

REGINA CAETANO QUISEN

**TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE *Eucalyptus camaldulensis*  
VIA CO-CULTIVO COM *Agrobacterium tumefaciens***

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

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Marguerite G.G.

Quirin

CURITIBA

2007



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 **REGINA CAETANO QUISEN**, sob o título “**TRANFORMAÇÃO GENÉTICA DE *Eucalyptus camaldulensis* VIA CO-CULTIVO COM *Agrobacterium tumefaciens***”, 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 arguido a candidata são de parecer pela “**APROVAÇÃO**” da Tese.

Curitiba, 26 de Janeiro de 2007.

Professor Dr. Wagner Campos Otoni  
Primeiro Examinador

Professor Dr. Marcos Pileggi  
Segundo Examinador

Professor Dr. Fernando Grossi  
Terceiro Examinador

Professor Dr. João Carlos Bepalhok Filho  
Quarto Examinador

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

**A minha mãe, *in memoriam*  
exemplo de força, amizade e amor.**

**DEDICO**

**O futuro não precisará de política e religião, mas de ciência e espiritualidade.**

Jawaharlal Nehru, 1889-1964.

**A árvore não deixa de ser árvore desde semente até crescer e ficar frondosa.**

Parmênides, 530-460? a.C.

**É mais fácil quebrar um átomo do que tirar crenças e  
superstições das cabeças das pessoas.**

Albert Einstein

**Nada no mundo é tão poderoso como uma idéia para a qual chegou sua era.**

Victor Hugo

**Temos grandes e muitos pomares e jardins, onde praticamos todas as conclusões de  
implantação e inoculação, assim criando árvores e flores que floresçam antes ou  
depois de suas estações, com frutas maiores, mais doces (...); e também de  
transformar uma árvore ou planta em outra.**

Francis Bacon, 1618

## BIOGRAFIA

REGINA CAETANO QUISEN, filha de Chafir Quisen e Iene Caetano Quisen, nasceu em Curitiba, Estado do Paraná. É casada com Luiz Marcelo Brum Rossi e mãe de Paolo Quisen Brum Rossi.

Cursou Engenharia Florestal de 1985 a 1989 na Universidade Federal do Paraná e ingressou em 1992 no Programa de Pós-Graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), recebendo em 1994 o grau de Mestre em Ciências Florestais, Linha de Pesquisa Melhoramento Florestal.

Obteve o grau de Especialista em Cultura de Tecidos Vegetais pela Universidade Federal de Lavras, Estado de Minas Gerais e de Especialista em Biotecnologia pela Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas.

De 1990 a 1991, atuou como docente no curso de Engenharia Florestal da Universidad Técnica del Beni, Riberalta, Bolívia, nas disciplinas de melhoramento genético, ecologia florestal e ordenamento florestal.

De 1993 a 1994, atuou como docente no curso de Engenharia Florestal do Instituto de Tecnologia do Amazonas, nas disciplinas de melhoramento genético, fisiologia vegetal e manejo de áreas silvestres.

De 1994 a 1997, atuou como bolsista DCR na Embrapa Rondônia, Porto Velho, Estado de Rondônia, responsável pelo Projeto de Ciclagem de Nutrientes em Sistemas Agroflorestais.

Em 1997, ingressou na Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, Amazonas, atuando desde então como pesquisadora em Biotecnologia Vegetal.

## AGRADECIMENTOS

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) pela oportunidade deste aprendizado;

À Universidade Federal do Paraná pela possibilidade de realizar o doutorado;

À Profa. Dra. Marguerite Quoirin pelos ensinamentos, pela orientação, confiança e amizade;

À Profa. Dra. Francine Cuquel pela co-orientação, apoio e amizade;

Ao Prof. Dr. Marcos Pileggi pela co-orientação, colaboração e disponibilidade;

Ao Prof. Dr. João Bessalho Filho pela atenção e apoio;

Ao Prof. Dr. Luiz Antônio Biasi pela presença amiga;

À banca de pré-defesa: Dr. Leonardo Ferreira Dutra, Prof. Dr. Marcos Pileggi, Profa. Dra. Francine Cuquel e Profa. Dra. Marguerite Quoirin pelo direcionamento e valiosas sugestões;

À banca de defesa Prof. Dr. Wagner Otoni, Prof. Dr. Fernando Grossi, Prof. Dr. João Bessalho Filho, Prof. Dr. Marcos Pileggi e Prof<sup>a</sup>. Dra. Marguerite Quoirin, pelo ensinamento;

À Embrapa Florestas, na pessoa da pesquisadora Dra. Valderes Aparecida Souza pela gentileza do laboratório sob sua responsabilidade;

Aos meus amigos e companheiros de Pós-graduação Roberson, Daniela, Liege e Luciana pela alegria, carinho e troca de idéias;

Às minhas grandes novas e para sempre amigas, as fortunas, Sandra, Justina, Giovana e Yohana pelos momentos de alegria, risadas gostosas e companheirismo;

À toda minha família, de perto e de longe, sempre confiante;

Às minhas tias e tios, sempre atuais e amigos, abraço carinhoso e aconchego de família;

Aos meus irmãos, amor sempre sintonizado no mesmo canal, força e amizade;

Ao Marcelo, amigo e companheiro, pelo amor e cumplicidade em toda nossa jornada;

Ao meu filho Paolo, luz na minha vida, por tanta paciência e compreensão pelas minhas ausências nesses momentos “indoor”, puro amor e carinho.

A todos meu amor e gratidão.

E a Deus, por me mostrar o caminho, pela luz e por todos citados acima fazerem parte de minha vida.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	x
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	xi
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	xiv
<b>LISTA DE ANEXOS</b> .....	xvii
<b>RESUMO</b> .....	xix
<b>ABSTRACT</b> .....	xx
<b>1 INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	01
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	03
2.1 BIOTECNOLOGIA E MELHORAMENTO GENÉTICO FLORESTAL .....	03
2.2 A FITORREMEDIAÇÃO .....	04
2.3 O <i>Eucalyptus camaldulensis</i> .....	06
2.4 A TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DO <i>Eucalyptus</i> .....	07
<b>3 ORGANOGÊNESE INDIRETA E MICROPROPAGAÇÃO DE <i>Eucalyptus camaldulensis</i></b> .....	10
3.1 INTRODUÇÃO .....	12
3.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	15
3.2.1 Material vegetal .....	15
3.2.2 Condições de cultura <i>in vitro</i> .....	15
3.2.3 Efeito de meios minerais e reguladores de crescimento na eficiência de regeneração .....	16
3.2.3.1 Organogênese indireta a partir de explantes cotiledonares (Ensaio 1 a 3) .....	16
3.2.3.2 Organogênese indireta a partir de explantes foliares (Ensaio 4 a 10) .....	18
3.2.3.2.1 Ensaio 4 .....	18
3.2.3.2.2 Ensaio 5 .....	19
3.2.3.2.3 Ensaio 6 .....	19
3.2.3.2.4 Ensaio 7 .....	20
3.2.3.2.5 Ensaio 8 .....	21
3.2.3.2.6 Ensaio 9 .....	23
3.2.3.2.7 Ensaio 10 .....	23
3.2.4 Multiplicação, enraizamento <i>in vitro</i> e aclimatização de brotações de <i>E. camaldulensis</i> .....	25
3.2.5 Avaliação e análise dos dados .....	26
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	27
3.3.1 Estudo da eficiência da regeneração indireta de <i>E. camaldulensis</i> .....	27

3.3.1.1	Organogênese indireta a partir de cotilédones .....	27
3.3.1.1.1	Ensaio 1 .....	27
3.3.1.1.2	Ensaio 2 .....	30
3.3.1.1.3	Ensaio 3 .....	32
3.3.1.2	Organogênese indireta a partir de explantes foliares .....	35
3.3.1.2.1	Ensaio 4 .....	35
3.3.1.2.2	Ensaio 5 .....	37
3.3.1.2.3	Ensaio 6 .....	38
3.3.1.2.4	Ensaio 7 .....	40
3.3.1.2.5	Ensaio 8 .....	42
3.3.1.2.6	Ensaio 9 .....	44
3.3.1.2.7	Ensaio 10 .....	44
3.3.2	Ensaio de multiplicação, enraizamento <i>in vitro</i> e a aclimatização de brotações de <i>E. camaldulensis</i> .....	46
3.3.3	Resumo dos resultados dos ensaios de organogênese e multiplicação de <i>E. camaldulensis</i> .....	50
3.4	CONCLUSÕES .....	52
3.5	REFERÊNCIAS .....	53
<b>4</b>	<b>UTILIZAÇÃO DE ANTIBIÓTICO E AGENTE SELETIVO NA TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE <i>Eucalyptus camaldulensis</i></b> .....	<b>58</b>
4.1	INTRODUÇÃO .....	60
4.2	MATERIAL E MÉTODOS .....	62
4.2.1	Material vegetal e condições de cultivo <i>in vitro</i> .....	62
4.2.2	Influência do agente seletivo na calogênese e organogênese de explantes cotiledonares de <i>E. camaldulensis</i> .....	63
4.2.2.1	Meio de cultura e concentrações do agente seletivo .....	63
4.2.2.2	Avaliação e análise de dados .....	63
4.2.3	Eficiência de dois antibióticos na eliminação de <i>A. tumefaciens</i> .....	64
4.2.3.1	Cultura de bactéria e infecção do explante.....	64
4.2.3.2	Eliminação de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	64
4.2.3.3	Avaliação e análise de dados .....	65
4.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	66
4.3.1	Susceptibilidade de <i>E. camaldulensis</i> à canamicina.....	66
4.3.2	Avaliação do efeito de antibióticos na eficiência da organogênese de explantes cotiledonares de <i>E. camaldulensis</i> .....	69
4.4	CONCLUSÕES .....	72
4.5	REFERÊNCIAS .....	73



<b>5</b>	<b>AVALIAÇÃO DA REGENERAÇÃO DE GEMAS E DA EXPRESSÃO TRANSIENTE DO GENE <i>gus</i> SOB CONTROLE DO PROMOTOR <i>cgMT1</i> EM <i>Eucalyptus camaldulensis</i> TRANSFORMADO VIA <i>Agrobacterium tumefaciens</i>.....</b>	<b>76</b>
5.1	INTRODUÇÃO .....	78
5.2	MATERIAL E MÉTODOS .....	81
5.2.1	Material vegetal e cultura de tecidos .....	81
5.2.2	Cepa bacteriana e vetor primário .....	82
5.2.3	Condições de crescimento bacteriano .....	83
5.2.4	Condições gerais de inoculação .....	83
5.2.5	Ensaio para a determinação de condições de maior eficiência da transformação genética .....	84
5.2.5.1	Ensaio 1 – Influência do meio de cultura bacteriana .....	85
5.2.5.2	Ensaio 2 – Influência do meio de inoculação .....	85
5.2.5.3	Ensaio 3 – Influência do período de co-cultura .....	85
5.2.5.4	Ensaio 4 – Influência do pré-cultivo de explantes cotiledonares e foliares .....	86
5.2.5.5	Ensaio 5 – Influência do genótipo da planta doadora na transformação de explantes foliares .....	86
5.2.6	Ensaio histoquímico da $\beta$ -glucuronidase .....	86
5.2.7	Avaliação e análise dos dados .....	87
5.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	88
5.3.1	Avaliação de fatores que influenciam a eficiência da transformação genética de <i>E. camaldulensis</i> via co-cultivo com <i>A. tumefaciens</i> .....	88
5.3.1.1	Ensaio 1 – Meio de cultura bacteriana .....	88
5.3.1.2	Ensaio 2 – Meio de inoculação .....	92
5.3.1.3	Ensaio 3 – Duração de co-cultura .....	95
5.3.1.4	Ensaio 4 – Efeito da pré-cultura de explantes .....	98
5.3.1.5	Ensaio 5 – Efeito do genótipo .....	100
5.3.2	Fatores que influenciaram a transformação de <i>E. camaldulensis</i> e a obtenção de plantas transformadas putativas .....	102
5.4	CONCLUSÕES .....	104
5.5	REFERÊNCIAS .....	105
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES GERAIS .....</b>	<b>109</b>
<b>7</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>110</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>111</b>
	<b>ANEXO 1 – MEIOS DE CULTURA .....</b>	<b>117</b>
	<b>ANEXO 2 – RESULTADOS DAS ANÁLISES DE VARIÂNCIA .....</b>	<b>120</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\mu E m^{-2} s^{-1}$	micro Einstein por metro quadrado por segundo
$\mu M$	micromolar
2,4-D	ácido 2,4-diclorofenoxiacético
ANA	ácido Naftalenoacético
Aug	Augmentina <sup>®</sup>
B5	meio de cultura de GAMBORG et al.
BAP	6-benzilaminopurina
<i>cgMT1</i>	gene da metalotioneína tipo I
CIN	cinetina
Cx	cefotaxima
DO	densidade ótica
DNA	ácido desoxirribonucléico
GUS	$\beta$ -glucuronidase
JADS	meio de cultura de Correia
Km	canamicina
LB	meio de cultura LURIA-BERTANI
MC	meio de indução de calogênese e regeneração para explante foliar
MCAC	meio de indução de calogênese e regeneração para explante cotiledonar
mg L <sup>-1</sup>	miligramas por litro
MS	meio de cultura de MURASHIGE e SKOOG
nm	nanômetro
NOS	gene da nopalina sintetase
<i>nptII</i>	gene da neomicina fosfotransferase
<i>PcgMT1</i>	promotor do gene da metalotioneína tipo I
rpm	rotações por minuto
s	segundo
TDZ	tidiazuron
<i>uidA</i>	gene codificante da enzima $\beta$ -glucuronidase
WPM	meio de cultura Woody Plant Medium de LLOYD e Mc COWN

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	Composição dos meios de cultura utilizados nos ensaios de organogênese indireta a partir de explantes cotilédonares de <i>E. camaldulensis</i> suplementados com 2% de sacarose e 0,6% de ágar, por 30 dias no escuro e 30 dias na luz .....	17
TABELA 2 -	Concentrações de reguladores de crescimento e fases de cultura aplicados no experimento de organogênese indireta a partir de explantes foliares de <i>E. camaldulensis</i> em meio MS N/2 (meio MS com metade da concentração de nitrogênio total, 2% de sacarose e 0,6% de ágar) .....	18
TABELA 3 -	Concentrações de reguladores de crescimento e fases de cultura aplicados no experimento de organogênese indireta a partir de explantes foliares de <i>E. camaldulensis</i> em meio MST (TOURNIER et al., 2003) suplementado com 2% de sacarose e 0,6% de ágar.....	19
TABELA 4 -	Concentrações de reguladores de crescimento e fases de cultura aplicados no experimento de organogênese indireta a partir de explantes foliares de <i>E. camaldulensis</i> em meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) suplementado com 2% de sacarose e 0,6% de ágar.....	20
TABELA 5 -	Concentrações de reguladores de crescimento e fases de cultura aplicados no experimento de organogênese indireta a partir de explantes foliares de <i>E. camaldulensis</i> em meio B5 (GAMBORG et al., 1968) suplementado com 2% de sacarose e 0,6% de ágar...	21
TABELA 6 -	Concentrações de fitorreguladores e fases de cultura aplicados no experimento de organogênese indireta a partir de segmentos apicais e basais de explantes foliares de <i>E. camaldulensis</i> em meios de cultura MS e MS N/2 (meio MS com a metade da concentração de nitratos de amônio e potássio), suplementados com 2% de sacarose e 0,6% de ágar .....	22
TABELA 7 -	Concentrações de TDZ e ANA e fases de cultura aplicados no experimento de organogênese indireta a partir de segmentos apicais e basais de explantes foliares de <i>E. camaldulensis</i> em meio básico B5 (GAMBORG et al., 1968) suplementado com 2% de sacarose e 0,6% de ágar.....	23
TABELA 8 -	Concentrações de fitorreguladores e fases de cultura aplicados no experimento de organogênese indireta a partir de explantes foliares de dois clones de <i>E. camaldulensis</i> em meio MST (TOURNIER et al., 2003) .....	24
TABELA 9 -	Efeito dos meios de cultura MS, WPM e JADS suplementados com 4,4 $\mu$ M de BAP e 2,7 $\mu$ M de ANA sobre a organogênese indireta de explantes cotilédonares de <i>E. camaldulensis</i> , ao final de 60 dias de cultivo.....	28
TABELA 10 -	Efeito de diferentes citocininas e da água de coco em meio MS N/2 suplementado com ANA sobre o desenvolvimento organogênico de cotilédones de <i>E. camaldulensis</i> , ao final de 60	

	dias de cultivo .....	30
TABELA 11 -	Efeito de combinações de reguladores de crescimento em meio MS/2 (metade da concentração do sais de MS) sobre o desenvolvimento organogênico de cotilédones de <i>E. camaldulensis</i> , após 60 dias de cultivo.....	33
TABELA 12 -	Influência de reguladores de crescimento adicionados ao meio de cultura MS N/2 (MS com metade da concentração de nitrogênio total) na capacidade regenerativa de explantes foliares de <i>E. camaldulensis</i> , após 60 dias de cultivo .....	35
TABELA 13 -	Influência do meio MS modificado – MST (TOURNIER et al., 2003) e reguladores de crescimento na capacidade regenerativa de explantes foliares de <i>E.camaldulensis</i> , após 90 dias de cultivo..	38
TABELA 14 -	Influência do meio de cultura MS completo (MURASHIGE e SKOOG, 1962) e reguladores de crescimento na capacidade regenerativa de explantes foliares de <i>E. camaldulensis</i> , após 120 dias de cultivo.....	39
TABELA 15 -	Influência do meio B5 (GAMBORG et al., 1968) e reguladores de crescimento na capacidade regenerativa de explantes foliares de <i>E. camaldulensis</i> , após 60 dias de cultivo.....	40
TABELA 16 -	Influência de combinações de reguladores de crescimento adicionados ao meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) e MS N/2 na capacidade regenerativa de segmentos foliares de <i>E. camaldulensis</i> , após 90 dias de cultivo.....	43
TABELA 17 -	Influência de reguladores de crescimento adicionados ao meio B5 (GAMBORG et al., 1968) na capacidade regenerativa de segmentos foliares de <i>E. camaldulensis</i> , ao final de 120 dias de cultivo.....	44
TABELA 18 -	Efeito do genótipo e reguladores de crescimento na capacidade regenerativa de explantes foliares de <i>E. camaldulensis</i> , após 90 dias de cultivo em meio MST (TOURNIER et al., 2003).....	45
TABELA 19 -	Efeito de meios de cultura e reguladores de crescimento na multiplicação <i>in vitro</i> de dois genótipos de <i>E. camaldulensis</i> após três subcultivos de 20 dias cada.....	47
TABELA 20 -	Resumo do comportamento de <i>E. camaldulensis</i> em diferentes ensaios de organogênese e multiplicação <i>in vitro</i> .....	51
TABELA 21 -	Efeito do agente seletivo canamicina na calogênese e organogênese de cotilédones de <i>E. camaldulensis</i> , após 60 dias de cultivo .....	66
TABELA 22 -	Efeito do agente seletivo canamicina, em concentrações $\leq 12 \text{ mg L}^{-1}$ , na calogênese e organogênese de cotilédones de <i>E. camaldulensis</i> , após 60 dias de cultivo.....	67
TABELA 23 -	Efeito de cefotaxima e Augmentina na calogênese, organogênese e contaminação de explantes cotiledonares de <i>E. camaldulensis</i> após 60 dias de cultura <i>in vitro</i> .....	69
TABELA 24 -	Área dos explantes de <i>E. camaldulensis</i> com expressão do gene	

	<i>gus</i> em função do meio de cultura de crescimento bacteriano, cinco dias após co-cultivo com <i>A. tumefaciens</i> .....	89
TABELA 25 -	Efeito do meio de crescimento bacteriano na resposta organogênica de explante cotiledonar de <i>E.camaldulensis</i> após transformação via co-cultivo com <i>A. tumefaciens</i> .....	90
TABELA 26 -	Efeito do meio de crescimento bacteriano na resposta organogênica de explante foliar de <i>E. camaldulensis</i> após transformação via co-cultivo com <i>A. tumefaciens</i> .....	91
TABELA 27 -	Área dos explantes de <i>E. camaldulensis</i> com expressão do gene <i>gus</i> em função do meio de ressuspensão e inoculação, cinco dias após co-cultivo com <i>A. tumefaciens</i> .....	93
TABELA 28 -	Efeito do meio de ressuspensão e inoculação na resposta organogênica de explante cotiledonar de <i>E. camaldulensis</i> após transformação via co-cultivo com <i>A. tumefaciens</i> .....	93
TABELA 29 -	Efeito do meio de ressuspensão e inoculação na resposta organogênica de explante foliar de <i>E. camaldulensis</i> após transformação via co-cultivo com <i>A. tumefaciens</i> .....	94
TABELA 30 -	Porcentagem de explantes de <i>E. camaldulensis</i> com expressão do gene <i>gus</i> em função da duração da co-cultura, cinco dias após a inoculação com <i>A. tumefaciens</i> .....	96
TABELA 31 -	Efeito da duração da co-cultura na resposta organogênica de explante cotiledonar de <i>E. camaldulensis</i> após transformação via co-cultivo com <i>A. tumefaciens</i> .....	97
TABELA 32 -	Efeito da duração da co-cultura na resposta organogênica de explante foliar de <i>E. camaldulensis</i> após transformação via co-cultivo de <i>A. tumefaciens</i> .....	97
TABELA 33 -	Porcentagem de explantes de <i>E. camaldulensis</i> com expressão do gene <i>gus</i> em função do tempo de pré-cultura do explante, cinco dias após co-cultivo com <i>A. tumefaciens</i> .....	99
TABELA 34 -	Efeito do tempo de pré-cultura na resposta organogênica de explante cotiledonar de <i>E. camaldulensis</i> via co-cultivo com <i>A. tumefaciens</i> .....	100
TABELA 35 -	Efeito do tempo de pré-cultura na resposta organogênica de explante foliar de <i>E. camaldulensis</i> via co-cultivo com <i>A. tumefaciens</i> .....	100
TABELA 36 -	Porcentagem de explantes foliares de <i>E. camaldulensis</i> com expressão do gene <i>gus</i> em função do genótipo, cinco dias após co-cultivo com <i>A. tumefaciens</i> .....	101
TABELA 37	Efeito do genótipo na resposta organogênica de explante foliar de <i>E. camaldulensis</i> após co-cultivo com <i>A. tumefaciens</i> .....	102

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	Sala de crescimento de culturas <i>in vitro</i> de <i>E. camaldulensis</i> .....	16
FIGURA 2 -	Aspecto da oxidação de explantes cotiledonares de <i>E. camaldulensis</i> .....	28
FIGURA 3 -	Aspectos da resposta organogênica de explantes cotiledonares de <i>E. camaldulensis</i> a distintos meios de cultura suplementados com 4,4 µM de BAP e 2,7 µM de ANA, após 60 dias de cultivo. 1 - Meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), 2 - Meio WPM (LLOYD e Mc COWN, 1980) e 3 - Meio JADS (CORREIA, 1993). Barra = 1,0 cm.....	29
FIGURA 4 -	Aspecto da organogênese indireta a partir de explantes cotiledonares de <i>E. camaldulensis</i> em meio MS N/2 (metade da concentração de nitrogênio total), com citocininas (BAP, TDZ e CIN), ANA e água de coco (10%), após 60 dias de cultura <i>in vitro</i> . Meio com BAP 4,4 µM + ANA 2,7 µM sem AC (1) e com AC (2); BAP 2,2 µM + ANA 2,7 µM sem AC (3) e com AC (4); TDZ 4,5 µM + ANA 2,7 µM sem AC (5) e com AC (6); TDZ 9,0 µM + ANA 2,7 µM sem AC (7) e com AC (8); CIN 4,7 µM + ANA 0,5 µM sem AC (9) e com AC (10). Barra = 1 cm.....	32
FIGURA 5 -	Organogênese a partir de explantes cotiledonares de <i>E. camaldulensis</i> após 60 dias de cultivo em meio MS/2 suplementado com: 1 - BAP 4,4 µM + ANA 2,7 µM; 2 - BAP 4,4 µM + ANA 2,7 µM + AC 10%; 3 - CIN 4,6 µM + ANA 2,1 µM; 4 - BAP 1,0 µM + picloram 0,04 µM e 5 - BAP 1,1 µM + 2,4-D 7,5 µM. Barra = 1,0 cm.....	34
FIGURA 6 -	Calogênese e regeneração em explantes foliares de <i>E. camaldulensis</i> em meio MS N/2, após 60 dias de cultivo. Tratamento (fase 1 e 2 com 30 dias cada): tratamento 1 sem água de côco (AC 10%) e 2 com AC 10%, em ambas fases, suplementados com BAP 4,4 µM + ANA 2,7 µM e fase 2 - BAP 4,4 µM + ANA 0,5 µM; tratamento 3 - sem água de côco (AC) e 4 com AC 10%, em ambas fases, suplementados com BAP 2,2 µM + ANA 2,7 µM e fase 2 - BAP 2,2 µM + ANA 0,05 µM; tratamento 5 sem água de côco (AC 10%) e 6 com AC 10%, em ambas fases, suplementados com TDZ 1,0 µM + ANA 2,7 µM e fase 2 - TDZ 1,0 µM + ANA 0,5 µM; tratamento 7 sem água de côco (AC 10%) e 8 com AC 10%, em ambas fases, suplementados com TDZ 2,0 µM + ANA 2,7 µM e fase 2 - TDZ 2,0 µM + ANA 0,5 µM; tratamento 9 sem água de côco (AC 10%) e 10 com AC 10%, em ambas fases, suplementados com CIN 4,7 µM + ANA 0,5 µM e fase 2 - CIN 4,7 µM + ANA 0,05 µM. Barra = 1,0 cm.....	36
FIGURA 7 -	Calogênese e regeneração em explantes foliares de <i>E. camaldulensis</i> após 120 dias de cultivo em meio MS (Murashige e Skoog, 1962). 1 - TDZ 1,0 µM + ANA 0,5 µM + AC (fase 1), TDZ 1,0 µM + ANA 0,27 µM + AC (fase 2) e BAP 2,2 µM + ANA 0,27 µM + AC (fase 3); 2 - TDZ 2,0 µM + ANA 0,5 µM + AC (fase 1), TDZ 2,0 µM + ANA 0,27 µM + AC (fase 2) e BAP 2,2 µM + ANA 0,27 µM + AC (fase 3); 3 - TDZ 3,0 µM + ANA 0,5 µM + AC (fase	

1), TDZ 3,0  $\mu\text{M}$  + ANA 0,27  $\mu\text{M}$  + AC (fase 2) e BAP 2,2  $\mu\text{M}$  + ANA 0,27  $\mu\text{M}$  + AC; 4 - TDZ 1,0  $\mu\text{M}$  + ANA 2,7  $\mu\text{M}$  + AC (fase 1), TDZ 1,0  $\mu\text{M}$  + ANA 0,27  $\mu\text{M}$  + AC (fase 2) e BAP 2,2  $\mu\text{M}$  + ANA 0,27  $\mu\text{M}$  + AC (fase 3); 5 - TDZ 2,0  $\mu\text{M}$  + ANA 2,7  $\mu\text{M}$  + AC (fase 1), TDZ 2,0  $\mu\text{M}$  + ANA 0,27  $\mu\text{M}$  + AC (fase 2) e BAP 2,2  $\mu\text{M}$  + ANA 0,27  $\mu\text{M}$  + AC (fase 3); TDZ 3,0  $\mu\text{M}$  + ANA 2,7  $\mu\text{M}$  + AC (fase 1), TDZ 3,0  $\mu\text{M}$  + ANA 0,27  $\mu\text{M}$  + AC (fase 2) e BAP 2,2  $\mu\text{M}$  + ANA 0,27  $\mu\text{M}$  + AC (fase 3). Fase 1 – 20 dias no escuro, fase 2 – 10 dias em sombrite 50% e 23 dias na luz, fase 3 – luz até 120° dia. Barra = 1,0 cm.....

39

- FIGURA 8 - Organogênese indireta de explantes foliares de *E. camaldulensis* em meio B5 (GAMBORG et al., 1968) suplementado com: 1 - BAP 2,2  $\mu\text{M}$  + 2,4-D 0,5  $\mu\text{M}$  (fase 1), BAP 2,2  $\mu\text{M}$  + ANA 0,5  $\mu\text{M}$  (fase 2, 3 e 4); 2 - BAP 2,2  $\mu\text{M}$  + 2,4-D 2,3  $\mu\text{M}$  (fase 1), BAP 2,2  $\mu\text{M}$  + ANA 0,5  $\mu\text{M}$  (fase 2, 3 e 4); 3 - BAP 2,2  $\mu\text{M}$  + 2,4-D 4,5  $\mu\text{M}$  (fase 1), BAP 2,2  $\mu\text{M}$  + ANA 0,5 (fase 2, 3 e 4); 4 - BAP 2,2  $\mu\text{M}$  + ANA 7,5  $\mu\text{M}$  (fase 1 e 2), BAP 2,2  $\mu\text{M}$  + ANA 0,05  $\mu\text{M}$  (fase 3), BAP 2,2  $\mu\text{M}$  + ANA 0,5  $\mu\text{M}$  (fase 4); 5 - BAP 2,2  $\mu\text{M}$  + ANA 2,7  $\mu\text{M}$  (fase 1 e 2), BAP 2,2  $\mu\text{M}$  + ANA 0,5  $\mu\text{M}$  (fase 3 e 4); 6 - TDZ 2,3  $\mu\text{M}$  + ANA 2,7  $\mu\text{M}$  (fase 1 e 2), TDZ 2,3  $\mu\text{M}$  + ANA 0,5  $\mu\text{M}$  (fase 3), BAP 2,2  $\mu\text{M}$  + ANA 0,5  $\mu\text{M}$  (fase 4); 7 - TDZ 4,5  $\mu\text{M}$  + ANA 2,7  $\mu\text{M}$  (fase 1 e 2), TDZ 2,3  $\mu\text{M}$  + ANA 0,5  $\mu\text{M}$  (fase 3), BAP 2,2  $\mu\text{M}$  + ANA 0,5  $\mu\text{M}$  (fase 4); 8 - BAP 2,2  $\mu\text{M}$  + 2,4-D 0,5  $\mu\text{M}$  (fase 1), BAP 2,2  $\mu\text{M}$  + ANA 2,7  $\mu\text{M}$  (fase 2 e 3), BAP 2,2  $\mu\text{M}$  + ANA 0,5  $\mu\text{M}$  (fase 4); 9 - BAP 2,2  $\mu\text{M}$  + 2,4-D 2,3  $\mu\text{M}$  (fase 1), BAP 2,2  $\mu\text{M}$  + ANA 2,7  $\mu\text{M}$  (fase 2 e 3), BAP 2,2  $\mu\text{M}$  + ANA 0,5  $\mu\text{M}$  (fase 4); 10 - BAP 2,2  $\mu\text{M}$  + 2,4-D 4,5  $\mu\text{M}$ , BAP 2,2  $\mu\text{M}$  + ANA 2,7  $\mu\text{M}$  (fase 2 e 3), BAP 2,2  $\mu\text{M}$  + ANA 0,5  $\mu\text{M}$  (fase 4). Fase 1 – 4 dias no escuro, fase 2 – 15 dias no escuro e sombrite 50% por 10 dias, fase 3 e 4 – luz por 30 dias. Barra = 1,0 cm.....
- FIGURA 9 - Aspecto da formação de calos nas folhas em brotações *in vitro* de *E. camaldulensis*.....
- FIGURA 10 - Aspecto de proliferação de brotações do clone 05 de *E. camaldulensis* após 90 dias. Tratamento 1 - Meio MS + BAP 1,3  $\mu\text{M}$ ; 2 - Meio MS + BAP 2,2  $\mu\text{M}$ ; 3 - Meio B5 + BAP 1,3  $\mu\text{M}$ ; 4 - Meio B5 + BAP 2,2  $\mu\text{M}$ ; 5 - Meio MS mod + BAP 2,64  $\mu\text{M}$  + ANA 0,5  $\mu\text{M}$ . Barra = 1,0 cm.....
- FIGURA 11 - Aspecto de mudas em casa-de-vegetação 20 dias após aclimação.....
- FIGURA 12 - Períodos de exposição de explantes cotiledonares de *E. camaldulensis* inoculados com *Agrobacterium tumefaciens* a diferentes concentrações de cefotaxima (Cx) e Augmentin® (Aug)..
- FIGURA 13 - Efeito de concentrações do antibiótico seletivo canamicina (Km) em explantes cotiledonares de *E. camaldulensis*, após 60 dias de cultura *in vitro*. A - tratamento controle (meio de organogênese sem antibiótico); B - meio com 3  $\text{mg L}^{-1}$  de Km; C - meio com 6  $\text{mg L}^{-1}$  de Km; D - meio com 9  $\text{mg L}^{-1}$  de Km; E e F - meio com 12  $\text{mg L}^{-1}$  de Km. Barra = 1 cm.....

FIGURA 14 -	Região T do plasmídeo de transformação genética pBIN19 contendo a construção gênica PcgMT1-GUS-NOS, onde: PcgMT1 é o promotor do gene da MT da <i>Casuarina glauca</i> ; nptII, gene que codifica para neomicina fosfotransferase; gus, gene que codifica para a β-glucuronidase; NOS-pro, promotor do gene da nopalina sintetase da <i>A. tumefaciens</i> ; NOS-ter, terminador do gene da nopalina sintetase da <i>A. tumefaciens</i> ; BD, borda direita do T-DNA; BE, borda esquerda do T-DNA.....	82
FIGURA 15 -	Representação esquemática da sequência dos experimentos com explantes cotiledonares e foliares de <i>E. camaldulensis</i> visando a determinação de condições de maior eficiência na transformação genética via co-cultivo com <i>A. tumefaciens</i> .....	84
FIGURA 16 -	Detecção da expressão do gene <i>gus</i> em explantes de <i>E. camaldulensis</i> em função do meio de cultura de crescimento bacteriano (YEB, MYA e LB), cinco dias após co-cultivo com <i>A. tumefaciens</i> .....	88
FIGURA 17 -	Detecção da expressão do gene <i>gus</i> em explantes de <i>E. camaldulensis</i> em função do meio de inoculação, cinco dias após co-cultivo com <i>A. tumefaciens</i> . Meios: MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), MS/2 (MS com metade da concentração original dos sais), MSi (MS + 1 g L <sup>-1</sup> de inositol), LB (meio Luria–Bertani) e LB + MS (1:1).....	92
FIGURA 18 -	Detecção da expressão do gene <i>gus</i> em explantes de <i>E. camaldulensis</i> em função da duração da co-cultura, cinco dias após o co-cultivo com <i>A. tumefaciens</i> .....	96
FIGURA 19 -	Detecção da atividade do gene <i>gus</i> em explantes de <i>E. camaldulensis</i> em função do tempo de pré-cultura do explante, cinco dias após o co-cultivo com <i>A. tumefaciens</i> .....	98
FIGURA 20 -	Detecção da atividade do gene <i>gus</i> em explantes foliares de <i>E. camaldulensis</i> em função do genótipo, cinco dias após co-cultivo com <i>A. tumefaciens</i> .....	101



## LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1.1	Composição dos meios de cultura em ( $\text{m mol}^{-1}$ ).....	118
ANEXO 1.2	Composição de meios de cultura para crescimento bacteriano (em $\text{g L}^{-1}$ ).....	119
ANEXO 2.1	Resumo da ANOVA para explante cotiledonar do Ensaio 01.....	121
ANEXO 2.2	Resumo da ANOVA para explante cotiledonar do Ensaio 02.....	121
ANEXO 2.3	Resumo da ANOVA para explante cotiledonar do Ensaio 03.....	121
ANEXO 2.4	Resumo da ANOVA para explante foliar do Ensaio 04.....	121
ANEXO 2.5	Resumo da ANOVA para explante foliar do Ensaio 05.....	121
ANEXO 2.6	Resumo da ANOVA para explante foliar do Ensaio 06.....	121
ANEXO 2.7	Resumo da ANOVA para explante foliar do Ensaio 07.....	122
ANEXO 2.8	Resumo da ANOVA para explante foliar do Ensaio 08.....	122
ANEXO 2.9	Resumo da ANOVA para explante foliar do Ensaio 09.....	122
ANEXO 2.10	Resumo da ANOVA para explante foliar do Ensaio 10.....	123
ANEXO 2.11	Resumo da ANOVA para multiplicação <i>in vitro</i> de dois genótipos de <i>E. camaldulensis</i> para o parâmetro brotos por calo.....	123
ANEXO 2.12	Resumo da ANOVA para o ensaio com agente seletivo canamicina nas concentrações de 0,0 a 80,0 $\text{mg L}^{-1}$ ).....	123
ANEXO 2.13	Resumo da ANOVA para o ensaio com agente seletivo canamicina nas concentrações de 0,0 a 12,0 $\text{mg L}^{-1}$ ).....	123
ANEXO 2.14	Resumo da ANOVA para o ensaio de eliminação de <i>A. tumefaciens</i> .....	124
ANEXO 2.15	Resumo da ANOVA no ensaio de influência do meio de cultura bacteriano com explante cotiledonar.....	124
ANEXO 2.16	Resumo da ANOVA no ensaio de influência do meio de cultura bacteriano com explante foliar.....	124
ANEXO 2.17	Resumo da ANOVA no ensaio de influência do meio de inoculação com explante cotiledonar.....	124
ANEXO 2.18	Resumo da ANOVA no ensaio de influência do meio de inoculação com explante foliar.....	124
ANEXO 2.19	Resumo da ANOVA no ensaio de influência do período de co-cultura com explante cotiledonar.....	125
ANEXO 2.20	Resumo da ANOVA no ensaio de influência do período de co-cultura com explante foliar.....	125
ANEXO 2.21	Resumo da ANOVA no ensaio de influência do pré-cultivo com explante cotiledonar.....	125
ANEXO 2.22	Resumo da ANOVA no ensaio de influência do pré-cultivo com explante foliar.....	125

ANEXO 2.23	Resumo da ANOVA no ensaio de influência do genótipo da planta doadora de explantes.....	125
------------	---	-----

## RESUMO

Dentre as diversas espécies florestais de interesse econômico, a transformação genética de *Eucalyptus* tem sido o objetivo de vários grupos de pesquisa nos últimos anos, tanto no setor público como no privado. No Brasil, o *Eucalyptus camaldulensis* ainda não teve todo seu potencial explorado tanto na eucaliptocultura, quanto nos programas de melhoramento genético e na biotecnologia, para os mais diversos objetivos e ambientes. As características de rápido crescimento, sistema radicular bastante desenvolvido e facilidade de aclimação tornam o eucalipto um gênero potencial para emprego em programas de recuperação de áreas degradadas pela deposição de metais pesados. A técnica de transformação genética pode contribuir significativamente para introduzir caracteres de interesse econômico que permitam aumentar a tolerância de uma cultura a determinadas condições de estresse abiótico. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo desenvolver um sistema de transformação genética de *E. camaldulensis* via co-cultivo com *Agrobacterium tumefaciens* visando à introdução do gene *gus* sob controle do promotor do gene *MT1* em células de explantes foliares e cotiledonares. Por este motivo, o trabalho foi dividido em três etapas, sendo a primeira orientada para estabelecer as condições mais adequadas para a otimização da organogênese indireta da espécie, a segunda para avaliar a eficácia de antibióticos seletivos e bactericidas na cultura organogênica, sem no entanto, interferir no potencial regenerativo da espécie, e por último, avaliar os fatores que influenciam na eficiência do processo de transformação do *E. camaldulensis* via *A. tumefaciens*.

Palavras-chave: plantas transgênicas, fitorremediação, cultura de tecidos, micropropagação, melhoramento de plantas.

## ABSTRACT

Among the several forest species of economical interest, the genetic transformation of *Eucalyptus* has been the objective of several research groups in the last years, as in public as in private sectors. In Brazil, *Eucalyptus camaldulensis* still hasn't had all its potential explored in culture of *Eucalyptus* or in programs of genetic improvement and in biotechnology, for the most diverse objectives and environments. Characteristics such as fast growth quite developed radicular system and easiness of acclimatization make the eucalyptus a species with potential for working in programs of recovery of areas degraded by the deposition of heavy metals. The technique of genetic transformation can significantly contribute to introduce characters of economical interest that allow increasing the tolerance to certain conditions of abiotic stress. In this context, the objective of the present work was to develop a system of genetic transformation of *E. camaldulensis* through *Agrobacterium tumefaciens*, to introduce the *gus* gene under control of the *cgMT1* promoter in cotyledonary and leaf explants cells. For this reason, this work was divided in three stages: the first one is aimed to establish the most appropriate conditions for the optimization of the indirect organogenesis of the species; the second stage evaluates the effectiveness of selective and bactericidal antibiotics in the organogenic culture, without interfering in the regenerative potential of the specie; and the last stage evaluates the factors that influence the efficiency of the process of transformation of *E. camaldulensis* mediated by *A. tumefaciens*.

Key-words: transgenics plants, phytoremediation, tissue culture, micropropagation, plant breeding.

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

O melhoramento genético e as práticas silviculturais contribuíram significativamente para o aumento da produtividade em plantios florestais e para o ganho genético em espécies de grande valor econômico. A aplicação de métodos de melhoramento genético, por sua vez, apresenta limitações devido ao longo ciclo reprodutivo das espécies arbóreas e à dificuldade em conseguir melhorias significativas em caracteres complexos tais como: propriedades da madeira, controle de pragas e doenças, e tolerância a estresses abióticos (NEHRA et al., 2005).

Neste sentido, criando uma nova dimensão aos programas de melhoramento genético, a biotecnologia florestal, com os avanços genéticos obtidos na produção de árvores, vem ampliando os campos do desenvolvimento da biologia de plantas com novas metodologias como a transformação genética e a descoberta de genes associados a características multigênicas complexas, a exemplo do Projeto Genolyptus realizado no Brasil.

Apesar das angiospermas representarem aproximadamente 40% dos plantios florestais no mundo (FAO, 2000), os relatos de pesquisas biotecnológicas florestais são na grande maioria concentrados no gênero *Populus*, em países do hemisfério norte (CONFALONIERI et al., 2003) e em *Eucalyptus* no Brasil (MACRAE e VAN STADEN, 1993; TOURNIER et al., 2003). Estas pesquisas são relacionadas à propagação *in vitro*, uso de marcadores moleculares para estudos de divergência genética e de seleção assistida e, ultimamente, à transformação genética de plantas (MEIRELES, 2006).

As árvores transgênicas têm sido geradas na tentativa de identificar a função de genes e gerar linhagens com características úteis para os programas de melhoramento, sendo empregadas com os mais diversos objetivos como tolerância a herbicidas, resistência a insetos e doenças, melhoria na capacidade fotossintética e, conseqüentemente, no crescimento das plantas, modificação do conteúdo de lignina, esterilidade e tolerância ao estresse abiótico (seca, calor, frio, solos ácidos) (MANDERS et al., 1992; JOUANIN et al., 1993; TZFIRA et al., 1997; RISHI et al., 2001).

Dentre as aplicações mais recentes, surge a utilização de árvores transgênicas na fitorremediação para despoluição de solos contaminados com metais pesados. Este uso

apresenta grande vantagem em relação às plantas de ciclo curto, pois árvores produzem maior biomassa e possuem um sistema radicular mais profundo e um ciclo de vida mais longo, características estas consideradas essenciais no processo de remediação de solos contaminados (RUGH et al., 1998).

O processo de transformação genética de plantas tem sido aprimorado desde a década de 80, quando STACHEL e ZAMBRYSKI relataram o uso de *Agrobacterium tumefaciens*, modificada geneticamente, para introdução de genes exógenos em plantas. Entretanto, apesar dos progressos alcançados nos últimos anos, muitos ainda são os desafios encontrados na transformação de algumas espécies lenhosas, atribuídos principalmente à baixa eficiência na inserção estável de um gene no genoma da planta e na habilidade para regenerar uma planta a partir da(s) célula(s) transformada(s) (DE BONDT et al., 1994).

De acordo com diversos autores, vários são os fatores que podem afetar a eficiência de transformação genética via co-cultura com *A. tumefaciens*. Dentre eles citam-se a técnica, o genótipo, a cepa bacteriana utilizada, os tratamentos aplicados aos explantes antes da infecção, a composição do meio de cultura e a adição de fitorreguladores, a presença de substâncias fenólicas para indução da transferência do T-DNA, a idade do explante e o uso de antibióticos para controle do crescimento da bactéria, entre outros (HOLFORD et al., 1992, DE BONDT et al., 1994; SRISKANDARAJAH e GOODWIN, 1998). GONZÁLEZ et al. (2002) reforçam que a dificuldade em se obter plantas transgênicas no gênero *Eucalyptus* está associada à baixa capacidade de regeneração de algumas espécies e ao sistema de seleção dos transformantes.

Dentro deste contexto, o presente trabalho teve como objetivo desenvolver um sistema de transformação genética de explantes foliares e cotiledonares de *Eucalyptus camaldulensis* via co-cultivo com *Agrobacterium tumefaciens* de maneira a regenerar plantas transformadas por organogênese indireta e avaliar alguns fatores que afetam a eficiência da transformação genética para auxiliar futuros trabalhos com plantas tolerantes a metais pesados.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 BIOTECNOLOGIA E MELHORAMENTO GENÉTICO FLORESTAL

A biotecnologia moderna tem sido largamente utilizada em agricultura e florestas, contribuindo para o aumento da produtividade e/ou como ferramenta para resolver questões de nutrição humana, diminuindo custos de produção, bem como produzindo materiais genéticos adaptados a condições adversas de clima e solo por meio da geração de cultivares tolerantes a estresses hídricos e nutricionais e resistentes a pragas e doenças (DI CIERO e AMARAL, 2002).

A pesquisa e a aplicação da biotecnologia florestal são atividades globais, identificadas em 76 países, realizadas em aproximadamente 140 gêneros, a maioria, 62 %, focadas principalmente em seis gêneros: *Pinus*, *Eucalyptus*, *Picea*, *Populus*, *Quercus* e *Acacia* (FAO, 2004).

Até 2001, aproximadamente 252 testes em campo com plantas lenhosas transgênicas tinham sido realizados envolvendo pelo menos 24 espécies vegetais em 17 países, incluindo tanto espécies frutíferas como florestais, sendo que 76% das espécies pertencem a essa última categoria (RAUTNER, 2001). Em 2004, a FAO reportou que em pelo menos 35 países foram realizadas pesquisas de transformação genética com espécies florestais, na sua maioria restrita a laboratórios ou estufas, e somente 16% com experimentação de campo, pequenas e de curta duração. Aproximadamente dois terços das pesquisas foram desenvolvidas na América do Norte (48%) e na Europa (32%), e em menor proporção na Ásia (14%), Oceania (5%), América do Sul (1%) e África com menos de 1%.

A partir de 1987, quando foi obtida a primeira cultura arbórea transformada (FILLATTI et al., 1987), as pesquisas com transgênicos têm se concentrado principalmente nos estudos moleculares de função e expressão de genes, processos fisiológicos e de desenvolvimento vegetal (HANSEN e WRIGHT, 1999), no estudo da modificação da composição/teor de lignina, resistência a pragas, tolerância a herbicidas, e na produção de biomassa e de plantas estéreis (MANDERS et al., 1992; JOUANIN et al., 2000; HAINES, 1994; TZFIRA et al., 1997; RISHI et al., 2001).

Tendo em vista os problemas inerentes ao melhoramento genético florestal, a

transformação genética é uma ferramenta que apresenta grande potencial para as espécies arbóreas. Estas novas ferramentas biotecnológicas devem combinar ao mesmo tempo o desenvolvimento de árvores superiores, objeto de estudo dos métodos clássicos de melhoramento, e possibilitar a multiplicação em larga escala do material genético melhorado. Na área florestal, considera-se que a transferência de genes pode minimizar as limitações intrínsecas do melhoramento de espécies arbóreas, tais como o longo tempo entre gerações e a variabilidade existente entre e dentro de espécies, auxiliando em programas de melhoramento genético pela introdução de uma nova característica ou a alteração de uma pré-existente sem modificar a estrutura genética global da planta (STUDART-GUIMARÃES et al., 2003).

## 2.2 A FITORREMEDIAÇÃO

Uma planta ideal para a recuperação ambiental pode ser definida como aquela que apresente elevada produção de biomassa combinada com uma capacidade superior para a tolerância, acúmulo e/ou a degradação de um poluente, dependendo do tipo do poluente e da tecnologia de fitorremediação selecionada (OW, 1996; LASAT, 2002; PILON-SMITS, 2005).

Como alternativa aos custosos processos convencionais de descontaminação tem-se fortalecido a idéia de que plantas geneticamente modificadas podem exercer importante papel na retirada de metais pesados de ambientes contaminados. As estratégias biotecnológicas constituem uma ferramenta útil para alcançar esses objetivos, pois pode-se utilizar a engenharia genética para transferir genes de hiperacumulação em plantas que não têm a propriedade de acumular metais, ou para superexpressar genes já existentes (BERKEN et al., 2002; EAPEN e D'SOUZA, 2005). Como exemplo deste potencial da engenharia genética para a fitorremediação, pesquisas recentes demonstraram que a introdução de uma via de detoxificação de mercúrio em plantas, favoreceu o aumento da tolerância ao elemento e conversão de formas altamente tóxicas de mercúrio orgânico em mercúrio elementar, menos tóxico (BIZILY et al., 2000). Além disso, este tipo de trabalho possibilita a compreensão do processo fisiológico de absorção, transporte e acúmulo de metais pesados na planta (MACEK et al., 2000).

Nos tecidos vegetais, frequentemente, pode ocorrer acúmulo de metais pesados em quantidades consideráveis nos tecidos vegetais, inclusive excedendo os níveis de tolerância do organismo humano e vegetal, sem prejudicar a produção ou causar efeito



tóxico visível (HAAN, 1981). Determinadas quantidades são requeridas pelas plantas para o seu metabolismo e crescimento normal, sendo os mesmos tóxicos quando fornecidos em quantidades excessivas. O aproveitamento destes elementos pelas células depende de um processo de balanceamento que visa impedir a toxicidade à planta, que inclui a compartimentalização dos metais em estruturas sub-celulares, exclusão e/ou diminuição do transporte através da membrana; e a formação de peptídeos quelantes, ricos em cisteínas, como as fitoquelatinas e metalotioneínas, que auxiliam direta ou indiretamente, na acumulação de metais pelas plantas (COBBET e GOLDSBROUGH, 2002).

As metalotioneínas (MTs), em particular, constituem uma superfamília de proteínas de baixo peso molecular (<10 kDa), que contêm alto teor de metais e enxofre, podendo contribuir com mais de 20% do peso dessa proteína, sendo encontradas em animais, plantas, microrganismos eucarióticos e em alguns procariontes. Íons metálicos bivalentes ( $Zn^{+2}$ ,  $Cu^{+2}$ ,  $Cd^{+2}$ ) ligam-se aos grupos tióis dos resíduos de cisteínas (BINZ e KÄGI, 2001). As MTs são classificadas em 3 classes, onde nas Classes I e II encontram-se proteínas codificadas por genes e na Classe III encontram-se polipeptídeos não diretamente codificados por genes, compostos por unidades atípicas, como por exemplo,  $\gamma$ -glutamilcisteína e fitoquelatina (KÄGI, 1991; COBBETT e GOLDSBROUGH, 2002).

Embora a exata função das MTs nas plantas ainda não seja conhecida, a diversidade de respostas e sítios de expressão destas proteínas sugerem que poderiam estar envolvidas em vários processos biológicos tais como a reação de defesa da planta a patógenos, apoptose, desenvolvimento e metabolismo de tolerância aos metais pesados (KÄGI, 1991; FORDHAM-SKELTON et al., 1998; COBBETT e GOLDSBROUGH, 2002; LAPLAZE et al., 2002). As MTs exercem papel primordial no controle de íons livres e na fixação intracelular de traços de zinco e cobre, na regulação do seu fluxo e destinos celulares e neutralização das influências prejudiciais da exposição aos elementos tóxicos, tais como o cádmio e o mercúrio e na proteção de uma variedade de condições do estresse (KÄGI, 1991). No trigo, a transcrição de *MT* foi aumentada quando da exposição a excesso de alumínio (SNOWDEN e GARDNER, 1993) e o decréscimo no mRNA de *Mimulus guttatus* foi observado quando as plantas foram tratadas com cobre (MIRANDA et al., 1990). Em *Brassica napus*, a expressão do gene *MT* foi observada durante a senescência das folhas e em *Arabidopsis thaliana* como resposta a injúrias e a extratos de *Peronospora parasitica* e *Pseudomonas syringae* (BUTT et al., 1998).

LAPLAZE et al. (2002) isolaram e clonaram o gene *cgMT1* a partir de células de nódulos de raízes de *Casuarina glauca*, inoculado com cepas de *Frankia*. Este gene mostrou alto grau de similaridade na sequência com os de outras proteínas *MT1*

encontradas em monocotiledôneas e dicotiledôneas. Com o objetivo de estudar a função do *MT1* em plantas actinorizais, este gene foi fusionado ao gene marcador *uidA* (*gus*) e introduzido em plantas de *C. glauca*, *A. thaliana* e *Nicotiana tabacum*. A análise de *gus* mostrou que o promotor do gene *cgMT1* foi mais ativo nas raízes, sistema vascular e nas partes mais velhas da planta, sugerindo que este gene possa estar associado ao transporte de metais pesados através da planta. Estes autores indicaram que este gene pode ser introduzido em plantas e, ao ser introduzido numa espécie lenhosa de rápido crescimento, a proteína poderia funcionar como fitoextratora de metais; no caso de árvore poderia permanecer por muitos anos no terreno a ser tratado.

### 2.3 O *Eucalyptus camaldulensis*

O *Eucalyptus camaldulensis* Dehn., seção *Exsertaria*, é conhecido na Austrália por “Murray red gum” e “River red gum”, ou seja, eucalipto do “Vale do Murray ou dos cursos d’água com tronco de casca lisa e madeira vermelha” (PRYOR, 1976; GOLFARI et al., 1978). É considerada a espécie de maior distribuição geográfica do gênero, encontrando-se espalhada por quase todo o território australiano, com exceção da Tasmânia. Em áreas áridas e semi-áridas, ocorre ao longo ou próximo de cursos d’água sazonais. É essencialmente uma espécie ciliar, mas pode também ocorrer em encostas de colinas, independente das condições de precipitação (BARROS e NOVAIS, 1990).

Cresce em condições climáticas variadas, desde quente a subúmida e semi-árida, com temperatura média máxima entre 27° e 40°C, no mês mais quente, e mínima média, no mês mais frio, variando de 3° a 15°C. Nas regiões tropicais não ocorrem geadas, enquanto que ao sul da zona de ocorrência podem ocorrer até 50 geadas por ano (SOUZA, 1996).

A precipitação média anual de sua área de ocorrência varia de 250 a 600 mm, em regime bem concentrado, chegando em algumas áreas a 1250 mm por ano e, em outras, a 150 mm por ano (SOERIANEGARA e LEMMENS, 1994). A distribuição das chuvas varia desde um máximo no inverno, na região sul, a uma distribuição periódica típica no norte da Austrália, caindo principalmente entre novembro e março. Em locais de baixa precipitação a espécie sobrevive em áreas alagadas e/ou presença de lençol freático alto. Os solos são tipicamente arenosos aluviais (MARTINEZ, 1990).

Devido às grandes dimensões e boa durabilidade da madeira (500-600 kg m<sup>-3</sup>), o *E. camaldulensis* tem ampla aplicação principalmente para usos que requerem madeiras mais duras, como para serraria, dormentes, postes, mourões e carvão. Também é utilizada como

cerca quebra-ventos, planta ornamental e produção de mel de excelente qualidade (MARTÍNEZ, 1990; ELDRIDGE et al., 1993; SOERIANEGARA e LEMMENS, 1994).

Em função de sua rusticidade, o *E.camaldulensis* é uma das espécies mais adequadas para reflorestamento em zonas críticas, sendo introduzido com relativo sucesso em vários países, principalmente em áreas onde ocorrem deficiências hídricas e edáficas, situações consideradas extremamente limitantes para o desenvolvimento para outras espécies (HIGA, 2003).

No Brasil, a introdução do *E. camaldulensis* ocorreu no início do século passado, assumindo maior importância quando os programas de florestamento moveram-se do sul para as regiões centro-oeste e nordeste, visto que as espécies como *E. grandis*, *E. saligna* e *E. urophylla* eram inadequadas para as condições de alta temperatura e longo período seco, característicos destas regiões (GOLFARI et al., 1978). Mas, apesar do *E. camaldulensis* ser caracterizado pela sua rusticidade e boa adaptabilidade a diferentes regiões, grande variabilidade genética entre procedências, registros de plantios comerciais desta espécie são poucos, sendo restritos a áreas experimentais, áreas produtoras de sementes e algumas poucas empresas.

Do ponto de vista da utilização da espécie no melhoramento e biotecnologia florestal, a existência de variação genética é um indicativo da viabilidade da seleção de genótipos com alta eficiência de absorção de nutrientes, especialmente sob condições limitantes de fertilidade do solo.

As características de rápido crescimento, sistema radicular bastante desenvolvido e facilidade de aclimatação tornam o *E. camaldulensis* uma espécie com potencial para emprego em programas de recuperação de áreas degradadas pela deposição de metais pesados. MOHAMMADNIA e KOWSAR (1999) chamaram a atenção para a importância do *E. camaldulensis* para as pesquisas que envolvem fitorremediação, pois esta espécie provou ser excelente removedor de  $\text{NO}_3$  e  $\text{NH}_4$  em aquíferos aluviais no sul do Irã. O *E. camaldulensis* apresentou desenvolvimento satisfatório em solos degradados, desestratificado e com características muito discrepantes das originais, resultante da extração do xisto (VALLE, 1991).

#### 2.4 A TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DO *Eucalyptus*

A produção de plantas transgênicas depende da introdução estável do DNA exógeno no interior do genoma de células de plantas cultivadas, seguido por regeneração

das plantas e subsequente expressão do(s) gene(s) introduzido(s) (BRASILEIRO e DUSI, 1999). Muitos trabalhos demonstram que vários tecidos, órgãos e células dentro de uma planta podem diferir em sua susceptibilidade à transformação por *Agrobacterium* (ROBBS et al., 1991; BAILEY et al., 1994; MAURO et al., 1995; NAM et al., 1997). Esta diferença tem sido observada em leguminosas (SCHROEDER et al., 1993), *Populus* (BENEDRA et al., 1996), *Pinus radiata* (BERGMANN e STOMP, 1992), *Arabidopsis* (NAM et al., 1997), *E. camaldulensis* (MULLINS et al., 1997) e feijão (NAGL et al., 1997), entre outras.

Estudos mais recentes relatam a susceptibilidade de espécies consideradas recalcitrantes a *Agrobacterium*. Neste sentido, TOURNIER et al. (2003) relataram que o estudo de transformação visando à modificação do teor de lignina realizada com o híbrido *E. grandis* x *E. urophylla* é bastante limitado devido à recalcitrância apresentada pelas espécies deste gênero, combinada com baixa capacidade de regeneração *in vitro*.

Em algumas espécies de *Eucalyptus*, tais como o *E. camaldulensis*, *E. citriodora* e *E. grandis*, tem sido positiva a regeneração completa de plantas a partir da organogênese ou embriogênese somática. Entretanto, quando esta regeneração é aplicada em conjunto com a transformação genética via *Agrobacterium*, estes sistemas normalmente perdem suas habilidades em regenerar plantas nos tecidos transformados (DIALLO e DUHOUX, 1984; MURALIDHARAN et al., 1989; LAINÉ e DAVID, 1994; QUOIRIN e QUISEN, 2006).

Para BRASILEIRO e LACORTE (1998), o principal requisito para o sucesso na obtenção de plantas transgênicas via *Agrobacterium* é a existência de uma metodologia eficiente de cultura de tecidos e regeneração da espécie-alvo. O sucesso de um sistema de regeneração depende de grande número de variáveis e, ao contrário do que se acredita, a composição salina de um meio de cultura não é a única variável determinante do sucesso da cultura *in vitro* (McCOWN e SELLMER, 1987).

O tipo de explante a ser transformado também tem grande importância em espécies que apresentam dificuldades de transformação, não só pela capacidade de regeneração de plantas a partir de células transformadas, mas também pela susceptibilidade à *Agrobacterium*, visto que o explante com potencial organogenético não corresponde necessariamente a um material transformável. Os trabalhos com melhores resultados na modificação genética com espécies florestais têm sido obtidos utilizando material juvenil, freqüentemente explantes produzidos a partir de tecidos cultivados *in vitro*, que têm uma capacidade muito mais elevada de regeneração que tecidos adultos. Alguns pesquisadores conseguiram obter regeneração de brotos a partir de órgãos juvenis de *E. gunnii* (CHRQUI et al., 1992), *E. marginata*, *E. diversicolor* (BENNETT e McCOMB, 1982), *E. camaldulensis* (DIALLO e DUHOUX, 1984), *E. globulus* (AZMI et al., 1997) e do híbrido *E. grandis* x *E.*

*urophylla* (YANG et al., 1995, BARRUETO CID et al., 1999). Apesar de relatos bem sucedidos com tecidos de plantas adultas serem raros, a regeneração a partir de folhas de *E. citriodora* (MURALIDHARAN et al., 1989), *E. grandis* (LAINÉ e DAVID, 1994) e caules e folhas de *E. tereticornis* (SUBBAIAH e MINOCHA, 1990) foi obtida com sucesso.

A eficiência da transformação pode ser aumentada pelo uso de linhagens de *Agrobacterium* altamente virulentas que possuem genes *vir* constitutivos (HANSEN et al., 1999), pela indução de ferimentos nos tecidos a serem transformados e pela adição de compostos fenólicos como a acetoseringona, os quais induzem a expressão dos genes *vir*. De acordo com MORALEJO et al. (1998) espécies lenhosas respondem melhor a infecção por cepas nopalinas do que às octopinas.

A exposição de explantes a diferentes períodos de co-cultura tem sido investigada para diferentes espécies, como ALMEIDA (2002) que verificou que explantes de *Citrus* com um e cinco dias de co-cultura não regeneraram brotos GUS positivos, sendo estes apenas obtidos no tratamento com três dias. No gênero *Eucalyptus*, CHEN et al. (1996), HO et al. (1998), KAWAZU et al. (1996) e MULLINS et al. (1997) aplicaram como tempo padrão, 48 horas de co-cultura em explantes hipocotiledonares, cotiledonares e foliares de *E. camaldulensis*. MACHADO et al. (1997) utilizaram cinco dias para a co-cultura do híbrido *E. grandis* x *E. urophylla* para diferentes tipos de explantes.

A cultura do explante em pré-cultura também tem resultado na melhoria da eficiência de transformação, como com *Arabidopsis thaliana* (SANGWAN et al., 1992) e *Citrus* (CERVERA et al., 1998). MORALEJO et al. (1998) após a pré-cultura de cotilédones e hipocótilos de *E. globulus* por 4 a 6 dias, observaram que o nível de expressão transiente GUS-positivo foi mais estável ao final de 30 dias com 6 dias de pré-cultura.

### 3 ORGANOGÊNESE INDIRETA E MICROPROPAGAÇÃO DE *Eucalyptus camaldulensis*

#### RESUMO

Até o momento, os resultados de organogênese adventícia indireta com espécies lenhosas tem sido limitantes para a utilização destas espécies nos sistemas de transformação e obtenção de plantas transgênicas. Neste sentido, em função dos comportamentos apresentados pelas diversas espécies do gênero *Eucalyptus* e, diante da potencialidade da utilização do *Eucalyptus camaldulensis* nos programas de transformação genética, os objetivos deste trabalho foram comparar a resposta organogênica de explantes cotiledonares e foliares em diferentes meios de cultura e estabelecer as condições para a otimização da organogênese indireta da espécie. Foram realizados experimentos com meios de cultura JADS, MS, MS N/2, com metade da concentração de nitratos de amônio e potássio, WPM e B5 contendo 2% de sacarose, além dos fitorreguladores BAP, TDZ, CIN, ANA, 2,4-D e picloram, combinados nos diferentes ensaios. Os resultados obtidos demonstraram que os explantes cotiledonares e foliares respondem de maneira diferente quanto à capacidade regenerativa quando cultivados nos mesmos meios de cultura, sendo a regeneração foliar pouco satisfatória. O meio de cultura MS N/2 suplementado com 2% de sacarose, 0,6% de ágar, 10% de água de coco, 4,4  $\mu\text{M}$  de BAP e 2,7  $\mu\text{M}$  de ANA proporcionou melhor condição para a organogênese indireta a partir de explantes cotiledonares. A multiplicação das brotações regeneradas foi superior em meio contendo os sais do MS com 2,64  $\mu\text{M}$  de BAP, 0,5  $\mu\text{M}$  de ANA, 3% de sacarose, 0,7% de ágar, 1,0  $\text{mg L}^{-1}$  de tiamina, 0,5  $\text{mg L}^{-1}$  de piridoxina e 0,5  $\text{mg L}^{-1}$  de ácido nicotínico. Plântulas com aproximadamente 1,5 cm de altura foram enraizadas em meio MS/2 com 3% de sacarose, 0,7% de ágar e 0,2% de carvão ativado. Em seguida foram aclimatizadas em tubete contendo vermiculita de granulometria fina e terra (1:1) em casa-de-vegetação com nebulização intermitente proporcionando 87% de sobrevivência.

Palavras-chave: eucalipto, regeneração *in vitro*, espécies lenhosas, cultura de tecidos.

### 3 INDIRECT ORGANOGENESIS AND MICROPROPAGATION OF *Eucalyptus camaldulensis*

#### ABSTRACT

Till now, the results of adventitious organogenesis obtained with woody species have limited the use of these species in transformation systems and regeneration of transgenic plants. Therefore, in function of the behaviors presented by several species of *Eucalyptus* and due to the potentiality of the use of *Eucalyptus camaldulensis* in programs of genetic transformation, the objectives of this work were to compare the organogenic response of cotyledonary and leaf explants to different culture media and to establish the most appropriate conditions for the indirect organogenesis of the specie. Experiments were carried out with JADS, MS, MS N/2, with half-strength potassium and ammonium nitrates concentration, WPM and B5 culture medium containing 2% sucrose with different growth regulators (BAP, TDZ, KIN, NAA, 2,4-D and picloram). The results demonstrated that the cotyledonary and leaf explants respond in a different way with regards to their regenerative capacity when cultivated in the same culture medium, being the regeneration from leaf explants little satisfactory. The MS N/2 culture medium supplemented with 2% sucrose, 0,6% agar, 10% coconut water, BAP (4,4  $\mu\text{M}$ ) and NAA (2,7  $\mu\text{M}$ ) provided the best conditions for the indirect organogenesis from cotyledonary explants of *E. camaldulensis*. The multiplication of the regenerated buds was superior in MS salt supplemented with 2,64  $\mu\text{M}$  BAP, 0,5  $\mu\text{M}$  ANA, 3% sucrose, 0,7% agar, 1,0  $\text{mg L}^{-1}$  thiamine, 0,5  $\text{mg L}^{-1}$  pyridoxine and 0,5  $\text{mg L}^{-1}$  nicotinic acid. Plantlets at least 1,5 cm high were rooted in half-strenght MS culture medium containing 3% sucrose, 0,7% agar and 0,2% activated charcoal. The acclimatization was done in greenhouse under intermittent mist in a substrate composed of vermiculite of fine granulometry and soil (1:1), where survival rate was 87%.

Key-words: eucalypt, *in vitro* regeneration, wood plant, tissue culture.

### 3.1 INTRODUÇÃO

Dentre muitas espécies para as quais protocolos de regeneração *in vitro* têm sido desenvolvidos, as espécies lenhosas têm apresentado resultados de organogênese adventícia limitantes para sua utilização nos sistemas de transformação e obtenção de plantas transgênicas. Uma das dificuldades encontradas deve-se ao fato de que metodologias de regeneração funcionam bem com algumas, mas não com outras espécies ou variedades, limitando o espectro daquelas que podem ser transformadas (BORÉM e SANTOS, 2001). As espécies de eucalipto têm sido amplamente pesquisadas neste aspecto, com resultados significativos de experimentos que utilizaram desde a embriogênese somática até a regeneração de brotos a partir de calos (DIALLO e DUHOUX, 1984; MURALIDHARAN et al., 1989; LAINÉ e DAVID, 1994; MORALEJO et al., 1998). No entanto, quando estas metodologias são aplicadas junto com a transformação genética via *Agrobacterium*, estes sistemas algumas vezes perdem suas habilidades em regenerar plantas a partir dos tecidos transformados.

Para diversas espécies de *Eucalyptus*, tem sido relatada a regeneração via organogênese indireta, dentre elas *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* (BARRUETO CID et al., 1999), *E. tereticornis* (GILL et al., 1996; SUBBAIAH e MINOCHA, 1990), *E. nitens* e *E. globulus* (BANDYOPADHYAY et al., 1999), *E. camaldulensis* (RAHIM et al., 2003) e *E. grandis* (ALVES et al., 2004).

Este tipo de regeneração *in vitro* pode ser influenciado por diversos fatores, que podem ser agrupados em cinco amplas categorias que são: a) genótipo, fonte e histórico; b) composição do meio de cultura; c) ambiente; d) tempo (períodos de sub-cultivo); e d) interações entre e dentro dos fatores acima mencionados (Mc COWN e SELLMER, 1987). Com base nisto, a formação *de novo* (ou adventícia) vem sendo obtida a partir de diversos tipos de explantes, como segmento nodal e internodal (HERVÉ et al., 2001; RAHIM et al., 2003; SUBBAIAH et al., 1997), discos foliares (BARRUETO CID et al., 1999; HERVÉ et al., 2001; LAINÉ e DAVID, 1994; SUBBAIAH e MINOCHA, 1990), segmentos cotiledonares (BANDYOPADHYAY e HAMILL, 2000; DIBAX, 2005) e hipocotiledonares (AZMI et al., 1997; TIBOK et al., 1995).

Além do tipo de explante, a idade do mesmo também exerce grande influência na resposta à indução de organogênese, pois de acordo com SKOOG e MILLER (1957),



quanto maior a determinação de um explante para uma via de desenvolvimento, menor será a competência para formar outro tipo de órgão. Este fato foi observado em explantes de *E. globulus* obtidos de plântulas germinadas *in vitro* com 8 a 15 dias de idade, único estágio competente para a regeneração de brotos via organogênese a partir de hipocótilos, enquanto explantes obtidos de plântulas mais velhas não foram responsivos à produção de brotações adventícias (AZMI et al., 1997).

A influência exercida pela composição dos meios de cultura também tem sido bastante explorada dentre as espécies do gênero *Eucalyptus*, sendo que a maioria dos trabalhos com regeneração utilizam meios nutritivos diferentes como B5 de GAMBORG et al. (1968) (KAWAZU et al., 1996), MS de MURASHIGE e SKOOG e MS modificado (MURALIDHARAN et al., 1989; HO et al., 1998; GONZÁLEZ, 2002) e o meio WPM de LLOYD e McCOWN (1980) (MACHADO et al., 1997; MULLINS et al., 1997).

A maioria dos meios de cultura utilizados para as fases da calogênese e regeneração têm a mesma composição de macronutrientes, seja na concentração original ou diluída. Apesar de ser o MS a composição salina mais empregada para induzir a formação de calos e a organogênese direta ou indireta na maioria das espécies vegetais, existem outras composições elaboradas para induzir determinados padrões morfogênicos. A principal diferença entre os meios utilizados nestas fases consiste no uso de fitorreguladores, na sua maioria as auxinas e as citocininas, que exercem grande influência sobre a resposta organogênica *in vitro* da espécie-alvo (RADICE, 2004).

O balanço entre auxinas e citocininas é usualmente requerido para iniciar o crescimento e diferenciação celular, sendo estas combinações bastante variadas quanto à concentração e tempo de exposição, aumentando ou diminuindo a eficiência da regeneração dependendo da espécie envolvida (SCHESTIBRATOV et al., 2003). Diversos protocolos de regeneração de *Eucalyptus* relatam estas combinações, onde após a obtenção de calos, segue-se a indução à regeneração em resposta a fitorreguladores presentes no meio de cultura. Nestes trabalhos, a organogênese foi induzida com diferentes concentrações de vários fitorreguladores, como no caso de explantes hipocotiledonares de *E. urophylla* (TIBOK et al., 1995) e de *E. globulus* (AZMI et al., 1997), com maior porcentagem de regeneração obtida em meio com 0,88 µM de benzilaminopurina (BAP) e 0,54 µM de ácido naftalenoacético (ANA) e 0,88 µM de BAP e 0,05 µM de ANA, respectivamente. GONZÁLEZ (2002), por sua vez, desenvolveu um protocolo de organogênese indireta de *E. grandis* x *E. urophylla* em 5 estádios diferentes, sendo o tidiazuron (TDZ) aplicado a 1,0 e 2,0 µM em diferentes balanços com ANA para a formação

de calos, enquanto BARRUETO CID et al. (1999) utilizaram somente TDZ a 2  $\mu$ M para a calogênese do mesmo híbrido.

Também o genótipo é um fator determinante nos processos morfogênicos, desde a capacidade de estabelecimento do explante nas condições *in vitro*, até para a proliferação celular, diferenciação e crescimento de novos órgãos. Potencialmente, qualquer genótipo pode ser cultivado e regenerado se conhecidas as condições adequadas de cultura. Este tipo de influência no processo de regeneração *in vitro* foi verificado por BENNETT e McCOMB (1982) em *E. marginata*, e para diferentes clones de *E. grandis* (LAINÉ e DAVID, 1994) e de *E. camaldulensis* (MULLINS et al., 1997).

Em função dos comportamentos apresentados pelas diversas espécies do gênero *Eucalyptus* e diante da potencialidade da utilização do *Eucalyptus camaldulensis* em programas de transformação genética, o objetivo deste trabalho foi estabelecer as condições mais adequadas para a organogênese indireta de *E. camaldulensis* comparando a regeneração de explantes cotiledonares e foliares em diferentes meios de cultura contendo várias combinações e concentrações de fitorreguladores e em dois genótipos.

## 3.2 MATERIAL E MÉTODOS

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

### 3.2.1 Material vegetal

Foram utilizados explantes (cotilédones e folhas) oriundos de plântulas germinadas *in vitro* de *E. camaldulensis* Dehl. provenientes do Setor de Sementes do Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais (IPEF), Piracicaba, São Paulo. As sementes foram coletadas em Área de Produção de Sementes (APS F1), localizada no município de Açailândia, Estado do Maranhão. A APS se caracteriza por ser um povoamento selecionado e desbastado, no qual são retiradas árvores não desejáveis, para então ser cultivado visando florescimento e produção de sementes abundantes via polinização cruzada.

### 3.2.2 Condições de cultura *in vitro*

Os explantes cotiledonares e foliares foram cultivados em placas de Petri de vidro com 90 mm de diâmetro e 20 mm de altura, contendo 25 mL de meio de cultura suplementado com 2% de sacarose e 0,6% de ágar (Vetec<sup>®</sup>), lacradas com filme plástico, com pH ajustado em 5,8 antes da esterilização em autoclave a 1 atm e 121°C por 20 min.

Todos os ensaios descritos a seguir foram realizados em sala de crescimento equipada com lâmpadas fluorescentes de tipo “luz do dia”, fornecendo uma densidade de fluxo de fótons de  $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , fotoperíodo de 16 horas e com temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  (Figura 1).



FIGURA 1 – Sala de crescimento de culturas *in vitro* de *E. camaldulensis*

### 3.2.3 Efeito de meios minerais, fitorreguladores e água de coco na eficiência de regeneração

#### 3.2.3.1 Organogênese indireta a partir de cotilédones (Ensaio 1, 2 e 3).

Sementes de *E. camaldulensis* foram esterilizadas superficialmente por lavagens sucessivas em etanol 70% (v/v) com Tween 20<sup>®</sup> (4 gotas/100 mL) por 2 minutos, solução de hipoclorito de sódio (8% de cloro ativo) durante 30 minutos sob agitação e três lavagens sucessivas em água deionizada estéril. As sementes foram semeadas em placas de Petri contendo 25 mL do meio de cultura MS/2 (meio de MURASHIGE e SKOOG, 1962, com metade da concentração original dos sais). Para a germinação, as placas de Petri foram mantidas em sala de crescimento na ausência de luz por 7 dias seguidos de 5 dias em condições de luz.

Para todos os experimentos detalhados na Tabela 1, os cotilédones isolados de plântulas com 12-15 dias de idade foram cultivados em sala de crescimento em ambiente escuro por 30 dias (Fase 1) e posteriormente transferidos para condição de luz por outros 30 dias (Fase 2), com a face adaxial em contato com o meio de cultura (MS, WPM e JADS, ANEXO 2) com diferentes combinações de citocininas (BAP, TDZ ou CIN) e auxinas (ANA, Picloram ou 2,4-D) com ou sem água de coco (Kero-Coco<sup>®</sup>) a 10% (v/v).

TABELA 1 – Composição dos meios de cultura utilizados nos ensaios de organogênese indireta a partir de explantes cotilédonares de *E. camaldulensis* suplementados com 2% de sacarose e 0,6% de ágar, por 30 dias no escuro e 30 dias na luz.

Ensaio	Tratamento	Meio de cultura	Fitorregulador (µM)					
			BAP	TDZ	CIN	ANA	Picloram	2,4-D
1	1	MS	4,4	-	-	2,7	-	-
	2	WPM	4,4	-	-	2,7	-	-
	3	JADS	4,4	-	-	2,7	-	-
2	1	MS N/2	4,4	-	-	2,7	-	-
	2	MS N/2 + AC (10%)	4,4	-	-	2,7	-	-
	3	MS N/2	2,2	-	-	2,7	-	-
	4	MS N/2 + AC (10%)	2,2	-	-	2,7	-	-
	5	MS N/2	-	4,5	-	2,7	-	-
	6	MS N/2 + AC (10%)	-	4,5	-	2,7	-	-
	7	MS N/2	-	9,0	-	2,7	-	-
	8	MS N/2 + AC (10%)	-	9,0	-	2,7	-	-
	9	MS N/2	-	-	4,7	2,7	-	-
	10	MS N/2 + AC (10%)	-	-	4,7	2,7	-	-
3	1	MS/2	4,4	-	-	2,7	-	-
	2	MS/2	4,4	-	-	2,7	-	-
	3	MS/2	-	-	4,6	2,1	-	-
	4	MS/2 + AC	1,0	-	-	-	0,04	-
	5	MS/2	1,1	-	-	-	-	7,5

Abreviaturas: AC – água de coco; MS – meio completo de MURASHIGE e SKOOG (1962); MS/2 – meio MS com metade da concentração original de sais; MS N/2 – meio MS com metade da concentração do nitrato de amônio e potássio; WPM – meio de cultura de LLOYD e Mc COWN (1980); JADS – meio de cultura de CORREIA (1993).

O delineamento experimental utilizado nestes experimentos foi inteiramente casualizado com 4 repetições nos ensaios 1 e 2, e 5 repetições no ensaio 3, considerando-se a placa de Petri como unidade experimental com 10 (ensaio 1) e 5 (ensaio 2 e 3) explantes cada uma. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de Duncan a 5% de significância para a comparação das médias dos tratamentos.

### 3.2.3.2 Organogênese indireta a partir de explantes foliares (Ensaio 4 a 10).

Previamente ao estabelecimento dos ensaios descritos a seguir, três clones micropropagados e subcultivados a cada 20 dias foram selecionados em função da superioridade na multiplicação e vigor *in vitro*, que foram os clones nº 05, 20 e 51. Destes, a partir de brotações múltiplas com 15-20 dias de idade foram excisadas folhas e divididos em dois no sentido transversal, para posterior cultivo com a face abaxial em contato com o meio de cultura.

#### 3.2.3.2.1 Ensaio 4

Explantes foliares do clone 05 foram cultivados por 30 dias no escuro (Fase 1) e subcultivados para luz por mais 30 dias (Fase 2), em meio MS com concentração original de nitratos de amônio e potássio reduzida à metade (MS N/2) suplementado com BAP, TDZ, CIN e ANA, com ou sem AC a 10% (v/v) conforme indicados na Tabela 2.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com 5 repetições por tratamento, considerando-se a placa de Petri como unidade experimental com 5 explantes cada. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de Duncan a 5% de significância para a comparação das médias dos tratamentos.

TABELA 2 – Concentrações de fitorreguladores e fases de cultura aplicados no experimento de organogênese indireta a partir de explantes foliares de *E. camaldulensis* em meio MS N/2 (meio MS com metade da concentração de nitratos de amônio e potássio, 2% de sacarose e 0,6% de ágar).

Tratamento	FASE 1					FASE 2				
	Fitorregulador (µM)				Água de coco (10%)	Fitorregulador (µM)				Água de coco (10%)
	BAP	TDZ	CIN	ANA		BAP	TDZ	CIN	ANA	
1	4,4	-	-	2,7	-	4,4	-	-	0,5	-
2	4,4	-	-	2,7	sim	4,4	-	-	0,5	sim
3	2,2	-	-	2,7	-	4,4	-	-	0,05	-
4	2,2	-	-	2,7	sim	4,4	-	-	0,05	sim
5	-	1	-	2,7	-	-	1	-	0,5	-
6	-	1	-	2,7	sim	-	1	-	0,5	sim
7	-	2	-	2,7	-	-	2	-	0,5	-
8	-	2	-	2,7	sim	-	2	-	0,5	sim
9	-	-	4,7	0,5	-	-	-	1	0,05	-
10	-	-	4,7	0,5	sim	-	-	1	0,05	sim

### 3.2.3.2.2 Ensaio 5

Explantos foliares do clone 05 foram cultivados em meio MS modificado (MST) de acordo com TOURNIER et al. (2003) (MST) suplementado com BAP, TDZ, ANA ou 2,4-D, com ou sem AC a 10% (v/v) nas concentrações e condições de luminosidade (fase 1 a 4) especificadas na Tabela 3.

TABELA 3 – Concentrações de fitorreguladores e fases de cultura aplicados no experimento de organogênese indireta a partir de explantes foliares de *E. camaldulensis* em meio MST (TOURNIER et al., 2003) suplementado com 2% de sacarose e 0,6% de ágar.

Tratamento	BAP ( $\mu$ M)	TDZ ( $\mu$ M)	ANA ( $\mu$ M)	2,4-D ( $\mu$ M)	Água de coco (10%)
Fase 1 – escuro por 5 dias					
1	1,0	-	-	0,5	-
2	1,0	-	-	2,3	-
3	1,0	-	-	4,5	-
4	2,0	-	-	0,5	-
5	2,0	-	-	2,3	-
6	2,0	-	-	4,5	-
Fase 2 – escuro por 10 dias seguido de luz por 15 dias					
1 a 3	-	1,0	0,5	-	sim
4 a 6	-	2,0	0,5	-	sim
Fase 3 – luz por 30 dias					
1 a 6	2,0	-	0,5	-	sim
Fase 4 – luz por 30 dias					
1 a 6	4,4	-	2,7	-	-

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 4 repetições por tratamento, considerando-se a placa de Petri como unidade experimental com 5 explantes cada. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de Duncan a 5% de significância para a comparação das médias dos tratamentos.

### 3.2.3.2.3 Ensaio 6

Explantos foliares do clone 05 foram cultivados em meio MS suplementado com ou sem AC a 10% (v/v), BAP, TDZ, ANA nas concentrações e condições de luminosidade (fases 1 a 4) especificadas na Tabela 4.

TABELA 4 – Concentrações de fitorreguladores e fases de cultura aplicados no experimento de organogênese indireta a partir de explantes foliares de *E. camaldulensis* em meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) suplementado com 2% de sacarose e 0,6% de ágar.

Tratamento	BAP (µM)	TDZ (µM)	ANA (µM)	Água de coco (10%)
Fase 1 – escuro por 20 dias				
1	-	1,0	0,5	sim
2	-	2,0	0,5	sim
3	-	3,0	0,5	sim
4	-	1,0	2,7	sim
5	-	2,0	2,7	sim
6	-	3,0	2,7	sim
Fase 2 – sombrite 50% por 10 dias e luz por 23 dias				
1	-	1,0	0,27	sim
2	-	2,0	0,27	sim
3	-	3,0	0,27	sim
4	-	1,0	0,27	sim
5	-	2,0	0,27	sim
6	-	3,0	0,27	sim
Fase 3 e 4 – luz até 120 dias				
1 a 6	2,2	-	0,27	-

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com 5 repetições por tratamento, considerando-se a placa de Petri como unidade experimental com 10 explantes cada. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de Duncan a 5% de significância para a comparação das médias dos tratamentos. Este experimento foi repetido duas vezes e a análise realizada pela média das repetições.

#### 3.2.3.2.4 Ensaio 7

Explantes foliares do clone 05 foram cultivados em meio B5 (GAMBORG et al., 1968) suplementado com 100 mg L<sup>-1</sup> de caseína hidrolisada, 200 mg L<sup>-1</sup> de glutamina, AC a 10% (v/v) e BAP, TDZ, ANA ou 2,4-D nas condições de luminosidade (fase 1 a 4) especificadas na Tabela 5.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com 5 repetições por tratamento, considerando-se a placa de Petri como unidade experimental com 10 explantes cada. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de Duncan a 5% de significância para a comparação das médias dos tratamentos.



TABELA 5 – Concentrações de fitorreguladores e fases de cultura aplicados no experimento de organogênese indireta a partir de explantes foliares de *E. camaldulensis* em meio B5 (GAMBORG et al., 1968) suplementado com água de coco (10%), 2% de sacarose e 0,6% de ágar.

Tratamento	BAP ( $\mu\text{M}$ )	TDZ ( $\mu\text{M}$ )	ANA ( $\mu\text{M}$ )	2,4-D ( $\mu\text{M}$ )
Fase 1 – escuro por 4 dias				
1	2,2	--	-	0,5
2	2,2	-	-	2,3
3	2,2	-	-	4,5
4	2,2	-	7,5	-
5	2,2	-	2,7	-
6	-	2,3	2,7	-
7	-	4,5	2,7	-
8	2,2	-	-	0,5
9	2,2	-	-	2,3
10	2,2	-	-	4,5
Fase 2 – escuro por 15 dias e sombrite 50% por 10 dias				
1 a 3	2,2	-	0,5	-
4	2,2	-	7,5	-
5	2,2	-	2,7	-
6	-	2,3	2,7	-
7	-	4,5	2,7	-
8 a 10	2,2	-	2,7	-
Fase 3 – luz por 30 dias				
1 a 3	2,2	-	0,5	-
4	2,2	-	0,05	-
5	2,2	-	0,5	-
6	-	2,3	0,5	-
7	-	2,3	0,5	-
8 a 10	2,2	-	2,7	-
Fase 4 – luz por 30 dias				
1 a 10	2,2	-	0,5	-

### 3.2.3.2.5 Ensaio 8

Explantes foliares do clone 05 foram seccionados em segmentos apical e basal, e cultivados em meio MS ou MS N/2 suplementados com 2% de sacarose, 0,6% de ágar (Vetec®), com ou sem AC a 10% (v/v), BAP, TDZ, CIN, ANA, Picloram, 2,4-D, nas condições de luminosidade (fase de 1 a 3) especificadas na Tabela 6.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado em esquema fatorial, considerando-se como fator 1 os meios de cultura, e como fator 2, os tipos de explante, com 4 repetições por tratamento, considerando-se a placa de Petri como unidade experimental com 4 explantes cada. Os dados foram submetidos à análise de variância

(ANOVA) e teste de Duncan a 5% de significância para a comparação das médias dos tratamentos.

TABELA 6 – Concentrações de fitorreguladores e fases de cultura aplicados no experimento de organogênese indireta a partir de segmentos apicais e basais de explantes foliares de *E. camaldulensis* em meios de cultura MS e MS N/2 (meio MS com a metade da concentração de nitratos de amônio e potássio), suplementados com 2% de sacarose e 0,6% de ágar.

Tratamento	BAP ( $\mu\text{M}$ )	TDZ ( $\mu\text{M}$ )	CIN ( $\mu\text{M}$ )	ANA ( $\mu\text{M}$ )	Picloram ( $\mu\text{M}$ )	2,4-D ( $\mu\text{M}$ )	Água de coco (10%)
Fase 1 – escuro por 30 dias							
1 – MS	2,2	-	-	-	0,04	-	-
2 – MS	2,2	-	-	-	0,04	-	sim
3 – MS *	1,1 (2,2)	-	-	-	0,04	-	-
4 – MS	-	2,3	-	2,7	-	-	sim
5 – MS	-	5,4	-	2,7	-	-	sim
6 – MS	2,2	-	-	2,7	-	-	sim
7 – MS N/2	2,2	-	-	2,7	-	-	sim
8 – MS N/2	-	-	4,7	2,7	-	-	sim
9 – MS	-	-	4,7	2,7	-	-	sim
10 – MS	-	-	4,7	2,7	-	-	sim
11 – MS	-	-	2,3	2,7	-	-	sim
Fase 2 – luz por 30 dias							
1 – MS	4,4	-	-	-	0,04	-	-
2 – MS	4,4	-	-	-	0,04	-	sim
3 – MS *	4,4	-	-	2,7	-	-	-
4 – MS	2,2	-	-	2,7	-	-	sim
5 – MS	-	5,4	-	2,7	-	-	sim
6 – MS	2,2	-	-	2,7	-	-	sim
7 – MS N/2	2,2	-	-	2,7	-	-	sim
8 – MS N/2	-	-	4,7	2,7	-	-	sim
9 – MS	-	-	4,7	2,7	-	-	sim
10 – MS	4,4	-	-	2,7	-	-	sim
11 – MS	2,2	-	-	2,7	-	-	sim
Fase 3 – luz por 30 dias							
1 – MS	4,4	-	-	-	-	0,01	-
2 – MS	4,4	-	-	-	-	0,01	-
3 – MS *	4,4	-	-	2,7	-	-	-
4 – MS	2,2	-	-	2,7	-	-	-
5 – MS	4,4	-	-	2,7	-	-	-
6 – MS	2,2	-	-	2,7	-	-	-
7 – MS N/2	4,4	-	-	2,7	-	-	-
8 – MS N/2	-	-	4,7	2,7	-	-	-
9 – MS	-	-	4,7	2,7	-	-	-
10 – MS	4,4	-	-	2,7	-	-	-
11 – MS	2,2	-	-	2,7	-	-	-

\* o tratamento 3 foi mantido a 1,1  $\mu\text{M}$  BAP por 7 dias seguido de 23 dias em 2,2  $\mu\text{M}$  BAP

### 3.2.3.2.6 Ensaio 9

Explantos foliares do clone 05 foram seccionados em segmentos apical e basal, e cultivados em meio B5 básico (GAMBORG et al., 1968) com ou sem AC a 10% (v/v), ANA e TDZ nas condições de luminosidade (fase 1 e 2) especificadas na Tabela 7.

TABELA 7 - Concentrações de TDZ e ANA e fases de cultura aplicados no experimento de organogênese indireta a partir de segmentos apicais e basais de explantes foliares de *E. camaldulensis* em meio básico B5 (GAMBORG et al., 1968) suplementado com 2% de sacarose e 0,6% de ágar.

Tratamento	TDZ ( $\mu\text{M}$ )	ANA ( $\mu\text{M}$ )	Água de coco (10%)
Fase 1 – escuro por 30 dias e luz por 30 dias			
1	1,1	0,5	sim
2	1,1	2,7	sim
3	2,2	0,5	sim
4	2,2	2,7	sim
Fase 2 – luz por 60 dias			
1	1,1	0,5	-
2	1,1	2,7	-
3	2,2	0,5	-
4	2,2	2,7	-

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado em esquema fatorial, considerando-se como fator 1 os meios de cultura, e como fator 2, os segmentos do explante, com 4 repetições por tratamento, considerando-se a placa de Petri como unidade experimental com 4 explantes cada. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de Duncan a 5% de significância para a comparação das médias dos tratamentos.

### 3.2.3.2.7 Ensaio 10

Explantos foliares dos clones 04 e 05 foram cultivados em meio MS modificado (MST) por acordo com TOURNIER et al. (2003) com ou sem AC a 10% (v/v), BAP, TDZ e ANA nas condições de luminosidade (fase de 1 a 3) especificadas na Tabela 8.

TABELA 8 – Concentrações de fitorreguladores e fases de cultura aplicados no experimento de organogênese indireta a partir de explantes foliares de dois clones de *E. camaldulensis* em meio MST (TOURNIER et al., 2003).

Tratamento	BAP ( $\mu\text{M}$ )	TDZ ( $\mu\text{M}$ )	ANA ( $\mu\text{M}$ )	Água de coco (10%)
Fase 1 – escuro por 30 dias				
1	-	1,0	2,7	sim
2 (15 dias)*	2,2		2,7	sim
2 (15 dias)*		1,0	2,7	sim
3 (15 dias)*		1,0	2,7	sim
3 (15 dias)*	4,4		2,7	sim
4	4,4	-	2,7	sim
5 (15 dias)*	4,4		2,7	sim
5 (15 dias)*		1,0	2,7	sim
6 (15 dias)*	4,4		2,7	sim
6 (15 dias)*		1,0	2,7	sim
Fase 2 – luz por 30 dias				
1	-	1,0	2,7	-
2	4,4	-	2,7	-
3	4,4	-	0,5	-
4	2,2	-	2,7	-
5	-	1,0	2,7	-
6	-	0,5	0,5	-
Fase 3 – luz por 30 dias				
1	-	1,0	2,7	-
2	4,4	-	2,7	-
3	4,4	-	0,5	-
4	2,2	-	2,7	-
5	-	1,0	2,7	-
6	-	1,0	0,5	-

\* tratamentos onde foi realizado subcultivo na fase 1 após 15 dias para novo meio de cultura.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado em esquema fatorial, considerando-se como fator 1 os genótipos, e como fator 2, os fitorreguladores, com 4 repetições por tratamento, considerando-se a placa de Petri como unidade experimental com 4 explantes cada. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de Duncan ao nível de 5% de significância para a comparação das médias dos tratamentos

### 3.2.4 Multiplicação, enraizamento *in vitro* e aclimatização de brotações de *E. camaldulensis*

Previamente ao estabelecimento do ensaio de multiplicação, dois clones (05 e 20) micropropagados em meio MS completo suplementado com 3% de sacarose, 0,7% de ágar (Vetec®) e 1,3 µM de BAP, subcultivados a cada 20 dias foram selecionados em função da superioridade na multiplicação e vigor *in vitro*. Destes foram isolados explantes constituídos de duas brotações cada com aproximadamente 0,5 cm de altura e inoculados verticalmente em frasco de 200 mL contendo 25 mL de meio de cultura de diferentes composições conforme os tratamentos:

- 1 – Meio MS completo + 1,3 µM de BAP
- 2 – Meio MS completo + 2,2 µM de BAP
- 3 – Meio B5 completo + 1,3 µM de BAP
- 4 – Meio B5 completo + 2,2 µM de BAP
- 5 – Meio MS básico + tiamina 1,0 mg L<sup>-1</sup> + 2,64 µM de BAP + 0,5 µM de ANA

Todos os meios de cultura foram suplementados com 3% de sacarose e 0,7% de ágar (Vetec®). Ao final de 20 dias foram realizadas avaliações e repicagens para nova subcultura, onde o explante foi isolado como no início do ensaio e subcultivado em mesmo tratamento.

Após três subculturas, as brotações foram individualizadas e transferidas para frascos contendo 25 mL de meio MS/2 suplementado com 3% de sacarose, 0,2% de carvão ativado e 0,7% de ágar (Vetec®) para a indução ao enraizamento *in vitro*. Após 30 dias, os frascos contendo plântulas enraizadas foram abertos e mantidos em sala de crescimento por 48 horas visando diminuir a umidade do ar no interior do frasco. Após a fase de pré-aclimatização, as raízes das plântulas com pelo menos 1,5 cm de altura foram limpas e transferidas para tubetes com substrato composto de vermiculita e terra (1:1) e mantidas em casa-de-vegetação com nebulização intermitente por 5 segundos a cada 15 minutos por 15-20 dias.

O delineamento experimental utilizado no ensaio de multiplicação foi inteiramente casualizado com 5 repetições por tratamento, considerando-se o frasco como unidade experimental com 4 explantes cada. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de Duncan a 5% de significância para a comparação das médias dos tratamentos.

### 3.2.5 Avaliação e análise dos dados

Para os experimentos de organogênese, aos 60 dias (ensaios com cotilédones) e 90 ou 120 dias (ensaios com folhas) foram avaliadas as seguintes variáveis: porcentagem de explantes formando calos com e sem gemas, número de brotações por calo e porcentagem de explantes oxidados. Para o ensaio de multiplicação clonal, foram avaliados ao final de cada subcultura, o número de brotações e porcentagem de sobrevivência de plântulas aclimatadas. Os resultados foram transformados e analisados conforme detalhado em cada ensaio.

### 3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.3.1. Estudo da eficiência da regeneração indireta de *E. camaldulensis*

##### 3.3.1.1 Organogênese indireta a partir de cotilédones

A resposta morfogênica inicial observada nos ensaios com cotilédones foi o intumescimento dos explantes após 7-10 dias de cultivo *in vitro*. Da mesma maneira como relatado por AZMI et al. (1997), para *Eucalyptus globulus*, e DIBAX et al. (2005), para *E. camaldulensis*, após o intumescimento, geralmente seguiu-se a formação dos calos e gemas a partir das camadas periféricas das protuberâncias próximo às bordas e base do pecíolo, local do corte para o isolamento do explante. Em alguns explantes, a regeneração se desenvolveu em pontos com múltiplas gemas adventícias próximas umas das outras, que, devido ao reduzido tamanho não foram contabilizadas.

##### 3.3.1.1.1 Ensaio 1

Na Tabela 9 estão apresentados os resultados obtidos quanto à influência de diferentes meios de cultura na organogênese indireta de *E. camaldulensis*, com diferença significativa entre os tratamentos somente para a variável porcentagem de calos com gemas onde os meios de cultura MS e WPM (tratamento 1 e 2, respectivamente) foram superiores ao meio JADS (tratamento 3).

Apesar da análise estatística não ter detectado diferença significativa nos demais parâmetros avaliados, observou-se que quanto maior a morte de explantes devido à oxidação, menor foi o número de brotações regeneradas dentre os tratamentos avaliados. Este fato pode, em parte, ser explicado pela influência que a oxidação exerce sobre a capacidade de regeneração do tecido vegetal, visto que este processo pode ocorrer em todo o explante ou em regiões que contenham células competentes e principalmente nas extremidades dos explantes, regiões observadas como preferenciais para a formação de gemas (Figura 2).

TABELA 9 – Efeito dos meios de cultura MS, WPM e JADS suplementados com 4,4  $\mu\text{M}$  de BAP e 2,7  $\mu\text{M}$  de ANA sobre a organogênese indireta de explantes cotiledonares de *E. camaldulensis*, aos 60 dias de cultivo.

Meio	Calogênese (%)	Calo com gema (%)	Nº broto calo <sup>-1</sup>	Oxidação (%)
MS	37,5 ns	57,5 a	4,8 ns	5,0 ns
WPM	42,5 ns	55,0 a	4,2 ns	2,5 ns
JADS	55,0 ns	35,0 b	3,5 ns	10,0 ns

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Duncan ( $p \leq 0,05$ )



FIGURA 2 – Aspecto da oxidação de explantes cotiledonares de *E. camaldulensis*.

PASQUAL et al. (1997) e ANDERSONE e IEVINSH (2002) explicam que este processo oxidativo ocorre pela presença de elevados teores dos micronutrientes cobre e ferro no meio de cultura que favorecem a liberação de algumas enzimas pelos tecidos lesados, tais como a peroxidase, a polifenoloxidase, a fenolase e a tirosinase. Ao relacionar esta informação com os meios de cultura utilizados no presente trabalho, verificou-se que o meio JADS (Anexo 1) apresenta em sua composição teores de ferro e cobre superiores aos demais tratamentos, podendo teste fator ter influenciado a oxidação obtida (10%).

O aspecto morfológico da regeneração em todos os tratamentos foi marcadamente diferenciado, conforme apresentado na Figura 3, onde se pode observar que o meio JADS favoreceu a formação de brotações de coloração verde escura com hiperhidricidade e tamanho reduzido, enquanto que no meio MS as brotações formadas foram maiores em relação ao WPM.





FIGURA 3 – Aspectos da resposta organogênica de explantes cotiledonares de *E. camaldulensis* a distintos meios de cultura suplementados com 4,4  $\mu\text{M}$  de BAP e 2,7  $\mu\text{M}$  de ANA, após 60 dias de cultivo. 1 - Meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), 2 - Meio WPM (LLOYD e Mc COWN, 1980) e 3 - Meio JADS (CORREIA, 1993). Barra = 1,0 cm.

O caráter morfológico das brotações formadas em meio JADS com características de hiperhidricidade, ou seja, coloração verde escura e aspecto quebradiço e brilhante, também foi observado por FERNANDO (2005) em regenerantes de *Passiflora edulis* Sims. *f. flavicarpa* via organogênese indireta em meio MS. Tais sintomas podem ser ocasionados tanto pelas concentrações dos elementos do meio de cultivo, como pela concentração e tipo de agente geleificante, altas concentrações de reguladores vegetais, baixa intensidade luminosa, genótipo e elevada umidade (DAGUIN e LETOUZÉ, 1986; GRIBBLE et al., 1996; BACHETTINI, 2000). O meio de cultura JADS, desenvolvido para *E. grandis* (CORREIA, 1993), tem na sua composição menor concentração de íons potássio, o que também poderia ter influenciado os processos metabólicos da planta, visto sua função predominantemente osmótica. Também estes íons, por serem altamente translocável na planta contribuem no fluxo de outros minerais e na translocação de fotossintatos, levando a uma menor taxa de absorção de fosfato e na hiperhidricidade do tecido regenerado (PASQUALETTO et al., 1988, RAMAGE e WILLIAMS, 2002).

Além disso, os meios testados apresentam diferenças entre si basicamente pela elevada concentração de nitrogênio total e potássio e baixo nível do fosfato nos meios MS e JADS e pela baixa concentração total dos íons no meio WPM. Apesar de que a formulação mais apropriada de meio de cultura pode variar dentro de uma mesma espécie, devido às exigências quanto à concentração dos sais no meio, segundo GEORGE (1993) e RADICE (2004) o meio MS é o mais indicado e amplamente utilizado para a indução dos processos

morfogênicos da organogênese indireta de dicotiledôneas, devido à maior concentração de  $\text{NO}_3$  e  $\text{NH}_4$  e proporção entre estas formas de nitrogênio.

De maneira geral, os dados estatísticos aqui apresentados, juntamente com as observações visuais, indicaram a superioridade dos meios MS e WPM na calogênese e regeneração da espécie. Neste sentido, nas condições desenvolvidas neste experimento, os meios MS e WPM são mais indicados para a organogênese indireta a partir de explantes cotiledonares de *E. camaldulensis* pela qualidade da regeneração obtida.

### 3.3.1.1.2 Ensaio 2

Neste ensaio, de acordo com a análise dos dados, houve diferença estatística significativa na organogênese de explantes cotiledonares de *E. camaldulensis* pelo teste de Duncan ( $p \leq 0,05$ ), conforme resultados apresentados na Tabela 10.

TABELA 10 – Efeito de diferentes citocininas e da água de coco em meio MS N/2 suplementado com ANA sobre o desenvolvimento organogênico de cotilédones de *E. camaldulensis*, ao final de 60 dias de cultivo.

Tratamento	Calogênese (%)	Calo com gema (%)	Nº broto calo <sup>-1</sup>	Oxidação (%)
1 - BAP 4,4 µM + ANA 2,7 µM	30,0 c	70,0 a	4,3 bc	0,0 b
2 - BAP 4,4 µM + ANA 2,7 µM + AC 10%	25,0 c	50,0 a	6,2 a	25,0 ab
3 - BAP 2,2 µM + ANA 2,7 µM	10,0 c	40,0 ab	5,0 ab	50,0 a
4 - BAP 2,2 µM + ANA 2,7 µM + AC 10%	30,0 c	70,0 a	4,1 bc	0,0 b
5 - TDZ 4,5 µM + ANA 2,7 µM	100,0 a	0,0 b	0,0 c	0,0 b
6 - TDZ 4,5 µM + ANA 2,7 µM + AC 10%	100,0 a	0,0 b	0,0 c	0,0 b
7 - TDZ 9,0 µM + ANA 2,7 µM	95,0 a	0,0 b	0,0 c	5,0 b
8 - TDZ 9,0 µM + ANA 2,7 µM + AC 10%	100,0 a	0,0 b	0,0 c	0,0 b
9 - CIN 4,7 µM + ANA 0,5 µM	25,0 bc	50,0 a	4,9 ab	25,0 ab
10 - CIN 4,7 µM + ANA 0,5 µM + AC 10%	65,0 b	35,0 ab	2,8 cd	0,0 b

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Duncan ( $p \leq 0,05$ ).

O maior número de brotos por explante cotiledonar ocorreu no tratamento 2 com 4,4 µM de BAP, 2,7 µM de ANA e 10% água de côco (v/v) com valor médio de 6,2 brotos/calor, mas não diferiu estatisticamente dos tratamentos 3 e 9. Nas condições deste tratamento, a adição da água de coco pode ter favorecido preferencialmente a produção de gemas, visto que a água de coco é considerada excelente fonte de vários

fatores do crescimento requeridos para induzir a morfogênese em culturas *in vitro*. KANTHARAJAH e DODD (1990) também verificaram efeito positivo da suplementação de água de coco em meio MS contendo 8,8  $\mu\text{M}$  de BAP com aumento significativo na produção de gemas de *Passiflora edulis*. De acordo com FERREIRA et al. (1998), esse efeito no crescimento e diferenciação em parte é explicado pela presença de compostos como a zeatina e zeatinaribosídeo e pelo fato de este aditivo ser rico em glicose e frutose, sais minerais, mioinositol, bem como nucleotídeos e outros compostos orgânicos.

Apesar de elevada produção de calos com gemas no tratamento 4 (70%) em comparação com o tratamento 2, a redução na concentração de BAP para 2,2  $\mu\text{M}$  não favoreceu o desenvolvimento das gemas em brotos. Considerando que a formação de brotações adventícias é regulada por uma interação entre auxinas e citocininas, o balanço entre estes fitorreguladores pode ter influenciado a diferenciação celular e organogênese, pois segundo PIERIK (1997) altos níveis de BAP são requeridos nesta fase.

O meio de cultura contendo cinetina a 4,7  $\mu\text{M}$  e 0,5  $\mu\text{M}$  de ANA (tratamento 9) por sua vez apresentou melhor desempenho na regeneração, formando 4,9 brotos por calo quando comparado ao tratamento 10, com mesmas concentrações destes fitorreguladores e água de coco (2,8 brotos/calos). Estas variações podem ser exemplificadas em relatos como de BANDYOPADHYAY e HAMILL (2000) que verificaram que a adição de 5-10% de água de coco ao meio de cultura (MS) não favoreceu a formação de calos e a regeneração de gemas em *Eucalyptus nitens* e *E. globulus* a partir de hipocótilos e cotilédones. DORNELAS e VIEIRA (1984) verificaram que o cultivo e regeneração de cotilédones de *Passiflora* foram otimizados com a utilização de água de coco, enquanto FERNANDO (2005) concluiu que meios de organogênese de *Passiflora edulis* Sims. *f. flavicarpa* pode ou não ser suplementados com água de coco.

Conforme pode ser observado na Figura 4, as concentrações de 4,5 e 9,0  $\mu\text{M}$  de TDZ (tratamentos 5 a 8) apresentaram efeito inibitório sobre a regeneração a partir de cotilédones, formando de 95 a 100% de calos. Este comportamento foi atribuído às elevadas concentrações de TDZ utilizadas, durante os 60 dias de cultura, pois segundo HUETTEMAN et al. (1993), o TDZ é uma substância com grande efeito de citocinina que estimula a formação de calos em explantes de espécies lenhosas, especialmente quando utilizada em concentração igual ou superior a 1,0  $\mu\text{M}$ , a custa do crescimento dos brotos. Diversos trabalhos relatam este efeito com diferentes concentrações de TDZ, como o de GRIBAUDDO e FRONDA (1991) na cultura *in vitro* de *Vitis vinifera* e de LE ROUX e VAN STADEN (1991) para *Eucalyptus saligna*, *E. smithii*, *E. macarthurii* e para o híbrido *E. macarthurii* x *E. grandis* cultivados em meio contendo 0,45 e 0,9  $\mu\text{M}$  de TDZ.

Os elevados índices de oxidação observados nos tratamentos 3, 2 e 9 não exerceram grande influência nas taxas de regeneração nestes meios de cultura.

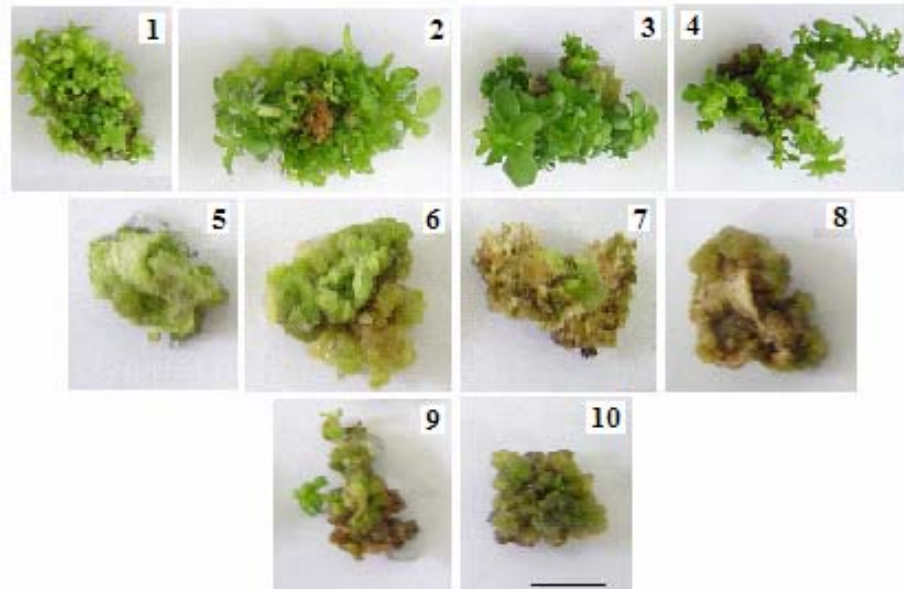


FIGURA 4 – Aspecto da organogênese indireta a partir de explantes cotiledonares de *E. camaldulensis* em meio MS N/2 (metade da concentração de nitratos de amônia e potássio de MS), com citocininas (BAP, TDZ e CIN), ANA e água de coco (10%), após 60 dias de cultura *in vitro*. Meio com BAP 4,4  $\mu\text{M}$  + ANA 2,7  $\mu\text{M}$  sem AC (1) e com AC (2); BAP 2,2  $\mu\text{M}$  + ANA 2,7  $\mu\text{M}$  sem AC (3) e com AC (4); TDZ 4,5  $\mu\text{M}$  + ANA 2,7  $\mu\text{M}$  sem AC (5) e com AC (6); TDZ 9,0  $\mu\text{M}$  + ANA 2,7  $\mu\text{M}$  sem AC (7) e com AC (8); CIN 4,7  $\mu\text{M}$  + ANA 0,5  $\mu\text{M}$  sem AC (9) e com AC (10). Barra = 1 cm.

### 3.3.1.1.3 Ensaio 3

Com exceção da porcentagem de oxidação, as demais variáveis analisadas neste experimento apresentaram diferença significativa a  $p \leq 0,05$ .

Com comportamento similar ao observado para o melhor tratamento 2 do ensaio anterior, o tratamento contendo 4,4  $\mu\text{M}$  de BAP, 2,7  $\mu\text{M}$  de ANA e 10% de AC apresentou média de regeneração superior aos demais meios de cultura, formando 5,1 brotações em 68% dos calos formados (Tabela 11). BRAVO (2005), avaliando a regeneração *in vitro* a partir de cotilédones de *E. camaldulensis*, obteve de 2,1 a 2,7 brotos/explante e porcentagens de regeneração próximas a 20% em diferentes concentrações de BAP e ANA. O mesmo autor atribuiu estes baixos valores de regeneração ao fato de serem estes tecidos

os mais determinados da plântula, por possuírem um curto período de vida e pela função de reserva que cumprem, limitando assim a sua capacidade de regeneração.

TABELA 11 – Efeito de combinações de fitorreguladores em meio MS/2 (metade da concentração de sais de MS) sobre o desenvolvimento organogênico de cotilédones de *E. camaldulensis*, após 60 dias de cultivo.

Tratamento	Calogênese (%)	Calo com gema (%)	Nº broto calo <sup>-1</sup>	Oxidação (%)
1 - BAP 4,4 µM + ANA 2,7 µM	60,0 b	36,0 b	3,0 b	4,0 ns
2 - BAP 4,4 µM + ANA 2,7 µM + AC 10%	24,0 c	68,0 a	5,1 a	8,0 ns
3 - CIN 4,6 µM + ANA 2,1 µM	72,0 b	20,0 b	1,2 c	8,0 ns
4 - BAP 1,0 µM + picloram 0,04 µM	100,0 a	0,0 c	0,0 c	0,0 ns
5 - BAP 1,1 µM + 2,4-D 7,5 µM	100,0 a	0,0 c	0,0 c	0,0 ns

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre sipelo teste de Duncan ( $p \leq 0,05$ )

As citocininas estimulam a divisão celular, sobretudo em combinação com uma auxina, sendo a 6-benzilaminopurina (BAP) a mais utilizada na organogênese *in vitro*, com intervalo de concentração de 0,44 a 80,0 µM para espécies arbóreas. A eficiência de regeneração diminui ou aumenta em função da espécie envolvida, podendo decrescer com o aumento da concentração e tempo de exposição.

SAAFI e BORTHAKUR (2002), testando a organogênese indireta de *Leucena leucocephala* na presença de BAP e 2,4-D observaram a formação de calos em hipocótilos, a morte de segmentos radiculares e tiveram sucesso na regeneração de brotações adventícias somente a partir de explantes cotiledonares. De outro lado, RAHIM et al. (2003) observaram que segmentos nodais de *E. camaldulensis* em meio MS contendo 2,2 µM de BAP e 4,5 µM de 2,4-D ou 4,7 µM de CIN, somente formaram calos, mas que a produção de brotos foi possível com o subcultivo destes calos para meio MS contendo 2,2 µM de BAP e 2,8 µM de AIA ou 4,4 µM de BAP e 2,7 µM de ANA. ILAHI e JABEEN (1987), ao contrário, obtiveram elevada frequência de múltiplas brotações a partir de segmentos nodais de *Eucalyptus tereticornis* em meio MS suplementado com 4,4 µM de BAP e 4,7 µM de CIN.

Na presença de BAP com Picloram ou 2,4-D (Tabela 11, tratamentos 4 e 5) não houve regeneração de gemas nas concentrações testadas, indicando que o uso destas combinações não tem efeito no processo organogênico da espécie a partir de cotilédones (Figura 5). Segundo GEORGE (1993), as auxinas são geralmente requeridas no processo de indução de calos nos explantes, sendo o 2,4-D frequentemente empregado em níveis

entre 4,5 e 13 mM na fase de indução, além do Picloram. No entanto, a manutenção destes fitorreguladores por 60 dias no meio de cultivo pode ter apenas promovido a produção de calos, indicando a necessidade da transferência destes tecidos, aos 30 dias, para meio com outra auxina ou concentração reduzida do mesmo regulador (2,4-D e Picloram), ou até mesmo sem auxina.

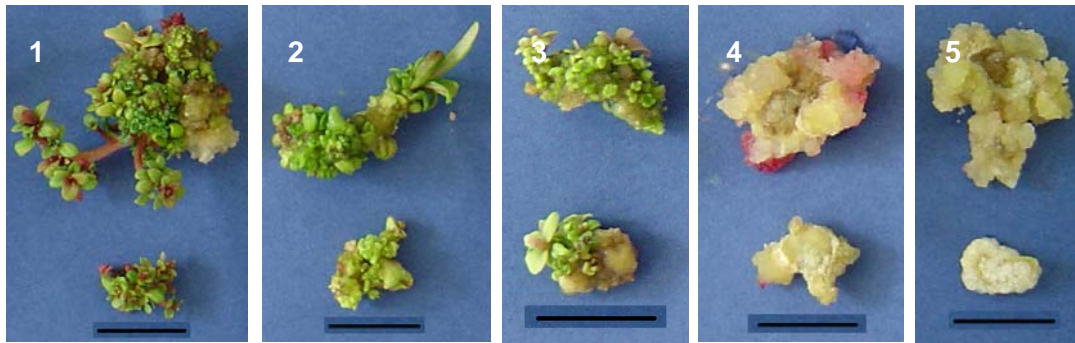


FIGURA 5 – Organogênese a partir de explantes cotiledonares de *E. camaldulensis* após 60 dias de cultivo em meio MS/2 suplementado com: 1 - BAP 4,4  $\mu\text{M}$  + ANA 2,7  $\mu\text{M}$ ; 2 - BAP 4,4  $\mu\text{M}$  + ANA 2,7  $\mu\text{M}$  + AC 10%; 3 - CIN 4,6  $\mu\text{M}$  + ANA 2,1  $\mu\text{M}$ ; 4 - BAP 1,0  $\mu\text{M}$  + picloram 0,04  $\mu\text{M}$  e 5 - BAP 1,1  $\mu\text{M}$  + 2,4-D 7,5  $\mu\text{M}$ . Barra = 1,0 cm.

Os resultados apresentados por esta e outras pesquisas comentadas demonstraram diferença nos potenciais de regeneração dos tecidos na presença de citocininas e auxinas. PERES (2002) afirma que a presença de fitorreguladores na cultura de tecidos é essencial para a morfogênese *in vitro* por meio da regulação da interação e balanço entre os fitorreguladores exógenos e hormônios naturais da planta. PIERIK (1997), por sua vez, indica que o modo de interação entre auxinas e citocininas é frequentemente dependente da espécie da planta e do tipo de tecido utilizado na cultura, reforçando ainda que a escolha dos fitorreguladores constitui a primeira fase a ser abordada para a definição da melhor condição para a organogênese indireta de órgãos e tecidos vegetais.

A capacidade regenerativa apresentada pelo explante cotiledonar de *E. camaldulensis*, entretanto, foi inibida principalmente em presença das auxinas 2,4-D e picloram testadas combinadas com CIN e BAP e favorecida pela combinação BAP-ANA.

### 3.3.1.2 Organogênese indireta a partir de explantes foliares

#### 3.3.1.2.1 Ensaio 4

Conforme apresentado na Tabela 12, a regeneração a partir do tecido foliar ocorreu somente nos tratamentos 1, 3, 4 e 6. Os melhores resultados foram obtido nos tratamentos 4, 3 e 6, produzindo 3,0; 4 e 0,8 brotos/calco, respectivamente.

TABELA 12 – Influência de fitorreguladores adicionados ao meio de cultura MS N/2 na capacidade regenerativa de explantes foliares de *E. camaldulensis*, após 60 dias de cultivo.

Tratamento	Fase e fitorregulador ( $\mu\text{M}$ )	Calogênese (%)	Calo com gema (%)	Nº broto calo <sup>-1</sup>	Oxidação (%)
1	1 - BAP (4,4) + ANA (2,7) 2 - BAP (4,4) + ANA (0,5)	90,0 ab	10,0 ab	0,5 b	0,0 ns
2	1 - BAP (4,4) + ANA (2,7) + AC 2 - BAP (4,4) + ANA (0,5) + AC	100,0 a	0,0 b	0,0 b	0,0 ns
3	1 - BAP (2,2) + ANA (2,7) 2 - BAP (2,2) + ANA (0,05)	80,0 ab	20,0 ab	2,4 ab	0,0 ns
4	1 - BAP (2,2) + ANA (2,7) + AC 2 - BAP (2,2) + ANA (0,05) + AC	80,0 ab	20,0 ab	3,0 a	0,0 ns
5	1 - TDZ (1) + ANA (2,7) 2 - TDZ (1) + ANA (0,5)	100,0 a	0,0 b	0,0 b	0,0 ns
6	1 - TDZ (1) + ANA (2,7) + AC 2 - TDZ (1) + ANA (0,5) + AC	65,0 b	35,0 a	0,8 ab	0,0 ns
7	1 - TDZ (2) + ANA (2,7) 2 - TDZ (2) + ANA (0,5)	100,0 a	0,0 b	0,0 b	0,0 ns
8	1 - TDZ (2) + ANA (2,7) + AC 2 - TDZ (2) + ANA (0,5) + AC	100,0 a	0,0 b	0,0 b	0,0 ns
9	1 - CIN (4,7) + ANA (0,5) 2 - CIN (4,7) + ANA (0,05)	100,0 a	0,0 b	0,0 b	0,0 ns
10	1 - CIN (4,7) + ANA (0,5) + AC 2 - CIN (4,7) + ANA (0,05) + AC	100,0 a	0,0 b	0,0 b	0,0 ns

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Duncan ( $p \leq 0,05$ )

Estes resultados demonstram que variações na metodologia podem induzir diferentes respostas do tecido vegetal, visto o comportamento distinto do explante foliar quando comparado ao cotiledonar cultivado em mesmo meio de cultura, como discutido anteriormente. ASSAREH e HENNERTY (1998) em estudo com *E. camaldulensis*, também verificaram que a calogênese e a morfologia de brotações obtidas foi influenciada pela composição genética, tipo de explante e composição de meios de cultura.

Nos meios com TDZ, as concentrações deste fitorregulador e o tempo de aplicação na cultura, podem ter inibido o processo de diferenciação e, conseqüentemente, a determinação celular (Figura 6, tratamentos 5, 6, 7, 8, 9 e 10). Segundo GEORGE (1983), este processo pode resultar no desenvolvimento de estruturas diferentes ao desejado, como, por exemplo, calos incapazes de regenerar brotações. Segundo HUETTEMAN e PREECE (1993), o aumento na concentração de TDZ tende a estimular a formação de calos à custa de crescimento de brotos.

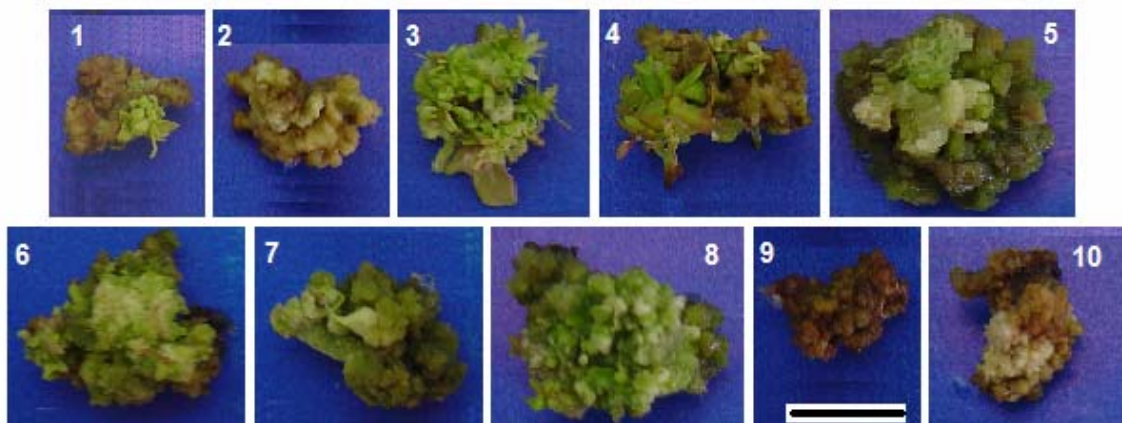


FIGURA 6 – Tratamentos para a indução da calogênese e regeneração em explantes foliares de *E. camaldulensis* em meio MS N/2, após 60 dias de cultivo (30 dias para cada subcultivo – fase 1 e 2). Meio sem água de côco (Tratamento 1) e com AC a 10% (Tratamento 2), suplementados na fase 1 com BAP 4,4  $\mu$ M + ANA 2,7  $\mu$ M e na fase 2 com BAP 4,4  $\mu$ M + ANA 0,5  $\mu$ M; Meio sem água de côco (Tratamento 3) e com AC a 10% (Tratamento 4), suplementados na fase 1 com BAP 2,2  $\mu$ M + ANA 2,7  $\mu$ M e na fase 2 com BAP 2,2  $\mu$ M + ANA 0,05  $\mu$ M; Meio sem água de côco (Tratamento 5) e com AC a 10% (Tratamento 6), suplementados na fase 1 com TDZ 1,0  $\mu$ M + ANA 2,7  $\mu$ M e na fase 2 com TDZ 1,0  $\mu$ M + ANA 0,5  $\mu$ M; Meio sem água de côco (Tratamento 7) e com AC a 10% (Tratamento 8), suplementados na fase 1 com TDZ 2,0  $\mu$ M + ANA 2,7  $\mu$ M e na fase 2 com TDZ 2,0  $\mu$ M + ANA 0,5  $\mu$ M; Meio sem água de côco (Tratamento 9) e com AC a 10% (Tratamento 10), suplementados na fase 1 com CIN 4,7  $\mu$ M + ANA 0,5  $\mu$ M e na fase 2 com CIN 4,7  $\mu$ M + ANA 0,05  $\mu$ M. Barra = 1,0 cm.

Segundo LU (1993), em certas espécies o TDZ estimula a divisão celular e, conseqüentemente, o crescimento de calos dependentes de citocininas, e algumas evidências indicam que possa ter atividade auxínica ou estar envolvido no metabolismo de auxinas. Em clones do híbrido *Eucalyptus grandis* x *E. tereticornis*, as concentrações de 0,45 e 4,5  $\mu$ M de TDZ foram inibitórias ao processo de multiplicação de gemas, favorecendo



a formação de calo e hiperhidricidade (LIMA e GONÇALVES, 1998), processo também verificado neste ensaio (Figura 6), com calos com massa celular não friável e vitrificados.

Diferentemente do comportamento apresentado pelo explante cotiledonar no ensaio 2, os meios dos tratamentos 9 e 10 deste ensaio com explante foliar não favoreceram a regeneração de brotações, formando calos rígidos e escurecidos (Figura 6). Possivelmente, esta resposta deve-se à combinação dos fitorreguladores utilizada, pois segundo CALDAS et al. (1998), a cinetina favorece mais o crescimento de brotos do que a indução de gemas adventícias.

#### 3.3.1.2.2 Ensaio 5

Os meios de cultura e fases de crescimento utilizados neste experimento foram adaptados de TOURNIER et al. (2003). Os resultados da Tabela 13 mostram a baixa regeneração obtida em todos os tratamentos, sem diferença significativa entre os valores.

Nos tratamentos com maiores concentrações de citocininas e 2,4-D (tratamentos 5 e 6) houve 25 e 15% de oxidação, respectivamente. Estes tratamentos se diferenciam dos demais pela presença de maior concentração de TDZ (2,0  $\mu$ M) no segundo subcultivo. Elevados índices de oxidação e baixa regeneração também foram observados por RODRIGUES (2000) em discos foliares de *Theobroma grandiflorum* em meio MS suplementado com 4,5  $\mu$ M de TDZ.

TABELA 13 – Influência do meio MS modificado – MST (TOURNIER et al., 2003) e fitorreguladores na capacidade regenerativa de explantes foliares de *E.camaldulensis*, após 90 dias de cultivo.

Tratamento	Fase e fitorregulador ( $\mu\text{M}$ )	Calogênese (%)	Calo com gema (%)	Nº broto calo <sup>-1</sup>	Oxidação (%)
1	1 - BAP (1) + 2,4-D (0,5) 2 - TDZ (1) + ANA (0,5) + AC 3 - BAP (2) + ANA (0,5) + AC 4 - BAP (4,4) + ANA (2,7)	80,0 ns	20,0 ns	0,7 ns	0,0 b
2	1 - BAP (1) + 2,4-D (2,3) 2 - TDZ (1) + ANA (0,5) + AC 3 - BAP (2) + ANA (0,5) + AC 4 - BAP (4,4) + ANA (2,7)	80,0 ns	20,0 ns	0,1 ns	0,0 b
3	1 - BAP (1) + 2,4-D (4,5) 2 - TDZ (1) + ANA (0,5) + AC 3 - BAP (2) + ANA (0,5) + AC 4 - BAP (4,4) + ANA (2,7)	85,0 ns	15,0 ns	0,9 ns	0,0 b
4	1 - BAP (2) + 2,4-D (0,5) 2 - TDZ (1) + ANA (0,5) + AC 3 - BAP (2) + ANA (0,5) + AC 4 - BAP (4,4) + ANA (2,7)	75,0 ns	25,0 ns	0,6 ns	0,0 b
5	1 - BAP (2) + 2,4-D (2,3) 2 - TDZ (2) + ANA (0,5) + AC 3 - BAP (2) + ANA (0,5) + AC 4 - BAP (4,4) + ANA (2,7)	50,0 ns	25,0 ns	0,9 ns	25,0 a
6	1 - BAP (2) + 2,4-D (4,5) 2 - TDZ (2) + ANA (0,5) + AC 3 - BAP (2) + ANA (0,5) + AC 4 - BAP (4,4) + ANA (2,7)	75,0 ns	10,0 ns	0,8 ns	15,0 a

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre sipelo teste de Duncan ( $p \leq 0,05$ )

### 3.3.1.2.3 Ensaio 6

Apesar de apresentar 9% de calos regenerando gemas, o meio de cultura contendo TDZ em concentrações medianas nas fases iniciais de cultura (tratamento 5) não proporcionou uma maior produção de regenerantes (Tabela 14). As médias de brotações formadas não diferiram significativamente entre si e, como no Ensaio 5, certas concentrações e períodos de exposição aos fitorreguladores podem ter influenciado negativamente a capacidade organogênica do explante.

A alta intensidade de calos formados (Figura 7) foi resultado do estímulo do TDZ, visto este fato ocorrer com frequência quando usado em concentrações iguais ou superiores a 1  $\mu\text{M}$  em explantes lenhosos (HUETTEMAN e PREECE, 1993).

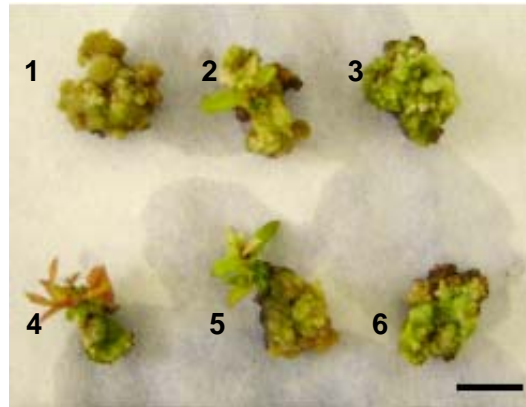


FIGURA 7 – Calogênese e regeneração em explantes foliares de *E. camaldulensis* após 120 dias de cultivo em meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962). 1 - TDZ 1,0  $\mu\text{M}$  + ANA 0,5  $\mu\text{M}$  + AC (fase 1), TDZ 1,0  $\mu\text{M}$  + ANA 0,27  $\mu\text{M}$  + AC (fase 2) e BAP 2,2  $\mu\text{M}$  + ANA 0,27  $\mu\text{M}$  + AC (fase 3); 2 - TDZ 2,0  $\mu\text{M}$  + ANA 0,5  $\mu\text{M}$  + AC (fase 1), TDZ 2,0  $\mu\text{M}$  + ANA 0,27  $\mu\text{M}$  + AC (fase 2) e BAP 2,2  $\mu\text{M}$  + ANA 0,27  $\mu\text{M}$  + AC (fase 3); 3 - TDZ 3,0  $\mu\text{M}$  + ANA 0,5  $\mu\text{M}$  + AC (fase 1), TDZ 3,0  $\mu\text{M}$  + ANA 0,27  $\mu\text{M}$  + AC (fase 2) e BAP 2,2  $\mu\text{M}$  + ANA 0,27  $\mu\text{M}$  + AC; 4 - TDZ 1,0  $\mu\text{M}$  + ANA 2,7  $\mu\text{M}$  + AC (fase 1), TDZ 1,0  $\mu\text{M}$  + ANA 0,27  $\mu\text{M}$  + AC (fase 2) e BAP 2,2  $\mu\text{M}$  + ANA 0,27  $\mu\text{M}$  + AC (fase 3); 5 - TDZ 2,0  $\mu\text{M}$  + ANA 2,7  $\mu\text{M}$  + AC (fase 1), TDZ 2,0  $\mu\text{M}$  + ANA 0,27  $\mu\text{M}$  + AC (fase 2) e BAP 2,2  $\mu\text{M}$  + ANA 0,27  $\mu\text{M}$  + AC (fase 3); TDZ 3,0  $\mu\text{M}$  + ANA 2,7  $\mu\text{M}$  + AC (fase 1), TDZ 3,0  $\mu\text{M}$  + ANA 0,27  $\mu\text{M}$  + AC (fase 2) e BAP 2,2  $\mu\text{M}$  + ANA 0,27  $\mu\text{M}$  + AC (fase 3). Fase 1 – 20 dias no escuro, fase 2 – 10 dias em sombrite 50% e 23 dias na luz, fase 3 – luz até 120º dia. Barra = 1,0 cm.

TABELA 14 – Influência do meio de cultura MS completo (MURASHIGE e SKOOG, 1962) e fitorreguladores na capacidade regenerativa de explantes foliares de *E. camaldulensis*, após 120 dias de cultivo.

Tratamento	Fase e fitorregulador ( $\mu\text{M}$ )	Calogênese (%)	Calo com gema (%)	Nº broto calo <sup>-1</sup>	Oxidação (%)
1	1 - TDZ (1) + ANA (0,5) + AC 2 - TDZ (1) + ANA (0,27) + AC 3 - BAP (2,2) + ANA (0,27)	94,0 ab	2,0 b	0,1 ns	4,0 ns
2	1 - TDZ (2) + ANA (0,5) + AC 2 - TDZ (2) + ANA (0,27) + AC 3 - BAP (2,2) + ANA (0,27)	97,0 a	3,0 ab	0,2 ns	0,0 ns
3	1 - TDZ (3) + ANA (0,5) + AC 2 - TDZ (3) + ANA (0,27) + AC 3 - BAP (2,2) + ANA (0,27) + AC	96,0 a	4,0 ab	0,3 ns	0,0 ns
4	1 - TDZ (1) + ANA (2,7) + AC 2 - TDZ (1) + ANA (0,27) + AC 3 - BAP (2,2) + ANA (0,27)	93,0 ab	5,0 ab	0,3 ns	2,0 ns
5	1 - TDZ (2) + ANA (2,7) + AC 2 - TDZ (2) + ANA (0,27) + AC 3 - BAP (2,2) + ANA (0,27)	91,0 ab	9,0 a	0,5 ns	0,0 ns
6	1 - TDZ (3) + ANA (2,7) + AC 2 - TDZ (3) + ANA (0,27) + AC 3 - BAP (2,2) + ANA (0,27)	88,0 b	8,0 ab	0,4 ns	4,0 ns

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Duncan ( $p \leq 0,05$ )

## 3.3.1.2.4 Ensaio 7

Os resultados apresentados na Tabela 15 demonstraram que, em meio de cultura B5, os fitorreguladores BAP, TDZ, ANA e 2,4-D nas concentrações testadas, não foram capazes de induzir os mecanismos envolvidos na aquisição de competência no tecido foliar, com respostas quase nulas aos estímulos hormonais.

A oxidação foi superior nos explantes cultivados nos meios que continham a BAP combinada com ANA, principalmente na fase inicial da organogênese (tratamento 5) e quando sucessivo ao 2,4-D (tratamento 8). Entretanto, o processo oxidativo não foi observado nos tratamentos com ANA a 0,5 µM combinado com BAP (tratamentos 1 e 2) e com TDZ (tratamentos 6 e 7). Segundo MOK et al. (1987) o TDZ é resistente às oxidases, sendo estável e biologicamente ativo em concentrações menores que as demais citocininas.

TABELA 15 – Influência do meio B5 (GAMBORG et al., 1968) e fitorreguladores na capacidade regenerativa de explantes foliares de *E. camaldulensis*, após 60 dias de cultivo.

Tratamento	Fase e fitorregulador (µM)	Calogênese (%)	Calo com gema (%)	Nº broto calo <sup>-1</sup>	Oxidação (%)	
1	1 - BAP (2,2) + 2,4-D (0,5) 2, 3 e 4 - BAP (2,2) + ANA (0,5)	100,0	a	0,0 ns	0,0 ns	0,0 c
2	1 - BAP (2,2) + 2,4-D (2,3) 2, 3 e 4 - BAP (2,2) + ANA (0,5)	100,0	a	0,0 ns	0,0 ns	0,0 c
3	1 - BAP (2,2) + 2,4-D (4,5) 2, 3 e 4 - BAP (2,2) + ANA (0,5)	96,0	ab	2,0 ns	0,1 ns	2,0 bc
4	1 e 2 - BAP (2,2) + ANA (7,5) 3 - BAP (2,2) + ANA (0,05) 4 - BAP (2,2) + ANA (0,5)	98,0	a	0,0 ns	0,0 ns	2,0 bc
5	1 e 2 - BAP (2,2) + ANA (2,7) 3 e 4 - BAP (2,2) + ANA (0,5)	90,0	bc	0,0 ns	0,0 ns	10,0 ab
6	1 e 2 - TDZ (2,3) + ANA (2,7) 3 - TDZ (2,3) + ANA (0,5) 4 - BAP (2,2) + ANA (0,5)	98,0	a	2,0 ns	0,0 ns	0,0 c
7	1 e 2 - TDZ (4,5) + ANA (2,7) 3 - TDZ (2,3) + ANA (0,5) 4 - BAP (2,2) + ANA (0,5)	100,0	a	0,0 ns	0,1 ns	0,0 c
8	1 - BAP (2,2) + 2,4-D (0,5) 2 e 3 - BAP (2,2) + ANA (2,7) 4 - BAP (2,2) + ANA (0,5)	88,0	c	0,0 ns	0,0 ns	12,0 a
9	1 - BAP (2,2) + 2,4-D (2,3) 2 e 3 - BAP (2,2) + ANA (2,7) 4 - BAP (2,2) + ANA (0,5)	96,0	ab	0,0 ns	0,0 ns	4,0 bc
10	1 - BAP (2,2) + 2,4-D (4,5) 2 e 3 - BAP (2,2) + ANA (2,7) 4 - BAP (2,2) + ANA (0,5)	96,0	ab	0,0 ns	0,0 ns	4,0 bc

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Duncan ( $p \leq 0,05$ )

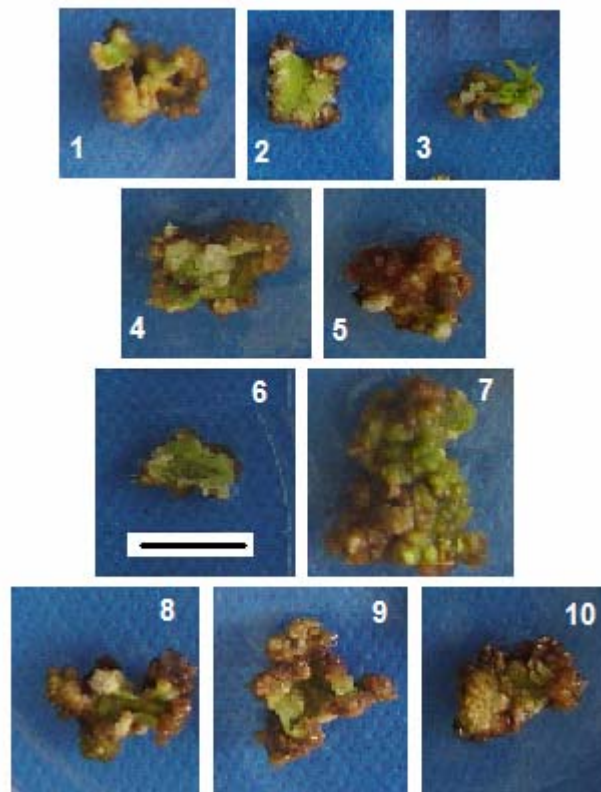


FIGURA 8 – Organogênese indireta de explantes foliares de *E. camaldulensis* em meio B5 (GAMBORG et al., 1968) suplementado com: 1 - BAP 2,2  $\mu$ M + 2,4-D 0,5  $\mu$ M (fase 1), BAP 2,2  $\mu$ M + ANA 0,5  $\mu$ M (fase 2, 3 e 4); 2 - BAP 2,2  $\mu$ M + 2,4-D 2,3  $\mu$ M (fase 1), BAP 2,2  $\mu$ M + ANA 0,5  $\mu$ M (fase 2, 3 e 4); 3 - BAP 2,2  $\mu$ M + 2,4-D 4,5  $\mu$ M (fase 1), BAP 2,2  $\mu$ M + ANA 0,5 (fase 2, 3 e 4); 4 - BAP 2,2  $\mu$ M + ANA 7,5  $\mu$ M (fase 1 e 2), BAP 2,2  $\mu$ M + ANA 0,05  $\mu$ M (fase 3), BAP 2,2  $\mu$ M + ANA 0,5  $\mu$ M (fase 4); 5 - BAP 2,2  $\mu$ M + ANA 2,7  $\mu$ M (fase 1 e 2), BAP 2,2  $\mu$ M + ANA 0,5  $\mu$ M (fase 3 e 4); 6 - TDZ 2,3  $\mu$ M + ANA 2,7  $\mu$ M (fase 1 e 2), TDZ 2,3  $\mu$ M + ANA 0,5  $\mu$ M (fase 3), BAP 2,2  $\mu$ M + ANA 0,5  $\mu$ M (fase 4); 7 - TDZ 4,5  $\mu$ M + ANA 2,7  $\mu$ M (fase 1 e 2), TDZ 2,3  $\mu$ M + ANA 0,5  $\mu$ M (fase 3), BAP 2,2  $\mu$ M + ANA 0,5  $\mu$ M (fase 4); 8 - BAP 2,2  $\mu$ M + 2,4-D 0,5  $\mu$ M (fase 1), BAP 2,2  $\mu$ M + ANA 2,7  $\mu$ M (fase 2 e 3), BAP 2,2  $\mu$ M + ANA 0,5  $\mu$ M (fase 4); 9 - BAP 2,2  $\mu$ M + 2,4-D 2,3  $\mu$ M (fase 1), BAP 2,2  $\mu$ M + ANA 2,7  $\mu$ M (fase 2 e 3), BAP 2,2  $\mu$ M + ANA 0,5  $\mu$ M (fase 4); 10 - BAP 2,2  $\mu$ M + 2,4-D 4,5  $\mu$ M, BAP 2,2  $\mu$ M + ANA 2,7  $\mu$ M (fase 2 e 3), BAP 2,2  $\mu$ M + ANA 0,5  $\mu$ M (fase 4). Fase 1 – 4 dias no escuro, fase 2 – 15 dias no escuro e sombrite 50% por 10 dias, fase 3 e 4 – luz por 30 dias. Barra = 1,0 cm.

### 3.3.1.2.5 Ensaio 8

Para as interações entre os fatores meio de cultura e segmentos do explante foliar (Tabela 16) ocorreram diferenças significativas a 5 % de probabilidade pelo teste de Duncan para as variáveis porcentagem de calos formando gemas e número de brotos por calo, sendo que o tratamento 11 foi superior aos demais e o tratamento 8 apresentou maior porcentagem de explantes oxidados. Entre os dois tipos de segmento foliar, somente a porcentagem de calos com gemas apresentou diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre as médias obtidas, 3,2% e 6,8% para ápice e base, respectivamente. Com relação ao efeito isolado da porção do explante utilizada, destaca-se o segmento basal da folha que foi mais responsivo que a parte apical, diferindo significativamente entre si na porcentagem de calos responsivos.

Os resultados nulos quanto à regeneração foram obtidos na presença de BAP associada ao picloram e ao 2,4-D (tratamentos 2 e 3), e CIN e ANA (tratamento 9). Nos tratamentos 4 e 5, associação entre as citocininas (BAP ou TDZ) e o ANA, os explantes não responderam satisfatoriamente à transferência após 30 dias para meio com TDZ, sendo o BAP aplicado na fase de indução à competência e diferenciação em gemas. O período prolongado nesta condição pode ter levado à falha na determinação das células dos centros meristemáticos que passaram a desenvolver protuberâncias sem regeneração. Este fato também foi relatado em pesquisas com diversas espécies de *Passiflora* onde a presença do calo estava associada a baixa ou nenhuma formação de gemas (MONTEIRO et al., 2000; OTAHOLA, 2000; FERNADO, 2005). Segundo GAHAN et al. (2003), a exposição em excesso das células às citocininas leva à morte celular, fato que pode explicar a falha no desenvolvimento de algumas células ou explantes quando expostos por período prolongado ao BAP ou ao TDZ. Resultado semelhante foi encontrado por CABONI et al. (1999), que estudaram o efeito da fase de indução da regeneração de ápices de brotações de macieira. Estes autores observaram que prolongar o período de permanência dos explantes em meio MS com BAP e ANA por 30 dias não foi tão eficiente como manter os explantes por 20 dias neste mesmo meio. Já CUENCA et al. (2000) obtiveram regeneração de brotações a partir de segmentos nodais de *Fagus sylvatica* e de *Fagus orientalis*, mantendo-os durante 30 dias em meio de indução para posterior transferência.

Apesar dos resultados para formação de brotações não diferirem significativamente entre si, nos tratamentos com CIN e ANA (tratamentos 8 e 9), ambos tipos de segmentos apresentaram capacidade morfogenética muito baixa, podendo este resultado ter sido influenciado pela elevada concentração da cinetina aplicada. Entretanto, com a redução

desta concentração e substituição pelo BAP (tratamento 11) observou-se uma resposta positiva do segmento apical, o qual produziu média de 1,5 brotos por calo, e aumento na média do segmento basal. DONATO et al. (2001) observaram que a interação entre estes fitorreguladores favoreceu a regeneração de brotos de *Brassica oleraceae* em concentrações reduzidas de cinetina, enquanto RAHIM et al. (2003) observaram que explantes de *E. camaldulensis* em meio MS com BAP e CIN somente formaram calos, mas que a produção de brotos foi possível com o subcultivo destes calos para meio MS contendo BAP e ANA ou AIA.

TABELA 16 – Influência de combinações de fitorreguladores adicionados ao meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) e MS N/2 na capacidade regenerativa de segmentos foliares de *E. camaldulensis*, após 90 dias de cultivo.

Meio	Fase e fitorregulador ( $\mu\text{M}$ )	Calos com gema (%)			Nº broto calo <sup>-1</sup>			Oxidação (%)		
		Segmento foliar		Média	Segmento foliar		Média	Segmento foliar		Média
		Ápical	Basal		Ápical	Basal		Ápical	Basal	
1 - MS	1 - BAP (2,2) + picloram (0,04) 2 - BAP (4,4) + picloram (0,04) 3 - BAP (4,4) + 2,4-D (0,01)	0,0 b	5,0 ab	2,5 c	0,0 b	1,5 ns	0,8 ab	0,0 ns	0,0 ns	0,0 b
2 - MS	1 - BAP (2,2) + picloram (0,04) 2 - BAP (4,4) + picloram (0,04) 3 - BAP (4,4) + 2,4-D (0,01)	0,0 b	0,0 b	0,0 c	0,0 b	0,0 ns	0,0 b	0,0 ns	0,0 ns	0,0 b
3 - MS	1 - BAP (1,1)(2,2)** + picloram (0,04) 2 e 3 - BAP (4,4) + ANA (2,7)	0,0 b	0,0 b	0,0 c	0,0 b	0,0 ns	0,0 b	0,0 ns	0,0 ns	0,0 b
4 - MS	1 - TDZ (2,3) + ANA (2,7) 2 e 3 - BAP (2,2) + ANA (2,7)	0,0 b	5,0 ab	2,5 c	0,0 b	0,1 ns	0,04 b	0,0 ns	0,0 ns	0,0 b
5 - MS	1 - TDZ (5,4) + ANA (2,7) 2 - TDZ (5,4) + ANA (2,7) 3 - BAP (4,4) + ANA (2,7)	0,0 b	5,0 ab	2,5 c	0,0 b	0,4 ns	0,2 ab	0,0 ns	0,0 ns	0,0 b
6 - MS	1, 2 e 3 - BAP (2,2) + ANA (2,7)	5,0 ab	20,0 a	12,5 ab	0,5 b	0,9 ns	0,7 ab	5,0 ns	0,0 ns	2,5 ab
7 - MS N/2	1 e 2 - BAP (2,2) + ANA (2,7) 3 - BAP (4,4) + ANA (2,7)	5,0 ab	10,0 ab	7,5 bc	0,1 b	0,4 ns	0,3 ab	0,0 ns	0,0 ns	0,0 b
8 - MS N/2	1, 2 e 3 - CIN (4,7) + ANA (2,7)	5,0 ab	5,0 ab	5,0 bc	0,2 b	0,2 ns	0,2 b	5,0 ns	5,0 ns	5,0 a
9 - MS	1, 2 e 3 - CIN (4,7) + ANA (2,7)	0,0 ab	0,0 b	0,0 c	0,0 b	0,0 ns	0,0 b	0,0 ns	0,0 ns	0,0 b
10 - MS	1 - CIN (4,7) + ANA (2,7) 2 e 3 - BAP (4,4) + ANA (2,7)	5,0 ab	10,0 ab	7,5 abc	0,3 b	0,6 ns	0,4 ab	0,0 ns	0,0 ns	0,0 b
11 - MS	1 - CIN (2,3) + ANA (2,7) 2 e 3 - BAP (2,2) + ANA (2,7)	15,0 a	15,0 ab	15,0 a	1,5 a	0,8 ns	1,1 a	0,0 ns	0,0 ns	0,0 b
Média segmento <sup>-1</sup>		3,2 B	6,8 A		0,2 A	0,4 A		0,9 A	0,4 A	

Médias seguidas de mesma letra minúscula, na coluna, e por mesma letra maiúscula, na linha, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Duncan ( $p \leq 0,05$ ). Fase 1 – escuro/30 dias, fase 2 e 3 – luz/ 30 dias cada. \*\* o tratamento 3 foi mantido a 1,1  $\mu\text{M}$  BAP por 7 dias seguido de 23 dias em 2,2  $\mu\text{M}$  BAP.



## 3.3.1.2.6 Ensaio 9

Os resultados não apresentaram diferenças estatisticamente significativas quando avaliados isoladamente para todos os parâmetros, assim como as médias das interações (Tabela 17).

TABELA 17 – Influência de fitorreguladores adicionados ao meio B5 (GAMBORG et al., 1968) na capacidade regenerativa de segmentos foliares de *E. camaldulensis*, ao final de 120 dias de cultivo.

Tratamento	Calo com gema (%)			Nº broto calo <sup>-1</sup>			Oxidação (%)		
	Segmento foliar		Média	Segmento foliar		Média	Segmento foliar		Média
	Apical	Basal		Apical	Basal		Apical	Basal	
1	0,0 ns	10,0 ns	5,0 ns	0,0 ns	1,2 ns	0,7 ns	0,0 ns	0,0 ns	0,0 ns
2	0,0 ns	15,0 ns	7,5 ns	0,0 ns	1,0 ns	0,5 ns	0,0 ns	0,0 ns	0,0 ns
3	0,0 ns	0,0 ns	0,0 ns	0,0 ns	0,0 ns	0,0 ns	0,0 ns	0,0 ns	0,0 ns
4	0,0 ns	5,0 ns	2,5 ns	0,0 ns	0,4 ns	0,2 ns	0,0 ns	0,0 ns	0,0 ns
Média Segmento <sup>-1</sup>	0,0 B	7,5 A		0,0 B	0,7 A		0,0 NS	0,0 NS	

Médias seguidas de mesma letra minúscula, na coluna, e por mesma letra maiúscula, na linha, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Duncan ( $p \leq 0,05$ ), onde: 1 - TDZ 1,1  $\mu\text{M}$  + ANA 0,5  $\mu\text{M}$  (fase 1 com água de coco e fase 2 sem água de coco); 2 - TDZ 1,1  $\mu\text{M}$  + ANA 2,7  $\mu\text{M}$  (fase 1 com água de coco e fase 2 sem água de coco); 3 - TDZ 2,2  $\mu\text{M}$  + ANA 0,5  $\mu\text{M}$  (fase 1 com água de coco e fase 2 sem água de coco); 4 - TDZ 2,2  $\mu\text{M}$  + ANA 2,7  $\mu\text{M}$  (fase 1 com água de coco e fase 2 sem água de coco). Fase 1 – escuro/30 dias e luz/30 dias, fase 2 - luz/60 dias com subcultivo aos 30 dias para mesmo meio.

Comparando-se o comportamento do segmento basal da folha com o da parte apical, observa-se que só na porção basal houve regeneração, apresentando média de 0,7 brotações por calo, sem diferença estatística entre os 4 tratamentos. Este fato também foi relatado por HERVÉ et al. (2001), que observaram que na parte proximal ao pecíolo de folhas de *E. gunnii* formaram-se protuberâncias densamente que regeneraram gemas, regiões estas associadas a feixes vasculares com maior competência à divisão celular.

## 3.3.1.2.7 Ensaio 10

As interações entre meios de cultura e genótipos influenciaram as respostas morfogênicas obtidas, diferindo significativamente entre si para todas as variáveis avaliadas, com exceção da porcentagem de oxidação (Tabela 18).

O clone 05 apresentou as maiores freqüências de regeneração no tratamento 3 com 40% dos calos formando gemas e o número médio de brotos adventícios igual a 1,8. A indução em TDZ seguida de transferência para concentração crescente de BAP para as fases de 15 e 30 dias (tratamento 2) produziu 1,0 broto/calco para o mesmo clone. O clone 04 induziu um número de brotações/calco menor, 0,6 e 0,3, para tratamentos 3 e 4 respectivamente.

Quando o TDZ foi combinado com ANA (tratamento 1) por 15 dias em meio indutor seguido de BAP (15 dias) associado ao ANA (tratamentos 5 e 6), não houve regeneração de brotos em nenhum dos clones testados.

TABELA 18 – Efeito do genótipo e fitoreguladores na capacidade regenerativa de explantes foliares de *E. camaldulensis*, após 90 dias de cultivo em meio MST (TOURNIER et al., 2003).

Tratamento	Calco com gema (%)			Nº broto calco <sup>-1</sup>			Oxidação (%)		
	Clone		Média	Clone		Média	Clone		Média
	04	05		04	05		04	05	
1	0,0 ns	0,0 b	0,0 b	0,0 ns	0,0 c	0,0 b	0,0 ns	0,0 ns	0,0 ns
2	0,0 ns	25,0 ab	12,5 b	0,0 ns	1,0 ab	0,5 b	0,0 ns	0,0 ns	0,0 ns
3	15,0 ns	40,0 a	27,5 a	0,6 ns	1,8 a	1,2 a	0,0 ns	0,0 ns	0,0 ns
4	5,0 ns	15,0 b	10,0 b	0,3 ns	0,2 bc	0,2 b	0,0 ns	0,0 ns	0,0 ns
5	0,0 ns	0,0 b	0,0 b	0,0 ns	0,0 c	0,0 b	0,0 ns	0,0 ns	0,0 ns
6	0,0 ns	0,0b	0,0 b	0,0 ns	0,0 c	0,0 b	0,0 ns	0,0 ns	0,0 ns
Média clone	3,3 B	13,3 A		0,1 B	0,5 A		0,0 NS	0,0 NS	

Médias seguidas de mesma letra minúscula, na coluna, e por mesma letra maiúscula, na linha, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Duncan ( $p \leq 0,05$ ), onde 1 - TDZ 1,0  $\mu\text{M}$  + ANA 2,7  $\mu\text{M}$  (fase 1), TDZ 1,0  $\mu\text{M}$  + ANA 2,7  $\mu\text{M}$  (fase 2 e 3); 2 - BAP 2,2  $\mu\text{M}$  (TDZ 1,0) + ANA 2,7  $\mu\text{M}$  (fase 1, tratamento com 15 dias em BAP e 15 dias em TDZ), BAP 4,4  $\mu\text{M}$  + ANA 2,7  $\mu\text{M}$  (fase 2 e 3); 3 - TDZ 1,0  $\mu\text{M}$  (BAP 4,4) + ANA 2,7  $\mu\text{M}$  (fase 1, tratamento com 15 dias em TDZ e 15 dias em BAP), BAP 4,4  $\mu\text{M}$  + ANA 0,5  $\mu\text{M}$  (fase 2 e 3); 4 - BAP 4,4  $\mu\text{M}$  + ANA 0,5  $\mu\text{M}$  (fase 1), BAP 2,2  $\mu\text{M}$  + ANA 2,7  $\mu\text{M}$  (fase 2 e 3); 5 - BAP 4,4  $\mu\text{M}$  (TDZ 1,0) + ANA 2,7  $\mu\text{M}$  M (fase 1, tratamento com 15 dias em BAP e 15 dias em TDZ), TDZ 1,0  $\mu\text{M}$  + ANA 2,7  $\mu\text{M}$  (fase 2 e 3); 6 - BAP 4,4  $\mu\text{M}$  (TDZ 1,0) + ANA 2,7  $\mu\text{M}$  M (fase 1, tratamento com 15 dias em BAP e 15 dias em TDZ), TDZ 1,0  $\mu\text{M}$  + ANA 0,5  $\mu\text{M}$  (fase 2 e 3). Fase 1 - escuro/30 dias, fase 2 e 3 - luz/30 dias cada.

O resultado negativo apresentado pelo clone 04, que não desenvolveu gemas na maioria dos tratamentos e o resultado do clone 05 na presença da combinação do TDZ e BAP com ANA, com maiores médias de regeneração, demonstra claramente a influência do genótipo na regeneração *in vitro* do *E. camaldulensis*. Esta influência também foi observada por BENNETT e McCOMB (1982) em *E. marginata* e por LAINÉ e DAVID (1994) em *E. grandis*. SERRANO (2005) comenta, no caso de espécies de *Prunus*, que à medida que aumenta a taxa de regeneração, observa-se uma diminuição da variabilidade dependente do genótipo. Na cultura *in vitro* de *Eucalyptus*, a grande variação genotípica em resposta aos

meios de cultura constitui elemento essencial para o processo morfogênético, sendo a interação entre os fitorreguladores e as células vegetais bastante complexa.

### 3.3.2. Ensaio de multiplicação, enraizamento *in vitro* e aclimatização de brotações de *E. camaldulensis*

Durante estudos preliminares a este experimento, observou-se a formação de calos nas folhas de brotações individualizadas provenientes de clones estabelecidos *in vitro* de *E. camaldulensis* (Figura 9). Este comportamento foi associado a dois aspectos da manipulação do explante nas subculturas, que possivelmente seriam os causadores desta anomalia. A formação dos calos ocorreu geralmente em determinados clones que permaneciam por períodos superiores a 30 dias em mesmo meio de cultura, após a subdivisão de tufo em brotações individualizadas.

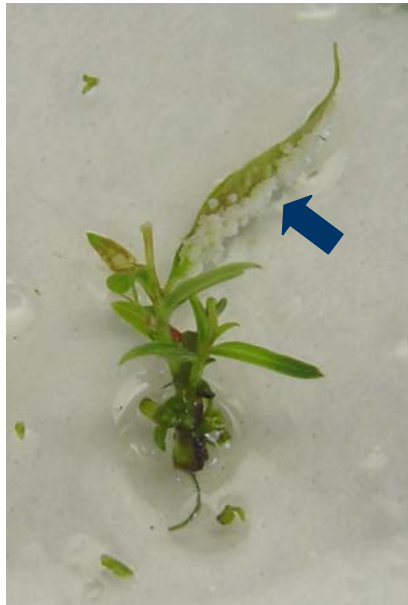


FIGURA 9 – Aspecto da formação de calos nas folhas em brotações *in vitro* de *E. camaldulensis*.

GRATTAPAGLIA e MACHADO (1998) atribuem o aparecimento destes calos em *E. gunnii* ao fato desta espécie ser intolerante à dilatação do prazo de subcultivo superiores aos convencionais de 20 dias. Também GASPAR et al. (2002) associam o aparecimento de calos em culturas *in vitro* a existência de estresse a nível celular, seja pela umidade no

ambiente, assim como também a resposta às mudanças no metabolismo e desenvolvimento da cultura. Neste sentido, para evitar a formação destas estruturas nas folhas, optou-se pela utilização de explantes compostos de dois brotos para o estabelecimento deste ensaio e a realização de subcultivos a cada 20 dias.

Dentre os fatores avaliados para a multiplicação *in vitro* do *E. camaldulensis*, verificou-se que todos apresentaram diferença estatística significativa (Tabela 19). Percebeu-se que a multiplicação de brotações de *E. camaldulensis* varia muito mais com o meio de cultura do que em função dos subcultivos e genótipos (Figura 10).

TABELA 19 - Efeito de meios de cultura e fitorreguladores na multiplicação *in vitro* de dois genótipos de *E. camaldulensis* após três subcultivos de 20 dias cada.

Tratamento	Broto explante <sup>-1</sup> (subcultivo)						Nº broto explante <sup>-1</sup> (clone)		Broto explante <sup>-1</sup> (tratamento)
	1º subcultivo		2º subcultivo		3º subcultivo		05	20	
	05	20	05	20	05	20			
1	11,3	9,0	10,3	9,2	5,9	6,7	9,2 b	8,3 ab	8,7 b
2	4,9	9,7	13,3	8,4	5,5	9,4	7,2 b	9,2 a	8,5 b
3	8,8	8,5	12,3	6,8	4,0	5,8	8,4 b	7,1 b	7,7 b
4	4,4	7,8	9,6	6,5	8,0	6,2	7,3 b	6,8 b	7,1 b
5	8,5	11,2	18,0	10,4	16,2	6,9	14,3 a	9,7 a	12,0 a
Broto calo <sup>-1</sup> (subcultivo)	7,6 B	9,4 A	12,7 A	8,2 B	7,9 A	7,0 B	9,4 A	8,2 B	
Broto calo <sup>-1</sup> (interação)	8,5 B		10,5 A		7,5 B				

Médias seguidas de mesma letra minúscula, na coluna, e por mesma letra maiúscula, na linha, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Duncan ( $p \leq 0,05$ ), onde tratamento: 1 - Meio MS + BAP 1,3  $\mu$ M; 2 - Meio MS + BAP 2,2  $\mu$ M; 3 - Meio B5 + BAP 1,3  $\mu$ M; 4 - Meio B5 + BAP 2,2  $\mu$ M; 5 - Meio MS mod + BAP 2,64  $\mu$ M + ANA 0,5  $\mu$ M.

Quanto à interação clone x subcultivo, os resultados demonstram diferença significativa com média de brotos por calo maior no segundo subcultivo (10,5), sendo também para este subcultivo a maior taxa média de multiplicação do clone 05 (12,7 brotos), enquanto o clone 20 obteve média superior no primeiro subcultivo (9,4 brotos).

De modo geral, todos os meios de cultura e fitorreguladores aplicados promoveram um aumento do número de brotações nos três subcultivos. Levando-se em consideração o meio de cultura, pode-se observar que o meio MS modificado apresentou maior média tanto para o clone 05 (14,3 brotos) como para o clone 20 (9,7). O meio MS modificado apresenta na sua composição concentração de tiamina dez vezes superior à do meio MS e inferior à do meio B5 e também contém BAP e ANA.

A tiamina, na forma de tiamina-pirofosfato, é um co-fator essencial para reações críticas da respiração aeróbica, da fotossíntese e da biosíntese de alguns aminoácidos e terpenóides em plantas (GEORGE, 1993). CORTINA e CULIÁÑEZ-MACIÀ (2004) verificaram que o aumento da tiamina em quatro vezes a concentração normal em meio MS favoreceu a diferenciação de gemas em explantes de *Lycopersicum esculentum*. CALDAS et al. (1998) reforçam que, embora tenha se verificado que as vitaminas desempenham funções essenciais na planta, o efeito benéfico da inclusão de determinada vitamina no meio nutritivo dependerá, em grande parte, da capacidade de biossíntese de cada um dos tecidos ou órgãos cultivados.

Segundo PASQUAL et al. (1997), o melhor crescimento de células e tecidos de plantas em meio MS é, sem dúvida, em grande parte devido à alta concentração de amônia e nitrato. Na Figura 10 é mostrado o aspecto de crescimento e qualidade das brotações nos cinco tratamentos, onde é evidente a superioridade do meio de cultura MS.



FIGURA 10 – Aspecto de proliferação de brotações do clone 05 de *E. camaldulensis* após 90 dias. Tratamento 1 - Meio MS + BAP 1,3  $\mu$ M; Tratamento 2 - Meio MS + BAP 2,2  $\mu$ M; Tratamento 3 - Meio B5 + BAP 1,3  $\mu$ M; Tratamento 4 - Meio B5 + BAP 2,2  $\mu$ M; Tratamento 5 - Meio MS mod + BAP 2,64  $\mu$ M + ANA 0,5  $\mu$ M. Barra = 1,0 cm.

A presença de ANA no meio de multiplicação parece também ter contribuído para aumentar a eficiência do tratamento 5 (Tabela 19) sobre a multiplicação do clone *in vitro*. GRATTAPAGLIA e MACHADO (1998) comentam que a auxina em meio de multiplicação pode anular o efeito inibitório que as citocininas podem ter sobre o alongamento das células

dos brotos, e que, em diversos clones de *Eucalyptus*, as partes aéreas se alongaram com a adição de AIA e AIB. Este alongamento por sua vez, pode facilitar a individualização de brotações produzidas neste processo.

Além da possível interação entre a tiamina e a citocinina, comentada por GEORGE (1993), o BAP é a citocinina com resposta mais eficaz no favorecimento da multiplicação de parte aérea e indução de gemas adventícias utilizada nos sistemas de micropropagação. Porém, algumas vezes, como no presente trabalho, esta citocinina apresenta comportamento diferenciado dependendo do meio de cultura utilizado. MURASHIGE e SKOOG (1962), quando publicaram a formulação do meio MS, chamaram a atenção para a interação entre os sais inorgânicos e os fitorreguladores no meio de cultura. Esta interação pode em parte explicar as diferenças encontradas na taxa de multiplicação, além da diferença observada entre os clones utilizados. REISCH (1986) concluiu que a taxa de multiplicação de *Vitis* é controlada, em parte, pela interação entre o genótipo e a citocinina.

A emissão de raízes foi observada a partir do 10º dia de cultura, sendo que no 30º dia as plântulas apresentaram raízes alongadas com 2,0 a 4,0 cm, além de pequenas raízes secundárias. A metodologia utilizada neste ensaio para as plântulas obtidas de *E. camaldulensis* foi eficiente com sobrevivência de 87% das mudas ao final de 20 dias de aclimatização (Figura 11).



FIGURA 11 – Aspecto de mudas em casa-de-vegetação 20 dias após aclimatização.

### 3.3.3 Resumo dos resultados dos ensaios de organogênese e multiplicação de *E. camaldulensis*

Dentre os resultados observados nos ensaios realizados no presente trabalho (Tabela 20), o procedimento mais adequado para a regeneração *in vitro* de brotações de *Eucalyptus camaldulensis* via organogênese indireta foi: utilização de explantes cotilédonares obtidos de plântulas germinadas *in vitro* com 10-12 dias de idade e cultivados em meio MS N/2 + 2% de sacarose + 0,6% de ágar + água de coco a 10% (v/v) + 4,4 µM de BAP + 2,7 µM de ANA por 30 dias em ambiente escuro de sala de crescimento, seguido de subcultivo em novo meio de mesma composição por outros 30 dias em fotoperíodo de 16 h e densidade de fluxo de fótons de 30 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, a uma temperatura de 25°C ± 2°C. O explante foliar apresentou resposta organogênica inferior, com melhor resultado observado em meio MS N/2 + 2% sacarose + 0,6% de ágar + água de coco a 10% (v/v) + 2,2 µM de BAP + 2,7 µM de ANA por 30 dias em ambiente escuro de sala de crescimento, seguido de subcultivo para novo meio por outros 30 dias em fotoperíodo de 16 h e densidade de fluxo de fótons de 30 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, a uma temperatura de 25°C ± 2°C.

Para a multiplicação das brotações regeneradas, mostrou-se mais eficiente o cultivo de brotações em meio MS + 2,64 µM de BAP + 0,5 µM de ANA + 3% de sacarose + 0,7% de ágar + 1,0 mg L<sup>-1</sup> de tiamina + 0,5 mg L<sup>-1</sup> de piridoxina + 0,5 mg L<sup>-1</sup> de ácido nicotínico e mantidas por 20 dias em ambiente de fotoperíodo de 16 h em sala de crescimento e densidade de fluxo de fótons de 30 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, a uma temperatura de 25°C ± 2°C.

O enraizamento *in vitro* foi eficiente, assim como a aclimatização, com 87% de sobrevivência de plântulas de acordo com os seguintes passos: 1º - plântulas individualizadas com pelo menos 1,5 cm de altura foram cultivadas por 30 dias em meio MS com metade da concentração original de sais + 3% de sacarose + 0,7% de ágar + 0,2% de carvão ativado; 2º - abertura do frasco por 48 horas em sala de crescimento (pré-aclimatização); 3º - retirada e limpeza das raízes das plântulas enraizadas; 4º - plantio em tubetes com substrato composto de vermiculita e terra (1:1) e mantidas em casa-de-vegetação com irrigação intermitente por 5 segundos a cada 15 minutos por 15-20 dias; 5º - transferência para ambiente de casa-de-vegetação com irrigação diária.

TABELA 20 – Resumo do comportamento de *E. camaldulensis* nos diferentes ensaios de organogênese e multiplicação *in vitro*.

Ensaio	Explante	Meio de cultura e fitorregulador	Resposta
1	cotilédone	BAP e ANA em MS e WPM	brotações maiores e bem formadas (média de 4,8 e 4,2 brotos/calor)
		BAP e ANA em JADS	brotações pequenas e com hiperhidricidade (média de 3,5)
2	cotilédone	MS N/2 com água de coco, BAP e ANA	brotações maiores e bem formadas (média de 6,2 brotos/calor)
3	cotilédone	MS/2 com água de coco, BAP e ANA	Brotações maiores e bem formadas (média de 5,1 brotos/calor)
4	folha	MS N/2 com água de coco, BAP e ANA	brotações maiores e bem formadas (médias inferiores a 1,0 broto/calor)
5	folha	MST com BAP, TDZ, ANA, 2,4-D e AC	baixos índices de regeneração (médias inferiores a 1,0 broto/calor)
6	folha	MS com BAP, TDZ, ANA e AC	baixos índices de regeneração (médias inferiores a 1,0 broto/calor)
7	folha	B5 com BAP, TDZ, ANA, 2,4-D e AC	baixos índices de regeneração (médias entre 0-0,1 broto/calor)
8	segmento folha	MS e MS N/2 com BAP, CIN, TDZ, ANA, 2,4-D, TDZ e AC	baixos índices de regeneração com médias 0,4 e 0,2 brotos/calor para segmento basal e apical da folha,
9	segmento folha	B5 com TDZ, ANA e AC	baixos índices de regeneração com médias 0,0 e 0,7 brotos/calor para segmento basal e apical da folha,
10	folha (clones)	MST com BAP, TDZ, ANA e AC	índices de regeneração com média 0,5 broto/calor para clone 05
Multiplicação	brotações múltiplas	MS, B5 e MS modificado com BAP e ANA	média de regeneração de 12,0 brotos/explante em meio MS



### 3.4 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos nas condições experimentais estabelecidas neste trabalho, pode-se concluir que:

- Os explantes de *Eucalyptus camaldulensis* avaliados responderam de maneira diferente quanto à capacidade regenerativa, sendo a regeneração do explante cotiledonar superior ao foliar;

- Foi verificada grande influência do meio de cultura, tipo e concentração de fitorreguladores na organogênese indireta de explantes cotiledonares e foliares;

- Entre as variáveis testadas verificou-se que a composição dos meios de cultura afetou a organogênese indireta;

- Foi verificada diferença na resposta entre porções foliares (apical e basal) e entre clones na regeneração de brotações adventícias;

- A taxa de multiplicação de brotações em meio MS com associação de BAP, ANA e tiamina foi superior às taxas obtidas nos demais meios testados;

- A metodologia de enraizamento *in vitro* e aclimatização aplicada às plântulas obtidas apresentou resultados satisfatórios dentro do processo de otimização da organogênese indireta de *E. camaldulensis*.

### 3.5 REFERÊNCIAS

- ALVES, E.C.S. de; 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.
- ANDERSONE, U.; IEVINSH, G. Changes of morphogenic competence in mature *Pinus sylvestris* L. buds *in vitro*. **Annals of Botany**, v. 90, p.293-298, 2002.
- ASSAREH, M.H.; HENNERTY, M.J. **Induction of indirect organogenesis in *Eucalyptus camaldulensis***. In: GRAY, J. S.; CAFFREY, P.; CRONIN, D.; FOLEY, K.; WARD, . S.M.; WIMS, P. Research Report 1996/1997. 1998.
- AZMI, A.; NOIN, M.; LANDRÉ, P.; PROTEAU, M.; BOUDET, A.M.; CHRIQUI, D. High frequency plant regeneration from *Eucalyptus globulus* Labill. hypocotyls: ontogenesis and ploidy level of the regenerants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 51, p. 9-16, 1997.
- BACHETTINI, P.S.V. **Micropropagação de *Gypsophila paniculata* L.** Pelotas, 2000. 45 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal). Universidade Federal de Pelotas.
- BANDYOPADHYAY, S.; HAMILL, J.D. Ultrastructural studies of somatic embryos of *Eucalyptus nitens* and comparisons with zygotic embryos found in mature seeds. **Annals of Botany**, v. 86, p.237-244, 2000.
- BARRUETO CID, L.P.; 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.
- BENNETT, I.J.; McCOMB, J.A. Propagation of jarrah (*Eucalyptus marginata*) by organ and tissue culture. **Australian Forest Research**, v.12, n. 2, p.121-127, 1982.
- BORÉM, A., SANTOS, F. R. **Biotechnologia Simplificada**. Viçosa: Ed. UFV, 2001. 250 p.
- BRAVO, C.V. **Controle genético e histogênese na regeneração de progênies de *Eucalyptus grandis* *in vitro***. 2005. 80 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, USP, 2005.
- CABONI, E.; TONELLI, M.G.; LAURI, P.; D'ANGELI, S. DAMIANO, C. *In vitro* shoot regeneration from leaves of wild pear. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.59, p.1-7, 1999.
- CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. In: Torres, A.C., Caldas, L.S., Buso, J.A. **Cultura de tecidos e transformação de plantas**. Brasília: EMBRAPA/CNPH, p.87-132, 1998.
- CORTINA, C.; CULIÁÑEZ-MACIÀ, F.A. Tomato transformation and transgenic plant production. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.76, p.269-275, 2004.
- CORREIA, D. **Crescimento e desenvolvimento de gemas na multiplicação de *Eucalyptus* spp *in vitro* em meio de cultura líquido e sólido**. Piracicaba, 1993. 113p. Tese (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

CUENCA, B; BALLESTER, A; VIEITEZ, A.M. *In vitro* adventitious bud regeneration from internodes segments of beech. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.60, n.3, p.213-220, 2000.

DAGUIN, F.; LETOUZÉ, R. Ammonium-induced vitrification in cultured tissues. **Physiologia Plantarum**, v. 66, p. 94-98, 1986.

DIALLO, N.; DUHOUX, E. Organogenèse et multiplication *in vitro* chez l' *Eucalyptus camaldulensis*. **Journal of Plant Physiology**, v.115, p.177-182, 1984.

DIBAX, R.; EISFELD, C. DE L.; CUQUEL, F.L.; KOEHLER, H.; QUOIRIN, M. Plant regeneration from cotyledonary explants of *Eucalyptus camaldulensis*. **Scientia Agricola**, v.62, n.4, p.406-412, 2005.

DONATO, V.M.T.S.; ANDRADE, A.G. de; CABRAL, J.B. Regeneração *in vitro* de plantas de couve-comum (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*) a partir de calos provenientes de tecidos foliares. **Revista Ecosystema**, v.26, n.2, p.143-146, 2001.

FERNANDO, J.A. **Estudos anatômicos e ultra-estruturais da organogênese *in vitro* de *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.** Campinas, 2005. 106 f. (Doutorado em Biologia Vegetal, Biologia) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.

FERREIRA, M. E.; CALDAS, L.S.; PEREIRA, E.A. Aplicações da cultura de tecidos no melhoramento genético de plantas. In: Torres, A.C.; Caldas, L.S.; Buso, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-CNPB, 1998. p.21-43. v.1.

GAHAN, P.B.; WANG, L.; BOWEN, I.D.; WINTERS, C. Cytokinin-induced apoptotic nuclear changes in cotyledons of *Solanum aviculare* and *Lycopersicon esculentum*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.72, n.3, p.237-245, 2003.

GAMBORG, O.L.; MILLER, R.A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**, v. 50, p. 151-158, 1968.

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**. Edington: Exegetics, vol.1, 1993. 574p.

GILL, R.I.S.; GILL, S.S.; GOSAL, S.S. Vegetative propagation of *Eucalyptus tereticornis* Sm. through tissue culture. **Abstract**. Intl. Plant Tissue Cult., Conference, Dhaka 19 - 21 Dec., pp. 44, 1996.

GONZÁLEZ, E.R. **Transformação genética de *Eucalyptus grandis* e do híbrido *E. grandis* x *E. urophylla* via *Agrobacterium***. Piracicaba, 2002. 93 f. (Tese de doutorado, Agronomia). Escola Superior “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

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/CNPB, p.183-260,1998.

GRIBAUDO, I.; FRONDA, A. Effects of thidiazuron on grapevine axillary buds cultivated *in vitro*. **Hortscience**, v.26, n.8, p.1083, 1991.

GRIBBLE, K., SARAFIS, V., NAILON, J., HOLFORD, P., UWINS, P. Environmental scanning electron microscopy of the surface of normal and vitrified leaves of *Gypsophila paniculata* (Babies Breath) cultured *in vitro*. **Plant Cell Reports**, v. 15, p. 771-776, 1996.

- 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., CUIANG, 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.
- HUETTEMAN, C.A.; PREECE, J.E. Thidiazuron: a potent cytokinin for wood plant tissue culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.33, n.2, p.105-119, 1993.
- ILAH, I.; JABEEN, M. Propagation of *Eucalyptus* species by tissue culture. In: **Moderns Trends of Plant Science Research in Pakistan**. Peshawar, Jardoan Press: 1987. p.170-175.
- KANTHARAJAH, A.S., DODD, W.A. *In vitro* micropropagation of *Passiflora edulis* (purple passionfruit). **Annals of Botany**, v.65, n.3, p.337-339, 1990.
- KAWAZU, T.; DOL, K.; TATEMACHI, Y.; ITO, K.; SHIBATA, M. Regeneration of transgenic plants by nodule culture systems in *Eucalyptus camaldulensis*. In: CONFERENCE OF TREE IMPROVEMENT FOR SUSTAINABLE TROPICAL FORESTRY, 1996, Caloundra. **Proceedings**. Caloundra: IUFRO, p.492-497, 1996.
- LAINÉ, E., DAVID, A. Regeneration of plants from leaf explants of micropropagated clonal *Eucalyptus grandis*. **Plant Cell Reports**, v.13, p.473-476, 1994.
- LE ROUX, J.J., VAN STADEN, J. Micropropagation of *Eucalyptus* species. **Hortscience**, v.26, n.2, p.199-200, 1991.
- LIMA, M.M.; GONÇALVES, A.N. Efeito do Thidiazuron na multiplicação *in vitro* de gemas de um clone de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus tereticornis*. **Scientia Forestalis**, n.53, p.49-56, 1998.
- LLOYD, G.; MCCOWN, B. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel *Kalmia latifolia* by use of shoot-tip culture. **Combined Proceedings of International Plant Propagation Society**, v.30, p.421-427, 1980.
- LU, C. The use of thidiazuron in tissue cultures. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, v.29, n.2, p.92-96, 1993
- MACHADO, L. O. R.; ANDRADE, G. M.; BARRUETO CID, L.P.; PENCHEL, R.M. *Agrobacterium* strain specificity and shooty tumour formation in eucalypt (*Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*). **Plant Cell Reports**, v.16, p.299-303, 1997.
- MCCOWN, B. H.; SELLMER, J. C. General media and vessels suitable for wood plant culture. In: BONGA, J. M.; DURZAN, D. J. (Ed.) **Cell and tissue culture in forestry**. Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers, p. 4-13, 1987 (v.1).
- MOK, M.C.; MOK, D.W.S.; TURNER, J.E.; MUJER, C.V. Biological and biochemical effects of cytokinin-active phenylurea derivatives in tissue culture systems. **HortScience**, v.22, n.6, p.1194-1197, 1987.
- MONTEIRO, A.C.B.A.; NAKAZAWA, G.T.; MENDES, B.M.J.; RODRIGUEZ, A.P.M. Regeneração *in vitro* de *Passiflora suberosa* a partir de discos foliares. **Scientia Agricola**, v.57, n.3, p.571-573, 2000.
- 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, n.2, 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**, p.787-791, 1997.
- MURALIDHARAN, E.M.; GUPTA, P.K.; MASCARENHAS, A.F. Plantlet production through high frequency somatic embryogenesis in long term cultures of *Eucalyptus citriodora*. **Plant Cell Reports**, v.8, p.41-43, 1989.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.
- OTAHOLA, V. Regeneración de plantas de parchita (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) a partir del cultivo *in vitro* de discos de hojas. **Bioagro**, v.12, n.3, p.71-74, 2000.
- PASQUAL, M.; HOFFMANN, A.; RAMOS, J.D. **Cultura de tecidos vegetais: tecnologia e aplicações**. Lavras: UFLA/ FAEPE, 1997. 159 p.
- PASQUALETTO, P.L.; ZIMMERMAN, R.H.; FORDHAM, I. The influence of cation and gelling agent concentrations on vitrification of apple cultivars *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.14, p.31-40, 1988.
- PERES, L.E.P. Bases fisiológicas e genéticas da regeneração de plantas *in vitro*. **Biociência: Ciência & Desenvolvimento**, n.25, p.45-48, 2002.
- PIERIK, R.L.M. ***In vitro* culture of higher plants**. Netherlands: Kluwer Academic Publishers. 348 p., 1997.
- RADICE, S. Morfogénesis *in vitro*. In: ECHENIQUE, V.; RUBINSTEIN, C.; MROGINSKI, L. **Biociencia y Mejoramiento Vegetal**. Buenos Aires: INTA, 2004. 10p.
- RAHIM, F.; JABEEN, M.; ILAHI, I. Mass Propagation in *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. **Asian Journal of Plant Sciences**, v.2, n.2, p.184-187, 2003
- RAMAGE, C.M.; WILLIAMS, R.R. Mineral nutrition and plant morphogenesis. **In Vitro Cellular and Development Biology - Plant**, v.38, n.2, p. 116-124, 2002.
- REISCH, B. I. Influence of genotype and cytokinins on *in vitro* shoot proliferation of grapes. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 111, p.138-141, 1986.
- RODRIGUES, E.F. **Desenvolvimento do eixo embrionário *in vitro* e calogênese de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) Schum.) e estabelecimento do ápice caulinar de bacuri (*Platonia insignis* Martius)**. 2000. 70f. Tese (Doutorado em Agronomia)- Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2000.
- SAAFI H.; BORTHAKUR, D. *In vitro* plantlet regeneration from cotyledons of the tree-legume *Leucaena leucocephala*. **Plant Growth Regulation**, v. 38, n.3, p. 279-285, 2002.
- SCHESTIBRATOV, K.A.; MIKHAILOV, R.V.; DOLGOV, S. Plantlet regeneration from subculturable nodular callus of *Pinus radiata*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.72, n.2, p.139-146, 2003.
- SERRANO, C.P. **Transformación genética del albaricoquero (*Prunus armeniaca* L.), mediada por *Agrobacterium* y regeneración de plantas transformadas**. Murcia, 2005. 194p. Tese (Doutorado em Biologia vegetal) – Universidade de Murcia, 2005.
- SKOOG, F.; MILLER, C.O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultivated *in vitro*. **Symposium of the Society of Experimental Botany**, v. 54, n11, p.118-130, 1957.
- 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.

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.; TEULIÈRES, C. An efficient procedure to stably introduce genes into an economically important pulp tree (*Eucalyptus grandis* × *Eucalyptus urophylla*). **Transgenic Research**, v. 12, p. 403–411, 2003.

#### 4 UTILIZAÇÃO DE ANTIBIÓTICO E AGENTE SELETIVO NA TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE *Eucalyptus camaldulensis*

##### RESUMO

A transformação de espécies do gênero *Eucalyptus* ainda é considerada bastante difícil, pois além da baixa capacidade de regeneração, estas espécies apresentam muitas variações quanto à resposta ao sistema de seleção dos transformantes adotado para cada espécie. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivos estabelecer a dose letal mínima do agente seletivo canamicina (Km) e determinar o tipo e a concentração de antibióticos adequados para a eliminação de *Agrobacterium tumefaciens* de explantes cotiledonares de *E. camaldulensis* inoculados, sem interferir com o potencial regenerativo do explante. A influência do agente seletivo foi estudada pela cultura de explantes cotiledonares não transformados em meio de cultura MS N/2 (com a metade da concentração de nitratos de amônio e potássio do meio MS) suplementado com BAP (4,4  $\mu\text{M}$ ), ANA (2,2  $\mu\text{M}$ ) e antibiótico canamicina nas concentrações de 0, 3, 6, 9 e 12  $\text{mg L}^{-1}$ . A canamicina foi adequada para a seleção de células transformadas na concentração de 9  $\text{mg.L}^{-1}$  por bloquear o crescimento de células não transformadas em explantes cotiledonares de *E. camaldulensis*. Para a avaliação da eficiência dos antibióticos cefotaxima e Augmentina<sup>®</sup> (amoxicilina/clavulonato de potássio), cotilédones infectados com a cepa desarmada de *A. tumefaciens* C58C1 foram cultivados em meio MS N/2 adicionado de BAP (4,4  $\mu\text{M}$ ), ANA (2,2  $\mu\text{M}$ ), canamicina (9  $\text{mg L}^{-1}$ ), 2% de sacarose e 0,6% de ágar. Foram testadas combinações de diferentes concentrações (0, 100, 125, 150, 200, 250, 300 e 500  $\text{mg.L}^{-1}$ ) de e tempos de exposição (10, 15, 20, 30 e 60 dias) dos explantes após a co-cultura. Os resultados variaram de acordo com as concentrações e o tempo de exposição aos antibióticos. Para a completa eliminação da *Agrobacterium*, verificou-se a necessidade da inclusão dos antibióticos durante todo o período do cultivo *in vitro* (60 dias). Além disso, a maior média de brotos regenerados por explante (5,4) foi observada na presença de 300  $\text{mg.L}^{-1}$  de Augmentina<sup>®</sup> por 15 dias, seguido por 150  $\text{mg.L}^{-1}$  até o 30º dia, e 100  $\text{mg.L}^{-1}$  até o final da cultura.

Palavras-chave: morfogênese, canamicina, Augmentina, cefotaxima, planta transgênica, *Agrobacterium tumefaciens*, eucalipto.

#### 4 USE OF ANTIBIOTIC AND SELECTIVE AGENT IN THE GENETIC TRANSFORMATION OF *Eucalyptus camaldulensis*

##### ABSTRACT

The transformation of *Eucalyptus* species is still quite difficult, due to their low regeneration capacity and to the fact that these species present a lot of variations in the response to the selection system adopted. In this context, the objectives of the present work were to determine the type and the concentration of appropriate antibiotics for the elimination of *Agrobacterium tumefaciens* in inoculated *E. camaldulensis* cotyledonary explants, without interfering with their regenerative potential. The influence of the selective agent was studied through culture of not transformed explants in the MS N/2 medium (with half-strength ammonium and potassium nitrates) supplemented with BAP (4,4  $\mu\text{M}$ ), ANA (2,2  $\mu\text{M}$ ) supplemented with antibiotic kanamycin (Km) in the concentrations of 0, 3, 6, 9 and 12  $\text{mg L}^{-1}$ . The results showed that this antibiotic is suitable for the selection of transformed cells in a concentration of 9  $\text{mg L}^{-1}$  as it inhibits the growth of not transformed cotyledonary explants. In order to test the efficiency of the antibiotics cefotaxime or Augmentin<sup>®</sup> (amoxicillin/clavulonate potassium), cotyledons infected with the disarmed strain of *A. tumefaciens* C58C1 were cultivated in MS N/2 medium supplemented with BAP (4,4  $\mu\text{M}$ ), ANA (2,2  $\mu\text{M}$ ), Km (9  $\text{mg L}^{-1}$ ), 2% sucrose and 0,6% agar. Several combinations of concentrations of cefotaxime or Augmentin<sup>®</sup> (0, 100, 125, 150, 200, 250, 300 and 500  $\text{mg L}^{-1}$ ) and times of exposition of the explants (10, 15, 20, 30 and 60 days) after the co-culture were tested. The results varied according to the concentrations and the time of exposition to the antibiotics. For the complete elimination of *Agrobacterium*, the necessity of the inclusion of the antibiotics during the whole period of the *in vitro* cultivation (60 days) was verified. Moreover the highest average number of regenerated shoots by explant (5,4) was observed in the presence of 300  $\text{mg L}^{-1}$  Augmentin<sup>®</sup> for 15 days, followed by 150  $\text{mg L}^{-1}$  until the 30th day and 100  $\text{mg L}^{-1}$  until the end of the culture.

Key-words: Morphogenesis, kanamycin, Augmentin, cefotaxime, transgenic plant, *Agrobacterium tumefaciens*, eucalypt.



#### 4.1 INTRODUÇÃO

Os antibióticos utilizados regularmente na transformação genética de plantas podem exercer duas funções distintas. A primeira delas diz respeito ao sistema de seleção dos transformantes. A segunda função está relacionada à supressão ou eliminação da *Agrobacterium tumefaciens* da cultura *in vitro* após o período de co-cultura necessário para que ocorra a transferência do T-DNA contendo o transgene de interesse para o tecido hospedeiro.

Segundo BRASILEIRO e LACORTE (1998), o princípio da transformação genética com uma linhagem desarmada de *A. tumefaciens* está baseado na seleção de uma ou mais células transformadas e na sua regeneração em planta transgênica. Para tal, a seqüência gênica inserida no genoma da planta deverá conter um gene de seleção que impeça a regeneração daquelas células não transformadas, pois uma vez ocorrido o evento de transformação, nem todas as células do tecido foram infectadas e, portanto, nem todas as gemas regeneradas seriam transformadas.

De acordo com POTRYKUS e SPANGENBERG (1995), os principais fatores a serem considerados na escolha de um determinado gene marcador seletivo são: a) a expressão do mesmo não deve interferir no metabolismo normal das células transformadas; b) seu produto deve proteger de modo efetivo as células transformadas, das propriedades inibitórias de crescimento do agente seletivo, além de ter boa difusão nos tecidos, de forma a permitir uma distinção fenotípica clara entre as células transformadas e as não transformadas, c) a exposição do explante transgênico ao agente seletivo, não deve afetar seu subsequente crescimento e regeneração em plantas inteiras e férteis.

A concentração do agente seletivo, no entanto, pode tanto afetar severamente as células não transformadas como as transformadas, assim como possibilitar o aparecimento de escapes, ou seja, plantas não transformadas que, apesar de não expressarem o gene de seleção, conseguem regenerar na presença do antibiótico seletivo (BRASILEIRO e LACORTE, 1998). Segundo GONZÁLEZ (2002), no eucalipto, a existência de variabilidade genética para tolerância/resistência a determinados antibióticos, possibilita a ocorrência de escapes, assim como respostas morfogênicas distintas aos antibióticos incorporados ao meio de cultura, interferindo com a organogênese *in vitro* da espécie.

Dentre os genes de seleção, a neomicina fosfotransferase (*nptII*) é o mais utilizado

como marcador de seleção *in vitro* na transformação de plantas, sendo responsável pela produção da enzima neomicina fosfotransferase II ou NPTII (EC 2.7.1.95) que inativa diferentes antibióticos do grupo dos aminoglicosídeos, como as canamicinas A, B e C, geneticina, neomicina, entre outros (BRASILEIRO e DUSI, 1999). Nas células das plantas, estes antibióticos em concentrações adequadas, quando em contato com o tecido vegetal, atuam na síntese de proteínas em mitocôndrias e cloroplastos, reduzindo a síntese de clorofila e inibindo o crescimento de células não transformadas (BRASILEIRO e ARAGÃO, 2001). Assim, as plantas transgênicas que sintetizam a enzima NPTII podem tolerar dosagens dos antibióticos aminoglicosídeos (substratos) que, em plantas não transformadas, são letais (BENVENISTE e DAVIES, 1973; BRASILEIRO e LACORTE, 1998).

Após o período de contato entre a célula e a suspensão bacteriana, as células de *A. tumefaciens* são indesejáveis na cultura, devendo ser eliminadas pela suplementação ao meio de regeneração de antibióticos bactericidas, que apresentem boa capacidade antimicrobiana em baixa concentração, além de toxicidade seletiva, sendo tóxico para as bactérias e não para as células do tecido. Os principais antibióticos utilizados são representados principalmente pela cefotaxima, carbenicilina, vancomicina, Augmentina<sup>®</sup>, tetraciclina, rifampicina, ampicilina, moxalactam e timentina com concentrações que variam de 200 a 1000 mg L<sup>-1</sup> (POLLOCK et al., 1983; SHACKELFORD e CHLAN, 1996), que atuam inibindo a última etapa da síntese da parede celular bacteriana.

O amplo intervalo entre as concentrações utilizadas demonstra o comportamento distinto apresentado pelos antibióticos bactericidas no controle das bactérias em culturas vegetais *in vitro*, podendo exercer um caráter fitotóxico e deletério, reduzindo a eficiência da transformação de diversas espécies ou até favorecendo a regeneração de plantas transformadas atuando no crescimento das células vegetais, na organogênese e embriogênese somática (NAUERBY et al., 1997; MAYOLO et al., 2003).

Neste sentido, este trabalho teve dois objetivos: primeiro, estabelecer a dose letal mínima do antibiótico seletivo e, em segundo lugar, determinar o tipo e a concentração de antibióticos adequados para a eliminação de *A. tumefaciens* de explantes inoculados, sem interferir com o potencial regenerativo do explante cotiledonar de *E. camaldulensis*.

## 4.2 MATERIAL E MÉTODOS

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

### 4.2.1 Material vegetal e condições de cultura *in vitro*

Foram utilizados explantes oriundos de sementes germinadas *in vitro* de *Eucalyptus camaldulensis* Dehl. provenientes de Área de Produção de Sementes (APS F1), localizada no município de Açailândia, Estado do Maranhão e, armazenadas no Setor de Sementes do Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais (IPEF), Piracicaba, São Paulo.

As sementes foram esterilizadas superficialmente por lavagens sucessivas em etanol 70% (v/v) e Tween 20<sup>®</sup> (4 gotas/100 mL) por dois minutos, solução de hipoclorito de sódio (8% de cloro ativo) durante 30 minutos sob agitação e três lavagens sucessivas em água deionizada estéril. A semeadura foi realizada em placa de Petri contendo 25 mL do meio de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) com metade da concentração original dos sais (MS/2), 2% de sacarose, 0,6 % de ágar (Vetec<sup>®</sup>), com pH ajustado em 5,8 e esterilizado em autoclave a 1 atm e 121°C por 20 minutos. A germinação se deu em sala de crescimento em ausência de luz por sete dias seguidos de cinco dias em condições de luz.

Os ensaios descritos a seguir foram realizados em sala de crescimento equipada com lâmpadas fluorescentes de tipo “luz do dia”, fornecendo uma densidade de fluxo de fótons de 30  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , fotoperíodo de 16 horas e com temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ .

Explantes cotiledonares foram isolados de plântulas de 12-15 dias, com o corte na base do pecíolo, e posteriormente transferidos com a face adaxial em contato com o meio de cultura. O meio de indução de calogênese e regeneração (MCAC) consistiu do meio MS N/2 (meio MS com a metade da concentração de nitratos de amônia e potássio) suplementado com 4,4  $\mu\text{M}$  de BAP, 2,7  $\mu\text{M}$  de ANA, 2% de sacarose, 0,6% de ágar (Vetec<sup>®</sup>) e 10% de água de coco (Kero-Coco<sup>®</sup>). O pH foi ajustado em 5,8 antes de adicionar o ágar e o meio autoclavado como indicado acima.

#### 4.2.2 Influência do agente seletivo na calogênese e organogênese de explantes cotiledonares de *E. camaldulensis*

##### 4.2.2.1 Meio de cultura e concentrações do agente seletivo

Neste experimento avaliou-se o nível de tolerância/resistência de explantes de *E. camaldulensis* ao antibiótico canamicina (Km) visando sua utilização como agente seletivo em experimentos de transformação genética. A canamicina foi esterilizada com filtro Millipore® (0,22 µm) e adicionada após autoclavagem e resfriamento ( $\pm 45^{\circ}\text{C}$ ) do meio de cultura.

Explantes cotiledonares não transformados foram cultivados em meio MCAC suplementado com 0, 10, 20, 40, 60 e 80 mg L<sup>-1</sup> de canamicina e mantidos em sala de crescimento durante os primeiros 30 dias em ambiente escuro e transferidos para condição de luz até o 60º dia. No entanto, em função dos resultados obtidos, foi necessária a implantação de novo experimento com modificação nas concentrações do agente seletivo para 0, 3, 6, 9 e 12 mg L<sup>-1</sup>, mantendo-se as condições especificadas no experimento realizado com concentrações maiores.

##### 4.2.2.2 Avaliação e análise dos dados

Ao final de 60 dias foram avaliadas a porcentagem de explantes formando calos, de calos com gemas, de explantes oxidados ou necrosados e o número de brotações por calo. O experimento foi repetido duas vezes. Os experimentos foram instalados em delineamento experimental inteiramente casualizado com 10 repetições para o primeiro experimento e 4 repetições no segundo, considerando-se a placa de Petri como unidade experimental com 6 e 5 explantes cada, respectivamente. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de Duncan a 5% de significância para a comparação das médias dos tratamentos.

### 4.2.3 Eficiência de dois antibióticos na eliminação de *A. tumefaciens*

#### 4.2.3.1 Cultura da bactéria e infecção do explante

Para a transformação genética de *E. camaldulensis* foi utilizada a linhagem desarmada de *A. tumefaciens* C58C1 contendo o vetor binário pBIN19. O T-DNA dessa linhagem desarmada contém a construção pCgMT1-GUS-NOS, com o gene repórter *uidA* sob controle do promotor do gene *cgMT1* (LAPLAZE et al., 2002), o gene de seleção *nptII*, da neomicina fosfotransferase, sob controle do promotor NOS da nopalina sintetase.

O cultivo da cepa C58C1 foi realizado em meio YEB sólido com canamicina (50 mg L<sup>-1</sup>), no escuro a 25 ± 2°C. Após 48 horas, colônias isoladas foram inoculadas em 10 mL de meio YEB líquido contendo canamicina como antibiótico de seleção a 50 mg L<sup>-1</sup>. A suspensão foi mantida a 28°C, em agitador rotatório a 120 rpm, na ausência de luz por 16 horas, quando atingia densidade ótica (DO) a 600 nm entre 0,8 e 1,0.

A cultura líquida para a inoculação dos explantes foi preparada a partir de uma alíquota de 1,0 mL da suspensão bacteriana centrifugada a 5.000 rpm por 10 minutos, seguida da ressuspensão do precipitado em meio MS/2 até a obtenção de DO<sub>600nm</sub> = 0,5.

Na suspensão bacteriana aferida foram inoculados explantes cotiledonares recém excisados de plântulas obtidas conforme descrito no item 4.2.1 e agitados a 120 rpm por 30 minutos. Após o período de infecção, os explantes foram colocados em papel filtro estéril para a retirada do excesso do meio líquido e então transferidos para placas de Petri contendo meio MCAC e selados com filme plástico, no qual permaneceram em co-cultivo em ambiente escuro por 72 horas a 25 ± 2°C.

#### 4.2.3.2 Eliminação de *Agrobacterium tumefaciens*

Os antibióticos cefotaxima, Augmentina<sup>®</sup> e canamicina foram esterilizados em filtro Millipore<sup>®</sup> (0,22 µm) e adicionados ao meio MCAC após autoclavagem e resfriamento (± 45°C). Após o período do co-cultivo, os cotilédones foram secos em papel filtro estéril e cultivados com a face adaxial em contato com os meios com os antibióticos, conforme tratamentos apresentados na Figura 12, e mantidos em sala de crescimento em ausência de luz por 30 dias. Após quatro semanas, as culturas foram transferidas para os meios renovados e mantidas em sala de crescimento por 60 dias.

O controle (tratamento 13) consistiu em explantes cotiledonares não infectados e cultivados em meio MCAC sem antibióticos (seletivo e bactericida).

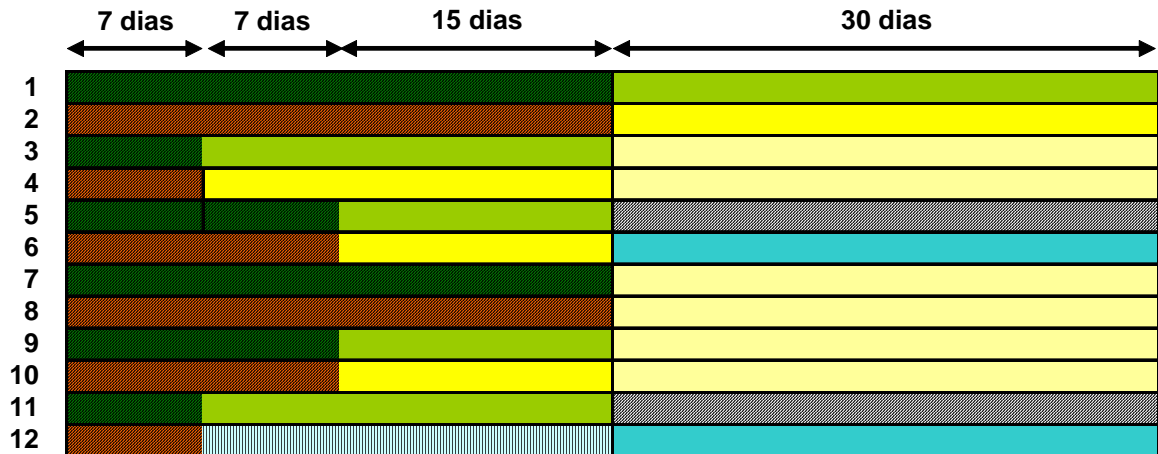


Figura 12 - Períodos de exposição de explantes cotiledonares de *E. camaldulensis* inoculados com *Agrobacterium tumefaciens* a diferentes concentrações dos antibióticos cefotaxima (Cx) a 500 mg L<sup>-1</sup> (verde escuro), a 250 mg L<sup>-1</sup> (verde claro), a 125 mg L<sup>-1</sup> (verde muito claro); e Augmentina® (Aug) a 300 mg L<sup>-1</sup> (marrom), a 150 mg L<sup>-1</sup> (amarelo), a 200 mg L<sup>-1</sup> (verde amarelo), a 100 mg L<sup>-1</sup> (azul); e sem antibiótico (branco).

#### 4.2.3.3 Avaliação e análise dos dados

Ao final de 60 dias, foram avaliadas as variáveis: porcentagem de explantes formando calos sem gemas, porcentagem de calos regenerando gemas, número de brotações por calo e porcentagem de explantes oxidados, necrosados e contaminados devido ao reaparecimento da *Agrobacterium tumefaciens* na cultura. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 4 repetições por tratamento, considerando-se a placa de Petri como unidade experimental com 10 explantes cada. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de Duncan ao nível de 5% de significância para a comparação das médias dos tratamentos.

## 4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.3.1 Susceptibilidade de *E. camaldulensis* à canamicina

No experimento inicial com canamicina, todos os tratamentos aplicados foram altamente fitotóxicos para explantes cotiledonares, conforme dados apresentados na Tabela 21. Estes resultados demonstram que a suplementação do meio de cultura com 10 mg L<sup>-1</sup> de canamicina, apesar de promover a perda de 43,3% dos explantes, ainda possibilitou a formação de calos (56,7%), fato este não observado nos demais tratamentos. Assim, conclui-se que o intervalo utilizado entre as concentrações definidas para este teste de tolerância/resistência, não foi adequado para a indicação da dose letal mínima do agente seletivo.

TABELA 21 – Efeito do agente seletivo canamicina na calogênese e organogênese de cotilédones de *E. camaldulensis*, após 60 dias de cultivo.

Km (mg L <sup>-1</sup> )	Calogênese (%)	Calo com gema (%)	Nº broto calo <sup>-1</sup>	Oxidação/necrose (%)
0	40,0 a	60,0 a	4,0 a	0,0 c
10	56,7 a	0,0 b	0,0 b	43,3 b
20	0,0 b	0,0 b	0,0 b	100,0 a
40	0,0 b	0,0 b	0,0 b	100,0 a
60	0,0 b	0,0 b	0,0 b	100,0 a
80	0,0 b	0,0 b	0,0 b	100,0 a

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Duncan ( $p \leq 0,05$ )

Na Tabela 22 são apresentados os valores médios dos parâmetros avaliados no segundo experimento realizado, com concentrações de canamicina menores às aplicadas no experimento anterior.

TABELA 22 – Efeito do agente seletivo canamicina, em concentrações  $\leq 12 \text{ mg L}^{-1}$ , na calogênese e organogênese de cotilédones de *E. camaldulensis*, após 60 dias de cultivo.

Km ( $\text{mg L}^{-1}$ )	Calogênese (%)	Calo com gema (%)	Nº broto calo <sup>-1</sup>	Oxidação/necrose (%)
0	37,5 ab	60,0 a	3,2 a	2,5 c
3,0	52,5 a	32,5 a	1,5 b	15,0 c
6,0	30,0 b	10,0 b	0,2 c	60,0 b
9,0	32,5 ab	0,0 b	0,0 c	67,5 b
12,0	5,0 c	0,0 b	0,0 c	95,0 a

Média de dois experimentos, onde médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Duncan ( $p \leq 0,05$ )

Os resultados demonstram que a capacidade calogênica e organogênica dos explantes cotiledonares de *E. camaldulensis* foi fortemente influenciada pelo agente seletivo utilizado, pois a partir de  $3,0 \text{ mg L}^{-1}$  de canamicina, mesmo com 1,5 brotações/calos ocorreu uma redução de 50% nas médias obtidas para formação de calos organogênicos e brotações regeneradas em comparação com o tratamento controle (Tabela 22).

Com o aumento gradativo na concentração da canamicina, a divisão celular foi reduzida, sendo que com  $6,0 \text{ mg L}^{-1}$  aconteceu somente em 30% dos explantes, resultado muito menor que aquele obtido com os tratamentos com  $3,0 \text{ mg L}^{-1}$  e controle (52,5 e 37,5%, respectivamente). A perda de explantes aumentou com o aumento da concentração do antibiótico ao meio, o qual inibiu a organogênese e conferiu-lhes aspecto clorótico ou necrótico ao final de 60 dias da cultura *in vitro* (Figura 13). Esta elevada toxicidade da Km em tecidos de eucalipto tem sido observada por diversos autores, como GONZÁLEZ (2002) em *E. grandis*, diferentemente de espécies onde existe considerável tolerância/resistência a canamicina, como em *Helianthus annuus* (EVERETT et al., 1987). Dentro do gênero *Eucalyptus* são encontradas respostas muito variáveis aos diferentes antibióticos aminoglicosilados, caracterizado como uma resposta espécie-dependente, como por exemplo em *E. globulus* (MORALEJO et al., 1998) e *E. grandis* x *E. urophylla* (CHEN et al., 1996), onde a concentração letal mínima de Km foi  $75 \text{ mg L}^{-1}$  e  $40 \text{ mg L}^{-1}$ , respectivamente.

Para ANGENON et al. (1994), o sucesso na definição de um antibiótico seletivo depende das características do antibiótico e do material vegetal, como no caso do gênero *Eucalyptus*, que apresenta respostas muito variáveis aos diferentes antibióticos aminoglicosilados. No caso do *E. camaldulensis*, HO et al. (1998) observaram que o cultivo de hipocótilos na presença de  $20 \text{ mg L}^{-1}$  de canamicina provocou uma redução na formação de calos e de brotações e, com  $40 \text{ mg L}^{-1}$ , a inibição da regeneração foi completa. MULLINS et al. (1997), por sua vez, concluíram que  $9,0 \text{ mg L}^{-1}$  de canamicina foi suficiente para inibir



a regeneração de brotações adventícias em alguns clones desta mesma espécie, sendo a mesma concentração mínima letal encontrada no presente trabalho. Também YEPES e ALDWINCKLE (1994) consideraram a canamicina como inibidora da regeneração de macieira em concentrações baixas. CERVERA et al. (1998), no entanto, ressaltam que quanto menor a pressão de seleção do antibiótico, maior a probabilidade do aparecimento de plantas escapes, devido provavelmente à proteção das células não transformadas pelas células transformadas vizinhas.

Também se observou que os tratamentos de maior concentração do agente seletivo apresentaram maior perda de explantes devido à oxidação ou necrose do tecido. Segundo PICOLI et al. (2002), a ocorrência de necrose, exudação fenólica e oxidação do explante são ainda um problema a ser mais investigado em protocolos de regeneração no gênero *Eucalyptus*, porém a inclusão do antibiótico seletivo no meio de cultura proporcionou maior toxicidade e favoreceu a liberação desses compostos, conforme pode ser observado o aspecto do tecido em cada tratamento na Figura 13 E-F.

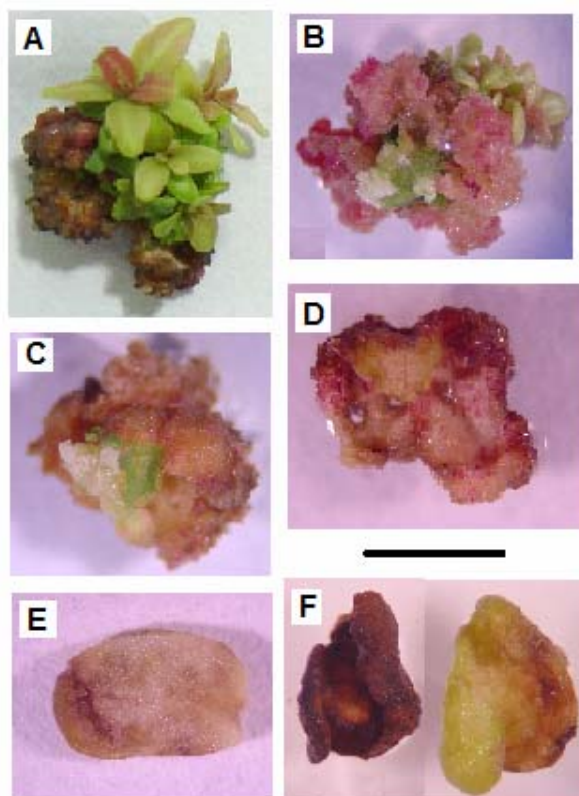


FIGURA 13 – Efeito de concentrações do antibiótico seletivo canamicina (Km) em explantes cotiledonares de *E. camaldulensis*, após 60 dias de cultura *in vitro*. A - tratamento controle (meio de organogênese sem antibiótico); B - meio com 3,0 mg L<sup>-1</sup> de Km; C - meio com 6,0 mg L<sup>-1</sup> de Km; D - meio com 9,0 mg L<sup>-1</sup> de Km; E e F - meio com 12,0 mg L<sup>-1</sup> de Km. Barra = 1 cm.

#### 4.3.2 Avaliação do efeito de antibióticos na eficiência da organogênese de explantes cotiledonares de *E. camaldulensis*

Todas as variáveis avaliadas na cultura de explantes cotiledonares de *E. camaldulensis* em meio de cultura MCAC na presença de antibióticos apresentaram diferença estatística significativa entre si (Tabela 23).

A ocorrência de contaminação da cultura devido ao reaparecimento da agrobactéria ocorreu nos tratamentos 3, 4, 7, 8, 9, 10 e 11, com perdas variando de 97,5% a 2,5% de explantes. Com exceção do tratamento 11, os demais tratamentos tiveram os antibióticos suprimidos do meio de cultura após 30 dias. Nestes casos, a concentração e tempo de aplicação no meio de cultura do antibiótico utilizado não foram suficientes para a eliminação da agrobactéria. No tratamento 11, mesmo contendo antibiótico até o 60º dia de cultura, a concentração inicial de 500 mg L<sup>-1</sup> de cefotaxima por sete dias foi insuficiente para a desinfecção inicial completa do material. Esses resultados indicam a necessidade da manutenção do agente bactericida durante toda a fase de produção de plantas transformadas *in vitro*, nas condições aplicadas neste trabalho. MAYOLO *et al.* (2003) indicam que a *Agrobacterium* também não foi eliminada durante a transformação genética de *Theobroma cacao* em cultura suplementada com cefotaxima a 100 e 300 mg L<sup>-1</sup>, sendo responsável pela contaminação de 8% e 15% de explantes respectivamente.

TABELA 23 - Efeito de cefotaxima e Augmentina na calogênese, organogênese e contaminação de explantes cotiledonares de *E. camaldulensis* após 60 dias de cultura *in vitro*.

Tratamento	Calogênese (%)	Calo com gema (%)	Nº broto calo <sup>-1</sup>	Oxidação (%)	Contaminação (%)
1	55,0 abc	35,0 abc	1,3 d	10,0 ab	0,0 d
2	52,5 abc	45,0 ab	4,2 b	2,5 cd	0,0 d
3	0,0 e	5,0 ef	0,7 e	0,0 d	95,0 a
4	17,5 de	25,0 bcde	1,4 d	0,0 d	57,5 b
5	72,5 b	27,5 bcd	2,5 c	0,0 d	0,0 d
6	45,0 bcd	55,0 ab	5,4 a	0,0 d	0,0 d
7	2,5 e	0,0 f	0,0 f	0,0 d	97,5 a
8	35,0 cd	7,5 def	0,1 f	2,5 cd	55,0 b
9	5,0 e	0,0 f	0,0 f	0,0 d	95,0 a
10	55,0 abc	7,5 def	0,1 f	5,0 cd	32,5 c
11	77,5 a	7,5 def	0,1 f	12,5 a	2,5 d
12	77,7 a	22,3 cde	1,5 d	0,0 d	0,0 d
controle	27,5 cde	72,5 a	5,4 a	0,0 d	0,0 d

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Duncan ( $p \leq 0,05$ )

A ocorrência da oxidação nos tratamentos 1, 2, 8, 10 e 11 sugere a toxicidade do antibiótico nos explantes de *E. camaldulensis*, observada principalmente nos estágios iniciais de diferenciação celular e regeneração, devido às concentrações elevadas de cefotaxima ( $500 \text{ mg L}^{-1}$ ) e de Augmentina® ( $300 \text{ mg L}^{-1}$ ) destes tratamentos. Também, na transformação genética de *E. camaldulensis* com explantes foliares (MULLINS et al., 1997), hipocótilos e cotilédones (HARCOURT et al., 2000), conclui-se que  $200 \text{ mg L}^{-1}$  de cefotaxima não afetou a capacidade morfogênica dos explantes, enquanto que em segmentos nodais da mesma espécie, definiu-se esta concentração entre  $300$  e  $500 \text{ mg L}^{-1}$  (KAWASU et al., 1996).

Com relação ao número médio de brotações por calo, a redução da concentração de Augmentina® de  $300 \text{ mg L}^{-1}$  à metade (15 dias), seguido por  $100 \text{ mg L}^{-1}$  (30 dias) no tratamento 6, possibilitou a formação de número médio de brotações igual ao do tratamento controle (5,4 brotações por calo). Apesar de resultados satisfatórios para várias culturas, poucos são os relatos encontrados de utilização da Augmentina® no gênero *Eucalyptus*. Para o híbrido *E. grandis* x *E. urophylla*, TOURNIER et al. (2003) adotaram a concentração de  $300 \text{ mg L}^{-1}$  desse antibiótico sem prejuízo para a cultura e transformação da espécie.

Na presença de cefotaxima, houve menores taxas de regeneração com 1,3 e 2,5 brotações/calos, nos tratamentos 1 e 5 respectivamente, contendo  $500 \text{ mg L}^{-1}$  deste antibiótico por 15 e 30 dias respectivamente. As baixas porcentagens observadas nestes tratamentos podem ser atribuídas a diferentes graus de toxicidade deste antibiótico para a maioria dos tecidos vegetais como mencionado por POLLOCK et al. (1983). Para algumas culturas vegetais, os antibióticos têm apresentado comportamento distinto, podendo exercer caráter fitotóxico e deletério ou, ao contrário melhorar a eficiência da transformação (SARMA et al., 1995; PICOLI, 2000; PICOLI et al., 2002). Apesar do efeito positivo da cefotaxima para culturas como o tabaco (SHACKELFORD e CHLAN, 1996), no gênero *Eucalyptus*, a carbenicilina e timentina têm apresentado melhores resultados, devido possivelmente, ao efeito hormonal que estas penicilinas podem exercer sobre a morfogênese. SARMA et al. (1995) e LIN et al. (1995) afirmam que a Cx tem uma atuação similar à de uma auxina e assim o agente bactericida exerceria maior efeito na formação de calos, reduzindo a capacidade de regeneração do explante.

Para outras espécies como *E. globulus*, *E. grandis*, *E. nitens*, *E. dunnii*, *E. pellita*, *E. robusta*, *E. saligna* e o híbrido *E. grandis* x *E. urophylla*, a cefotaxima também tem sido mais freqüentemente utilizada com concentrações de  $200$  a  $600 \text{ mg L}^{-1}$ , além da carbenicilina, timentina e amoxicilina (MACHADO et al., 1997; MORALEJO et al., 1998; GONZÁLEZ, et al. 2000; SPOKEVICIUS et al., 2005). GUIDOLIN (2003), por sua vez, obteve, com elevada

concentração de cefotaxima (500 mg L<sup>-1</sup>), menor nível de interferência do antibiótico no desenvolvimento de calos organogênicos de *Phaseolus vulgaris* enquanto DUHEM et al. (1988), aplicando cefotaxima e amoxicilina em café e cacau, obtiveram baixa eficiência no controle da agrobactéria após a infecção de explantes, além da oxidação dos tecidos. Entretanto, estas diferenças obtidas para uma mesma espécie estão associadas principalmente a diversos fatores que determinam a eficiência do antibiótico no controle da infecção tais como: cepa bacteriana e tecido vegetal utilizado.

Outro fator que pode ter exercido influência no resultado da regeneração é a variabilidade genética do material vegetal utilizado, originado de sementes obtidas de população com polinização cruzada e, de acordo com ALLARD (1971), característica da espécie. Segundo vários autores, esta variação genotípica apresentada por determinadas espécies recalcitrantes como no gênero *Eucalyptus*, onde a regeneração via organogênese indireta é bastante difícil, pode influenciar negativamente o processo de morfogênese *in vitro*, principalmente o desenvolvimento de protocolos de transformação (LAINÉ e DAVID, 1994; TIBOK et al., 1995; BARRUETO CID et al., 1999).

#### 4.4 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos nas condições experimentais estabelecidas para este trabalho pode-se concluir que:

- O antibiótico aminoglicosilado canamicina é adequado para a seleção de células transformadas de *E. camaldulensis* na concentração de 9 mg L<sup>-1</sup>;
- Após transformação genética de explantes de *E. camaldulensis* com a cepa C58C1, o antibiótico bactericida deve ser mantido no meio de cultura durante todo o processo de regeneração e produção de plantas transgênicas *in vitro*;
- A manutenção de cefotaxima e Augmentina<sup>®</sup> no meio de cultura, nas maiores concentrações testadas e por períodos prolongados, leva à necrose e morte dos explantes;
- A Augmentina<sup>®</sup> mostrou-se eficiente na eliminação da *A. tumefaciens*, possibilitando maior regeneração de brotações a partir de explantes cotiledonares.

#### 4.5 REFERÊNCIAS

ALLARD, R.W. **Princípios do melhoramento genético das plantas**. São Paulo: Edgard Blücher, 1971. 381 p.

ANGENON, G.; DILLEN, W.; VAN MONTAGU, M. Antibiotic resistance markers for plant transformation. In: Gelvin, S.B., Schilperoort, R.A. **Plant molecular biology manual**. Kluwer, Dordrecht, 1994. p. 1–13

BARRUETO CID, L.P.; 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.

BENVENISTE, R.; DAVIES, J. Mechanisms of antibiotic resistance in bacteria. **Annual Review of Biochemistry**, v.42, p. 315-319, 1973.

BRASILEIRO, A. C. M.; DUSI, D. M. A. Transformação genética de plantas. v.2, In: TORRES, A. C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J. A.. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA–SPI/EMBRAPA–CNPQ, 1999. p.679–735.

BRASILEIRO, A.C.M.; ARAGÃO, F.J.L. Marker genes for *in vitro* selection of transgenic plants. **Journal of Plant Biotechnology**, v.3, n.3, p. 113-121, 2001.

BRASILEIRO, A.C.M.; LACORTE, C. Interação *Agrobacterium*-hospedeiro. In: Brasileiro, A.C.M., Carneiro, V.T.C. **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília, Brasil. Embrapa-SPI/Embrapa-Cenargen, p.75-92, 1998.

CERVERA, M.; PINA, J.A.; JUÁREZ, J.; NAVARRO, L.; PENA, L. *Agrobacterium*-mediated transformation of citrange: factors affecting transformation and regeneration. **Plant Cell Reports**, v.18, n.3-4, p. 271-278, 1998.

CHEN, Z.; TSAY, J.; CHUNG, J. Callus culture of *Eucalyptus grandis* x *urophylla* and preliminary studies on organogenesis and *Agrobacterium*-mediated transformation. **Taiwan Journal of Forest Sciences**, v.11, n.1, p.43-52, 1996.

DUHEM, F.; MERCIER, N.; BOXUS, P. Difficulties in the establishment of axenic *in vitro* cultures of field collected coffee and cacao germplasm. **Acta Horticulturae**, v. 225, p. 67-75, 1988.

EVERETT, N.P.; ROBINSOS, K.E.P.; MASCARENHAS, D. Genetic engineering of sunflower (*Helianthus annuus* L.). **Biotechnology**, v.5, p.1201-1204, 1987.

GONZÁLEZ, E.R. **Transformação genética de *Eucalyptus grandis* e do híbrido *E. grandis* x *E. urophylla* via *Agrobacterium***. Piracicaba, 2002. 93 f. Tese (Doutorado, Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

GONZÁLEZ, E.R.; ANDRADE, A. de; BERTOLO, A.L.; LACERDA, G.C.; CARNEIRO, R.T.;

DEFÁVARI, V.A.P.; LABATE, C.A. The efficiency of aminoglycoside antibiotics in the regeneration and selection of *Eucalyptus* spp. **Proceedings**. In: International Conference *Eucalyptus* in the Mediterranean basin: perspectives and new utilization. Italy, p.45-48, 2000.

GUIDOLIN, A.F. **Regeneração de plantas de *Phaseolus vulgaris* L. a partir de calos e transformação genética via *Agrobacterium***. Piracicaba, 2003. 100 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – CENA, Universidade de São Paulo.

HARCOURT, R.L.; KYOZUKA, J.; FLOYD, R.B.; BATEMAN, K.S.; TANAKA, H.; DECROOQ, V.; LLEWELLYN, D.J.; ZHU, X.; PEACOCK, W.J.; DENNIS, E.S. Insect and herbicide resistant transgenic eucalypts. **Molecular Breeding**, v. 6, p. 307-315, 2000.

HO, C.K.; CHANG, S.H.; TSAY, J.Y.; TSAI, 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.

KAWAZU, T.; DOL, K.; TATEMACHI, Y.; ITO, K.; SHIBATA, M. Regeneration of transgenic plants by nodule culture systems in *Eucalyptus camaldulensis*. In: CONFERENCE OF TREE IMPROVEMENT FOR SUSTAINABLE TROPICAL FORESTRY, 1996, Caloundra. **Proceedings**. Caloundra: IUFRO, 1996. p.492-497.

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

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

LIN, J-J; ASSAD-GARCIA, N.; KUO, J. Plant hormone effect of antibiotics on the transformation efficiency of plant tissues by *Agrobacterium tumefaciens* cells. **Plant Science**, v.109, p.171–177, 1995.

MACHADO, L.O.R.; ANDRADE, G.M., CID, L.P.B., PENCHEL, R.M. *Agrobacterium* strain specificity and shooty tumour formation in eucalypt (*Eucalyptus grandis* × *Eucalyptus urophylla*). **Plant Cell Reports**, v. 16, p. 299-303, 1997.

MAYOLO, G.A. de; MAXIMOVA, S.N.; PISHAK, S.; GUILTINAN, M.J. Moxalactam as a counter-selection antibiotic for *Agrobacterium* mediated transformation and its positive effects on *Theobroma cacao* somatic embryogenesis. **Plant Science**, v.164, p. 607-615, 2003.

MORALEJO, M.; ROCHANGE, F.; BOUDET, A.M.; TEULIÉRES, C. Generation of transgenic *Eucalyptus globulus* plantlets through *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 25, n.2, 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**, p.787-791, 1997.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio-assays 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.

PICOLI, E.A.T. **Morfogênese *in vitro* e transformação genética de berinjela (*Solanum melongena* L. cv. Embú) mediada por *Agrobacterium tumefaciens***. Viçosa, 2000. Dissertação. (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

PICOLI, E.A.DE T.; CECON, P.R.; FÁRI, M.G.; OTONI, W.C. Organogenesis in eggplant (*Solanum melongena* L. cv. Embú) as affected by antibiotics and growth regulators. **International Journal of Horticultural Science**, v. 8, n. 2, p. 76-82, 2002.

POLLOCK, K.; BARFIELD, D.G.; SHIELDS, R. The toxicity of antibiotics to plant cell cultures. **Plant Cell Reports**, v.2, p.36–39, 1983.

POTRYKUS, I.; SPANGENBERG, G.G. **Gene transfer to plant**. Springer: Laboratory Manual, 1995. 328p.

SARMA, K.S.; EVANS, N.E.; SELBY, C. Effect of carbenicillin and cefotaxime on somatic embryogenesis of sitka spruce (*Picea sitchensis* (Bong.) Carr.). **Journal of Experimental Botany**, v. 46, n. 292, p.1779-1781, 1995.

SHACKELFORD, N.J.; CHLAN, C.A. Identification of antibiotics that are effective in eliminating *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.14, p.50-57, 1996.

SPOKEVICIUS, A.V.; VAN BEVEREN, K.; LEITCH, M.A.; BOSSINGER, G. *Agrobacterium*-mediated *in vitro* transformation of wood-producing stem segments in eucalypts. **Plant Cell Reports**, v. 23, n. 9, p. 617-624, 2005.

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.; TEULIÈRES, C. An efficient procedure to stably introduce genes into an economically important pulp tree (*Eucalyptus grandis* × *Eucalyptus urophylla*). **Transgenic Research**, v. 12, p. 403–411, 2003.

YEPES, L.M.; ALDWINCKLE, H.S. Factors that affect leaf regeneration efficiency in apple, and effect of antibiotics in morphogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 37, n. 3, p. 257-269, 1994.



## 5 AVALIAÇÃO DA REGENERAÇÃO DE GEMAS E DA EXPRESSÃO TRANSIENTE DO GENE *gus* SOB CONTROLE DO PROMOTOR *cgMT1* EM *Eucalyptus camaldulensis* TRANSFORMADO VIA *Agrobacterium tumefaciens*

### Resumo

Além do protocolo de regeneração *in vitro* existem diversos fatores que podem afetar a eficiência da transformação genética via *Agrobacterium tumefaciens*. Dentre estes fatores estão o cultivo da cepa, o tipo de explante, o genótipo, as condições de incubação e co-cultivo, além de tratamentos de pré-cultura do tecido hospedeiro. Visando estabelecer condições adequadas para a transformação genética de *Eucalyptus camaldulensis* via co-cultivo com *Agrobacterium tumefaciens*, este trabalho teve como objetivo estudar o efeito de diferentes fatores relacionados ao cultivo e a condição de incubação da agrobactéria e tipos de tratamentos do explante na eficiência de transformação. Segmentos foliares e cotilédones foram co-cultivados com a linhagem de *A. tumefaciens* C58C1 contendo o vetor binário pBIN19, com a construção P*cgMT1*-GUS-NOS, com o gene repórter *uidA* sob controle do promotor do gene *cgMT1* e o gene de seleção *nptII*, da neomicina fosfotransferase, sob controle do promotor NOS da nopalina sintetase. Na transformação dos explantes cotilédones e foliares foram avaliados os efeitos dos fatores a seguir: meios de cultura bacteriana YEB, MYA e LB, meios de inoculação (MS/2, MS, MS + 1 g L<sup>-1</sup> de inositol, MS + LB e LB), duração da co-cultura (0, 24, 48 e 72 horas), pré-cultura do explante (0, 24, 48, 72 e 96 horas), além de três genótipos. A eficiência da transferência do DNA da *Agrobacterium tumefaciens* para o explante foi influenciada tanto pelo tipo de tecido quanto pelas condições de crescimento da agrobactéria e pela interação entre a bactéria e o tecido vegetal. Apesar do meio de crescimento bacteriano não exercer influência significativa na regeneração, o meio LB favoreceu a necrose de explantes. Os meios de ressuspensão da bactéria tiveram pouco efeito sobre o processo de regeneração dos explantes cotilédones e nenhum efeito no caso dos explantes foliares. A resposta organogênica foi superior quando a co-cultura foi realizada por 48 horas em ambos tipos de explantes. O pré-cultivo por 48 ou 72 horas em meio MCAC (MS com 4,4 µM de BAP, 2,7 µM de ANA, 2% de sacarose, 0,6% de ágar e água de coco a 10%) favoreceu a integração do T-DNA com formação de plantas transformadas putativas mas não a regeneração de gemas. Os três genótipos apresentaram diferenças no comportamento perante a transformação genética. Formaram-se 45 plantas transformadas putativas por organogênese indireta a partir de explantes foliares e 178 plantas transformadas putativas a partir de explantes cotilédones. Palavras-chave: planta transgênica, metalotioneína, meio de cultura, co-cultura, pré-cultura, genótipo.

## 5 EVALUATION OF BUD REGENERATION AND TRANSIENT EXPRESSION OF GENE *gus* UNDER CONTROL OF *cgMT1* PROMOTOR IN TRANSFORMED *Eucalyptus camaldulensis* USING *Agrobacterium tumefaciens*

### Summary

In addition to the *in vitro* regeneration protocol, there are several factors that can affect the efficiency of genetic transformation through *Agrobacterium tumefaciens*. These factors include the bacteria culture conditions, the explant type, the plant genotype, the incubation and co-cultivation conditions, as well as pre-culture treatments of the host tissues. Seeking to establish appropriate conditions for the *Eucalyptus camaldulensis* genetic transformation mediated by *A. tumefaciens*, the objective of this experiments was to study the effect of different factors on the regeneration efficiency of transformed plants: cultivation and incubation conditions of the agrobacteria and types and treatments of the explant. Leaf and cotyledonary explants were co-cultivated with the *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 strain carrying the binary vector pBIN19, containing the construction P*cgMT1*-*GUS*-*NOS*, with the reporter gene *gus* under control of the promoter *cgMT1* and the selection gene *nptII*, of the neomycin phosphotransferase, under control of the *NOS* promoter (nopaline synthase). The effects of the following factors were evaluated: bacterial suspension media YEB, MYA and LB, infection medium (MS/2, MS, MS + 1 g L<sup>-1</sup> inositol, MS + LB and LB), co-culture duration (0, 24, 48 and 72 hours), explant pre-culture (0, 24, 48, 72 and 96 days) and three genotypes. Based on the results obtained in the experimental conditions established in this study, it can be observed that the efficiency of the *A. tumefaciens* DNA transfer to the explant depends as much on the tissue type as on the conditions of growth of the agrobacteria and on the interaction between the bacterium and the plant tissue. Although the bacterial suspension medium did not influence significantly on the regeneration, LB medium favored explant necrosis. The use of bacterium resuspension medium had little influence on the process of regeneration of the cotyledonary explants and had no effect in the case of the leaf explants. The organogenesis was better when the co-culture lasted 48 hours in both types of explants. The pre-culture of the explants for 48 or 72 hours in MCAC medium (MS with 2% sucrose, 0,6% agar, 10% coconut water, BAP 4,4 µM and NAA 2,7 µM) favored T-DNA integration, with production of putative transformed plants. The three genotypes presented differences in their response to genetic transformation. It was possible to produce 45 putative transformed plants by indirect organogenesis from leaf explants and 178 from cotyledonary explants.

Key-words: Transgenic plant, metalothionein, *gus* gene, culture medium, co-culture, pre-culture, genotype.

## 5.1 INTRODUÇÃO

A combinação de técnicas de biologia molecular, cultura de tecidos e transferência de genes representa uma ferramenta poderosa para introduzir novas características em uma determinada planta (BRASILEIRO, 1998). Nesta combinação, independentemente da técnica de transformação genética utilizada, é necessário dispor de um transgene e de uma metodologia eficiente para sua transferência para o genoma vegetal. Uma vez introduzido na célula, a geração de plantas a partir do tecido transformado deve ser realizada por meio de técnicas de cultura de tecidos *in vitro*, enquanto a análise molecular das plantas regeneradas é aplicada para identificar aquelas que contenham e expressem o transgene nos níveis desejados (ANDRADE, 2003).

No âmbito florestal, a aplicação destas novas ferramentas biotecnológicas deve combinar o desenvolvimento de árvores superiores com métodos clássicos de melhoramento e possibilitar a multiplicação em larga escala do material genético melhorado a partir de seleção genotípica. O melhoramento florestal clássico é freqüentemente visto como uma condição prévia para a utilização efetiva de técnicas sofisticadas de biotecnologia, visto que a tecnologia de transferência de genes pode contribuir para minimizar as limitações intrínsecas do melhoramento de espécies arbóreas, que dizem respeito ao longo tempo necessário para a obtenção de novas gerações e a grande variabilidade existente dentro e entre espécies (DI CIERO e AMARAL, 2002).

Algumas características de interesse para espécies florestais já foram introduzidas pelas técnicas de transformação genética e avaliadas em testes no campo, como modificação da composição/teor de lignina, resistência a pragas, alta produção de biomassa, esterilidade e adaptabilidade a condições de estresse abiótico variadas, e recentemente geração de plantas de interesse para a fitorremediação (MANDERS et al., 1992; JOUANIN et al., 1993; HAINES, 1994; TZFIRA et al., 1998; RISHI et al., 2001).

O uso destas plantas representa uma solução de baixo custo para muitas áreas contaminadas, visto que por meio da manipulação genética é possível criar plantas adequadas para as diversas situações de limpeza ambiental, no que diz respeito a superior capacidade para o acúmulo e/ou metabolismo e a resistência a concentrações elevadas de metais pesados combinada a uma elevada produção de biomassa (SALT et al., 1995; MACEK et al., 2000).

LAPLAZE et al. (2002) demonstraram este potencial com o isolamento e clonagem, a partir de células de nódulos de raízes de *Casuarina glauca*, do gene que codifica uma proteína denominada metalotioneína à qual é atribuída a proteção das células quando em condições de concentrações excessivas de metais pesados. Este trabalho teve como objetivo estudar a função do *MT1* em plantas actinorizais, onde este gene foi fusionado ao gene *gus* e introduzido em plantas de *C. glauca*, *Arabidopsis thaliana* e *Nicotiniana tabacum*. A análise da expressão do gene *gus* demonstrou que o promotor do *cgMT1* foi mais ativo nas raízes, no sistema vascular e nas partes mais velhas da planta, sugerindo que este gene possa estar associado ao transporte de metais pesados através da planta. Estes resultados indicaram que o gene pode ser introduzido em outras plantas, podendo estas então funcionar como fitoextratoras de metais em ambientes contaminados, permanecendo por muitos anos no terreno a ser tratado, além de contribuir para o entendimento das funções da proteína nas plantas.

Com características atrativas para este uso, destaca-se o *Eucalyptus*, uma das mais importantes espécies florestais de interesse econômico mundial, chegando a alcançar taxas de crescimento de 100 m<sup>3</sup>/ha/ano com ciclos de 5-7 anos (HORNG et al., 1991). Diversos autores demonstraram a factibilidade da transformação genética via co-cultivo com *A. tumefaciens* de *E. globulus* e *Eucalyptus camaldulensis* (MULLINS et al., 1997; HO et al., 1998; MORALEJO et al., 1998; HARCOURT et al., 2000), e *E. grandis* x *E. urophylla* (GONZÁLEZ, 2002). Dentre estas espécies, o *E. camaldulensis* além de ser uma espécie adaptada a solos de baixa fertilidade e com deficiência hídrica, reúne características essenciais em uma planta fitoextratora, que são a elevada biomassa, sistema radicular profundo e rápido crescimento (STUDART-GUIMARÃES et al., 2003).

DE BONDT et al. (1994) afirmam que o maior problema enfrentado com a utilização de *Agrobacterium* na transformação de algumas espécies lenhosas é a baixa eficiência, pois a introdução estável de um gene dentro do genoma da planta e a habilidade para regenerar uma planta da célula transformada são dois requerimentos essenciais para a transformação.

De acordo com diversos autores, vários são os fatores que podem afetar a eficiência de transformação genética via *Agrobacterium tumefaciens*, dentre eles citam-se a técnica, o genótipo, a cepa bacteriana utilizada, tratamentos dados aos explantes antes da infecção, composição do meio e fitorreguladores, idade do explante, presença de compostos fenólicos, entre outros (DE BONDT et al., 1994; SRISKANDARAJAH e GOODWIN, 1998).

Como em outras culturas, vários fatores afetam a eficiência da transformação no gênero *Eucalyptus*, sendo considerados como os mais importantes, a cepa bacteriana utilizada, o tipo do promotor presente no transgene, a duração da co-cultura, a presença de

compostos fenólicos, o genótipo, a composição do meio de crescimento bacteriano, o tipo de tecido e tratamento do explante (QUOIRIN e QUISEN, 2006). A transformação genética do *E. camaldulensis* via co-cultivo com *A. tumefaciens* foi relatada por alguns autores (CHEN et al., 1996; KAWAZU et al., 1996; MULLINS et al., 1997; HO et al., 1998; VALÉRIO et al., 2003) sendo, entretanto, os métodos e materiais utilizados distintos entre eles, assim como os resultados obtidos.

Neste sentido, este trabalho teve como objetivo estudar o efeito de fatores relacionados ao cultivo e condição de incubação da agrobactéria, tipos e tratamentos do explante na eficiência de regeneração de plantas transformadas, visando estabelecer condições adequadas para a transformação genética de *Eucalyptus camaldulensis* via co-cultivo com *Agrobacterium tumefaciens*.

## 5.2 MATERIAL E MÉTODOS

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

### 5.2.1. Material vegetal e cultura de tecidos

Foram utilizados explantes oriundos de sementes germinadas *in vitro* de *Eucalyptus camaldulensis* Dehl. provenientes de Área de Produção de Sementes (APS F1) via polinização cruzada, localizada no município de Açailândia, Estado do Maranhão e armazenadas no Setor de Sementes do Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais (IPEF), Piracicaba, São Paulo.

As sementes foram esterilizadas superficialmente por lavagens sucessivas em etanol 70% (v/v) e Tween 20<sup>®</sup> (5 gotas/100 mL) por 2 minutos, solução de hipoclorito de sódio (8% de cloro ativo) durante 30 minutos sob agitação e três lavagens sucessivas em água deionizada estéril. A semeadura foi realizada em placas de Petri com 25 mL do meio de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) com metade da concentração original dos sais (MS/2), 2% de sacarose, 0,6 % de ágar, com pH ajustado em 5,8 e esterilizado em autoclave a 1 atm e 121°C por 20 minutos. A germinação ocorreu a 25 ± 2°C em ausência de luz por sete dias em sala de crescimento seguidos de 5 dias em condições de luz.

Nos experimentos descritos a seguir, os explantes foram co-cultivados com *Agrobacterium tumefaciens* e transferidos para meio de indução de calogênese e regeneração. Para tal, os explantes cotiledonares foram isolados de plântulas de 12-15 dias, com o corte na base do pecíolo, e transferidos com a face adaxial em contato com o meio de cultura de indução de calogênese e regeneração (meio MCAC) que consistiu do meio MS suplementado com 4,4 µM de BAP, 2,7 µM de ANA, 2% de sacarose, 0,6% de ágar (Vetec<sup>®</sup>) e água de coco (Kero-Coco<sup>®</sup>) a 10% (v/v).

Já nos experimentos com explantes foliares, folhas foram excisadas de tufo de culturas-matrizes mantidas em condições *in vitro*, 15 a 20 dias após a última transferência, e

cortadas em dois fragmentos no sentido transversal, para então serem cultivadas com a face abaxial em contato com o meio MS N/2 suplementado com 2,2  $\mu\text{M}$  de BAP, 2,7  $\mu\text{M}$  de ANA, 2% de sacarose, 0,6% de ágar (Vetec<sup>®</sup>) e água de coco marca Kero-Coco<sup>®</sup> a 10% (v/v), denominado como meio MC. Nos ensaios de nº 1 a 4 utilizaram-se folhas do clone 05 e, no ensaio 5 folhas dos clones 04, 05 e 51.

As culturas foram mantidas em sala de crescimento sem luz a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  por 30 dias, e em meio de cultura fresco até o 60º dia 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 horas. Estas condições foram utilizadas para todos os experimentos, exceto nos casos especificados.

### 5.2.2. Cepa bacteriana e vetor primário

Nos experimentos de transformação genética de *E. camaldulensis* utilizou-se a linhagem de *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 contendo o vetor binário pBIN19. O T-DNA dessa linhagem desarmada contém a construção *PcgMT1*-GUS-NOS, com o gene repórter *uidA* sob controle do promotor do gene *cgMT1* (LAPLAZE et al., 2002) e o gene de seleção *nptII*, da neomicina fosfotransferase, sob controle do promotor NOS da nopalina sintetase (Figura 14).

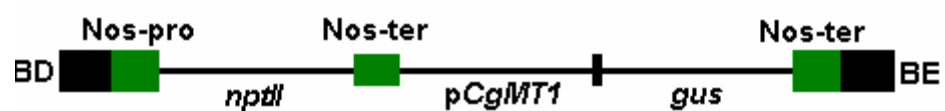


FIGURA 14 – Região T do plasmídeo de transformação genética pBIN19 contendo a construção gênica *PcgMT1*-GUS-NOS, onde: *PcgMT1* é o promotor do gene da MT da *Casuarina glauca*; *nptII*, gene que codifica para neomicina fosfotransferase; *gus*, gene que codifica para a  $\beta$ -glucuronidase; NOS-pro, promotor do gene da nopalina sintetase da *A. tumefaciens*; NOS-ter, terminador do gene da nopalina sintetase da *A. tumefaciens*; BD, borda direita do T-DNA; BE, borda esquerda do T-DNA.

### 5.2.3. Condições de crescimento bacteriano

O cultivo da cepa C58C1 foi realizado em meio YEB sólido (ANEXO 1) com canamicina (Km) a  $50 \text{ mg L}^{-1}$  no escuro a  $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$  por 48 horas visando a obtenção de inóculo para a preparação da suspensão de células bacterianas. Colônias isoladas foram inoculadas em 5 mL de meio líquido contendo canamicina, contendo antibiótico de seleção canamicina. A suspensão foi mantida em agitador rotatório a 120 rpm por 16 horas, na ausência de luz a  $28^\circ\text{C}$ , quando atingia densidade ótica a 600 nm ( $\text{DO}_{600\text{nm}}$ ) entre 0,6 e 1,0.

A cultura líquida foi preparada a partir de uma alíquota de 1 mL da suspensão centrifugada a 5.000 rpm por 10 minutos, seguida da ressuspensão do precipitado por meio de diluição até a obtenção de  $\text{DO}_{600 \text{ nm}} = 0,5$ .

### 5.2.4. Condições gerais de inoculação

Os explantes foram co-cultivados em suspensão bacteriana e agitados a 120 rpm por 30 minutos. Em seguida, os explantes foram colocados em papel filtro estéril e transferidos para placas de Petri contendo 25 mL de meio MCAC ou MC, selados com filme plástico e incubados a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  em ambiente escuro.

Após a inoculação, os explantes foram secos em papel filtro estéril e cultivados em meio MCAC ou MC contendo  $300 \text{ mg L}^{-1}$  de Augmentina e  $9 \text{ mg L}^{-1}$  de canamicina a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  na ausência de luz por 30 dias. Ao final de quatro semanas, as culturas foram transferidas para os mesmos meios contendo  $150 \text{ mg L}^{-1}$  de Augmentina<sup>®</sup> e  $9 \text{ mg L}^{-1}$  de canamicina e mantidos em sala de crescimento a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  em condição de luz por 60 dias (cultura de cotilédones) ou 90 dias (cultura de folhas). Nos ensaios com explantes foliares foram realizados mais um ou dois subcultivos após o 60º dia, com 30 dias cada.



### 5.2.5. Ensaios para a determinação de condições de maior eficiência da transformação genética

Os itens a seguir descrevem experimentos em seqüência, onde, *a priori*, definiu-se que o melhor resultado obtido na expressão transiente para um determinado parâmetro seria adotado como padrão para o ensaio seguinte (Figura 15). O tratamento controle caracterizou-se por cultura de explantes não transformados em meio de calogênese e regeneração (MCAC ou MC) e mantido nas mesmas condições de crescimento que os demais tratamentos. Todos os experimentos foram repetidos duas vezes.

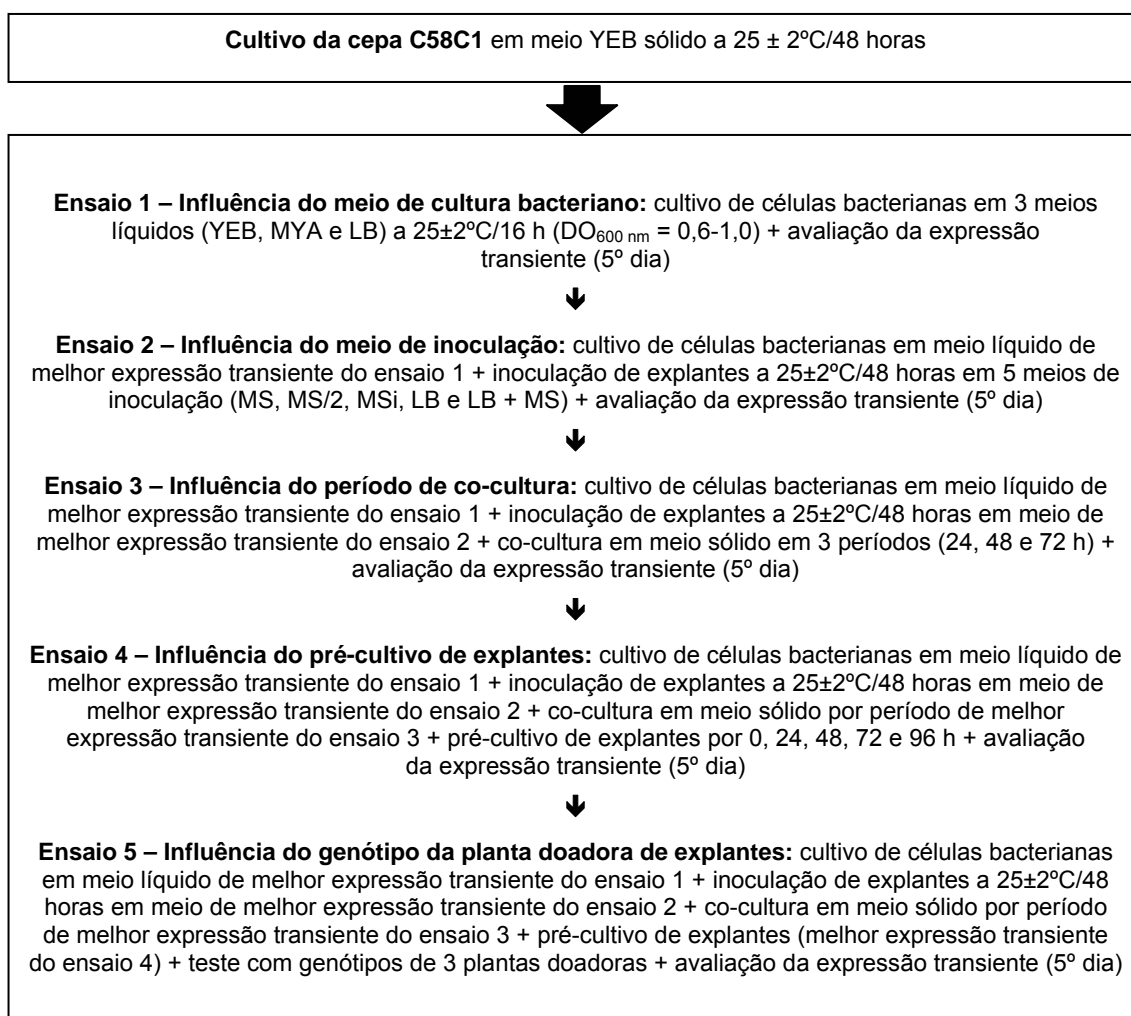


FIGURA 15 – Representação esquemática da seqüência de experimentos com explantes cotiledonares e foliares de *E. camaldulensis* visando a determinação de condições de maior eficiência na transformação genética via co-cultivo com *A. tumefaciens*.

#### 5.2.5.1 Ensaio 1 - Influência do meio de cultura bacteriana

As células bacterianas foram cultivadas a 28°C por 16 horas em agitador rotatório a 120 rpm em meio de cultura YEB, MYA ou LB (ANEXO 1), contendo 50 mg L<sup>-1</sup> de Km. Nestas condições, a suspensão atingiu densidade ótica a 600 nm (DO<sub>600nm</sub>) entre 0,6 e 1,0. A seguir, a cultura foi submetida à centrifugação e as células ressuspensas em meio MS/2 até DO<sub>600 nm</sub> = 0,5.

Os explantes foliares e cotilédones foram co-cultivados por três dias em placas de Petri contendo 25 mL de meio de cultura de indução de calogênese e regeneração, meio MCAC para cotilédones e MC para folhas, e em seguida transferidos para meio com antibiótico bactericida e agente seletivo (item 5.2.4).

#### 5.2.5.2 Ensaio 2 - Influência do meio de inoculação

As células bacterianas foram cultivadas em meio de crescimento bacteriano de com melhor resultado obtido na expressão transiente para cada tipo de tecido vegetal no Ensaio 1. A suspensão para co-cultura foi preparada a partir de uma alíquota de 1 mL do meio de cultura bacteriano centrifugado a 5.000 rpm por 10 minutos, seguida da ressuspensão do precipitado por meio de diluição nos meios MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), MS com metade da concentração original dos sais (MS/2), MS + 1 g L<sup>-1</sup> de inositol (MSi), Luria-Bertani (LB), e LB + MS (1:1), até DO<sub>600 nm</sub> = 0,5.

Os explantes foram inoculados em suspensão bacteriana e agitados a 120 rpm por 30 minutos. Em seguida, os explantes foram mantidos em co-cultura por 72 horas em placas de Petri contendo 25 mL de meio meio MCAC para cotilédones e MC para folhas e transferidos para meio com antibiótico bactericida e agente seletivo.

#### 5.2.5.3 Ensaio 3 - Influência do período de co-cultura

O meio de crescimento bacteriano e de inoculação utilizados foram selecionados em função dos melhores resultados obtidos na expressão transiente dos ensaios anteriores (Ensaio 1 e 2). Após 24, 48 e 72 horas, os explantes foram transferidos para placas de Petri contendo 25 mL de meio MCAC ou MC, para co-cultivo com *A. tumefaciens*. Em

seguida, os explantes foram cultivados em meio MCAC ou MC com antibiótico bactericida e agente seletivo.

#### 5.2.5.4 Ensaio 4 - Influência do pré-cultivo de explantes cotiledonares e foliares

Antes da infecção e co-cultura, os explantes foram cultivados por 0, 24, 48, 72 e 96 horas em meio MCAC ou MC a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  no escuro. As condições de cultura bacteriana, inoculação e co-cultura aplicadas neste item foram definidas em função do resultado obtido na expressão transiente nos ensaios anteriores.

#### 5.2.5.5 Ensaio 5 - Influência do genótipo da planta doadora na transformação de explantes foliares

Previamente ao estabelecimento do ensaio, três clones (05, 20 e 51), micropropagados e mantidos com subcultivos a cada 20 dias foram selecionados em função da superioridade na multiplicação e vigor *in vitro*. Destas matrizes foram isolados explantes foliares para o co-cultivo com *A. tumefaciens* de acordo com a sequência metodológica mostrada na Figura 14 e os resultados dos ensaios anteriores (meio de cultura bacteriana e inoculação, duração de co-cultura e pré-cultura dos explantes).

#### 5.2.6 Ensaio histoquímico da $\beta$ -glucuronidase

Para cada teste especificado anteriormente, amostras (10 cotilédones e folhas) dos experimentos foram imersos em tampão X-Gluc (JEFFERSON, 1987) contendo: 10 mM  $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 0,1% Triton X-100, 0,1 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 0,5  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  e  $250 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  de 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-glucuronídeo e mantidas em estufa a  $37^\circ\text{C}$  por 16 horas. Após este período, os tecidos foram lavados e imersos em álcool 70%, para a eliminação da clorofila.

### 5.2.7 Avaliação e análise dos dados

A avaliação da expressão transiente do gene *gus* foi realizada cinco dias após início da co-cultura mediante análise de imagem com estimativa visual da porcentagem da área do tecido com coloração azulada em 10 explantes por tratamento. Para esta avaliação foram utilizadas as seguintes referências: a) sem expressão transiente do gene, ou seja, sem coloração azulada no tecido; b) expressão em até 5% da área do tecido; c) expressão em 6-40% da área do tecido; d) expressão em 41-70% da área do tecido e e) 71 a 100% da área do tecido. A expressão estável do gene *gus* foi avaliada ao final de cada ensaio em folhas de clones regenerados utilizando as mesmas referências aplicadas para a expressão transiente.

Ao final de 60 dias (explantes cotiledonares) e 90 dias (explantes foliares) foram avaliados a porcentagem de explantes com calos sem e com gemas, explantes necrosados, explantes não responsivos e o número médio de brotações por calo. Todos os experimentos foram instalados em delineamento experimental inteiramente casualizado com 5 repetições por tratamento, considerando-se a placa de Petri como unidade experimental, com 10 explantes em cada placa. Os dados foram transformados conforme a necessidade de cada ensaio e submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de Duncan a 5% de significância para a comparação das médias dos tratamentos. Todos os ensaios foram repetidos duas vezes e os valores utilizados para a análise foram médias dos valores obtidos nos experimentos.

### 5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 5.3.1. Avaliação de fatores que influenciam a eficiência da transformação genética de *Eucalyptus camaldulensis* via co-cultivo com *Agrobacterium tumefaciens*.

##### 5.3.1.1 Ensaio 1 - Meio de cultura bacteriana

A influência de diferentes meios de cultura bacteriana na transformação genética de *E. camaldulensis* via *A. tumefaciens* foi avaliada inicialmente por meio da expressão transiente da enzima  $\beta$ -glucuronidase em explantes cotiledonares e foliares, onde se considerou como resultado positivo todo e qualquer tecido que apresentou uma ou mais células com coloração azul. Os resultados desta expressão estão apresentados na Figura 16 e Tabela 24.

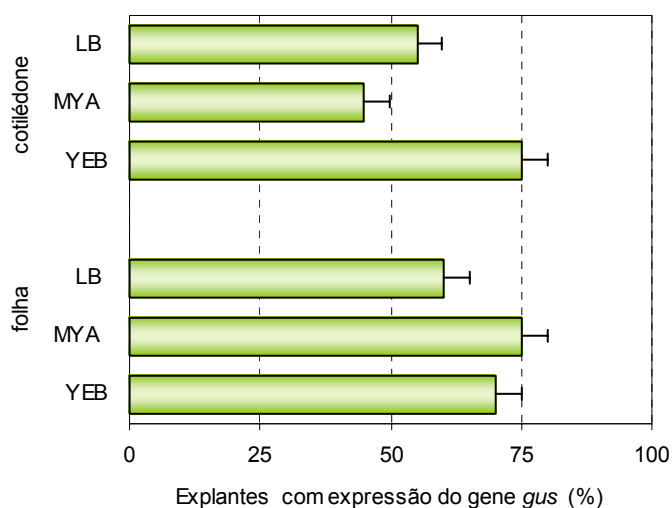


FIGURA 16 – Detecção da expressão do gene *gus* em explantes de *E. camaldulensis* em função do meio de cultura de crescimento bacteriano (YEB, MYA e LB), cinco dias após co-cultivo com *A. tumefaciens*.

Os resultados dos experimentos para ambos tipos de explantes demonstram que os meios influenciaram a taxa de infecção do tecido vegetal pela *A. tumefaciens* (Figura 16). A

maior porcentagem de explantes cotiledonares com expressão do gene *gus* foi observada quando a bactéria foi cultivada em meio YEB (75%), enquanto os meios MYA e LB apresentaram 55% e 45% de tecidos com atividade da  $\beta$ -glucuronidase, respectivamente. No experimento com folhas, estas apresentaram valores de expressão *gus* muito próximos quando as bactérias foram cultivadas nos meios MYA (75%) e YEB (70%), enquanto que esta atividade foi menor para o LB (60%).

Nos explantes cotiledonares, em nenhuma das amostras observou-se expressão da atividade do gene em 100% da área do tecido (Tabela 24), enquanto nas folhas, nos tratamentos com meio YEB e MYA, 5% de explantes ficaram completamente azulados, sendo o MYA responsável pelas maiores porcentagens para as demais classes de área de infecção. Nos explantes foliares, observa-se que quando a bactéria foi cultivada no meio LB, houve maior porcentagem da área dos cotilédones sem expressão da  $\beta$ -glucuronidase (40%) e menor área de expressão em até 5% do tecido (35%).

TABELA 24 – Área dos explantes de *E. camaldulensis* com expressão do gene *gus* em função do meio de cultura de crescimento bacteriano, cinco dias após co-cultivo com *A. tumefaciens*.

Tipo de explante	Meio de cultura bacteriano	Distribuição dos explantes em função da área foliar com expressão <i>gus</i> (%)				
		sem expressão	≤ 5% área	6-40% área	41-70% área	71-100% área
cotilédone	YEB	25	20	35	20	0
	MYA	55	25	10	10	0
	LB	45	20	25	10	0
folha	YEB	30	30	30	5	5
	MYA	25	25	30	15	5
	LB	40	35	20	5	0

A diferença observada no crescimento bacteriano nos diferentes meios testados é resultado da resposta da cepa em função da composição dos meios utilizados, visto que a falta de determinados nutrientes pode ser um fator limitante para o crescimento ótimo de determinadas bactérias. Os meios YEB e MYA são ricos em fonte de carbono, proteínas, nitrogênio, enxofre e co-fatores como o magnésio, fatores estes que podem haver contribuído para uma maior densidade e crescimento bacteriano, resultando em uma maior expressão transiente positiva, enquanto o meio LB é composto por extrato de levedura, triptona e cloreto de sódio. As composições dos meios de cultura bacterianas podem ser muito variadas, desde muito simples contendo um único carboidrato como fonte de energia

e carbono e alguns sais minerais, até mais complexas, contendo várias fontes de carbono e energia, vitaminas e aminoácidos.

O intumescimento do tecido e início da formação de gemas foi visualizado cerca de 15-20 dias após a infecção com a cepa C58C1 em explantes cotiledonares, enquanto nas folhas este processo foi observado após 20-30 dias. No tratamento controle, para ambos tipos de explantes, a regeneração ocorreu na metade do tempo em comparação aos demais tratamentos. Esta diferença deve-se a divisão celular e formação de calos serem mais lentas em tecido transformado atribuído ao efeito detrimental da bactéria sobre as células e tecidos, fato este também observado por PEÑA et al. (1995), em *Citrus* sp.

Os brotos regenerados a partir destes explantes foram excisados ao final da cultura e mantidos em meio de multiplicação para avaliação da expressão estável do gene *gus*. Os resultados da organogênese e da frequência de expressão estável do gene *gus* estão apresentados nas Tabelas 25 e 26.

Após o co-cultivo, os cotilédones apresentaram em média 16% e 13% de explantes necrosados nos tratamentos com meio MYA e LB respectivamente, enquanto para o meio YEB, 6,0% sofreram necrose (Tabela 25). Os explantes foliares exibiram sinais de escurecimento do tecido em função do contato com a suspensão bacteriana, resultando em perda de explantes em todos os tratamentos (Tabela 26). KAWAZU et al. (1996), em experimentos preliminares, também obtiveram maior perda de explantes foliares pela necrose do que os demais tipos de explantes de *E. camaldulensis*, hipocótilos e cotilédones, levando estes autores a utilizarem somente os explantes hipocotiledonares para os demais experimentos realizados.

TABELA 25 – Efeito do meio de crescimento bacteriano na resposta organogênica de explante cotiledonar de *E.camaldulensis* após transformação via co-cultivo com *A. tumefaciens*.

Tratamento	Não responsivo (%)	Calogênese (%)	Calo com gema (%)	Necrose (%)	Broto calo <sup>-1</sup>	Expressão estável
YEB	0,0 b	69,0 a	25,0 b	6,0 bc	1,1 b	25/25 (100%)
MYA	0,0 b	59,0 ab	25,0 b	16,0 a	1,3 b	12/12 (100%)
LB	6,0 a	68,0 a	13,0 c	13,0 ab	0,6 b	24/25 (96%)
controle	0,0 b	51,0 b	49,0 a	0,0 c	2,7 a	-

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Duncan ( $p \leq 0,05$ )

TABELA 26 – Efeito do meio de crescimento bacteriano na resposta organogênica de explante foliar de *E. camaldulensis* após transformação via co-cultivo com *A. tumefaciens*.

Tratamento	Não responsivo (%)	Calogênese (%)	Calo com gema (%)	Necrose (%)	Broto calo <sup>-1</sup>	Expressão estável
YEB	0,0	49,0 c	2,0 b	47,0 a	0,05 b	04/04 (100%)
MYA	0,0	63,0 b	1,0 b	36,0 b	0,01 b	01/01(100%)
LB	0,0	66,0 b	4,0 b	32,0 b	0,03 b	01/01 (100%)
controle	0,0	88,0 a	12,0 a	0,0 c	0,27 a	-

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Duncan ( $p \leq 0,05$ )

LOWE e KRUL (1991) atribuem a necrose observada em várias espécies de *Vitis* expostas a *A. tumefaciens* à incompatibilidade na interação entre a agrobactéria e as células hospedeiras da planta e, de acordo com PERL et al. (1996), estas reagem à infecção com uma reação de hipersensibilidade associada com a morte da célula e conseqüente necrose do tecido. Esta observação pode explicar a perda de explantes no presente ensaio (Tabelas 25 e 26), comparado ao tratamento controle com 0% de perda para ambos os tipos de explantes.

Em ambos os experimentos, houve diferença estatística significativa entre as médias dos números de brotos por calo dos tratamentos e as do controle, sendo a regeneração quase nula a partir do explante foliar, refletindo a dificuldade da organogênese indireta a partir deste tecido associada aos danos causados pelo processo de transformação genética.

Para os cotilédones, a regeneração foi de 1,3 e 1,1 brotos por calo quando a bactéria foi cultivada nos meios MYA e YEB, respectivamente, enquanto no meio LB, foi de 0,6 brotos/calco, sem diferença estatística entre estes valores (Tabela 25). Dentre estas regenerações, obteve-se no tratamento com meio LB uma planta GUS negativa, que possivelmente seria uma regeneração escape. Neste caso, foram realizadas duas análises histoquímicas, que confirmaram a expressão negativa nessas plantas putativas. A ocorrência de escapes em meio seletivo tem sido relatada como um dos maiores problemas na transformação, que ocorre possivelmente pela proteção de células transformadas que circundam células não transformadas ao contato com o antibiótico (HORSCH et al., 1985; DEROLES e GARDNER, 1988). JANSEN e GARDNER (1989) afirmam que o antibiótico somente exerce pressão seletiva quando aplicado por 10-14 dias, imediatamente após a co-cultura.



Seguindo a sequência metodológica deste trabalho (Figura 15), os meios de crescimento bacteriano YEB foi adotado para a transformação do explante cotiledonar e MYA para explante foliar em todos os experimentos seguintes.

### 5.3.1.2 Ensaio 2 - Meio de inoculação

Os resultados obtidos para a avaliação da expressão transiente do gene *gus* em função do meio de inoculação com *A. tumefaciens* (MS/2, MS, MSi, LB e LB + MS), são apresentados na Figura 17 e Tabela 27.

As células de *A. tumefaciens* diluídas em meio MS suplementado com 1,0 g L<sup>-1</sup> de inositol (MSi), apresentaram melhores índices de expressão do gene *gus* para ambos tipos de explantes, seguido do meio MS/2 para os cotilédones e do meio MS para os explantes foliares. Além disso, este tratamento apresentou de 71 a 100% da área do tecido com atividade da enzima β-glucuronidase em 25% das amostras de cotilédones e 5% das folhas infectadas (Tabela 27). Esta superioridade do meio MSi em comparação aos demais meios também foi verificada por SANGWAN et al. (1992) com *Arabidopsis thaliana* e por EGNIN et al. (1998) com *Arachis hypogaea*, os quais afirmaram que o inositol atua como um agente removedor temporário dos exudados fenólicos liberados pelos tecidos durante a infecção. Como no Ensaio 1, verificou-se a existência de uma planta *gus* negativa no tratamento com meio MS/2.

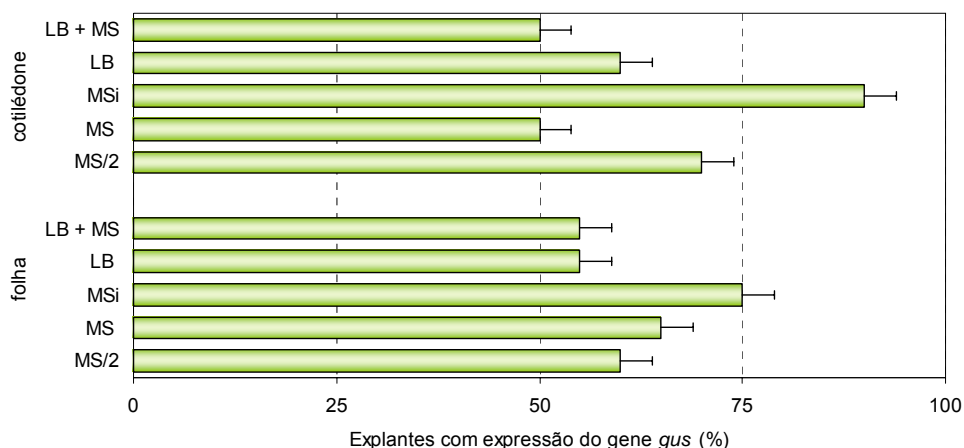


FIGURA 17 – Detecção da expressão do gene *gus* em explantes de *E. camaldulensis* em função do meio de inoculação, cinco dias após co-cultivo com *A. tumefaciens*. Meios: MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), MS/2 (MS com metade da concentração original dos sais), MSi (MS + 1 g L<sup>-1</sup> de inositol), LB (meio Luria–Bertani) e LB + MS (1:1).

TABELA 27 - Área dos explantes de *E. camaldulensis* com expressão do gene *gus* em função do meio de ressuspensão e inoculação, cinco dias após co-cultivo com *A. tumefaciens*.

Tipo de explante	Meio de cultura	Distribuição dos explantes em função da área foliar com expressão <i>gus</i> (%)				
		sem expressão	≤ 5% área	6-40% área	41-70% área	71-100% área
cotilédone	MS/2	30	20	20	20	10
	MS	55	20	10	20	0
	MSi	10	20	35	10	25
	LB	40	20	30	10	0
	LB + MS	50	30	15	0	5
folha	MS/2	40	30	25	5	0
	MS	30	25	40	0	0
	MSi	25	20	25	25	5
	LB	45	35	15	5	0
	LB + MS	45	40	15	0	0

Os resultados obtidos quanto à organogênese, apresentados nas tabelas 28 e 29 mostram em relação ao tratamento controle, redução de aproximadamente 50% na produção de calos com gemas e no número de brotações formadas a partir de cotilédones como resultado da interferência da inoculação com a bactéria e do meio de cultura na morfogênese do explante. Os tratamentos aplicados não favoreceram a formação de gemas e regeneração de brotos a partir de explantes foliares (Tabela 29).

TABELA 28 – Efeito do meio de ressuspensão e inoculação na resposta organogênica de explante cotiledonar de *E. camaldulensis* após transformação via co-cultivo com *A. tumefaciens*.

Tratamento	Não responsivo (%)	Calogênese (%)	Calo com gema (%)	Necrose (%)	Broto calo <sup>-1</sup>	Expressão estável
MS/2	7,0 a	70,0 ab	23,0 bc	0,0 c	1,1 b	9/10(90%)
MS	8,0 a	75,0 a	13,0 c	4,0 c	0,7 b	5/5(100%)
MSi	9,0 a	56,0 bcd	28,0 b	6,0 c	1,3 b	17/17(100%)
LB	4,0 ab	63,0 abc	19,0 bc	14,0 b	1,0 b	7/7(100%)
LB + MS	4,0 ab	51,0 cd	24,0 bc	21,0 a	1,0 b	7/7(100%)
controle	0,0 b	42,0 d	58,0 a	0,0 c	3,7 a	-

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Duncan ( $p \leq 0,05$ )

TABELA 29 – Efeito do meio de ressuspensão e inoculação na resposta organogênica de explante foliar de *E. camaldulensis* após transformação via co-cultivo com *A. tumefaciens*.

Tratamento	Não responsivo (%)	Calogênese (%)	Calo com gema (%)	Necrose (%)	Broto calo <sup>-1</sup>	Expressão estável
MS/2	0,0 ns	42,0 bc	3,0 b	55,0 ab	0,04 b	3/3(100%)
MS	0,0 ns	46,0 b	1,0 b	53,0 b	0,01 b	1/1(100%)
MSi	0,0 ns	48,0 b	2,0 b	50,0 b	0,04 b	2/2(100%)
LB	0,0 ns	36,0 bc	0,0 b	64,0 ab	0,00 b	-
LB + MS	0,0 ns	29,0 c	2,0 b	69,0 a	0,04 b	2/2(100%)
controle	0,0 ns	77,0 a	7,0 a	16,0 c	0,28 a	-

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Duncan ( $p \leq 0,05$ )

A percentagem de oxidação ou de necrose mais elevada observada no tratamento com meio LB + MS (1:1) pode ser atribuída à composição destes meios que poderiam favorecer a ação da bactéria em detrimento do tecido vegetal. HAN et al. (2005) observaram que, apesar do crescimento ideal de cepas LBA 4404 e EHA 105 ocorrer em meio LB e ser inferior em meio MS, quando utilizaram o LB como meio de inoculação, verificaram a inibição da formação de brotos transformados de *Artemisia annua*, com frequências de regeneração de 18,8% para o meio MS, 6,2% para o meio MS + LS (1:1) e 1,8 % para o meio LB. Estes autores atribuíram ao extrato de levedura e à triptona presentes no meio LB o caráter inibitório e desfavorável à morfogênese do tecido.

Para o explante foliar, a necrose também ocorreu no tratamento controle, demonstrando assim que este tecido é susceptível à oxidação, liberando fenóis que provocam a morte do explante. Além do efeito da infecção bacteriana e transformação, o aumento no acúmulo de polifenóis nos demais tratamentos pode ser devido a uma inadequação do meio nutritivo. De acordo com TEIXEIRA (2001), o cultivo em meios salinos diluídos é mais apropriado, resultando em menor síntese e oxidação fenólica, como no caso do meio MS/2 com a concentração de sais reduzida pela metade, que pode contribuir para reduzir a oxidação fenólica.

A capacidade organogênica do tecido foliar não foi favorecida pela utilização destes meios de infecção, e comparando-se os resultados obtidos para ambos explantes, pode-se inferir que esta dificuldade na regeneração de brotações transgênicas putativas muito mais associada ao componente morfogênico do tecido foliar do que ao processo de transformação. Mesmo com resultados pouco significativos em termos de regeneração,

selecionou-se o meio MSi para o prosseguimento dos experimentos de transformação a partir de tecidos foliares e para cotiledonares.

Seguindo a proposta metodológica proposta deste trabalho (Figura 15), o meio MSi foi adotado na transformação para todos os experimentos seguintes. Esta escolha foi confirmada como positiva pelo maior número de plantas recuperadas com expressão transiente positiva com o meio MS contendo maior concentração de inositol.

#### 5.3.1.3 Ensaio 3 - Duração da co-cultura

Os resultados apresentados na Figura 18 e Tabela 30 mostraram que a duração da co-cultura tem efeito significativo na expressão transiente de ambos tipos de explantes, com maior expressão no tratamento com 24 horas de co-cultura, diminuindo a medida que aumentou o tempo de contato entre tecido vegetal e agrobactéria. Com 72 horas de co-cultivo, observou-se o maior crescimento da bactéria.

O período de co-cultivo tem sido considerado um importante fator na eficiência de transformação via *Agrobacterium* como para ALMEIDA (2002) que ao contrário do resultado obtido neste trabalho, verificou que explantes de *Citrus* com 24 e 120 horas de co-cultura não regeneraram brotos GUS positivos, sendo estes apenas obtidos no tratamento com 72 horas. Também em *Citrus*, YANG et al. (2000) encontraram maior quantidade de brotos putativos transformados com co-cultura de 48 e 72 horas, e ALMEIDA (2002) após 120 horas observou crescimento excessivo da bactéria após 120 horas e subsequente decréscimo na regeneração de brotações.

O melhor tempo de co-cultura para a expressão transiente dos explantes cotiledonares e foliares observado neste trabalho foi menor ao tempo aplicado em pesquisas de transformação de diversas espécies do gênero *Eucalyptus* via *Agrobacterium*. CHEN et al. (1996), HO et al. (1998), KAWAZU et al. (1996) e MULLINS et al. (1997) utilizaram 48 horas de co-cultura em explantes hipocotiledonares, cotiledonares e foliares de *E. camaldulensis*. Período maior de co-cultura foi utilizado por MACHADO et al. (1997) que aplicaram 120 horas para a co-cultura do híbrido *E. grandis* x *E. urophylla* para diferentes tipos de explantes.

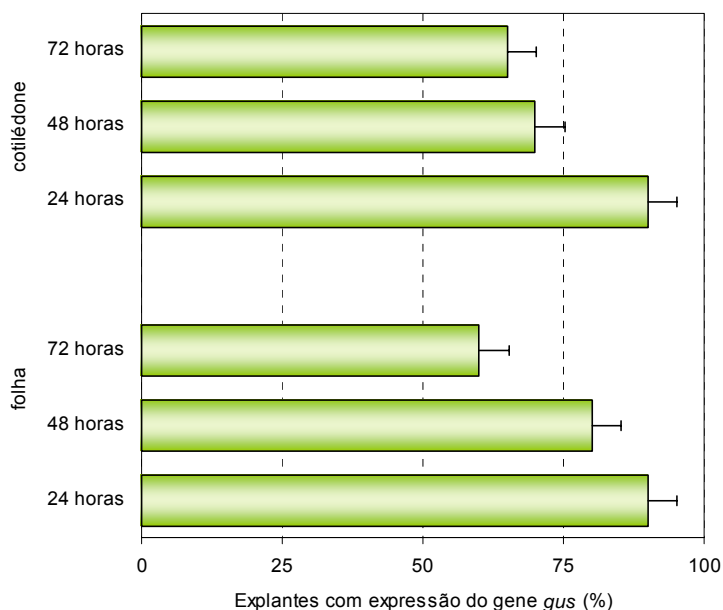


Figura 18 – Detecção da expressão do gene *gus* em explantes de *E. camaldulensis* em função da duração da co-cultura, cinco dias após o co-cultivo com *A. tumefaciens*.

TABELA 30 – Porcentagem de explantes de *E. camaldulensis* com expressão do gene *gus* em função da duração da co-cultura, cinco dias após a inoculação com *A. tumefaciens*.

Tipo de explante	Tempo de co-cultura	Distribuição dos explantes em função da área foliar com expressão <i>gus</i> (%)				
		sem expressão	≤ 5% área	6-40% área	41-70% área	71-100% área
cotilédone	24 horas	10	25	25	25	15
	48 horas	30	35	25	10	0
	72 horas	35	30	25	10	0
folha	24 horas	10	30	20	30	10
	48 horas	20	20	15	35	5
	72 horas	40	30	30	0	0

Comparado ao tratamento controle que produziu 3,1 brotos por calo, a frequência de regeneração de brotações a partir de cotilédones foi baixa em todos os tratamentos (Tabela 31), No caso dos explantes foliares (Tabela 32), tanto o controle quanto os explantes submetidos à inoculação e a varios tempos de co-cultura produziram médias de brotos por calo muito baixas, confirmando a característica recalcitrante dos tecidos foliares de *E. camaldulensis* observada no presente trabalho.

Considerando que a necrose aumentou com o tempo de contato do tecido com a bactéria, um período menor de co-cultura é mais indicado para reduzir a perda do tecido e de área com potencial de regeneração.

As 40 plantas regeneradas a partir de cotilédones e 9 de folhas apresentaram toda expressão do gene *gus* ao final da cultura, confirmando a eficiência do meio seletivo com 9 mg L<sup>-1</sup> de canamicina.

TABELA 31 – Efeito da duração da co-cultura na resposta organogênica de explante cotiledonar de *E. camaldulensis* após transformação via co-cultivo com *A. tumefaciens*.

Tratamento	Não responsivo (%)	Calogênese (%)	Calo com gema (%)	Necrose (%)	Broto calo <sup>-1</sup>	Expressão estável
24 horas	3,0 ns	79,0 a	8,0 c	10,0 a	0,6 b	8/8 (100%)
48 horas	3,0 ns	66,0 b	19,0 b	12,0 a	1,0 b	21/21(100%)
72 horas	3,0 ns	71,0 ab	11,0 bc	15,0 a	0,8 b	11/11(100%)
controle	0,0 ns	33,0 c	67,0 a	0,0 b	3,1 a	-

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Duncan ( $p \leq 0,05$ )

TABELA 32 – Efeito da duração da co-cultura na resposta organogênica de explante foliar de *E. camaldulensis* após transformação via co-cultivo com *A. tumefaciens*.

Tratamento	Não responsivo (%)	Calogênese (%)	Calo com gema (%)	Necrose (%)	Broto calo <sup>-1</sup>	Expressão estável
24 horas	0	70,0 b	3,0 ns	27,0 b	0,05 ns	3/3(100%)
48 horas	0	49,0 c	4,0 ns	47,0 a	0,07 ns	4/4(100%)
72 horas	0	45,0 c	2,0 ns	53,0 a	0,09 ns	2/2(100%)
controle	0	88,0 a	5,0 ns	7,0 c	0,13 ns	-

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Duncan ( $p \leq 0,05$ )

Seguindo a seqüência metodológica deste trabalho (Figura 15), adotou-se a co-cultura de 48 horas dos explantes com *A. tumefaciens* em todos os experimentos seguintes, tempo este confirmado como mais adequado no maior número de plantas resgatadas *in vitro* com expressão estável.

#### 5.3.1.4 Ensaio 4 - Efeito da pré-cultura de explantes

O pré-cultivo dos explantes por 72 horas proporcionou maior expressão *gus* transiente para ambos tipos de explantes (Figura 19 e Tabela 33). Nos tratamentos com 24 horas e sem pré-cultura a expressão transiente foi inferior, devido provavelmente à diminuição da divisão celular das células.

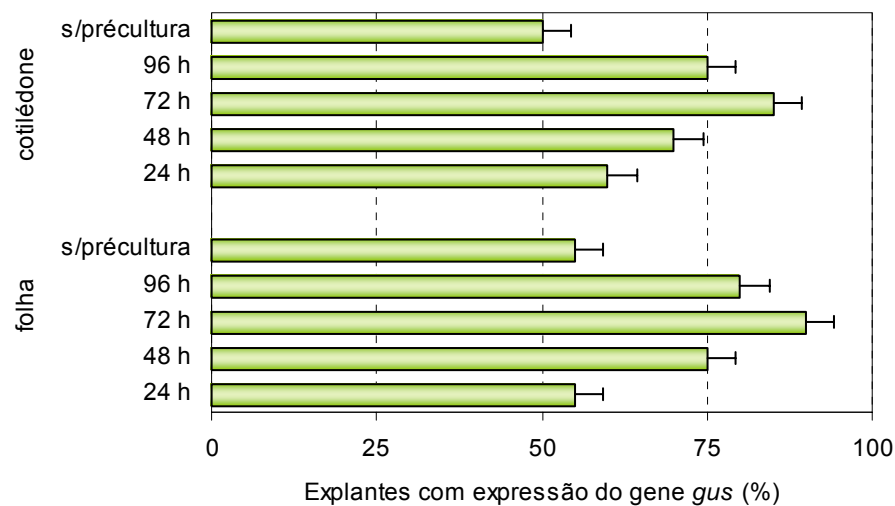


FIGURA 19 – Detecção da atividade do gene *gus* em explantes de *E. camaldulensis* em função do tempo de pré-cultura do explante, cinco dias após o co-cultivo com *A. tumefaciens*.

A base da promoção desta transformação pela pré-incubação do tecido vegetal não é totalmente compreendida. SUNILKUMAR et al. (1999) indicam que a pré-cultura do explante aumenta a eficiência da transformação devido ao fato da ligação da agrobactéria ao tecido ser favorecida pela síntese de células na superfície do local lesado e a produção de compostos indutores do gene *vir* pelo metabolismo ativo das células. BINNS e THOMASHOW (1988) e SANGWAN et al. (1992) por sua vez, reforçam que as células hospedeiras em divisão favorecem a transformação e que a pré-cultura em meio rico em auxinas aumenta a taxa de transformação. MORALEJO et al. (1998) concluíram que, após a pré-cultura de cotilédones e hipocótilos de *E. globulus* por 96 a 144 horas, o nível de expressão transiente GUS-positivo foi significativamente maior do que no tratamento sem pré-cultura ou após 192 horas, e que o tratamento com 144 horas mostrou expressão mais estável ao final de 30 dias de cultura.

TABELA 33 – Porcentagem de explantes de *E. camaldulensis* com expressão do gene *gus* em função do tempo de pré-cultura do explante, cinco dias após co-cultivo com *A. tumefaciens*.

Tipo de explante	Tempo de pré-cultura	Distribuição dos explantes em função da área foliar com expressão <i>gus</i> (%)				
		sem expressão	≤ 5% área	6-40% área	41-70% área	71-100% área
cotilédone	sem pré-cultura	40	25	25	10	0
	24 horas	30	20	40	10	0
	48 horas	15	10	30	25	20
	72 horas	25	20	25	20	10
	96 horas	50	15	20	10	5
folha	sem pré-cultura	45	15	5	25	10
	24 horas	25	15	15	30	15
	48 horas	10	10	35	20	25
	72 horas	20	15	40	25	0
	96 horas	45	40	15	0	0

Quanto à resposta organogênica dos explantes cotiledonares, a regeneração foi superior no tratamento sem pré-cultura, seguido do tratamento com 48 horas de pré-cultura (Tabela 34). No entanto, o resultado obtido ao final da cultura, comparativamente aos ensaios anteriores com explante cotiledonar, pareceu não contribuir grandemente para o aumento na eficiência de transformação. Neste sentido, alguns autores chamam a atenção para o efeito negativo que o processo de transformação poderia exercer nas células competentes do tecido. CERVERA et al. (1998) observaram uma redução de 50% na regeneração de epicótilos de *Citrus* após pré-cultura, devido à diminuição na indução de células competentes para a transformação. HAN et al. (2005) também observaram a influência negativa dos períodos prolongados de pré-cultura na eficiência do processo de transformação de *Artemisia annua*.

A resposta dos explantes foliares foi similar a dos ensaios anteriores, com regeneração quase nula (Tabela 35).



TABELA 34 – Efeito do tempo de pré-cultura na resposta organogênica de explante cotiledonar de *E. camaldulensis* via co-cultivo com *A. tumefaciens*.

Tratamento	Não responsivo (%)	Calogênese (%)	Calo com gema (%)	Necrose (%)	Broto calo <sup>-1</sup>	Expressão estável
sem pré-cultura	0,0 ns	64,0 a	2,0 c	34,0 a	0,06 c	9/10(90%)
24 horas	0,0 ns	65,0 a	7,0 bc	9,0 bc	0,3 c	3/3(100%)
48 horas	0,0 ns	75,0 a	17,0 b	8,0 bc	0,6 b	7/7(100%)
72 horas	0,0 ns	81,0 a	8,0 bc	12,0 b	0,2 c	15/15(100%)
96 horas	0,0 ns	76,0 a	10,0 bc	14,0 b	0,2 c	8/8(100%)
controle	0,0 ns	37,0 b	62,0 a	1,0 c	2,9 a	-

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Duncan ( $p \leq 0,05$ )

TABELA 35 – Efeito do tempo de pré-cultura na resposta organogênica de explante foliar de *E. camaldulensis* via co-cultivo com *A. tumefaciens*.

Tratamento	Não responsivo (%)	Calogênese (%)	Calo com gema (%)	Necrose (%)	Broto calo <sup>-1</sup>	Expressão estável
sem pré-cultura	0,0 ns	59,0 bc	0,0 b	41,0 a	0,0 b	-
24 horas	0,0 ns	52,0 c	3,0 b	45,0 a	0,07 b	2/2 (100%)
48 horas	0,0 ns	59,0 bc	2,0 b	39,0 a	0,02 b	3/3 (100%)
72 horas	0,0 ns	50,0 c	0,0 b	50,0 a	0,0 b	2/2 (100%)
96 horas	0,0 ns	88,0 a	2,0 b	10,0 b	0,02 b	-
controle	0,0 ns	81,0 a	10,0 a	9,0 b	0,2 a	-

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Duncan ( $p \leq 0,05$ )

### 5.3.1.5 Ensaio 5 - Efeito do genótipo

No teste histoquímico realizado nos explantes foliares, observou-se que os genótipos das plantas apresentaram diferença marcante quanto à resposta da infecção pela *Agrobacterium* cinco dias após a co-cultura. Nos clones 5 e 51, 100% e 90% dos tecidos amostrados, respectivamente, expressaram o gene *gus* de maneira transiente, enquanto no clone 20 a expressão foi de somente 20% (Figura 20 e Tabela 36).

Apesar da menor regeneração apresentada pelo explante foliar, a produção de brotos do controle do clone 05 foi superior aos demais clones, assim como a porcentagem de calos com gemas (Tabela 37). Esta diferença na resposta organogênica entre os clones comparados ilustra a influência do genótipo como um dos importantes fatores na

determinação da integração do transgene no genoma da planta. A influência dos genótipos na transformação também tem sido relatada por vários autores, como DE BONDY et al. (1994) que verificaram que o genótipo tem comportamento diferenciado quanto à integração do DNA exógeno no genoma da planta. HAN et al. (2005) consideram que a especificidade do genótipo está relacionada com as condições fisiológicas das células, as quais incluem reação fisiológica após o fermento, concentração hormonal e estrutura de parede celular.

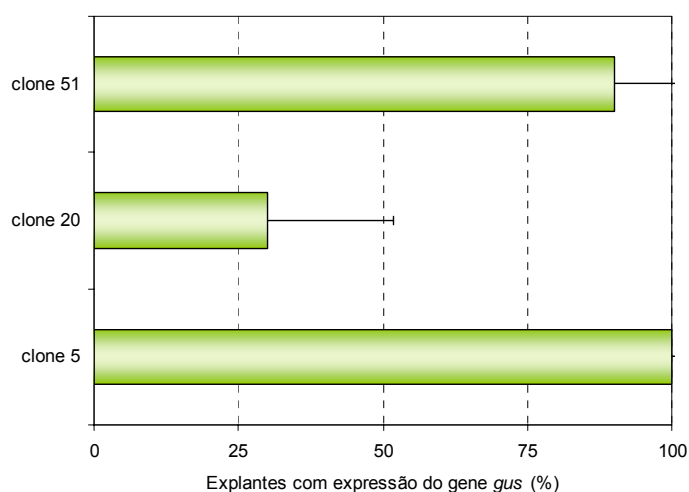


FIGURA 20 – Detecção da atividade do gene *gus* em explantes foliares de *E. camaldulensis* em função do genótipo, cinco dias após co-cultivo com *A. tumefaciens*.

TABELA 36 – Porcentagem de explantes foliares de *E. camaldulensis* com expressão do gene *gus* em função do genótipo, cinco dias após co-cultivo com *A. tumefaciens*.

Clone	Distribuição dos explantes em função da área foliar com expressão <i>gus</i> (%)				
	sem expressão	≤ 5% área	6-40% área	41-70% área	71-100% área
05	0	20	40	20	20
20	70	20	10	0	0
51	20	30	40	10	0

TABELA 37 – Efeito do genótipo na resposta organogênica de explante foliar de *E. camaldulensis* após co-cultivo com *A. tumefaciens*.

Clone	Não responsivo (%)	Calogênese (%)	Calo com gema (%)	Necrose (%)	Broto calo <sup>-1</sup>	Expressão estável
05	6,0 cd	68,0 a	12,0 ab	14,0 ab	0,3 b	14/14(100%)
05 controle	0,0 d	76,0 a	18,0 a	6,0 b	0,6 a	-
20	40,0 a	42,0 b	0,0 c	18,0 ab	0,0 b	-
20 controle	32,0 ab	42,0 b	0,0 c	26,0 a	0,0 b	-
51	20,0 bc	62,0 ab	0,0 c	18,0 ab	0,0 b	-
51 controle	10,0 cd	68,0 a	6,0 bc	16,0 ab	0,1 b	-

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Duncan ( $p \leq 0,05$ )

### 5.3.2. ¥ Fatores que influenciaram a transformação de *E. camaldulensis* e a obtenção de plantas transformadas putativas

No presente trabalho, apesar de que nenhum dos fatores avaliados aumentou de forma significativa a eficiência da transformação genética do *E. camaldulensis*, verificou-se que o explante cotiledonar apresentou maior potencial na regeneração de plantas putativas transformadas. De forma resumida pode-se dizer que:

- O meio de crescimento bacteriano não influenciou significativamente a regeneração; no entanto, o meio LB favoreceu a necrose de explantes, o que pode diminuir a área de tecido com células potenciais para a regeneração. Nos experimentos comparando 3 meios de cultura bacteriana, foram produzidas 61 plantas putativas e 1 planta GUS-negativa a partir de cotilédones e 6 plantas putativas a partir de folhas.

- A utilização de meios de ressuspensão da bactéria favoreceu pouco o processo de regeneração dos explantes cotiledonares e não teve efeito no caso dos explantes foliares, cuja taxa de organogênese permaneceu extremamente baixa. Nestes ensaios comparando cinco meios, foram produzidas 45 plantas putativas e 1 GUS-negativa a partir de cotilédones, e 8 plantas putativas a partir de folhas.

- Quanto ao efeito da duração da co-cultura, apesar da expressão transiente ser maior em explantes co-cultivados por 24 horas, a resposta organogênica foi melhor com 48 horas em ambos explantes. Os experimentos de comparação de três tempos de co-cultura forneceram 30 plantas putativas a partir de cotilédones e 9 putativas a partir de folhas.

- Explantes pré-cultivados por 72 horas em meio MCAC parecem ter células mais disponíveis à integração estável, tendo maior produção de plantas putativas, apesar do

número baixo de brotos emitidos por calo. Nos experimentos de comparação entre três tempos de pré-cultura, foram produzidas 42 plantas putativas e uma GUS-negativa a partir de cotilédones e 7 plantas putativas a partir de folhas.

- Os genótipos apresentaram diferenças no comportamento perante a transformação genética. Nos experimentos comparando três clones, foram produzidas 15 plantas putativas a partir de folhas.

- Foram produzidas ao total 178 plantas transformadas putativas e 3 GUS-negativas a partir de cotilédones e 45 plantas transformadas putativas a partir de folhas.

#### 5.4 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nas condições experimentais estabelecidas para este trabalho permitem concluir que:

- apesar do aspecto recalcitrante apresentado pelos genótipos avaliados, foi possível produzir 45 plantas transformadas putativas por organogênese indireta a partir de explantes foliares;

- a resposta dos explantes cotilédones à transformação genética foi mais acentuada e eficiente que a dos explantes foliares, permitindo a obtenção de 178 plantas transformadas putativas.

- a eficiência na transferência do DNA da *Agrobacterium tumefaciens* para o explante é dependente tanto do genótipo e do tipo de tecido quanto das condições de crescimento da agrobactéria e da interação entre a bactéria e o tecido.

## 5.5 REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, W.A.B. de. **Caracterização anatômica da organogênese *in vitro* e transformação genética via *Agrobacterium tumefaciens* em *Citrus* sp.** Piracicaba, 2002. 138 f. Tese (Doutorado em Agronomia, Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- ANDRADE, S.R.M. de. **Transformação de plantas.** Brasília: Embrapa Cerrados, 2003. 28 p. (Documentos/Embrapas Cerrados, 102).
- BINNS A.N.; THOMASHOW, M. Cell Biology of *Agrobacterium* infection and transformation of plants. **Annual Review of Microbiology**, v. 42, p.575-606, 1988.
- 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: EMBRAPA/CENARGEN, 1998. 309 p.
- 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, n.3-4, p.271-278, 1998.
- CHEN, Z.; TSAY, J.; CHUNG, J. Callus culture of *Eucalyptus grandis* x *urophylla* and preliminary studies on organogenesis and *Agrobacterium*-mediated transformation. **Taiwan Journal of Forest Sciences**, v.11, n.1, p.43-52, 1996.
- DE BONDT, A.; EGGERMONT, K.; DRUART, P.; DE VIL, M.; GODERIS, I.; VAN DERLEYDEN, J.; BROEKAERT, W.F. *Agrobacterium*-mediated transformation of apple (*Malus domestica* Borkh): and assessment of factors affecting gene transformation steps. **Plant Cell Reports**, v.13, p.587-593, 1994.
- DEROLES, S.; GARDNER, R.C. Analysis of the T-DNA structure in a large number of transgenic petunias generated by *Agrobacterium*-mediated transformation. **Plant Molecular Biology**, v.11, p.365-377, 1988.
- DI CIERO, L.; AMARAL, W.A.N. Árvores Geneticamente Modificadas na Silvicultura Intensiva . **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 29, p. 92-98, 2002.
- EGNIN, M.; MORA, A., PRAKASH, C.S. Factors enhancing *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer in Peanut (*Arachis hypogaea* L.). **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v.34, p.310-318, 1998.
- GONZÁLEZ, E.R. **Transformação genética de *Eucalyptus grandis* e do híbrido *E. grandis* x *E. urophylla* via *Agrobacterium*.** Piracicaba, 2002. 93 f. Tese (Doutorado, Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- HAINES, R. **Biotechnology in forest tree improvement.** Rome: FAO, 1994. 230 p.

HAN, J.; WANG, H.; YE, H.; YAN, L.; LI, Z.; YI, Z.; ZHANG, Y.; FANG, Y.; LI, G. High efficiency of genetic transformation and regeneration of *Artemisia annua* L. via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated procedure. **Plant Science**, v.168, n.1, p.73-80, 2005.

HARCOURT, R.L.; KYOZUKA, J.; FLOYD, R.B.; BATEMAN, K.S.; TANAKA, H.; DECROOCQ, V.; LLEWELLYN, D.J.; ZHU, X.; PEACOCK, W.J.; DENNIS, E.S. Insect- and herbicide-resistant transgenic eucalypts. **Molecular Breeding**, v. 6, p. 307-315, 2000.

HO, C.K., CHANG, S.H., TSAY, C.J., CUIANG, 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.

HORNG, F.W., SHEN, T.A., CHEN, C.F., YANG, J.C. Studies on management of fast-growing and high-quality fiber producing tree species. In: SYMPOSIUM FOR CURRENT ADVANCES ON RESEARCH PROJECTS OF FOREST MANAGEMENT AND ECONOMICS. **Proceedings**.Taipei, 1991. p. 143-151.

HORSCH, R.B.; FRY, J.E.; HOFFMAN, N.L.; EICHOLTZ, D.A.; ROGERS, S.G.; FRALEY, R.T. A simple and general method for transferring genes into plants. **Science**, v. 227, p.1229-1231, 1985.

JANSEN, B. J.; GARDNER, R. C. Localized transient expression of GUS in leaf discs following cocultivation with *Agrobacterium*. **Plant Molecular Biology**, v.14, p.61–72, 1989.

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

JOUANIN, L.; BRASILEIRO, A.C.M.; LEPLÉ, J.C.; PILATE, G.; CORNU, D. Genetic transformation: a short review of methods and their applications, results and perspectives for forest trees. **Annales des Sciences Forestières**, v. 50, p.325-336, 1993.

KAWAZU, T.; DOL, K.; TATEMACHI, Y.; ITO, K.; SHIBATA, M. Regeneration of transgenic plants by nodule culture systems in *Eucalyptus camaldulensis*. In: CONFERENCE OF TREE IMPROVEMENT FOR SUSTAINABLE TROPICAL FORESTRY, 1996, Caloundra. **Proceedings**. Caloundra: IUFRO, 1996. p.492-497.

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

LOWE, B.A.; KRUL, W.R. Physical, chemical, developmental and genetic factors that modulate the *Agrobacterium-Vitis* interaction. **Plant Physiology**, v. 96, p.121-129, 1991.

MACEK, T., MACKOVÁ, M., KÁS, J. Exploitation of plants for the removal of organics in environmental remediation. **Biotechnology Advances**, v.18, 2000. p.23-34.

MACHADO, L.O.R.; ANDRADE, G.M.; BARRUETO CID, L.P.; PENCHEL, R.M. *Agrobacterium* strain specificity and shooty tumour formation in eucalypt (*Eucalyptus grandis* × *Eucalyptus urophylla*). **Plant Cell Reports**, v.16, p.299-303, 1997.

MANDERS, G.; DAVEY, M.R.; POWER, J.B. New genes for old trees. **Journal of Experimental Botany**, v. 43, p. 1181-1190, 1992.

MORALEJO, M.; ROCHANGE, F.; BOUDET, A.M.; TEULIÉRES, C. Generation of transgenic *Eucalyptus globulus* plantlets through *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 25, n. 2, 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**, p.787-791, 1997.

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

PEÑA, L.; CERVERA, M.; JUÁREZ, J.; ORTEGA, C.; PINA, J.A.; DURAN-VILA, N.; NAVARRO, L. High efficiency *Agrobacterium* mediated transformation and regeneration of *Citrus*. **Plant Science**, v.104, p.183-191, 1995.

PERL, A.; LOTAN, O.; ABU-ABIED, M.; HOLLAND, D. Establishment of an *Agrobacterium*-mediated transformation system for grape (*Vitis vinifera* L.): the role of antioxidants during grape-*Agrobacterium* interactions. **Nature Biotechnology**, v. 14, p. 624-628, 1996.

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.

RISHI, A.S.; NELSON, N.D.; GOYAL, A. Genetic modification for improvement of *Populus*. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 7, p. 7-21, 2001.

SALT, D., BLAYLOCK, M., KUMAR, N.P.B.A. DUSHENKOV, V., ENSLEY, B.D., CHET, I. Phytoremediation: a novel strategy for the removal of toxic metals from the environment using plants. **Biotechnology**, v.13, 1995. p. 468-474.

SANGWAN, R.S.; BOURGEOIS, Y.; BROWN, S.; YASSEUR, 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.

SRISKANDARAJAH, S.; GOODWIN, P. Conditioning promotes regeneration and transformation in apple leaf explants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.53, p.1-11, 1998.

STUDART-GUIMARÃES, C.; LACORTE, C.; BRASILEIRO, A.C.M. Transformação genética em espécies florestais. **Ciência Florestal**, v.13, n.1, p.167-178, 2003.

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.

TEIXEIRA, J.B. Limitações ao processo de cultivo *in vitro* de espécies lenhosas. Disponível em: <[http://www.redbio.org/portal/encuentros/enc\\_2001/simposios/S-06/Joao%20Batista%20Teixeira/Palestra%20-%20Jo%20E3o%20Batista%20Teixeira.pdf](http://www.redbio.org/portal/encuentros/enc_2001/simposios/S-06/Joao%20Batista%20Teixeira/Palestra%20-%20Jo%20E3o%20Batista%20Teixeira.pdf)> Acesso em agosto 2006.

TZFIRA, T.; ZUKER, A.; ALTMAN, A. Forest-tree biotechnology: genetic transformation and its application to future forests. **Trends in Biotechnology**, v. 16, p. 439-446, 1998.



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

YANG,Z.N.; INGELBRECHT. I.L.; LOUZADA, E.; SKARIA, M.; MIRKOV, T.E. *Agrobacterium*-mediated transformation of the commercially important grapefruit cultivar Rio Red (*Citrus paradisi* Macf.). **Plant Cell Reports**, v.19, p.1203, 2000.

## 6 CONCLUSÕES GERAIS

A partir das condições experimentais estabelecidas no presente trabalho, pode-se concluir que:

- As condições de cultivo *in vitro* para organogênese indireta e regeneração de plantas de *Eucalyptus camaldulensis* foram diferentes para explantes cotiledonares e foliares. Os explantes cotiledonares apresentam resposta organogênica mais favorável do que os explantes foliares que apresentaram elevado grau de recalcitrância.
- Vários fatores podem afetar a regeneração, tais como: genótipo, meio de cultura mineral, reguladores de crescimento e tipo de explante.
- O antibiótico aminoglicosilado canamicina é adequado para a seleção de células transformadas na concentração de 9 mg L<sup>-1</sup> por bloquear o crescimento de células não transformadas em explantes cotiledonares de *E. camaldulensis*.
- Para a completa eliminação da *Agrobacterium*, sem afetar a regeneração indireta de tecidos transformados, verificou-se a necessidade da inclusão dos antibióticos bactericidas Augmentina<sup>®</sup> durante todo o período do cultivo *in vitro* (60 dias), utilizando 300 mg.L<sup>-1</sup> de Augmentina<sup>®</sup> por 15 dias, seguido por 150 mg L<sup>-1</sup> até o 30º dia, e 100 mg L<sup>-1</sup> até o final da cultura.
- A colocação prévia de explantes em meio de regeneração sólido 2-3 dias antes da infecção foi benéfica para o sistema de transformação utilizado, podendo ser adotado em outros experimentos.
- A utilização de diferentes meios de cultura da bactéria favoreceu pouco o processo de regeneração dos explantes cotiledonares e não teve efeito no caso dos explantes foliares.
- Os genótipos apresentaram diferenças no comportamento perante a transformação genética.
- Apesar do aspecto recalcitrante apresentado pelos genótipos avaliados, foi possível produzir plantas transformadas putativas em maior quantidade por organogênese indireta a partir de explantes cotiledonares que a partir de explantes foliares.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Quanto à organogênese indireta de *E. camaldulensis*:

A organogênese indireta de *E. camaldulensis* a partir de explantes foliares necessita de maiores estudos visando estimular células competentes de maneira mais eficiente à proliferação, diferenciação e regeneração de gemas adventícias. Sugere-se também investigar a capacidade morfogenética de explantes hipocotiledonares de *E. camaldulensis*.

Quanto ao uso de antibiótico e agente seletivo:

A eficiência dos antibióticos aplicados visando a eliminação da agrobactéria após infecção do explante, representa uma etapa essencial no processo de transformação, principalmente em função da espécie vegetal e cepa bacteriana utilizada. Recomenda-se desta forma, além das concentrações indicadas no presente trabalho para *E. camaldulensis*, a realização de testes com outros antibióticos e associações entre eles, tais como a timentina, moxalactam e a carbenicilina.

Quanto aos fatores que influenciam a transformação genética do *E. camaldulensis* via co-cultivo com *A. tumefaciens*:

A obtenção de plantas transformadas de *E. camaldulensis* está diretamente relacionada a diversos fatores que influenciam a infecção e transferência gênica para o tecido hospedeiro, conforme demonstrado neste trabalho. A experimentação de outros fatores associados aos investigados nos ensaios relacionados neste trabalho, no entanto, podem também contribuir para o aumento da eficiência da transformação. Esses novos fatores a serem investigados são: pH da suspensão bacteriana, temperatura de co-cultivo, influência da luz na co-cultura, concentração da suspensão bacteriana, tipo de cepas, além de utilização de explantes hipocotiledonares.

## 8 REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, W.A.B. de. **Caracterização anatômica da organogênese *in vitro* e transformação genética via *Agrobacterium tumefaciens* em *Citrus* sp.** Piracicaba, 2002. 138 f. Tese (Doutorado em Agronomia, Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- AZMI, A.; NOIN, M.; LANDRÉ, P.; PROTEAU, M.; BOUDET, A.M.; CHRQUI, D. High frequency plant regeneration from *Eucalyptus globulus* Labill. Hypocotyls: ontogenesis and ploidy level of the regenerants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 51, p. 9-16, 1997.
- BAILEY, M.A.; BOERMA, H.R.; PARROTT, W.A. Inheritance of *Agrobacterium tumefaciens* - induced tumorigenesis of soybean. **Crop Science**, v.34, p.514-519, 1994.
- BANDYOPADHYAY, S.; HAMILL, J.D. Ultrastructural studies of somatic embryos of *Eucalyptus nitens* and comparisons with zygotic embryos found in mature seeds. **Annals of Botany**, v. 86, p.237-244, 2000.
- BARROS, N.F. de; NOVAIS, R.F. de. **Relação solo-eucalipto**. Vicosa: UFV, 1990. 330p.
- BARRUETO CID, L.P.; 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.
- BENEDDRA, T.; PICARD, C.; PETIT, A.; NESME, X. Correlation between susceptibility to crown gall and sensitivity to cytokinin in aspen cultivars. **Phytopathology**, v.86, n.2, p.225-231, 1996.
- BENNETT, I.J.; MC COMB, J.A. Propagation of jarrah (*Eucalyptus marginata*) by organ and tissue culture. **Australian Forest Research**, v.12, n. 2, p.121-127, 1982.
- BERGMANN, B.A.; STOMP, A.M. Effects of host plant genotype and growth-rate on *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gall formation in *Pinus radiata*. **Phytopathology**, v.82, n.12, p.1457-1462, 1992.
- BERKEN, A.; MULHOLLAND, M.M.; LE DUC, D.L.; TERRY, N. Genetic engineering of plants to enhance selenium phytoremediation. **Critical Review of Plant Sciences**, v.21, p.567-582, 2002.
- BINZ, P.A.; KÄGI, J.H.R. Mettallothionein. <http://www.unizh.ch/~mtpage/MT.html> (10/fev 2007)
- BIZILY, S.P.; RUGH, C.L.; MEAGHER, R.B. Phytodetoxification of hazardous organomercurials by genetically engineered plants. **Nature Biotechnology**, v.18, p.213-217, 2000..

BRASILEIRO, A.C.M.; DUSI, D.M.A. Transformação genética de plantas. In: Torres, A.C., Caldas, L.S., Buso, J.A. (Org.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa/CNPH, p. 679-735, 1999. v.2.

BRASILEIRO, A.C.M.; LACORTE, C. Interação *Agrobacterium*-hospedeiro. In: Brasileiro, A.C.M., Carneiro, V.T.C. **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília, Brasil. Embrapa-SPI/Embrapa-Cenargen, p.75-92, 1998.

BUTT, A.; MOUSLEY, K.; MORRIS, K.; BEYNON, J.; CAN, C.; HOLUB, E.; GREENBERG, J.T.; BUCHANAN-WOLLASTON, V. Differential expression of a senescence-enhanced metallothionein gene in *Arabidopsis* in response to isolates of *Peronospora parasitica* and *Pseudomonas syringae*. **Plant Journal**, v. 16, p. 209-221, 1998.

CERVERA, M.; PINA, J.A.; JUAREZ, J.; NAVARRO, L.; PENA, L. *Agrobacterium* mediated transformation of citrange factors affecting transformation and regeneration. **Plant Cell Reports**, v.18, n.3-4, p.271-278, 1998.

CHEN, Z.; TSAY, J.; CHUNG, J. Callus culture of *Eucalyptus grandis* x *urophylla* and preliminary studies on organogenesis and *Agrobacterium*-mediated transformation. **Taiwan Journal of Forest Sciences**, v.11, n.1, p.43-52, 1996.

CHRIQUI, D.; ADAM, S.; CAISSARD, J.C.; NOIN, M.; AZMI, A. Shoot regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation of *Eucalyptus globulus* and *E. gunnii*. In: SCHÖNAU APG, ed.. IUFRO symposium on intensive forestry: the role of Eucalypts. **Proceedings**. Pretoria, South Africa: Southern African Institute of Forestry, 70-80, 1992.

COBBETT, C.; GOLDSBROUGH, P. Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. **Annual Review of Plant Biology**, v.5, p.159–182, 2002.

CONFALONIERI, M.; BALESTRAZZI, A.; BISOFFI, S.; CARBONERA, D. *In vitro* culture and genetic engineering of *Populus* spp.: synergy for forest tree improvement. **Plant Cell, Tissue and Organ and Culture**, v. 72, n.2, p.109-138, 2003.

DE BONDT, A.; EGGERMONT, K.; DRUART, P.; DE VIL, M.; GODERIS, I.; VAN DERLEYDEN, J.; BROEKAERT, W.F. *Agrobacterium*-mediated transformation of apple (*Malus domestica* Borkh): and assessment of factors affecting gene transformation steps. **Plant Cell Report**, v.13, p.587-593, 1994.

DI CIERO, L.; AMARAL, W. Árvores geneticamente modificadas na silvicultura intensiva. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, n.29, p.92-99, 2002.

DIALLO, N. ; DUHOUX, E. Organogenèse et multiplication *in vitro* chez l' *Eucalyptus camaldulensis*. **Journal of Plant Physiology**, v.115, p.177-182, 1984.

EAPEN, S.; D'SOUZA, S.F. Prospects of genetics engineering of plants for phytoremediation of toxic metals. **Biotechnology advances**, v.23, p.97-114, 2005.

ELDRIDGE, K.; DAVIDSON, J.; HARDWIID, C.; WYK, G. van. **Eucalypt domestication and breeding**. Oxford: Clarendon Press, 1993. 312 p.

FAO. 2004. **Preliminary review of biotechnology in forestry, including genetic modification**. Roma: FAO (Forest Genetic Resources Working Paper, 59) 124p.

FAO. Global forest resources assessment, 2000. FAO, Roma, **Forestry Paper**, n.140, 2000.

FILLATTI, J.J.; SELLMER, J.C.; MCCOWN, B.H.; HAISSIG, B.E.; COMAI, L. *Agrobacterium* mediated transformation and regeneration of *Populus*. **Molecular and General Genetics**, v. 206, p. 192-199, 1987.

FORDHAM-SKELTON, A.P.; ROBINSON, N.J.; GOLDSBROUGH, P.B. Metallothionein-like genes and phytochelatins in higher plants. In: SILVER, S., WALDEN, W. (eds) **Metal ions in gene regulation**. London: Chapman and Hall, 1998. p.398-431.

GOLFARI, L.; CASER, R.L., MOURA, V.P.G. **Zoneamento ecológico esquemático para reflorestamento no Brasil - 2ª aproximação**. Belo Horizonte: Centro de Pesquisa Florestal da Região do Cerrado, 1978. 66p. (PRODEPEF. Série Técnica, 11).

GONZÁLEZ, E.R.; ANDRADE, A.; BERTOLO, L.; LACERDA, G.; CARNEIRO, R.; DEFAVARI, V.; LABATE, M.; LABATE, C. Transformação genética do eucalipto. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 26, n.1, p.18-22, 2002.

HAAN, S. Results of municipal waste compost research over more than fifty years at the Institute for Soil Fertility at haren Groningen. **Netherlands Journal of Agricultural Science**, v.29, p.49-61, 1981.

HAINES, R.J. **Biotechnology in forest tree improvement: research directions and priorities**. Forestry Paper nº 118. Rome, 1994.

HANSEN, G.; WRIGHT, M.S. Recent advances in the transformation of plants. **Trends in Plant Science**, v. 4, p.226-231, 1999.

HANSEN,G.; DAS, A.; CHILTON, M. Constitutive expression of the virulence genes improves the efficiency of plant transformation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.91, p.7603-7607, 1994.

HIGA, R. C. V. Descrição de algumas espécies de eucalipto. **Revista da Madeira**, v.13, n. 75, p. 8-17, 2003.

HO, C.K.; CHANG, S.H.; TSAY, C.J.; CUIANG, 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.

HOLFORD, P.; HERNANDEZ, N., NEWBURY, H.J. Factors influencing the efficiency of T-DNA transfer during co-cultivation of *Antirrhinum majus* with *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Cell Reports**, v.11, p.196-199, 1992.

JOUANIN, L.; BRASILEIRO, A.C.M.; LEPLÉ, J.C.; PILATE, G.; CORNU, D. Genetic transformation: a short review of methods and their applications, results and perspectives for forest trees. **Annales des Sciences Forestières**, v. 50, p.325-336, 1993.

JOUANIN, L. ; GOUJON, T. ; DE NADAÏ,V. ; MARTIN, M.T.; MILA, I.; VALLET, C. ; POLLET, B. ; YOSHINAGA, A.; CHABBERT, B.; PETIT-CONIL, M.; LAPIERRE, C. Lignification in transgenic poplars with extremely reduced caffeic acid-O-methyltransferase activity. **Plant Physiology**, v.123, p.1363–1373, 2000.

KÄGI, J.H.R. Metallothioneins. **Methods of Enzymology**, San Diego: Academic Press, v. 205, p.613-626, 1991.

KAWAZU, T.; DOL, K.; TATEMACHI, Y.; ITO, K.; SHIBATA, M. Regeneration of transgenic plants by nodule culture systems in *Eucalyptus camaldulensis*. In: CONFERENCE OF TREE IMPROVEMENT FOR SUSTAINABLE TROPICAL FORESTRY, 1996, Caloundra. **Proceedings**. Caloundra: IUFRO, p.492-497, 1996.

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

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.

LASAT, M.M. Phytoextraction of toxic metals: a review of biological mechanisms. **Journal of Environmental Quality**, v.31, p.109-120, 2002.

MACEK, T.; MACKOVÁ, M.; KÁS, J. Exploitation of plants for the removal of organics in environmental remediation. **Biotechnology Advances**, v.18, p.23-34, 2000.

MACHADO, L. O. R.; ANDRADE, G. M.; BARRUETO CID, L.P.; PENCHEL, R.M. *Agrobacterium* strain specificity and shooty tumour formation in eucalypt (*Eucalyptus grandis* × *Eucalyptus urophylla*). **Plant Cell Reports**, v.16, p.299-303, 1997.

MACRAE, S.; VAN STANDEN, J., *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation to improve rooting ability of eucalypts. **Tree Physiology**, v.12, p. 414-418, 1993.

MANDERS, G.; DAVEY, M.R.; POWER, J.B. New genes for old trees. **Journal of Experimental Botany**, v. 43, p.1181-1190, 1992.

MARTINEZ, H. **Camaldulensis (*Eucalyptus camaldulensis*): especie de arbol de uso multiple en America Central**. Turrialba, Costa Rica, 1990. 68p. (CATIE. Informe Tecnico, 158).

MAURO, A.O.; PFEIFFER, T.W.; COLLINS, G.B. Inheritance of soybean susceptibility to *Agrobacterium tumefaciens* and its relationship to transformation. **Crop Science**, v.35, p.1152-1156, 1995.

Mc COWN, B. H.; SELLMER, J. C. General media and vessels suitable for wood plant culture. In: BONGA, J. M.; DURZAN, D. J. (Ed.) **Cell and tissue culture in forestry**. Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers, 1987, p. 4-13.

MEIRELES, K.G.X. **Identificação de proteínas na região cambial de *Eucalyptus grandis*, por espectrometria de massa**. Piracicaba, 2006.117 f. Tese (Doutorado) Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

MIRANDA, J.R. de; THOMAS, D.A.; TOMSETT, A.B., Metallothionein genes from flowering plant *Mimulus guttatus*. **FEBS Letters**, v.260, n.2, p.277-280, 1990.

MOHAMMADNIA, M.; KOWSAR, S.A. Nitrogen transport through the vadose zone of the Bisheh Zard Aquifer.p.148.In: GNADLINGER, J.; PORTO, E.R.; MENEZES, E.A.; LOPES,

P.R.C.; RIEDER, I. **Abstract**. 9th International Rain Water Catchment Systems Conference, 6-9 July, 1999. Petrolina, Brasil.

MORALEJO, M.; ROCHANGE, F.; BOUDET, A.M.; TEULIÉRES, C. Generation of transgenic *Eucalyptus globulus* plantlets through *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 25, n.2, 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**, p.787-791, 1997.

MURALIDHARAN, E.M.; GUPTA, P.K.; MASCARENHAS, A.F. Plantlet production through high frequency somatic embryogenesis in long term cultures of *Eucalyptus citriodora*. **Plant Cell Reports**, v.8, p.41-43,1989.

NAGL, W.; IGNACIMUTHU, S.; BECKER, J. Genetic engineering and regeneration of *Phaseolus* and *Vigna*. State of the art and new attempts. **Journal of Plant Physiology**, v.150, p.625-644, 1997.

NAM, J.; MATTHYSSE, A.G.; GELVIN, S.B. Differences in susceptibility of Arabidopsis ecotypes to crown gall disease may result from a deficiency in T-DNA integration. **The Plant Cell**, v. 9, p. 317-333, 1997.

NEHRA, N.S.; BECWAR, M.R.; ROTTMANN, W.H.; PEARSON, L.; CHOWDHURY, K.; CHANG, S.; WILDE, H.D.; KODRZYCKI, R.J.; ZHANG, C.; GAUSE, K.C.; PARKS, D.W.; HINCHEE, M.A. Forest biotechnology: innovative methods, emerging opportunities. **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, v.41, p.701–717, 2005.

OW, D.W. Heavy metal tolerance genes: prospective tools for bioremediation. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 18, p. 135-149, 1996.

PILON-SMITS, E. Phytoremediation. **Annual Review of Plant Biology**, v.56, p.15-39, 2005.

PRYOR, L.D. **The biology of Eucalypts**. London: Edward Arnold, 1976. 83p.

RAUSER, W.E. Phytochelatins. **Annual Review of Biochemistry**, v. 59, p.61-86, 1990.

RAUTNER, M. Designer trees. **Biotechnology and Development Monitor**, v. 44/45, p. 2-7, 2001.

RISHI, A.S.; NELSON, N.D.; GOYAL, A. Genetic modification for improvement of *Populus*. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 7, p.7-21, 2001.

ROBBS, S.L.; HAWES, M.C.; LIN, H.J.; PUEPPKE, S.G.; SMITH, L.Y. Inheritance of resistance to crown gall in *Pisum sativum*. **Plant Physiology**, v.95, p.52-57, 1991.

RUGH, C.L.; SENECOFF, J.F.; MEAGHER, R.B.; MERKLE, S.A. Development of transgenic yellow poplar for mercury phytoremediation. **Nature Biotechnology**, v. 16, p. 925-928, 1998.

SANGWAN, R.S.; BOURGEOIS, Y.; BROWN, S.; YASSEUR, 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.



SCHROEDER, H.E.; SCHOTZ, A.H.; WARDLEYRICHARDSON, T.; SPENCER, D.; HIGGINS, T.J.V. Transformation and regeneration of 2 cultivars pea (*Pisum sativum* L.). **Plant Physiology**, v.101, n.3, p.751-757, 1993.

SNOWDEN, K.C.; GARDNER, R.C. Five gens induced by aluminium in wheat (*Triticum aestivum* L.) roots. **Plant Physiology**, v. 103, p. 855-861,1993.

SOERIANEGARA, I.; LEMMENS, R.H.M.J. (eds) **Timber trees: mayor commercial timbers**. Bogor: PROSEA, 1994. 610p. (Plant resources of South-East Asia Prosea 5, n.1).

SOUZA, I.C.G. de. **Caracterização de procedências para a formação de populações-base de *Eucalyptus camaldulensis* Dehn**. Piracicaba: ESALQ, 1996. 119p. (Tese de Mestrado, 1996).

SRISKANDARAJAH, S.; GOODWIN, P. Conditioning promotes regeneration and transformation in apple leaf explants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.53, p.1-11, 1998.

STUDART-GUIMARÃES, C.; LACORTE, C.; BRASILEIRO, A.C.M. Transformação genética em espécies florestais. **Ciência Florestal**, v. 13, n.1, p.1567-178, 2003.

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.

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

TZFIRA, T.; JENSEN, C.S.; WANG, W.; ZUKER, A.; VINOCCUR, B.; ALTMAN, A.; VAINSTEIN, A. Transgenic *Populus tremula*: a step-by-step protocols for its *Agrobacterium*-mediated transformation. **Plant Molecular Biology**, v.15, p.219-235, 1997.

VALLE, C.F. do. **Análise silvicultural de lotes de sementes de *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. visando a implantação de populações-base**. 1991, 111p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba.

YANG, J.C.; CHUNG, J-D.; CHEN, Z-Z. Vegetative propagation of adult *Eucalyptus grandis* × *urophylla* and comparision of growth between micropropagated plantlets and rooting cuttings. **Plant Cell Reports**, v.15, p.170-173, 1995.

## **ANEXO 1 – MEIOS DE CULTURA**

ANEXO 1.1 – Composição de meios de cultura (em m mol L<sup>-1</sup>).

Componente	MS	JADS	WPM	B5	MST
KNO <sub>3</sub>	18,8	8,0	-	24,7	-
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	20,6	41,5	5,0	-	29,3
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	-	-	1,0	-
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1,5	3,0	1,5	1,0	1,5
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	3,0	-	0,65	1,0	3,0
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	-	5,0	2,35	-	-
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,25	3,0	1,25	-	1,25
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	-	5,68	-	5,68
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	-	-	-	1,05	-
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	-	0,10	-	0,06	0,101
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0,100	-	0,100	-	-
KI	0,005	-	-	0,005	0,005
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,100	0,050	0,100	0,05	0,100
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,030	-	0,030	0,007	0,030
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,0001	0,005	0,001	0,0001	0,0001
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,001	0,018	0,001	0,001	0,001
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,0001	0,001	-	0,0001	0,0001
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,100	0,200	0,100	0,100	0,100
Na <sub>2</sub> EDTA	0,100	0,045	0,100	0,100	0,100
Ácido nicotínico	0,004	0,004	0,004	0,008	-
Piridoxina-HCl	0,0024	0,0024	0,0024	0,005	0,006
Tiamina-HCl	0,0003	0,015	0,003	0,030	0,030
Inositol	0,55	0,55	0,55	0,55	1,1
Glicina	0,027	-	0,027	-	-
Arginina	-	0,040	-	-	-
Glutamina	-	1,025	-	-	-
Cisteína	-	0,041	-	-	-
Pantotenato de cálcio	-	0,005	-	-	-

Abreviaturas: MS – meio de cultura básico de MURASHIGE e SKOOG (1962); WPM – meio de cultura básico de LLOYD e McCOWN (1980); JADS – meio de cultura básico de CORREIA (1993); MST – Meio de cultura básico de TOURNIER et al. (2003)

ANEXO 1.2 – Composição de meios de cultura para crescimento bacteriano (em g L<sup>-1</sup>).

Componente	YEB	MYA	LB
Extrato de carne	5,0	5,0	-
Extrato de levedura	1,0	5,0	5,0
Peptona	5,0	-	-
Triptona	-	-	10,0
NaCl	-	-	10,0
Caseína	-	0,5	-
Manitol	-	8,0	-
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	2,0	-
Sacarose	5,0	-	-
MgSO <sub>4</sub>	0,24	-	-
ágar	16,0	16,0	16,0
pH	7,5	6,6	7,5

## **ANEXO 2 – RESULTADOS DAS ANÁLISES DE VARIÂNCIA**

### CAPITULO 3 – ORGANOGÊNESE INDIRETA E MICROPROPAGAÇÃO DE *Eucalyptus camaldulensis*

#### ANEXO 2.1 - Resumo da ANOVA para explante cotiledonar do Ensaio 01.

Parâmetro	QM	F	P <sub>≤</sub>	CV (%)
Explante inerte	325,0	2,79	0,1144	27,6
Calogênese	608,333	5,09	0,0332	29,4
Calo com gema	1,62583	0,70	0,5234	35,6
Broto por calo	58,3333	1,40	0,2955	114,6
Oxidação				

#### ANEXO 2.2 – Resumo da ANOVA para explante cotiledonar do Ensaio 2.

Parâmetro	QM	F	P <sub>≤</sub>	CV (%)
Calogênese	5671,11	19,33	0,0000	67,5
Calo com gema	3293,33	4,99	0,0004	111,3
Broto por calo	65,9	9,13	0,0000	116,3
Oxidação	1222,22	1,47	0,2054	303,0

#### ANEXO 2.3 – Resumo da ANOVA para explante cotiledonar do Ensaio 03.

Parâmetro	QM	F	P <sub>≤</sub>	CV (%)
Calogênese	5016,0	41,80	0,0000	43,0
Calo com gema	4056,0	25,35	0,0000	114,7
Broto por calo	24,0576	34,69	0,0000	115,9
Oxidação	80,0	1,25	0,3221	204,1

#### ANEXO 2.4 – Resumo da ANOVA para explante foliar do Ensaio 04.

Parâmetro	QM	F	P <sub>≤</sub>	CV (%)
Calogênese	623,333	1,68	0,1367	22,6
Calo com gema	623,333	1,68	0,1367	243,5
Broto por calo	4,95567	2,21	0,0501	254,6

#### ANEXO 2.5 – Resumo da ANOVA para explante foliar do Ensaio 05.

Parâmetro	QM	F	P <sub>≤</sub>	CV (%)
Calogênese	616,667	1,19	0,3514	31,3
Calo com gema	136,667	0,29	0,9127	104,3
Broto por calo	0,317667	0,65	0,6659	104,8
Oxidação	466,667	6,00	0,0020	191,1

#### ANEXO 2.6 – Resumo da ANOVA para explante foliar do Ensaio 06.

Parâmetro	QM	F	P <sub>≤</sub>	CV (%)
Calogênese	54,8333	2,39	0,0677	5,7
Calo com gema	38,8333	2,17	0,0917	89,8
Broto por calo	0,120483	1,54	0,2146	107,6
Oxidação	19,3333	2,11	0,0992	198,3

## ANEXO 2.7 – Resumo da ANOVA para explante foliar do Ensaio 07.

Parâmetro	QM	F	P≤	CV (%)
Calogênese	86,4444	3,46	0,0031	6,3
Calo com gema	3,55556	0,89	0,5435	94,9
Broto por calo	0,00186667	0,93	0,5074	55,6
Oxidação	93,5556	4,25	0,0006	174,4

## ANEXO 2.8 – Resumo da ANOVA para explante foliar do Ensaio 08.

Parâmetro	QM	F	P≤
Calogênese			
regulador de crescimento (A)	260,909	3,02	0,0033
segmento foliar (B)	222,727	2,58	0,1131
interação (A x B)	22,7273	0,26	0,9870
Calo com gema			
regulador de crescimento (A)	210,0	3,01	0,0034
segmento foliar (B)	290,909	4,17	0,0450
interação (A x B)	40,9091	0,59	0,8189
Broto por calo			
regulador de crescimento (A)	1,083	1,61	0,1220
segmento foliar (B)	0,920455	1,37	0,2457
interação (A x B)	0,550455	0,82	0,6104
Oxidação			
regulador de crescimento (A)	20,9091	1,53	0,1475
segmento foliar (B)	4,54545	0,33	0,5657
interação (A x B)	4,54545	0,33	0,9689

## ANEXO 2.9 – Resumo da ANOVA para explante foliar do Ensaio 09.

Parâmetro	QM	F	P≤
Calogênese			
regulador de crescimento (A)	83,3333	1,11	0,3640
segmento foliar (B)	450,0	6,00	0,0220
interação (A x B)	83,3333	1,11	0,3640
Calo com gema			
regulador de crescimento (A)	83,3333	1,11	0,3640
segmento foliar (B)	450,0	6,00	0,0220
interação (A x B)	83,3333	1,11	0,3640
Broto por calo			
regulador de crescimento (A)	0,685	0,93	0,4405
segmento foliar (B)	3,645	4,96	0,0356
interação (A x B)	0,685	0,93	0,4405

## ANEXO 2.10 – Resumo da ANOVA para explante foliar do Ensaio 10.

Parâmetro	QM	F	P≤	CV (%)
Calogênese				
genótipo (A)	953,333	4,52	0,0027	
regulador de crescimento (B)	1200,0	5,68	0,0225	
interação (A x B)	300,0	1,42	0,2402	
Calo com gema				
genótipo (A)	953,333	4,52	0,0027	
regulador de crescimento (B)	1200,0	5,68	0,0225	
interação (A x B)	300,0	1,42	0,2402	
Broto por calo				
genótipo (A)	1,64533	5,61	0,0006	
regulador de crescimento (B)	1,33333	4,55	0,0399	
interação (A x B)	0,679333	2,32	0,0636	

ANEXO 2.11 - Resumo da ANOVA para multiplicação *in vitro* de dois genótipos de *E. camaldulensis* para o parâmetro brotos por calo.

Fonte de variação	Quadrado médio	F	P≤	CV (%)
meio de cultura (A)	86,6037	10,22	0,0000	
clone (B)	42,483	5,01	0,0274	
subcultura (C)	93,1363	10,99	0,0000	
interação (A x B)	26,693	3,15	0,0175	
interação (A x C)	15,8884	1,88	0,0724	
interação (B x C)	99,379	11,73	0,0000	

**CAPITULO 4 – UTILIZAÇÃO DE ANTIBIÓTICO E AGENTE SELETIVO NA TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE *E. camaldulensis***ANEXO 2.12 - Resumo da ANOVA para o ensaio com agente seletivo canamicina nas concentrações de 0,0 a 80,0 mg L<sup>-1</sup>).

Parâmetro	QM	F	P≤	CV (%)
Calogênese	4150,74	100,29	0,0000	131,2
Calo com gema	7202,4	265,13	0,0000	206,3
Broto por calo	32,4818	78,75	0,0000	215,0
Oxidação/necrose	7472,0	525,37	0,0000	60,6

ANEXO 2.13 - Resumo da ANOVA para o ensaio com agente seletivo canamicina nas concentrações de 0,0 a 12,0 mg L<sup>-1</sup>).

Parâmetro	QM	F	P≤	CV (%)
Calogênese	1182,5	7,02	0,0021	62,0
Calo com gema	2655,0	27,00	0,0000	123,0
Broto por calo	7,65796	37,84	0,0000	
Oxidação/necrose	5892,5	32,14	0,0000	



ANEXO 2.14 - Resumo da ANOVA para o ensaio de eliminação de *A. tumefaciens*

Parâmetro	QM	F	P <sub>≤</sub>	CV (%)
Calogênese	3145,03	9,26	0,0000	78,6
Calo com gema	2073,61	11,27	0,0000	105,2
Broto por calo	16,2248	4,81	0,0001	145,5
Oxidação	1,86646	1,16	0,3455	110,9
Contaminação	64,503	29,77	0,0000	98,2

**CAPITULO 5 - ENSAIOS PARA A DETERMINAÇÃO DE CONDIÇÕES DE MAIOR EFICIÊNCIA DA TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA**

## ANEXO 2.15 - Resumo da ANOVA no ensaio de influência do meio de cultura bacteriano com explante cotiledonar.

Parâmetro	QM	F	P <sub>≤</sub>	CV (%)
Não responsivo	45,0	10,29	0,0005	218,9
Calogênese	357,917	5,02	0,0121	17,5
Calo com gema	1140,0	19,20	0,0000	54,2
Broto por calo	3,96746	7,22	0,0028	74,2
Oxidação	257,917	6,66	0,0040	97,2

## ANEXO 2.16 - Resumo da ANOVA no ensaio de influência do meio de cultura bacteriano com explante foliar.

Parâmetro	QM	F	P <sub>≤</sub>	CV (%)
Calogênese	1301,67	15,43	0,0001	25,0
Calo com gema	124,583	4,43	0,0190	138,6
Broto por calo	0,0733333	24,44	0,0000	131,9
Oxidação	2037,92	35,06	0,0000	66,9

## ANEXO 2.17 - Resumo da ANOVA no ensaio de influência do meio de inoculação com explante cotiledonar.

Parâmetro	QM	F	P <sub>≤</sub>	CV (%)
Não responsivo	55,3333	2,33	0,0737	101,311
Calogênese	753,5	6,46	0,0006	25,2921
Calo com gema	1245,5	16,98	0,0000	60,3495
Broto por calo	6,17668	9,90	0,0000	86,0371
Oxidação	351,5	12,41	0,0000	122,24

## ANEXO 2.18 - Resumo da ANOVA no ensaio de influência do meio de inoculação com explante foliar.

Parâmetro	QM	F	P <sub>≤</sub>	CV (%)
Calogênese	1369,33	13,69	0,0000	
Calo com gema	29,5	5,06	0,0026	125,9
Broto por calo	0,0552833	23,69	0,0000	156,7
Oxidação	1738,83	15,81	0,0000	38,6

ANEXO 2.19 - Resumo da ANOVA no ensaio de influência do período de co-cultura com explante cotiledonar.

Parâmetro	QM	F	P $\leq$	CV (%)
Não responsivo	11,25	1,29	0,3132	134,4
Calogênese	2044,58	51,11	0,0000	30,3
Calo com gema	3797,92	93,49	0,0000	95,9
Broto por calo	7,43413	17,20	0,0000	94,1
Oxidação	211,25	14,70	0,0001	72,9

ANEXO 2.20 - Resumo da ANOVA no ensaio de influência do período de co-cultura com explante foliar.

Parâmetro	QM	F	P $\leq$	CV (%)
Calogênese	1990,0	22,74	0,0000	31,2
Calo com gema	8,33333	0,40	0,7521	123,5
Broto por calo	0,00583333	0,29	0,8295	156,3
Oxidação	2178,33	18,64	0,0000	62,8

ANEXO 2.21 - Resumo da ANOVA no ensaio de influência do pré-cultivo com explante cotiledonar.

Parâmetro	QM	F	P $\leq$	CV (%)
Calogênese	1251,33	12,57	0,0000	26,0
Calo com gema	2477,33	74,32	0,0000	120,7
Broto por calo	5,90148	120,44	0,0000	142,5
Oxidação	628,0	13,22	0,0000	93,4

ANEXO 2.22 - Resumo da ANOVA no ensaio de influência do pré-cultivo com explante foliar.

Parâmetro	QM	F	P $\leq$	CV (%)
Calogênese	1250,83	6,29	0,0007	30,1
Calo com gema	68,8333	4,86	0,0033	171,4
Broto por calo	0,0296833	6,85	0,0004	180,6
Oxidação	1635,33	9,21	0,0001	64,0

ANEXO 2.23 - Resumo da ANOVA no ensaio de influência do genótipo da planta doadora de explantes.

Parâmetro	QM	F	P $\leq$	CV (%)
Não responsivo	1216,0	13,27	0,0000	93,8
Calogênese	1035,33	4,50	0,0049	32,2
Calo com gema	288,0	10,16	0,0000	142,5
Broto por calo	0,277333	6,47	0,0006	188,2
Oxidação	211,333	1,57	0,2077	74,5