEREIRA, H.; TEULIÈRES, C. Down regulation of cinnamyl alcohol dehydrogenase, a lignification enzyme, in *Eucalyptus camaldulensis*. **Molecular Breeding**, v. 12, p. 157-167, 2003.

WATT, M. P.; BLAKEWAY, F.; CRESSWELL, C. F.; HERMAN, B. Somatic embryogenesis in *Eucalyptus grandis*. **South African Forestry Journal**, v. 157, p.59-65, 1991.

WELLING, A.; PALVA, E. T. Molecular control of cold acclimation in trees. **Physiologia Plantarum**, v. 127, p. 167-181, 2006.

YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K; SHINOZAKI, K. Organization of cis-acting regulatory elements in osmotic- and cold-stress-responsive promoters. **Trends in Plant Science**, v.10, p. 88-94, 2005.

ZHANG, J. Z.; CREELMAN, R. A.; ZHU, J. K. From laboratory to field. Using information from *Arabidopsis* to engineer salt, cold, and drought tolerance in crops. **Plant Physiology**, v. 135, p.615-621, 2004.

ZHU, J.; HASEGAWA, P. M.; BRESSAN, R. A. Molecular aspects of osmotic stress in plants. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 16, p. 253-277, 1997.

ZHU, J.; DONG, C-H; ZHU, J-K. Interplay between cold-responsive gene regulation, metabolism and RNA processing during plant cold acclimation. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 10, p. 290-295, 2007.

ZUO, J.; NIU, Q. W.; FRUGIS, G; CHUA, N. H. The WUSCHEL gene promotes vegetative-to-embryonic transition in *Arabidopsis*. **The Plant Journal**, v. 30, p. 349-359, 2002.

### 3 REGENERAÇÃO DE GEMAS A PARTIR DE EXPLANTES FOLIARES DO HÍBRIDO

#### *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*

#### RESUMO

Para a utilização das técnicas de transformação genética, é necessário que células de tecidos transformados regenerem plântulas que expressem os genes inseridos. O estabelecimento de um sistema eficiente de regeneração *in vitro* é fundamental no processo de transformação genética de plantas. 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. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar alguns fatores importantes para o sucesso de regeneração de gemas em explantes foliares de dois clones de *E. grandis* x *E. urophylla*. Segmentos foliares foram isolados de brotações dos clones 11 e 827 e cultivados em meio de reativação celular (BIP), no escuro, por dois dias, seguido de cinco dias em meio de cultura sólido (A2). Posteriormente, os explantes foram transferidos para meio de indução de gemas (BIT), no escuro, por 15 dias, com repicagem a cada cinco dias. Após os 22 dias de cultivo inicial, os explantes foram transferidos para meio de desenvolvimento de gemas (SDM), por 70 dias, com repicagem a cada 14 dias. Variáveis como calogênese e número de gemas por explante, foram avaliadas aos 30 e 90 dias após o cultivo inicial dos explantes. Foram avaliados também o efeito de diferentes dias de repicagem das brotações dos dois clones, em meio de multiplicação, da utilização de segmentos foliares, folha inteira e meia folha, porção basal e apical e o efeito da duração da subcultura em meio de cultura BIT. Foram verificadas diferenças na capacidade regenerativa dos dois clones testados, sendo que o clone 11 apresentou capacidade superior ao clone 827. Explantes foliares coletados de brotações repicadas a cada 17 dias apresentaram superioridade em termos de capacidade regenerativa, em comparação com os repicados a cada 26 ou 35 dias. A parte da folha utilizada afetou a regeneração do clone 11, com maior eficiência regenerativa para a parte basal da folha. O aumento da frequência de repicagem dos explantes foliares em meio BIT influenciou positivamente a regeneração dos explantes do clone 11.

**Palavras-chave:** espécie lenhosa, micropropagação, organogênese.

**REGENERATION OF BUDS FROM LEAF EXPLANTS OF *Eucalyptus grandis* x  
*Eucalyptus urophylla***

**ABSTRACT**

Transformed tissue cells with ability to regenerate plants that express inserted genes are needed for genetic transformation success. In this process the establishment of an efficient system of *in vitro* plant regeneration is essential. The protocol of regeneration should be adapted to every species or even to each genotype. This study aims to evaluate some important factors for the regeneration of buds from leaf explants of two clones of *E. grandis* x *E. urophylla*. Leaf segments were isolated from clones 11 and 827 shoots and cultivated in darkness for two days on a cellular reactivation medium (BIP medium) followed by solid co-culture medium (A2) for five days. Afterwards, explants were transferred to bud induction medium (BIT), in darkness for fifteen days, with subculture each five days. After twenty-two days of culture the explants were transferred to shoot development medium (SDM) for seventy days with subculture each fourteen days. Variables that refer to regenerative rates like callogenesis and number of buds per explant were analyzed at 30 and 90 days after starting the initial culture. Tests were carried out in order to verify the effect of different dates of transfer into multiplication medium. Entire and half leaves, basal and apical portions were also tested as well as the effect of culture duration in BIT medium. Differences in regenerative capacity of the two clones were observed, clone 11 presented a higher capacity than clone 827. Leaf explants collected from material transferred each 17 days presented a better regenerative capacity than those transferred each 26 or 35 days. The use of specific part of the leaves affects the clone 11 regeneration, the most efficient being the basal part. The increase of the frequency of transfer of the leaf explants on BIT medium influences positively the regeneration of the explants of the clone 11.

**Key-words:** woody species, micropropagation, organogenesis.

### 3.1 INTRODUÇÃO

As técnicas de transformação genética apresentam-se como uma ferramenta importante em um programa de melhoramento genético, principalmente considerando as dificuldades deste programa, inerentes ao uso de espécies perenes, cujos ciclos de melhoramento são normalmente longos. Desta forma, a transformação genética permite a eliminação de etapas de um programa de melhoramento, possibilitando com isto avanços na obtenção dos resultados, gerando plantios de alta qualidade (DIOUF, 2003).

Para a aplicação das técnicas de transformação genética é necessário que células de tecidos transformados regenerem plântulas que depois expressem os genes inseridos. Desta forma, o estabelecimento de um sistema eficiente de regeneração *in vitro* é fundamental no sucesso da transformação de plantas (BARRUETO CID *et al.*, 1999; McCOWN; SELLMER, 1987).

A regeneração por meio da organogênese tem apresentado avanços significativos com diferentes espécies de *Eucalyptus*. Para *E. urophylla* (TIBOK *et al.*, 1995); *E. grandis* (LAINÉ; DAVID, 1994); *E. camaldulensis* (MURALIDHARAN; MASCARENHAS, 1987; MULLINS *et al.*, 1997), *E. globulus* (SERRANO *et al.*, 1996) e *E. tereticornis* (SUBBAIAH; MINOCHA, 1990). Alguns trabalhos com o híbrido *E. grandis* x *E. urophylla* foram publicados (BARRUETO CID *et al.*, 1999; TOURNIER *et al.*, 2003; ALVES *et al.*, 2004). Porém, a otimização e a adaptação de um protocolo de regeneração para condições próprias de trabalho e até mesmo para um material genético ou clone específico são muito importantes, pois embora um protocolo seja estabelecido para uma espécie, ou até mesmo para um genótipo, normalmente não pode ser utilizado para outro genótipo, mesmo que da mesma espécie.

Diversos são os fatores que podem alterar a resposta organogênica do tecido vegetal. Dentre os quais destacam-se o genótipo, a idade e o estado fisiológico da plântula na qual será coletado o explante, a composição dos meios de cultura, as condições de crescimento, como temperatura, luminosidade e fotoperíodo, o tempo entre os sub-cultivos e principalmente a interação entre os fatores mencionados acima (GEORGE, 1993).

O genótipo é um dos principais fatores que interfere no potencial organogenético do tecido vegetal, sendo que em geral dois genótipos reagem ao mesmo estímulo de maneira diferente. Estudos sugerem considerável variação na resposta regenerativa dos explantes em resposta a diferenças genéticas (LAINÉ; DAVID, 1994). A idade fisiológica e ontogenética da planta matriz também apresentam influências no desenvolvimento

vegetativo. Em geral, explantes provenientes de tecidos juvenis apresentam maior facilidade de expressar o potencial organogênico, quando comparados com explantes de plantas adultas (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

O presente trabalho teve como objetivo otimizar a regeneração de explantes foliares de *E. grandis* x *E. urophylla*. Para isto, foi estudado o efeito da duração da subcultura em meio de multiplicação no potencial regenerativo dos explantes foliares. Foi analisado também o efeito da utilização de explantes foliares, folha inteira e de meia folha, porção basal e apical, e o efeito da duração da cultura dos explantes em meio de cultura BIT sem repicagem.



## 3.2 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi conduzido no Laboratório de Micropropagação de Plantas, Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo do Setor de Ciências Agrárias, da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná.

### 3.2.1 Material vegetal

Para os experimentos foram utilizadas plântulas matrizes de *E. grandis* x *E. urophylla*, oriundas de sementes obtidas do IPEF (Instituto de Pesquisas Florestais), Piracicaba, São Paulo, e germinadas *in vitro*. Previamente a este trabalho, vários clones foram obtidos e dois deles (11 e 827) selecionados, com base na velocidade de aparecimento das gemas adventícias, sendo utilizados como material vegetal.

### 3.2.2 Condições de cultura *in vitro*

As culturas foram mantidas em sala de crescimento, com temperatura de  $25 \pm 2$  °C, sob luz fluorescente branca fria com densidade de fluxo de fótons de  $30 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  e fotoperíodo de 16 h.

Os tufo de gemas de *E. grandis* x *E. urophylla* foram cultivados em frascos de vidro de 6 cm de diâmetro e 9 cm de altura, com 35 mL de meio de cultura M em cada, vedados com tampa de polipropileno rígido. A repicagem foi realizada a cada 30 dias, utilizando o meio de cultura M, suplementado com 3% de sacarose e 0,7% de ágar (Vetec®) (Anexo 01).

Os explantes foliares foram mantidos em placas de Petri de vidro de 10 cm de diâmetro e 2 cm de altura, contendo 25 mL de meio de cultura, vedadas com filme plástico. Os meios de cultura e o tempo que cada explante foliar permaneceu no meio variaram de acordo com a fase de desenvolvimento, conforme será destacado no item 3.2.3. Os meios de cultura em que foram mantidos os explantes foliares foram suplementados com 3% de sacarose e 0,6% ou 0,7% de agar, dependendo do meio de cultura utilizado (Vetec®). O pH dos meios descritos acima foram ajustados em 5,6, antes da esterilização em autoclave a 1 atm e 121 °C por 20 min.

### 3.2.3 Organogênese a partir de explantes foliares

Explantes foliares foram isolados de brotações dos clones 11 e 827, mantidas em condições *in vitro*, cerca de 30 dias após a última repicagem em meio de cultura M. Foram escolhidas folhas jovens retiradas das partes superiores das brotações, estas foram selecionadas e seccionadas em duas partes no sentido transversal, na presença de solução antioxidante (Anexo 03) e cultivadas em sala de crescimento, no escuro por dois dias, com a face abaxial em contato com o meio BIP. Em seguida, os explantes foram transferidos para meio de cultura A2, no escuro, por cinco dias e depois para meio BIT por 15 dias, no escuro, sendo repicados a cada cinco dias. Após os 22 dias de cultivo inicial, os explantes foram transferidos para meio SDM, por 68 dias, com repicagem a cada 14 dias, sob densidade de fluxo de fótons em torno de  $10 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , nas duas primeiras semanas e posteriormente sob condição de plena luminosidade, com densidade de fluxo de fótons em torno de  $30 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . Os meios de cultura estão especificados no Anexo 01.

Em geral, todos os experimentos seguiram o padrão descrito acima, sendo que condições particulares foram especificadas em cada ensaio.

#### 3.2.3.1 Duração da subcultura em meio de multiplicação

Foi avaliado o efeito da duração da subcultura de brotações mantidas em meio de multiplicação M (Anexo 01) sobre a regeneração de gemas. Para isto, três períodos foram comparados: 17, 26 e 35 dias. Folhas jovens foram selecionadas, excisadas dos tufos de gemas, seccionadas em duas partes e cultivadas em meio de cultura, conforme descrito no item 3.2.3.

#### 3.2.3.2 Efeito do tipo de explante foliar

Foram comparados segmentos foliares, folha inteira e meia folha, como explantes no processo de organogênese (Figura 02).

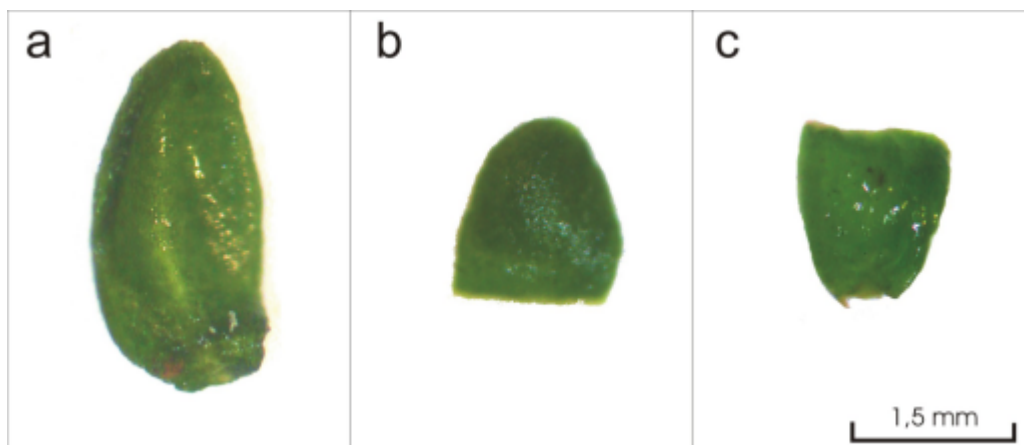


FIGURA 02 - Explantes foliares de *E. grandis* x *E. urophylla* utilizados no ensaio 2. a) folha inteira, b) segmento distal e c) segmento proximal.

### 3.2.3.3 Duração da subcultura em meio BIT

Neste ensaio, foi observado o efeito da duração da subcultura dos explantes foliares em meio de indução das gemas (BIT, Anexo 01). Os explantes foram repicados a cada 5, 10 ou 14 dias e os explantes permaneceram neste meio durante 15 dias.

### 3.2.3.4 Avaliações

Para os ensaios citados anteriormente, foram realizadas duas avaliações, uma após 30 dias e a outra após 90 dias de cultivo em meio de cultura. Aos 30 dias foram avaliadas as seguintes variáveis: porcentagem de explantes com calo e com calo oxidado. Aos 90 dias, foram avaliadas a calogênese e a porcentagem de calos com gema, número médio de gemas formadas por explante e porcentagem de explantes oxidados.

### 3.2.3.5 Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com 5 repetições e 10 explantes por unidade experimental e os experimentos foram repetidos duas vezes. Os tratamentos representaram arranjo fatorial 3 x 2 (três períodos de subcultura ou tipos de explantes e dois clones). Primeiramente, foi aplicado um teste de análise de variância e, em

seguida, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. A análise estatística foi realizada utilizando o programa computacional SISVAR (FERREIRA, 1999).

### 3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.3.1 Descrição da organogênese a partir de explantes foliares

O início da calogênese variou de acordo com o clone, sendo que para o clone 11 ocorreu aos 10 dias após o isolamento dos explantes foliares. Já para o clone 827, a calogênese teve início aos 14 dias. Os calos formados permaneceram verdes por aproximadamente 25 dias, que correspondeu ao período durante o qual os explantes permaneceram no escuro. O escurecimento dos calos ocorreu gradualmente e, na maior parte dos explantes que regeneraram gemas este escurecimento, ocorreu somente em uma parte do calo. A formação de gemas foi verificada, em geral, 20 a 30 dias após a transferência dos explantes em meio de cultura SDM (Figura 03).

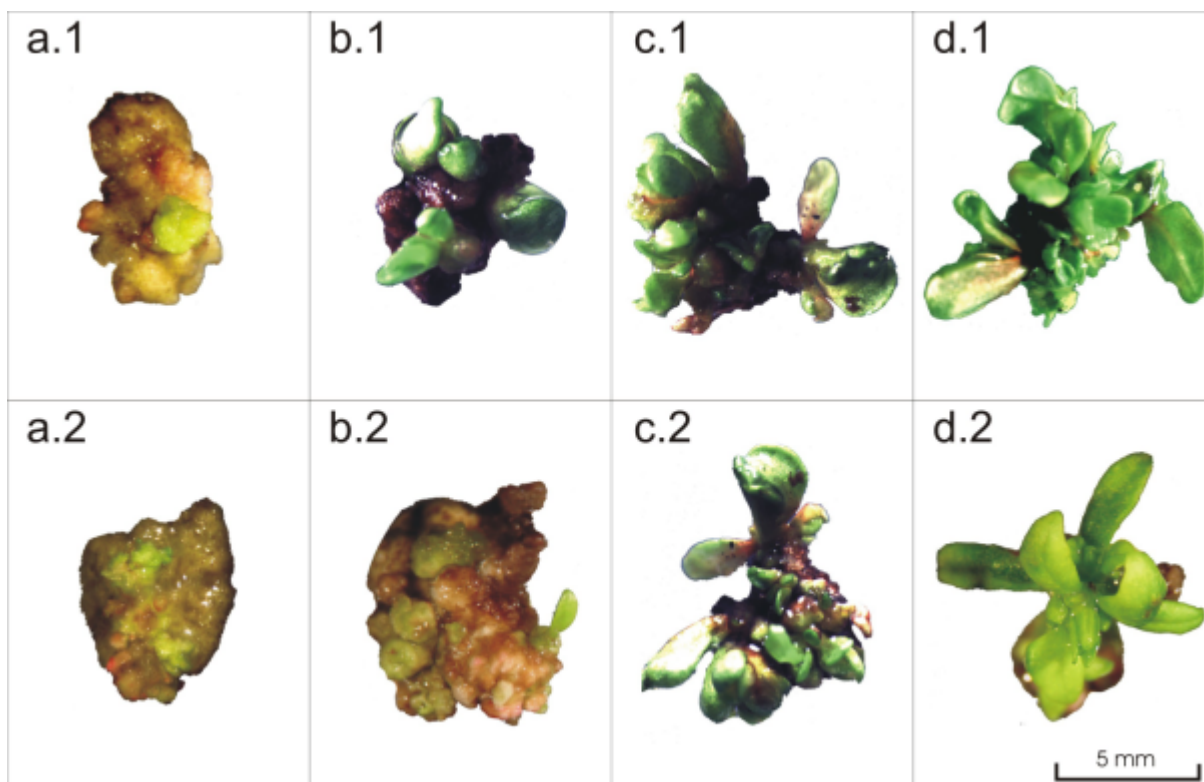


FIGURA 03 – Calogênese e regeneração de gemas do clone 11 de *E. grandis* x *E. urophylla*. a.1 e a.2) formação de calo, 14 dias após o isolamento; b.1 e b.2) início da formação de gemas, 30 dias em meio SDM; c.1 e c.2) desenvolvimento das gemas, 50 dias em meio SDM; d.1 e d.2) aspecto dos explantes após 90 dias de cultivo.

### 3.3.2 Efeito da duração da subcultura em meio de multiplicação

De acordo com a análise de variância, após 30 dias de cultivo (Anexo 04), foi verificada interação entre os fatores clone e duração da subcultura apenas para a variável calos oxidados. Para a variável calos sem gema, não houve interação entre os fatores testados. Somente a duração da subcultura apresentou efeito significativo. Os clones não apresentaram diferenças estatísticas.

A porcentagem de explantes com calos foi alta para os dois clones (Tabela 01), sendo observada diferença estatística de acordo com os dias de repicagem, com maior porcentagem para os explantes provenientes de plântulas que permaneceram 17 dias no meio de multiplicação, seguido de 26 dias. Foi verificada baixa porcentagem de explantes com calos oxidados, sendo que para o clone 11, houve menor oxidação dos calos, com explantes de 17 e 26 dias. O restante dos explantes que não foram contabilizados na tabela foram aqueles que não formaram calo, mas que não chegaram a oxidar.

TABELA 01 - Calogênese em explantes foliares dos clones 11 e 827 de *E. grandis* x *E. urophylla*, em função da duração da subcultura em meio de multiplicação, com avaliação após 30 dias de cultivo.

Duração da subcultura (dias)	Calos (%)				Calos oxidados (%)			
	Clone 11		Clone 827		Clone 11		Clone 827	
17	86,00	a A	80,00	a A	2,00	b A	4,00	a A
26	66,00	b A	66,00	b A	2,00	b A	6,00	a A
35	54,00	c A	58,00	b A	10,00	a A	6,00	a A

Médias seguidas da mesma letra minúscula na vertical, para a duração da subcultura, e médias seguidas da mesma letra maiúscula na horizontal, para clones, não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Os resultados da análise de variância estão apresentados no Anexo 04.

O resultado da análise de variância, para a avaliação após 90 dias de cultivo, está apresentado no Anexo 05. De acordo com os resultados, observou-se que a interação entre os fatores clone e duração da subcultura foi estatisticamente significativa para as variáveis testadas, exceto para o número de explantes oxidados, que apresentou significância apenas para a duração da subcultura.

Houve diferenças quanto à resposta regenerativa entre os clones 11 e 827 (Tabela 02). O clone 11 apresentou melhores respostas quanto à porcentagem de explantes regenerando gemas e ao número de gemas formadas por explante, com exceção do tratamento com subcultura a cada 35 dias. Em geral, para ambos os clones, com o aumento

na frequência de repicagem das brotações das quais foram coletadas as folhas houve melhores resultados de organogênese.

As maiores porcentagens de formação de calos foram verificadas com os explantes provenientes de brotações repicadas com maior frequência. Para os dois clones foram constatadas diferenças estatísticas entre os três tratamentos, com aumento na porcentagem de formação de calos com gema à medida que se aumentou a frequência de repicagem das brotações das quais foram coletadas as folhas. Para o clone 11, o mesmo ocorreu com relação ao número de gemas por explante.

TABELA 02 - Calogênese e regeneração de gemas em explantes foliares dos clones 11 e 827 de *E. grandis* x *E. urophylla*, em função da duração da subcultura em meio de multiplicação, com avaliação após 90 dias de cultivo.

Dias	Clone 11				Clone 827		
	Calos sem gema (%)						
17	30,00	a	B	56,00	a	A	
26	30,00	a	A	36,00	b	A	
35	26,00	a	A	24,00	c	A	
Calos com gema (%)							
17	32,00	a	A	10,00	a	B	
26	12,00	b	A	6,00	b	B	
35	2,00	c	A	2,00	c	A	
Nº gemas/ explante regenerando							
17	5,00	a	A	2,72	b	B	
26	4,43	b	A	3,63	a	B	
35	2,40	c	B	2,90	b	A	
Oxidação (%)							
17	38,00	c	A	34,00	c	A	
26	58,00	b	A	58,00	b	A	
35	72,00	a	A	74,00	a	A	

Médias seguidas da mesma letra minúscula na vertical, para duração da subcultura, e médias seguidas da mesma letra maiúscula na horizontal, para clones, não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Os resultados da análise de variância estão apresentados no Anexo 05.

A melhor resposta regenerativa dos explantes provenientes de brotações obtidas com uma frequência de repicagem maior, a cada 17 dias, quando comparada a 26 e 35 dias, possivelmente esteja relacionada à utilização de folhas mais jovens. Isto ocorre pelo fato de que quando as plântulas foram repicadas, retiraram-se todas as folhas mais velhas e calos oxidados que se formaram no explante e, como consequência, as folhas coletadas de plântulas repicadas há 17 dias eram mais jovens que as folhas de 26 dias e estas que as de 35 dias, como pode ser evidenciado na Figura 04. O maior potencial organogênético de explantes jovens está relacionado ao fato dos tecidos mais jovens serem menos

diferenciados e apresentarem células metabolicamente mais ativas em condições hormonais e nutricionais adequadas (FAMIANI *et al.*, 1994).

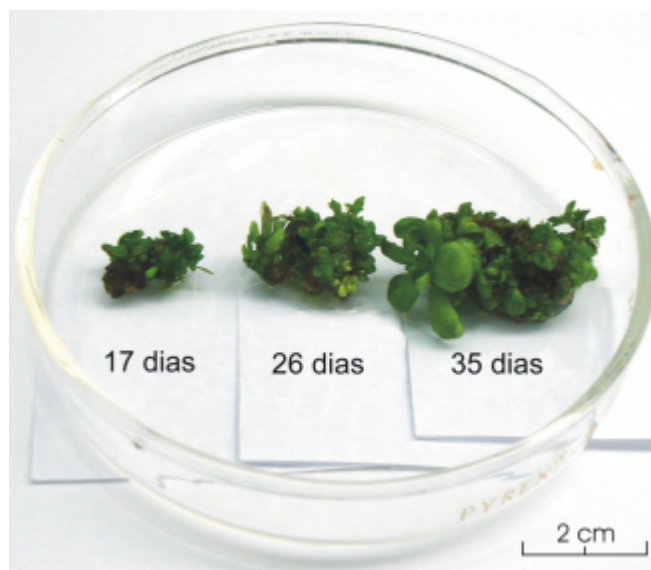


FIGURA 04 - Tufos de gemas de *E. grandis* x *E. urophylla*, dos quais os explantes foliares foram isolados aos 17, 26 e 35 dias após a repicagem.

O efeito da idade do explante no potencial de indução de calos já foi relatado para outras espécies, como *Passiflora edulis* (BECERRA *et al.*, 2004), *Brassica* spp. (TANG *et al.*, 2003) e *Prunus armeniaca* (PÉREZ-TORNERO *et al.*, 2000). O efeito da fonte do explante na morfogênese de *Passiflora edulis* foi estudado comparando a resposta dos explantes foliares coletados de plantas jovens de um a seis meses germinadas em casa-de-vegetação, plântulas mantidas *in vitro* e plantas adultas de um ano revigoradas, por meio de podas sucessivas. Os resultados do estudo mostraram que a regeneração a partir de plantas de dois meses foi superior a das plântulas mantidas *in vitro* e de plantas adultas, o que foi evidenciado pelo maior número de brotações por explante (BECERRA *et al.*, 2004).

Em *Brassica* spp., cotilédones de quatro dias mostraram uma maior produção de calos regenerando gemas (56,7% dos explantes) e um maior número de gemas por explante, entre 3,5 e 4,0, quando comparados a cotilédones de 5 a 10 dias (TANG *et al.*, 2003). Resultados similares também foram observados com *Prunus armeniaca*, no qual a taxa de regeneração aumentou duas vezes com a utilização de folhas jovens. Estas foram definidas como as primeiras quatro folhas apicais e as folhas velhas, como as últimas folhas, as mais basais. Entretanto, neste trabalho, a utilização de folhas jovens não afetou o número de gemas formadas por explante, que ficou em torno de 1,0 (PÉREZ-TORNERO *et al.*, 2000).



Em trabalhos de transformação genética com *Eucalyptus*, recomenda-se a utilização de tecidos vegetais jovens, sendo que normalmente são utilizadas folhas cotiledonares e hipocótilos de plântulas germinadas entre 2 e 15 dias, embriões zigóticos e folhas novas (GONZÁLEZ *et al.*, 2002). Porém, para a maioria das espécies, ainda não está definida a idade ideal ou a melhor fase de desenvolvimento da plântula, que possibilitem uma alta taxa de regeneração dos explantes.

Em estudo com o híbrido *E. grandis* x *E. urophylla* foram comparados cotilédones e hipocótilos de mudas de 14 dias e folhas primárias provenientes de mudas com 20, 30, 40 e 50 dias. Os cotilédones foram os explantes que apresentaram calos com maior indução de gemas, variando de 35 a 55%, dependendo do tratamento com o fitorregulador, já os hipocótilos apresentaram variação de 22 a 47% (BARRUETO CID *et al.*, 1999). Diferentemente do observado no presente trabalho, as folhas provenientes de mudas de 30 e 40 dias apresentaram o melhor potencial regenerativo, com  $53 \pm 30\%$  e  $33 \pm 11\%$ , respectivamente. As folhas mais jovens e as mais velhas apresentaram a menor capacidade de formação de gemas com  $13 \pm 11\%$  (BARRUETO CID *et al.*, 1999).

Uma outra característica importante da utilização de explantes jovens está na resposta regenerativa mais rápida quando comparada com explantes mais velhos. Neste sentido, Sriskandarajah *et al.* (2004) verificaram que brotos transformados de hipocótilos de doze dias iniciaram a calogênese 10 dias após a inoculação com a bactéria e os primórdios foliares começaram a aparecer depois de 21 dias. Em contraste, hipocótilos de 35 dias iniciaram a formação de calos depois de 20 dias, mas não chegaram a produzir brotos.

### 3.3.3 Efeito do tipo de explante foliar

A análise de variância aplicada aos resultados obtidos após 30 dias de cultivo (Anexo 06) revelou que não houve interação entre os fatores analisados. Houve diferenças significativas para os clones e as partes da folha testadas, para a variável calo. Já a variável calos oxidados apresentou diferenças significativas entre os clones.

Para os dois clones houve maior porcentagem de explantes com calos com a utilização da parte basal da folha, seguida da apical e da folha inteira. Com a utilização do clone 11 houve maior porcentagem de calos. A maior porcentagem de calos oxidados foi verificada para o clone 827 (Tabela 03).

TABELA 03 - Calogênese em explantes foliares dos clones 11 e 827 de *E. grandis* x *E. urophylla*, em função do tipo de explante (parte basal, apical ou folha inteira), com avaliação após 30 dias de cultivo.

Parte folha	Calos (%)			Calos oxidados (%)				
	Clone 11		Clone 827		Clone 11		Clone 827	
Basal	84,00	a A	78,00	a B	4,00	a B	8,00	a A
Apical	74,00	b A	68,00	b B	6,00	a B	8,00	a A
Folha inteira	44,00	c A	34,00	c B	6,00	a B	6,00	a A

Médias seguidas da mesma letra minúscula na vertical, para parte da folha, e médias seguidas da mesma letra maiúscula na horizontal, para clones, não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Os resultados da análise de variância estão apresentados no Anexo 06.

Após 90 dias de cultivo foi constatada interação entre os fatores clone e parte da folha para as variáveis calos com gema e oxidação. Para as variáveis calos sem gema e número de gemas por explante os fatores foram significativos isoladamente (Anexo 07).

Houve diferenças no potencial regenerativo entre o clone 11 e o 827 (Tabela 04). O clone 11 apresentou maior formação de calos com gemas, com exceção do tratamento que utilizou folhas inteiras, e maior número de gemas por explante. Já com o clone 827 não houve formação de gemas, evidenciando assim a superioridade regenerativa do clone 11. A melhor resposta do clone 11 já havia sido evidenciada aos 30 dias (Tabela 03), com uma maior porcentagem de explantes formando calos.

Houve maior formação de calos e de calos com gema quando a folha foi seccionada e utilizada sua parte basal e apical, para o clone 11. Foi observada maior porcentagem de calos com gemas com a parte basal da folha, seguida da apical e da folha inteira, com diferenças significativas entre estes tratamentos. Já para o clone 827 não houve diferença estatística na porcentagem de calos com gema, entre os tratamentos testados.

Com relação ao número de gemas por explante não houve diferença significativa entre os tratamentos para os dois clones testados. Porém, ocorreu aumento no número de gemas com a utilização de meias folhas.

TABELA 04 - Calogênese e regeneração de gemas em explantes foliares dos clones 11 e 827 de *E. grandis* x *E. urophylla*, em função do tipo de explante foliar (basal, apical e folha inteira), com avaliação após 90 dias de cultivo.

Parte folha	Clone 11			Clone 827		
	Calos sem gema (%)					
Basal	30,00	a	B	48,00	a	A
Apical	32,00	a	B	44,00	a	A
Folha inteira	16,00	b	B	28,00	b	A
Calos com gema (%)						
Basal	42,00	a	A	12,00	a	B
Apical	34,00	b	A	10,00	a	B
Folha inteira	10,00	c	A	6,00	a	A
Nº gemas/ explante regenerando						
Basal	5,10	a	A	3,04	a	B
Apical	5,40	a	A	2,26	a	B
Folha inteira	3,00	a	A	2,00	a	B
Oxidação (%)						
Basal	28,00	b	B	40,00	b	A
Apical	34,00	b	B	46,00	b	A
Folha inteira	74,00	a	A	66,00	a	A

Médias seguidas da mesma letra minúscula na vertical, para parte da folha, e médias seguidas da mesma letra maiúscula na horizontal, para clones, não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Os resultados da análise de variância estão apresentados no Anexo 07.

Diferenças com a utilização da parte basal e apical da folha também foram verificadas para *E. camaldulensis*, para o qual somente na parte basal houve regeneração, apresentando média de 0,7 brotações por calo (QUISEN, 2007). Hervé *et al.* (2001), verificaram que na região próxima ao pecíolo da folha de *E. gunnii* houve a formação de protuberâncias que culminaram na regeneração de gemas. Estas folhas não apresentaram competência celular para a regeneração de gemas, quando a região próxima ao pecíolo da folha foi removida. Segundo os autores, estas protuberâncias foram originadas de regiões meristemáticas localizadas na base foliar e conectadas aos feixes vasculares, apresentando alta taxa de divisão celular. Este envolvimento do sistema vascular na regeneração de gemas já havia sido relatado para *Cichorium intybus* (endívia) (PIÉRON; WATILLON, 2001) e para *Malus domestica* e *Prunus canescens* (DRUART, 1990).

### 3.3.4 Efeito da duração da subcultura em meio BIT

O resultado da análise de variância, após 30 dias de cultivo, está apresentado no Anexo 08. Observou-se que para a variável explantes com calos houve interação entre os

fatores clone e duração da subcultura em meio BIT. Para a porcentagem de calos oxidados não houve interação entre os fatores, mas com diferenças significativas para os fatores isolados.

Com relação à variável porcentagem de calos formados houve aumento com a diminuição da duração das subculturas em meio de cultura BIT. No caso do clone 827, não houve diferença significativa entre os tratamentos. Em geral, houve baixa porcentagem de calos oxidados para todos os tratamentos analisados (Tabela 05).

TABELA 05 - Calogênese e regeneração de gemas em explantes foliares dos clones 11 e 827 de *E. grandis* x *E. urophylla* em função da duração da subcultura em meio BIT (5, 10 e 14 dias), com avaliação após 30 dias de cultivo.

Número de dias no meio BIT	Calos (%)			Calos oxidados (%)		
	Clone 11		Clone 827	Clone 11		Clone 827
5	76,00	a A	70,00 a A	4,00 b A	2,00 b B	
10	68,00	ab A	72,00 a A	6,00 a A	4,00 a B	
14	60,00	b B	74,00 a A	6,00 a A	4,00 a B	

Médias seguidas da mesma letra minúscula na vertical, para dias em meio BIT, e médias seguidas da mesma letra maiúscula na horizontal, para clones, não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Os resultados da análise de variância estão apresentados no Anexo 08.

Na avaliação realizada após 90 dias de cultivo houve interação entre os fatores clone e número de dias em meio BIT para as variáveis testadas, com exceção das variáveis número de calos sem gema e oxidação, as quais apresentaram significância apenas para o fator clone (Anexo 09).

Houve diferença significativa entre os clones testados, sendo observada maior porcentagem de calos sem gema para o clone 827 e de calos com gemas para o clone 11 (Tabela 06). O número de gemas por explante também foi maior em explantes do clone 11. Com relação à oxidação foi verificada maior porcentagem para o clone 11.

O clone 827 não apresentou diferenças significativas entre os resultados nos três tratamentos (Tabela 06). Já para o clone 11, a duração da cultura em meio BIT teve efeito na regeneração dos explantes, o que pode ser evidenciado com a maior porcentagem de calos com gemas e o maior número de gemas por explante com subcultura a cada 5 dias em BIT, sem repicagem, seguido de 10 e de 14 dias. Porém, para o número de gemas, os tratamentos com 5 e 10 dias são estatisticamente iguais, diferindo estes apenas do tratamento com 14 dias.

TABELA 06 - Calogênese e regeneração de gemas em explantes foliares dos clones 11 e 827 de *E. grandis* x *E. urophylla*, em função do período (5, 10 e 14 dias) de permanência dos explantes sem repicagem em meio BIT, com avaliação após 90 dias de cultivo.

Permanência no meio BIT (dias)	Clone 11				Clone 827			
	Calos sem gema (%)							
5	28,00	a	B	60,00	a	A		
10	32,00	a	B	62,00	a	A		
14	38,00	a	B	64,00	a	A		
Calos com gema (%)								
5	30,00	a	A	6,00	a	B		
10	20,00	b	A	4,00	a	B		
14	12,00	c	A	4,00	a	B		
Nº gemas/ explante regenerando								
5	4,86	a	A	2,12	a	B		
10	4,00	a	A	1,50	a	B		
14	2,82	b	A	1,74	a	B		
Oxidação (%)								
5	42,00	a	A	34,00	a	B		
10	48,00	a	A	34,00	a	B		
14	50,00	a	A	32,00	a	B		

Médias seguidas da mesma letra minúscula na vertical, para dias de repicagem, e médias seguidas da mesma letra maiúscula na horizontal, para clones, não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Os resultados da análise de variância estão apresentados no Anexo 09.

O BIT é um meio de cultura definido para o híbrido *E. grandis* x *E. urophylla* como um meio indutor na formação de gemas (TOURNIER *et al.*, 2003). Estes autores utilizam este meio realizando a repicagem dos explantes foliares a cada cinco dias. Entretanto, como a resposta regenerativa dos explantes varia não só com a espécie, mas com o clone, e no caso do presente trabalho foram utilizados clones diferentes dos autores citados acima, foram testados além de cinco dias, repicagens a cada 10 e 14 dias. De acordo com os resultados obtidos, fica clara a variação na resposta de calogênese, formação de gemas e número de gemas formadas por explante de um clone para o outro. O clone 11 proporcionou a resposta observada pelos autores citados acima, respondeu melhor com a repicagem realizada a cada cinco dias. Desta forma, para uma maior formação de calos com gemas é necessária maior frequência de repicagem dos explantes foliares. Porém o clone 827 apresentou um padrão de resposta diferente, não sendo constatadas diferenças estatísticas entre os tempos de repicagens testados, para todas as variáveis analisadas.

O fato do clone 827 não apresentar diferença na resposta regenerativa com o aumento na frequência de repicagem possivelmente esteja relacionado com a baixa resposta de indução de gemas (Tabela 06). Isto pode ocorrer devido à ausência ou a

insuficiência de estímulos internos que possibilitem a indução da formação de gemas. Um outro fator que pode estar influenciando a ausência de resposta do clone 827 com relação aos tratamentos testados é o fato dos estímulos externos, como o meio de cultura e a luminosidade, não ter sido suficientes para estimular a formação de gemas, sendo neste caso indiferente a frequência de repicagem. Em geral dois genótipos reagem a um mesmo estímulo de maneira diferente. Isto se dá pelas variações morfológicas, bioquímicas e fisiológicas resultantes da expressão diferenciada dos genes (SRIVASTAVA, 2001). Estudos sugerem considerável variação na resposta regenerativa dos explantes em resposta a diferenças genéticas. Em um estudo com oito clones de *E. grandis*, foram observadas diferenças no requerimento de reguladores de crescimento para potencial organogênico entre os diferentes clones (LAINÉ; DAVID, 1994).

### 3.4 CONCLUSÕES

Fundamentando-se nos resultados obtidos no presente trabalho, conclui-se que:

- Os clones testados de *E. grandis* x *E. urophylla* apresentam diferenças na capacidade regenerativa. O clone 11 apresentou maior potencial organogênico e respondeu melhor aos tratamentos testados, quando comparado ao clone 827;
- A utilização de explantes foliares coletados de brotações repicadas a cada 17 dias é o indicado para a regeneração de *E. grandis* x *E. urophylla*, por apresentar superioridade regenerativa quando comparado aos repicados a cada 26 ou 35 dias;
- A capacidade regenerativa do clone 11 apresenta diferença de acordo com o tipo de explante foliar utilizado, com maior eficiência para a parte basal;
- Para o clone 11, a regeneração dos explantes foliares é influenciada positivamente com o aumento na frequência de repicagem dos explantes em meio BIT.

### 3.5 REFERÊNCIAS

- ALVES, E. C. S. de C.; XAVIER, A.; OTONI, W. C. Organogênese de explante foliar de clones de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, p. 421-430, 2004.
- BARRUETO CID, L. P. B.; MACHADO, A. C. M. G.; CARVALHEIRA, S. B. R. C.; BRASILEIRO, A. C. M. Plant regeneration from seedling explants of *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 56, p. 17-23, 1999.
- BECERRA, D. C.; FORERO, A. P.; GÓNGORA, G. A. Age and physiological condition of donor plants affect *in vitro* morphogenesis in leaf explants of *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 79, p. 87-90, 2004.
- DIOUF, D. Genetic transformation of forest trees. **African Journal Biotechnology**, v. 2, p. 328-333, 2003.
- DRUART, P. Effect of culture conditions and leaf selection on organogenesis of *Malus domestica* cv. McIntosh 'Wijcik' and *Prunus canescens* Bois GM79. **Acta Horticulturae**, v. 280, p. 117-124, 1990.
- FAMIANI, F.; FERRADINI, N.; STAFFOLANI, P.; STANDARDI, A. Effect of leaf excision time and age, BA concentration and dark treatments on *in vitro* shoot regeneration of M.26 apple rootstock. **Journal of Horticultural Science**, v. 69, p.679-685, 1994.
- FERREIRA, D. F. **Programa estatístico SISVAR (Software)**. Lavras:UFLA, 1999.
- GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture: the technology**. Great Britain: Exegetics Limited, 1993. v.1, 574 p.
- GONZÁLEZ, E. R.; ANDRADE, A.; BERTOLO, A. L.; LACERDA, G. C.; CARNEIRO, R. T.; DEFÁVARI, V. A. P.; LABATE, M. T. V.; LABATE, C. A. Production of transgenic *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* using the sonication-assisted *Agrobacterium* transformation (SAAT) system. **Functional Plant Biology**, v.29, p.97-102, 2002.



GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: Embrapa - SPI/Embrapa, 1998. p.183-260.

HERVÉ, P.; JAUNEAU, A.; PÂQUES, M.; MARIEN, J. N.; BOUDET, A. M.; TEULIÈRES, C. A procedure for shoot organogenesis *in vitro* from leaves and nodes of an elite *Eucalyptus gunnii* clone: comparative histology. **Plant Science**, v. 161, p. 645-653, 2001.

LAINÉ, E.; DAVID, A. Regeneration of plants from leaf explants of micropropagated clonal *Eucalyptus grandis*. **Plant Cell Reports**, v. 13, p. 473-476, 1994.

McCOWN, B. H.; SELLMER, J. C. General media and vessels suitable for woody plant microculture. In: BONGA, J. M.; DURZAN, D. J. (Ed.). **Cell and tissue culture in forestry**. Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers, p. 4-14, 1987.

MULLINS, K. V.; LLEWELLYN, D. J.; HARTNEY, V. J.; STRAUSS, S.; DENNIS, E. S. Regeneration and transformation of *Eucalyptus camaldulensis*. **Plant Cell Reports**, v. 16, p. 787-791, 1997.

MURALIDHARAN, E. M.; MASCARENHAS, A. F. *In vitro* plantlet formation by organogenesis in *Eucalyptus camaldulensis* and by somatic embryogenesis in *Eucalyptus citriodora*. **Plant Cell Reports**, v. 6, p. 256-259, 1987.

PÉREZ-TORNERO, O.; EGEA, J.; VANOOSTENDE, A.; BURGOS, L. Assessment of factors affecting adventitious shoot regeneration from *in vitro* cultured leaves of apricot. **Plant Science**, v. 158, p. 61-70, 2000.

PIÉRON, S.; WATILLON, B. Expression of a chimeric GUS gene construct as a tool to study nodule morphogenesis in chicory leaves. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 66, p. 159-165, 2001.

QUISEN, R. C. **Transformação genética de *Eucalyptus camaldulensis* via cocultivo com *Agrobacterium tumefaciens***. Tese de doutorado. Programa de Pós- Graduação em Agronomia – Produção Vegetal. Universidade Federal do Paraná, 2007.

SERRANO, L.; ROCHANGE, F.; SEMBLAT, J. P.; MARQUE, C.; TEULIÈRES, C.; BOUDET, A. M. Genetic transformation of *Eucalyptus globulus* through biobalistics: complementary development of procedures for organogenesis from zygotic embryos and stable

transformation of corresponding proliferating tissue. **Journal of Experimental Botany**, v. 47, p. 285-290, 1996.

SRISKANDARAJAH, S.; FRELLO, S.; JORGENSEN, K.; SEREK, M. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Campanula carpatica*: factors affecting transformation and regeneration of transgenic shoots. **Plant Cell Reports**, v. 23, p.59–63, 2004.

SRIVASTAVA, L. M. **Plant growth and development**. 1 ed. Califórnia: Academic Press, 2001. 772 p.

SUBBAIAH, M. M.; MINOCHA, S. C. Shoot regeneration from stem and leaf callus of *Eucalyptus tereticornis*. **Plant Cell Reports**, v. 9, p. 370-373, 1990.

TANG, G. X.; ZHOU, W. J.; LI, H. Z.; MAO, B. Z.; HE, Z. H.; YONEYAMA, K. Medium, explant and genotype factors influencing shoot regeneration in oilseed *Brassica* spp. **Journal of Agronomy & Crop Science**, v. 189, p. 351-358, 2003.

TIBOK, A.; BLACKHALL, N. W.; POWER, J. B.; DAVEY, M. R. Optimized plant regeneration from callus derived from seedling hypocotyls of *Eucalyptus urophylla*. **Plant Science**, v. 110, p. 139-145, 1995.

TOURNIER, V.; GRAT, S.; MARQUE, C.; EL KAYAL, W.; PENCHEL, R.; ANDRADE, G. de; BOUDET, A. M.; TEULIÈRES, C. An efficient procedure to stably introduce genes into an economically important pulp tree. **Transgenic Research**, v. 12, p. 403-411, 2003.

#### 4 OTIMIZAÇÃO DA TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA EM *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* VIA *Agrobacterium tumefaciens*

##### RESUMO

O híbrido *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* apresenta alta produtividade e potencial para indústrias de papel, celulose e fibras. Em função da sua importância econômica, existe interesse no desenvolvimento de técnicas de transformação genética que possam ser incorporadas a um programa de melhoramento genético, potencializando os ganhos obtidos, encurtando os ciclos de produção e promovendo a geração de plantios de alta qualidade. Visando estabelecer condições adequadas para a transformação genética via co-cultivo com *Agrobacterium tumefaciens*, o presente trabalho teve como objetivo avaliar alguns fatores que influem no processo de transformação. Segmentos foliares foram co-cultivados com a cepa AGL1, contendo o vetor binário pKGWFS7, com o gene repórter *uidA* sob controle do promotor CaMV35S e o gene de seleção *nptII*, sob controle do promotor da nopalina sintetase. Análises histoquímicas da expressão do gene *uidA* foram realizadas, cinco e 12 dias após inoculação com *A. tumefaciens*, para avaliar os efeitos da pré-cultura (1 e 2 dias) e da co-cultura (3 e 5 dias) de explantes foliares de *E. grandis* x *E. urophylla*. Além destes fatores, foram analisados os efeitos da cepa de agrobactéria (AGL1, C58C1 e EHA 105) e do uso de acetosiringona (50 µM) na pré e co-cultura. A pré-cultura de dois dias proporcionou as melhores respostas de expressão do gene *uidA*. Com cinco dias de co-cultura, houve maior porcentagem de explantes expressando GUS na primeira avaliação, porém, na avaliação realizada 12 dias após a inoculação, não houve diferença de expressão com três e cinco dias de co-cultura. Explantes transformados com a cepa AGL1 apresentaram as maiores porcentagens de expressão GUS. Após cinco dias da inoculação com a bactéria houve um aumento na porcentagem de explantes com expressão GUS, com o uso da acetosiringona na pré-cultura, porém, na avaliação após 12 dias da inoculação, a maior porcentagem de explantes expressando o gene *uidA* ocorreu com o uso da acetosiringona na pré e co-cultura. Conclui-se, neste trabalho, que as condições que mostraram-se mais eficientes na transformação genética de *E. grandis* x *E. urophylla* são dois dias de pré-cultura e três dias de co-cultura, a cepa AGL1 e o uso da acetosiringona nos meios de pré e co-cultura.

**Palavras-chave:** eucalipto, planta transgênica, pré-cultura, co-cultura, acetosiringona, *uidA*.

## OPTIMIZATION OF *Agrobacterium tumefaciens*-MEDIATED GENETIC TRANSFORMATION OF *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*

### ABSTRACT

The hybrid *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* presents high levels of productivity and potential for use in paper, cellulose and fiber industries. Due to its economic value, the establishment of genetic transformation techniques is interesting, as they can be incorporated into a program of genetic breeding in order to potencialize gains, to shorten production cycles and promote the development of high quality plantations. This study aimed to establish adequate conditions for genetic transformation via co-cultivation with *Agrobacterium tumefaciens*. Some factors that affect the transformation process were evaluated. Leaf segments were co-cultivated with AGL1 strain containing the binary vector pKGWFS7 with the reporter gene *uidA* under control of CaMV35S promoter and *nptII* gene under control of nopaline synthetase promoter. Histochemical analyses of *uidA* gene expression were conducted five and twelve days after the inoculation with *A. tumefaciens* in order to evaluate the effects of pre-culture (1 and 2 days) and of co-culture (3 and 5 days) of *E. grandis* x *E. urophylla* leaf explants. The effect of *Agrobacterium* strain (AGL1, C58C1 and EHA 105) was also analyzed as well as the use of acetosyringone (50  $\mu$ M) in pre and co-culture. The two days pre-culture propiciated the best response for *uidA* gene expression. After five days of co-culture there was a highest percentage of GUS expression explants. After 12 days there was no difference of expression after three and five days of co-culture. Explants transformed with the AGL1 strain presented the best percentage of GUS expression. Five days after the bacterial inoculation there was an increase in the percentage of GUS expression when acetosyringone was added to the pre-culture medium, however in the evaluation of the 12<sup>th</sup> day the highest percentage of *uidA* expression occurred when acetosyringone was used in the pre and co-culture. In conclusion, the most efficient conditions during genetic transformation of *E. grandis* x *E. urophylla* were two days of pre-culture and three days of co-culture, the AGL1 strain and the use of acetosyringone in pre and co-culture media.

**Key-words:** eucalypt, transgenic plant, pre-culture, co-culture, acetosyringone, *uidA*.

## 4.1 INTRODUÇÃO

As espécies de *Eucalyptus* estão entre as mais amplamente plantadas no mundo, com mais de 17,8 milhões de hectares (BRACELPA, 2007). A cultura intensiva em reflorestamentos comerciais, com poucas espécies de eucalipto ocorre em função do seu rápido crescimento, em média 45 a 60 m<sup>3</sup>/ha/ano em plantios clonais (ALFENAS *et al.*, 2004). Além de seu rápido crescimento, o curto período de corte, de cinco a sete anos, é um fator importante que permite até três rotações sucessivas, com ciclos que podem chegar a 21 anos (HO *et al.*, 1998).

No Brasil, o híbrido *E. grandis* x *E. urophylla* tem se destacado bastante, devido principalmente às propriedades da sua madeira, habilidade de enraizamento e resistência ao cancro (ALFENAS *et al.*, 2004). A superioridade demonstrada com maior homogeneidade dos plantios com híbrido, tem sido atingida com o desenvolvimento de programas de melhoramento genético, o que tem gerado ganhos em produtividade bastante expressivos. Entretanto, existem novas tecnologias que podem potencializar ainda mais os ganhos obtidos em programas de melhoramento genético.

A transformação genética de clones selecionados é um instrumento importante no desenvolvimento de novos genótipos. Alguns avanços já têm sido realizados neste sentido, o que pode ser constatado em trabalhos que visam ao aumento no crescimento, modificações nas propriedades das fibras, aumento na polimerização de celulose, modificações na biossíntese e/ou redução na quantidade de lignina, resistência a herbicidas e a insetos e tolerância a estresses abióticos (QUOIRIN; QUISEN, 2006).

Existem diversos fatores que podem afetar a transformação genética por meio de *A. tumefaciens*, dentre os quais destacam-se a presença de compostos fenólicos, como a acetosiringona, o pré-cultivo e co-cultivo dos explantes, as cepas de *A. tumefaciens*, a composição da suspensão bacteriana, o genótipo da planta e o tipo de tecido utilizado como explante para a transformação (QUOIRIN; QUISEN, 2006).

Após a realização da transformação genética, torna-se importante a diferenciação das células transgênicas por observação visual, para isto faz-se o uso de genes marcadores. Dentre os genes mais utilizados está o *uidA*, que codifica a enzima  $\beta$ -glucuronidase (JEFFERSON, 1987). Sua ampla aceitação deve-se a simplicidade, rapidez e versatilidade do método de detecção da atividade enzimática. No entanto, o método apresenta algumas limitações, como o fato dos ensaios serem destrutivos e de que algumas

plantas ou tecidos apresentam atividade endógena semelhante a da  $\beta$ -glucuronidase, o que poderá interferir na análise histoquímica (HODAL *et al.*, 1992). Porém, mesmo com as limitações do método, a expressão do gene *uidA* é bastante utilizada por permitir uma evidência de transformação e por possibilitar determinações importantes associadas ao método de transformação genética, auxiliando em futuros trabalhos com transformação genética.

O presente trabalho teve como objetivo otimizar a transformação genética de explantes foliares de *E. grandis* x *E. urophylla*, via co-cultivo com *A. tumefaciens*. Para isto, foram testados fatores que influem na eficiência da transformação genética, como: cepas de *A. tumefaciens*, o efeito da pré e co-cultura e da acetosiringona, utilizando o gene *uidA* como marcador da transformação.

## 4.2 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi conduzido no Laboratório de Micropropagação de Plantas, Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo do Setor de Ciências Agrárias, da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná. O Laboratório apresenta Certificado de Qualidade em Biossegurança (Nº 0114/99).

### 4.2.1 Material vegetal

Para todos os experimentos, utilizaram-se plântulas matrizes de *E. grandis* x *E. urophylla*, oriundas de sementes obtidas do IPEF (Instituto de Pesquisas Florestais), Piracicaba, São Paulo, e germinadas *in vitro*. Vários clones foram selecionados com base na velocidade de aparecimento de gemas adventícias. Para o estudo dos fatores que influenciam a transformação genética foi utilizado o clone 11, devido ao seu melhor desempenho nos ensaios de regeneração.

### 4.2.2 Condições de cultura *in vitro*

As culturas foram mantidas em sala de crescimento, com temperatura de  $25 \pm 2$  °C, sob luz fluorescente branca fria com densidade de fluxo de fótons de  $30 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  e fotoperíodo de 16 h.

Os tufos de gemas de *E. grandis* x *E. urophylla* foram cultivados em frascos de vidro de 6 cm de diâmetro e 9 cm de altura, com 35 mL de meio de cultura M em cada, vedados com tampa de polipropileno rígido. A repicagem foi realizada a cada 30 dias, utilizando o meio de cultura M, suplementado com 3% de sacarose e 0,7% de ágar (Vetec®) (Anexo 01).

Os explantes foliares foram mantidos em placas de Petri de vidro de 10 cm de diâmetro e 2 cm de altura, contendo 25 mL de meio de cultura, vedadas com filme plástico. O meio de cultura e o tempo que cada explante foliar permaneceu no meio variaram de acordo com a fase de desenvolvimento, conforme detalhado no item 4.2.5.

Os meios de cultura em que foram mantidos os explantes foliares foram suplementados com 3% de sacarose e 0,6% ou 0,7% de agar, dependendo do meio de

cultura utilizado (Vetec®). O pH dos meios descritos acima foram ajustados em 5,6, antes da esterilização em autoclave a 1 atm e 121 °C por 20 min.

#### 4.2.3 Cepas de *A. tumefaciens* com diferentes construções gênicas

Para todos os ensaios que avaliaram os fatores que influenciam a transformação genética foi utilizada a cepa AGL1. Para o ensaio que analisou o efeito de três tipos de cepas, foram utilizadas também as cepas C58C1 e EHA 105.

A cepa AGL1 continha o vetor binário pKGWFS7 (KARIMI *et al.*, 2002). Este vetor contém o gene marcador de seleção da neomicina fosfotransferase II (*nptII*), que confere resistência à canamicina, e o gene repórter *uidA*, que codifica a enzima  $\beta$ -glucuronidase (JEFFERSON, 1987). O gene *nptII* está sob controle do promotor do gene da nopalina sintetase (*nos*) e o *uidA* apresenta sua expressão regulada pelo promotor CaMV 35S. A cepa C58C1 continha o vetor binário pBIN19 (BEVAN, 1984), com o gene *uidA* sob controle do promotor do gene *cgMT1* (LAPLAZE *et al.*, 2002) e o gene de seleção *nptII*, sob controle do promotor *nos* (QUISEN, 2007). A cepa EHA105 continha o vetor binário pBI121-P5CSF129A (HONG *et al.*, 2000), carregando o gene *uidA*, o gene mutante *p5cs* de *Vigna aconitifolia*, ambos sob controle do CaMV 35S, e o gene *nptII*, sob controle do promotor *nos*.

#### 4.2.4 Crescimento bacteriano

As bactérias foram cultivadas em meio de cultura YEB sólido (MILLER, 1972) (Anexo 02), suplementado com os antibióticos de seleção, mantidas no escuro a  $25 \pm 2$  °C, por 48 h. Após este período, a colônia selecionada foi inoculada em 5 mL do mesmo meio, líquido, e incubada a 28 °C, por 16 h, sob agitação constante de 120 rpm. Posteriormente, a suspensão líquida foi preparada centrifugando a suspensão bacteriana a 5000 rpm, por 10 min. O pellet formado foi ressuspenso em meio de cultura C (Anexo 01), até a obtenção de  $DO_{600nm}$  em torno de 0,5. Antibióticos de seleção foram adicionados ao meio YEB sólido e líquido de acordo com a cepa utilizada. No caso da AGL1, o meio foi suplementado com canamicina ( $50 \text{ mg.L}^{-1}$ ), ampicilina ( $50 \text{ mg.L}^{-1}$ ) e rifampicina ( $50 \text{ mg.L}^{-1}$ ). Para a C58C1 foi adicionado ao meio canamicina ( $50 \text{ mg.L}^{-1}$ ) e para a EHA105, canamicina ( $50 \text{ mg.L}^{-1}$ ) e rifampicina ( $25 \text{ mg.L}^{-1}$ ).



#### 4.2.5 Condições de inoculação dos explantes

Explantes foliares foram isolados de tufos de gemas do clone 11, mantidos em condições de multiplicação *in vitro*, 15 dias após a última repicagem. Foram escolhidas folhas jovens, retiradas das partes superiores das brotações, selecionadas e seccionadas em duas partes no sentido transversal, na presença de solução antioxidante (Anexo 03). Posteriormente, essas foram pré-cultivadas no escuro por dois dias em sala de crescimento, com a face abaxial em contato com o meio BIP, com adição de 50  $\mu\text{M}$  de acetosiringona (AS).

Para a inoculação dos explantes, estes foram retirados do meio BIP, imersos em suspensão bacteriana com  $\text{DO}_{600\text{nm}}$  em torno de 0,5 e agitadas por 30 min a 120 rpm. Após o contato com a suspensão bacteriana, os explantes foram secos em papel filtro estéril e incubados em meio de cultura A2 (Anexo 01), com adição de 50  $\mu\text{M}$  de AS e mantidos em sala de crescimento, no escuro, por cinco dias. Após a co-cultura, os explantes foram transferidos para meio de cultura BIT (Anexo 01), suplementado com canamicina (50  $\text{mg.L}^{-1}$ ) e cefotaxima (500  $\text{mg.L}^{-1}$ ), por 15 dias, sendo repicados a cada cinco dias, sob condição de meia luz, com densidade aproximada de fluxo de fótons de 10  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . Após os 22 dias de cultivo inicial, os explantes foram transferidos para meio SDM (Anexo 01), com canamicina (50  $\text{mg.L}^{-1}$ ) e cefotaxima reduzida pela metade (250  $\text{mg.L}^{-1}$ ), por um período total de 68 dias, com repicagem a cada 14 dias. Nas duas primeiras semanas que os explantes foram mantidos em SDM, foi utilizada condição de fluxo de fótons de 10  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  e posteriormente, nos 56 dias, foram mantidos sob condição de plena luminosidade, com densidade de fluxo de fótons de 30  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ .

Para todos os ensaios foi adicionado um controle negativo, que consistiu de explantes não inoculados em suspensão bacteriana e cultivados nos mesmos meios de cultura, citados anteriormente, utilizados para os explantes transformados.

#### 4.2.6 Condições da pré-cultura dos explantes

Foi verificado o efeito da utilização da pré-cultura dos tecidos vegetais e seu tempo de duração. Foram realizados três tratamentos: t1) ausência de pré-cultura; t2) pré-cultura de um dia e t3) pré-cultura de dois dias.

Neste experimento, foi utilizado Augmentin<sup>®</sup> (amoxicilina e clavulonato de potássio), na concentração de 300  $\text{mg.L}^{-1}$  no meio BIT, sendo reduzido para 150  $\text{mg.L}^{-1}$  no meio SDM.

#### 4.2.7 Condições da co-cultura dos explantes

Foi analisado o efeito da co-cultura dos explantes com a bactéria e seu tempo de duração, com t1) ausência de co-cultura; t2) co-cultura de três dias e t3) co-cultura de cinco dias.

Neste experimento foi utilizado Augmentin<sup>®</sup> (amoxicilina e clavulonato de potássio), na concentração de 300 mg.L<sup>-1</sup> no meio BIT, sendo reduzido para 150 mg.L<sup>-1</sup> no meio SDM.

#### 4.2.8 Acetosiringona (AS)

Os segmentos foliares (meia folha) foram pré- e co-cultivados com e sem AS, sendo a concentração final no meio de cultura de 50 µM. Os tratamentos foram os seguintes: t1) pré e co-cultivo com AS; t2) pré-cultivo com AS e co-cultivo sem AS; t3) pré-cultivo sem AS e co-cultivo com AS e t4) pré e co-cultivo sem AS.

#### 4.2.9 Ensaio histoquímico da β-glucuronidase

A influência de diferentes fatores que afetam a transformação genética de *E. grandis* x *E. urophylla* por co-cultura com *A. tumefaciens* foi avaliada após cinco dias de co-cultura e sete dias em meio seletivo (12 dias após a inoculação com a bactéria), por meio da expressão transiente da enzima β-glucuronidase em explantes foliares.

Para cada experimento citado anteriormente foi realizado o teste histoquímico da β-glucuronidase, sendo utilizados 10 explantes foliares por tratamento. As folhas foram imersas em tampão xGluc (JEFFERSON, 1987) contendo: 10mM Na<sub>2</sub>EDTA.H<sub>2</sub>O, 0,1% Triton X-100; 0,1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,5 K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> e 250 µg.mL<sup>-1</sup> de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-glucuronídeo e mantidas em estufa a 37 °C por 16 h. Posteriormente, os explantes foram lavados e imersos em etanol 70%, para eliminação da clorofila, facilitando assim a visualização.

#### 4.2.10 Desenho experimental e avaliação

Foram realizadas duas avaliações da expressão do gene *uidA*, mediante análise de imagem com estimativa visual da porcentagem da área do tecido com coloração azulada. A primeira avaliação, 5 dias após a inoculação com *A. tumefaciens* e a segunda, 12 dias após a inoculação com a bactéria. Nas duas avaliações foram utilizados 10 explantes por tratamento e os experimentos foram repetidos duas vezes. Foram avaliados cinco níveis de expressão transiente do gene *uidA*: a) sem expressão, ou seja, ausência de coloração azulada no tecido; b) pontos isolados de expressão; c) áreas de expressão que vão de 5 a 39% da superfície da folha; d) expressão em 40 a 69% da área do tecido e e) expressão em 70 a 100% da área foliar.

### 4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas Figuras 05, 06 e 07 é possível visualizar a expressão do gene *uidA* em explantes foliares de *E. grandis* x *E. urophylla*. Na Figura 05 está representada a expressão GUS em explantes foliares, após cinco e doze dias do contato com a bactéria, com destaque para a diferenciação da expressão em pontos e em áreas, bem como para a morfologia dos explantes foliares sem expressão. Nas Figuras 06 e 07 é possível visualizar as diferenças entre as áreas de expressão, 5 a 39%, 40 a 69% e 70 a 100%, após cinco dias do contato com a *A. tumefaciens* (Figura 06) e após 12 dias do contato com a bactéria (Figura 07).

De forma geral, para todos os ensaios realizados, foi verificada uma diminuição no nível de expressão após 12 dias da inoculação com a bactéria, quando comparado com os resultados após cinco dias da inoculação.

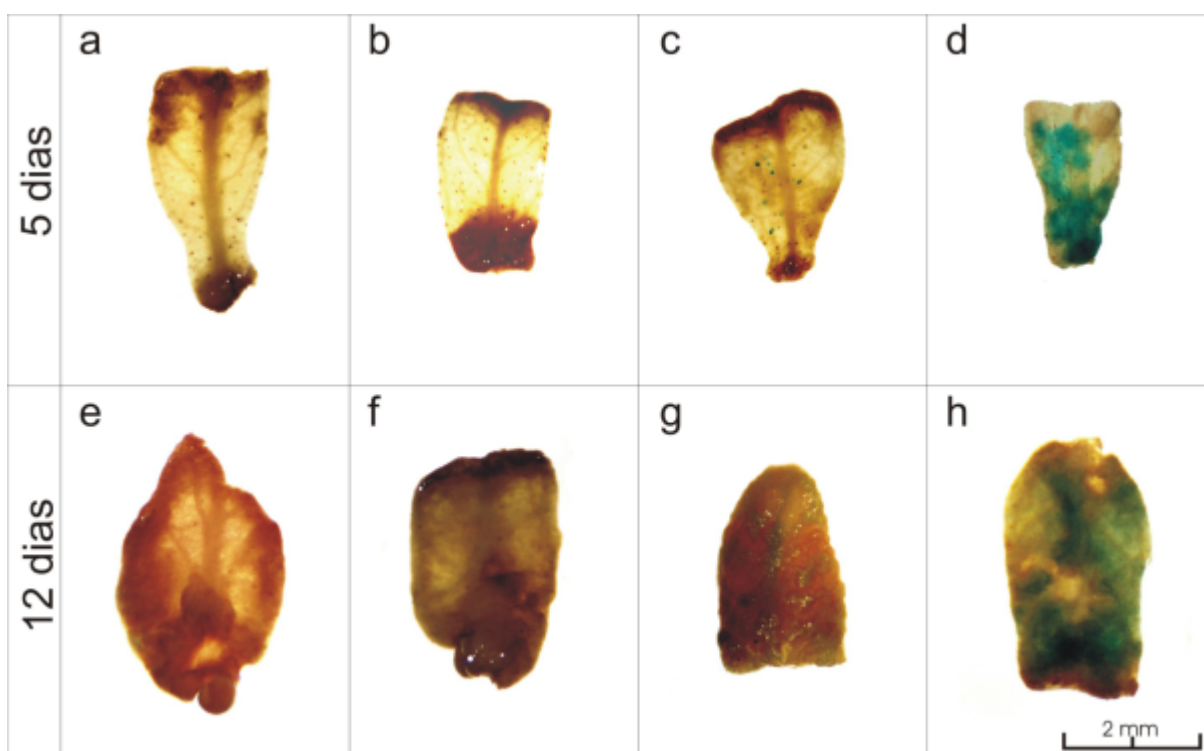


FIGURA 05 – Expressão do gene *uidA* em explantes foliares de *E. grandis* x *E. urophylla*, 5 e 12 dias após a inoculação com a cepa AGL1 de *A. tumefaciens*. a e e) controles, sem inoculação com a bactéria; b e f) sem expressão; c e g) formação de pontos isolados de expressão; d e h) formação de áreas de expressão.

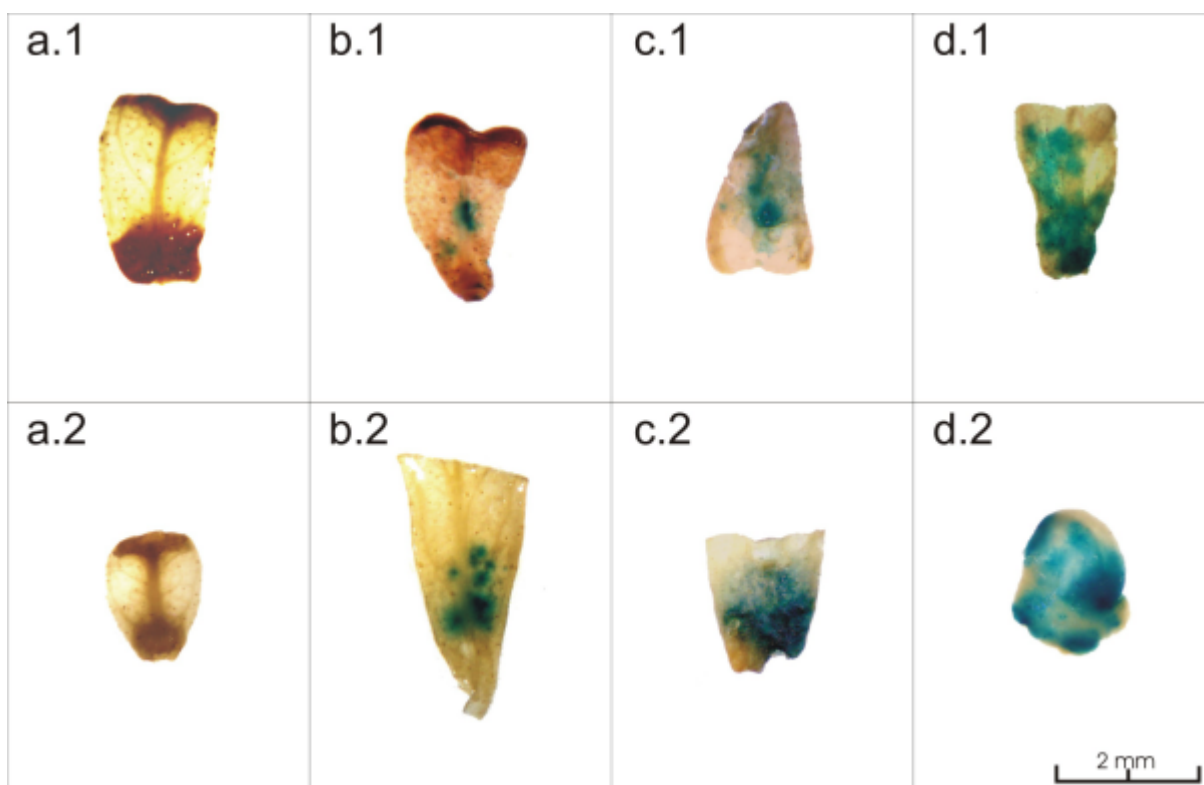


FIGURA 06 – Expressão transiente do gene *uidA* em explantes foliares de *E. grandis* x *E. urophylla*, 5 dias após a inoculação com a cepa AGL1 de *A. tumefaciens*. a.1 e a.2) sem expressão; b.1 e b.2) áreas de expressão de 5 a 39% da superfície da folha; c.1 e c.2) áreas de expressão de 40 a 69% da superfície da folha; d.1 e d.2) áreas de expressão de 70 a 100% da superfície da folha.

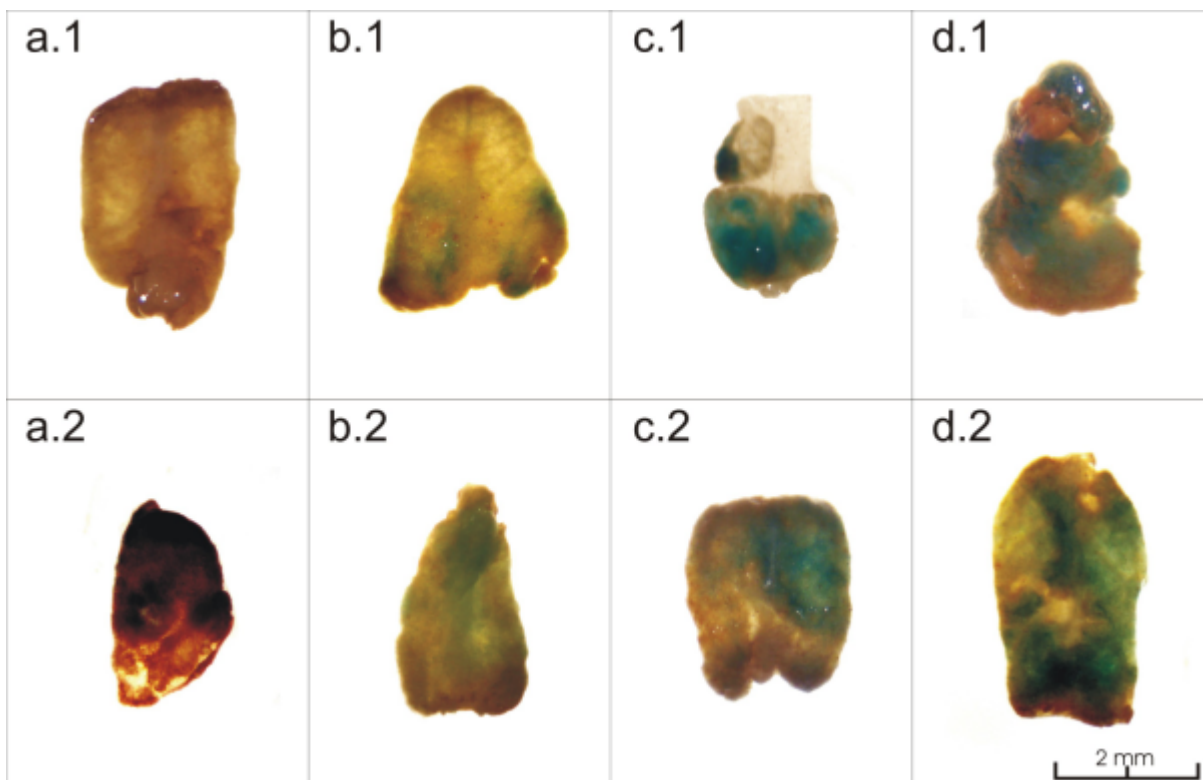


FIGURA 07 – Expressão transiente do gene *uidA* em explantes foliares de *E. grandis* x *E. urophylla*, 12 dias após a inoculação com a cepa AGL1 de *A. tumefaciens*. a.1 e a.2) sem expressão; b.1 e b.2) áreas de expressão de 5 a 39% da superfície da folha; c.1 e c.2) áreas de expressão de 40 a 69% da superfície da folha; d.1 e d.2) áreas de expressão de 70 a 100% da superfície da folha.

#### 4.3.1 Cepas de *A. tumefaciens* com diferentes construções gênicas

Os resultados da expressão transiente do gene *uidA*, de acordo com os diferentes tipos de cepas de *A. tumefaciens*, contendo plasmídeos, genes e promotores diferentes, estão apresentados na Figura 08 e Tabela 07. Os resultados indicam que o tipo de cepa e a construção gênica utilizada influenciaram a expressão do gene *uidA*. A cepa AGL1 e sua respectiva construção foi a que induziu as maiores porcentagens de expressão GUS, tanto para cinco dias após a inoculação, com 100% de expressão, como para 12 dias após a inoculação, com 80% de expressão.

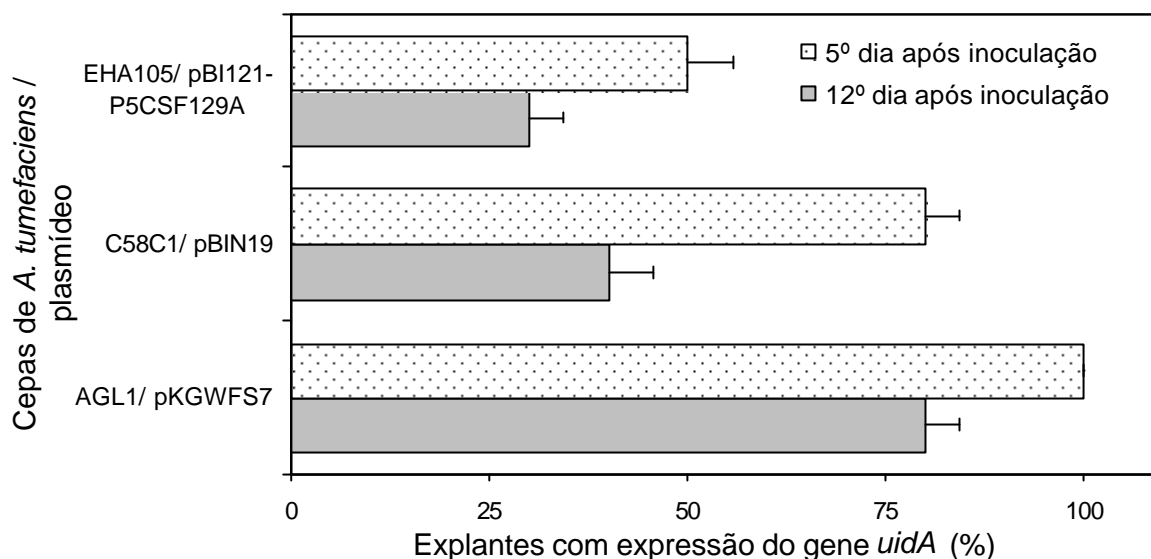


FIGURA 08 – Expressão do gene *uidA* em explantes foliares de *E. grandis* x *E. urophylla*, em função da cepa de *A. tumefaciens* e construção gênica, 5 e 12 dias após a inoculação com a bactéria.

Diferenças na taxa de infecção do tecido vegetal, com a utilização de diferentes tipos de cepas de *A. tumefaciens* também foram verificadas em hipocótilos de *Gossypium hirsutum* (JIN *et al.*, 2005). Nesse estudo, a eficiência da transformação com a cepa LBA4404 foi significativamente melhor do que com a C58C1. Nadolska-Orczyk e Orczyk (2000) testaram três cepas de *A. tumefaciens*, LBA4404, C58C1 e EHA105, quanto à expressão do gene marcador, utilizando o mesmo plasmídeo, na transformação genética de *Pisum sativum* L. Esses autores observaram que a cepa EHA105 foi mais eficiente com 8,2% de plantas resistentes a canamicina no primeiro experimento e 5,6% no segundo. Entretanto com os testes moleculares foram constatados muitos escapes, plantas que se apresentaram resistentes a canamicina, que não eram transformadas.

Com explantes cotiledonares de soja foi verificado que a cepa KYRT1 foi mais efetiva na transformação que a EHA105 (TORISKY *et al.*, 1997). O fato de uma cepa de *Agrobacterium* ser mais efetiva na transformação genética que outras pode estar vinculado à temperatura de co-cultivo (GRANT *et al.*, 2003). Porém, as diferentes respostas na eficiência da transformação de acordo com os tipos de cepas variam de acordo com a espécie vegetal, de forma que uma cepa pode apresentar um resultado satisfatório para uma espécie e não para outra (GRANT *et al.*, 2003).

Em um estudo com *E. camaldulensis* foram comparadas cinco cepas de *A. tumefaciens* (A6, LBA4404, GV3111, AGL1 e GV3850), as quais continham o mesmo vetor binário e os genes *uidA* e *nptII* direcionados pelo promotor 35S do CaMV. Nesse estudo não

foi verificada diferença entre as cepas testadas quanto à expressão do gene *uidA* (MULLINS *et al.*, 1997).

Três cepas de *A. tumefaciens* foram comparadas no presente trabalho, porém foram utilizadas construções com plasmídeos, genes e promotores diferentes, o que tornou difícil a comparação entre as cepas. Como as três cepas com as construções utilizadas estavam disponíveis no laboratório, o ensaio foi realizado visando analisar o melhor nível de expressão do gene *uidA*. Com base na melhor expressão GUS, foi selecionada uma cepa para realizar ensaios visando analisar fatores que afetam a transformação genética de explantes foliares de *E. grandis* x *E. urophylla*.

Com relação à distribuição dos explantes em função da área de expressão (Tabela 07), foram constatados pontos de expressão somente na avaliação após cinco dias da inoculação, e a maior porcentagem de explantes com pontos foi observada com a utilização da cepa AGL1. Em geral, a maioria dos explantes apresenta expressão GUS em 5 a 69% da área, para as cepas testadas. Foi verificado apenas 10% dos explantes inoculados com a cepa C58C1 expressando o gene *uidA* em áreas maiores, de 70 a 100% da área foliar.

TABELA 07 - Área foliar com expressão GUS em explantes de *E. grandis* x *E. urophylla*, após 5 e 12 dias da inoculação com diferentes cepas e construções gênicas de *A. tumefaciens*.

Avaliação	Cepas <i>A. tumefaciens</i> e construção gênica	Sem expressão (%)	Pontos isolados de expressão (%)	Área de expressão (%)		
				5-39%	40-69%	70-100%
5 dias após inoculação	AGL1	0	50	20	30	0
	C58C1	20	20	40	10	10
	EHA105	50	10	10	30	0
12 dias após inoculação	AGL1	20	0	40	40	0
	C58C1	60	0	30	10	0
	EHA105	70	0	30	0	0

#### 4.3.2 Efeito da pré-cultura dos explantes

Os resultados da expressão do gene *uidA* em função da duração da pré-cultura em meio BIT, com avaliação cinco e doze dias após a inoculação com a bactéria estão apresentados na Figura 09 e Tabela 08. De acordo com os dados, verifica-se que houve influência da utilização da pré-cultura e de sua duração na expressão do gene *uidA*. Para as duas avaliações foi constatado que a utilização de dois dias de pré-cultura proporcionou resultado superior ao de um dia e este superior à ausência de pré-cultura.



Resultados obtidos no presente trabalho estão de acordo com os descritos por Tournier *et al.* (2003) para o mesmo híbrido no qual também foi utilizada pré-cultura de dois dias. Para *E. camaldulensis*, utilizando segmentos do hipocótilo, a melhor expressão transiente do gene *uidA* foi obtida com pré-cultura de três dias, seguido de dois dias de co-cultivo (HO *et al.*, 1998). Moralejo *et al.* (1998) relataram um tempo maior de pré-cultura, de 4 a 6 dias, para o aumento do nível da expressão do gene *uidA* em cotilédones e hipocótilos de *E. globulus*.

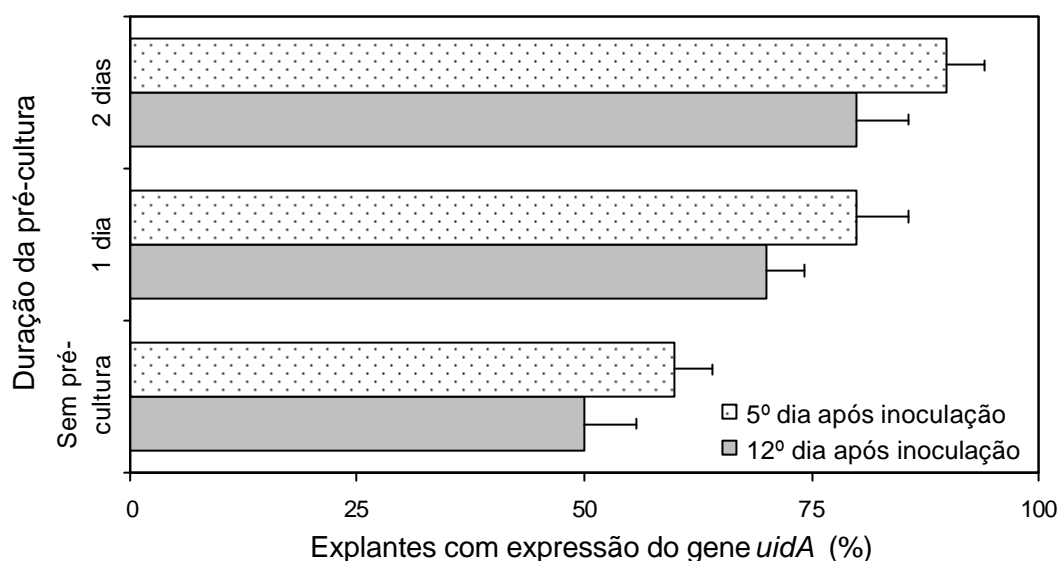


FIGURA 09 – Expressão do gene *uidA* em explantes foliares de *E. grandis* x *E. urophylla*, em função da duração da pré-cultura, 5 e 12 dias após a inoculação com a *A. tumefaciens*.

A pré-cultura também apresentou efeito positivo na transformação de cotilédones de *Morus alba*, com 18,6% de explantes transformados, utilizando 2 dias de pré-cultura. Além deste tempo, foram testados também 1 e 3 dias, porém a taxa de explantes transformados caiu para 4,2 e 14,2%, respectivamente (AGARWAL *et al.*, 2004). Já em epicótilos de *Citrus paradisi*, a pré-cultura reduziu a porcentagem de explantes com gemas expressando o gene *uidA*, sendo 8,4 vezes maior no tratamento sem pré-cultura (5,9%), quando comparado aos tratamentos com um e dois dias de pré-cultura (0,7%) (COSTA *et al.*, 2002).

Os mecanismos que atuam na promoção da transformação genética, via *A. tumefaciens*, pela pré-cultura, ainda não são bem elucidados. Porém, existem relatos de que a pré-cultura aumenta a eficiência da transformação devido ao favorecimento da ligação da agrobactéria ao tecido vegetal. Isso ocorre pela síntese de células na superfície do local do

ferimento e a produção de compostos indutores da região *vir*, pelo metabolismo ativo dessas células (SUNILKUMAR *et al.*, 1999).

Além de proporcionar maior eficiência na transformação genética de algumas espécies, a pré-cultura em meio contendo 2,4-D e BAP é uma fase favorável à regeneração. Neste sentido, ela pode promover mudanças fisiológicas e morfológicas no explante e aumentar sua competência morfogenética, facilitando assim o processo de regeneração (AINSLEY *et al.*, 2001).

De acordo com os dados apresentados na Tabela 08, com relação à avaliação após cinco dias da inoculação com a bactéria, verifica-se expressão do gene *uidA* na forma de pontos azuis. Em geral, a maioria dos explantes apresenta expressão GUS em 5 a 39% da superfície foliar. A porcentagem de explantes com áreas maiores de expressão, foi baixa para todos os tratamentos e áreas de expressão de 70 a 100% foram verificadas somente após um e dois dias de pré-cultura.

Doze dias após a inoculação, não são observados pontos de expressão. Em geral, ocorre bastante variação na área de expressão dos explantes, os quais atingem áreas de 5 a 100% do tecido vegetal, em todos os tratamentos testados, com exceção dos explantes não submetidos à pré-cultura, que não apresentam área de expressão de 70 a 100%.

TABELA 08 - Área foliar com expressão GUS em explantes de *E. grandis* x *E. urophylla*, após 5 e 12 dias da inoculação com *A. tumefaciens*, cepa AGL1, em função da ausência de pré-cultura, 1 e 2 dias de pré-cultura.

Avaliação	Tempo de pré-cultura	Sem expressão (%)	Pontos isolados de expressão (%)	Área de expressão (%)		
				5-39%	40-69%	70-100%
5 dias após inoculação	Sem pré-cultura	30	30	30	10	0
	1 dia	20	0	50	20	10
	2 dias	10	10	40	20	20
12 dias após inoculação	Sem pré-cultura	50	0	20	30	0
	1 dia	30	0	30	20	20
	2 dias	20	0	20	40	20

#### 4.3.3 Efeito da co-cultura dos explantes

Os resultados referentes ao efeito da duração da co-cultura sobre a expressão do gene *uidA*, avaliado após cinco e doze dias da inoculação com a bactéria, estão apresentados na Figura 10 e Tabela 09. Na avaliação após cinco dias da inoculação, as maiores taxas de explantes expressando o gene *uidA* são observadas após cinco dias de

co-cultura, com 100% de expressão, seguido de três dias. Porém, com a avaliação após doze dias da inoculação, não foi verificada diferença na taxa de infecção do tecido vegetal pela *A. tumefaciens*, com a utilização da co-cultura de três ou cinco dias.

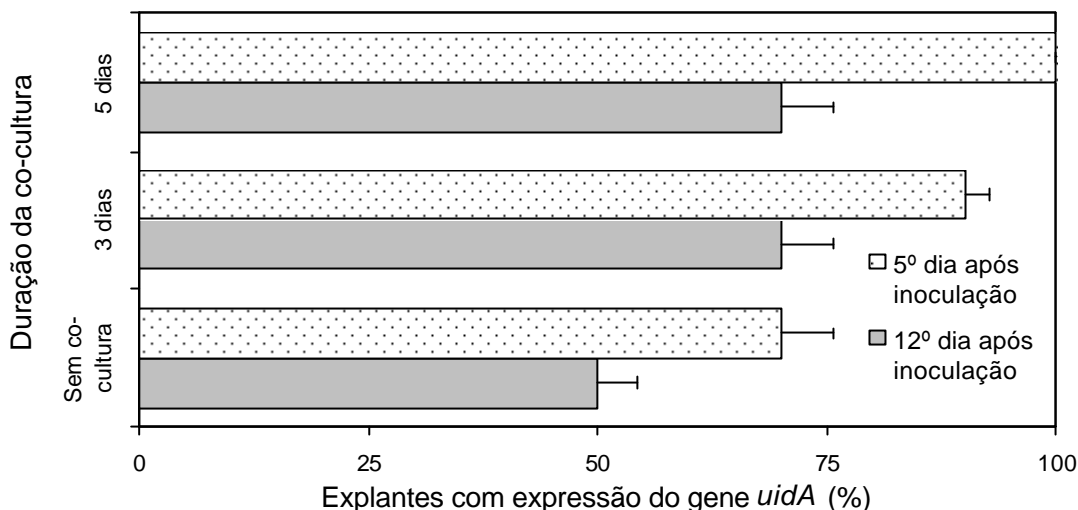


FIGURA 10 – Expressão do gene *uidA* em explantes foliares de *E. grandis* x *E. urophylla*, em função da duração da co-cultura, 5 e 12 dias após a inoculação com a *A. tumefaciens*.

Na primeira avaliação houve maior taxa de explantes expressando o gene *uidA* com cinco dias de co-cultura, porém, na avaliação posterior, após doze dias da inoculação, esta superioridade não foi mantida, pois a porcentagem de explante expressando o gene *uidA* foi à mesma com três e cinco dias de co-cultura. Como há relatos de que o uso de co-culturas por períodos superiores a dois ou três dias tem dificultado o controle posterior da bactéria, uma co-cultura de três dias pode apresentar vantagens para o processo de regeneração (CERVERA *et al.*, 1998).

Relatos sobre o efeito da co-cultura têm sido divulgados para algumas espécies de *Eucalyptus*. Em um estudo com *E. globulus*, segmentos apicais foram transformados e co-cultivados por períodos que variaram de dois a sete dias, obtendo-se os melhores resultados, com relação ao número de explantes que formaram calos e ao número total de eventos transformados, com seis dias de co-cultura (SPOKEVICIUS *et al.*, 2005). Para segmentos de hipocótilo de *E. camaldulensis*, foi utilizado dois dias de co-cultura (HO *et al.*, 1998). Em explantes foliares do híbrido *E. grandis* x *E. urophylla* foi realizada transformação, com cinco dias de co-cultura (TOURNIER *et al.*, 2003).

Cinco dias após a inoculação com a bactéria foi verificada maior porcentagem de explantes com áreas de expressão (90%) para o tratamento de cinco dias de co-cultura, seguido do de três dias (70%) e com 50% para o tratamento que não utilizou co-cultura. Na

avaliação após doze dias da inoculação também foi verificada maior expressão com cinco dias de co-cultura, seguida do tratamento com três dias (Tabela 09).

TABELA 09 - Área foliar com expressão GUS em explantes de *E. grandis* x *E. urophylla*, após 5 e 12 dias da inoculação com *A. tumefaciens*, cepa AGL1, em função da ausência de co-cultura, 3 e 5 dias de co-cultura.

Avaliação	Tempo de co-cultura	Sem expressão (%)	Pontos isolados de expressão (%)	Área de expressão (%)		
				5-39%	40-69%	70-100%
5 dias após inoculação	Sem co-cultura	30	20	30	20	0
	3 dias	10	20	60	10	0
	5 dias	0	10	50	30	10
12 dias após inoculação	Sem co-cultura	50	10	20	20	0
	3 dias	30	20	20	20	10
	5 dias	30	0	30	30	10

#### 4.3.4 Efeito da acetosiringona

Os resultados referentes à utilização da AS (50  $\mu$ M) na pré e co-cultura, cinco dias e doze dias após a inoculação com a bactéria estão apresentados na Figura 11 e Tabela 10. De acordo com os dados, após cinco dias da inoculação com *Agrobacterium*, houve um aumento na expressão do gene *uidA* com o uso da AS na concentração de 50  $\mu$ M na pré-cultura. Já na avaliação após 12 dias da inoculação com a bactéria, o uso da AS tanto na pré- como na co-cultura, influenciou positivamente a expressão do gene *uidA*.

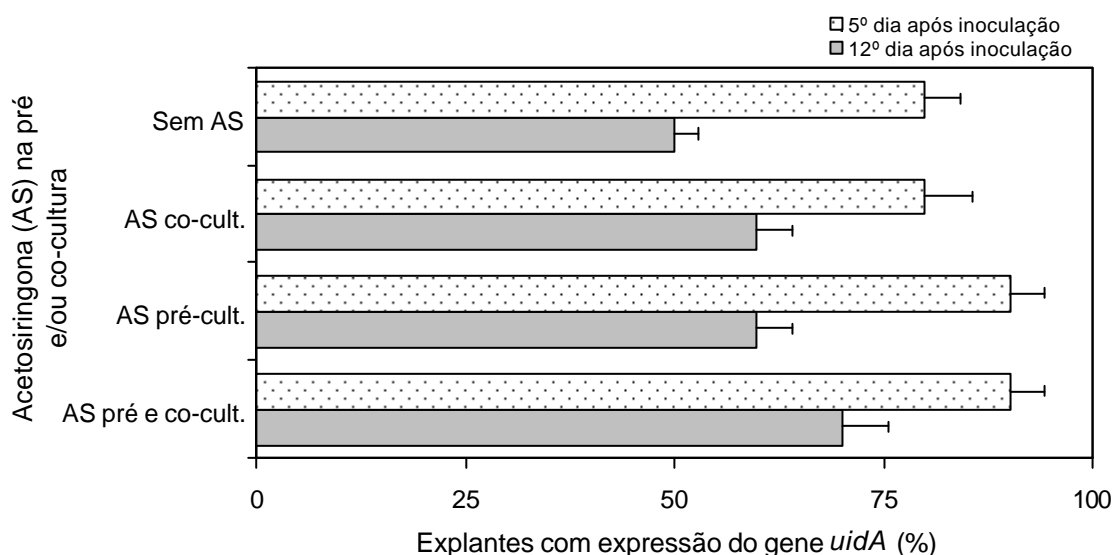


FIGURA 11 – Expressão do gene *uidA* em explantes foliares de *E. grandis* x *E. urophylla*, em função da adição de acetosiringona (50  $\mu$ M) na pré e co-cultura, cinco e doze dias após a inoculação com *A. tumefaciens*.

Tournier *et al.* (2003) também utilizaram 50 µM de AS na pré- e co-cultura para a transformação de explantes foliares de *E. grandis* x *E. urophylla*, porém os autores não avaliaram o efeito da utilização da AS. Uma concentração maior, 100 µM, foi utilizada na solução bacteriana para transformação genética de segmentos apicais de *E. globulus* (SPOKEVICIUS *et al.*, 2005). Em outros estudos com *E. camaldulensis* utilizando explantes foliares (MULLINS *et al.*, 1997) e hipocótilos (HO *et al.*, 1998) não foi relatado o uso da AS no protocolo de transformação.

Os resultados apresentados na Tabela 10 indicam que na avaliação após 5 dias da inoculação, a maioria dos explantes que expressaram o gene *uidA*, apresentaram expressão em 5 a 39% da área foliar, para todos os tratamentos testados. Na avaliação após 12 dias da inoculação houve diminuição na porcentagem de expressão, com a maioria dos explantes expresando GUS em 5 a 39% da área foliar, com exceção do tratamento sem a utilização da acetosiringona, que não houve diferença entre o número de explantes que expressaram GUS entre 5 a 69% da área foliar. Em geral, a porcentagem de explantes com áreas de expressão de 40 a 69% variou de 10 a 20%. Houve pequena diferença quanto aos dias de avaliação, no que se refere à área de expressão de 70 a 100%, sendo que após cinco dias da inoculação, foram observadas as maiores áreas de expressão com o uso da AS na pré e co-cultura, bem como somente na pré-cultura. Após doze dias da inoculação, somente 10% dos explantes apresentaram as maiores áreas de expressão, na ausência da AS.

TABELA 10 - Área foliar com expressão GUS em explantes de *E. grandis* x *E. urophylla*, após 5 e 12 dias da inoculação com *A. tumefaciens*, cepa AGL1, em função da presença ou não da acetosiringona (AS) no pré e co-cultivo.

Avaliação	AS (50 µM)	Sem expressão (%)	Pontos isolados de expressão (%)	Área de expressão (%)		
				5-39%	40-69%	70-100%
Após 5 dias da inoculação	Pré e co-cultura	30	0	40	20	10
	Pré-cultura	20	0	60	10	10
	Co-cultura	30	20	40	10	0
	Sem	20	20	50	10	0
Após 12 dias da inoculação	Pré e co-cultura	50	10	30	10	0
	Pré-cultura	50	0	30	20	0
	Co-cultura	60	0	30	10	0
	Sem	50	0	20	20	10

Os compostos fenólicos são muito importantes ao processo de indução e infecção do tecido vegetal pela *Agrobacterium*. As bactérias são atraídas pelas moléculas-sinal, como

por exemplo, compostos fenólicos que são exsudados pelo ferimento que ocorre na célula vegetal, iniciando assim o processo de infecção (STACHEL *et al.*, 1985; BRASILEIRO; LACORTE, 1998). Além disso, após ligação inicial da bactéria no tecido vegetal, as moléculas-sinal exsudadas em resposta ao ferimento induzem genes de virulência na região vir do plasmídeo Ti (“Tumor inducing”) (ANDRADE *et al.*, 2003). Desta forma, alguns autores têm relatado o uso da AS na solução da bactéria, na pré e/ou co-cultura, visando potencializar a indução e a infecção do tecido vegetal. Nas condições do presente trabalho, a AS apresentou efeito positivo na expressão do gene *uidA*, quando adicionada aos meios de cultura na pré e co-cultura. Esse resultado evidencia que os compostos fenólicos liberados quando o tecido da planta sofreu a injúria do corte possivelmente não estavam em concentrações suficientes para atuar como sinalizadores e promover quimiotactismo positivo para o contato com *A. tumefaciens* (HAWES *et al.*, 1988).

#### 4.4 CONCLUSÕES

Fundamentando-se nos resultados obtidos no presente trabalho, conclui-se que:

- A eficiência da transformação genética do híbrido *E. grandis* x *E. urophylla* é afetada pelo tempo de duração da pré e co-cultura e pela adição de acetosiringona. As melhores condições para a transformação genética do clone 11 foram: dois dias de pré-cultura e três dias de co-cultura e a utilização da acetosiringona adicionada nos meios de pré e co-cultura.
- A cepa AGL1 de *A. tumefaciens*, com o vetor binário pKGWFS7, contendo os genes *nptII* e o *uidA* foi a mais indicada para a transformação genética de *E. grandis* x *E. urophylla*.

#### 4.5 REFERÊNCIAS

AGARWAL, S.; KANWAR, K.; SAINI, N.; JAIN, R. K. *Agrobacterium tumefaciens* mediated genetic transformation and regeneration of *Morus alba* L. **Scientia Horticulturae**, v. 100, p. 183-191, 2004.

AINSLEY, P. J., COLLINS, G. G., SEDGLEY, M. Factors affecting *Agrobacterium* mediated gene transfer and the selection of transgenic calli in paper shell almond (*Prunus dulcis* Mill.). **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 76, p. 522-528, 2001.

ALFENAS, A. C.; ZAUZA, E. A. V.; MAFIA, R. G.; ASSIS, T. F. **Clonagem e doenças do Eucalipto**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2004. 442 p.

ANDRADE, G. M. de; SARTORETTO, L. M.; BRASILEIRO, A. C. M. Biologia molecular do processo de infecção por *Agrobacterium* spp. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, p. 465-476, 2003.

BEVAN, M. Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. **Nucleic Acids Research**, v.12, p. 8711-8721, 1984.

BRACELPA - Associação Brasileira de Celulose e Papel. **Desempenho do setor em 2007 e Projeções**. Disponível em <http://www.bracelpa.org.br/bra/estatisticas/index.html>. Acesso em 10/03/2008.

BRASILEIRO, A. C. M.; LACORTE, C. Interação *Agrobacterium* - hospedeiro. In: BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. de C. **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPq, 1998, v.1, p. 75-92.

CERVERA, M.; PINA, J. A.; JUAREZ, J.; NAVARRO, L.; PEÑA, L. *Agrobacterium*-mediated transformation of citrange: factors affecting transformation and regeneration. **Plant Cell Reports**, v. 18, p. 271-278, 1998.

COSTA, M. G. C.; OTONI, W. C.; MOORE, G. A. An evaluation of factors affecting the efficiency of *Agrobacterium*-mediated transformation of *Citrus paradisi* (Macf.) and production of transgenic plants containing carotenoid biosynthetic genes. **Plant Cell Reports**, v. 21, p. 365-373, 2002.



GRANT, J. E.; THOMSON, L. M. J.; PITHER-JOYCE, M. D.; DALE, T. M.; COOPER, P. A. Influence of *Agrobacterium tumefaciens* strain on the production of transgenic peas (*Pisum sativum* L.). **Plant Cell Reports**, v. 21, p. 1207-1210, 2003.

HAWES, M. C.; SMITH, L. Y.; HOWARTH, A. J. *Agrobacterium tumefaciens* mutants deficient in chemotaxis to root exudates. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 1, p. 182-186, 1988.

HO, C. K.; CHANG, S. H.; TSAY, C. J.; CHIANG, V. L.; CHEN, Z. Z. *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of *Eucalyptus camaldulensis* and production of transgenic plants. **Plant Cell Reports**, v. 17, p. 675-680, 1998.

HODAL, L.; BOCHARDT, A.; NIELSEN, J. E.; MATTSSON, O.; OKKELS, F. T. Detection expression and specific elimination of endogenous  $\beta$ -glucuronidase in transgenic and non-transgenic plants. **Plant Science**, v.87, p. 115-121, 1992.

HONG, Z.; LAKKINENI, K.; ZHANG, Z.; VERMA, D. P. S. Removal of feedback inhibition of delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthetase results in increased proline accumulation and protection of plants from osmotic stress. **Plant Physiology**, v.122, p.1129-1136, 2000.

JEFFERSON, R. Assaying chimeric genes in plants: the *gus* gene fusion system. **Plant Molecular Biology Reports**, v. 5, p. 387-405, 1987.

JIN, S.; ZHANG, X.; LIANG, S.; NIE, Y.; GUO, X.; HUANG, C. Factors affecting transformation efficiency of embryogenic callus of Upland cotton (*Gossypium hirsutum*) with *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.81, p.229-237, 2005.

KARIMI, M.; INZE, D.; DEPICKER, A. **Trends in Plant Science**, v. 7, p. 193-195, 2002.

LAPLAZE, L.; GHERBI, H.; DUHOUX, E.; PAWLOWSKI, K.; AUGUY, F.; GUERMANCHE, F.; FRANCHE, C.; BOGUSZ, D. Symbiotic and non-symbiotic expression of *cgMT1*, a metallothionein-like gene from actinorhizal tree *Casuarina glauca*. **Plant Molecular Biology**, v. 49, p. 81-92, 2002.

MILLER, J. H. **Experiments in molecular genetics**. New York: Cold Spring Harbor, 1972.

MORALEJO, M.; ROCHANGE, F.; BOUDET, A. M.; TEULIÈRES, C. Generation of transgenic *Eucalyptus globulus* plantlets through *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 25, p. 207-212, 1998.

MULLINS, K. V.; LLEWELLYN, D. J.; HARTNEY, V. J.; STRAUSS, S.; DENNIS, E. S. Regeneration and transformation of *Eucalyptus camaldulensis*. **Plant Cell Reports**, v. 16, p. 787-791, 1997.

NADOLSKA-ORCZYK, A.; ORCZYK, W. Study of the factors influencing *Agrobacterium*-mediated transformation of pea (*Pisum sativum* L.). **Molecular Breeding**, v.6, p.185-194, 2000.

QUISEN, R. C. **Transformação genética de *Eucalyptus camaldulensis* via cocultivo com *Agrobacterium tumefaciens***. Tese de doutorado. Programa de Pós- Graduação em Agronomia – Produção Vegetal. Universidade Federal do Paraná, 2007.

QUOIRIN, M.; QUISEN, R. **Advances in genetic transformation of *Eucalyptus* species**. In: FRANCHE, C. (edit) *Molecular Biology of Tropical Plants*. Research Signpost, Kerala, India, 2006, p. 41-56.

SPOKEVICIUS, A. V.; BEVEREN; K. V; LEITCH, M. A.; BOSSINGER, G. *Agrobacterium*-mediated *in vitro* transformation of wood-producing stem segments in eucalypts. **Plant Cell Reports**, v. 23, p. 617-624, 2005.

STACHEL, S. E.; MESSENS, E.; MONTAGU, M. V.; ZAMBRYSKI, P. Identification of the signal molecules produced by wounded plant cells that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. **Nature**, v. 318, p. 624-629, 1985.

SUNILKUMAR, G.; VIJAYACHANDRA, K.; VELUTHAMBI, K. Pre-incubation of cut tobacco leaf explants promotes *Agrobacterium*-mediated transformation by increasing *vir* genes induction. **Plant Science**, v. 141, p. 51-58, 1999.

TORISKY, R. S.; KOVACS, L.; AVDIUSHKO, S.; NEWMAN, J. D.; HUNT, A. G.; COLLINS, G. B. Development of a binary vector system for plant transformation based on the supervirulent *Agrobacterium tumefaciens* strain Chry5. **Plant Cell Reports**, v. 17, p. 102-108, 1997.

TOURNIER, V.; GRAT, S.; MARQUE, C.; EL KAYAL, W.; PENCHEL, R.; ANDRADE, G. de; BOUDET, A. M.; TEULIÈRES, C. An efficient procedure to stably introduce genes into an economically important pulp tree. **Transgenic Research**, v. 12, p. 403-411, 2003.

## 5 TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* COM O GENE *gfp* SOB REGULAÇÃO DO PROMOTOR *cbf1a* OU *cbf1b* INDUZIDOS PELO FRIO

### RESUMO

O frio é um fator limitante para a distribuição de muitas plantas, afetando diretamente o crescimento e a produtividade de algumas culturas. Estudos que visam ao melhor entendimento dos processos relacionados ao aumento da resistência a estresses abióticos, como o frio e as geadas, são de grande importância para muitas espécies de *Eucalyptus*. O híbrido *E. grandis* x *E. urophylla* é recomendado para plantios em regiões tropicais e subtropicais. Quando plantado em regiões temperadas apresenta dificuldade de adaptação. Sendo assim, alguns estudos têm sido direcionados ao entendimento do processo de aclimação ao frio. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo a introdução do gene *gfp* sob regulação dos promotores *cbf1a* ou *cbf1b* e a sua indução pelo frio. Segmentos foliares de *E. grandis* x *E. urophylla* foram co-cultivados com a cepa AGL1 contendo o vetor binário com o gene de seleção *nptII* e dois genes repórteres: *uidA* e *gfp*, ambos sob controle do promotor induzido pelo estresse *cbf1a* ou *cbf1b*. Segmentos foliares foram isolados de brotações e cultivados em meio de cultura BIP, por dois dias. Posteriormente, os explantes foram imersos em solução bacteriana com  $DO_{600nm}$  em torno de 0,5 e submetidos à sonicação durante 15 s e ao vácuo por 5 min. Após a inoculação, os explantes foram incubados em meio A2 por cinco dias, sendo posteriormente transferidos para meio BIT com canamicina ( $50 \text{ mg.L}^{-1}$ ) e Augmentin<sup>®</sup>, ( $300 \text{ mg.L}^{-1}$ ), por 15 dias. Após o cultivo inicial, os explantes foram transferidos para meio SDM, com as mesmas concentrações de canamicina e Augmentin<sup>®</sup>, por um período total de 70 dias. Cinco dias após a transformação, os explantes foram submetidos a 4 °C por diferentes intervalos de tempos de exposição, de 30 min a 5 h, e a 0 °C por 1, 2 e 3 h, visando à indução dos promotores *cbf1a* e *cbf1b*. Em seguida, a fluorescência da GFP foi observada nos explantes. A transformação genética foi indicada por PCR e a transcrição do gene foi avaliada por RT-PCR. A porcentagem de explantes formando calos com gemas foi de 4,5% para a construção com o promotor *cbf1a* e de 5,4% com o promotor *cbf1b*. A eficiência da transformação foi de 0,71% (5/700 explantes transformados/ explantes inoculados), para construção promotor *cbf1a* e 2,67% (12/450 explantes transformados/ explantes inoculados), para construção promotor *cbf1b*. Foi constatado um aumento da expressão *gfp* a partir de 2 h de exposição a 4 °C, com resultados similares de 2 a 5 h. Foi escolhido o tratamento com 2 h de exposição a 4 °C, por este apresentar-se menos prejudicial ao processo regenerativo. A expressão do gene *gfp* foi confirmada por RT-PCR para quatro eventos da construção promotor *cbf1b*, nas três repetições realizadas. Para a construção com o promotor *cbf1a* a expressão ocorreu em cinco eventos de transformação, no entanto não houve repetibilidade na expressão.

**Palavras-chave:** espécie florestal, planta transgênica, promotor estresse-induzido, *cbf*, análise molecular, *Agrobacterium tumefaciens*.

**GENETIC TRANSFORMATION OF *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* WITH *gfp* GENE UNDER CONTROL OF *cbf1a* OR *cbf1b* PROMOTOR VIA *Agrobacterium tumefaciens* INDUCED BY COLD**

**ABSTRACT**

Cold is a factor that limits the distribution of many plants, affecting directly the growth and productivity of some cultures. Studies that aim to understand processes related to the increase of abiotic stress tolerance, like freezing, are important in *Eucalyptus* case. The hybrid *E. grandis* x *E. urophylla* is recommended for tropical and subtropical plantations. When planted in temperate regions it presents low adaptation. Thus, some studies have been directed to assess the cold acclimation process. In this context this study consisted of the introduction of *gfp* gene under control of *cbf1a* or *cbf1b* promoters and its induction by cold. Foliar segments of *E. grandis* x *E. urophylla* were co-cultivated with AGL1 strain containing a binary vector with *nptII* gene and two reporter genes, *uidA* and *gfp*, both under control of stress-induced promoter *cbf1a* or *cbf1b*. Foliar segments were isolated from shoots and cultivated in BIP medium, for two days. Afterwards, the explants were immersed in bacterial solution with OD<sub>600nm</sub> close to 0.5 and submitted to sonication for 15 s and to vacuum for five min. After inoculation the explants were incubated and kept in A2 medium for five days, being transferred to BIT medium with kanamycin (50 mg.L<sup>-1</sup>) and Augmentin® (300 mg.L<sup>-1</sup>) for fifteen days. The explants were transferred to SDM medium with the same concentrations of kanamycin and Augmentin®, for a total period of 17 days. Five days after the transformation explants were submitted to a temperature of 4 °C during different intervals of exposition, from 30 min to 5 h, and to 0 °C during 1, 2 and 3 h, in order to induce *cbf1a* and *cbf1b* promoters and observe GFP fluorescence. Genetic transformation was indicated via PCR and gene transcription was evaluated by RT-PCR. The percentage of explants with callus developing buds was 4.5% for *cbf1a* and 5.4% for *cbf1b* construct. Transformation efficiency was 0.71% (5/700 transformed explant) for *cbf1a* and 2.67% (12/450 transformed explant) for *cbf1b*. There was an increase of *gfp* expression after 2 h of exposure at 4 °C, with similar results between 2 and 5 h. A 2 h treatment at 4 °C was chosen due to less damage to regenerative process. *gfp* gene expression was confirmed via RT-PCR in four events with *cbf1b* promoter construct, in three replicate. *Cbf1a* promoter construct expression occurred in five events, but without repeatability.

**Key-words:** Forest species, transgenic plant, stress-induced promoter, *cbf*, molecular analysis, *Agrobacterium tumefaciens*.

## 5.1 INTRODUÇÃO

Algumas espécies do gênero *Eucalyptus* são amplamente plantadas no mundo, visando principalmente à produção de celulose, papel e carvão vegetal (POKE *et al.*, 2005; ALFENAS *et al.*, 2004). Além da excelente qualidade da madeira sólida e da celulose, as espécies de *Eucalyptus* são reconhecidas principalmente pela alta taxa de crescimento, com produtividade média de 40 m<sup>3</sup>/ha/ano (HO *et al.*, 1998; BRACELPA, 2007). Dentre as mais plantadas estão *E. grandis*, *E. globulus*, *E. camaldulensis* e seus híbridos, representando cerca de 80% da área plantada com *Eucalyptus* no mundo (POKE *et al.*, 2005). O híbrido *E. grandis* x *E. urophylla* tem se destacado em plantios, principalmente no Brasil, por apresentar alta produtividade e potencial para indústrias de papel, celulose e fibras (FERREIRA, 1992).

Ganhos significativos na produtividade de eucalipto vêm sendo obtidos por meio de programas de melhoramento, os quais têm explorado a variação genética natural e sua habilidade de hibridação (POKE *et al.*, 2005). Porém, a adoção de novas tecnologias, como a transformação genética, associadas a um programa de melhoramento, permitem a geração de novos materiais genéticos, resultando em ganhos consideráveis de produção. Alguns estudos de transformação genética têm sido desenvolvidos em espécies florestais visando ao aumento no crescimento, modificações nas propriedades das fibras, aumento na polimerização da celulose, modificações na biossíntese e/ou redução na quantidade de lignina, resistência a herbicidas e a insetos e tolerância a estresses abióticos (QUOIRIN; QUISEN, 2006).

Estudos que visam ao melhor entendimento dos processos relacionados ao aumento da resistência a estresses abióticos, como o frio e as geadas, são de grande importância a muitas espécies de *Eucalyptus*. Temperaturas baixas, principalmente quando associadas às geadas, podem ocasionar queima superficial das folhas, desfolha total em plantas novas e em brotos e até mesmo mortalidade, refletindo diretamente na queda da produtividade do eucalipto (CARAMORI *et al.*, 2000; PALUDZYSZYN FILHO *et al.*, 2006). Como *E. grandis*, *E. urophylla* e *E. grandis* x *E. urophylla* são espécies recomendadas para plantios em regiões tropicais e subtropicais (POKE *et al.*, 2005), quando são plantadas em regiões temperadas, apresentam dificuldades de adaptação. Sendo assim, alguns estudos têm sido direcionados ao entendimento do processo de aclimação ao frio (THOMASHOW, 2001).

Nos últimos anos, várias investigações têm sido realizadas para identificar os genes regulados pelo estresse, com o objetivo de melhorar o entendimento dos mecanismos de

tolerância (THOMASHOW, 2001; ZHU, 2002; SHINOZAKI *et al.*, 2003). A indução de muitos genes em resposta ao frio inclui uma família de fatores de transcrição, os *cbfs* ("C-repeat-binding factors"), também conhecidos como *drebs* ("dehydration-responsive element-binding protein") (ZHU *et al.*, 2007). Os genes *cbfs* induzem a expressão de outros genes, conferindo tolerância ao congelamento, à seca e à salinidade (GILMOUR *et al.*, 1998; KASUGA *et al.*, 2004).

Vários genes *cbfs* já foram identificados, os quais representam cerca de 12% dos genes regulados pelo frio (FOWLER *et al.*, 2002; COOK *et al.*, 2004). Os genes *cbfs* já foram descritos para algumas espécies de plantas, dentre as quais estão *Arabidopsis*, canola, trigo, arroz, cevada e tomate (THOMASHOW, 2001; LIU *et al.*, 1998). Em *Arabidopsis* os genes *cbfs* foram descritos em três subgrupos, *cbf1*, *cbf2* e *cbf3* (HAAKE *et al.*, 2002; LIU *et al.*, 1998). O gene *cbf1* é especificamente induzido pelo frio; já *cbf2* e *cbf3* são induzidos pela seca, salinidade e aplicação de ácido abscísico (LIU *et al.*, 1998). Recentemente, genes *cbfs* foram isolados de algumas espécies florestais como *Populus balsamifera* (BENEDICT *et al.*, 2006), *Betula pendula* (WELLING e PALVA, 2006) e *Eucalyptus gunnii* (EL KAYAL *et al.*, 2006). No estudo com *E. gunnii* foram isolados dois genes, designados de *Egucbf1a* e *Egucbf1b*, e promotores *cbf*.

Em muitas espécies herbáceas houve progresso no entendimento da base molecular da resistência ao frio, porém em espécies lenhosas são escassos estes estudos. Mais escassos ainda são os estudos com o promotor dos genes *cbfs* induzido pelo estresse. Neste sentido, a identificação e utilização desses promotores é um aspecto importante para a transformação genética, pois permite a expressão controlada dos genes de interesse em locais, tempo e intensidade específicos e serão pré-requisitos em gerações futuras de transgênicos (PAOLI *et al.*, 2007). Atualmente, um dos promotores mais utilizados no desenvolvimento de plantas transgênicas é o 35S do vírus do mosaico da couve-flor (CaMV) (OBERTELLO *et al.*, 2005). Este promotor apresenta grande importância em estudos com transformação genética, devido a sua ampla atividade transcricional em muitos tipos de plantas (YOSHIDA; SHINMYO, 2000). No entanto, o uso de promotores constitutivos pode causar uma expressão desnecessária do gene, aumentando a possibilidade de interferência em outras rotas metabólicas da planta (PAOLI *et al.*, 2007).

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a expressão do gene *gfp* sob regulação dos promotores *cbf1a* e *cbf1b* em explantes foliares de *E. grandis* x *E. urophylla* transformados via co-cultivo com *Agrobacterium tumefaciens* e verificar a sua indução pelo frio.

## 5.2 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi conduzido no Laboratório de Superfície Celular e Sinalização dos Vegetais, Pólo de Biotecnologia Vegetal, Respostas Adaptativas ao Frio, Universidade Paul Sabatier, Toulouse, França.

### 5.2.1 Material vegetal

Para todos os experimentos utilizaram-se plântulas matrizes de *E. grandis* x *E. urophylla*, oriundas de sementes obtidas do IPEF (Instituto de Pesquisas Florestais), Piracicaba, São Paulo, e germinadas *in vitro*. Clones foram selecionados com base na velocidade de aparecimento das gemas adventícias. Desses clones, o 201 foi utilizado como material vegetal para o estudo da transformação genética, devido a sua melhor resposta organogênica, em ensaios anteriormente realizados no laboratório.

### 5.2.2 Condições de cultura *in vitro*

Os tufos de gemas de *E. grandis* x *E. urophylla* e os explantes foliares foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de  $23 \pm 2$  °C, com luz fluorescente branca fria e densidade aproximada de fluxo de fótons de  $10 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , com fotoperíodo de 16 h.

Os tufos de gemas de *E. grandis* x *E. urophylla* foram cultivados em placas de Petri de plástico transparente de 10 cm de diâmetro e 2 cm de altura, com 30 mL de meio de cultura em cada, vedadas com Parafilm<sup>®</sup>, sendo cultivadas quatro plântulas por placa. A repicagem do clone foi realizada a cada 20 dias, utilizando o meio de cultura M, suplementado com 3% de sacarose e 0,7% de agar (Sigma<sup>®</sup>) (Anexo 01).

Os explantes foliares foram mantidos em placas de Petri de plástico transparente de 5 cm de diâmetro e 1,5 cm de altura, contendo 10 mL de meio de cultura, vedadas com Parafilm<sup>®</sup>, sendo cultivados 20 explantes em cada placa. O meio de cultura e o tempo que cada explante foliar permaneceu no meio variaram de acordo com a fase de desenvolvimento, conforme detalhado no item 5.2.5. Os meios de cultura em que foram



mantidos os explantes foliares foram suplementados com 3% de sacarose e 0,6% ou 0,7% de agar, dependendo do meio de cultura utilizado (Vetec®). O pH dos meios descritos acima foram ajustados em 5,6, antes da esterilização em autoclave a 1 atm e 121 °C por 20 min.

### 5.2.3 Cepas de *A. tumefaciens*

A cepa AGL1 de *A. tumefaciens* com o vetor binário pKGWFS7 foi utilizada na transformação genética. Este vetor contém o gene marcador de seleção da neomicina fosfotranferase II (*nptII*), que confere resistência aos antibióticos aminoglicosilados, como a canamicina, e dois genes repórteres, o *uidA*, que codifica a enzima  $\beta$ -glucuronidase (JEFFERSON, 1987) e o gene da *gfp*, que codifica a proteína verde fluorescente (“Green fluorescent protein”) (CHALFIE *et al.*, 1994). Ambos os genes repórteres estão sob controle do promotor estresse-induzido *cbf1a* ou *cbf1b* (EL KAYAL *et al.*, 2006) (Figura 12).

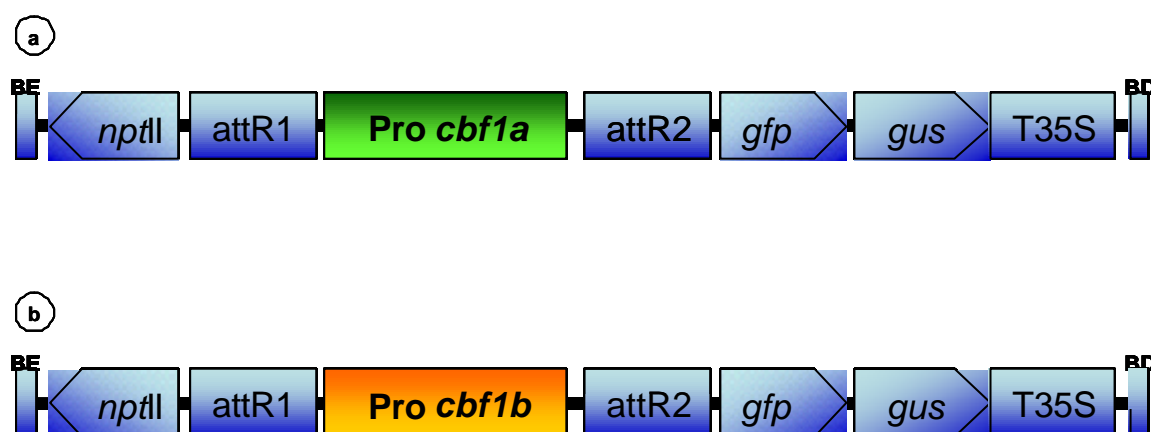


FIGURA 12 – Mapa das construções do T-DNA com o plasmídeo binário pKGWFS7, utilizado na transformação genética de explantes foliares de *E. grandis* x *E. urophylla*. Ambos contêm as bordas esquerda (BE) e direita (BD), as regiões *attR1* e *attR2*, que são os adaptadores onde irá ocorrer a recombinação e os genes *nptII*, *gfp* e *uidA*. a) Construção com o promotor *cbf1a* e b) Construção com o promotor *cbf1b*.

Para a construção gênica foi utilizado o sistema de clonagem Gateway™ (Invitrogen). Esta técnica é baseada na recombinação-sítio específica, no qual as sequências de interesse foram primeiramente capturadas em vetores de entrada. Para isto plasmídeos doadores sofreram recombinação por meio de sítios compatíveis com regiões específicas da sequência de interesse. Posteriormente, regiões específicas do vetor de entrada sofreram recombinação com o vetor de destinação, originando então o clone ou vetor de expressão

(Anexo 10). As etapas realizadas no sistema Gateway<sup>TM</sup> estão descritas no Anexo 11, sendo utilizados os vetores da Invitrogen<sup>®</sup>.

#### 5.2.4 Manutenção e crescimento da bactéria

Isolados de *A. tumefaciens* (cepa AGL1) foram estocados em solução contendo 1 mL de solução bacteriana ( $DO_{600nm}$  em torno de 1,0) e 500  $\mu$ L de glicerol 50%, e conservados a -80 °C.

A bactéria foi cultivada duas vezes em meio de cultura MYA líquido (TEPFER; CASSE-DELBART, 1987) (Anexo 02), suplementado com canamicina (50  $mg.L^{-1}$ ), ampicilina (50  $mg.L^{-1}$ ) e rifampicina (50  $mg.L^{-1}$ ), e incubada a 28 °C, por 16 h, sob agitação constante de 120 rpm. No segundo cultivo foi utilizada a suspensão bacteriana obtida no primeiro cultivo, o meio MYA e os mesmos antibióticos. Posteriormente, a cultura líquida foi preparada centrifugando a suspensão bacteriana a 5000 rpm e 4 °C, por 10 min. O pellet formado foi ressuspenso em meio de cultura C (Anexo 01), até a obtenção de  $DO_{600nm}$  em torno de 0,5.

#### 5.2.5 Condições de inoculação e cultura dos explantes

Explantes foliares foram isolados de tufos de gemas do clone 201, mantidos em condições *in vitro* em meio de multiplicação (meio M) (Anexo 01), cerca de 15 dias após a última repicagem.

Foram escolhidas folhas jovens retiradas das partes superiores das brotações, essas foram seccionadas em duas partes no sentido transversal, na presença de solução antioxidante (Anexo 03). Posteriormente, os explantes foliares foram cultivados a 23 °C, no escuro, por dois dias, com a face abaxial em contato com o meio BIP, com adição de 50  $\mu$ M de acetosiringona (AS).

Para a inoculação dos explantes, estes foram retirados do meio BIP e imersos em suspensão bacteriana com  $DO_{600nm}$  em torno de 0,5 e submetidos à sonicação durante 15 s e em seguida mantidos sob vácuo por 5 min. Após a inoculação, os explantes foram secos em papel filtro estéril, incubados em meio de cultura A2 (Anexo 01), com adição de 50  $\mu$ M de AS e mantidos em sala de crescimento, no escuro, por cinco dias. Após a co-cultura, os explantes foram transferidos para meio de cultura BIT (Anexo 01), suplementado com

canamicina ( $50 \text{ mg.L}^{-1}$ ) e Augmentin® (amoxicilina e clavulonato de potássio) ( $300 \text{ mg.L}^{-1}$ ), por 15 dias, sendo repicados a cada cinco dias, sob densidade de fluxo aproximada de  $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  e temperatura de  $23 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ . Após os 22 dias de cultivo inicial, os explantes foram transferidos para meio SDM (Anexo 01), com canamicina ( $50 \text{ mg.L}^{-1}$ ) e Augmentin® (amoxicilina e clavulonato de potássio) ( $300 \text{ mg.L}^{-1}$ ), sob as mesmas condições de luminosidade e temperatura por um período total de 68 dias, com repicagem a cada 14 dias. Posteriormente os explantes foram mantidos em meio de multiplicação (Meio M), com repicagem a cada 20 dias. A sequência dos cultivos dos explantes foliares de *E. grandis* x *E. urophylla* pode ser visualizada na Figura 13.

Para todos os ensaios de transformação genética foi adicionado um controle negativo, que consistiu de explantes não inoculados em suspensão bacteriana e cultivados nos mesmos meios de cultura que os explantes inoculados com *A. tumefaciens*.

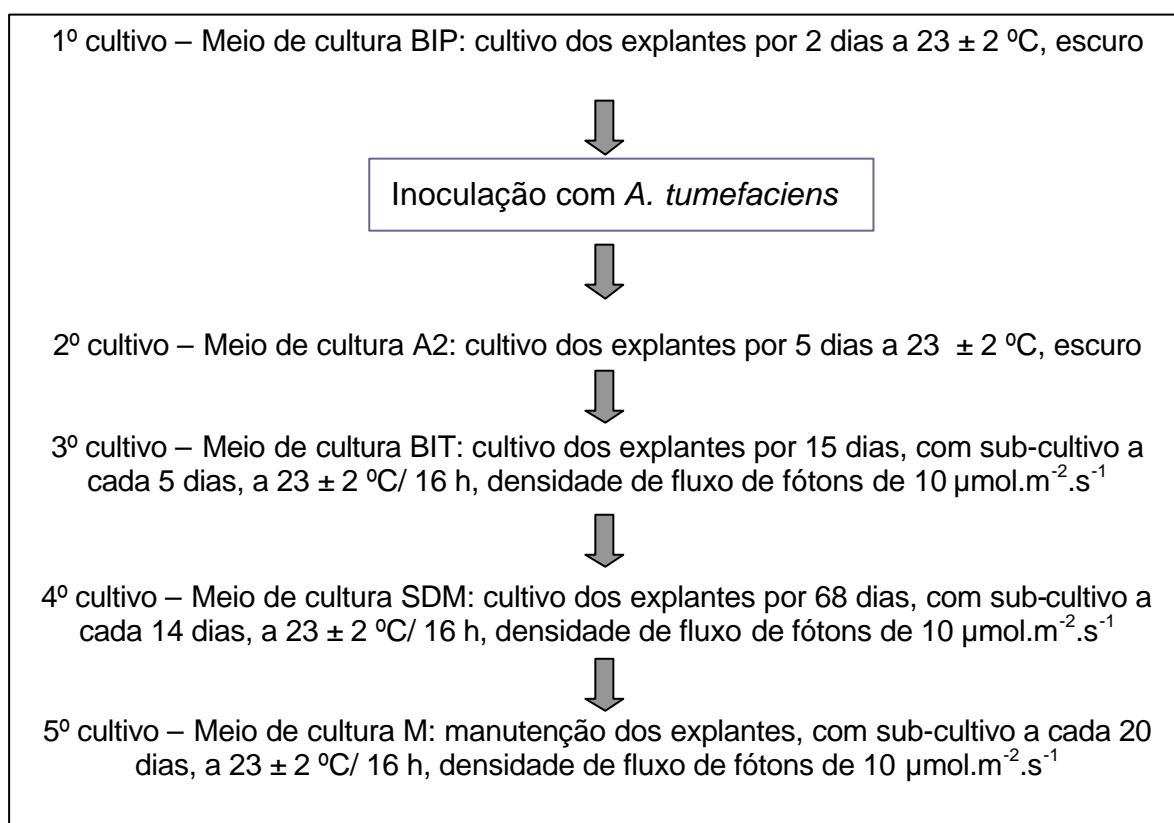


FIGURA 13 – Representação esquemática da sequência de cultivos dos explantes foliares de *E. grandis* x *E. urophylla*.

### 5.2.6 Avaliação

Ao quinto dia após a inoculação com *A. tumefaciens*, os explantes foliares foram selecionados com base na expressão do gene *gfp*. Para isso, os explantes foram expostos a 4 °C por 2 h, em seguida permaneceram por 1 h a 23 °C e foram visualizados no microscópio. Foi utilizado o microscópio fluorescente Leica MZ FL III, equipado com laser de comprimento de onda de 488 nm, para fluorescência verde e 577 nm para fluorescência vermelha. Os explantes que apresentaram pontos ou áreas fluorescentes verdes foram considerados transformantes putativos e foram mantidos em meio de cultura, já os explantes que não expressaram pontos foram descartados.

Foi realizada avaliação do processo de regeneração nos explantes transformados com as duas construções após 90 dias de cultivo em meio de cultura SDM, sendo avaliadas as seguintes variáveis: porcentagem de explantes com calo, porcentagem de explantes com calo e com gema, número de gemas por explante e porcentagem de oxidação.

### 5.2.7 Delineamento experimental

Com a construção *cbf1a* foram realizados 12 ensaios de transformação com 280 explantes cada, totalizando 3360 explantes. Com a construção *cbf1b* foram realizados 7 ensaios de transformação com 280 explantes cada, totalizando 1960 explantes. Foi acrescentado a cada ensaio um controle negativo, com explantes foliares que não foram inoculados com *A. tumefaciens*, sendo 20 explantes por unidade experimental, totalizando 380 explantes. Os explantes do tratamento controle foram cultivados nos mesmos meios de cultura e nas mesmas condições que os explantes inoculados com a bactéria. Foram avaliados a porcentagem de calogênese, de calos com gemas, número de gemas por explante e porcentagem de oxidação para as duas construções (*cbf1a* e *cbf1b*).

### 5.2.8 Expressão da GFP após tratamento com frio

Ao 5º dia após a inoculação com *A. tumefaciens* foram realizados dois ensaios, para verificar qual o melhor tempo de exposição dos explantes transformados a temperaturas baixas, visando à indução dos promotores induzidos pelo estresse *cbf1a* e *cbf1b*, pela observação da fluorescência da GFP. Nos dois ensaios foi incluído um tratamento controle,

formado por explantes transformados mantidos a 23 °C antes da observação em microscópio. Para a observação da GFP, as placas de Petri com os explantes em meio de cultura BIT foram expostas a 4 °C, durante 30 min, 1 h 30 min, 2 h, 3 h, 4 h e 5 h ou a 0 °C por 1, 2 e 3 h. Em seguida as placas foram mantidas por 1 h, à temperatura ambiente (23 °C), antes da observação em microscópio.

#### 5.2.8.1 Delineamento experimental

Foram utilizadas placas de Petri de plástico transparente de 5 cm de diâmetro e 1,5 cm de altura, vedadas com Parafilm<sup>®</sup>, com 10 mL de meio de cultura e 20 explantes em cada placa, sendo utilizadas quatro placas por tratamento.

#### 5.2.8.2 Avaliação

Para a avaliação da expressão da GFP foram contados os explantes que apresentaram ou não expressão, após cinco dias do contato com *A. tumefaciens*, sendo utilizado o seguinte critério: nenhuma expressão (0%), expressão em torno de 5 a 50% da superfície dos explantes e expressão de 51 a 100%.

#### 5.2.9 Análises moleculares

Os explantes foliares de *E. grandis* x *E. urophylla* que expressaram o gene da *gfp* e que formaram gemas foram posteriormente mantidos em meio de multiplicação (meio de cultura M). As gemas obtidas a partir de um explante foram separadas e cada uma delas multiplicada até a obtenção de material suficiente para a realização dos testes moleculares visando à comprovação da transformação genética com os promotores *cbf1a* e *cbf1b*.

##### 5.2.9.1 Extração de DNA e PCRs

Foi realizado extração de DNA e PCR de 19 eventos de transformantes putativos para o promotor *cbf1a* e 56 para o promotor *cbf1b*.

Para maceração do material vegetal foram utilizados tufos de gemas inteiras, com folhas e calos, recém retirados do meio de cultura M (Figura 14). Estes foram transferidos para um almofariz, contendo nitrogênio líquido e, com o auxílio de um pistilo, o material foi pulverizado até a obtenção de pó fino, sendo posteriormente transferido para tubo tipo Eppendorf de 2 mL. A extração do DNA foi realizada utilizando o kit Dneasy Plant Mini Kit da Qiagen e posteriormente o DNA genômico foi conservado a 4 °C, até a reação de amplificação.

Vários ensaios foram realizados para definir quais as melhores condições para realização da reação de amplificação. Foram testados o Kit da Sigma (Extract-N-Amp™ Tissue PCR Kits) e o PCR clássico, utilizando tampão, MgCl<sub>2</sub>, Go Taq Flexi DNA Polymerase, dNTP e água. Também foram testadas várias temperaturas de hibridização e primers (Tabela 11). Os ensaios encontram-se especificados na Tabela 12.

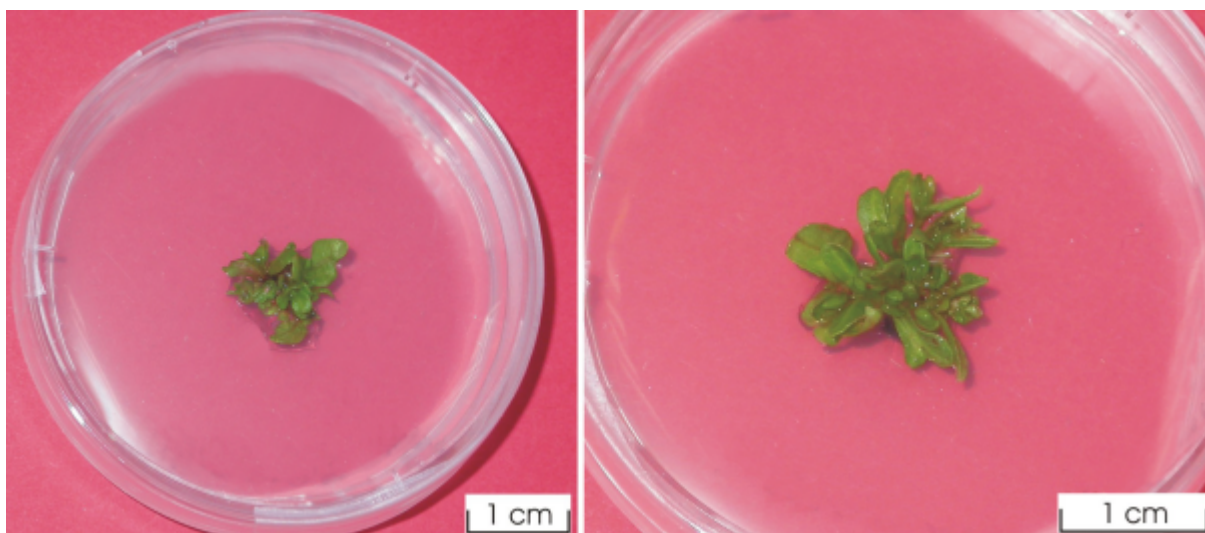


FIGURA 14 – Tufo de gemas de *E. grandis* x *E. urophylla* transformados com promotor *cbf1a* por meio de *A. tumefaciens* e mantidos em meio de multiplicação (Meio M).

A reação de amplificação foi realizada utilizando 1 µL (30 ng) do DNA isolado de plantas transformadas e os seguintes produtos da marca Promega: 10 µL de tampão 5x, 5 µL de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 1 µL de dNTP (10 mM), 30,5 µL de água e 0,5 µL de Go Taq<sup>®</sup> Flexi DNA Polymerase (5 U/ µL), além de 1 µL de cada primer (10 mM) (Tabela 11). As reações foram submetidas ao seguinte programa de temperaturas: 5 min a 94 °C, seguido de 40 ciclos de amplificação (1 min a 94 °C; 1 min a temperaturas variando de 55 a 66 °C, conforme pode ser visualizado na Tabela 12; 3 min e 30 s a 72 °C) e extensão final de 10 min a 72 °C. Os produtos das reações foram submetidos à eletroforese em tampão TAE 0,5

x (Tris-acetato-EDTA), em gel de agarose 1% e visualizados após coloração com brometo de etídeo (0,5 µg/ mL) sob luz UV.

Foi realizado PCR com os primers da tubulina (Tub-s e Tub-as) (Tabela 11), para comprovação de que não houve problemas com as reações. Para esta reação de amplificação foram utilizados 1 µL (30 ng) do cDNA e os seguintes produtos da marca Promega: 10 µL de tampão 5x, 5 µL de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 1 µL de dNTP (10 mM), 30,5 µL de água e 0,5 µL de Go Taq<sup>®</sup> Flexi DNA Polymerase (5 U/ µL), além de 1 µL de cada primer (10 mM). As condições da reação foram: 3 min a 94 °C, seguido de 35 ciclos de amplificação (1 min a 94 °C; 1 min a 58 °C, 2 min a 72 °C) e extensão final de 10 min a 72 °C. Os produtos das reações foram submetidos à eletroforese em tampão TAE 0,5 x (Tris-acetato-EDTA), em gel de agarose 2% e visualizados após coloração com brometo de etídeo (0,5 µg/ mL) sob luz UV.

Em todas as reações de PCRs realizadas foram adicionados um controle negativo (T-) e um controle positivo (T+). O controle negativo foi formado pelo produto de PCR sem DNA; já o controle positivo, pelo produto de PCR com DNA de plantas de *E. grandis* x *E. urophylla*, no qual já havia sido confirmada a amplificação do fragmento esperado.

TABELA 11 – Sequências de primers utilizados nas reações de PCR de *E. grandis* x *E. urophylla*.

PRIMERS	SEQUÊNCIAS
AttB1 pro1a	5'-AAAAAGCAGGCTATCAATGTATGACACGAAAAGACCC-3'
AttB1 pro1b	5'-AGAAAGCTGGGTAAGGACGTCTGCACAGGGATA-3'
pKG <i>gfp</i> rev	5'-AGGGTCAGCTTGCCGTAGGT-3'
Kana RNAi	5'-GCGGTTCTGTCAGTTCCAAACGTAA-3'
pKG Kana fw	5'-TGA CTCCCTTAATTCTCATGTA-3'
AttB1	5'- GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTA -3'
AttB2	5'- GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTA -3'.
T35S fw	5'-ATTTGTAGAGAGAGACTGGT GATTT-3'
Tub-s	5'-TGGTTCGGGGCTTGGTTCCC-3'
Tub-as	5'-GCGCTTGGTCTTGATGGTTG-3'

Nota: Tub: tubulina; fw: primer forward; rev: primer reverse.

TABELA 12 - Ensaios de PCR realizados utilizando explantes transformados de *E. grandis* x *E. urophylla*, testando diferentes construções, produtos, temperaturas de hibridização e primers.

Ensaios	Construção	Extração do DNA – PCR	Temperatura hibridização (°C)	Primers
1	Promotor <i>cbf1a</i> (5 eventos)	Extract-N-Amp™ Kit Sigma	60	AttB1 pro1a pKG <i>gfp</i> rev
2	Promotor <i>cbf1a</i> (5 eventos)	Extract-N-Amp™ Kit Sigma	58	Tub-s Tub-as
3	pKGWFS7	Extração e PCR tradicionais	55	pKG Kana fw pKG <i>gfp</i> rev
			55,9	
			58,2	
			60,6	
			63	
			64,8	
65				
4	pKGWFS7	Extract-N-Amp™ Kit Sigma	65	pKG Kana fw pKG <i>gfp</i> rev
5	<i>cbf1a</i>	Extração clássica Kit Sigma	55	AttB1 pKG <i>gfp</i> rev
			55,9	
			58,2	
			60,6	
			63	
			64,8	
65				
6	<i>cbf1a</i> <i>cbf1b</i>	Extract-N-Amp™ Kit Sigma	58,2	AttB1 pro1a/ AttB1 pro1b pKG <i>gfp</i> rev
7	<i>cbf1a</i> <i>cbf1b</i>	Extract-N-Amp™ Kit Sigma	66	Tub-s Tub-as
8	<i>cbf1a</i>	Extract-N-Amp™ Kit Sigma	66	AttB1 T35S fw
9	<i>cbf1a</i>	Extract-N-Amp™ Kit Sigma	55	pKG Kana fw pKG <i>gfp</i> rev
			60	
			65	
10	<i>cbf1a</i>	Extract-N-Amp™ Kit Sigma	55	AttB1 <i>cbf1a</i> AttB2 <i>cbf1a</i> AttB1 AttB2
			60	
11	<i>cbf1a</i> Pro <i>cbf1a</i>	Extract-N-Amp™ Kit Sigma	55	AttB1 AttB2
12	<i>cbf1a</i> <i>cbf1b</i>	Extração e PCR clássicos	55	Kana RNAi pKG <i>gfp</i> rev
13	Pro <i>cbf1a</i> Pro <i>cbf1b</i> <i>cbf1b</i>	Extração e PCR clássicos	55	Kana RNAi pKG <i>gfp</i> rev

Nota: A sequência dos primers encontra-se na Tabela 11.



### 5.2.9.2 RT-PCR em tempo real

Para a realização do RT-PCR foram utilizadas as plantas positivas pela análise de PCR, sendo 5 plantas provenientes de eventos de transformação com o promotor *cbf1a* e 12 plantas com o promotor *cbf1b*. As placas de RT-PCR foram repetidas 3x.

A maceração do material vegetal foi realizada conforme indicado no item 5.2.9.1. Para a extração do RNA foi utilizado o Kit SV Total RNA Isolation System (Promega). Posteriormente, o RNA total foi conservado a -20 °C até ser quantificado em espectrofotômetro com absorvância de 260 nm.

Para a síntese de cDNA foi utilizado RNA (3 µg) e os seguintes produtos da Promega: 5 µL de tampão, 1,3 µL de dNTP (10 mM), 1 µL de random primer (10 mM) e água Mili-Q até completar o volume final de 23 µL. Após a homogeneização, a solução foi deixada por 15 min à temperatura ambiente. Em seguida, os tubos tipo eppendorfs, contendo a solução foram colocados no termociclador (T1 Thermocycler 48 - Biometra), o qual foi ajustado para 5 min a 70 °C, seguido de 5 min a 0 °C. Neste momento foi adicionado 0,8 µL de RNasin e 1 µL de superscriptase II, continuando com 1 h a 42 °C e 10 min a 70 °C. Após a síntese de cDNA foi realizada a dosagem em espectrofotômetro com absorvância em 260 nm. Foi também realizado PCR com os oligonucleotídeos da tubulina, conforme descrito no item 5.2.9.1.

Com o cDNA obtido foram realizadas duas diluições, a primeira com a concentração de 120 ng/ µL e a segunda de 0,12 ng/ µL. Após as diluições foi realizada a placa de análise de expressão. Para realização da placa cada amostra foi repetida 3x e foi acrescentada uma testemunha negativa, sem DNA, sendo esta repetida 2x. Para a preparação do mix para o gene da *gfp* foi adicionado 5 µL de SYBR<sup>®</sup>green (Applied Biosystems), 0,3 µL do primer RT-*gfp* fw (10 µM) e 0,3 µL de primer RT-*gfp* rev (10 µM), 2,4 µL de água Mili-Q e 2 µL de cDNA (120 ng/ µL). As sequências dos primers são: RT-*gfp* fw: 5'-ACGTAAACGGCCACAAGTTCA-3'; RT-*gfp* rev: 5'-TGCAGATGAACTTCAGGGTTCAG-3'.

Já para preparação do mix com o gene 18S, que é o controle positivo, foram adicionados 5 µL de SYBR<sup>®</sup>green, 0,3 µL de primer 18S fw (10 µM) e 0,3 µL de primer 18S rev (10 µM), 2,4 µL de água e 2 µL de cDNA (0,120 ng/ µL). Posteriormente a preparação do mix dos dois genes foi depositado 8 µL do mix em cada canaleta da placa e em seguida 2 µL de cDNA, sendo os dois homogeneizados com uma pipeta. As sequências dos primers são: 18S fw: 5'-CGCGCTACACTGATGTATTC-3'; 18S rev: 5'-GTACAAAGGGCAGGGACGTA-3'.

Em seguida, a placa de expressão foi encaminhada ao Genopole de Castanet-Toulouse para mensurar os produtos amplificados, sendo utilizado o equipamento Roche Light Cycler 480. Posteriormente, foram obtidos os valores de Ct, ou seja, o número de ciclos na reação de amplificação que foram necessários para a obtenção de transcritos. Foram realizados os cálculos com base no valor de Ct, utilizando o método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). No Anexo 12 está apresentado um exemplo dos cálculos realizados.

Para a obtenção do nível de expressão, foram utilizadas as seguintes formulas:

$$\Delta Ct = \bar{X}_{gfp} - \bar{X}_{18S}$$

$$SD = [(DP_{tratamento\ gfp})^2 + (DP_{tratamento\ 18S})^2]^{0.5}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{tratamento} - \Delta Ct_{controle}$$

$$NE = 2^{(\Delta\Delta Ct)}$$

Nas quais: Tratamento: 4 °C, 2 h

Controle: 23 °C

Ct = indica o número fracionado de ciclos no qual a quantidade de transcritos atinge um limiar fixo

SD = desvio padrão normatizado

DP = desvio padrão

NE = nível de expressão

## 5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.3.1 Transformação genética

Ao quinto dia após o contato com *A. tumefaciens*, os explantes foram selecionados com base na expressão do gene *gfp* de acordo com a visualização do explante foliar sob exposição a diferentes comprimentos de onda. Os explantes foram considerados *gfp* positivos quando apresentaram pontos ou áreas de expressão verde sob luz fluorescente verde e quando os mesmos pontos ou áreas desapareceram sob a exposição à luz fluorescente vermelha (Figura 15).

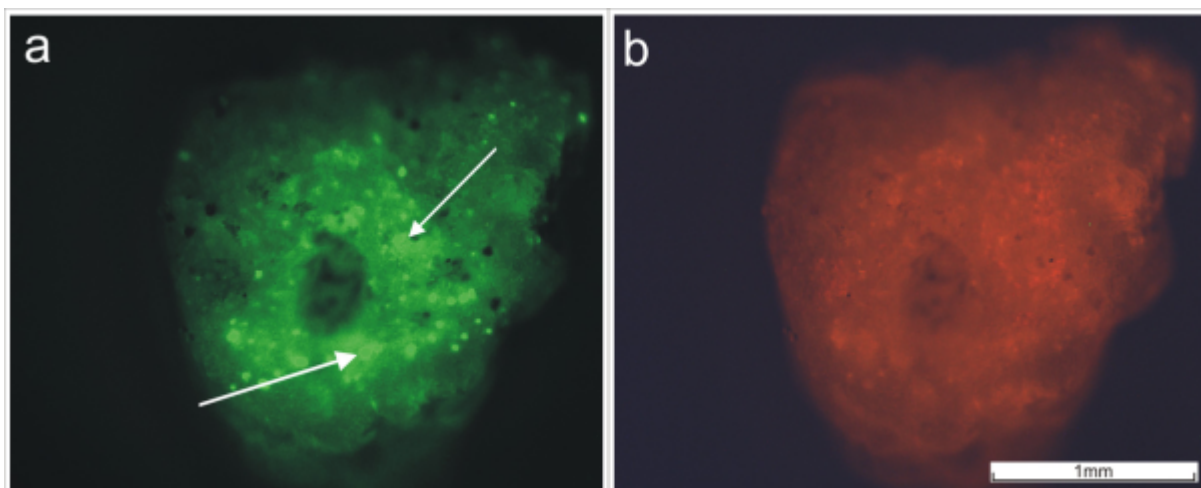


FIGURA 15 – Explante foliar de *E. grandis* x *E. urophylla*, cinco dias após a inoculação com *A. tumefaciens*. a) As setas indicam a expressão da GFP sob luz fluorescente verde; b) Expressão da GFP sob luz fluorescente vermelha.

Os resultados da expressão do gene *gfp* em explantes foliares de *E. grandis* x *E. urophylla* transformados com as construções *cbf1a* e *cbf1b* e em explantes que não foram submetidos à inoculação com *A. tumefaciens* (tratamento controle) estão apresentados na Tabela 13. Foi observada variação no número de explantes com expressão GFP com relação aos promotores testados. Foi utilizado maior número de explantes para a instalação dos experimentos com o promotor *cbf1a* e foi verificado uma menor porcentagem de explantes com expressão GFP (34,85%), quando comparado com o promotor *cbf1b* (46,43%).

TABELA 13 – Resumo dos resultados obtidos na transformação genética de explantes foliares de *E. grandis* x *E. urophylla*, com as construções promotor *cbf1a* e promotor *cbf1b* e com o tratamento controle.

	Promotor <i>cbf1a</i>	Promotor <i>cbf1b</i>	Controle
Nº de explantes colocados em cultura	3360	1960	380
Nº explantes com expressão GFP	1171 (34,85%)	910 (46,43%)	0
Nº explantes GFP utilizados nos ensaios posteriores	700	450	0

A formação de calos em explantes foliares de *E. grandis* x *E. urophylla* putativos teve início em média aos 15 dias após o isolamento. Já o início da regeneração ocorreu após 20 dias em meio de cultura SDM, aos 42 dias de cultivo. Em geral, as gemas formadas tiveram início a partir de calos em sua maioria de coloração esverdeada. Também foram verificadas regiões avermelhadas, evidenciando a presença de antocianina (Figura 16). No tratamento controle, a formação de calos e a regeneração de gemas ocorreram em um intervalo de tempo menor, em média cinco dias antes que nos explantes inoculados com *A. tumefaciens*. Porém, o desenvolvimento das plantas transformadas foram morfológicamente semelhantes ao de plantas não transgênicas, mantidas nos mesmos meios de cultura e sob as mesmas condições da sala de crescimento.

No presente estudo foi realizada a transformação genética mediada por *A. tumefaciens* assistida pela técnica de sonicação e vácuo e acredita-se que o seu uso tenha contribuído para a eficiência da transformação. Segundo Joersbo e Brunstedt (1992), a sonicação incrementa a transferência do T-DNA, por gerar microferimentos na superfície dos tecidos facilitando a penetração bacteriana e por induzir a liberação de compostos fenólicos. Em estudo com *E. grandis* x *E. urophylla*, foi avaliado o efeito de tempos de sonicação antes e durante a inoculação de sementes. Verificou-se que o efeito da sonicação foi benéfico, pois aumentou a eficiência da transformação de cotilédones quando a sonicação foi de 120 s antes da inoculação com *A. tumefaciens* (GONZÁLEZ *et al.*, 2002). A transformação genética combinada com infiltração a vácuo foi realizada em explantes cotiledonares de *Pinus radiata*, no qual se observou melhor frequência de transferência genética, verificado com aumento no número de células expressando o gene *uidA* (CHARITY *et al.*, 2002).

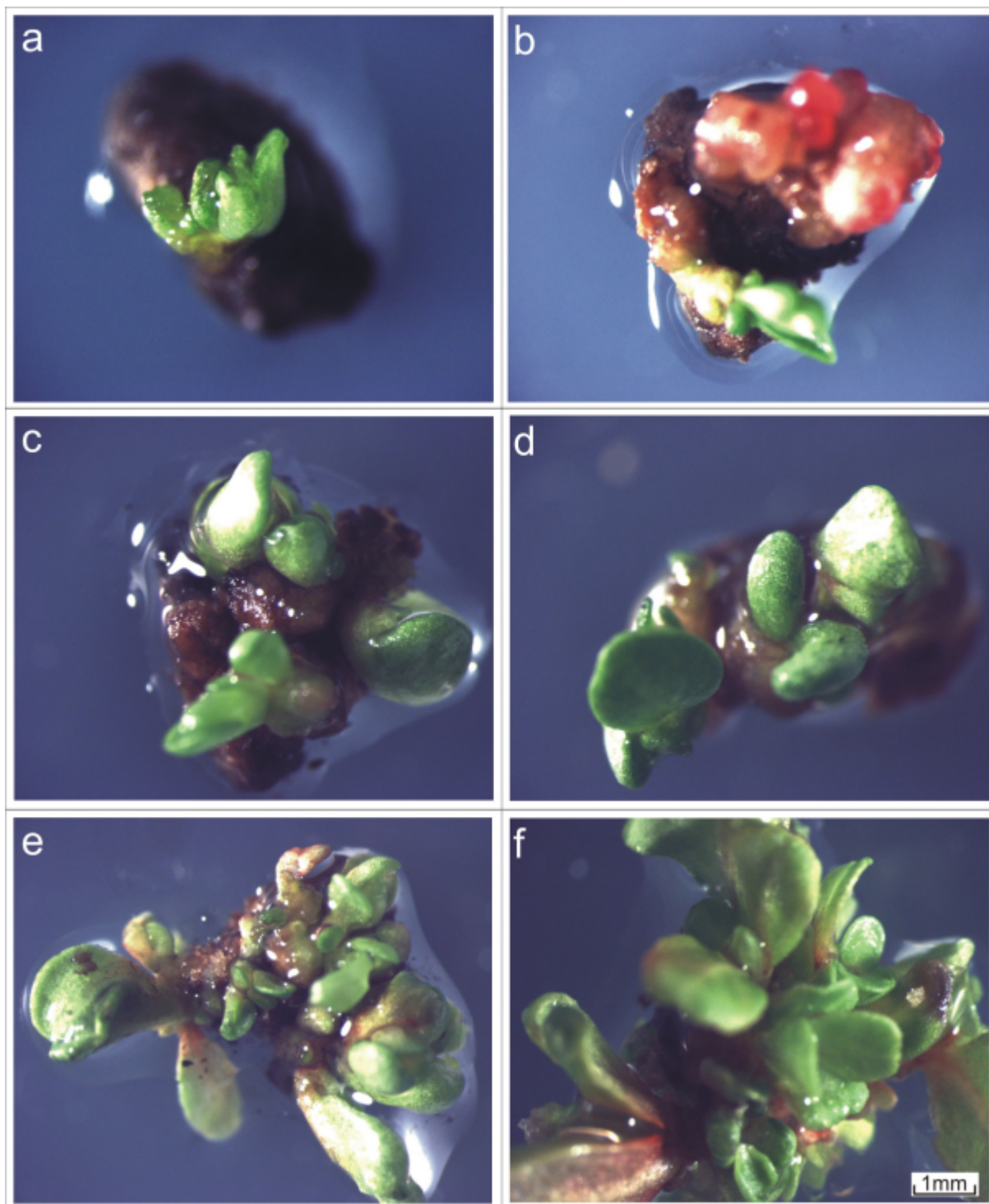


FIGURA 16 – Regeneração de gemas em *E. grandis* x *E. urophylla*. a-b) Formação de calos e início da regeneração após 20 dias em meio de cultura SDM; c-d) Formação de gemas após 30 dias em meio de cultura SDM; e-f) Formação de gemas após 68 dias em SDM.

Os resultados de calogênese, formação de gemas, número de gemas formadas por explante e oxidação estão apresentados na Tabela 14. De acordo com os dados verifica-se uma porcentagem de 4,5% de calos formados com gemas para a construção promotor *cbf1a* e 5,36%, para a promotor *cbf1b*. Já para o tratamento controle foi verificada uma taxa de regeneração maior (30,28%) que para os explantes inoculados com *A. tumefaciens*. Para o número de gemas formadas por explante (Tabela 14), houve maior número para o controle, seguido do promotor *cbf1a*.

TABELA 14 - Porcentagem de calos e gemas formados, número de gemas por explante e porcentagem de oxidação em explantes foliares de *E. grandis* x *E. urophylla* após a inoculação com *A. tumefaciens*, com a construção contendo o promotor *cbf1a* e *cbf1b* e o tratamento controle, com avaliação após 90 dias de cultivo.

Tratamentos	Calo sem gema (%)	Calo com gema (%)	Nº gemas/ explante	Oxidação (%)
pro <i>cbf1a</i>	34,66	4,50	5,79	60,92
pro <i>cbf1b</i>	26,30	5,36	4,40	68,28
Controle	52,00	30,28	12,60	17,72

Com relação à taxa de oxidação, o controle apresentou baixa porcentagem (17,75%), seguido dos explantes transformados com a construção promotor *cbf1a*. De uma forma geral, houve alta porcentagem de oxidação após a inoculação com *A. tumefaciens*. Porém é comum em diversas espécies de *Eucalyptus* o relato de altas taxas de oxidação após a inoculação com a bactéria. Em um estudo com *E. saligna* foi verificado 99,5% de mortalidade, ocasionado por oxidação em explantes foliares transformados com *A. tumefaciens* (DIBAX, 2007). A diferença na taxa de oxidação obtida com *E. saligna* com relação ao presente trabalho pode estar relacionada à utilização do antibiótico cefotaxima o qual pode ter ocasionado maior toxicidade aos explantes, uma vez que, neste trabalho com *E. grandis* x *E. urophylla*, foi utilizado o antibiótico Augmentin® (amoxicilina e clavulonato de potássio). Outros autores também já relataram o efeito ocasionado pela alta oxidação dos explantes na presença de cefotaxima, fato este verificado com explantes cotiledonares de *Nicotiana tabacum* (NAUERBY *et al.*, 1997) e com *E. camaldulensis* (QUISEN, 2007).

### 5.3.2 Expressão do gene *gfp*

Depois de realizada a inoculação com *A. tumefaciens* utilizando os promotores *cbfs* tornou-se importante determinar quais as melhores condições de exposição dos explantes foliares ao estresse para ativação dos promotores *cbfs* e expressão do gene da *gfp*.

Com base nos resultados do efeito da exposição das plantas transformadas com os promotores *cbf1a* e *cbf1b* a 4 °C (Tabela 15) e a 0 °C (Tabela 16) durante diferentes intervalos de tempo, não foi constatada expressão da GFP em mais de 50% dos explantes, como pode ser visualizado na Figura 17. De acordo com os dados, verifica-se que houve um aumento na expressão da GFP a partir de duas horas de exposição a 4 °C, sendo os tratamentos com duas a cinco horas similares. Foi escolhido o tratamento com duas horas de exposição a 4 °C, por este apresentar-se menos prejudicial ao processo regenerativo.

Quanto à expressão do gene *gfp* sob controle dos promotores *cbf1a* e *cbf1b*, foi verificada maior porcentagem de explantes expressando a GFP com *cbf1b*, com exposição a 4 °C (Tabela 15). Esta tendência de menor expressão do promotor *cbf1a* quando comparada com o promotor *cbf1b* também foi verificada com a expressão dos genes *cbfs* em estudo realizado com dois genes *cbfs* isolados de *E. gunnii*, denominados *Egucbf1a* e *Egucbf1b* (EL KAYAL *et al.*, 2006). Neste trabalho foi verificado que, após a transferência das plantas de 12 °C para 4 °C, o *Egucbf1a* foi dez vezes menos induzido que o *Egucbf1b*, após duas horas de exposição a 4 °C. Segundo os autores o *Egucbf1b* foi significativamente mais induzido que o *Egucbf1a* em diferentes programas de aclimação (EL KAYAL *et al.*, 2006).

TABELA 15 – Efeito da exposição dos explantes foliares de *E. grandis* x *E. urophylla* a 4 °C por diferentes períodos sobre a expressão do gene *gfp*, após cinco dias da inoculação com *A. tumefaciens*.

Promotor	Tratamentos a 4 °C	Explantes com expressão do gene <i>gfp</i> (%)
<i>cbf1a</i>	30 min	10,0
	1h 30 min	20,0
	2 h	40,0
	3 h	45,0
	4 h	45,0
	5 h	40,0
<i>cbf1b</i>	30 min	10,0
	1h 30 min	30,0
	2 h	60,0
	3 h	55,0
	4 h	50,0
	5 h	50,0

Nota: Médias de duas repetições para os tratamentos com duas e três horas.

De acordo com os dados da Tabela 16, verifica-se maior porcentagem de explantes expressando a GFP tanto para o promotor *cbf1a*, como para promotor *cbf1b* após a exposição dos explantes por duas ou três horas a 0 °C, quando comparado a 1 h de exposição. No entanto, a porcentagem de explantes com expressão é bastante similar à expressão obtida após a exposição a 4 °C, citada anteriormente. Como a exposição dos explantes à temperatura de 0 °C pode prejudicar a regeneração, estes tratamentos não foram utilizados posteriormente. Os resultados do presente trabalho diferem do exposto por alguns autores que relatam que os genes *cbfs* são induzidos com uma hora de exposição à temperatura de 0 °C, codificando fatores transcrpcionais, que ativam genes responsivos ao frio (YAMAGUCHI-SHINOZAKI; SHINOZAKI, 1994; STOCKINGER *et al.*, 1997). Em um estudo com *Gossypium hirsutum*, foi acompanhada a expressão do gene *ghdreb1*, após a exposição de plantas de nove dias a 0 °C, por diferentes intervalos de tempo (0, 30 min, 1, 2, 4, 8 e 16 horas), sendo verificada um pico de expressão com duas horas de exposição (SHAN *et al.*, 2007).

Porém não existem relatos da expressão do gene *gfp* sob controle de promotores *cbfs*, que possam ser comparados com o presente trabalho.



TABELA 16 - Efeito da exposição de explantes foliares de *E. grandis* x *E. urophylla* a 0 °C por 1, 2 e 3 horas sobre a expressão do gene *gfp*, após cinco dias da inoculação com *A. tumefaciens*.

Promotor	Tratamentos a 0 °C (horas)	Explantes com expressão do gene <i>gfp</i> (%)
<i>cbf1a</i>	1	20,0
	2	55,0
	3	50,0
<i>cbf1b</i>	1	35,0
	2	50,0
	3	55,0

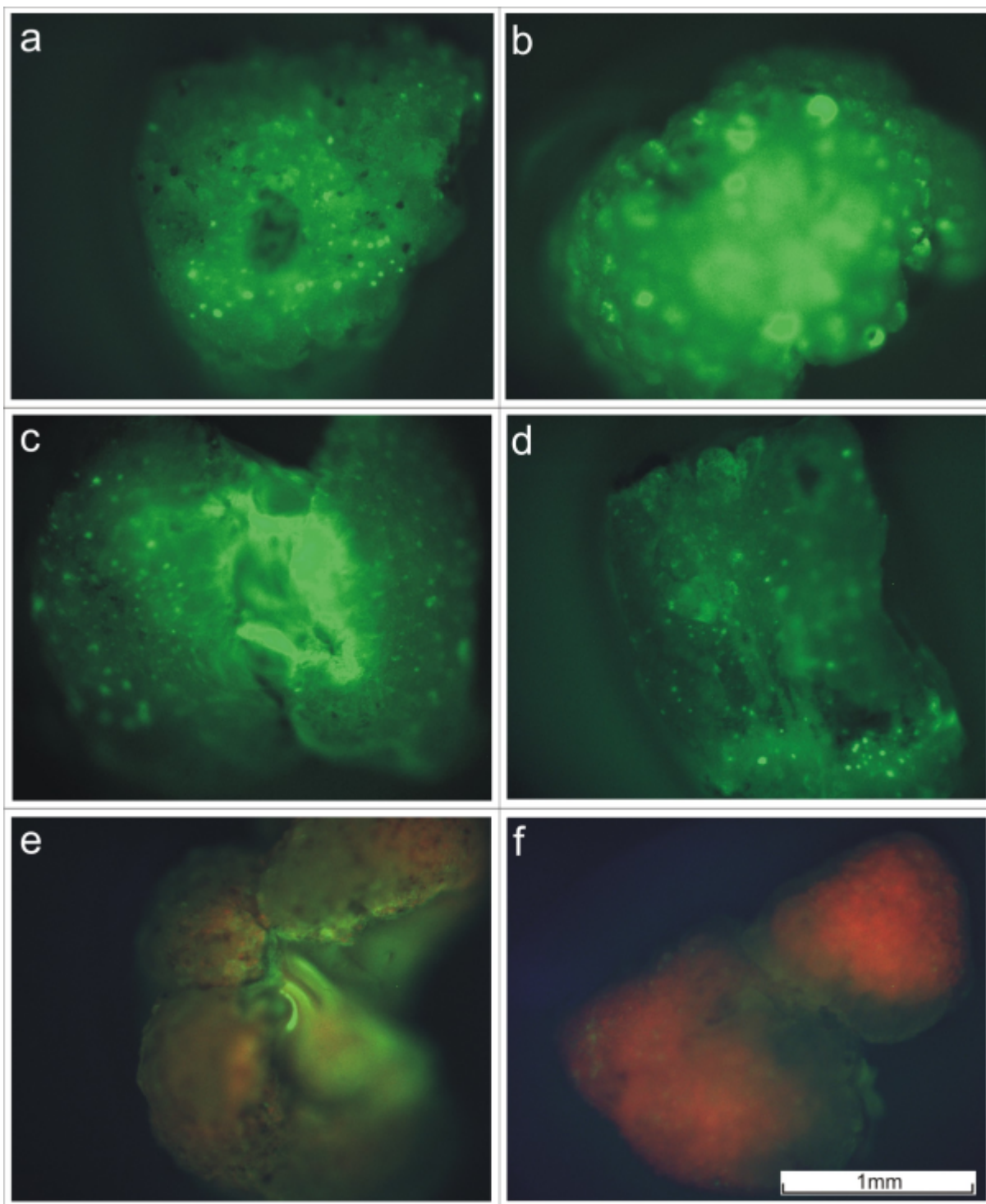


FIGURA 17 – Expressão do gene *gfp*, após a exposição ao frio de explantes foliares de *E. grandis* x *E. urophylla*, sob luz fluorescente verde, cinco dias após o contato com *A. tumefaciens*. a) Explantes transformados com o promotor *cbf1a*, 4 °C - 2 h; b) Promotor *cbf1b*, 4 °C - 2 h; c) Promotor *cbf1a*, 4 °C - 3 h; d) Promotor *cbf1b*, 4 °C - 3 h; e) Promotor *cbf1a*, 0 °C - 2 h; f) Controle negativo, sem expressão *gfp*.

### 5.3.3 Análises moleculares

#### 5.3.3.1 PCR

Para possibilitar a realização da análise por PCR foi necessária a obtenção de um controle positivo, para verificar se o método de extração e a reação de PCR estariam funcionando. Para isto, foi testado inicialmente o Kit da Sigma (Extract-N-Amp™) pela quantidade pequena de material vegetal, cerca de uma folha, requerida na extração. Porém, não foi obtida resposta positiva com os diversos primers, temperaturas de hibridização e DNAs testados, tanto com os promotores *cbfs*, como com a utilização dos genes *cbfs*.

Posteriormente, nos ensaios utilizando a extração e os produtos de PCR clássicos, foram obtidos os fragmentos esperados, indicando que o protocolo era apropriado, com os primers e as temperaturas de hibridização adequados para a reação de amplificação. O melhor resultado foi obtido utilizando o DNA do *cbf1b*, temperatura de hibridização de 55 °C e Kana RNAi e pKG *gfp* rev, como primers. Os resultados de todos os ensaios realizados estão apresentados no Anexo 13.

O DNA extraído das gemas regeneradas (Figura 18 a) foi analisado por PCR para a detecção dos promotores *cbfs*. Os resultados da análise de PCR estão apresentados na Figura 18 b, para o promotor *cbf1a* e na Figura 19, para o promotor *cbf1b*. Foram testadas 19 plantas putativas com o promotor *cbf1a*, das quais foram obtidas cinco positivas. Para o promotor *cbf1b* foram testadas 56 plantas, das quais foram obtidas 12 positivas.

Algumas plantas transformadas com o promotor *cbf1a* e a planta controle positivo apresentaram o fragmento desejado de 2095 pb, correspondente ao promotor *cbf1a*, sendo confirmada a detecção deste promotor em 5 eventos de transformação. Como esperado, plantas que não foram transformadas e o produto de PCR sem DNA (T-) não apresentaram nenhum fragmento amplificado.

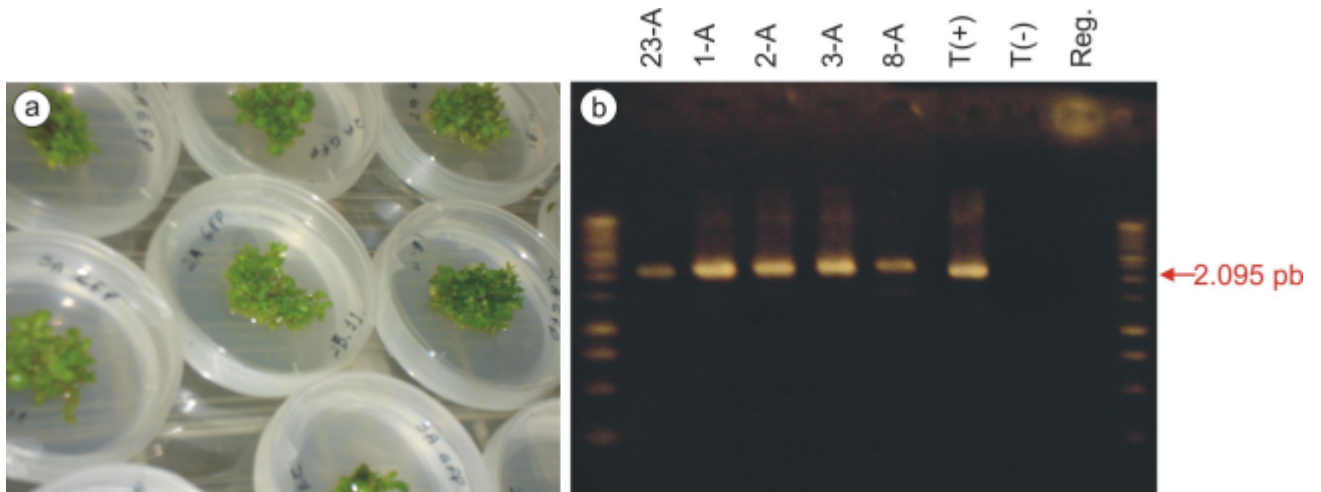


FIGURA 18 - a) Tufo de gemas de *E. grandis* x *E. urophylla* utilizados no PCR; b) Produtos de PCR obtidos do DNA de *E. grandis* x *E. urophylla* com o promotor *cbf1a*, no qual 1A, 2A, 3A, 8A e 23 A são os eventos confirmados, o T+ o controle positivo, o T- o controle negativo e o Reg, não inoculado com *A. tumefaciens*.

Para as plantas transformadas com o promotor *cbf1b* e para a planta controle positivo foi constatado o fragmento esperado de 1138 pb (Figura 19), sendo confirmada a detecção deste promotor em 12 eventos de transformação. Como esperado, plantas que não foram transformadas e o produto de PCR sem DNA (T-), que foi depositado no gel de agarose, não apresentaram nenhum fragmento.

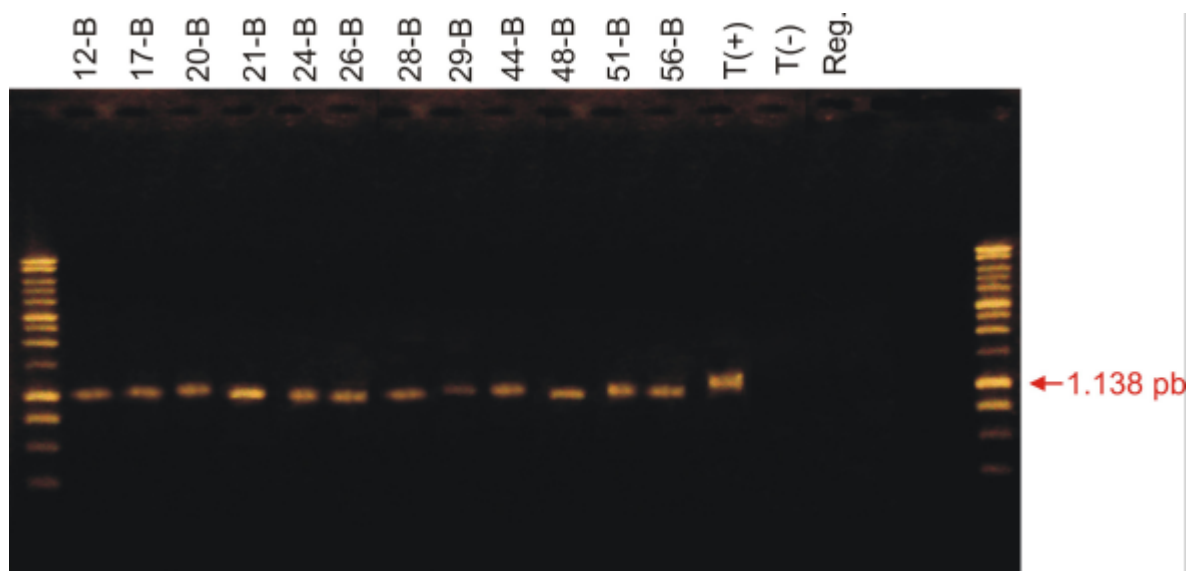


FIGURA 19 - Produtos de PCR obtidos do DNA de *E. grandis* x *E. urophylla* transformados com o promotor *cbf1b*. 12, 17, 20, 21, 24, 26, 28, 29, 44, 48, 51 e 56B são os eventos confirmados, o T+ controle positivo, o T- o controle negativo, e o Reg, não inoculado com *A. tumefaciens*.

### 5.3.3.2 RT-PCR em tempo real

Para confirmar a expressão dos promotores *cbf1a* e *cbf1b* no genoma de *E. grandis* x *E. urophylla* por meio da expressão do gene da *gfp*, foi realizado o RT-PCR em plantas positivas pela análise de PCR. Como os promotores *cbfs* são induzidos pelo estresse, o que foi verificado em ensaios anteriores quando a exposição das plantas de *E. grandis* x *E. urophylla* a 4 °C durante 2 h induziu a expressão do gene da *gfp* pelos promotores *cbfs*, os explantes foram expostos a estas condições antes da extração do RNA. A expressão do gene dos explantes expostos a 4 °C ocorre quando os valores de expressão obtidos são superiores a 2,0 (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001), quando comparado ao controle (23 °C).

Foram analisados por PCR em tempo real cinco eventos de transformação com o promotor *cbf1a* e 12 eventos com *cbf1b*, sendo obtidos quatro eventos confirmados com o promotor *cbf1b* nas três placas de expressão realizadas, utilizando RNA proveniente de extrações diferentes. Neste caso, pode-se afirmar que o promotor *cbf1b* está sendo ativado. Para os outros eventos analisados, transformados com o promotor *cbf1a*, foi constatada a expressão do gene da *gfp* em uma placa de expressão, porém não houve reprodutibilidade (Tabela 17). Esta dificuldade na detecção da expressão de alguns eventos pode indicar que estas plantas apresentam níveis baixos de expressão do gene da *gfp* quando comparados com os quatro eventos confirmados com o promotor *cbf1b*.

Uma outra explicação para a ocorrência de alguns eventos confirmados pela análise de PCR, mas não pelo RT-PCR está relacionada ao fato de que o gene da *gfp* induzido pelo promotor *cbf* não foi inserido no genoma das plantas. Isto pode ter ocorrido devido a erros de seleção das plantas durante o cultivo *in vitro* com a regeneração de “escapes”. No entanto, existe grande probabilidade de que estes falsos positivos tenham sido gerados devido à contaminação causada pela presença de *Agrobacterium* residual. Os falsos positivos são devidos à amplificação de quantidades mínimas de DNAs contaminantes contendo a sequência analisada (ROMANO, 1998; BORST *et al.*, 2004).

TABELA 17 - Nível de expressão do gene da *gfp* em tufo de gemas de *E. grandis* x *E. urophylla* transformadas com o promotor *cbf1a* e *cbf1b*.

Construção	Eventos	Expressão do gene da <i>gfp</i>		
		1º RT-PCR	2º RT-PCR	3º RT-PCR
Pro <i>cbf1a</i>	1	3,51	1,24	1,27
	2	6,47	0,07	0,14
	3	8,89	0,95	0,82
	8	11,51	0,13	0,04
	23	2,45	2,72	1,34
Pro <i>cbf1b</i>	20	29,39	27,19	31,52
	21	4,12	4,37	3,23
	26	4,52	4,16	3,89
	48	5,99	6,17	6,09

## 5.4 CONCLUSÕES

Fundamentando-se nos resultados obtidos no presente trabalho, conclui-se que:

- É possível regenerar explantes foliares de *E. grandis* x *E. urophylla* inoculados com *Agrobacterium tumefaciens*, com o gene da *gfp*, sob controle dos promotores *cbf1a* e *cbf1b*.
- A exposição dos explantes foliares de *E. grandis* x *E. urophylla* a 4 °C durante duas horas foi a melhor condição para a ativação dos promotores *cbfs* e expressão do gene da *gfp*.

## 5.5 REFERÊNCIAS

- ALFENAS, A. C.; ZAUZA, E. A. V.; MAFIA, R. G.; ASSIS, T. F. **Clonagem e doenças do Eucalipto**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2004. 442 p.
- BENEDICT, C.; SKINNER, J. S.; MENG, R.; CHANG, Y.; BHALERAO, R.; HUNER, N. P. A.; FINN, C. E.; CHEN, T. H. H.; HURRY, V. The *cbf1*-dependent low temperature signalling pathway, regulon, and increase in freeze tolerance are conserved in *Populus* spp. **Plant Cell and Environment**, v. 29, p. 1259-1271, 2006.
- BORST, A.; BOX, A. T. A.; FLUIT, A. C. False-positive results and contamination in nucleic acid amplification assays: suggestions for a prevent and destroy strategy. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 23, p. 289-299, 2004.
- BRACELPA - Associação Brasileira de Celulose e Papel. **Desempenho do setor em 2007 e Projeções**. Disponível em <http://www.bracelpa.org.br/bra/estatisticas/index.html>. Acesso em 10/03/2008.
- CARAMORI, P. H.; MANETTI FILHO, J.; MORAIS, H.; LEAL, A. C. **Geada: técnicas para proteção dos cafezais**. Londrina: IAPAR, 2000. 35 p. (IAPAR. Circular, 112).
- CHALFIE, M.; TU, Y.; EUSKIRCHEN, G.; WARD, W. W.; PRASHER, D. C. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. **Science**, v. 263, p. 802-805, 1994.
- CHARITY, J. A.; HOLLAND, L.; DONALDSON, S.S.; GRACE, L.; WALTER, C. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Pinus radiata* organogenic tissue using vacuum-infiltration. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 70, p. 51-60, 2002.
- COOK, D.; FOWLER, S.; FIEHN, O.; THOMASHOW, M. F. A prominent role for the *cbf* cold response pathway in configuring the low temperature metabolome of *Arabidopsis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA** 101, 15243-15248, 2004.
- DIBAX, R. **Transformação genética de *Eucalyptus saligna* com o gene *P5CSF129A* via *Agrobacterium tumefaciens***. (tese de doutorado). Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Produção Vegetal. Universidade Federal do Paraná, 2007.



EL KAYAL, W.; NAVARRO, M.; MARQUE, G.; KELLER, G.; MARQUE, C.; TEULIÈRES, C. Expression profile of *cbf*-like transcriptional factor genes from *Eucalyptus* in response to cold. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, p. 2455-2469, 2006.

FERREIRA, M. Melhoramento e a silvicultura intensiva clonal. **IPEF**, n. 45, p. 22-30, 1992.

FOWLER, S.; THOMASHOW, M. F. *Arabidopsis* transcriptome profiling indicates that multiple regulatory pathways are activated during cold acclimation in addition to the *cbf* cold response pathway. **The Plant Cell**, v. 14, 1675-1690, 2002.

GILMOUR, S. J.; ZARKA, D. G.; STOCKINGER, E. J.; SALAZAR, M. P.; HOUGHTON, J. M.; THOMASHOW, M. F. Low temperature regulation of the *Arabidopsis cbf* family of AP2 transcriptional activators as an early step in cold-induced *cor* gene expression. **The Plant Journal**, v. 16, p. 433-442, 1998.

GONZÁLEZ, E. R.; ANDRADE, A.; BERTOLO, A. L.; LACERDA, G. C.; CARNEIRO, R. T.; DEFÁVARI, V. A. P.; LABATE, M. T. V.; LABATE, C. A. Production of transgenic *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* using the sonication-assisted *Agrobacterium* transformation (SAAT) system. **Functional Plant Biology**, v.29, p.97-102, 2002.

HAAKE, V.; COOK, D.; RIECHMANN, J. L.; PINEDA, O.; THOMASHOW, M. F.; ZHANG, J. Z. Transcription factor *cbf4* is a regulator of drought adaptation in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v. 130, p. 639-648, 2002.

HO, C. K.; CHANG, S. H.; TSAY, C. J.; CHIANG, V. L.; CHEN, Z. Z. *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of *Eucalyptus camaldulensis* and production of transgenic plants. **Plant Cell Reports**, v. 17, p. 675-680, 1998.

JEFFERSON, R. Assaying chimeric genes in plants: the *gus* gene fusion system. **Plant Molecular Biology Reports**, v. 5, p. 387-405, 1987.

JOERSBO, M.; BRUNSTEDT, J. Sonication: a new method for gene-transfer to plants. **Physiologia Plantarum**, v. 85, p. 230-234, 1992.

KASUGA, M.; MIURA, S.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. 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 Physiology**, v. 45, p. 346-350, 2004.

LIU, Q.; KASUGA, M.; SAKUMA, Y.; ABE, H.; MIURA, S.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA-binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. **Plant Cell**, v. 10, p. 1391-1406, 1998.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method. **Methods**, v. 25, p. 402-408, 2001.

NAUERBY, B.; BILLING, K.; WYNDAELE, R. Influence of the antibiotic timentin on plant regeneration compared to carbenicillin and cefotaxime in concentrations suitable for elimination of *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Science**, v. 123, p. 169-177, 1997.

OBERTELLO, M.; SANTI, C.; SY, M-O.; LAPLAZE, L.; AUGUY, F.; BOGUSZ, D.; FRANCHE, C. Comparison of four constitutive promoters for the expression of transgenes in the tropical nitrogen-fixing tree *Allocasuarina verticillata*. **Plant Cell Reports**, v. 24, p. 540-548, 2005.

PALUDZYSZYN FILHO, E.; SANTOS, P. E. T. dos; FERREIRA, C. A. **Eucalyptus indicados para plantio no estado do Paraná**. Documentos Embrapa, 2006, v. 129, 45p.

PAOLI, L. G. de; CAMARGO, R. L. B.; HAKAKAVA, R.; MENDES, B. M. J.; MOURÃO FILHO, F. de A. A. Transformação genética de laranja 'Valência' com o gene *cecropin* MB39. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, p.1663-1666, 2007.

POKE, F. S.; VAILLANCOURT, R. E.; POTTS, B. M.; REID, J. B. Genomic research in *Eucalyptus*. **Genetica**, v. 125, p. 79-101, 2005.

QUISEN, R. C. **Transformação genética de *Eucalyptus camaldulensis* via cocultivo com *Agrobacterium tumefaciens***. Tese de doutorado. Programa de Pós- Graduação em Agronomia – Produção Vegetal. Universidade Federal do Paraná, 2007.

QUOIRIN, M.; QUISEN, R. **Advances in genetic transformation of *Eucalyptus* species**. In: FRANCHE, C. (Ed) *Molecular Biology of Tropical Plants*. Research Signpost, Kerala, India, 2006, p. 41-56.

ROMANO, E. Análise da integração do DNA pela técnica Southern Blot. In: BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. de C. **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPq, 1998, v.1, p. 205-222.

SHAN, D. P.; HUANG, J. G.; YANG, Y. T.; GUO, Y. H.; WU, C. A.; YANG, G. D.; GAO, Z.; ZHENG, C. C. Cotton GhDREB1 increases plant tolerance to low temperature and is negatively regulated by gibberellic acid. **New Phytologist**, v. 176, p.70-81, 2007.

SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SEKI, M. Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 6, p. 410-417, 2003.

STOCKINGER, E. J; GILMOUR, S. J.; THOMASHOW, M. F. *Arabidopsis thaliana cbf1* encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, v. 94, p. 1035-1040, 1997.

TEPFER, M.; CASSE-DELBART, F. *Agrobacterium rhizogenes* as a vector for transforming higher plants. **Microbiological Sciences**, v.4, p. 24-28, 1987.

THOMASHOW, M. F. So what's new in the field of plant cold acclimation? Lots! **Plant Physiology**, v. 125, p.89-93, 2001.

TOURNIER, V.; GRAT, S.; MARQUE, C.; EL KAYAL, W.; PENCHEL, R.; ANDRADE, G. de; BOUDET, A. M.; TEULIÈRES, C. An efficient procedure to stably introduce genes into an economically important pulp tree. **Transgenic Research**, v. 12, p. 403-411, 2003.

WELLING, A.; PALVA, E. T. Molecular control of cold acclimation in trees. **Physiologia Plantarum**, v. 127, p. 167-181, 2006.

YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. A novel cis-acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress. **Plant Cell**, v. 6, p. 251-264, 1994.

YOSHIDA, K.; SHINMYO, A. Transgene expression systems in plant, a natural bioreactor. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 90, p. 353-362, 2000.

ZHU, J. K. Salt and drought stress signal transduction in plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 53, p. 247-273, 2002.

ZHU, J.; DONG, C-H; ZHU, J. K. Interplay between cold-responsive gene regulation, metabolism and RNA processing during plant cold acclimation. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 10, p. 290-295, 2007.

## 6 CONCLUSÕES GERAIS

Com base nos resultados obtidos, a partir das condições experimentais estabelecidas no presente trabalho, conclui-se que:

- A capacidade regenerativa de explantes foliares do híbrido *E. grandis* x *E. urophylla* mostra-se dependente do genótipo. O clone 11 apresenta potencial regenerativo superior ao 827.
- O aumento na frequência de repicagem dos tufos de gemas no qual são coletadas as folhas favorece a regeneração.
- A parte da folha utilizada afeta o potencial regenerativo do clone 11, com maior eficiência para a parte basal;
- A regeneração de explantes foliares do clone 11 é afetada positivamente com o aumento na frequência de repicagens em meio de cultura BIT.
- A pré-cultura favorece a transformação genética de explantes foliares de *E. grandis* x *E. urophylla*, sendo dois dias de pré-cultura o tempo recomendado.
- A co-cultura foi benéfica para o sistema de transformação utilizado, com resposta mais favorável com três dias de co-cultura.
- A acetosiringona aumenta a eficiência da transformação genética, sendo recomendada sua utilização na pré- e co-cultura.
- A melhor condição para a ativação dos promotores *cbfs* e expressão do gene da *gfp* em explantes foliares de *E. grandis* x *E. urophylla* é de 4 °C durante duas horas.
- A expressão do gene da *gfp* foi confirmada em quatro plantas de *E. grandis* x *E. urophylla*, transformadas com o promotor *cbf1b*.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com relação aos fatores que influenciam a regeneração e a transformação genética de explantes foliares de *E. grandis* x *E. urophylla*:

O estabelecimento de um sistema de regeneração *in vitro* é essencial para o processo de transformação genética. O protocolo de regeneração deve ser adaptado para cada genótipo, pois diferentes genótipos respondem de maneira distinta aos fatores abióticos estabelecidos. Sugere-se a realização de ensaios testando diferentes intensidades luminosas na exposição das plântulas, visando diminuir o percentual oxidativo.

A transformação genética é uma ferramenta importante no desenvolvimento de novos genótipos, os quais podem promover a geração de plantios de alta qualidade. Além dos fatores testados no presente estudo, a investigação de outros aspectos, relacionados com a infecção com *A. tumefaciens* e a transferência gênica para o tecido da planta, podem contribuir para o aumento na eficiência da transformação. Neste sentido, recomenda-se que sejam investigados diferentes tipos de cepas contendo o mesmo vetor, genes e promotores. Nos ensaios realizados no presente estudo não ocorreu à regeneração de gemas adventícias, houve apenas a formação de calos. A transformação genética de explantes foliares de *E. grandis* x *E. urophylla* necessita de maiores estudos visando estimular células que tiveram contato com a bactéria a regenerar gemas adventícias.

Com relação à transformação genética de *E. grandis* x *E. urophylla* com o gene da *gfp* sob regulação dos promotores *cbfs*:

O estudo de sistemas de expressão com promotores indutivos é de extrema importância para o avanço do desenvolvimento de plantas transgênicas. As plantas transgênicas com o gene da *gfp* sob regulação do promotor induzido por estresse *cbf1b* que foram obtidas permitirão a realização de ensaios para analisar em que órgãos da planta houve expressão da *gfp*. Além disso, será possível realizar estudos sobre a localização celular desta expressão, após a exposição dos explantes ao frio.

Sugere-se para as futuras pesquisas de transformação genética a adição de ensaios comparando promotores induzidos com constitutivos, visando verificar a interferência do uso de diferentes promotores na expressão de genes de interesse.

## ANEXOS

ANEXO 01 – Composição dos meios de cultura (TOURNIER *et al.*, 2003).

<b>Substâncias inorgânicas (mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>BIP</b>	<b>BIT</b>	<b>C</b>	<b>A2</b>	<b>SDM</b>	<b>M</b>
CaCl <sub>2</sub> . 2 H <sub>2</sub> O	440	441,9	220	440	441,9	440
CoCl <sub>2</sub> . 6 H <sub>2</sub> O	0,025	-	0,025	0,025	-	0,025
CuSO <sub>4</sub> . 5 H <sub>2</sub> O	0,025	0,25	0,025	0,025	0,25	0,025
FeSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O	27,85	27,85	27,85	27,85	27,85	27,85
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2	6,2	6,2	6,2	6,2	6,2
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	990	990	-	-	990	-
KCl	1401	-	-	-	-	-
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	170	85	170	170	170
KI	0,83	-	0,83	0,83	-	0,83
KNO <sub>3</sub>	-	-	950	1900	-	1900
Mg SO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O	370	370	185	370	370	370
Mn SO <sub>4</sub> . H <sub>2</sub> O	16,9	16,9	16,9	16,9	16,9	16,9
Na <sub>2</sub> EDTA	37,25	37,25	37,25	37,25	37,25	37,25
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> . 2 H <sub>2</sub> O	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	2344	391,8	825	1650	391,8	1650
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	323,3	-	-	323,3	-
ZnSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O	8,6	8,6	8,6	8,6	8,6	8,6
<b>Substâncias orgânicas (mg L<sup>-1</sup>)</b>						
Ácido nicotínico	5	5	3	5	5	5
Arginina	-	59,23	-	-	-	-
Mio-inositol	200	200	200	200	200	200
Pantotenato de cálcio	-	-	3	-	-	-
Piridoxina	1,2	1,2	3	1,2	1,2	1,2
Tiamina	10	10	3	10	10	10
Agar (g L <sup>-1</sup> )	6	6	6	7	6	7
Água de coco (%)	-	10	-	-	-	-
Sacarose (g L <sup>-1</sup> )	30	30	20	30	30	30
<b>Fitorreguladores (µM)</b>						
2,4-D	0,5	-	-	-	-	-
BAP	1	-	-	1	2	1
ANA	-	0,1	-	2	0,5	0,5
Putrescina	-	500	-	-	100	-
Espermidina	-	100	-	-	10	-
TDZ	-	3	-	-	-	-
<b>pH</b>	<b>5,6</b>	<b>5,6</b>	<b>5,7</b>	<b>5,6</b>	<b>5,6</b>	<b>5,6</b>

## ANEXO 02 – Composição dos meios de cultura para crescimento bacteriano.

Substâncias (g.L <sup>-1</sup> )	YEB		MYA	LB
	sólido	líquido		
Extrato de carne	5,00	5,00	5,00	-
Extrato de levedura	1,00	1,00	-	5,00
Peptona	5,00	5,00	-	-
Triptona				10,00
Sacarose	5,00	5,00	-	-
MgSO <sub>4</sub>	0,24	0,24	-	-
Manitol	-	-	8,00	-
NaCl	-	-	5,00	10,00
Caseína	-	-	0,50	-
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	-	2,00	-
Ágar	16,00	-	15,00	16,00
<b>pH</b>	7,5	7,5	6,6	7,5

Nota: YEB (MILLER, 1972)

MYA (TEPFER; CASSE-DELBART, 1987).

ANEXO 03 – Solução antioxidante (TOURNIER *et al.*, 2003).

Substâncias (g)	1 L
Ácido ascórbico	0,250
Ácido cítrico	0,025
PVP 40	1,000
<b>pH</b>	5,0



ANEXO 04 - Análise de variância para o número de explantes com calo e para o número de calos oxidados de *E. grandis* x *E. urophylla*. Referentes a diferentes durações da subcultura (17, 26 e 35 dias) e dois clones (11 e 827), com avaliação após 30 dias de cultivo.

Fator de variação	Graus de liberdade	QUADRADO MÉDIO	
		Calo	Calo oxidado
Clone	1	0,033 <sup>ns</sup>	0,033 <sup>ns</sup>
Duração da subcultura	2	18,633 <sup>**</sup>	0,700 <sup>**</sup>
Clone x duração subcultura	2	0,633 <sup>ns</sup>	0,433 <sup>*</sup>
Erro	24	0,215	0,033
Total	29		
Teste de Bartlett - $\chi^2$		0,979 <sup>ns</sup>	2,823 <sup>ns</sup>
Coeficiente de variação (%)		6,8	36,4

\*\* significativo a 1% de probabilidade

\* significativo a 5% de probabilidade

<sup>ns</sup> não significativo ao nível de 5% de probabilidade

ANEXO 05 - Análise de variância para o número de explantes com calo sem gema, com calo e com gema, número de gemas por explante e número de explantes oxidados de *E. grandis* x *E. urophylla*. Referentes a diferentes durações da subcultura (17, 26 e 35 dias) e dois clones (11 e 827), com avaliação após 90 dias de cultivo.

Fator de variação	Graus de liberdade	QUADRADO MÉDIO			
		Calo sem gema	Calo com gema	Nº gemas/ explante	Oxidação
Clone	1	7,203 <sup>**</sup>	6,535 <sup>**</sup>	5,548 <sup>**</sup>	0,033 <sup>ns</sup>
Duração da subcultura	2	8,156 <sup>**</sup>	9,235 <sup>**</sup>	5,677 <sup>**</sup>	34,636 <sup>**</sup>
Clone x duração subcultura	2	5,263 <sup>**</sup>	3,232 <sup>**</sup>	4,837 <sup>**</sup>	0,233 <sup>ns</sup>
Erro	24	0,182	0,021	0,170	0,187
Total	29				
Teste de Bartlett - $\chi^2$		1,588 <sup>ns</sup>	1,161 <sup>ns</sup>	1,829 <sup>ns</sup>	3,004 <sup>ns</sup>
Coeficiente de variação (%)		12,7	13,7	11,7	7,8

\*\* significativo a 1% de probabilidade

\* significativo a 5% de probabilidade

<sup>ns</sup> não significativo ao nível de 5% de probabilidade

ANEXO 06 - Análise de variância para o número de explantes com calo e para o número de calos oxidados de *E. grandis* x *E. urophylla*. Referentes a diferentes partes da folha (basal, apical e folha inteira) e dois clones (11 e 827), com avaliação após 30 dias de cultivo.

Fator de variação	Graus de liberdade	QUADRADO MÉDIO	
		Calo	Calo oxidado
Clone	1	4,033**	0,300*
Parte folha	2	48,133**	0,033 <sup>ns</sup>
Clone x folha	2	0,133 <sup>ns</sup>	0,100 <sup>ns</sup>
Erro	24	0,145	0,053
Total	29		
Teste de Bartlett - $\chi^2$		1,996 <sup>ns</sup>	2,722 <sup>ns</sup>
Coeficiente de variação (%)		6,0	36,5

\*\* significativo a 1% de probabilidade

\* significativo a 5% de probabilidade

<sup>ns</sup> não significativo ao nível de 5% de probabilidade

ANEXO 07 - Análise de variância para o número de explantes com calo sem gema, com calo e com gema, número de gemas por explante e número de explantes oxidados de *E. grandis* x *E. urophylla*. Referentes a diferentes partes da folha (basal, apical e folha inteira) e dois clones (11 e 827), com avaliação após 90 dias de cultivo.

Fator de variação	Graus de liberdade	QUADRADO MÉDIO			
		Calo sem gema	Calo com gema	Nº gemas/ explante	Oxidação
Clone	1	14,700**	28,033**	31,416**	2,133*
Parte folha	2	9,100**	9,700**	7,372*	37,200**
Clone x folha	2	0,300 <sup>ns</sup>	4,633**	2,809 <sup>ns</sup>	3,333**
Erro	24	0,551	0,215	2,086	0,406
Total	29				
Teste de Bartlett - $\chi^2$		3,008 <sup>ns</sup>	1,761 <sup>ns</sup>	2,658 <sup>ns</sup>	2,661 <sup>ns</sup>
Coeficiente de variação (%)		22,5	24,4	41,9	13,3

\*\* significativo a 1% de probabilidade

\* significativo a 5% de probabilidade

<sup>ns</sup> não significativo ao nível de 5% de probabilidade

ANEXO 08 - Análise de variância para o número de explantes com calo e para o número de calos oxidados de *E. grandis* x *E. urophylla*. Referentes aos dias que os explantes permaneceram sem repicagem em meio BIT (5, 10 e 14 dias) e dois clones (11 e 827), com avaliação após 30 dias de cultivo.

Fator de variação	Graus de liberdade	QUADRADO MÉDIO	
		Calo	Calo oxidado
Clone	1	1,200**	0,300**
Dia em BIT	2	1,300**	0,133**
Clone x dias em BIT	2	2,100*	0,0019 <sup>ns</sup>
Erro	24	0,189	0,017
Total	29		
Teste de Bartlett - $\chi^2$		2,177 <sup>ns</sup>	0,190 <sup>ns</sup>
Coeficiente de variação (%)		6,2	30,5

\*\* significativo a 1% de probabilidade

\* significativo a 5% de probabilidade

<sup>ns</sup> não significativo ao nível de 5% de probabilidade

ANEXO 09 - Análise de variância para o número de explantes com calo sem gema, com calo e com gema, número de gemas por explante e número de explantes oxidados de *E. grandis* x *E. urophylla*. Referentes aos dias que os explantes permaneceram sem repicagem em meio BIT (5, 10 e 14 dias) e dois clones (11 e 827), com avaliação após 90 dias de cultivo.

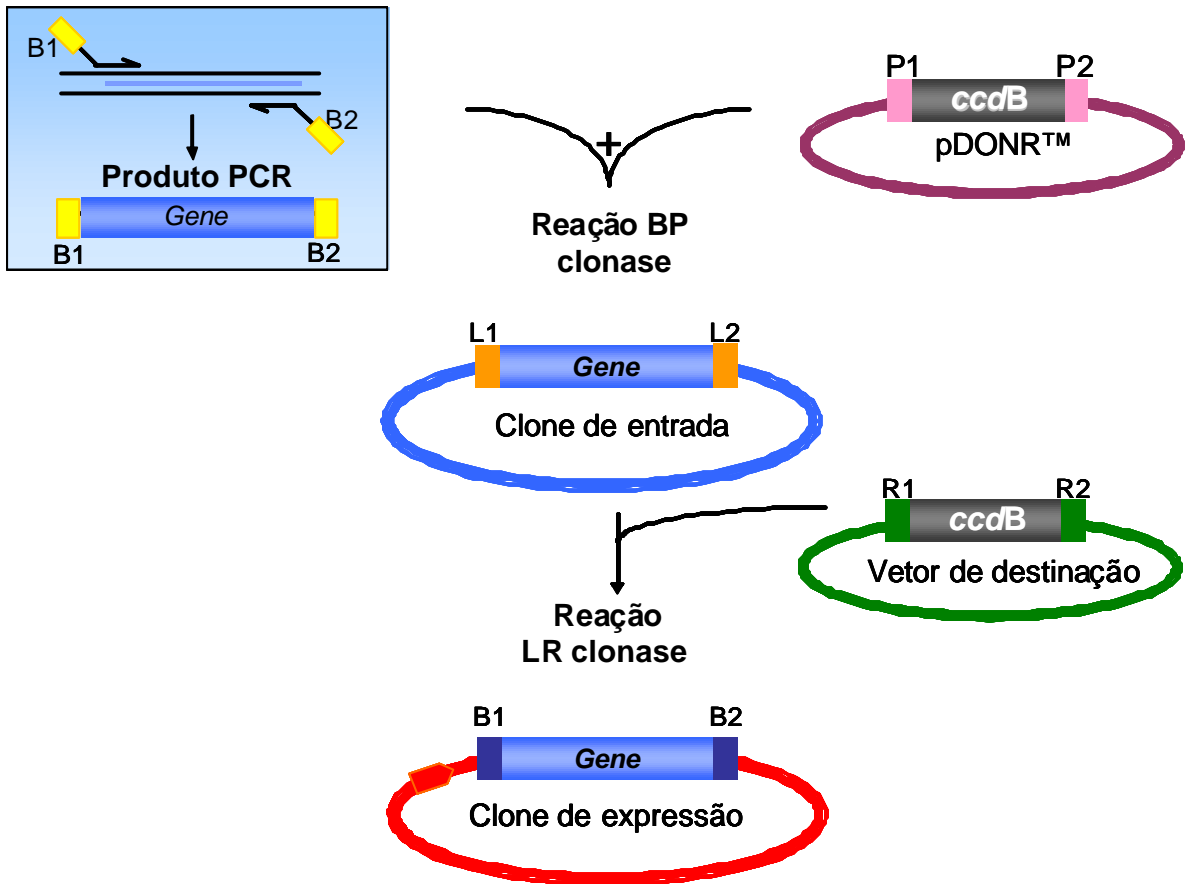
Fator de variação	Graus de liberdade	QUADRADO MÉDIO			
		Calo sem gema	Calo com gema	Nº gemas/explante	Oxidação
Clone	1	64,533**	19,200**	33,708**	13,333**
Dias em BIT	2	1,233 <sup>ns</sup>	2,533**	3,704**	0,300 <sup>ns</sup>
Clone x dias em BIT	2	0,233 <sup>ns</sup>	1,600**	2,053**	0,633 <sup>ns</sup>
Erro	24	0,372	0,075	0,265	0,380
Total	29				
Teste de Bartlett - $\chi^2$		1,314 <sup>ns</sup>	2,718 <sup>ns</sup>	0,612 <sup>ns</sup>	1,529 <sup>ns</sup>
Coeficiente de variação (%)		12,9	21,7	18,1	15,4

\*\* significativo a 1% de probabilidade

\* significativo a 5% de probabilidade

<sup>ns</sup> não significativo ao nível de 5% de probabilidade

ANEXO 10 – Representação esquemática do sistema de construção gênica Gateway.



## ANEXO 11 - Protocolo utilizado para a construção gênica.

---

1ª etapa: síntese da construção

---

O sistema de construção teve início com a adição de alguns pares de bases à parte codante, por meio de PCR, para permitir em um segundo PCR adicionar adaptadores AttB1 e AttB2, essenciais ao processo de recombinação. Para a realização do 1º PCR foi utilizado 1 µL do DNA de *E. gunnii*, sendo testadas as concentrações de 10 e 30 ng/ µL. Os seguintes produtos da marca Promega® foram utilizados: 5 µL de tampão 10x, 1 µL de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 1,5 µL de dNTP (10 mM), 39,1 µL de água e 0,4 µL de Go Taq® Flexi DNA Polymerase, além de 1 µL de cada primer (10 µM). Os seguintes oligonucleotídeos foram utilizados nas reações para o isolamento do promotor *cbf1a*: attB1 pro *cbf1b*: 5'-AAAAAGCAGGCTATCAATGTATGACACGAAAAGACCC-3' e attB2 pro *cbf1b*: 5'-AGAAAGCTGGGTAAGGACGTCTGCACAGGGATA-3'.

As reações foram submetidas ao seguinte programa de temperaturas: 2 min a 95°C, seguido de 10 ciclos de amplificação (15 s a 94 °C; 1 min a 60 °C; 1 min a 68 °C. Depois foram 25 ciclos (15 s a 94 °C; 1 min a 53 °C e 1 min a 68 °C) e extensão final de 7 min a 68°C. Os produtos das reações foram submetidos à eletroforese em tampão TAE 0,5 x (Tris-acetato-EDTA), em gel de agarose 2% e visualizados após coloração com brometo de etídeo (0,5 µg/mL) sob luz UV.

Para o 2º PCR, que teve como objetivo adicionar na parte codante os adaptadores AttB1 e AttB2, foi utilizado 5 µL do produto obtido no primeiro PCR, juntamente com os seguintes reagentes da Promega®: 4 µL de tampão 10x, 0,8 µL de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 1,2 µL de dNTP (10 mM), 30,6 µL de água e 0,4 µL de Go Taq® Flexi DNA Polymerase (5 U/ µL), além de 4 µL de cada primer (10 µM). Os seguintes oligonucleotídeos foram utilizados: AttB1: 5'- GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTA -3' e attB2: 5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTA -3'. O programa utilizado foi: 2 min a 95 °C, seguido de 10 ciclos de amplificação (15 s a 94 °C; 30 s a 45 °C; 1 min a 68 °C). Seguido de 20 ciclos (15 s a 94 °C; 30 s a 55 °C; 1 min a 68 °C) e extensão final de 7 min a 68 °C Os produtos das reações foram submetidos à eletroforese em tampão TAE 0,5 x (Tris-acetato-EDTA), em gel de agarose 2% e visualizados após coloração com brometo de etídeo (0,5 µg/mL) sob luz UV.

---

2ª etapa: ligação da construção com o vetor doador

---

Nesta etapa ocorreu a ligação do produto de PCR obtido na etapa anterior no vetor doador. Para a reação foi adicionado 2 µL de produto de PCR (728 ng/ µL), 1 µL do vetor de entrada (100 fmol), 1 µL de TE e 2 µL da enzima BP Clonase II (Invitrogen). A solução permaneceu por 1 noite a 25 °C, posteriormente foi acrescentado 1 µL de proteinase K e

---

---

deixado por 10 min a 37 °C.

---

3ª etapa: inserção do clone de entrada em *E. coli* por choque térmico

---

A transformação é caracterizada pela inserção do clone de entrada nas bactérias de *Escherichia coli* competentes (DH5 alpha). Os tubos retirados do aparelho de PCR foram resfriados em gelo, posteriormente foi aliquoteado em cada tubo 100 µL de cultura de bactérias competentes, depois adicionados 2 µL de produto de PCR ligado, obtido na etapa anterior e acondicionados por 30 min em gelo. Em seguida, os tubos permaneceram por 30 s a 42 °C em banho-maria e depois foram colocados no gelo por 2 min, seguido do acréscimo de 250 µL de meio de cultura LB ultra puro (SOC Invitrogen) em câmara de fluxo. Posteriormente, os tubos permaneceram por 1 h a 37 °C sob agitação de 100 rpm e foi realizado o repique de *E. coli* sobre placa de Petri com meio de cultura LB adicionado de gentamicina (7 µg/mL). A placa foi mantida por uma noite a 37 °C; em seguida, foram repicadas as colônias, as quais permaneceram em crescimento por uma noite a 37 °C, sendo em seguida realizado o PCR sobre as colônias que apresentaram crescimento positivo.

Para o PCR foi utilizado 1 µL de *E. coli*, juntamente com os seguintes reagentes da Promega®: 10 µL de tampão 10x, 5 µL de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 1 µL de dNTP (10 mM), 30,75 µL de água e 0,25 µL de Go Taq® Flexi DNA Polymerase (5 U/ µL), além de 1 µL de cada primer (10 µM). Os seguintes oligonucleotídeos foram utilizados: AttB1: 5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTA -3' e attB2: 5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTA -3'. O termociclador foi programado para: 95 °C - 5 min, seguido de 35 ciclos a 95 °C – 30 s, 58 °C – 1 min, 72 °C - 1 min, 72 °C- 1 min. Os produtos de amplificação foram analisados em gel de agarose 2% e visualizados após coloração com brometo de etídeo (0,5 g/mL) sob luz UV.

Em seguida ao PCR, foi realizada a pré-cultura de uma colônia em meio MYA, contendo gentamicina (7 µg/mL), por 16 h a 37 °C, sob agitação de 100 rpm. Foi realizada também a extração do plasmídeo, utilizando o Midi kit da Qiagen.

---

4ª etapa: ligação do vetor de entrada no vetor de destinação

---

Para a inserção do vetor de entrada no vetor de destinação e formação do clone de expressão foi realizado um mix contendo 1 µL do vetor de entrada (150 ng/ µL), 1 µL do vetor de destinação (150 ng/ µL), 6 µL de TE e 2 µL da enzima LR clonase II (Invitrogen). O mix permaneceu 1 noite a 25 °C, em seguida foi adicionado 1 µL da proteinase K, permanecendo por 10 min a 37 °C.

---

5ª etapa: inserção do clone de expressão em *E. coli* por choque térmico

---

A transformação por choque térmico foi realizada para a inserção do clone de

---

---

expressão nas bactérias de *E. coli* (DH5 alpha) competentes. Nesta etapa foi efetuado o repique da *E. coli* sobre o meio LB adicionado de espectinomicina (100 µg/mL), crescendo por 1 noite a 37 °C. Posteriormente foi realizado o repique de uma colônia e o PCR da colônia, assim como a pré-cultura da colônia e a extração do plasmídeo. Os produtos e a programação do termociclador foram os mesmos que os apresentados na 3ª etapa.

---

#### 6ª etapa: transformação de *A. tumefaciens* por choque térmico

---

Nesta etapa ocorreu a inserção do clone de expressão em *A. tumefaciens*, cepa AGL1. Foi realizada a pré-cultura da bactéria AGL1 em 5 mL do meio LB suplementado com os antibióticos rifampicina (20 mg/L) e ampicilina (50 mg/L), sob agitação de 200 rpm a 28 °C, durante 24 h. Com a  $DO_{600nm}$  de 0,5 a 1,0 a cultura foi resfriada no gelo e centrifugada a 3000 rpm e 4 °C por 6 min. Em seguida o pellet formado foi ressuspenso em 300 µL de  $CaCl_2$  (20 mM) e em uma alíquota de 100 µL foi adicionado 2 µg do plasmídeo de *E. coli*, sendo também realizado um tratamento controle, ou seja, sem DNA. Posteriormente, os tubos foram congelados em  $N_2$  líquido, descongelados 4 min a 37 °C e acrescentado 1 mL de meio LB (Anexo 02), sendo incubados a 28 °C durante 4 h, sob agitação de 100 rpm. Os tubos foram centrifugados a 3000 rpm e 4 °C por 30 s, o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspenso em 200 µL de LB líquido. Foi também realizada a pré-cultura em meio LB sólido, com incubação de 28 °C por 48 h.

---

ANEXO 12 – Exemplo do cálculo de RT-PCR, com base no valor de Ct, utilizando o método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

Amostra	Posição	gfp			18 S			Comparação gfp com 18 S			Nível expressão
		Ct	Média	Desvio padrão	Ct	Média	Desvio padrão	$\Delta Ct$	SD	$\Delta\Delta Ct$	
1 A	A1	33,475	34,175	0,991	14,324	14,287	0,043	19,888	0,992	0,000	
1 A	A2	34,876			14,299						
1 A	A3	34,268			14,240						
23 A	A13	34,097	35,861	0,130	14,276	14,279	0,003	21,582	0,130	0,000	
23 A	A14	35,953			14,281						
23 A	A15	35,770			14,281						
20 B	A22	33,488	34,777	0,726	14,509	14,503	0,038	20,274	0,727	0,000	
20 B	A23	35,291			14,538						
20 B	A24	34,264			14,463						
21 B	B1	34,681	36,205	2,154	14,108	14,115	0,008	22,090	2,154	0,000	
21 B	B2	34,160			14,119						
21 B	B3	37,728			14,118						
água	C4	34,596	34,350	0,348	32,185	32,561	0,532	1,788	0,636	0,000	
água	C5	34,103			32,938						
1 A (4° C)	D1	33,386	33,999	0,867	14,387	14,427	0,077	19,572	0,871	-0,316	1,245
1 A (4° C)	D2	34,852			14,496						
1 A (4° C)	D3	34,612			14,398						
23 A (4° C)	D13	33,898	34,285	0,547	14,164	14,146	0,017	20,139	0,548	-1,442	2,718
23 A (4° C)	D14	36,973			14,145						
23 A (4° C)	D15	34,672			14,129						
20 B (4° C)	D22	30,165	29,954	0,058	14,441	14,445	0,003	15,508	0,058	-4,765	27,195
20 B (4° C)	D23	29,995			14,450						
20 B (4° C)	D24	29,913			14,446						
21 B (4° C)	E1	33,937	34,443	0,715	14,502	14,482	0,052	19,961	0,717	-2,129	4,373
21 B (4° C)	E2	34,948			14,429						
21 B (4° C)	E3	35,555			14,514						
água	F4	38,217	37,907	0,438	32,813	32,316	0,702	5,591	0,827	3,802	
água	F5	37,598			31,820						



Anexo 13 - Resultados dos ensaios de PCR com explantes de *E. grandis* x *E. urophylla*.

ENSAIOS	INSERTO	RESULTADO
1	Pro <i>cbf1a</i>	? Não houve amplificação do fragmento desejado para nenhum dos eventos com pro <i>cbf1a</i> testados, indicando que o promotor <i>cbf1a</i> pode não estar presente nas amostras analisadas, ou que a extração (Extract-N-Amp™) do DNA ou a reação de PCR não são adequadas.
2	Pro <i>cbf1a</i>	? Foi verificada a amplificação do fragmento desejado com os primers da tubulina, para os 5 eventos de transformação, indicando não haver problemas com a extração de DNA.
3	pKGWFS7	? Foi utilizado a extração e o PCR clássicos, com o vetor vazio (pKGWFS7). Foi verificada a amplificação do fragmento desejado para todas as temperaturas testadas, porém nas temperaturas de 55 a 60,6 °C foi constatada a amplificação de duas bandas, portanto foi escolhida a temperatura de 65 °C.
4	pKGWFS7	? Houve amplificação do fragmento desejado, utilizando o melhor resultado obtido no ensaio 3, também com o pKGWFS7, indicando que o kit da Sigma funciona.
5	<i>cbf1a</i>	? Houve amplificação do fragmento desejado, com as 3 primeiras temperaturas de hibridização testadas (55; 55,9 e 58,2 °C), utilizando o DNA de planta transformada com o <i>cbf1a</i> , proveniente da extração clássica de DNA.
6	<i>cbf1a</i> <i>cbf1b</i>	? O PCR anterior foi refeito utilizando material vegetal obtido pela extração com o kit da Sigma, porém não foi verificada amplificação do fragmento desejado.
7	<i>cbf1a</i> <i>cbf1b</i>	? Houve amplificação do fragmento desejado com os DNAs testados, utilizando os primers da tubulina, indicando não haver problema com a extração quando se usa o kit da Sigma.
8	<i>cbf1a</i>	? Foram testados outros primers com as mesmas condições e DNA utilizado no ensaio anterior, porém não houve a amplificação do fragmento desejado.
9	<i>cbf1a</i>	? Foram testadas 3 temperaturas de hibridização, o mesmo DNA do ensaio anterior, com outros primers, mais não houve amplificação do fragmento desejado.
10	<i>cbf1a</i>	? Foram testadas 2 temperaturas de hibridização com dois pares de primers diferentes e o mesmo DNA do ensaio anterior. Houve a amplificação do fragmento desejado com os primers AttB1 e AttB2, porém houve também amplificação do fragmento na testemunha, indicando contaminação.
11	<i>cbf1a</i> Pro <i>cbf1a</i>	? O PCR anterior foi refeito, utilizando novas diluições dos primers AttB1 e AttB2, porém não houve amplificação do fragmento desejado.
12	<i>cbf1a</i> <i>cbf1b</i>	? Foram testados outros primers, com a melhor temperatura de hibridização verificada em ensaio anterior, utilizando DNA obtido de extração clássica de planta transformada com <i>cbf1a</i> e <i>cbf1b</i> . Foi amplificado fragmento esperado com <i>cbf1b</i> , sendo definidas, portanto as condições para reação de amplificação.
13	Pro <i>cbf1a</i> Pro <i>cbf1b</i> <i>cbf1b</i> (T+)	? Foram utilizados os mesmo primers e as mesmas condições do ensaio anterior e foi verificada banda com o Pro <i>cbf1a</i> , Pro <i>cbf1b</i> e com a testemunha ( <i>cbf1b</i> ).

Nota: Os detalhes da metodologia de cada ensaio estão na Tabela 12.