

ROBERSON DIBAX

**TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE *Eucalyptus saligna* COM O GENE *P5CSF129A*
VIA *Agrobacterium tumefaciens***

**CURITIBA
2007**

ROBERSON DIBAX

**TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE *Eucalyptus saligna* COM O GENE *P5CSF129A*
VIA *Agrobacterium tumefaciens***

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

Orientadora: Dr^a. Marguerite Quoirin
Co-orientador: Dr. Cícero Deschamps

**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 pelo candidato **ROBERSON DIBAX**, sob o título “**TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE *Eucalyptus saligna* COM O GENE p5csf129A VIA *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 argüido o candidato são de parecer pela “**APROVAÇÃO**” da Tese.

Curitiba, 23 de Agosto de 2007.

Dr. Luiz Gonzaga Esteves Vieira
Primeiro Examinador

Dr. Leonardo Ferreira Dutra
Segundo Examinador

Professor Dr. João Carlos Bepalhok Filho
Terceiro Examinador

Professora Dra. Luciana Lopes Fortes Ribas
Quarta Examinadora

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

Ao meu futuro.

OFEREÇO

Aos meus pais Pedro e Rozalia, *in memoriam*.

DEDICO

Alpha-60

Ninguém vive só no passado e ninguém viverá só no futuro.

O presente é a forma de toda e qualquer vida. Essa é uma propriedade que nenhum mal pode arrancar-lhe.

O tempo é como um círculo que gira sem fim...

O arco que desce é o passado, e o que sobe é o futuro.

Tudo o que foi dito, a não ser que as palavras mudem de sentido, ou o sentido das palavras seja mudado, pode até representar o presente, mas nada assegura que permanecerão valendo no futuro.

Trecho do filme *Alphaville* dirigido por Jean-Luc Godard (França-1965).

BIOGRAFIA

Roberson Dibax, filho de Rozalia Furman Dibax e Pedro Dibax nasceu em Curitiba Estado do Paraná em 17 de maio de 1974. Em 1995 ingressou no curso de Agronomia pela Universidade Federal do Paraná (UFPR) e obteve o título de Engenheiro Agrônomo em 2001. Em 2002 iniciou o curso de Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Agronomia (PGAPV-UFPR) sob orientação da Dra. Marguerite Quoirin e obteve o título de Mestre em 2004 com a defesa da sua dissertação intitulada: “**REGENERAÇÃO DE PLANTAS DE *Eucalyptus camaldulensis* A PARTIR DE FOLHAS COTILEDONARES**”. Neste mesmo ano, ingressou no curso de Doutorado no mesmo Programa de Pós-Graduação e em 2007 obteve o título de Doutor com a defesa da tese intitulada: “**TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE *Eucalyptus saligna* COM O GENE *P5CSF129A* VIA *Agrobacterium tumefaciens***”, sob orientação da Dra. Marguerite Quoirin. Durante o segundo semestre de 2007 atuou como docente das disciplinas de “Cultivo de células e Tecidos I e II” para o Curso de Biotecnologia Industrial da Universidade do Oeste de Santa Catarina (UNOESC-Campus de Videira).

AGRADECIMENTOS

À Fundação Araucária e CAPES pelo auxílio financeiro.

À UFPR pela oportunidade de realização do doutorado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia-Produção Vegetal, corpo docente e funcionários.

À minha orientadora Dra. Marguerite Quoirin, pela sua dedicada e competente orientação, paciência, confiança e amizade.

Ao Dr. Cicero Deschamps e ao Dr. João Carlos Bespalhok Filho, pela amizade, apoio e contribuições.

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

Aos integrantes do Laboratório de Biotecnologia Vegetal do IAPAR-Londrina, em especial aos pesquisadores Dr. Luiz Gonzaga Esteves Vieira, Dr. Hugo Bruno Correa Molinari e a Bióloga Marília Kaphan Freitas de Campos pelo fundamental auxílio, disponibilidade e ensinamentos técnicos prestados durante os trabalhos de biologia molecular.

Aos integrantes da minha banca examinadora, Dra. Luciana Lopes Fortes Ribas (Departamento de Botânica UFPR), Dr. Luiz Gonzaga Esteves Vieira (IAPAR-Londrina), Dr. Leonardo Ferreira Dutra (EMBRAPA-Florestas, Colombo-PR) e Dr. João Carlos Bespalhok Filho (PGAPV-UFPR) pelas contribuições prestadas para a finalização desta tese.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	xi
LISTA DE FIGURAS.....	xii
LISTA DE TABELAS.....	xv
LISTA DE ANEXOS.....	xvi
RESUMO.....	xviii
ABSTRACT.....	xix
1 INTRODUÇÃO GERAL.....	01
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	04
2.1 O gênero <i>Eucalyptus</i>	04
2.2 A espécie <i>Eucalyptus saligna</i> Smith.....	05
2.2.1 Classificação botânica.....	05
2.2.2 Características gerais da espécie.....	05
2.2.3 Micropropagação de <i>Eucalyptus saligna</i>	06
2.3 Regeneração de plantas de <i>Eucalyptus</i> por organogênese indireta..	07
2.4 Transformação genética em <i>Eucalyptus</i>	09
2.4.1 Transformação direta.....	09
2.4.2 Transformação indireta.....	10
2.4.2.1 Cepas de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	10
2.4.2.2 Duração da co-cultura.....	11
2.4.2.3 Compostos fenólicos e osmoprotetores.....	11
2.4.2.4 Solução de inoculação.....	12
2.4.2.5 Genótipo.....	12
2.4.2.6 Tipo de tecidos.....	12
2.4.2.7 Tratamento de sonicação e infiltração a vácuo.....	13
2.4.2.8 Pré-cultura.....	13
2.4.2.9 Concentração de antibióticos seletivos.....	13
2.4.3 Aplicações da engenharia genética no melhoramento de <i>Eucalyptus</i>	14
2.5 O estresse abiótico.....	17
2.5.1 Estresse causado por baixas temperaturas.....	17
2.5.2 Resposta ao estresse abiótico.....	18
2.5.3 Mecanismos de resistência ao estresse abiótico.....	20
2.5.3.1 Osmoprotetores.....	22
2.5.3.1.1 O papel da prolina na proteção ao estresse abiótico.....	23
2.6 REFERÊNCIAS.....	28
3 ORGANOGENESE E MICROPROPAGAÇÃO DE <i>Eucalyptus</i> <i>saligna</i>.....	41
RESUMO.....	41
ABSTRACT.....	42
3.1 INTRODUÇÃO.....	43
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	44
3.2.1 Local de realização dos experimentos.....	44
3.2.2 Condições gerais de cultura <i>in vitro</i>	44
3.2.3 Organogênese indireta a partir de folhas cotiledonares.....	44

3.2.4	Identificação, isolamento e seleção de um clone.....	45
3.2.5	Multiplicação das gemas.....	45
3.2.6	Organogênese a partir de folhas.....	46
3.2.7	Alongamento e enraizamento.....	47
3.2.8	Aclimatização.....	48
3.2.9	Análise estatística.....	48
3.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
3.3.1	Organogênese indireta a partir de folhas cotiledonares.....	49
3.3.2	Multiplicação das gemas.....	50
3.3.3	Organogênese a partir de folhas.....	52
3.3.4	Alongamento e enraizamento.....	56
3.3.5	Aclimatização.....	59
3.4	Resumo das etapas de regeneração de gemas e micropropagação de <i>Eucalyptus saligna</i>	60
3.5	CONCLUSÕES.....	62
3.6	REFERÊNCIAS.....	63
4	TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE <i>Eucalyptus saligna</i> com o gene <i>P5CSF129A</i> VIA <i>Agrobacterium tumefaciens</i>.....	66
	RESUMO.....	66
	ABSTRACT.....	67
4.1	INTRODUÇÃO.....	68
4.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	70
4.2.1	Otimização da transformação genética via <i>Agrobacterium tumefaciens</i> em <i>Eucalyptus saligna</i>	70
4.2.1.1	Local de realização dos experimentos.....	70
4.2.1.2	Material vegetal e condições de cultura.....	70
4.2.1.3	Cepa bacteriana e vetor binário.....	71
4.2.1.4	Condições de crescimento bacteriano.....	72
4.2.1.5	Condições gerais de inoculação, co-cultura e cultura dos explantes.....	72
4.2.1.6	Efeito do tipo de explante, da duração da co-cultura e da densidade ótica da solução bacteriana ($DO_{600nm}=1,0$) na expressão transiente do gene <i>GUS</i>	72
4.2.1.7	Delineamento experimental.....	73
4.2.1.8	Análise histoquímica da β -glucuronidase.....	73
4.2.2	Transformação genética em <i>E. saligna</i> com o gene <i>P5CSF129A</i>	74
4.2.2.1	Material vegetal e condições de inoculação.....	74
4.2.2.2	Condições de co-cultura e seleção de células transformadas.....	74
4.2.2.3	Cultura de explantes resistentes a canamicina.....	74
4.2.2.4	Multiplicação das gemas.....	75
4.2.2.5	Alongamento e enraizamento das brotações.....	75
4.2.2.6	Aclimatização.....	75
4.2.3	Análises moleculares da integração do transgene <i>P5CSF129A</i> em plantas de <i>E saligna</i>	76
4.2.3.1	Material vegetal e extração de DNA.....	76
4.2.3.2	Análises da integração do transgene.....	76
4.2.4	Determinação da massa fresca total e do teor de prolina na parte.....	77

	aérea e raiz em plantas controle e plantas transformadas com <i>P5CSF129A</i>	77
4.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	79
4.3.1	Otimização da transformação genética via <i>A. tumefaciens</i> em <i>E. saligna</i>	79
4.3.1.1	Efeito do tipo de explante e tempo de co-cultura.....	79
4.3.1.2	Comparação entre explantes inoculados em soluções bacterianas com DO _{600nm} de 0,25, 0,50 e 1,00.....	83
4.3.2	Transformação genética em <i>E. saligna</i> com o gene <i>P5CSF129A</i>	84
4.3.3	Análises moleculares da integração do transgene <i>P5CSF129A</i>	88
4.3.4	Determinação da massa fresca total e do teor de prolina na parte aérea e raízes de plantas controle e plantas transformadas com o gene <i>P5CSF129A</i>	90
4.4	CONCLUSÕES	95
4.5	REFERÊNCIAS	96
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	100

LISTA DE ABREVIATURAS

2,4-D	ácido 2,4-diclorofenoxiacético
AIB	ácido indolbutírico
ANA	ácido naftalenoacético
B5	meio de cultura de Gamborg et al. (1968)
BAP	6-benzilaminopurina
BIP	Meio “Bud Induction Pretreatment” de (Tournier et al.,2003)
CaMV 35S	promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor
CPPU	(N-(2-cloro-piridil)-N-feniluréia)
CQB	Certificado de Qualidade em Biossegurança
Cx	cefotaxima
DNA	ácido desoxirribonucléico
DO	densidade ótica
GA ₃	ácido giberélico 3
<i>GUS</i>	gene codificante da enzima β-glucuronidase
JADS	meio de cultura de Correia (1993) e Correia et al. (1995)
Km	canamicina
LD	meio de Lainé e David (1994)
LEA	“Late Embryogenic Protein”
MS	meio de Murashige e Skoog (1962)
MS/2	meio de Murashige e Skoog com a concentração de sais reduzida à metade
MSM	meio de Murashige e Skoog com a concentração de nitratos de potássio e amônio reduzida à metade
NN	meio de Nitsch e Nitsch (1965)
<i>NPTII</i>	gene da neomicina fosfotransferase
P5CS	enzima pirrolina-5-carboxilato sintetase
<i>P5CS</i>	gene que codifica a enzima pirrolina-5-carboxilato sintetase
<i>P5CSF129A</i>	gene mutante que codifica a enzima pirrolina-5-carboxilato sintetase
PBI121	vetor binário de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
PCR	reação em cadeia da polimerase
pH	potencial hidrogeniônico
PVC	policloreto de vinila
PVP	polivinilpirrolidona
Rif	rifampicina
rpm	rotações por minuto
SDS	duodecil sulfato de sódio
SSC	citrato salino de sódio
T-DNA	DNA de transferência
TDZ	thidiazuron
U	unidade
UV	ultravioleta
WPM	meio “Woody Plant Medium” (Lloyd e Mccown, 1980)
X-gluc	“5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronic acid”
YEB	meio “Yeast Extract Broth” (Miller, 1972)

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 - Via metabólica de biossíntese de prolina em plantas superiores (A) (Via Glutamato), (B) (Via Ornitina). GSA, Ácido glutâmico semialdeído; P5C, Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato; P5CS, P5C sintetase; P5CR, P5C redutase; ProDH, prolina desidrogenase; P5CDH, P5C desidrogenase. OAT, Ornitina d-aminotransferase..... 24
- FIGURA 2 - Calogênese e regeneração de gemas a partir de folhas cotiledonares de *E. saligna* cultivadas em meio MS contendo 2,70 μ M de ANA e 4,44 μ M de BAP. (A) Formação de calos após 30 dias de cultivo. (B) Região da base do pecíolo apresentando regeneração de gemas após 60 dias de cultivo. Barras = 2,0 mm..... 50
- FIGURA 3 - Taxa de multiplicação de *E. saligna* em função das concentrações de BAP (μ M)..... 52
- FIGURA 4 - Calogênese e regeneração de gemas a partir de folhas de *E. saligna*. (A) Formação de calos após 15 dias de cultivo em meio de cultura MSM contendo 0,1 μ M de ANA e 1,0 μ M de TDZ. (B) Início da formação de calos com aspecto organogênico após 30 dias de cultivo no mesmo meio. (C e D) Regeneração de gemas após 30 dias da transferência dos explantes para o meio de cultura contendo 0,67 μ M de ANA e 1,11 μ M de BAP. Barras = 5,0 mm..... 55
- FIGURA 5 - Alongamento e enraizamento de microestacas de *E. saligna*. (A) Microestaca alongada após 28 dias de cultura em meio MSM contendo 2,5% de carvão ativado, (B) Planta enraizada após 28 dias de cultura em meio MS/2 sem reguladores vegetais. Barras = 1,5 cm..... 58
- FIGURA 6 - (A e B) Plantas de *E. saligna* aclimatizadas em substrato Plantmax® HT após 28 dias em casa-de-vegetação..... 59
- FIGURA 7 - Região T do plasmídeo pBI121 utilizado na transformação genética de *Eucalyptus saligna*. Construção gênica *P5CSF129A* modificada (Zhang et al., 1995) para conferir a inibição do feedback da prolina onde *P5CS* é o gene de *Vigna aconitifolia*; *NPTII*, gene que codifica a neomicina fosfotransferase; *GUS*, gene que codifica a β -glucuronidase; NOS-P, promotor do gene da nopalina sintetase da *A. tumefaciens*; 35S-P, promotor constitutivo do vírus do mosaico da couve-flor; NOS-3', terminador do gene da nopalina

- sintetase da *A. tumefaciens*; RD, borda direita do T-DNA; LB, borda esquerda do T-DNA..... 71
- FIGURA 8 - Expressão do gene *GUS* em dois tipos de explantes foliares de *E. saligna* inoculados com *A. tumefaciens* após 3 e 5 dias de co-cultura..... 79
- FIGURA 9 - Expressão do gene *GUS* em explantes foliares de *E. saligna* co-cultivados com *A. tumefaciens* por 3 e 5 dias seguidos de 7 dias em meio seletivo contendo 500 mg.L⁻¹ de Cx e 50 mg.L⁻¹ de Km..... 80
- FIGURA 10 - Expressão transiente do gene *GUS* em folhas e segmentos foliares de *E. saligna* após 5 dias de co-cultura em OD_{600nm} = 1,00 e após 7 dias em meio seletivo. (A) Folha não inoculada; (B) Folha exibindo expressão do gene *GUS* após 5 dias de co-cultura; (C) Folha exibindo expressão do gene *GUS* na base do pecíolo após 7 dias em meio seletivo; (D) Segmento foliar não inoculado; (E) Segmento foliar exibindo expressão do gene *GUS* na região do corte após 5 dias de co-cultura; (F) Segmento foliar exibindo manchas de expressão do gene *GUS* após 7 dias de co-cultura. Barras = 2mm..... 82
- FIGURA 11 - Expressão do gene *GUS* em explantes foliares de *E. saligna* inoculados com *A. tumefaciens* com três densidades óticas após 5 dias de co-cultura e 7 dias em meio seletivo..... 83
- FIGURA 12 - (A e B) Indução de calos e gemas no segmento foliar de *E. saligna* que originou o evento 1. (A) Calos induzidos em meio seletivo MSM contendo 0,1 µM de ANA e 1,0 µM de TDZ 90 dias após a inoculação. (B) Indução de gemas em meio de cultura MSM contendo 0,67 µM de ANA e 1,11 µM de BAP. (C) Indução do alongamento das gemas após 14 dias em meio de cultura MSM contendo 1,45 µM de GA3. (D) Expressão estável do gene *GUS* em folha do evento 1 após a fase de multiplicação. Barras = 2 mm..... 86
- FIGURA 13 - Eletroforese dos produtos do PCR realizado com DNA de *E. saligna*. Coluna M – marcador de peso molecular (Ladder 100 pb); coluna C – controle negativo (planta de *E. saligna* não inoculada); coluna 1 – evento 1; coluna B – branco; coluna P – plasmídeo pBI121-*P5CSF129A*..... 88
- FIGURA 14 - Resultado do Southern blot realizado com DNA de *E. saligna* utilizando a sonda do gene *P5CSF129A*. Coluna P – Plasmídeo pBI121-*P5CSF129A*; coluna T – planta transgênica de *E. saligna*; coluna C – controle negativo (planta de *E. saligna* não transformada) exibindo três cópias isomórficas

entre o gene *P5CS* de *V. aconitifolia* e o gene de *E. saligna*..... 89

- FIGURA 15 - Resultado do Southern blot realizado com DNA de *E. saligna* utilizando a sonda do gene *GUS*. Linha P – plasmídeo pBI121-*P5CSF129A*, linha B – branco; linha T – planta transgênica de *E. saligna* demonstrando a inserção de duas cópias do gene *GUS* no genoma; linha C – controle negativo (planta de *E. saligna* não transformada)..... 90
- FIGURA 16 - Massa fresca (g) da parte aérea em plantas de *E. saligna* controle (não transformadas) e em plantas transformadas com o gene *P5CSF129A* (média + desvio-padrão) (n=4)..... 91
- FIGURA 17 - Plantas de *E. saligna* controle e transformadas com o gene *P5CSF129A*, 150 dias após a aclimatização. (A) planta controle (direita) e planta transformada (esquerda); (B) planta transformada (esquerda) e planta controle (direita)..... 91
- FIGURA 18 - Massa fresca (g) das raízes em plantas de *E. saligna* controle (não transformadas) e em plantas transformadas com o gene *P5CSF129A* (média + desvio-padrão) (n=4)..... 92
- FIGURA 19 - Comparação entre as raízes de plantas de *E. saligna* controle e transformadas com o gene *P5CSF129A*. (A) Plantas controle exibindo raízes lignificadas. (B) Plantas transformadas exibindo raízes jovens e tenras, 150 dias após a aclimatização..... 92
- FIGURA 20 - Concentração de prolina da parte aérea de plantas de *E. saligna* controle (não transformadas) e de plantas transformadas (média + desvio-padrão) (n=4)..... 93
- FIGURA 21- Concentração de prolina nas raízes de *E. saligna* controle (não transformadas) e de plantas transformadas (média + desvio-padrão) (n=4)..... 94

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Micropropagação de <i>E. saligna</i> (reguladores vegetais em μM).....	06
TABELA 2 - Regeneração <i>in vitro</i> de plantas de <i>Eucalyptus</i> a partir de explantes cotiledonares (reguladores vegetais em μM).....	07
TABELA 3 - Regeneração de plantas de <i>Eucalyptus</i> a partir de folhas (reguladores em μM).....	08
TABELA 4 - Regeneração de gemas a partir de explantes foliares de <i>E. saligna</i> em meio de cultura MSM contendo ANA e TDZ por 30 dias seguido de subcultivo em meio MSM contendo 0,67 μM de ANA e 1,11 μM de BAP por 30 dias.....	53
TABELA 5 - Efeito do carvão ativado e de três concentrações de ANA no enraizamento de microestacas de <i>E. saligna</i> após 28 dias de cultivo em meio MS/2*.....	58
TABELA 6 - Resumo das etapas de germinação das sementes de <i>E. saligna</i> , regeneração a partir de folhas cotiledonares e multiplicação das gemas.....	60
TABELA 7 - Resumo das etapas de regeneração a partir de folhas de <i>E. saligna</i> , alongamento, enraizamento e aclimatização das plantas.....	61
TABELA 8 - Obtenção de calos e gemas em segmentos foliares de <i>E. saligna</i> não inoculados e após a inoculação com <i>A. tumefaciens</i> e seleção das células transformadas.....	85

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1 - Meio de cultura MS modificado (MS/2) utilizado para a germinação das sementes de <i>E. saligna</i> e o enraizamento.....	103
ANEXO 2 - Meio de cultura MS com a concentração de nitratos de potássio e amônio reduzida à metade (MSM) utilizado para a organogênese a partir de folhas cotiledonares de <i>E. saligna</i>	104
ANEXO 3 - Meio de cultura MS com as concentrações de nitratos de potássio e amônio reduzidas à metade (MSM) utilizado para a multiplicação das gemas de <i>E. saligna</i>	105
ANEXO 4 - Meio de cultura MS com as concentrações de nitratos de potássio e amônio reduzidas à metade (MSM) utilizado para a organogênese a partir de folhas de <i>E. saligna</i>	106
ANEXO 5 - Meio de cultura MS com as concentrações de nitratos de potássio e amônio reduzidas à metade (MSM) utilizado para o alongamento das brotações de <i>E. saligna</i>	107
ANEXO 6 - Resultados da análise de variância para as variáveis analisadas durante o processo de indução de gemas adventícias a partir de folhas de <i>E. saligna</i>	108
ANEXO 7 - Resultados da análise de variância para as variáveis analisadas durante o processo de enraizamento das microestacas de <i>E. saligna</i>	108
ANEXO 8 - Meio de cultura MS com as concentrações de nitratos de potássio e amônio reduzidas à metade (MSM) utilizado para os experimentos de transformação genética de <i>E. saligna</i>	109
ANEXO 9 - Composição do meio de cultura YEB (Miller, 1972) utilizado para o cultivo de <i>A. tumefaciens</i>	110
ANEXO 10 - Distribuição da expressão do gene <i>GUS</i> em dois tipos de explantes foliares de <i>E. saligna</i> após 3 e 5 dias de co-cultura...	110
ANEXO 11 - Distribuição da expressão do gene <i>GUS</i> em explantes foliares de <i>E. saligna</i> inoculados com <i>A. tumefaciens</i> , co-cultivados com a bactéria por 3 e 5 dias seguidos de 7 dias em meio seletivo contendo 500 mg.L ⁻¹ Cx e 50 mg.L ⁻¹ de Km.....	111

ANEXO 12 - Distribuição da expressão do gene <i>GUS</i> em explantes foliares de <i>E. saligna</i> inoculados com soluções de <i>A. tumefaciens</i> de diferentes densidades óticas 5 dias após a co-cultura e depois de 7 dias de cultivo em meio seletivo.....	112
--	-----

**TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE *Eucalyptus saligna* COM O GENE *P5CSF129A* VIA
*Agrobacterium tumefaciens***

RESUMO

No Brasil, especialmente na região Sul, os estresses causados por baixas temperaturas são os que mais influenciam de forma negativa a produtividade de *Eucalyptus spp.* Diante desta limitação, os programas de reflorestamento perderam o interesse pelo cultivo do *Eucalyptus saligna* e substituíram esta espécie por outras que apresentam maior resistência ao frio. O objetivo desta pesquisa foi a obtenção de plantas de *Eucalyptus saligna* geneticamente transformadas com o gene *P5CSF129A*, que codifica um mutante da enzima chave P5CS (Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato sintetase) da síntese do aminoácido L-prolina, cuja propriedade de aumentar a tolerância ao frio já foi confirmada em algumas espécies de plantas. Este trabalho foi dividido em duas etapas, sendo a primeira orientada no estudo da organogênese e micropropagação para a espécie e a segunda etapa referente à otimização da transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens* com o gene *P5CSF129A* e sua expressão nas plantas de *Eucalyptus saligna*. Na primeira etapa, genótipos da espécie foram estabelecidos a partir de folhas cotiledonares cultivadas em meio de cultura MS contendo 2,70 μM de ANA e 4,44 μM de BAP. Após a seleção de um genótipo para o cultivo *in vitro*, foram realizados estudos para determinar a concentração de BAP que forneça a taxa de multiplicação mais elevada em meio MS com as concentrações de nitratos de potássio e amônio reduzidos à metade (MSM). Foram comparadas as concentrações a seguir: 0; 1,11; 2,22; e 4,44 μM . Os melhores resultados foram obtidos com a utilização de 1,11 a 3,33 μM de BAP. Estudos de regeneração de gemas a partir de explantes foliares foram realizados em meio de cultura MSM contendo 0,1 μM de ANA combinado com 1,0; 1,5 e 2,0 μM de TDZ, seguido de 0,67 μM de ANA e 1,11 μM de BAP. O melhor resultado foi obtido após o cultivo dos explantes em meio contendo 0,1 μM de ANA e 1,0 μM de TDZ por 30 dias, seguido de 0,67 μM de ANA e 1,11 μM de BAP, proporcionando uma taxa de regeneração de 30%. Para o alongamento, as brotações foram cultivadas durante 28 dias em meio de cultura MSM contendo 2,5% de carvão ativado e em seguida transferidas para o meio de enraizamento MS/2 (com a concentração dos sais reduzida de metade) por mais 28 dias. As micro-estacas enraizadas foram aclimatizadas em casa-de-vegetação utilizando o substrato Plantmax[®], proporcionando uma taxa de sobrevivência de 80% após 28 dias. Com relação à transformação genética, os melhores resultados na expressão transiente do gene *GUS* foram obtidos com a utilização de segmentos foliares (meia folha), co-cultivados durante 5 dias após a inoculação em solução bacteriana de $\text{DO}_{600\text{nm}}=0,5$, e este tratamento foi utilizado para a transferência do gene de interesse. A co-cultura foi realizada no escuro em meio MSM contendo 0,1 μM de ANA e 1,0 μM de TDZ. Após, os explantes foram transferidos para o mesmo meio contendo 500 mg.L^{-1} de cefotaxima (Cx) e 50 mg.L^{-1} de canamicina (Km) por dois períodos de 28 dias e em seguida a concentração de Cx foi reduzida para 250 mg.L^{-1} . Os calos que se formaram nos explantes foliares foram transferidos para o meio MSM contendo 0,67 μM de ANA e 1,11 μM de BAP por mais 28 dias sob condições de luz até a formação de gemas. Estas foram transferidas para o meio MS contendo 1,45 μM de GA_3 durante 14 dias e, finalmente, para o meio de multiplicação contendo 1,11 μM de BAP. A transformação genética foi confirmada num evento por PCR seguido de Southern blot. O nível de prolina foi medido no evento e apresentou um aumento de quatro vezes em comparação com o controle, confirmando o incremento na biossíntese de prolina. Concluiu-se neste trabalho que o genótipo de *Eucalyptus saligna* utilizado apresentou um comportamento responsivo na indução da organogênese nos tecidos estudados e possibilitou a transformação genética da espécie com o gene *P5CSF129A*.

Palavras-chave: espécies florestais, cultivo *in vitro*, estresse abiótico, prolina

Agrobacterium tumefaciens-MEDIATED GENETIC TRANSFORMATION OF *Eucalyptus saligna* WITH *P5CSF129A* GENE

ABSTRACT

In Brazil, especially in the Southern region, stresses caused by cold and eventual frost are those that exert the most negative effect on the productivity of *Eucalyptus spp.* Considering this limitation, the reforestation programs loose their interest for the culture of *Eucalyptus saligna* and substituted this species for another that present greater resistance to the cold. The purpose of this research was to investigate some parameters affecting *Agrobacterium*-mediated gene transfer and to obtain plants of *Eucalyptus saligna* expressing the *P5CSF129A* gene that encodes a mutant of the key-enzyme P5CS (Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase) of proline biosynthesis. Proline involvement in increasing cold tolerance has already been demonstrated in some plant species. In order to reach this objective, this study was divided in two parts. The first one consisted in the establishment of plant regeneration and micropropagation procedures for a selected genotype. The second part referred to the optimisation of transformation procedure with *P5CSF129A* gene mediated by *Agrobacterium tumefaciens* and expression in *Eucalyptus saligna*. Shoots were obtained from cotyledonary explants of *E. saligna* cultured on MS medium supplemented with 2.7 μM naphthalene acetic acid (NAA) and 4.44 μM 6-benzylaminopurine (BAP). After genotype selection for *in vitro* culture, studies were carried out in order to define the best concentration of BAP for multiplication on MS medium with half-strength concentrations of potassium and ammonium nitrates (MSM). The multiplication rate was established for the following concentrations of BAP: 0; 1.11; 2.22; 3.33 and 4.44 μM . The best results were obtained in the presence of BAP (1.11 – 3.33 μM). Experiments of bud regeneration from leaf explants were done on MSM culture medium containing 0,1 μM NAA combined with the 1.0; 1.5 or 2.0 μM TDZ, followed by 0.125 μM NAA and 0.250 μM BAP. The best regeneration rate was 30%, obtained after explant culture on MSM medium containing 0.1 μM NAA and 1.0 μM TDZ for 30 days, followed by 30 days on MS medium containing 0.67 μM NAA and 1.11 μM BAP. For elongation, shoots were cultured for 28 days on MSM medium containing 2.5% of activated charcoal. Micro-cuttings were rooted after 28 days of culture on MS/2 medium (with half-strength concentration of salts) without growth regulators and activated charcoal. The plants were acclimatized in a greenhouse in a Plantmax[®] mixture, providing a survival rate of 80% after 28 days. The best results of transient expression of *GUS* gene were obtained with half leaves inoculated in a bacterial solution of $\text{OD}_{600\text{nm}} = 0.5$ for 30 min and co-cultured for five days. Co-culture was done in the dark on MSM culture medium supplemented with 0.1 μM NAA and 1.0 μM TDZ. The explants were then transferred to the same medium containing 500 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ cefotaxime (Cx) and 50 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ kanamycin (Km) for two 28-day-periods and then the Cx concentration was reduced to 250 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$. The calli that appeared on leaf explants were transferred on MSM medium containing 0.67 μM NAA and 1.11 μM BAP and cultured under light for another 28 days period. Shoots were cultured on MSM medium with 1.45 μM GA_3 for 14 days and finally on MSM medium containing 1.11 μM BAP for shoot multiplication. The presence of the transgene in the genome of one event was demonstrated by PCR and Southern blot analysis. Transformation efficiency was 0.5%. Proline level was measured in the event and in non transformed plants and showed a four times enhanced production in comparison with the control. In conclusion, the *Eucalyptus saligna* genotype used in this study presented a responsive behavior for organogenesis induction in tissues studied and the genetic transformation of this specie with the *P5CSF129A* gene was possible.

Key-words: forestry species, *in vitro* culture, abiotic stress, proline.

1 INTRODUÇÃO GERAL

O gênero *Eucalyptus* L'Hér. (Myrtaceae) é nativo da Austrália e muitas espécies e híbridos são cultivados em larga escala em várias regiões de clima tropical e subtropical em todo o mundo, incluindo Argentina, Austrália, Brasil, Marrocos, Portugal, África do Sul, Espanha, Estados Unidos e Uruguai (ELDRIDGE et al., 1994).

Atualmente, o Brasil possui a maior área plantada de eucaliptos do mundo (mais de 3 milhões de hectares). A produção brasileira concentra-se em Minas Gerais e São Paulo, os quais lideram a produção nacional e, em seguida, com menor produção, nos Estados do Paraná e Santa Catarina, devido às restrições climáticas para o gênero (SOCIEDADE BRASILEIRA DE SILVICULTURA, 2007). O Brasil é o maior produtor mundial de celulose (cerca de 6,3 milhões de toneladas por ano). As indústrias brasileiras que usam o eucalipto como matéria prima para a produção de papel, celulose e demais derivados representam 4% do Produto Interno Bruto, 8% das exportações e geram aproximadamente 150 mil empregos (SOCIEDADE BRASILEIRA DE SILVICULTURA, 2007).

A utilização econômica da espécie *E. saligna* Smith concentra-se principalmente no aproveitamento de sua madeira para serraria e laminações e, com menor frequência, para papel e celulose, devido às propriedades físicas de sua madeira. O cultivo comercial desta espécie é recomendado para os três Estados da região Sul do Brasil, porém, a ocorrência de geadas nesta região é o fator que mais influencia de forma negativa a produtividade e o interesse pelo seu cultivo (AMBIENTE BRASIL, 2007). Diante desta limitação, os programas de reflorestamento perderam o interesse no cultivo de *E. saligna* e substituíram esta espécie por *E. viminalis*, *E. dunnii* e *E. grandis*, por serem mais resistentes às geadas (AMBIENTE BRASIL, 2007).

De acordo com Higa et al. (1994), as geadas registradas em 1972, 1974, 1975 e 1991 foram as de maior influência sobre a atividade florestal e causaram em alguns locais, perdas de até 100%, em talhões de espécies suscetíveis, estabelecidas principalmente no Sul do Brasil. Esses autores registram que as geadas ocorridas nestes anos, também comprometeram o abastecimento da

indústria de base florestal. As geadas causam danos irreversíveis às membranas celulares e em decorrência disso, danos em mudas, aumento da susceptibilidade à doenças e pragas e defeitos na madeira contribuem para a queda da produtividade e depreciação do produto final (HIGA et al. 1994).

Diante dos problemas e limitações decorrentes do melhoramento convencional para a obtenção de plantas tolerantes ao frio, a engenharia genética representa uma estratégia promissora para aumentar a capacidade das plantas em tolerar este tipo de estresse (HARE e CRESS, 1997). Entre as diferentes estratégias que podem ser utilizadas para aumentar a resistência ao frio está o acúmulo de compostos osmóticos como a prolina. O aumento da tolerância ao estresse causado pelo frio já foi obtido em algumas espécies de plantas mediante a introdução do gene *P5CS* (Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato sintetase) envolvido na síntese do aminoácido L-prolina, como por exemplo em arroz (HUR et al., 2004), *Arabidopsis* (SAVOURE et al., 1997; NANJO et al., 1999), *Larix sp.* (GLEESON et al., 2005) e tabaco (KONSTANTINOVA et al., 2002).

A obtenção de plantas de *E. saligna* acumulando altos níveis de prolina representa um passo inicial nos estudos de resistência ao estresse causado. O material vegetal disponibilizado nesta pesquisa dará oportunidade para a realização de estudos moleculares e fisiológicos que determinarão a expressão do gene e assim, determinar os mecanismos de tolerância ao estresse e futura utilização no sistema produtivo de plantas de *E. saligna* geneticamente modificadas com o gene *P5CSF129A* (gene mutante que codifica a enzima Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato sintetase).

O objetivo geral deste estudo foi a transformação genética em *E. saligna* via co-cultivo com *Agrobacterium tumefaciens* com o gene *P5CSF129A*. Para que o objetivo proposto fosse alcançado, estudos referentes à organogênese a partir de folhas cotiledonares e micropropagação foram realizados para a determinação de um protocolo de regeneração de plantas, bem como o estabelecimento de uma metodologia que permitisse a regeneração de gemas a partir de segmentos foliares de um genótipo e sua posterior utilização nos experimentos de transformação genética. Com relação à transformação genética, foram investigados alguns parâmetros que influenciam a eficiência da transformação e realizadas análises

moleculares e bioquímicas para comprovar a inserção do gene de interesse e as conseqüências de sua expressão no teor de prolina e na massa fresca das plantas de *E. saligna*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O gênero *Eucalyptus*

O gênero *Eucalyptus*, pertencente à família Myrtaceae, está representado por 520 espécies e totaliza 600 denominações entre espécies, híbridos e variedades (RIZZINI, 1971). Os eucaliptos foram introduzidos para cultivo e aclimatados em várias regiões do mundo a partir do século 18. De acordo com a FAO (“Food and Agriculture Organization’s”), em 1981 o eucalipto já havia sido introduzido para cultivo e aclimatado em 96 países e regiões das Américas do Norte, Central e do Sul, México, Europa e Índia (CHEN e EVANS, 1990).

Ferreira (1979) descreve os eucaliptos como sendo as árvores folhosas de mais rápido crescimento (média de 45 m³/ha por ano em plantios clonais) e mais altas do mundo. Existem espécies cujas árvores registram alturas superiores a 100 m, as quais produzem fibras e polpa de madeira de alta qualidade, com baixo custo e em curto espaço de tempo, com ciclos de até 21 anos (HO et al., 1998).

A utilização econômica do eucalipto está diretamente relacionada às características da espécie quanto às condições climáticas da localização geográfica (TURNBULL, 1999). Os eucaliptos são ricos em óleos essenciais que são amplamente utilizadas nas indústrias farmacêuticas e perfumarias. Algumas espécies como ornamentais, quebra ventos, combustível para locomotivas, polpa para produção de papel, carvão e postes (TURNBULL, 1999).

A importância econômica do gênero deve-se à versatilidade de suas aplicações econômicas aliada a uma taxa de crescimento rápido, garantindo assim o crescente interesse pela produção que visa atender a demanda de polpa para a produção de celulose, combustível e madeira para construções (MACRAE e VAN STADEN, 1990). As maiores áreas plantadas com eucalipto concentram-se nas regiões de clima tropical, como África do Sul, Angola, Brasil, China e Índia. No Brasil, as plantações florestais ocupam 550 milhões de hectares, dos quais, cinco milhões de hectares são destinados aos plantios comerciais, que garantem parte da madeira consumida, preservando desta forma as florestas nativas (AMS, 2006). Hoje, o Brasil é o maior produtor mundial de celulose extraída de árvores de eucalipto (11 milhões de toneladas por ano) (AMS, 2006).

No Brasil, as espécies mais utilizadas são *E. grandis* (55%), *E. saligna* (17%), *E. urophylla* (9%) e *E. viminalis* (2%). De modo geral, a madeira obtida de plantios de eucalipto está concentrada em três espécies: *E. grandis*, *E. saligna* e *E. urophylla*, além do híbrido *E. grandis* x *E. urophylla*, que atendem perfeitamente as exigências industriais (SILVA, 2005).

2.2 A espécie *E. saligna* Smith

2.2.1 Classificação botânica

Segundo a chave de identificação de espécies florestais (IPEF, 2007), a espécie *Eucalyptus saligna* apresenta a seguinte classificação botânica:

Divisão: Angiospermae
Classe: Dicotyledoneae
Subclasse: Archichlamydeae
Ordem: Myrtiflorae (Myrtales)
Família: Myrtaceae
Gênero: *Eucalyptus*
Subgênero: *Symphyomyrtus*
Secção: *Transversaria*
Série: *Saligna*
Sub-série: *Saligninae*
Espécie: *Eucalyptus saligna*
Tipo de casca: Gum, Blue gum
Código Pryor e Johnson: SECAC

2.2.2 Características gerais da espécie

A espécie *E. saligna* é conhecida na Austrália como “Sydney blue gum” e distribui-se geralmente na região litorânea e nos vales das cadeias montanhosas próximas ao litoral de New South Wales e ao sul de Queensland (BOLAND et al., 1989). A distribuição natural da espécie situa-se entre as latitudes de 28 a 35° , desde o nível do mar até 1000 m.

A precipitação pluviométrica anual ideal para o cultivo situa-se entre 800 e 1200 mm, com chuvas uniformemente distribuídas durante o ano ou concentradas no verão, porém, a estação seca não deve ultrapassar 4 meses (WACHIRA et al., 1994). Com relação às temperaturas médias para cultivo, o *E. saligna* apresenta alta

susceptibilidade às geadas, porém esta espécie adapta-se facilmente em locais onde a temperatura média das máximas do mês mais quente encontra-se na faixa de 28 a 30° C e das mínimas do mês mais frio entre 3 a 4° C (FERREIRA, 1979).

A madeira é indicada para usos gerais, como por exemplo, construções, laminações de móveis, caixotaria, postes, escoras, mourões, celulose e carvão e para reflorestamentos. Em função do sucesso alcançado com a espécie no Estado de São Paulo, o plantio de *E. saligna* é recomendado para todas as regiões, com restrições a locais onde ocorram geadas ou deficiências hídricas severas (SILVA, 2005). Frequentemente a espécie *E. saligna* é confundida com *E. grandis* em função das semelhanças existentes entre elas (FERREIRA, 1979).

2.2.3 Micropropagação de *E. saligna*

A disponibilidade de trabalhos relacionados à micropropagação da espécie *E. saligna* é restrita na literatura, sendo que até o presente, não foram publicados protocolos de regeneração de gemas adventícias a partir de calos induzidos em tecidos juvenis. Os trabalhos existentes para a espécie foram desenvolvidos a partir de explantes obtidos de material conduzido a campo (Tabela 1).

Tabela 1- Micropropagação de *E. saligna* (reguladores vegetais em µM)

Tipo de explante	Meio de multiplicação	Meio de alongamento	Meio de enraizamento	Referências
Segmentos nodais	Sais do meio MS Vitaminas do meio B5 ¹ 0,44 BAP	MS Sem reguladores	Meio de KNOP ² 4,92 AIB	Fantini Júnior e Graça (1990)
Segmentos nodais	MS 0,05 ANA 0,88 BAP	Não indicado	½ MS 9,84 AIB	Le Roux e Van Staden (1991)

¹B5 (Gamborg et al.,1968); ²Knop (1865)

2.3 Regeneração de plantas de *Eucalyptus* por organogênese indireta

O estabelecimento de uma metodologia eficiente de regeneração de plantas por organogênese indireta é fundamental para os estudos de transformação genética em *Eucalyptus* spp. A organogênese em *Eucalyptus* inicia-se geralmente a partir de explantes juvenis, tais como folhas cotiledonares (Tabela 2) e folhas oriundas de material micropropagado (Tabela 3).

Tabela 2 - Regeneração *in vitro* de plantas de *Eucalyptus* a partir de explantes cotiledonares (reguladores vegetais em μM).

Espécie	Meio de calogênese	Meio de regeneração	Meio de enraizamento	Referências
<i>E. camaldulensis</i>	Sais MS, vitaminas NN ¹ 5,3 ANA e 3,1 BAP	O mesmo para a calogênese	0,5 – 5,3 ANA	Diallo e Duhoux (1984)
<i>E. camaldulensis</i>	MS 16,2 ANA, 4,44 BAP	Mesma composição do meio de calogênese	MS 5,0 IBA	Ho et al. (1998)
<i>E. camaldulensis</i>	B5 ² 1,0 4-CPPU, 0,1 ANA 5% sacarose	B5 ² 0,1 ANA, 0,9 BAP	¼ B5 ² 0,05 ANA	Harcourt et al. (2000)
<i>E. camaldulensis</i>	MS 2,7 ANA, 4,44 BAP	Mesma composição do meio de calogênese	MS Sem reguladores	Dibax et al. (2005)
<i>E. globulus</i>	MS; 1,0 BAP, 1,0 TDZ	Mesma composição do meio de calogênese 5,0 BAP	Não indicado	Azmi et al. (1997)
<i>E. globulus</i>	MS; 0,2 2,4-D, 0,05 TDZ ou 5,0 ANA	MS 2,65 ANA e 4,4 BAP	Não indicado	Nugent et al. (2001)
<i>E. globulus</i>	MS 5,3 ANA e 2,2 BAP	SP ³ 2,4-D e BAP	AIB	Bandyopadhyay et al. (1999)
<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>	Não indicado	Não indicado	0,5 – 5,3 ANA	Esmeraldo et al (1997)

¹NN (Nitsch e Nitsch, 1969); ²B5 (Gamborg et al. 1968); ³SP (Lainé e David, 1994).

Tabela 3 - Regeneração de plantas de *Eucalyptus* a partir de folhas (reguladores em μM)

Espécie	Meio de calogênese	Meio de regeneração	Meio de enraizamento	Referências
<i>E. camaldulensis</i>	WPM ¹ 1g.L ⁻¹ caseína 16 ANA, 0,44 BAP 5% sacarose	WPM ¹ 1,32 BAP	WPM ¹	Mullins et al. (1997)
<i>E. camaldulensis</i>	B5 ² Combinações auxinas/citocininas	B5 ² 0,5-2,5 TDZ	B5 ² Isento de reguladores	Chang et al. (2000)
<i>E. globulus</i>	MS; 7,0 2,4-D, 0,44 BAP 3% sacarose	WPM ¹ 1,0 ANA, 2,6 BAP 574 arginina 3% sacarose	½ MS Vitaminas de White 7,5 AIB 2% sacarose	Moralejo et al. (1998)
<i>E. grandis</i>	G22 ³ 2,0 ANA e 2,0 BAP	GBA ³ 0,5 ANA e 6,6 BAP	KG ³ 1,2 AIB 2% sacarose	Lainé e David (1994)
<i>E. grandis</i>	MS 7,5 2,4-D, 1,1 BAP MS 0,5 ANA, 2,0 TDZ	WPM ¹ 0,01 ANA, 3,0 TDZ	Não indicado	Machado et al. (1997)
<i>E. grandis x E. urophylla</i>	MS, 2,0 TDZ	0,48 ANA, 2,7-1,0 BAP ou zeatina e ANA	12,5 AIB	Barrueto Cid et al. (1999)
<i>E. grandis x E. urophylla</i>	BIP ⁴ 0,5 2,4-D, 1,0 BAP	BIP ⁴ 0,1 ANA, 3,0 TDZ SDM8 2,0 BAP, 0,5 ANA	ex - vitro	Tournier et al. (2003)
<i>E. grandis x E. urophylla</i>	R5 ³ 0,5 ANA, (2,4) TDZ	R5 ³ com ferro e micronutrientes do MS 4,4 BAP	Sais MS vitaminas White 800 mg.L ⁻¹ PVP 555 inositol 7,5 AIB	Alves et al. (2004)
<i>E. gunnii</i>	MS, 0,04 picloran 1,0 BAP – 1 semana e após 2,2 BAP	Mesmo para calogênese	Não indicado	Hervé et al. (2001)

¹WPM (Lloyd e McCown, 1980); ²B5(Gamborg et al. 1968); ³G22, ³GBA, ³KG e ³R5 (Lainé e David, 1994); ⁴BIP (Tournier et al. 2003)

Em outros trabalhos, embriões zigóticos também foram utilizados como fonte de explantes (SERRANO et al., 1996). Os meios minerais necessitam ser adaptados em função da espécie, porém o meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) e modificações são utilizados com frequência para muitas espécies. Outros meios como o B5 (GAMBORG et al., 1968), LD (LAINÉ e DAVID, 1994), WPM (LLOYD e MCCOWN, 1981) e JADS (CORREIA, 1993; CORREIA et al., 1995) foram utilizados para *E. globulus*, *E. grandis* e *E. grandis* x *E. urophylla*.

2.4 Transformação genética em *Eucalyptus*

2.4.1 Transformação direta

A transformação genética de *Eucalyptus* tem sido o objetivo de vários grupos de pesquisa nos últimos anos, tanto no setor público como no privado. Os primeiros resultados na transformação direta foram publicados para a espécie *E. saligna* (KAWAZU et al., 1990) e para o *E. gunnii* (TEULIÈRES et al., 1991). Nestas duas pesquisas, foram utilizados protoplastos para a transformação. Para a espécie *E. gunnii*, dois métodos de transformação foram utilizados: com polietileno glicol (PEG) e por eletroporação; porém, estes métodos foram ineficientes para a obtenção de plantas transformadas (TEULIÈRES et al., 1991).

O método biolístico foi utilizado para a introdução de DNA em embriões zigóticos de *E. globulus* (SERRANO et al., 1996). Neste trabalho, foram obtidos calos com expressão do gene marcador *GUS* e a integração foi comprovada pela análise de Southern blot, embora não tenham sido regeneradas plantas transformadas. Em outro trabalho, Moralejo et al. (1998) obtiveram plantas transgênicas de *E. globulus* utilizando embriões zigóticos injuriados por bombardeamento, seguido da inoculação com *Agrobacterium tumefaciens*.

O método biolístico foi utilizado também para a transformação genética do híbrido *E. grandis* x *E. urophylla* utilizando calos obtidos a partir de cotilédones e hipocótilos (SARTORETTO et al., 2002). Nesta pesquisa, os genes *GUS* e *nptII* foram introduzidos nos calos por meio da aceleração de micropartículas de tungstênio; entretanto, a regeneração de plantas transgênicas não ocorreu.

2.4.2 Transformação indireta

O *E. camaldulensis* foi a primeira espécie de eucalipto utilizada para estudos de transformação genética via *A. tumefaciens* e atualmente, é a espécie mais pesquisada devido à relevância econômica e facilidade de regeneração (KAWAZU et al., 1990; MULLINS et al., 1997; HO et al., 1998; CHEN et al., 2003).

Resultados de transformação utilizando o método indireto foram publicados também para *E. globulus* (CHRIQUI et al., 1991; SERRANO et al., 1996; NUGENT et al., 2001), *E. grandis* (ESMERALDO et al., 1997; PURSE, 1997; GONZALES et al., 1999, 2001) e para *E. gunnii* (CHRIQUI et al., 1991). Em outro trabalho, estudos referentes ao efeito das condições de co-cultura na expressão transiente do gene marcador *GUS* foram realizados a partir de material juvenil do híbrido *E. grandis* x *E. urophylla* (BARRUETO CID et al., 1999).

A utilização da agrobiolística já foi relatada em estudos de transformação em *E. globulus* (MORALEJO et al., 1998). Neste trabalho, a combinação entre os métodos favoreceu a expressão transiente do gene *GUS*, porém em longo prazo, nenhum efeito positivo na transformação foi observado para esta espécie.

Na transformação indireta mediada por *A. tumefaciens*, o estudo de alguns fatores relacionados ao material vegetal e à bactéria utilizada como vetor e suas características de cultivo são de grande importância para que a eficiência do método seja alcançada. Os principais fatores que influenciam a transformação via *A. tumefaciens* são descritos a seguir.

2.4.2.1 Cepas de *A. tumefaciens*

As cepas de *A. tumefaciens* e seus plasmídeos são classificados de acordo com o grupo de opinas produzidos nos mesmos. Com o objetivo de estudar o efeito de diferentes cepas de *Agrobacterium* na transformação de *E. globulus*, as cepas LBA 4404 (octopina), C58C1 e EHA101 (nopalina) contendo os plasmídeos pAL4404; pEHA101, pTiBo542, respectivamente, foram comparadas quanto à expressão transiente do gene marcador *GUS* (MORALEJO et al., 1998). Conforme os resultados, a cepa EHA101 foi quatro vezes mais eficiente que a LBA4404 e duas

vezes mais eficiente que a C58C1. De acordo com estes autores, espécies florestais geralmente respondem melhor a cepas produtoras de nopalina do que a octopina e agropina.

Da mesma maneira, Rochange (1996) mostrou que as cepas C58C1, EHA101 e AGL1 foram mais eficientes para a expressão estável do gene *GUS* em *Eucalyptus globulus*, enquanto que a cepa LBA4404 resultou em uma baixa expressão do gene. Entretanto, a integração no genoma depende também do genótipo da planta (ROCHANGE, 1996).

2.4.2.2 Duração da co-cultura

A co-cultura dos explantes geralmente é realizada em meio sólido ou líquido. O tempo de duração é muito relativo e depende da espécie. Em alguns resultados obtidos para diferentes espécies de *Eucalyptus*, a duração da co-cultura foi de três dias (HO et al., 1998; MULLINS et al., 1997; GONZÁLES et al., 2002), em outros de quatro dias (ESMERALDO et al., 1997; VALÉRIO et al., 2000), cinco dias (MACHADO et al., 1997; TOURNIER et al., 2003) e seis dias (MORALEJO et al., 1998).

2.4.2.3 Compostos fenólicos e osmoprotetores

A virulência da *A. tumefaciens* é conferida pela expressão dos genes *vir* e é induzida naturalmente por compostos fenólicos liberados pelos tecidos feridos da planta (STACHEL e NESTER, 1986). A aplicação exógena destes compostos em protocolos de transformação é utilizada para estimular a virulência da *Agrobacterium*. Os mais utilizados são: acetosiringona, hidroxí-acetosiringona e os álcoois sinapil e coniferil (QUOIRIN e QUISEN, 2006). A acetosiringona já foi utilizada em pesquisas com o híbrido *E. grandis* x *E. urophylla* (GONZÁLES et al., 2002; TOURNIER et al., 2003) e *E. globulus* (VALÉRIO, 2000).

Com relação aos agentes osmoprotetores, a prolina é um composto osmoticamente ativo que algumas vezes é adicionado junto à solução bacteriana (0,5 – 1,0 μ M) durante a inoculação dos explantes (TOURNIER et al., 2003). Em

estudo referente à transformação de *E. globulus* a adição de prolina não revelou efeito significativo para esta espécie (ROCHANGE, 1996).

2.4.2.4 Solução de inoculação

A maioria das pesquisas de transformação para o gênero *Eucalyptus* recomenda que as bactérias sejam ressuspensas em meio MS, ou diluições do mesmo (QUOIRIN e QUISEN, 2006). Segundo estas autoras, o pH parece não ter efeito na eficiência da transformação, pois resultados de expressão transiente já foram obtidos sem a ressuspensão da solução bacteriana.

2.4.2.5 Genótipo

Alguns genótipos de *Eucalyptus* não respondem à infecção por *Agrobacterium* e a eficiência da transformação parece estar diretamente relacionada ao potencial de regeneração do genótipo. Este fato foi evidenciado em pesquisa realizada com *E. camaldulensis* (MULLINS et al., 1997) e *E. grandis* x *E. urophylla* (TIBOK et al., 1995).

2.4.2.6 Tipo de tecidos

Em todos os trabalhos de transformação genética em *Eucalyptus*, recomenda-se a utilização de tecidos vegetais jovens, sendo os mais utilizados folhas cotiledonares e hipocótilos de plântulas germinadas entre 2 e 15 dias, embriões zigóticos e folhas novas. A transformação genética de sementes em germinação também foi relatada (GONZÁLES et al., 2002).

Com relação aos materiais de elite onde somente árvores adultas estão disponíveis, a micropropagação a partir de gemas representa uma estratégia preliminar para a obtenção de material rejuvenescido, porém o grande desafio refere-se ao estabelecimento de uma metodologia de assepsia que seja eficiente para o material vegetal proveniente do campo (QUOIRIN e QUISEN, 2006).

2.4.2.7 Tratamento de sonicação e infiltração a vácuo

Alguns autores relataram que o tratamento de sonicação dos explantes por 15s no momento da inoculação bacteriana garantiu uma maior eficiência na transformação (TOURNIER et al., 2003; GONZÁLES et al., 2002). Segundo Quoirin e Quisen (2006), a aplicação de ultra-som em tecidos de plantas induz a formação de poros microscópicos, os quais permitem a exposição de tecidos internos à infecção por *A. tumefaciens*, o que resulta no aumento dos níveis de expressão transitória do T-DNA. Estes mesmos autores indicam que o sonicador utilizado na transformação geralmente é do tipo banho maria e utiliza uma frequência de 40 kHz. Segundo estes mesmos autores, os micro-fermentos resultantes do tratamento de sonicação induzem a liberação de compostos fenólicos e podem contribuir para que a eficiência da transformação seja aumentada.

Outra alternativa que objetiva aumento na eficiência da transformação é a utilização da infiltração a vácuo. Este tratamento elimina o ar existente nos espaços intercelulares e ajuda a penetração das bactérias nos tecidos (QUOIRIN e QUISEN, 2006).

2.4.2.8 Pré-cultura

Alguns autores investigaram a possibilidade de aumentar a eficiência da transferência de genes utilizando a pré-cultura dos explantes em meio de regeneração antes da inoculação com a bactéria e posterior co-cultura dos calos obtidos. Em alguns trabalhos, o período do pré-cultura variou de zero a cinco dias (MACHADO et al., 1997; HO et al., 1998; MORALEJO et al., 1998; TOURNIER et al., 2003).

2.4.2.9 Concentração de antibióticos seletivos

Após o período de co-cultura dos tecidos vegetais com a solução bacteriana, as células de *A. tumefaciens* são indesejadas na cultura, e devem ser eliminadas com a utilização de antibióticos que atuem no controle bacteriano e não interfiram no

crescimento normal das células vegetais. O antibiótico bactericida mais utilizado na transformação de *Eucalyptus* é a cefotaxima em concentrações que variam de 200 a 600 mg.L⁻¹, além da carbenicilina, timentina e amoxicilina (MACHADO et al., 1997; MORALEJO et al., 1998; GONZÁLES et al., 2002; SPOKEVICIUS et al., 2005).

O antibiótico canamicina é o mais freqüentemente utilizado para a seleção de células transformadas com o gene de resistência *NPTII*. Em *Eucalyptus* a resposta a diferentes antibióticos do grupo dos aminoglicosilados é muito variável e dependente da espécie (GONZÁLES et al., 2001).

A concentração de 100 mg.L⁻¹ de canamicina foi eficiente para a seleção de calos transformados de *E. globulus* (SERRANO et al., 1996). Resposta similar foi observada por Moralejo et al. (1998) utilizando 75 mg.L⁻¹ de canamicina para selecionar plantas transformadas da mesma espécie. Em trabalhos com a espécie *E. camaldulensis*, Ho et al. (1998) verificaram que a concentração de 20 mg.L⁻¹ inibiu significativamente a formação de calos e concentrações acima de 40 mg.L⁻¹ causaram intumescimento e oxidação em hipocótilos inibindo, a formação de calos. Já para Mullins et al. (1997) a concentração de 9 mg.L⁻¹ de canamicina inibiu a regeneração de brotos não transformados em diferentes clones de *E. camaldulensis*.

2.4.3 Aplicações da engenharia genética no melhoramento de *Eucalyptus*

O melhoramento de *Eucalyptus* via transformação genética atualmente visa as seguintes modificações: aumento no potencial do crescimento, modificação da propriedade da fibra, aumento na polimerização da celulose; modificação na biossíntese da lignina, redução do conteúdo de lignina, resistência a herbicidas e insetos e tolerância a estresses abióticos. A obtenção de plantas de *Eucalyptus* estéreis também é alvo de estudos e sua aplicação é importante para o impedimento da disseminação de transgenes em regiões onde a polinização cruzada pode ocorrer com árvores nativas ou não transformadas, como por exemplo, na Austrália (QUOIRIN e QUISEN, 2006).

De acordo com Cooke et al. (2004), o interesse na manipulação das propriedades da madeira aumentou consideravelmente durante as últimas duas décadas. Segundo estes autores, o progresso conseguido por meio de pesquisas na

área de genômica e proteômica, aliado aos conhecimentos em relação à composição da parede celular das fibras, favoreceu os estudos que visam à melhoria das características de madeira. Estudos das rotas da biossíntese da celulose, hemicelulose e lignina e a clonagem dos genes-chave de algumas enzimas são importantes para a determinação de estratégias que visem a modificação destes compostos.

Visando comprovar a atuação gênica para um possível aumento de biomassa em *Eucalyptus*, o gene da CBD (Cellulose Binding Domain) codificando endoglucanase foi isolado de *Arabidopsis thaliana*, fundido com diferentes promotores e introduzidos em *E. camaldulensis*, *E. grandis* e híbridos comerciais de *E. grandis*. Atualmente, 25 linhagens de plantas transgênicas obtidas estão sendo testadas a campo (SHANI et al., 2004).

A lignina é um polímero fenólico presente na parede celular das plantas superiores que apresenta funções estruturais essenciais por conferir resistência mecânica e a doenças e impermeabilidade. Apesar de sua importância estrutural, é um composto indesejável durante a fabricação de polpa de celulose para a indústria de papel. Durante o processo, a celulose necessita ser separada da lignina. Este processo de purificação da polpa, além de aumentar os custos de produção, é poluente (TOURNIER et al., 2003).

Diferentes genes que codificam enzimas que atuam na biossíntese da lignina podem ser regulados. Em *E. camaldulensis*, a modificação do metabolismo da lignina foi conseguida através da introdução do gene cinamato-4hidroxilase isolado de *Populus* (CHEN et al., 2003). Em outro trabalho para a mesma espécie, a transformação com as construções anti-senso do gene *CAD* (álcool cinamil desidrogenase) isolado de *Eucalyptus gunnii* contribuiu para uma redução significativa da atividade deste gene em 32% das plantas transformadas, porém após 10 meses de cultivo, nenhuma mudança significativa nas características da lignina foi observada, indicando que a atividade do *CAD* não foi suficientemente suprimida (VALÉRIO et al., 2003). A mesma construção anti-senso do gene *CAD* foi introduzida em *E. grandis* x *E. urophylla* (TOURNIER et al., 2003). Neste caso, 2 linhagens transgênicas foram consideradas potenciais por apresentarem baixos valores residuais da atividade do gene.

Outros aspectos da rota da biossíntese da lignina podem ser alterados com a modificação dos fatores de transcrição e genes reguladores (MYB e LIM). Plantas transgênicas de tabaco expressando o gene anti-senso *NTLIM1* revelaram baixa transcrição para alguns genes chaves da rota de fenilpropanóides tais como, da fenilalanina amônia-liase (PAL), cinamato-4hidroxilase (C4H), hidroxicinamoil COA ligase (4CL) e cinamil álcool desidrogenase (CAD) (KAWAOKA et al., 2003). A mesma construção foi introduzida em *E. camaldulensis* e as plantas resultantes mostraram uma redução de 20% na quantidade de lignina (KAWAOKA et al., 2003).

A manipulação genética no florescimento é apontada como uma ferramenta promissora para encurtar o ciclo do florescimento e o ciclo reprodutivo. Alguns genes homólogos aos genes *AP1* e *LEAFY* de *A. thaliana* já foram identificados em *Eucalyptus* (KYOZUKA et al., 1997; SOUTHERTON et al., 1998). A superexpressão destes genes em *Eucalyptus* poderia ajudar a reduzir a fase juvenil e encurtar o tempo de geração, permitindo assim uma avaliação antecipada destas linhagens. Uma outra aplicação destes genes está relacionada com o desenvolvimento floral e a produção de árvores estéreis, o que representaria um importante fator de impacto para a segurança da liberação de espécies florestais transgênicas.

A resistência a insetos pode ser obtida pela inserção de genes do *BT* (*Bacillus thuringiensis*) tal como em culturas agrícolas. Um exemplo disto foi a obtenção de plantas de *E. camaldulensis* com gene de *BT* *CRY3A* resistentes a insetos (HARCOURT et al., 2000).

As árvores podem também ser melhoradas para a tolerância a estresses abióticos tais como seca, frio, geada e salinidade. Um exemplo é o uso dos genes *DREB* na transformação de *E. camaldulensis* e do híbrido *E. grandis* x *E. urophylla* (KONDO et al., 2002).

Estudos iniciais referentes a transformação genética de plantas de *E. camaldulensis* para utilização na fitorremediação já foram realizados (QUISEN, 2007). Neste trabalho, o objetivo foi a transformação com o promotor do gene *cgMT₁*, que codifica uma proteína denominada metalotioneína à qual é atribuída a proteção das células quando na presença de condições de concentrações excessivas de metais pesados. Plantas de diferentes genótipos foram regeneradas

após o processo de inoculação, porém a integração do promotor no genoma destas plantas ainda não foi confirmada.

2.5 O estresse abiótico

O estresse é considerado como um desvio significativo das condições ótimas para a vida. Ele induz mudanças e respostas em todos os níveis funcionais do organismo, as quais são reversíveis a princípio, mas podem se tornar permanentes (LARCHER, 2004).

O estresse abiótico refere-se ao ponto sub e supra-ótimo de fatores físicos e químicos do ambiente (VALOIS et al., 1996), os quais atingem a maioria dos processos fisiológicos como a fotossíntese, fixação de nitrogênio e respiração, além de afetar diferentes estágios de desenvolvimento da planta, incluindo a germinação de sementes, desenvolvimento de plântulas, crescimento vegetativo e reprodutivo, maturação de sementes e senescência, que são diferencialmente alterados em respostas às condições de estresse (GLOVER, 1999).

Em condições naturais de cultivo, as plantas estão expostas a vários tipos de estresses ambientais que afetam de maneira negativa seu crescimento, metabolismo e produtividade. Seca, salinidade, baixas e altas temperaturas, inundação, poluentes e radiação são os principais fatores de estresse que mais limitam a produtividade das culturas (LAWLOR, 2002).

2.5.1 Estresse causado por baixas temperaturas

No Brasil, especialmente na região Sul, os estresses causados por baixas temperaturas são os que mais influenciam de forma negativa a produtividade de *Eucalyptus* spp (HIGA et al., 1994).

As temperaturas de resfriamento são demasiadamente baixas para o crescimento normal, mas não são suficientes para a formação de gelo. As espécies tropicais e subtropicais são tipicamente suscetíveis ao dano por resfriamento (TAIZ e ZEIGER, 2004). Quando plantas que estão crescendo a temperaturas relativamente altas (25 a 35°C) são resfriadas entre 10 e 15°C, ocorre o dano causado por resfriamento, sob o qual o crescimento torna-se mais lento, surgem descolorações

ou lesões nas folhas e a folhagem pode apresentar-se com o aspecto de estar encharcada, como se fosse embebida em água por um longo tempo. Se as raízes sofrerem resfriamento, a planta pode murchar (TAIZ e ZEIGER, 2004). O dano por congelamento ocorre a temperaturas abaixo do ponto de congelamento da água, sendo que a indução total de tolerância ao congelamento, como o resfriamento, exige um período de aclimação a temperaturas baixas (TAIZ e ZEIGER, 2004).

Ao nível molecular, os principais danos causados pelo resfriamento são: alteração das propriedades das membranas celulares; inibição da fotossíntese, redução das taxas de translocação de carboidratos e respiratórias, inibição da síntese protéica e aumento da degradação das proteínas existentes (TAIZ e ZEIGER, 2004).

De acordo com Higa et al. (1994), as geadas registradas em 1972 no Brasil foram as de maior influência sobre a atividade florestal causando, em alguns locais, perdas de até 100%, em talhões de espécies suscetíveis, estabelecidas principalmente na região sul do Brasil. Esses autores registraram, ainda, que as geadas dos anos de 1974, 1975, 1991 e 1994, também comprometeram o abastecimento da indústria de base florestal.

Árvores de eucalipto afetadas por geada apresentam vários danos, desde a queima de ponteiros, até a perda total da copa. Quando observadas à distância, apresentam um aspecto de queima ou bronzeamento da folhagem. De acordo com Higa et al. (1994), além de danos diretos, como morte total ou parcial da copa e até a morte da planta, os danos indiretos, que são os mais freqüentes, podem, não apenas restringir o potencial de crescimento das plantas, como também contribuir para a susceptibilidade à infecção por patógenos e até mesmo inviabilizar a formação de povoamentos comerciais de eucaliptos.

2.5.2 Resposta ao estresse abiótico

Quando uma planta é submetida a um fator de estresse, como por exemplo baixa temperatura, receptores específicos percebem primeiramente os sinais vindos do ambiente (XIONG e ZHU, 2002) e, após a ativação, iniciam ou suprimem uma série de sinalizações para transmitir a informação entre as células e, em muitos

casos, ativar fatores de transcrição nuclear para induzir a expressão de locais específicos de genes (XIONG e ZHU, 2002).

Após receberem o sinal nos receptores de membrana, as células utilizam uma série de eventos moleculares para traduzir e amplificar a informação recebida. A fosforilação e desfosforilação de proteínas são, talvez, as formas mais comuns de sinalização dentro da célula ao regularem uma ampla faixa de processos celulares, tais como ativação de enzimas, localização e degradação de proteínas (HARDIE, 1999). O cálcio e as espécies reativas de oxigênio são importantes moduladores de eventos de tradução de sinais celulares, principalmente em condições de estresses bióticos e abióticos (BOWLER e FLUHR, 2000), tais como ataque por pragas e doenças, deficiência hídrica, choque osmótico, alta e baixa temperatura e alta intensidade luminosa (PASTORI e FOYER, 2002).

O caminho da sinalização induzida por um agente de estresse moderado ou de longa duração promove a ativação de genes de respostas iniciais retardadas, envolvidos no controle do metabolismo celular, permitindo o ajuste do crescimento e metabolismo da planta às condições impostas pelo estresse (KACPERSKA, 2004). Quando o estresse apresenta severidade em um curto período de tempo, ocorre uma desestabilização das membranas celulares resultando em um aumento da concentração de cálcio no citossol, e uma conseqüente sinalização fosfolipídica é desencadeada, podendo elevar os níveis de produção de espécies reativas de oxigênio, acumulação de H_2O_2 e peroxidação lipídica, bem como um aumento na síntese de hormônios, tais como jasmonatos e etileno (WANG et al., 2003). Em muitos casos o agente estressante pode levar a uma injúria irreversível e morte celular ou à recuperação da célula, a qual dependerá do impacto causado pelo agente agressor (KACPERSKA, 2004). A expressão gênica e a síntese de proteínas específicas em resposta ao estresse hídrico são comuns, tanto no estresse causado pelo calor quanto pelo frio e salinidade; porém, alguns aspectos da expressão gênica induzível pelo frio diferem daqueles produzidos pelo estresse causado pelo calor (KACPERSKA, 2004).

2.5.3 Mecanismos de resistência ao estresse abiótico

Durante a aclimatação, o metabolismo celular sofre modificações, as quais incluem alterações na expressão de certos genes, mudanças no nível de hormônios, acúmulo de osmoprotetores e proteínas protetoras (PALVA et al., 2002). A síntese de várias proteínas de choque térmico que podem atuar como chaperonas moleculares é totalmente regulada pelo estresse causado pelo frio, da mesma maneira como ocorre durante o estresse causado pelo calor (TAIZ e ZEIGER, 2004). As temperaturas baixas induzem alterações nos componentes celulares, inclusive na composição de certas proteínas, na redistribuição dos ácidos graxos saturados e não saturados dentro das moléculas de lipídeos e na ativação de canais iônicos (PALVA et al., 2002).

As membranas celulares exercem um importante papel na percepção das temperaturas baixas e subsequente transmissão destes sinais. O grau de insaturação dos ácidos graxos dos lipídeos aumenta com as temperaturas baixas. Este grau representa o fator mais importante que afeta a “fluidez” dos lipídeos das membranas (MURATA e LOS, 1997). O termo “fluidez” é utilizado para descrever a extensão da desordem e do movimento das moléculas na bicamada lipídica das membranas e, quando ocorre um declínio da temperatura, ela diminui e, conseqüentemente, genes que codificam desaturases de ácidos graxos se expressam em nível maior (MURATA e LOS, 1997).

As proteínas anticongelamento, cuja síntese é totalmente regulada pelo frio, possuem a propriedade de inibir o crescimento de cristais de gelo de uma maneira não coligativa, evitando assim danos sob temperaturas de congelamento intermediárias. Estas proteínas conferem às soluções aquosas a propriedade de histerese térmica, de modo que, às vezes, elas são identificadas como proteínas de histerese térmica (THPs; do inglês “thermal hysteresis proteins”) (URRUTIA et al., 1992; KRISTIANSEN e ZACHARIASSEN, 2005). Outras proteínas, associadas ao estresse osmótico, são também totalmente reguladas pelo frio. O grupo inclui proteínas envolvidas na síntese de osmólitos, proteínas de estabilização de membrana e as proteínas LEA. Uma vez que a formação extracelular de cristais de gelo gera estresses osmóticos significativos dentro das células, para suportar o

estresse por congelamento também são necessárias medidas para enfrentar o estresse osmótico (TAIZ e ZEIGER, 2004).

A percepção do déficit hídrico celular precisa ser traduzida em compostos bioquímicos e metabólitos, gerando uma conseqüente resposta fisiológica ao estresse (INGRAM e BARTELS, 1996). Os produtos de genes induzidos pelo estresse podem ser classificados em dois grandes grupos: grupo 1 - aqueles que regulam a expressão gênica e a transdução de sinais de resposta a estresses, e grupo 2 – representado por proteínas envolvidas na captação e transportes de íons, como aquaporinas e transportadores iônicos (BLUMWALD, 2000; SEKI et al., 2003; YAMAGUCHI-SHINOZAKI e SHINOZAKI, 2005). O primeiro grupo está relacionado à biossíntese de vários osmoprotetores tais como prolina e betaínas, proteínas LEA (“late embryogenesis abundant”), chaperonas e enzimas detoxificadoras. Os níveis de moléculas osmoprotetoras geralmente aumentam durante o estresse. Vários genes codificando enzimas envolvidas na biossíntese dessas moléculas já foram isolados, como colina desidrogenase e colina oxidase (síntese de glicina betaína), manitol-1-fosfato desidrogenase (síntese de manitol); trehalose-6-fosfato desidrogenase (síntese de trehalose); e Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato sintetase (síntese de prolina). Genes codificando enzimas que sintetizam moléculas osmoprotetoras podem ser utilizados na obtenção de plantas transgênicas com maior tolerância a estresses abióticos (HARE e CRESS, 1997, HARE et al., 1998 e 1999; SERRAJ e SINCLAIR, 2002; MOLINARI et al., 2004).

No segundo grupo, envolvido na transdução de sinais, estão os fatores de transcrição que desempenham papel fundamental na resposta da planta ao estresse (SEKI et al., 2003). Até o momento foram descritas quatro vias de transdução de sinais envolvidas na resposta da planta ao déficit hídrico: duas vias são ABA-dependentes (I e II) e as outras duas ABA não dependentes (III e IV) (SHINOZAKI; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 1997, 1999, 2000; SEKI et al., 2003; YAMAGUCHI-SHINOZAKI; SHINOZAKI, 2005).

A via ABA-dependente tipo I requer a síntese de certas proteínas para ativar os fatores de transcrição MYC/MYB (ABE et al., 1997) e/ou bZIP, os quais se ligam a regiões do DNA como os ABREs – “ABA-Responsive Elements” e elementos tais como CE1 e CE3 – “Coupling Elements” (SHEN e HO, 1995; SHEN et al., 1996;

PRADEEP et al, 2006). A via ABA dependente tipo II ativa o fator de transcrição bZIP (NAKAGAWA et al., 1996; HOLLUNG et al., 1997) o qual aciona a expressão gênica pela ligação com os elementos ABA responsivos ABREs. A via ABA não dependente tipo IV induz a expressão gênica pela ativação de DREBP – “Dehydration-Response-Element-Binding- Protein” que se liga ao elemento de resposta à seca DRE/CRT – “Drought Response Element/C-repeat”. A via ABA não dependente tipo III compreende alguns genes induzidos pela seca que não respondem ao ABA nem ao frio (NAKASHIMA et al., 1998).

Além destas vias, muitos outros sistemas de regulação transcricional estão envolvidos na expressão de genes responsivos ao estresse. De maneira paralela, estas quatro principais vias se relacionam e convergem para a ativação de genes envolvidos na resposta ao estresse. Muitos genes são induzidos pela seca, salinidade e baixa temperatura. Isto sugere que existe uma inter ligação (“cross-talk”) entre estas vias de sinalização (YAMAGUCHI-SHINOZAKI e SHINOZAKI, 2005).

2.5.3.1 Osmoprotetores

A classe de pequenas moléculas conhecidas como osmólitos compatíveis inclui aminoácidos como a prolina, compostos quaternários de amônio (glicina betaína, prolina betaína, B-alanina betaína, e colina-0-sulfato colina) e o composto terciário de sulfato, 3-dimetilsulfoniopropionato (DMSP) (YANCEY, 1994; SAKAMOTO e MURATA, 2000). Estes compostos compartilham a propriedade de permanecerem invariáveis em pH neutro e serem altamente solúveis em água (BALLANTYNE e CHAMBERLIN, 1994).

A interação entre um osmólito compatível e uma proteína promove a estabilização estrutural protéica. Isto é possível porque os osmólitos são preferencialmente excluídos da superfície da proteína, resultando na formação de uma camada de hidratação altamente organizada e de menor mobilidade ao redor das proteínas (TIMASHEFF, 2002). O acúmulo de osmólitos em células de plantas resulta em uma redução do potencial osmótico e também na manutenção da absorção de água e pressão de turgor da célula, o que contribui para a manutenção dos processos fisiológicos, como abertura estomática, fotossíntese e crescimento da

planta (BLUM et al., 1983; LUDLOW et al., 1990; MORGAN, 1994). Este acúmulo tem sido utilizado com ênfase como critério de seleção nos programas tradicionais de melhoramento de plantas para aumento da produtividade em ambiente com deficiência hídrica (BLUM et al., 1983; LUDLOW et al., 1990; TANGPRENSRI et al., 1991; BELHASSEM et al., 1995; ZHANG et al., 1999; CLAUSSEN, 2005; SOKAHANSANJ et al., 2006).

2.5.3.1.1 O papel da prolina na proteção ao estresse abiótico

O L-prolina é um dos 20 aminoácidos presentes nas proteínas de todos os organismos vivos (CHERIAN et al., 2006). Aminoácidos são moléculas que contêm ambas porções amino (-NH₂) e um grupo funcional carboxil (-COOH). Diferentemente, a prolina contém uma porção imino (C=NH), um grupo funcional carboxil e um grupo imino secundário, tendo sido reportada como um importante osmoprotetor em muitas plantas. Este aminoácido, na sua forma pura, apresenta-se como uma substância incolor, altamente solúvel em água, medianamente solúvel em álcoois, razoavelmente em benzeno e acetona e insolúvel em outros compostos (TAIZ e ZEIGER, 2004).

Conforme a Figura 1, a prolina em plantas, é sintetizada diretamente a partir do glutamato via Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato sintetase (P5CS), formando um produto intermediário denominado glutamil semi-aldeído (GSA), que a partir de uma reação espontânea, é convertido a pirrolina 5-carboxilato (P5C) e finalmente é reduzido a prolina pela enzima pirrolina 5-carboxilato redutase (P5CR) (KAVI-KISHOR et al., 2005). Outra via de síntese de prolina ocorre a partir da ornitina pela enzima ornitina d-aminotransferase (OAT) (KAVI-KISHOR et al., 2005).

A enzima Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato redutase (P5CR) foi a primeira a ser identificada e caracterizada em muitas espécies de plantas (KREUGER et al., 1986; TREICHEL, 1986; LAROSA et al., 1991). A localização no cloroplasto desta enzima foi reportada em ervilha (RAYAPATI e STWART, 1991). Por outro lado, Szoke et al. (1992) encontraram atividade da enzima P5CR na fração citosólica de raízes e nódulos de soja, bem como em células de folhas. As diferentes localizações da enzima *P5CR* indicam que a prolina pode ser sintetizada em diferentes

compartimentos celulares, como no citosol e estroma de cloroplastos, via Fd-GOGAT (glutamato sintase ferredoxina dependente).

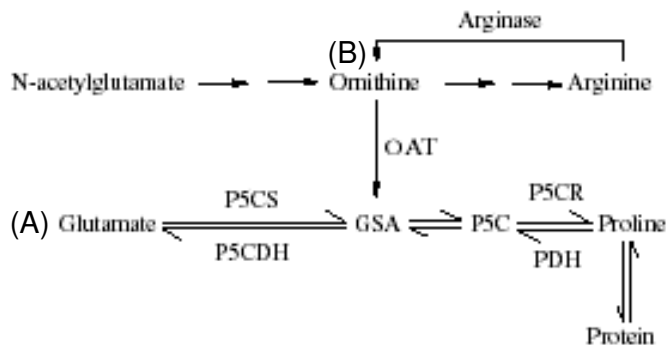


Figura 1 - Via metabólica de biossíntese de prolina em plantas superiores (A) (Via Glutamato), (B) (Via Ornitina). GSA, Ácido glutâmico semialdeído; P5C, Δ¹-pirrolina-5-carboxilato; P5CS, P5C sintetase; P5CR, P5C redutase; ProDH, prolina desidrogenase; P5CDH, P5C desidrogenase. OAT, Ornitina d-aminotransferase.

O gene que codifica a enzima P5CR foi identificado por teste de complementação direta de uma linhagem de *E. coli* com clones de uma biblioteca de cDNA de nódulos de soja (DELAUNEY e VERMA, 1990), facilitando o isolamento de P5CR homólogos de *Pisum sativum* (WILLIAMSON e SLOCUM, 1992) e *Arabidopsis thaliana* (VERBRUGGEN et al., 1993).

Transcritos de P5CR aumentam abundantemente em resposta ao estresse osmótico, indicando que o gene *P5CR* transcrito é controlado sob estresse osmótico (DELAUNEY e VERMA, 1990; WILLIAMSON e SLOCUM, 1992; VERBRUGGEN et al., 1993; CHERIAN et al., 2006).

Muitos estudos referentes à biossíntese de prolina e catabolismo de genes envolvidos tem mostrado diversas funções deste aminoácido também como fonte de energia, nitrogênio e carbono (KAVI-KISHOR et al., 2005). Saviouré et al. (1997) sugerem que a expressão de genes para a biossíntese de prolina é dependente de pelo menos duas vias de transdução de sinais, uma ativada por aplicação exógena de ABA na ausência de estresse e outra ativada por frio e estresse osmótico independentemente da aplicação exógena de ABA.

A enzima P5CS é limitante para a síntese de prolina, sendo sensível à inibição por retroalimentação. Em plantas de tabaco transformadas com o gene *P5CS*, o acúmulo de prolina foi de 10 a 18 vezes superior às plantas controle, e a tolerância ao estresse salino foi confirmada nas plantas transgênicas cultivadas sob condições controladas (KAVI-KISHOR et al., 1995). Em muitas plantas o aumento dos níveis de prolina livre é uma resposta à imposição de estresses bióticos e abióticos, sendo que este aminoácido atua como um mediador e estabilizador do ajuste osmótico e serve também como um depósito de radicais livres produzidos durante a oxidação das membranas lipídicas. ZHANG et al. (1995) desenvolveram uma mutação no gene selvagem *P5CS* de *Vigna aconitifolia* para a remoção da retroinibição da via de produção de prolina. O gene mutante *P5CSF129A* foi utilizado para estabelecer resultados comparativos de quantidade de prolina acumulada em plantas de *Nicotiana tabacum* expressando o gene selvagem *P5CS*. De acordo com o trabalho de Hong et al. (2000), plantas transgênicas foram cultivadas em meio de cultura contendo 200 mM de NaCl e isento de NaCl. Os resultados comprovaram que as plantas transgênicas de tabaco expressando o gene mutante *P5CSF129A* acumularam aproximadamente 2 vezes mais prolina que as plantas expressando o tipo selvagem do gene em condições normais de cultivo, e que em condições de estresse salino os níveis de prolina foram ainda maiores nas plantas expressando o gene mutante.

De acordo com Matysik et al. (2002), em plantas a prolina constitui menos que 5% dos aminoácidos totais livres em condições normais, mas sob várias formas de estresse a concentração de prolina pode chegar a 80% do “pool” total de aminoácidos. Plantas naturalmente adaptadas a ambientes salinos produzem altos níveis de prolina (aproximadamente $100 \mu\text{mol g}^{-1}$ de matéria fresca) como é o caso das halófitas. Estes níveis podem aumentar até 10X (até $1500 \mu\text{mol g}^{-1}$ de matéria fresca) em resposta a altas concentrações salinas (THOMAS e BOHNERT, 1993). A prolina protege a membrana celular e proteínas contra efeitos adversos de altas concentrações de íons inorgânicos e temperaturas extremas e pode também funcionar como um osmólito compatível inibitório da agregação de proteínas (SRINIVAS e BALASUBRAMANIAN, 1995). A síntese de prolina pode estar envolvida na manutenção da relação NADP⁺/NADPH em valores compatíveis com o

metabolismo normal (HARE e CRESS, 1999) e a geração de ATP para a recuperação e conseqüente reparo de danos causados pelo estresse (HARE e CRESS, 1999).

O estresse osmótico resulta em um aumento na taxa da biossíntese de prolina (RHODES e HANDA, 1989). O acúmulo de prolina envolve a indução (PENG et al., 1996) e/ou ativação de enzimas da sua biossíntese, provavelmente junto com o controle da inibição por “feedback” da via de produção de prolina (DELAUNEY e VERMA, 1993), o decréscimo de oxidação de prolina para glutamato (SELLS e KOEPPE, 1981; ELTHON e STEWART, 1982) mediado por uma baixa regulação de prolina desidrogenase (KIYOSUE et al., 1996; PENG et al., 1996) e o decréscimo na utilização de prolina na síntese de proteínas (BOGGESS et al., 1976). Na tentativa de aumentar a tolerância ao estresse salino em plantas de *Nicotiana tabacum*, Sokhansanj et al. (2006) clonaram em três tipos de vetores os genes que codificam a forma mutante de glutamil quinase (proB) e *P5CS* e utilizaram na transformação genética de linhagens de tabaco. As linhas transgênicas foram comparadas de acordo com a habilidade em produzir gemas em meio MS contendo 320 mM de NaCl. Os resultados demonstraram que somente as linhagens de tabaco transformado com os genes modificados mostraram-se tolerantes aos altos níveis de salinidade.

Altos níveis de prolina livres têm sido reportados em várias espécies de plantas modificadas geneticamente. As modificações visadas foram tanto para suprimir quanto aumentar a expressão das enzimas chave no metabolismo de prolina e as plantas resultantes exibiram aumento de tolerância a vários tipos de estresses abióticos (KAVI-KISHOR et al., 1995; ZHU et al., 1998; NANJO et al., 1999; HONG et al., 2000; ROOSENS et al., 2002; MOLINARI et al., 2004; DE RONDE et al., 2004; HMIDA-SAYARI et al., 2005).

Em *Arabidopsis thaliana*, a expressão antisense do gene *P5CS* inibiu a produção de prolina fazendo com que as plantas se tornassem hipersensíveis ao estresse osmótico (NANJO et al., 1999). Com este trabalho ficou comprovado que estas plantas transgênicas antisense sofreram um impacto negativo no desenvolvimento da inflorescência e mostraram alterações na morfologia da

diferenciação vascular devido a uma mudança nas proteínas estruturais da parede celular (NANJO et al., 2003).

Danos na ultraestrutura de cloroplastos e mitocôndrias foram observados em plântulas de *Arabidopsis thaliana* tratadas com concentrações milimolares de prolina exógena. Essa descoberta aponta para possíveis danos que este aminoácido pode causar quando as plantas produzem prolina em altas concentrações (HARE et al., 2002). Assim, se faz necessário maiores estudos em plantas onde naturalmente os “pools” metabólicos de formação de prolina são menores. Realizaram-se também estudos *in vitro* para verificar o papel osmoprotetor da prolina sobre a atividade da enzima Rubisco (Ribulose 1,5-bisfosfato carboxilase oxigenase) (SIVAKUMAR et al., 1998). A atividade da Rubisco, purificada de plântulas de *Brassica juncea*, *Sesbania sesban* e *Oryza sativa*, foi testada na presença de concentrações crescentes desse aminoácido. A prolina, na concentração de 1 M, provocou uma redução de aproximadamente 50% na atividade da Rubisco nestas espécies. Estes dados são contrários aos publicados na literatura, onde a prolina tem mostrado desempenhar um papel vital na manutenção da integridade e na estabilização de macromoléculas (SCHWAB e GAFF, 1990; GERAND et al., 1991).

2.6 REFERÊNCIAS

ABE, H.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; URAO, T.; IWASAKI, T.; HOSOKAWA, D.; SHINOZAKI, K. Role of Arabidopsis MYC and MYB homologs in drought and abscisic acid-regulated gene expression. **Plant Cell Reports**, v.9, p.1859-1868, 1997.

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

AMBIENTEBRASIL. Disponível em: <http://www.ambientebrasil.com.br/eucalipto.htm>> Acesso em 15/07/2007.

ASSOCIAÇÃO MINEIRA DE SILVICULTURA AMS. **O balanço do setor florestal**. <<http://www.ams.org.br>>. Acesso em: 10 abr. 2006.

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

BALLANTYNE, J. S.; CHAMBERLIN, M. E. Regulation of cellular amino acid levels. In: **Cellular and Molecular Physiology of Cell Volume Regulation** (K Strange ed), CRC Press, Boca Raton, p.111-122, 1994.

BANDYOPADHYAY, S.; CANE, K.; RASMUSSEN, G.; HAMILL, J. Efficient plant regeneration from seedling explants of two commercially important temperate eucalypt species- *Eucalyptus nitens* and *E. globulus*. **Plant Science**, v. 140, p. 189-198, 1999.

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

BELHASSEN, E.; THIS, D.; MONNEVEUX, P. L'adaptation génétique face aux contraintes de sécheresse. **Cahiers Agricoles**, v.4, p.251-261, 1995.

BLUM, A.; MAYER, J.; GOZLAN, G. Associations between plant production and some physiological components of drought resistance in wheat. **Plant, Cell and Environment**. v. 6, p. 219-225, 1983.

BLUMWALD, E.; GROVER, A.; GOOD, A. G. **Breeding for abiotic stress resistance: challenges and opportunities**. In: New directions for a diverse planet. *Proceedings of the 4th International Crop Science Congress*, 26 Sep - 1 Oct 2004, Brisbane, Australia, http://www.cropscience.org.au/icsc2004/pdf/1953_blumwalde.pdf, 2004.

BOGGESS, S. F.; ASPINALL, D.; PALEG, L. G. Stress metabolism IX. The significance of end-product inhibition of proline biosynthesis and of compartmentation in relation to stress-induced proline accumulation. **Australian Journal of Plant Physiology** v. 3, p. 513-525, 1976.

BOLAND, D. J.; BROOKER, M. I. H.; CHIPPENDALE, G. M.; HALL, N.; HYLAND, B. P. M.; JOHNSTONE, R. D.; KLEINIG, D. A.; TURNER, J. D. **Forest trees of Australia**. CSIRO, Melbourne, v.1, 687p, 1989.

BOWLER, C.; FLUHR, R. The role of calcium and activated oxygens as signals for controlling cross-tolerance. **Trends in Plant Science**, v. 5, p. 241-246, 2000.

CHANG, S. H.; HO, C. K.; TSAI, J. Y.; CHEN, Z. Z. Thidiazuron enhancement of plant regeneration from leaf calli of superior clones of *Eucalyptus camaldulensis*. **Journal Forestry Sciences**, v.15, p. 81-90, 2000.

CHEN, Z. Z.; CHANG, S. H.; HO, C. K.; CHEN, Y. C.; TSAI, J. B.; CHIANG, V. L. Plant production of transgenic *Eucalyptus camaldulensis* carrying the *Populus tremuloides* cinnamate 4-hydroxylase gene. **Journal Forestry Science**, v. 16, p. 249-258, 2003.

CHEN, Z.; EVANS, D. A. Handbook of plant cell culture. **Perennial Crops**, v. 6, p. 190-215, 1990.

CHERIAN, S.; REDDY, M. P.; FERREIRA, R. B. Transgenic plants with improved dehydration-stress tolerance: Progress and future prospects; **Journal Biologia Plantarum**, v. 50, p. 481-495, 2006.

CHRIQUI, D.; ADAM, S.; CAISSARD, J. C.; NOIN, M.; AZMI, A. Shoot regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation of *Eucalyptus globulus* and *E. gunnii*. In: Intensive Forestry: The Role of Eucalypts (pp. 70-80) **Proc. IUFRO Symposium**, Durban, South Africa, 2-6 Sept. 1991.

CLAUSSEN, W. Proline as a measure of stress in tomato plants. **Plant Science** v.168, p.241-248, 2005.

COOKE, J. E. K.; MORSE, A. M.; DAVIS, J. M. Forestry. In: **Handbook of Plant Biotechnology**. Christou, P. and Klee, H. (eds.). John Wiley and Sons, Ltd. v. 2, p. 881-904. 2004. In: QUOIRIN, M.; QUISEN, R. **Advances in genetic transformation of *Eucalyptus* species**. In: FRANCHE, C. (edit) *Molecular Biology of Tropical Plants*. Research Signpost, Kerala, India, 2006, p. 41-56.

CORREIA, D. **Crescimento e desenvolvimento de gemas na multiplicação de *Eucalyptus* spp. em meio de cultura líquido e sólido**. (Dissertação - Mestrado). Piracicaba: USP/ESALQ, 113p. 1993.

CORREIA, D.; GONÇALVES, A. N.; COUTO, H. T. Z. do; RIBEIRO, M. C. Efeito do meio de cultura líquido e sólido no crescimento e desenvolvimento de *Eucalyptus*

grandis *Eucalyptus urophylla* na multiplicação *in vitro*. **IPEF**, v.48/49, p.107-116, 1995.

DE RONDE, J. A.; CRESS, W. A.; KRUGER, G. H. J.; STRASSER, R. J.; VAN STADEN, J. Photosynthetic response of transgenic soybean plants, containing an *Arabidopsis* P5CR gene, during heat and drought stress. **Journal of Plant Physiology**, v.161, p.1211-1224, 2004.

DELAUNEY, A. J.; VERMA, D. P. S. A soybean Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate reductase gene was isolated by functional complementation in *Escherichia coli* and is found to be osmoregulated. **Molecular Genomics and Genetics**, v.221, p.299-305, 1993.

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

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

ELDRIDGE, K.; DAVIDSON, J.; HARDWIID, C.; WYK, G. V. **Eucalypt domestication and breeding**. Oxford Clarendon, p. 228-246, 1994.

ELTHON, T. E.; STEWART, C. R. Proline oxidation in corn mitochondria. **Plant Physiology**, v. 70, p. 567-572, 1982.

ESMERALDO, M. V.; CARVALHEIRA, S. B. R. C.; BRASIL, A. A.; FIGUEIREDO, S. A.; BARRUETO CID, L. P.; BRASILEIRO, A. C. M. Analysis of different parameters affecting *Agrobacterium* -mediated transformation of *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*. In: **IUFRO Conference on Silviculture and Improvement of Eucalypts** (pp.19-23), Salvador, Brasil, p. 24-29 Agosto 1997.

FANTINI JUNIOR, M. e GRAÇA, M. E. C. Propagação *in vitro* de *Eucalyptus saligna*. In: 6º Congresso Florestal Brasileiro, Campos do Jordão. Anais. São Paulo: **Sociedade Brasileira de Silvicultura**, p. 373-378, 1990.

FAO. Global Forest Resources Assessment 2000 – Main report. FAO Forestry paper. In: QUOIRIN, M.; QUISEN, R. **Advances in genetic transformation of *Eucalyptus* species**. In: FRANCHE, C. (EDIT) *Molecular Biology of Tropical Plants*. Research Signpost, KERALA, INDIA, 2006, p. 41-56.

FERREIRA, M. **Escolha das espécies de eucaliptos**. Circular técnica IPEF, v. 47, p.130, 1979. Disponível em: <<http://www.ipef.com.br/espécies/desceucaliptos.html>> Acesso em 17 jun. 2007.

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

GERAND, H.; LE SAOS, J.; BILLARD, J. P.; TRIMOLIERES, A.; BAUCAUD, J. Effect of salinity on lipid composition, glycine betaine content and photosynthetic activity in chloroplasts of *Suaeda maritime*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 29, p. 421- 427, 1991.

GLEESON, D.; WALTER, M. A. L.; PARKINSON, M. Overproduction of proline in transgenic hybrid larch (*Larix x leptoeuropaea* (Dengler)) cultures renders them tolerant to cold, salt and frost. **Molecular Breeding**, v. 15, p. 21–29, 2005.

GLOVER, A. Taming abiotic stress in plant through genetic engineering: current strategies and perspective. **Plant Science**, v. 143, p. 101-111, 1999.

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

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

GONZALES, E. R.; ANDRADE A.; LACERDA, G. C.; DEFÁVARI, V. A. P.; BERTOLO, A. L.; CARNEIRO, R. T.; LABATE, M. T. V.; LABATE, C. A. Generation of transgenic *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* using sonication-assisted *Agrobacterium* transformation (SAAT) of germinating seeds. In: **"Tree Biotechnology in the New Millenium" IUFRO 2001**, Stevenson, Washington, USA, July 21-27, 2001.

GONZALES, E. R.; TORO, A. A.; LABATE, M. T. V.; DIAS, C. T. S.; LABATE, C. A. Transformação genética via *Agrobacterium* assistida por sonicação de sementes e plântulas de *Eucalyptus grandis*. In: **Anais do Congresso de Genética e Biologia Molecular** (p. 677), Porto Alegre, Brazil, October, 1999.

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.

HARDIE, D. G. Roles of the AMP-activated/SNF1 protein kinase family in the response to cellular stress. **Biochemistry Society**, v. 64, p. 13-27, 1999.

HARE, P. D.; CRESS, W. A. Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. **Plant Growth Regulation**, v. 21, p. 79-102, 1997.

HARE, P. D.; CRESS, W. A.; VAN STADEN, J. Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. **Plant Cell Environment**, v. 21, p. 535-553, 1998.

HARE, P. D.; CRESS, W. A.; VAN STADEN, J. Proline synthesis and degradation: a model system for elucidating stress-related signal transduction. **Journal of Experimental Botany**, v. 50, p. 413-434, 1999.

HARE, P. D.; CRESS, W. A.; VAN STADEN, J. Disruptive effects of exogenous proline on chloroplast and mitochondrial ultrastructure in *Arabidopsis* leaves. **South African Journal of Botany**, v. 68, p. 393-396, 2002.

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.

HIGA, A. R.; GARCIA, C. H.; SANTOS, E. T. Geadas, prejuízos à atividade florestal. **Silvicultura**, São Paulo, v. 15, p. 40-43, 1994.

HMIDA-SAYARI, A.; GARGOURI-BOUZID, R.; BIDAN, A.; JAOUA, L.; SAVOURÉ, A.; JAOUA, S. Overexpression of pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers salt tolerance in transgenic potato plants. **Plant Science**, v. 196, p. 746-752, 2005.

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 plantlets. **Plant Cell Reports**, v.17, p. 675-680, 1998.

HOLLUNG, K.; ESPELUND, M.; SCHOU, K.; JAKOBSEN, K. S. Developmental, stress and ABA modulation of mRNA levels for bZIP transcription factors and Vp1 in barley embryos and embryo-derived suspension cultures. **Plant Molecular Biology**, v. 35, p. 561-571, 1997.

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

HUR, J.; JUNG, K. H.; LEE, C. H. Stress-inducible *OSP5CS2* gene is essential for salt and cold tolerance in rice. **Plant Science**, v. 167, p. 417-426, 2004.

INGRAM, J.; BARTELS, D. The molecular basis of dehydration tolerance in plants. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 47, p. 377-403, 1996.

IPEF. Chave de identificação de espécies florestais. Disponível em: <http://www.ipef.br/identificacao/cief/especies/saligna>> Acesso on line em 04/07/2007.

KACPERSKA, A. Sensor types in signal transduction pathway in plant cells responding to abiotic stressors: do they depend on stress intensity? **Physiologia Plantarum**, v. 122, p. 159-168, 2004.

KAVI-KISHOR, P. B.; SANGAM, S.; AMRUTHA, R. N.; SRI-LAXMI, P.; NAIDU, K. R.; RAO, K. R. S. S.; SREENATH R.; REDDY, K. J.; THERIAPPAN, P.; SREENIVASULU, N. Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. **Current Science**, v. 88, p. 424-438, 2005.

KAVI-KISHOR, P. B. K.; HONG, Z.; MIAO, G. H.; HU, C. A. A.; VERMA, D. P. S. Overexpression of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants. **Plant Physiology**, v.108, p.1387-1394, 1995.

KAWAOKA, A.; NANTO, K.; SUGITA, K.; ENDO, S.; YAMADA-WATANABE, K.; MATSUNAGA, E.; EBINUMA, H. Production and analysis of lignin-modified transgenic *Eucalyptus*. In: **Tree Biotechnology, IUFRO**. Sweden, 2003. In: QUOIRIN, M.; QUISEN, R. **Advances in genetic transformation of *Eucalyptus* species**. In: FRANCHE, C. (edit) Molecular Biology of Tropical Plants. Research Signpost, Kerala, India, 2006, p. 41-56.

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

KIYOSUE, T.; YOSHIBA, Y.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. A nuclear gene, encoding mitochondrial proline dehydrogenase, an enzyme involved in proline metabolism, is upregulated by proline but downregulated by dehydration in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, v. 8, p.1323-1335, 1996.

KNOP, W. Quantitative untersuchungen uber den ernahrungsproversder pflazen.. **Landerwirtsch Vers. St**, v. 7, p. 93-107, 1865.

KONDO, K.; KOSHIYAMA, J.; DOI, K.; ISHIGE, N.; HIBINO, T.; KASUGA, M.; SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Analysis of the stress response genes in eucalyptus and effect of introducing a stress tolerance-giving gene (*rd29A-DREB1A*) into *Eucalyptus*. **Plant and Cell Physiology**, v. 43, p. 113, 2002.

KONSTANTINOVA, T.; PARVANOVA, D.; ATANASSOV, A.; DJILIANOIV, D. Freezing tolerant tobacco, transformed to accumulate osmoprotectants. **Plant Science**, v.163, p. 157-164, 2002.

KREUGER, R.; JAGER, H. J.; HINTZ, M.; PAHLICH, E. Purification to homogeneity of pyrroline-5-carboxylate reductase of barley. **Plant Physiology**, v.80, p.142-144, 1986.

KRISTIANSEN. E.; ZACHARIASSEN, K. E. The mechanism by which fish antifreeze proteins cause thermal hysteresis. **Cryobiology**, v. 51, P. 262-180, 2005.

KYOZUKA, J.; HARCOURT, R. L.; PEACOCK, W. J.; DENNIS, E. S. *Eucalyptus* has functional equivalent of the *Arabidopsis AP1* gene. **Plant Molecular Biology**, v. 35, p. 573-584, 1997.

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

LARCHER W. Ecofisiologia vegetal. **São Carlos: Rima Artes e Textos**, p. 531, 2004.

LAROSA, P. C.; RHODES, D.; RHODES, J. C.; BRESSAN, R. A.; CSONKA, L. N. Elevated accumulation of proline in NaCl-adapted tobacco cells is not due to altered Δ^1 -pyrroline -5-carboxylate reductase. **Plant Physiology**, v.96, p. 245-250, 1991.

LAWLOR, D. W. Limitation to photosynthesis in water-stressed leaves: stomata vs. metabolism and the role of ATP. **Annals of Botany**, v.89, p. 871-885, 2002.

LE ROUX, J. J. e VAN STADEN, J. Micropropagation of *Eucalyptus* species. **Journal of Horticultural Science**, Bangalore, v.26, n.5, p.199-200, 1991.

LLOYD, G.; MCCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **Combined Proceedings International Plant Propagators Society**, v. 30, p. 421-427, 1981.

LUDLOW, M. M.; SANTAMARIA, J. M.; FUKAI, S. Contribution of osmotic adjustment to grain yield in *Sorghum bicolor* (L.) Moench under water-limited conditions. II. Water stress after anthesis. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 41, p. 67-78, 1990.

MACHADO, L. O. R.; PENCHEL, R. M.; TEULIÈRES, C.; BERTOLUCCI, F. L.; BOUDET, A. M. Transformation and regeneration studies of elite eucalypt hybrids: optimisation of physical and biological parameters. In: **IUFRO Conference on Silviculture and Improvement of Eucalypts** (pp.192-197), Salvador, Brasil, p. 24-29, Agosto, 1997.

MACRAE, S.; VAN STADEN, J. *In vitro* culture of *Eucalyptus grandis*: effect of gelling agents on propagation. **Journal of Plant Physiology**, v.137, p.249-251, 1990.

MATYSIK, J.; ALIA, B. B.; MOHANTY, P. Molecular mechanisms of quenching of reactive oxygen species by proline. **Current Science**, v. 82, p. 525-532, 2002.

MOLINARI, H, B, C.; MARUR, C. J.; BESPALHOK J. C.; KOBAYASHI, A. K.; PILEGGI, M.; PEREIRA, F. P. P.; VIEIRA, L. G. E. Osmotic adjustment in transgenic citrus rootstock Carrizo citrange (*Citrus sinensis* Osb. x *Poncirus trifoliata* L. Raf.) overproducing proline. **Plant Science**, v. 167, p.1375-1381, 2004.

MORALEJO, M.; ROCHANGE, F.; BOUDET, A.M.; TEULIÈRES, C. Generation of transgenic *Eucalyptus globulus* plantlets through *Agrobacterium tumefaciens*

mediated transformation. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 25, p. 207-212, 1998.

MORGAN, J. M. Osmoregulation and water stress in higher plants. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 35, p. 299-319, 1994.

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

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

MURATA, N.; LOS, D. A. Membrane fluidity and temperature perception. **Plant Physiology**, v. 115, p. 875-879, 1997.

NAKAGAWA, H.; OHMIYA, K.; HATTORI, T. A rice bZIP protein, designated OSBZ8, is rapidly induced by abscisic acid. **Plant Journal** v. 9, p. 217-227, 1996.

NAKASHIMA, K.; SATOH, R.; KIYOSUE, T.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. A gene encoding proline dehydrogenase is not only induced by proline and hypoosmolarity, but is also developmentally regulated in the reproductive organs of Arabidopsis. **Plant Physiology**, v.118, p.1233-1241, 1998.

NANJO, T.; KOBAYASHI, M.; YOSHIBA, Y., SANADA, Y.; WADA, K.; TSUKAYA, H.; KAKUBARI, Y.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Biological functions of proline in morphogenesis and osmotolerance revealed in antisense transgenic *Arabidopsis thaliana*. **Plant Journal**, v. 18, p. 185-193, 1999.

NANJO, T.; FUJITA, M.; SEKI, M.; KATO, T.; TABATA, S.; SHINOZAKI, K. Toxicity of free proline revealed in an Arabidopsis T-DNA-tagged mutant deficient in proline dehydrogenase. **Plant Cell Physiology**, v. 44, p.541-548, 2003.

NITSCH, J. P.; NITSCH, C. Haploid plants from pollen grains. **Science**, v. 163, p. 85-87, 1969.

NUGENT, G.; CHANDLER, S.F.; WHITEMAN, P.; STEVENSON, T. W. Adventitious bud induction in *Eucalyptus globulus* Labill. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v. 37, p. 388-391, 2001.

PALVA, E. T.; HTIHARJU, S. T.; TAMMINEN, P.; PUHAKAINEN, T.; LAITINEN, R.; SVENSSON, J.; HELENIUS, E.; HEINO, P. Biological mechanisms of low temperature stress response: cold acclimation and development of freezing tolerance in plants. **JIRCAS Working Reports**, p. 9 -15, 2002.

PASTORI, G.M.; FOYER, C. Common components, networks and pathways of cross-tolerance to stress. The central role of 'redox' and abscisic acid-mediated controls. **Plant Physiology**, v.129, p. 460-468, 2002.

PENG, Z.; LU, Q.; VERMA, D. P. S. Reciprocal regulation of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase and proline dehydrogenase genes controls proline levels during and after osmotic stress in plants. **Molecular and General Genetics**, v. 253, p. 334-341, 1996.

PRADEEP, K.; YAN, Z.; XU, M. G.; MAZZA, S. V.; BULDYREV, S. H.; CHEN, S. L.; STANLEY, H. E. Glass transition in biomolecules and the liquid-liquid critical point of water. **Plant Physiology Review**, v. 97, 2006.

PURSE, J. Genetic transformation of *Eucalyptus*. Abstracts. **Tree Biotechnology Liaison Group 17th annual Meeting**. University of Nottingham, p. 15-17, 1997.

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

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

RAYAPATI, P. J.; STEWART, C. R. Solubilization of a proline dehydrogenase from maize (*Zea mays* L.) mitochondria. **Plant Physiology**, v. 95, p. 787-791, 1991.

RHODES, D.; HANDA, S. Amino acid metabolism in relation to osmotic adjustment in plant cells. In: **Environmental Stress in Plants: Biochemical and Physiological Mechanisms**, NATO ASI Series, (JH Cherry ed), Springer, Berlin, v.19, p. 41-62, 1989.

RIZZINI, C. T. **Árvores e madeiras úteis do Brasil**. 2.ed. São Paulo: Ed. Edgard Blücher, 1971.

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

SAKAMOTO, A.; MURATA, N. Genetic engineering of glycinebetaine synthesis in plants: current status and implications for enhancement of stress tolerance. **Journal of Experimental Botany**, v.51, p.81-88, 2000.

SARTORETTO, L. M.; BARRUETO CID, L. P.; BRASILEIRO, A. C. M. Biolistic transformation of *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* callus. **Functional Plant Biology**, v. 29, p. 917-924, 2002.

SAVOURÉ, A.; HUA, X. J.; BERTAUCHE, N.; VAN MONTAGU, M.; VERBRUGGEN, N. Abscisic acid-independent and abscisic acid-dependent regulation of proline biosynthesis following cold and osmotic stresses in *Arabidopsis thaliana*. **Molecular Genomics and Genetics**, v. 254, p.104-109, 1997.

SCHWAB, K. B.; GAFF, D. F. Influence of compatible solutes on soluble enzymes from desiccation-tolerant *Sporobolus stapfianus* and desiccation-sensitive *Sporobolus pyramidalis*. **Journal of Plant Physiology**, v. 137, p. 208-215, 1990.

SEKI, M.; KAMEI, A.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Molecular responses to drought, salinity and frost: common and different paths for plant protection. **Current Opinion of Biotechnology**, v.14, p.194-199, 2003.

SELLS, G. D.; KOEPPE, D. E. Oxidation of proline by mitochondria isolated from water-stressed maize shoots. **Plant Physiology**, v.68, p.1058-1063, 1981.

SERRAJ, R.; SINCLAIR, T. R. Osmolyte accumulation: can it really help increase crop yield under drought conditions? **Plant and Cell Environment**, v. 25, p. 333-341, 2002.

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

SHANI, Z.; DEKEL, M.; COHEN, B.; BARIMBOIM, N.; COHEN, O.; HALALY, T.; KOLOSOVSKI, N.; SHOSEYOV, O. Cell wall modification, a technological approach for fiber improvement and growth enhancement of commercial *Eucalyptus*. In: Borralho, N. *et al.* (eds.). *Eucalyptus* in a changing world. **Proceedings of the International IUFRO Conference**. Aveiro, Portugal, v.11-15, p. 668-673, 2004.

SHEN, Q.; HO, T. H. D. Functional dissection of an abscisic acid (ABA)-inducible gene reveals two independent response complexes each containing a G-box and a novel cis-acting element. **Plant Cell**, v. 7, p. 295-307, 1995.

SHEN, Q.; ZHANG, P.; HO, T.H.D. Modular nature of abscisic acid (ABA) response complexes: Composite promoter units that are necessary and sufficient for ABA induction of gene expression in Barley. **Plant Cell Reports**, v. 8, p. 1107-1119, 1996.

SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Gene expression and signal transduction in water stress response. **Plant Physiology**, v. 115, p. 327-334, 1997.

SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Molecular responses to cold, drought, heat and salt stress in higher plants. **Biotechnology Intelligence Unit 1**, Austin, Texas, U.S.A. p. 11-25, 1999.

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

SILVA, J. C. Novos Valores estimulam consumo da madeira de reflorestamento. **Visão Agrícola**, Piracicaba - SP, v. 4, n. 2, p. 112-113, 2005.

SIVAKUMAR, P.; SHARMILA, P.; SARADHI, P. Proline suppresses Rubisco activity in higher plants. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 252, p. 428-432, 1998.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE SILVICULTURA (SBS). **Fatos e Números do BrasilFlorestal**. Disponível em: <http://www.sbs.org.br/FatoseNumerosdoBrasilFlorestal.pdf>. Acesso on line em 10 de maio de 2007.

SOKHANSANJ, S. A.; SADAT N.; NIKNAM. V. Comparison of bacterial and plant genes participating in proline biosynthesis with osmotin gene, with respect to enhancing salinity tolerance of transgenic tobacco plants. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 53, p. 110–115, 2006.

SOUTHERTON, S. G.; STRAUSS, S. H.; OLIVE, M. R.; HARCOURT, R. L.; DECROOQ, V.; ZHU, X.; LLEWELLYN, D. J.; PEACOCK, W. J.; DENNIS, E. S. *Eucalyptus* has a functional equivalent of the *Arabidopsis* floral meristem identity gene *LEAFY*. **Plant Molecular Biology**, v. 37, p. 897-910, 1998.

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

SRINIVAS, V.; BALASUBRAMANIAN, D. Proline is a protein-compatible hydrotrope. **Langmuir**, v. 11, p. 2830-2833, 1995.

STACHEL, S. E.; NESTER, E. W. The genetic and transcriptional organization of the vir region of A6 Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. **The EMBO Journal**, v. 5, p.1445-1454, 1986.

SZOKE, A.; MIAO, G. H.; HONG, Z.; VERMA, D.P.S. Subcellular location of Δ^1 pyrroline-5-carboxylate reductase in root/nodule and leaf of soybean. **Plant Physiology** v. 99, p.1642-1649, 1992.

TAIZ, L; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3 Ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 719p, 2004.

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

THOMAS, J. C.; BOHNERT, H. J. Salt Stress Perception and Plant Growth Regulators in the Halophyte *Mesembryanthemum crystallinum*. **Plant Physiology**, v. 103, p. 1299- 1304, 1993.

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.

TIMASHEFF, S. N. The control of protein stability and association by weak interactions with water: how do solvents affect these processes? **Annual Review of Biophysical and Biomolecular Structure**, v. 22, p. 67-97, 1993.

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

TREICHEL, S. The influence of NaCl on delta1-pyrroline-5-carboxylate reductase in proline-accumulating cell suspension cultures of *Mesembryanthemum nodiflorum* and other halophytes. **Plant Physiology**, v. 67, p. 173-181, 1986.

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

URRUTIA, M. E.; DUMAN, J. G.; KNIGHT, C. A. Plant thermal hysteresis proteins – **Biochemistry and Biophysical Acta**, v. 22, p. 199-201, 1992.

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

VALÉRIO, L.; CARTER, D.; RODRIGUES, J. C. Down regulation of cinnamyl alcohol dehydrogenase, a lignification enzyme, in *Eucalyptus camaldulensis*. **Molecular Breeding**, v. 12: p. 157-167, 2003.

VALOIS, A. C. C.; SALOMÃO, A. N.; ALLEM, A. C. **Glossário de recursos genéticos vegetais**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, p, 62, 1996.

VERBRUGGEN, N.; VILLARROEL, R.; VAN MONTAGU, M. Osmoregulation of a pyrroline-5-carboxylate reductase gene in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiology**, v. 103, p. 771-781, 1993.

WACHIRA, F. N., BORE, J. K. A.; NJUGUNA, C. K. Evaluation of fuel wood species for use in the tea industry, v. 15, p. 119-123, 1994.

WANG, W.; VINOCUR, B.; ALTMAN, A. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. **Planta**, v. 218, p.1-14, 2003.

WILLIAMSON, C. L.; SLOCUM, R. D. Molecular cloning and evidence for osmoregulation of the Δ^1 -pyrroline -5-carboxylate reductase (*proC*) gene in pea (*Pisum sativum* L.). **Plant Physiology**, v. 100, p. 1464-1470, 1992.

XIONG, L.; ZHU, J. K. Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic stress. **Plant Cell and Environment**, v. 25, p.131-139, 2002.

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

YANCEY, P.H. Compatible and counteracting solutes. In: **Cellular and Molecular Physiology of Cell Volume Regulation** (K Strange ed), CRC Press, Boca Raton, p. 81-109, 1994.

ZHANG, J.; NGUYEN, H.T.; BLUM, A. Genetic analysis of osmotic adjustment in crop plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 50, p. 291-302, 1999.

ZHU, B.; SU, J.; CHANG, M. C.; VERMA, D. P. S.; FAN, Y. L.; WU, R. Overexpression of a Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase gene and analysis of tolerance to water and salt-stress in transgenic rice. **Plant Science**, v.139, p. 41-48, 1998.

3 ORGANOGÊNESE E MICROPROPAGAÇÃO DE *Eucalyptus saligna*

RESUMO

As técnicas de transformação genética têm contribuído com os programas de melhoramento florestal para a obtenção de genótipos com novas características de interesse. A transformação genética, além de reduzir os longos ciclos de melhoramento, evita a manipulação de árvores de grande porte. Para que o processo de transformação genética seja eficiente, torna-se imprescindível a disposição de protocolos de regeneração que permitam o desenvolvimento de plantas a partir de tecidos transformados. Este trabalho teve como objetivo a obtenção e micropropagação de plantas de *Eucalyptus saligna* via organogênese a partir de folhas cotiledonares e o estabelecimento de um protocolo de regeneração a partir de folhas para posterior utilização na transformação genética por co-cultura com *Agrobacterium tumefaciens*. Gemas foram obtidas a partir de folhas cotiledonares cultivadas em meio de cultura MS contendo 2,70 μM de ANA e 4,44 μM de BAP. Após a seleção de um genótipo para o cultivo *in vitro*, foram realizados estudos referentes a taxa de multiplicação de gemas em meio MS com as concentrações de nitratos de potássio e amônio reduzidas à metade (MSM) e concentrações de 0; 1,11; 2,22; 3,33 e 4,44 μM de BAP. Os melhores resultados em termos de taxa de multiplicação foram obtidos com a utilização das concentrações de 1,11 a 3,33 μM de BAP. Estudos de regeneração de gemas a partir de explantes foliares foram realizados em meio de cultura MSM contendo 0,1 μM de ANA combinado com as concentrações de 1,0; 1,5 e 2,0 μM de TDZ durante dois períodos de 15 dias, seguido de 0,125 μM de ANA e 0,250 μM de BAP por mais dois períodos de 15 dias. O melhor resultado foi obtido após o cultivo dos explantes em meio contendo 0,1 μM de ANA e 1,0 μM de TDZ por 30 dias, seguido de 0,67 μM de ANA e 1,11 μM de BAP com uma taxa de regeneração de 30%. Para o alongamento, as brotações foram cultivadas durante 28 dias em meio de cultura MSM contendo 2,5% de carvão ativado. Para o enraizamento foi utilizado o meio de cultura MS/2 (com a concentração dos sais reduzida de metade) contendo os seguintes tratamentos: sem regulador vegetal e carvão ativado, 2,5% de carvão ativado sem regulador vegetal e concentrações de 1,35; 2,70 e 5,40 μM de ANA. A melhor taxa de enraizamento (73,75%) foi obtida no meio de cultura MS/2 isento de reguladores vegetais após 28 dias de cultivo. As microestacas enraizadas foram aclimatizadas em casa-de-vegetação utilizando o substrato Plantmax[®], proporcionando uma taxa de sobrevivência de 80% após 28 dias. Os resultados obtidos neste trabalho permitiram concluir que o genótipo de *Eucalyptus saligna* utilizado apresentou um comportamento responsivo na indução da organogênese nos tecidos estudados e nas demais etapas da micropropagação. Esta resposta possibilitou a obtenção de um protocolo de regeneração de plantas a partir de uma metodologia simples e permitiu resultados satisfatórios para a espécie *Eucalyptus saligna*.

Palavras-chave: espécies florestais, cultura de tecidos, cultivo *in vitro*.

3 ORGANOGENESIS AND MICROPROPAGATION OF *Eucalyptus saligna*

ABSTRACT

The genetic transformation techniques contribute to forestry improvement programs to obtain genotypes expressing new interesting characteristics. The genetic transformation allows shortening the long breeding cycles and avoiding manipulation of adult trees. The efficiency of genetic transformation methods is relational to establishment of regeneration procedures that will allow the development of shoots from the transformed tissues. The present study aimed to obtain micropropagated plants of *Eucalyptus saligna* by organogenesis from cotyledons and establishing a regeneration procedure from leaf explants to be used in future studies of genetic transformation via co-culture with *Agrobacterium tumefaciens*. Buds were obtained from cotyledonary explants of *E. saligna* cultured on MS medium supplemented with 2.70 μM naphthalene acetic acid (NAA) and 4.44 μM 6-benzylaminopurine (BAP). After genotype selection for *in vitro* culture studies were carried out in order to define the multiplication rate on MS medium with half-strength concentrations of potassium and ammonium nitrates (MSM) and concentrations of 0; 1.11; 2.22; 3.33 and 4.44 μM of BAP. The best results for bud multiplication rate were obtained on MSM medium containing (1.11 – 3.33) μM BAP. Experiments of bud regeneration from leaf explants were made on MSM culture medium containing 0.1 μM NAA combined with the concentrations of 1.0; 1.5 and 2.0 μM TDZ, followed by 0.125 μM NAA and 0.250 μM BAP. The best result was obtained after explants culture on MSM medium containing 0.1 μM NAA and 1.0 μM TDZ for 30 days, followed by 30 days on MS medium containing 0.125 μM NAA and 0.250 μM BAP, the regeneration rate was 30%. For elongation, shoots were cultured for 28 days on MSM medium containing 2,5% of activated charcoal. For the micro-cuttings rooting, was used the MS/2 medium (with half-strength concentration of salts) containing the following treatments: without growth regulator and activated charcoal, 2.5% of active charcoal without growth regulator and NAA concentrations of 1.35; 2.70 and 5.40 μM . The best micro-cuttings rooting (73.75%) were obtained on MS medium with half-strength concentration of salts and without growth regulators and active charcoal after 28 days of culture. The plants were acclimatized in a greenhouse in a Plantmax[®] mixture, with a survival rate of 80% after 28 days. The results obtained in this study allowed concluding that the *Eucalyptus saligna* genotype was responsive for organogenesis induction on studied tissues and the micropropagation. It also made possible the establishment of plant regeneration procedure was developed by a simple methodology and allowed satisfactory results for *Eucalyptus saligna*.

Key-words: forestry species, tissue culture, *in vitro* culture.

3.1 INTRODUÇÃO

As técnicas de transformação genética têm contribuído com os programas de melhoramento florestal na obtenção de genótipos com novas características de interesse. A transformação genética, além de reduzir os longos ciclos de melhoramento, evita a manipulação de árvores adultas. Para que a metodologia de transformação seja eficiente, o estabelecimento de um protocolo de regeneração de plantas utilizando material vegetal proveniente de genótipos identificados e com boas respostas *in vitro*, e o completo domínio de todas as etapas envolvidas na produção de plantas aptas para cultivo *ex vitro*, são fatores indispensáveis para o sucesso dos estudos de transformação genética *via Agrobacterium tumefaciens*.

Várias pesquisas visando o desenvolvimento de protocolos de regeneração a partir de diferentes fontes de explantes e micropropagação já foram descritas para *E. camaldulensis* (MURALIDHARAN e MASCARENHAS, 1987; MULLINS et al., 1997; HO et al., 1998; DIBAX et al., 2005), *E. tereticornis* (SUBBAIAH e MINOCHA 1990; PARTHIBAN et al., 1999), *E. grandis* (WARRAG et al., 1991; LAINÉ e DAVID, 1994), *E. urophylla* (TIBOK et al., 1995), *E. globulus* (SERRANO et al., 1996); *E. gunnii* (HERVÉ et al., 2001); *E. grandis* x *E. urophylla* (GONZÁLES et al., 2002; TOURNIER et al., 2003; ALVES et al., 2004).

Com relação à espécie *Eucalyptus saligna*, os únicos trabalhos de micropropagação publicados para esta espécie foram desenvolvidos por Fantini Júnior e Graça (1990) e Le Roux e Van Staden (1991). Nestes dois trabalhos, explantes *ex vitro* foram utilizados para a micropropagação, porém, informações relacionadas a organogênese indireta de gemas não foram encontradas até o presente. Diante deste contexto, este trabalho teve como objetivo a obtenção de plantas de *Eucalyptus saligna* via organogênese em folhas cotiledonares, bem como a partir de folhas de um genótipo selecionado e sua posterior utilização na transformação genética por co-cultura com *Agrobacterium tumefaciens*.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Local de realização dos experimentos

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.

3.2.2 Condições gerais de cultura *in vitro*

Todas as culturas *in vitro* respectivas a cada experimento foram mantidas em sala de crescimento, sob luz fluorescente branca fria com densidade de fluxo fotossintético de $40 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 16 h e temperatura de $27 \pm 2^\circ\text{C}$.

As culturas foram realizadas em placas de Petri de 10 cm de diâmetro e 2 cm de altura, contendo 30 mL de meio de cultura e vedadas com filme PVC, ou em frascos de vidro de 6 cm de diâmetro e 9 cm de altura, contendo 40 mL de meio de cultura cada um e vedados com tampa de polipropileno rígido.

Todos os meios de cultura tiveram o pH ajustado em 5,8 e foram autoclavados durante 20 min a 120°C .

3.2.3 Organogênese indireta a partir de folhas cotiledonares

Sementes de *E. saligna* foram fornecidas pela EMBRAPA – Florestas, sendo uma mistura das seguintes progênies: BR00-519 (27%), BR00-523 (13%), BR01-197 (12%), BR00-534 (12%), BR01-201 (12%), BR00-530 (12%) e BR00-539 (12%).

Antes da realização da assepsia, as sementes foram selecionadas por tamanho com o auxílio de uma peneira com malha de 1 mm para a seleção das sementes maiores que 1 mm. Após a seleção, foram submersas em solução de etanol 70% (v/v) adicionada de 5 gotas de TWEEN 20[®] por 100 mL durante 3 min e, em seguida, foram desinfestadas numa solução de hipoclorito de sódio 6% (v/v) durante 30 min. No final do tratamento, foram lavadas três vezes com água destilada autoclavada e semeadas em placas de Petri contendo o meio de cultura MS/2 (Murashige e Skoog, 1962), vitaminas e compostos orgânicos do mesmo meio, 20

g.L^{-1} de sacarose e 7 g.L^{-1} de ágar (Vetec[®]) (Anexo 1). A fase de germinação foi subdividida em duas etapas: primeiramente as sementes foram mantidas por um período de dez dias no escuro e, em seguida, permaneceram dois dias sob condições de luz.

Doze dias após a germinação, as folhas cotiledonares foram cortadas na base do pecíolo e posicionadas com a face adaxial em contato com o meio de cultura para a indução da organogênese indireta. Este meio era composto pelos sais e vitaminas do meio MS, 30 g.L^{-1} de sacarose, 7 g.L^{-1} de ágar (Vetec[®]), $2,70 \mu\text{M}$ de ANA e $4,44 \mu\text{M}$ de BAP (DIBAX et al., 2005) (Anexo 2).

As culturas foram mantidas em sala de crescimento, no escuro durante 15 dias e, após, em condições de luz por mais 15 dias. Em seguida, os explantes que formaram calos foram transferidos para o mesmo meio de cultura e mantidos na luz. Aos 60 dias, os explantes regenerando gemas foram identificados, isolados e selecionados.

3.2.4 Identificação, isolamento e seleção de um clone

As gemas obtidas foram transferidas para frascos contendo o meio de cultura MSM suplementado com $4,44 \mu\text{M}$ de BAP, 30 g.L^{-1} de sacarose e 7 g.L^{-1} de ágar (Vetec[®]). Aos 15 dias após o isolamento, os tufo de gemas foram divididos e repicados em novos frascos contendo o mesmo meio de cultura. Repicagens sucessivas foram realizadas a cada 20 dias.

Um clone foi selecionado em função da superioridade na multiplicação e vigor *in vitro* e também pelos seguintes parâmetros: formação abundante de folhas, ausência de hiperidricidade e imperfeições no limbo foliar, coloração verde intensa e uniforme, folhas com dimensões médias de 5 mm de comprimento por 3 mm de largura.

3.2.5 Multiplicação das gemas

O meio de cultura utilizado foi o MS, com 30 g.L^{-1} de sacarose e 7 g.L^{-1} de ágar (Vetec[®]) (Anexo 3). Os tratamentos foram os seguintes: (1) Controle (sem

BAP), (2) 1,11 μM de BAP, (3) 2,22 μM de BAP, (4) 3,33 μM de BAP, (5) 4,44 μM de BAP.

O material vegetal foi dividido em tufos contendo quatro gemas e transferido nos meios de cultura de cada tratamento e em seguida mantido em sala de crescimento sob condições de luz. Após 28 dias, realizou-se a avaliação pela contagem do número final de gemas em cada tufo.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com 10 repetições por tratamento e 4 segmentos por unidade experimental.

Foi ajustada uma equação de regressão para representar o número médio de gemas por tufo em função das concentrações de BAP comparadas. O modelo de equação ajustado foi:

$$Y = b_0 + b_1 + b_2X^2$$

Onde: y = variável considerada

X = tratamento aplicado

b_0, b_1, b_2 = coeficientes do modelo

3.2.6 Organogênese a partir de folhas

As folhas foram retiradas das partes superiores das brotações do clone selecionado durante o seu 5^o subcultivo em meio de MSM contendo 1,11 μM de BAP (Anexo 4).

Para esta etapa, foi utilizado o meio de cultura MSM com 30 g.L^{-1} de sacarose e 7 g.L^{-1} de ágar (Vetec) (Anexo 4). Os tratamentos foram os seguintes: (1) Controle: (sem reguladores vegetais), (2) 0,1 μM de ANA + 1,0 μM de TDZ, (3) 0,1 μM de ANA + 1,5 μM de TDZ, (4) 0,1 μM de ANA + 2,0 μM de TDZ.

As folhas foram cortadas na base do pecíolo e divididas ao meio. Os explantes foliares foram dispostos aleatoriamente em contato com o meio de cultura distribuído em placas de Petri.

As placas de Petri foram mantidas em sala de crescimento no escuro. Quinze dias após o isolamento, realizou-se o segundo subcultivo nos mesmos meios de

cultura. Os explantes permaneceram no escuro por um período de 30 dias. Em seguida, foi realizada a avaliação da porcentagem de explantes formando calos e uma limpeza nos explantes que formaram calos verdes com aspecto organogênico, retirando os tecidos oxidados. A seguir os explantes foram transferidos para o meio de cultura MSM acrescido de 0,67 μM de ANA e 1,11 μM de BAP (Anexo 4). As placas de Petri foram mantidas na câmara de crescimento e cobertas por sombrite (50% de redução de luz) durante 15 dias. Após este período, realizou-se uma nova limpeza dos calos e o segundo subcultivo em meio de cultura MSM acrescido de 0,67 μM de ANA e 1,11 μM de BAP (Anexo 4). Aos 60 dias após o período inicial do cultivo dos explantes foliares, foram avaliadas as porcentagens de explantes regenerando gemas, o número de gemas por explante e a porcentagem de explantes oxidados.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com 10 repetições por tratamento e 10 explantes por unidade experimental.

3.2.7 Alongamento e enraizamento

Para o alongamento das brotações foi utilizado o meio de cultura MSM com 30 g.L^{-1} de sacarose, 2,5% de carvão ativado, 7 g.L^{-1} de ágar (Vetec[®]) (Anexo 5). Tufos de gemas foram divididos em tufos menores com aproximadamente cinco gemas por tufo e repicados nos meios de cultura.

Para o enraizamento foi utilizado o meio de cultura MS/2 com 20 g.L^{-1} de sacarose e 7 g.L^{-1} de ágar (Vetec[®]) (Anexo 1). Os tratamentos foram os seguintes: (1) Controle: MS/2 (sem regulador vegetal e carvão ativado), (2) meio MS/2 contendo 2,5% de carvão ativado, (3) 1,35 μM de ANA, (4) 2,70 μM de ANA, (5) 5,40 μM de ANA. Nos dois casos, as culturas foram realizadas em frascos.

As brotações foram divididas em microestacas de 1,5 cm com a área foliar reduzida e transferidas nos meios de cultura respectivos a cada tratamento. O material vegetal foi mantido no escuro por 15 dias e depois, transferido para a luz. Após 28 dias, realizou-se a avaliação considerando as seguintes variáveis: porcentagem de microestacas enraizadas, número médio de raízes e comprimento médio da raiz principal.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com 10 repetições por tratamento e quatro microestacas por unidade experimental.

3.2.8 Aclimatização

Para a aclimatização das mudas, foram utilizadas 30 microestacas de tamanho médio de 3 cm, enraizadas em meio MS/2 com 20 g.L⁻¹ de sacarose e 7 g.L⁻¹ de ágar (Vetec[®]) (Anexo 1), conforme o melhor resultado obtido após o experimento de enraizamento. As microestacas foram preparadas como indicado em 3.2.7 e, após o isolamento, os frascos foram mantidos no escuro por um período de 15 dias e em seguida transferidos para a luz. As plantas enraizadas foram retiradas dos frascos, lavadas em água corrente para a retirada de resíduos de meio de cultura e em seguida transplantadas em tubetes de polipropileno de 40 mm de diâmetro e 125 mm de altura, preenchidos com aproximadamente 50 cm³ do substrato Plantmax HT[®].

As plantas foram transferidas para o sistema de nebulização intermitente de gotas finas, com controle automático de rega de 30 em 30 min, sobre bancadas elevadas de 3,00 m de comprimento por 1,00 m de largura, com fundo telado, preenchidas com casca de arroz carbonizada, onde permaneceram por um período de 15 dias. Após este período, as plantas foram transferidas uma sala da mesma casa-de-vegetação sem nebulização, na qual permaneceram por mais 15 dias recebendo irrigação manual a cada três dias. Após o período de 30 dias, as plantas foram avaliadas de acordo com as seguintes variáveis: porcentagem de plantas sobreviventes e tamanho médio da parte aérea das plantas.

3.2.9 Análise estatística

Após a confirmação da homogeneidade das variâncias pelo teste de Bartlett, realizou-se a análise de variância para detectar se havia diferenças significativas entre as médias dos tratamentos ao nível de 1% e 5% de probabilidade. O teste de Tukey ao nível de 5% de significância foi utilizado para a comparação das médias dos tratamentos. O programa estatístico utilizado foi o Statgraphics Plus 4.1.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Organogênese indireta a partir de folhas cotiledonares

No meio de cultura contendo 2,70 μM de ANA combinado com 4,44 μM de BAP houve indução de calos em 85% dos explantes e 40% de regeneração de gemas a partir dos calos formados. O número médio de gemas por explante foi de 4,25 e, no final dos 60 dias de cultivo, a taxa de mortalidade entre os explantes foi de 45%.

A calogênese teve início aos 10 dias após o isolamento e aos 30 dias de cultivo constatou-se que o local predominante de origem dos calos foi a região da base do pecíolo, porém calos recobrimo todo o explante foram também observados. No período que os explantes permaneceram no escuro, os calos apresentaram coloração branca com aspecto brilhante e, após a transferência para a luz, colorações bege-clara, bege-escura e avermelhadas foram adquiridas. Resultados semelhantes foram observados por Dibax et al. (2005) quando estudaram o efeito da presença e ausência de luz na calogênese a partir de folhas cotiledonares de *E. camaldulensis* utilizando o mesmo tipo de explante.

Com relação à textura, tanto calos friáveis como compactos foram observados. Os calos de coloração vermelha exibiram conformações nodulares com aspecto compacto (Figura 2A) e nos calos bege-claro e bege-escuro, as divisões celulares foram menos intensas, sem a formação de calos nodulares, apresentando somente distribuição uniforme na superfície de todo o explante.

As gemas foram originadas predominantemente a partir das inúmeras protuberâncias nodulares de coloração vermelha formadas na região da base do pecíolo, aos 30 dias após o início do cultivo (Figura 2 B). Quanto à porcentagem de regeneração, estes resultados diferem dos descritos por Ho et al. (1998) e Diallo e Duhoux (1984) para a espécie *E. camaldulensis*, onde obtiveram a regeneração de gemas a partir de folhas cotiledonares cultivadas na presença de ANA e BAP nas concentrações de 16,2 μM e 2,22 μM , respectivamente. Estes autores utilizaram uma concentração de auxina superior à de citocinina e neste estudo a regeneração de gemas foi obtida com uma concentração de citocinina superior a de auxina. Se

compararmos os resultados aqui presentes relacionados com os resultados descritos na literatura para outras espécies de *Eucalyptus*, sugere-se que as respostas organogênicas são distintas entre as diferentes espécies, bem como entre genótipos de uma mesma espécie. Portanto, a necessidade de adequar protocolos diferenciados é de fundamental importância para a obtenção da organogênese e micropropagação de *Eucalyptus*.

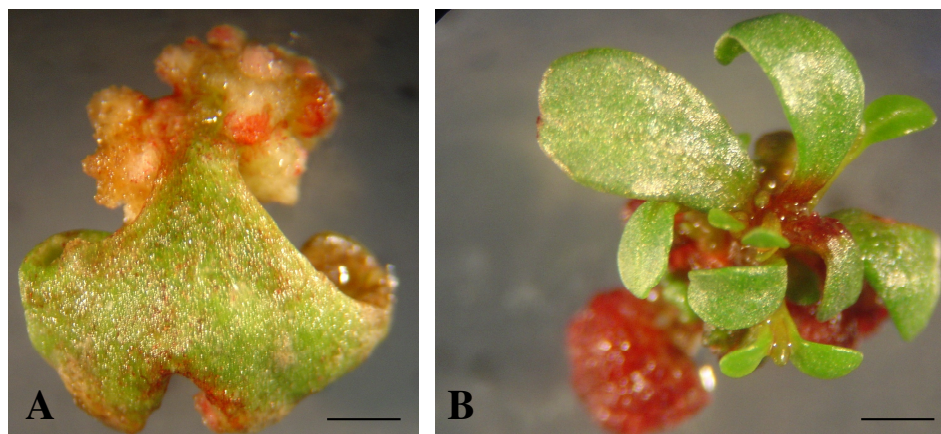


Figura 2 – Calogênese e regeneração de gemas a partir de folhas cotiledonares de *E. saligna* cultivadas em meio MS contendo 2,70 μM de ANA e 4,44 μM de BAP. (A) Formação de calos após 30 dias de cultivo. (B) Região da base do pecíolo apresentando regeneração de gemas após 60 dias de cultivo. Barras = 2,0 mm.

3.3.2 Multiplicação das gemas

Observou-se um comportamento quadrático para os níveis de BAP na indução de multiplicação das gemas. Conforme a tendência representada pela curva de regressão, as melhores taxas de multiplicação das gemas (cinco gemas em média) foram obtidas com a utilização das concentrações compreendidas no intervalo de 1,11 a 3,33 μM de BAP (Figura 3). Com a utilização de concentrações superiores a 3,33 μM a taxa de multiplicação tende a um decréscimo, conforme representado pela curva de regressão (Figura 3). Em nenhum dos tratamentos foram observadas gemas hiperhídricas e os tufo de gemas multiplicadas apresentaram-se compactos, sendo que as folhas permaneceram com um comprimento médio inicial

variando entre 3 a 5 mm. Estes resultados são similares aos obtidos por Fantini Júnior e Graça (1990) no estudo de multiplicação de gemas para a mesma espécie de *Eucalyptus*. Embora estes autores tenham utilizado intervalos menores entre as concentrações de BAP, também foi constatado em seus experimentos um decréscimo na taxa de multiplicação quando utilizaram a concentração de 4,44 μM de BAP, estando de acordo com as observações aqui presentes. O decréscimo na taxa de multiplicação pode ser explicado pelo provável efeito deletério da elevada concentração de citocinina presente no meio de cultura utilizado para esta espécie.

A concentração de 1,11 μM de BAP foi utilizada de forma rotineira para a multiplicação do material e obtenção de fontes de explantes, sendo que até o 7^o subcultivo, período máximo de multiplicação das gemas durante os experimentos, não foram observadas variações no fenótipo do material vegetal.

Na maioria das pesquisas publicadas, as respostas *in vitro* para o gênero são diferenciadas conforme a espécie e o genótipo, porém, a utilização de meios de cultura com reduções na composição mineral é freqüentemente relatada. Segundo Rodrigues e Vendrame (2003), a eficiência da micropropagação de eucaliptos é altamente influenciada pelo equilíbrio iônico do meio de cultura. Segundo estes autores, estudos baseados nas características nutricionais distintas entre as espécies são decisivos para a formulação de meios adequados para o cultivo *in vitro* de *Eucalyptus*. Para a micropropagação de *E. grandis*, o meio de cultura JADS (CORREIA, 1993; CORREIA et al., 1995) foi formulado com reduções significativas na composição mineral quando comparado ao meio MS e apresentou resultados positivos para esta espécie. Esta informação serviu de base para a formulação dos meios de cultura utilizados neste trabalho, no qual padronizou-se somente a redução dos nitratos de potássio e amônio da composição original do meio de cultura MS. Relacionando-se os resultados obtidos com os descritos na literatura, pode-se concluir que a espécie *E. saligna* apresentou bons resultados de multiplicação de gemas, provavelmente devido à resposta do genótipo utilizado nos estudos *in vitro*.

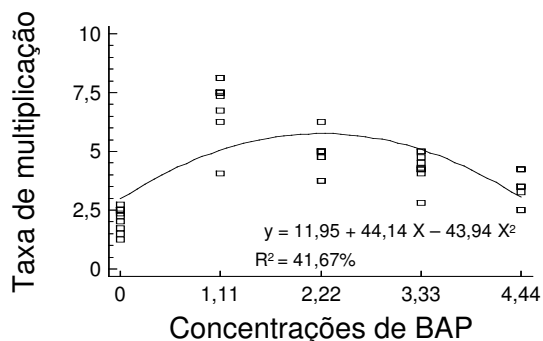


Figura 3 - Taxa de multiplicação de *E. saligna* em função das concentrações de BAP (μM).

3.3.3 Organogênese a partir de folhas

Para a variável porcentagem de explantes formando calos, foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos (Anexo 6). Somente no tratamento controle não foi observada a formação de calos nos explantes foliares (Tabela 4), enquanto os tratamentos 0,1 μM de ANA + 1,0 μM de TDZ e 0,1 μM de ANA + 1,5 μM de TDZ proporcionaram as maiores porcentagens para esta variável (Tabela 4). A calogênese teve início aos 15 dias (Figura 4A) após o isolamento e aos 30 dias de cultivo constatou-se que os locais predominantes de origem dos calos foram a região onde os explantes foram cortados e a região da base do pecíolo. No período em que os explantes permaneceram no escuro, os calos apresentaram coloração verde e aspecto brilhante e translúcido (Figura 4B). Resultados similares já haviam sido observados por Alves et al. (2004) em um estudo comparativo da calogênese e regeneração de gemas a partir de folhas em três clones de *E. grandis* x *E. urophylla*. Neste trabalho, 100% dos explantes formaram calos no meio de cultura LD (LAINÉ e DAVID, 1994) suplementado de 0,54 μM de ANA e 2,27 μM de TDZ. Estes mesmos autores evidenciaram mudanças de coloração e textura dos calos quando cultivados na luz e maior frequência de calos com aspecto organogênico na região da base do pecíolo.

Quanto à variável porcentagem de explantes regenerando gemas, foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos (Anexo 6). As melhores respostas para esta variável foram obtidas mediante a utilização de 0,1 μM de ANA + 1,0 μM de TDZ, com 30% de explantes regenerando gemas 15 dias após a transferência para o segundo meio de cultura contendo 0,67 μM de ANA + 1,11 μM de BAP (Figuras 4C e 4D).

Tabela 4 - Regeneração de gemas a partir de explantes foliares de *E. saligna* em meio de cultura MSM* contendo ANA e TDZ por 30 dias seguido de subcultivo em meio MSM contendo 0,67 μM de ANA e 1,11 μM de BAP por 30 dias.

Tratamentos (μM)		Explantes formando calos (%)	Explantes regenerando gemas (%)	Gemas por explante (Nº médio)	Explantes oxidados após 60 dias (%)
ANA	TDZ				
0,0	0,0	0,00 c	0,00 d	0,00 b	100,00 a
0,1	1,0	73,00 a	30,00 a	13,00 a	70,00 c
0,1	1,5	72,00 a	13,00 b	9,00 a	87,00 b
0,1	2,0	59,00 b	5,00 c	11,00 a	88,00 b

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. * meio de Murashige e Skoog com a concentração de nitratos de potássio e de amônio reduzida de metade.

Em todos os tratamentos, as gemas tiveram origem dos inúmeros calos de coloração verde isolados das protuberâncias formadas na base do pecíolo da região de corte (Figura 4B). Segundo Margara (1982), a intensa formação de calos e regeneração de gemas na região onde o tecido vegetal foi ferido se deve ao transporte dos fotoassimilados e reguladores do crescimento em direção a esta região. Hervé et al. (2001) relataram uma alta correlação entre protuberâncias e regeneração de gemas em explantes foliares, segmentos internodais e nodais de *E. gunnii*. Segundo estes mesmos autores, os calos que se formavam na região do pecíolo após serem transferidos para o meio de regeneração, desenvolveram gemas em 8,8% dos calos e posteriormente valores próximos de calos regenerando gemas foram observados por Alves et al. (2004). Resultados similares de regeneração já haviam sido observados por Barrueto Cid et al. (1999) em trabalhos de regeneração de gemas a partir de explantes oriundos de plântulas germinadas *in vitro* do híbrido *E. grandis* X *E. urophylla*. Estes autores estabeleceram comparações entre o

potencial de indução de calos e regeneração de gemas a partir de hipocótilos, folhas cotiledonares e folhas primárias, sendo que para todos os tipos de explantes o meio de cultura SP contendo 2,0 μM de TDZ foi responsável por 95 a 100% de calogênese preferencialmente induzida nas regiões onde os explantes foram cortados. Segundo estes mesmos autores, os calos mantinham sua habilidade de crescimento até 30 dias no meio SP contendo TDZ e, após este período, tornavam-se escurecidos e não originavam gemas.

Comparando-se os protocolos de regeneração de gemas a partir de explantes foliares provenientes de clones de *Eucalyptus*, observa-se que os resultados descritos por Mullins et al. (1997) e por Lainé e David (1994) superaram todos os aqui descritos. Estes autores obtiveram 60% e 38,5% de regeneração de gemas a partir de folhas de clones micropropagados de *E. camaldulensis* e *E. grandis*, respectivamente. Porém, devido à ausência de trabalhos publicados a respeito da organogênese a partir de folhas de *E. saligna*, não foi possível comparar as porcentagens aqui observadas com os resultados de outros autores. Com relação ao número médio de gemas por explante, o teste de comparação de médias mostrou que não houve diferenças estatísticas entre os três tratamentos (Anexo 6, Tabela 4).

Com relação à porcentagem de explantes oxidados durante os 60 dias de cultivo, foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos (Anexo 6). A menor taxa de oxidação foi elevada (70%) e foi observada no tratamento com 0,1 μM de ANA e 1,0 μM de TDZ (Tabela 5), a maior porcentagem sendo a do tratamento controle, no qual 100% dos explantes apresentaram-se oxidados no final do período de cultivo.

Segundo Barrueto Cid et al. (1999), a biossíntese de compostos fenólicos induzida pela luz e altas concentrações de citocininas nos meios de cultura contribuem para a oxidação dos explantes. Estes autores observaram valores consideráveis de explantes oxidados quando estudaram a regeneração de gemas adventícias a partir de folhas cotiledonares, folhas primárias e hipocótilos de *E. grandis* x *E. urophylla*. Em outro trabalho de regeneração de plantas a partir de folhas de *E. grandis*, Lainé e David (1994) recomendaram a utilização de polivinilpirrolidona (PVP) ou outros antioxidantes para minimizar os efeitos deletérios

causados pela oxidação dos explantes durante o processo de calogênese e indução de gemas.

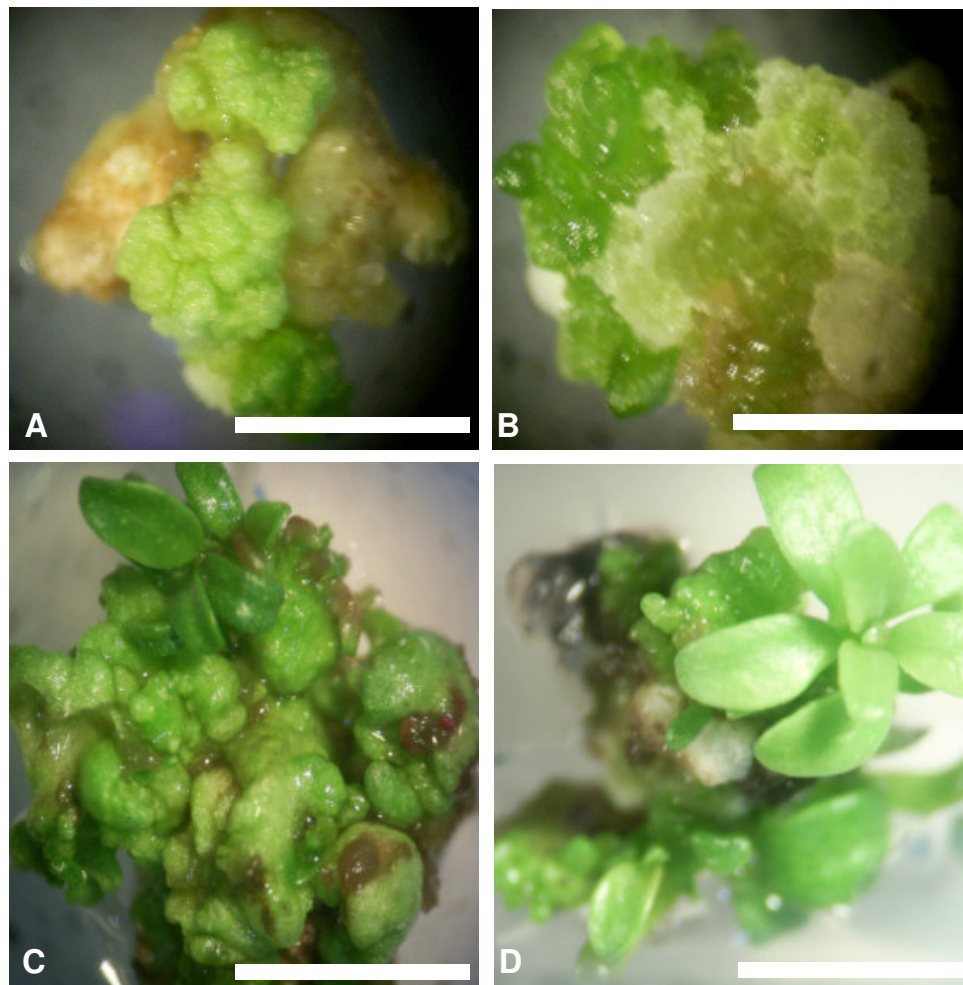


Figura 4 – Calogênese e regeneração de gemas a partir de folhas de *E. saligna*. (A) Formação de calos após 15 dias de cultivo em meio de cultura MSM contendo $0,1 \mu\text{M}$ de ANA e $1,0 \mu\text{M}$ de TDZ. (B) Início da formação de calos com aspecto organogênico após 30 dias de cultivo no mesmo meio. (C e D) Regeneração de gemas após 30 dias da transferência dos explantes para o meio de cultura contendo $0,67 \mu\text{M}$ de ANA e $1,11 \mu\text{M}$ de BAP. Barras = 5,0 mm.

3.3.4 Alongamento e enraizamento

Para o alongamento das gemas, o meio de cultura MSM contendo 2,5% de carvão ativado apresentou-se adequado, e foi utilizado em todos os experimentos onde foi necessária esta prática. Quando as gemas foram cultivadas neste meio, aproximadamente 90% das brotações foram alongadas, sendo que os comprimentos das mesmas variaram de 2,5 a 3,0 cm após 28 dias de cultivo (Figura 5A). Na maioria dos tufos observados, as brotações exibiam primórdios radiculares após a finalização da etapa de alongamento. De acordo com Barrueto Cid et al. (1999), o alongamento de gemas regeneradas a partir de folhas cotiledonares foi estimulado com a utilização do meio SP contendo BAP, ANA e GA₃ e, após um intervalo compreendido entre 20 e 30 dias, as plantas apresentaram-se com 1,5 cm de comprimento e indução espontânea de raízes. Em outro trabalho, Mullins et al. (1997) relatam que gemas de *E. grandis* originadas a partir de explantes foliares algumas vezes alongaram espontaneamente quando as gemas foram cultivadas em meio de cultura contendo 2 µM de BAP e 2,5 µM de ANA. Já algumas foram incapazes de alongarem-se e eventualmente exibiam necrose, fatores estes que não foram observados nos resultados aqui apresentados.

Com relação ao enraizamento, as porcentagens de microestacas enraizadas variaram entre 59,75 e 76,25%, porém não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos e o controle apresentou 73,75% (Anexo 7, Tabela 5 e Figura 5B). Resultados similares foram descritos para o enraizamento de microestacas de *E. botryoides*, *E. camaldulensis*, *E. deglupta* e *E. grandis* por Ito et al. (1996), mediante utilização de concentrações inferiores às apresentadas neste trabalho. Segundo estes autores, as microestacas podem ser enraizadas em meio de cultura B5 (GAMBORG et al., 1968) com a concentração de sais reduzida quatro vezes, concentrações de ANA variando de 0 a 0,01 µM, 1% de sacarose e 0,35% de ágar. Em outro trabalho, Ho et al. (1998) obtiveram sucesso no enraizamento de microestacas de *E. camaldulensis* utilizando meio de cultura MS com a concentração de sais reduzidas à metade, estando de acordo com as observações aqui presentes. Já para Bennett e McComb (1982), no enraizamento de microestacas de *E. marginata*, o meio de cultura MS/2 com 5 µM de AIB induziu o enraizamento em

35% das plantas observadas. Barreto Cid et al. (1999) obtiveram 80 a 100% de enraizamento de microestacas de *E. grandis* x *E. urophylla* utilizando o meio de cultura SP contendo 2,5 µM de BAP e 50% no controle sem adição do regulador vegetal. Em outro trabalho, Bunn (2005) utilizou o meio de cultura denominado IM-2, correspondente ao meio de cultura MS/2 contendo diferentes combinações entre ANA e AIB, para o enraizamento das microestacas de *E. impensa*. O maior valor observado foi de 73% de enraizamento nas microestacas observadas, quando utilizadas as concentrações de 0,25 µM de ANA e 0,25 µM de AIB, respectivamente.

Para a porcentagem de microestacas que desenvolveram calos, foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos (Anexo 7), sendo que todos os tratamentos contendo ANA foram responsáveis por formação de calos na base das microestacas, entretanto não diferiram significativamente (Tabela 6). Segundo Grattapaglia e Machado (1998), altas concentrações de auxinas no meio de enraizamento podem promover a formação de calos na base das microestacas, comprometendo a rizogênese e o crescimento da parte aérea da planta. Nos tratamentos controle e com 2,5% de carvão ativado, não foi observada a formação de calos nas microestacas e estes dois tratamentos não diferiram significativamente entre si (Tabela 5). Kapoor e Chauhan (1992) observaram reduções na taxa de enraizamento em microestacas de *E. torelliana* x *E. citriodora* que manifestaram intensa calogênese durante o processo de enraizamento, em meio de cultura MS com 50 e 20% da composição mineral, contendo 4,92 µM de AIB. Com base nos resultados obtidos e informações encontradas na literatura, pode-se afirmar que o comportamento de indução e formação de raízes corresponderam ao esperado conforme a revisão de literatura para outras espécies de *Eucalyptus*. Os tratamentos aplicados induziram respostas favoráveis ao enraizamento, provavelmente devido a fatores como o genótipo do material vegetal e a concentração endógena de auxina. Estas observações podem ser evidenciadas se compararmos os resultados obtidos na presença de ANA e nos outros casos onde a auxina não foi adicionada. Em todos os tratamentos comparados, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas com os demais tratamentos, e mostrando neste caso, que a auxina exógena não foi necessária para induzir a o enraizamento.

Com relação ao número médio de raízes por planta e comprimento médio da raiz principal, foram observadas diferenças significativas entre as médias dos tratamentos comparados (Anexo 7, Tabela 5). Nos tratamentos controle e contendo 2,70 e 5,40 μM de ANA, o número de raízes foi de 1,80 por planta e não diferiram significativamente entre si, sendo os melhores resultados encontrados para esta variável. Já o maior comprimento médio da raiz principal foi observado nos tratamentos contendo 2,70 μM e 5,40 μM de ANA, com valores médios aproximados de 3 cm (Anexo 7, Tabela 5).

Tabela 5 – Efeito do carvão ativado e de três concentrações de ANA no enraizamento de microestacas de *E. saligna* após 28 dias de cultivo em meio MS/2*.

Tratamentos	Enraizamento (%)	Calos (%)	Número médio de raízes	Comprimento médio da raiz principal (cm)
Controle	73,75 a	0,00 b	1,82 a	1,72 c
2,5% de carvão ativado	65,00 a	0,00 b	1,50 b	2,53 b
1,35 μM de ANA	59,75 a	92,5 a	1,30 c	2,43 b
2,70 μM de ANA	72,50 a	73,75 a	1,80 a	3,16 a
5,40 μM de ANA	76,25 a	78,75 a	1,86 a	3,24 a

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. * Meio de Murashige e Skoog com a concentração de sais reduzida a metade.

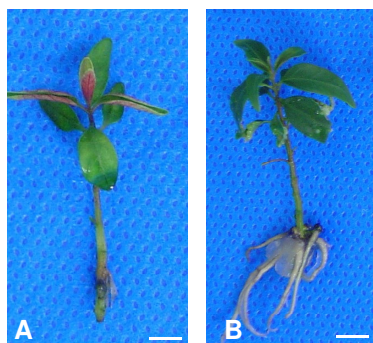


Figura 5 – Alongamento e enraizamento de microestacas de *E. saligna*. (A) Microestaca alongada após 28 dias de cultura em meio MSM contendo 2,5% de carvão ativado, (B) Planta enraizada após 28 dias de cultura em meio MS/2 sem reguladores vegetais. Barras = 1,5 cm.

3.3.5 Aclimatização

Após o período de 28 dias de aclimatização em casa-de-vegetação (Figura 6), 80% das plantas sobreviveram. O tamanho médio da parte aérea das plantas foi de 7 cm e não foram observadas alterações fenotípicas.

Com o mesmo objetivo, Bennett e McComb (1982) aclimataram plantas de *E. marginata* em sala de crescimento com uma mistura de areia e turfa estéreis na proporção de 3:1. A umidade foi reduzida gradativamente até a quarta semana e em seguida foram transferidas para as condições de casa-de-vegetação. A porcentagem de sobrevivência média das plantas observada por estes autores foi de 50. Valores superiores aos encontrados neste trabalho foram obtidos por Tournier et al. (2003) para a aclimatização de plantas de *E. grandis* x *E. urophylla*, os quais obtiveram 95% de sobrevivência das plantas em casa-de-vegetação utilizando substrato composto por areia e fertilizantes. Tibok et al. (1995) utilizaram como método de aclimatização das plantas de *E. urophylla* a abertura progressiva dos frascos durante um período de 14 dias e, em seguida, as plantas foram submetidas às condições de casa-de-vegetação. Esta prática confirma as recomendações propostas por Grattapaglia e Machado (1998). Segundo estes autores, a pré-aclimatização, ou seja, a exposição gradativa das plantas *in vitro* às condições de ambiente externo, contribuiu para a sobrevivência futura em condições de casa-de-vegetação.

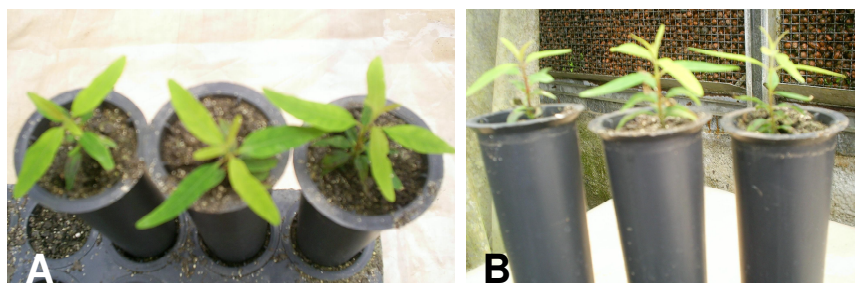


Figura 6 – (A e B) Plantas de *E. saligna* aclimatizadas em substrato Plantmax[®] HT após 28 dias em casa-de-vegetação.

3.4 Resumo das etapas de regeneração de gemas e micropropagação de *Eucalyptus saligna*

Os resultados obtidos neste trabalho permitiram estabelecer um protocolo de regeneração de gemas adventícias a partir de folhas cotiledonares e de folhas, assim como de micropropagação e aclimatização, conforme descrito nas Tabelas 6 e 7.

Tabela 6 - Resumo das etapas de germinação das sementes de *Eucalyptus saligna*, regeneração a partir de folhas cotiledonares e multiplicação das gemas.

Etapas	Métodos		
Germinação das sementes	Preparo das sementes	Desinfestação	Meio de cultura
	- Seleção por tamanho utilizando uma peneira de 1mm de malha	- Etanol 70% (v/v) contendo 5 gotas de TWEEN 20 [®] por 100 mL durante 3 min; - Hipoclorito de sódio 6% durante 30 min; - Enxágüe triplo com água destilada autoclavada.	- MS/2 (Anexo 1) sacarose 30 g.L ⁻¹ 10 dias no escuro 2 dias sob condições de luz
Regeneração a partir de folhas cotiledonares	Preparo dos explantes	Meio de indução de calos	Meio de indução de gemas
	- Cortes realizados na base do pecíolo; - Isolamento dos explantes com a face adaxial em contato com o meio de cultura	- MS (Anexo 2) contendo 2,7 µM de ANA e 4,44 µM de BAP; - 15 dias de cultivo no escuro; - 15 dias sob condições de luz.	- MS (Anexo 2) contendo 2,7 µM de ANA e 4,44 µM de BAP; - sacarose 20 g.L ⁻¹ - 30 dias de cultivo sob condições de luz.
Multiplicação das gemas	Preparo do material vegetal	Meio de cultura	Subculturas
	- Subdivisão em tufos contendo 4 gemas	- MSM (Anexo 3) contendo 1,11 µM de BAP; sacarose 30 g.L ⁻¹	- A cada 28 dias para novo meio de multiplicação.

Tabela 7 - Resumo das etapas de regeneração a partir de folhas de *Eucalyptus saligna*, alongamento, enraizamento e aclimatização das plantas.

Etapas	Métodos		
Regeneração a partir de folhas	Preparo dos explantes	Meio de indução de calos	Meio de indução de gemas
	<ul style="list-style-type: none"> - Folhas retiradas das partes superiores das gemas cultivadas em meio de multiplicação; - Divisão das folhas em segmentos; 	<ul style="list-style-type: none"> - 2 períodos de 15 dias em meio MSM (Anexo 4) contendo 0,1 μM de ANA e 1,0 μM de TDZ; sacarose 30 g.L^{-1} - 15 dias de cultivo no escuro; - 15 dias sob proteção de sombrite (50%) 	<ul style="list-style-type: none"> - 2 períodos de 15 dias em meio MSM (Anexo 4) contendo 0,67 μM de ANA e 1,11 μM de BAP; sacarose 30 g.L^{-1} - Cultivo sob condições de luz.
Alongamento e enraizamento	Preparo do material vegetal	Meio de alongamento	Meio de enraizamento
	<ul style="list-style-type: none"> - Subdivisão em tufos contendo 5 gemas; 	<ul style="list-style-type: none"> - MSM (Anexo 5) contendo 2,5% de carvão ativado; sacarose 30 g.L^{-1} - 28 dias de cultivo 	<ul style="list-style-type: none"> - MS/2 (Anexo 1) sem reguladores vegetais; sacarose 20 g.L^{-1} - 15 dias no escuro; - 13 dias sob condições de luz;
Aclimatização	Preparo do material vegetal	Substrato utilizado	Cultivo em casa-de-vegetação
	<ul style="list-style-type: none"> - Plantas enraizadas são lavadas em água corrente; 	<ul style="list-style-type: none"> - Plantmax[®] HT. 	<ul style="list-style-type: none"> - 15 dias sob nebulização - 15 dias sem nebulização e irrigação manual.

3.5 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos nas condições experimentais estabelecidas nesta pesquisa, podemos concluir que:

- O genótipo de *E. saligna* utilizado apresentou um comportamento responsivo na indução da organogênese nos tecidos estudados e nas demais etapas da micropropagação. Esta resposta possibilitou a obtenção de um protocolo de regeneração de plantas a partir de uma metodologia simples e permitiu resultados satisfatórios para a espécie *E. saligna*;
- Foi verificada influência do BAP na multiplicação de gemas e do TDZ na indução de organogênese indireta a partir de explantes foliares;
- O genótipo utilizado apresentou aptidão para o enraizamento de microestacas em meio de cultura isento de reguladores vegetais;
- As informações apresentadas servirão de base para futuras pesquisas referentes à otimização de protocolos de regeneração e micropropagação para outros genótipos da espécie.

3.6 REFERÊNCIAS

- ALVES, E. C. S. C.; XAVIER, A.; OTONI, W. C. Organogênese de explante foliar de clones de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, p. 421-430, 2004.
- BARRUETO CID, L. P.; MACHADO, A. C. M.; CARVALHEIRA, S. 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 Forestry Research**, v. 12, p. 121–127, 1982.
- BUNN, E. Development of *in vitro* methods for *ex situ* conservation of *Eucalyptus impensa*, an endangered mallee from southwest Western Australia. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 83, p. 97-102, 2005.
- CORREIA, D. **Crescimento e desenvolvimento de gemas na multiplicação de *Eucalyptus spp.* em meio de cultura líquido e sólido.** (Dissertação - Mestrado), Piracicaba: USP/ESALQ, 1993,113p.
- CORREIA, D.; GONÇALVES, A.N.; COUTO, H.T.Z. do; RIBEIRO, M.C. Efeito do meio de cultura líquido e sólido no crescimento e desenvolvimento de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* na multiplicação *in vitro*. **IPEF**, v. 48/49, p.107-116, 1995.
- 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. S.; QUOIRIN, M. Plant regeneration from cotyledonary explants of *Eucalyptus camaldulensis*. **Scientia Agrícola**, v. 62, p. 406-412, n. 4, 2005.
- FANTINI JUNIOR, M. e GRAÇA, M. E. C. Propagação *in vitro* de *Eucalyptus saligna*. In: 6º Congresso Florestal Brasileiro, Campos do Jordão. Anais. São Paulo: **Sociedade Brasileira de Silvicultura**, p. 373-378, 1990.
- 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.
- GONZÁLES, E.R.; ANDRADE, A.; BERTOLO, A.L.; LACERDA, G.C.; CARNEIRO, R.T.; DEFÁVARI, V.; VENEZIANO LABATE, M.; LABATE, C.A. Production of transgenic *Eucalyptus grandis* x *urophylla* using the sonication-assisted *Agrobacterium* transformation (SAAT) system. **Functional Plant Biology**, v. 29, p. 97-102, 2002.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP/Embrapa- CNPH, p. 433, 1998.

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, 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.

ITO, K.; DOI, K.; TATEMACHI, Y.; SHIBATA, M. Plant regeneration of *Eucalyptus* from rotating nodule cultures. **Plant Cell Reports**, v. 16, p. 42-45, 1996.

KAPOOR, M. L.; CHAUHAN, M. S. *In vitro* clonal propagation of mature *Eucalyptus* F1 hybrid (*E. torelliana* F. V. Muell x *E. citriodora* Hook.) **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 46, n.6, p.143-147, 1992.

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. **Journal of Horticultural Science**, Bangalore, v.26, n.5, p.199-200, 1991.

MARGARA, J. Bases de la multiplication végétative. Paris: **Institut National de la Recherche Agronomique**, p. 60, 1982.

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

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

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

PARTHIBAN, K. T.; VANANGAMUDI, M.; SURENDRAN, C.; BALAJI, S. Calogenesis and organogenesis in *Eucalyptus tereticornis*. **Journal of Forestry**, v. 22, p. 101-105, 1999.

RODRIGUES, A.P.M.; VENDRAME, W.A. Micropropagation of tropical woody species. In: JAIN, S.M.; ISHII, K. (Ed.) **Micropropagation of woody trees and fruits**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p.153-179, 2003.

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

SUBBIAH, 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. Optimised plant regeneration from callus derived from seedling hypocotyls of *Eucalyptus urophylla*. **Plant Science**, v.110, p.139-145, 1995.

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

WARRAG, E.; LESNEY, M. S.; ROCKWOOD, D. J. Nodule culture and regeneration of *Eucalyptus grandis* hybrids. **Plant Cell Reports**, v. 9, p. 586-589, 1991.

4 TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE *Eucalyptus saligna* COM O GENE *P5CSF129A* VIA *Agrobacterium tumefaciens*

RESUMO

No Brasil, especialmente na região Sul, o estresse causado pelo frio e eventuais geadas afeta de forma negativa a produtividade de *Eucalyptus* spp. A engenharia genética representa uma estratégia promissora para aumentar a capacidade das plantas em tolerar este tipo de estresse. Uma das vias para atingir tal tolerância ao frio consiste no aumento da síntese de prolina nas células da planta. O objetivo desta pesquisa foi investigar alguns parâmetros que afetam a transformação de plantas de *Eucalyptus saligna* via *Agrobacterium tumefaciens* visando a inserção do gene mutante *P5CSF129A* de *Vigna aconitifolia*, que codifica um mutante da enzima chave P5CS (Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato sintetase) de maneira a incrementar a síntese do aminoácido L-prolina nesta espécie. Folhas jovens foram utilizadas como explantes e inoculadas em solução bacteriana da cepa EHA105 de *Agrobacterium tumefaciens* contendo o vetor binário pBI121-*P5CS129A*. Este vetor contém o gene marcador *GUS* e o gene *P5CSF129A* controlados pelo promotor constitutivo CaMV 35S e o gene *NPTII* que confere resistência ao antibiótico canamicina. Análises histoquímicas comparativas foram realizadas para investigar o efeito do tipo de explante (folhas inteiras ou segmentos foliares), do tempo de duração da co-cultura (3 e 5 dias) e da densidade ótica da solução bacteriana (DO_{600nm}) (0,25; 0,5 e 1) na expressão transiente do gene *GUS*. Segmentos foliares (meia folha), co-cultivados durante 5 dias após a inoculação em solução bacteriana de $DO_{600nm}=0,5$, proporcionaram as melhores respostas de expressão transiente do gene *GUS* e este tratamento foi utilizado para a transferência do gene de interesse. A co-cultura foi realizada no escuro em meio MSM contendo 0,1 μM de ANA e 1,0 μM de TDZ. Após, os explantes foram transferidos para o mesmo meio contendo 500 $mg.L^{-1}$ de cefotaxima (Cx) e 50 $mg.L^{-1}$ de canamicina (Km) por dois períodos de 28 dias e em seguida a concentração de Cx foi reduzida para 250 $mg.L^{-1}$. Os calos que se formaram nos explantes foliares foram transferidos para o meio MSM contendo 0,67 μM de ANA e 1,11 μM de BAP por mais 28 dias sob condições de luz para a indução de gemas. Estas foram transferidas para o meio MS contendo 1,45 μM de GA_3 durante 14 dias e, finalmente, para o meio de multiplicação contendo 1,11 μM de BAP. A expressão estável do gene *GUS* foi confirmada nestas gemas pelo teste histoquímico para a β -glucuronidase, e a transformação genética por PCR seguido de Southern blot. A eficiência da transformação foi de 0,5% (1/200 explante transformado/explantes inoculados). O nível de prolina foi medido no evento e em plantas não transformadas e apresentou um aumento de quatro vezes em comparação com o controle, confirmando o incremento na biossíntese de prolina.

Palavras-chave: melhoramento genético, espécies florestais, estresse abiótico, prolina.

4 *Agrobacterium tumefaciens*-MEDIATED GENETIC TRANSFORMATION OF *Eucalyptus saligna* WITH *P5CSF129A* GENE

ABSTRACT

In Brazil, especially in the Southern region, stresses caused by cold and eventual frost are those that exert the most negative effect on the productivity of *Eucalyptus* spp. Genetic engineering represents a promising strategy to increase the capacity of the plants in tolerating stress caused by low temperatures. One of the possibilities to improve this tolerance is to increase the level of proline synthesis in the plant cells. The purpose of this research was to investigate some parameters affecting *Agrobacterium*-mediated gene transfer and to obtain plants of *Eucalyptus saligna* expressing the *P5CSF129A Vigna aconitifolia* mutant gene that encodes a mutant of key-enzyme P5CS (Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase) in order to increase proline biosynthesis in plants of this species. Young leaves from micropropagated plants maintained *in vitro* were used as explants and inoculated with strain EHA105 containing the binary vector *pBI121-P5CSF129A* with the *GUS* and *P5CS* genes both under the control of the CaMV 35S promoter, and *NPTII* selection gene. Histochemical analyses of *GUS* expression were made in order to investigate the effect of leaf explant type (entire and half leaves), duration of co-culture (3 and 5 days) and optical density of bacterial concentration (OD_{600nm}) (0.25; 0.5 and 1) on transformation efficiency. Half leaves inoculated in a bacterial solution of $OD_{600nm} = 0.5$ for 30 min and co-cultured for five days gave the best results of transient expression. This treatment was then used in all the experiments of transformation. Co-culture was done in the dark on MSM culture medium supplemented with 0.1 μM NAA and 1.0 μM TDZ. The explants were then transferred to the same medium containing 500 $mg.L^{-1}$ cefotaxime (Cx) and 50 $mg.L^{-1}$ kanamycin (Km) for two 28-day-periods and then the Cx concentration was reduced to 250 $mg.L^{-1}$. The calli that appeared on leaf explants were transferred on MSM medium containing 0.67 μM NAA and 1,11 μM BAP and cultured under light for another 28 days period. Shoots were cultured on MSM medium with 1.45 μM GA₃ for 14 days and finally on MSM medium containing 1.11 μM BAP for shoot multiplication. The *GUS* expression was confirmed by histochemical test for β -glucuronidase. The presence of the transgene in the plant genome was demonstrated by PCR and Southern blot analysis. Transformation efficiency was 0.5% (1/200 transformed explant). Proline level was measured in the event and in not transformed plants and showed a four times enhanced production in comparison with control.

Key-words: genetic breeding, forestry species, abiotic stress, proline.

4.1 INTRODUÇÃO

As espécies florestais são de grande importância para a economia, porque oferecem diversos produtos, como madeira para construções, biomassa para produção de polpa de celulose e de papel e como fonte de energia industrial, assim como uma série de subprodutos para a indústria de cosméticos, farmacêutica e alimentícia, entre outros. No Brasil, as plantações florestais são compostas, sobretudo, por espécies, híbridos e clones de *Eucalyptus* spp e de *Pinus* spp (MORA e GARCIA, 2000). Atualmente, o país possui a maior área plantada de eucaliptos do mundo (mais de 3 milhões de hectares). De acordo com a Sociedade Brasileira de Silvicultura (2006), o Brasil é o maior produtor mundial de celulose (cerca de 6,3 milhões de toneladas por ano). As indústrias brasileiras que usam o eucalipto como matéria prima para a produção de papel, celulose e demais derivados representam 4% do Produto Interno Bruto, 8% das exportações e geram aproximadamente 150 mil empregos.

No Brasil, especialmente na região Sul, os estresses causados pelo frio e eventuais geadas são os que mais influenciam de forma negativa a produtividade de *Eucalyptus* spp (HIGA et al., 1994). Os programas de melhoramento genético florestal são dificultados pela altura dos indivíduos, que implica na dificuldade de manter controle sobre processos de polinização e fecundação, pela complexidade da análise dos descendentes após os cruzamentos e retrocruzamentos, pela necessidade da disponibilidade de uma grande área para as pesquisas e pelo longo ciclo de crescimento das árvores até atingirem a maturidade sexual (TZFIRA et al., 1998, DANDEKAR et al., 1993). Tendo em vista estes inconvenientes, as técnicas de transformação genética tornaram-se uma importante ferramenta na obtenção de plantas expressando genes de interesse em um curto período de tempo, além do fato destas plantas poderem ser utilizadas em estudos moleculares de e expressão dos genes, assim como em estudos fisiológicos (HANSEN e WRIGHT, 1999).

Atualmente, diferentes características de interesse sócio-econômico já foram introduzidas em diversas espécies de plantas por transformação genética via co-cultura com *Agrobacterium* spp. ou por métodos diretos. Essas características visam, por exemplo, o melhoramento do desempenho em campo das plantas cultivadas

pela inserção de genes exógenos que conferem resistência a estresses bióticos e abióticos (GUIMARÃES et al., 2003). As pesquisas voltadas ao gênero *Eucalyptus* incluem estudos referentes ao isolamento e inserção de genes que permitam modificação nas rotas metabólicas da biossíntese da celulose e hemicelulose e também para o aumento da biomassa em um espaço de tempo reduzido. Estudos visando a resistência a estresses abióticos e bióticos, tais como tolerância à seca, frio e salinidade, resistência a insetos, herbicidas e pragas, solos ácidos e fitorremediação são exemplos de pesquisas em engenharia genética com aplicações para as espécies plantadas de eucalipto (GUIMARÃES et al., 2003).

Dentre os métodos de transformação existentes, a transferência de genes via *A. tumefaciens* é o mais utilizado, sobretudo pelo baixo custo, quando comparado ao método biobalístico. Para que o método de transformação seja eficiente, além da definição prévia de um protocolo de regeneração a partir do tecido vegetal escolhido, o estudo dos principais fatores relacionados ao vetor e ao seu cultivo isoladamente e em conjunto com o tecido vegetal é imprescindível para a obtenção dos transformantes. De acordo com a literatura, vários são os fatores que podem influenciar a transformação genética via *A. tumefaciens*. Entre eles, podem ser destacados: o genótipo da planta, a idade do explante, a presença de compostos fenólicos produzidos pela planta, a cepa bacteriana utilizada, os tratamentos dados aos explantes antes da infecção, a composição do meio de cultura e presença de reguladores vegetais, a idade do explante, entre outros (DE BONDT et al., 1994; SRISKANDARAJAH e GOODWIN, 1998).

Os objetivos deste estudo foram otimizar a transformação genética em *E. saligna* via *A. tumefaciens* e obter plantas desta espécie expressando o gene mutante *P5CSF129A*.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Otimização da transformação genética via *A. tumefaciens* em *E. saligna*

4.2.1.1 Local de realização dos experimentos

Os experimentos de transformação genética foram conduzidos no Laboratório de Micropropagação de Plantas do Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo do Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná (CQB 114/99). As análises moleculares e bioquímicas foram conduzidas no Laboratório de Biotecnologia Vegetal do Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR), Londrina-PR (CQB 059/98).

4.2.1.2 Material vegetal, meios de cultura e condições de cultura

Os explantes foliares foram retirados de brotações de um clone obtido por regeneração a partir de folhas cultivadas durante 15 dias em meio de cultura MSM contendo $1,11 \mu\text{M}$ de BAP, 30 g.L^{-1} de sacarose e 7 g.L^{-1} de ágar (Vetec[®]).

Foram escolhidas folhas jovens das brotações superiores durante o 5^o subcultivo; dois tipos de explantes foram utilizados: 1) Folhas inteiras: excisadas na base do pecíolo; 2) Segmentos foliares: folhas cortadas em duas metades no sentido transversal.

Para ambos os tipos de explantes, a inoculação em meio de co-cultivo foi realizada sem a padronização da face que permaneceu em contato com o meio de cultura.

O meio de cultura de base para todos os experimentos descritos neste capítulo foi o MSM (Anexo 8) contendo 30 g.L^{-1} de sacarose, 7 g.L^{-1} de ágar (Vetec[®]) e os reguladores vegetais ANA e TDZ nas concentrações de $0,1 \mu\text{M}$ e $1,0 \mu\text{M}$, respectivamente. O pH foi ajustado a 5,8 e o meio foi autoclavado durante 20 min a 120°C .

As culturas foram mantidas em sala de crescimento sem luz a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ até a última amostragem coletada para a análise dos dados, que ocorreu no 12º dia após a transformação.

4.2.1.3 Cepa bacteriana e vetor binário

A cepa EHA105 de *Agrobacterium tumefaciens*, pertencente ao grupo de opina succinamopina (Hood et al., 1993), contendo o vetor binário pBI121-*P5CSF129A* (Hong et al., 2000), foi utilizada para a transformação de *E. saligna*. Este vetor contém o gene marcador *GUS*, o gene mutante *P5CS* de *V. aconitifolia*, ambos sob controle do promotor constitutivo CaMV 35S, e o gene marcador de seleção *NPTII*, sob controle do promotor do gene *NOS*. O gene *P5CS* foi modificado para impedir a retroinibição da síntese da prolina, e denominado *P5CSF129A*.

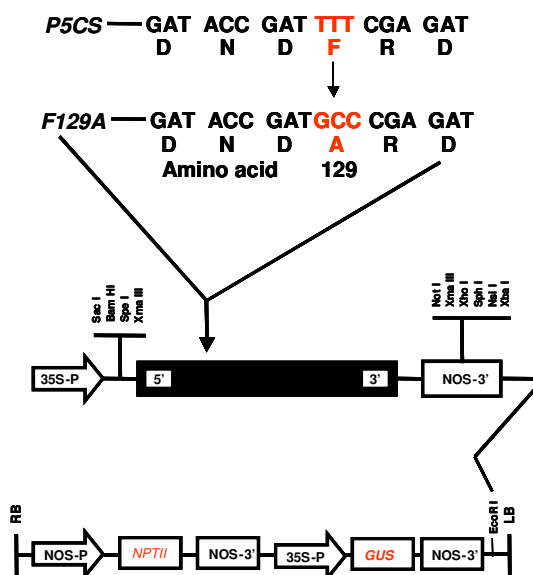


Figura 7 – Região T do plasmídeo pBI121 utilizado na transformação genética de *Eucalyptus saligna*. Construção gênica *P5CSF129A* modificada (Zhang et al., 1995) para conferir a inibição do feedback da prolina onde *P5CS* é o gene de *Vigna aconitifolia*; *NPTII*, gene que codifica a neomicina fosfotransferase; *GUS*, gene que codifica a β -glucuronidase; NOS-P, promotor do gene da nopalina sintetase da *A. tumefaciens*; 35S-P, promotor constitutivo do vírus do mosaico da couve-flor; NOS-3', terminador do gene da nopalina sintetase da *A. tumefaciens*; RD, borda direita do T-DNA; LB, borda esquerda do T-DNA.

4.2.1.4 Condições de crescimento bacteriano

O cultivo da bactéria foi realizado em placas de Petri contendo o meio de cultura YEB sólido (MILLER, 1972) (Anexo 9) suplementado com os antibióticos de seleção Km (50 mg.L⁻¹) e Rif (25 mg.L⁻¹) e incubadas durante 48 h à temperatura de 28°C. Em seguida, colônias isoladas foram cultivadas no mesmo meio, líquido, por 24 h.

A suspensão celular foi centrifugada a 5.000 rpm por 10 min., seguida da ressuspensão do precipitado em meio de cultura MSM líquido (Anexo 4) por meio de diluição até a obtenção dos valores de DO_{600nm} utilizados nos experimentos.

4.2.1.5 Condições gerais de inoculação, co-cultura e cultura dos explantes

Os explantes foram inoculados em solução bacteriana e incubados por um período de 30 min. Em seguida, foram secos em papel filtro estéril e co-cultivados em meio de cultura MSM contendo 0,1 µM de ANA e 1,0 µM de TDZ (Anexo 8).

Ao final do período de co-cultura, os explantes foram transferidos para o mesmo meio acrescido de 500 mg L⁻¹ de Cx e 50 mg.L⁻¹ de Km para a eliminação da *A. tumefaciens* e seleção das células transformadas (Anexo 8). As placas de Petri contendo os explantes foram mantidas no escuro a 25 ± 2°C por um período de 15 dias.

4.2.1.6 Efeito do tipo de explante, da duração da co-cultura e da densidade ótica da solução bacteriana (DO_{600nm}=1,0) na expressão transiente do gene *GUS*

Os experimentos foram os seguintes:

1) Comparação entre dois tipos de explante (folhas inteiras e segmentos foliares) inoculados em solução bacteriana de DO_{600nm} = 1,00 e de dois tempos de co-cultura (3 e 5 dias);

2) Comparação entre três soluções bacterianas com DO_{600nm} de 0,25, 0,50 e 1,00.

Nos dois experimentos, o controle consistiu de explantes não inoculados em solução bacteriana e cultivados em meio de regeneração. A primeira coleta das amostras para o teste histoquímico foi realizada após o período de co-cultura de 5 dias e a segunda coleta foi realizada após 7 dias de cultivo dos explantes em meio seletivo contendo 500 mg.L^{-1} de Cx e 50 mg.L^{-1} de Km, ou seja, 12 dias após a inoculação.

4.2.1.7 Delineamento experimental

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com quatro repetições por tratamento e 50 explantes por unidade experimental. Os valores utilizados foram as médias e o desvio padrão obtidos entre as variáveis analisadas visualmente com relação à expressão do transiente do gene *GUS* em explantes foliares de *E. saligna*.

4.2.1.8 Análise histoquímica da β -glucuronidase

Com o intuito de observar a expressão do gene *GUS* por reação catalisada pela β -glucuronidase na presença de X-gluc (JEFFERSON, 1987), 10 explantes de cada tratamento foram imersos em solução composta por 10 mM de $\text{Na}_2\text{EDTA.H}_2\text{O}$, 0,1% de Triton X-100, 0,1 mM de NaH_2PO_4 , 0,5 mM de $\text{K}_4\text{Fe(CN)}_6$ e $250 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de X-gluc e incubados a 37°C por um período de aproximadamente 16 h. Após o período de reação, os explantes foram transferidos para solução de F.A.A. composta de formaldeído (10 ml/100 ml) + ácido acético (5 ml/100 ml) + etanol 50% (85 ml/100 ml) durante 1h para eliminação da clorofila e em seguida para etanol 70% para conservação.

Para a determinação visual da expressão transiente da enzima β -glucuronidase, considerou-se como resultado positivo todo e qualquer tecido que apresentou uma ou mais regiões com a coloração azul. As amostras foram analisadas visualmente de acordo com as seguintes variáveis: porcentagem de explantes expressando o gene *GUS*, número médio de manchas azuis por explante, local de expressão e porcentagem da área do explante de cor azul.

4.2.2 Transformação genética em *E. saligna* com o gene *P5CSF129A*

4.2.2.1 Material vegetal e condições de inoculação

As folhas foram retiradas das brotações do clone selecionado, divididas em segmentos foliares no sentido transversal e os explantes imersos na solução bacteriana de $DO_{600nm} = 0,5$ por um período de 30 min. Em cada ensaio foram utilizadas quatro repetições (placas de Petri de 10 cm de diâmetro e 2 cm de altura) e 50 segmentos foliares por repetição. O tratamento controle consistiu no cultivo de segmentos foliares em meio de regeneração sem antibióticos seletivos (Anexo 8).

4.2.2.2 Condições de co-cultura e seleção das células transformadas

Após o período de inoculação, os segmentos foliares foram secos em papel filtro estéril e co-cultivados durante cinco dias em placas de Petri contendo o meio de cultura MSM contendo $0,1 \mu\text{M}$ de ANA e $1,0 \mu\text{M}$ de TDZ (Anexo 8). Após este período, os explantes foram transferidos para o meio seletivo com a mesma formulação do meio de co-cultura acrescido de 500 mg.L^{-1} de Cx e 50 mg.L^{-1} de Km (Anexo 8). Foram mantidos por 2 períodos de 28 dias nesse mesmo meio de cultura e então transferidos para o mesmo meio com a concentração de Cx reduzida para 250 mg.L^{-1} por mais 28 dias (Anexo 8). Em todas as etapas, os explantes foram mantidos no escuro.

4.2.2.3 Cultura de explantes resistentes a canamicina

Os calos originados durante o cultivo dos explantes em meio seletivo foram isolados e transferidos para placas de Petri contendo o meio de cultura MSM (Anexo 8) com $0,67 \mu\text{M}$ de ANA e $1,11 \mu\text{M}$ de BAP para a indução de gemas e mantidos sob condições de luz por um período de 28 dias.

4.2.2.4 Multiplicação das gemas

O material vegetal que exibiu início de formação de ápices caulinares foi transferido para MSM (Anexo 8) contendo $1,45 \mu\text{M}$ de GA_3 durante 14 dias para a induzir um certo alongamento dos brotos e facilitar a separação dos mesmos. Em seguida, os brotos foram transferidos para frascos de 6 cm de diâmetro e 9 cm de altura contendo o mesmo meio de cultura adicionado de $1,11 \mu\text{M}$ de BAP para a multiplicação das gemas (Anexo 8). Várias subculturas foram realizadas a cada 15 dias até a obtenção de material vegetal em quantidade suficiente para as etapas de micropropagação e testes subseqüentes.

4.2.2.5 Alongamento e enraizamento das brotações

Para o alongamento das brotações foi utilizado o meio de cultura MSM com 30 g.L^{-1} de sacarose, 2,5% de carvão ativado, 7 g.L^{-1} de ágar (Vetec[®]) (Anexo 5). Tufos de gemas foram divididos em tufos menores com aproximadamente 5 gemas por tufo e repicados nos meios de cultura.

Para o enraizamento foi utilizado o meio de cultura MS/2 com 20 g.L^{-1} de sacarose e 7 g.L^{-1} de ágar (Vetec[®]) (Anexo 1). As brotações foram divididas em microestacas de 1,5 cm com a área foliar reduzida e transferidas no meio de cultura. O material vegetal foi mantido no escuro por 15 dias e depois deste período, transferido para a luz por mais 13 dias.

4.2.2.6 Aclimatização

Para a aclimatização das mudas, foram utilizadas as plantas enraizadas de tamanho médio de 3 cm, As plantas foram retiradas dos frascos, lavadas em água corrente para a retirada de resíduos de meio de cultura e em seguida transplantadas em tubetes de polipropileno de 40 mm de diâmetro e 125 mm de altura, preenchidos com aproximadamente 50 cm^3 do substrato Plantmax HT[®].

As plantas foram transferidas para a casa-de-vegetação sem nebulização, na qual permaneceram por mais 120 dias recebendo irrigação manual a cada 2 dias.

4.2.3 Análises moleculares da integração do transgene *P5CSF129A* em plantas de *E saligna*

4.2.3.1 Material vegetal e extração de DNA

A extração do DNA genômico para as análises da integração do transgene foi realizada de acordo com a metodologia de Doyle e Doyle (1987). Foi utilizado aproximadamente 1 g de material vegetal (folhas jovens provenientes de plantas putativas e de plantas controle após 120 dias de condução em casa-de-vegetação).

4.2.3.2 Análises da integração do transgene

A análise das plantas transformadas foi realizada por reação em cadeia da polimerase (PCR) para detectar a presença do transgene *P5CS*.

Cada reação (20 μ L) continha 20 mM de Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM de KCl, 3 mM de $MgCl_2$, 100 μ M de cada dNTP, 1,0 U de *Taq* polimerase, 50 ng de DNA e 5 μ M de cada oligonucleotídeo (primers: 5'AGCAACTCAACTCTCTCGGA-3' e 5'-CCACTCTAGACTTGTCGCCA-3') específicos para o gene *P5CSF129A*. As amostras foram submetidas ao seguinte programa de temperaturas em termociclador PTC-100TM (MJ Research, Waltham, MA, U.S.A), para a amplificação do fragmento *P5CSF129A*: 94° por 4 min, seguido de 32 ciclos de amplificação a 94° por 1 min, 52° por 45 s, 72° por 45 s, 72° por 5 min e 4° até o momento da aplicação no gel. Os produtos das reações de PCR foram aplicados em gel de agarose 0,8% (p/v) contendo 0,5 μ g de brometo de etídeo e, após eletroforese em tampão SB 1X (BRODY e KERN, 2004), foram visualizados sob luz UV.

Para análise de Southern blot, 20 μ g de DNA genômico do evento transgênico e controle foram incubados com a enzima de restrição *HindIII* a 37°C por 16 horas. As amostras foram então submetidas à eletroforese em tampão SB 1X em gel de agarose 0,8% (p/v), corado com brometo de etídeo a 1% (v/v), a 2 V/cm por 16 h. Após a eletroforese, o DNA foi transferido por capilaridade à membrana de Nylon (Hybond-N⁺ Amersham Pharmacia Biotech, PI, EUA) e fixado mediante incubação a 80° C por duas horas (SAMBROOK; MANIATIS, 1989).

Para a confirmação da integração dos transgenes *P5CSF129A* e *GUS* no genoma de *E. saligna*, foram realizados dois testes de Southern blot. O primeiro teste foi realizado com a seqüência de DNA de aproximadamente 1,6 Kb obtido a partir da digestão do plasmídeo pBI121-*P5CSF129A* com a enzima *Xba*I. No segundo teste, utilizou-se como sonda fragmento de PCR de 519 pb referentes à posição interna do gene *GUS*. As sondas foram marcadas utilizando $\alpha^{32}\text{P}$ d-CTP pela técnica de "random priming". Após a hibridização, procederam-se duas lavagens a 42°C com soluções de 2% de SSC e 0,1% de SDS e duas lavagens com soluções de 0,1% de SSC e 0,1% de SDS, também a 42°C. Após as lavagens, as membranas foram expostas a placas de sensibilização por 1 h e as imagens capturadas pelo sistema FLA-3000 FUJIFILM.

4.2.4 Determinação da massa fresca total e do teor de prolina na parte aérea e raiz em plantas controle e plantas transformadas com *P5CSF129A*

Para a determinação da massa fresca total (g), tanto da parte aérea quanto da raiz, foram utilizadas quatro plantas controle e quatro plantas transformadas. Em ambos os tratamentos, as plantas apresentavam 120 dias de idade e foram cultivadas sob condições normais de crescimento em casa-de-vegetação. A determinação da concentração de prolina foi realizada conforme protocolo descrito por Bates et al. (1973). Como a concentração deste aminoácido varia conforme o estágio de desenvolvimento das folhas, foi necessária a utilização de material vegetal de mesma idade e tamanho, portanto padronizou-se a utilização de material vegetal correspondente ao 2º par de folhas localizadas a partir do ápice das plantas. Para a coleta de tecido radicular, foi padronizada a utilização de material vegetal correspondente a região do ápice radicular. Foram coletados 100 mg de material vegetal por amostra, rapidamente congelado e macerado em N₂ líquido. A extração foi feita com adição de ácido sulfosalicílico (3%) e, em seguida, o extrato foi centrifugado (7.500 rpm por 2 min). Foram coletados 2 ml do sobrenadante e acrescentados 2 ml da solução de ácido ninhídrico (1,25 g de ninhidrina; 30 ml de ácido acético glacial; 20 ml de ácido fosfórico 6 M) e 2 ml de ácido acético glacial em tubos de microcentrífuga de 15 ml. As amostras foram então incubadas a 100°C

por 1 h e, em seguida, transferidas para gelo até esfriarem. Em seguida, as amostras foram acrescidas de 4 ml de tolueno e homogeneizadas por 20 s para completa extração de prolina. O sobrenadante foi utilizado para a determinação da concentração de prolina por espectrofotometria (Abs_{520nm}).

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Otimização da transformação genética via *A. tumefaciens* em *E. saligna*

4.3.1.1 Efeito do tipo de explante e tempo de co-cultura

Os resultados da expressão transiente do gene *GUS* são apresentados nas Figuras 8 e 9 e Anexos 10 e 11.

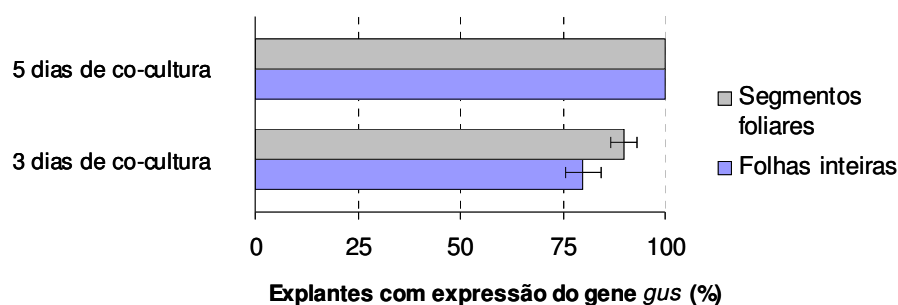


Figura 8 - Expressão do gene *GUS* em dois tipos de explantes foliares de *E. saligna* inoculados com *A. tumefaciens* após 3 e 5 dias de co-cultura.

Para ambos os tipos de explantes, os maiores valores das variáveis analisadas foram obtidos após 5 dias de co-cultura, sendo o gene *GUS* expresso em 100% dos explantes avaliados (Figura 8 e Anexo 10).

Resultados similares foram observados por Tournier et al. (2003) para o híbrido *E. grandis* x *E. urophylla*. Estes autores observaram 100% de expressão transiente do gene *GUS* nos explantes transformados com a cepa AGL1 contendo o plasmídeo pTiBo542 e o promotor CaMV 35S após 6 dias de co-cultura em solução bacteriana de $DO_{600nm}=0,50$. Em outro trabalho, Spokevicius et al. (2005) utilizaram como explantes segmentos caulinares de *E. globulus* inoculados em solução bacteriana preparada com a cepa de *Agrobacterium* AGL1 contendo o plasmídeo pCAMBIA1305.1, sob controle do promotor CaMV 35S. Estes autores relatam que a maior frequência de expressão da atividade do gene *GUS* foi observada após um período de co-cultura de 6 dias. Em explantes cotiledonares de *E. globulus*

transformados com o gene *GUS*, Moralejo et al. (1998) verificaram a expressão estável 30 dias após infecção por *Agrobacterium*. Segundo estes autores, a co-cultura por um período de 6 dias proporcionou bons resultados para a expressão do gene, sendo que a mesma ocorreu nas regiões do explante com potencialidade para a divisão celular, o que de fato permitiria uma maior probabilidade de seleção de células transformadas e iniciação dos processos organogênicos a partir das mesmas.

Com relação à área foliar ocupada pelas manchas azuis, valores diferentes foram observados de acordo com a duração da co-cultura. Para as folhas inteiras, 50% dos explantes tiveram coloração azul em 51 a 100% da área foliar e, nas folhas divididas à metade, 40% destas expressaram estes valores após 5 dias de co-cultura (Anexo 10). Após 7 dias da transferência dos explantes para o meio seletivo, o gene *GUS* permaneceu expresso em 50 % dos explantes em ambos os tipos de preparo quando submetidos a 5 dias de co-cultura (Figura 9, Figura 10C e 10F e Anexo 11).

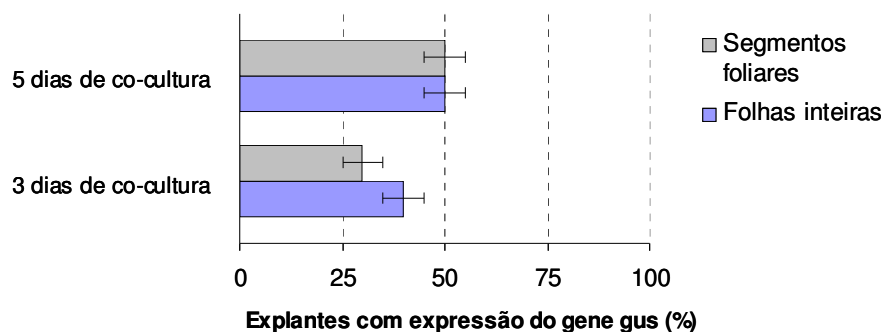


Figura 9 - Expressão do gene *GUS* em explantes foliares de *E. saligna* co-cultivados com *A. tumefaciens* por 3 e 5 dias seguidos de 7 dias em meio seletivo contendo 500 mg.L^{-1} de Cx e 50 mg.L^{-1} de Km.

Nas folhas inteiras, ocorreu intensa expressão da atividade do gene *GUS*, sendo que na maioria das vezes, os explantes apresentavam-se totalmente azuis após o período de co-cultura e, inclusive, uma forte expressão nos tecidos vasculares foi freqüentemente observada (Figura 10B). Porém, após 7 dias no meio seletivo, a expressão do gene não era mais aparente e permaneceu visível somente

em algumas áreas, no lugar do corte e em regiões com ferimentos aleatórios ocorridos durante o preparo dos explantes (Figura 10C). Com relação à área apresentando expressão do gene *GUS*, em 40% dos explantes representados por folhas inteiras, em ambos os tempos de co-cultura, 40% dos explantes analisados apresentaram de 0 a 5% da área com manchas azuis. (Anexo 11). Resultados similares de expressão nos tecidos vasculares foram observados por Costa et al. (2000) quando analisaram a expressão transiente do gene *GUS* utilizando o vetor binário pBI121 sob controle do promotor constitutivo CaMV 35S na transformação de folhas de *Lycopersicon esculentum*. Em outro trabalho, Spokevicius et al. (2005) compararam períodos de co-cultura dos explantes entre 2 e 7 dias. De acordo com a literatura, a duração da co-cultura para *Eucalyptus* spp. é muito variável. Alguns autores recomendam 3 dias (HO et al., 1998; MULLINS et al., 1997; GONZÁLES, 2002), outros 4 dias (ESMERALDO et al., 1997; VALÉRIO et al., 2003), 5 dias (TOURNIER et al., 2003; MACHADO et al., 1997) ou 6 dias (MORALEJO et al., 1998).

A utilização de folhas inteiras como explantes para a transformação tornou-se inviável para a continuidade das pesquisas de transformação genética devido ao fato de não ter sido realizado um estudo para determinar as condições de regeneração para este tipo de explante. Já para os segmentos foliares, a expressão foi intensa nas regiões de corte e na base do pecíolo após a co-cultura e 7 dias em meio seletivo (Figura 10 B e C).

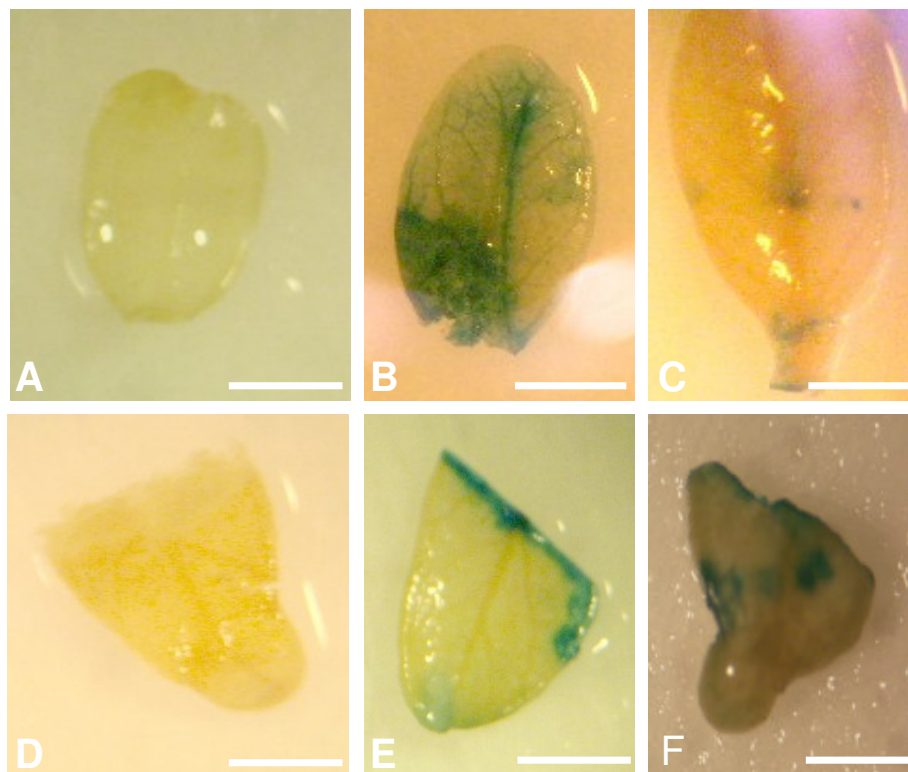


Figura 10 - Expressão transiente do gene *GUS* em folhas e segmentos foliares de *E. saligna* após 5 dias de co-cultura em $OD_{600nm} = 1,00$ e após 7 dias em meio seletivo. (A) Folha não inoculada; (B) Folha exibindo expressão do gene *GUS* após 5 dias de co-cultura; (C) Folha exibindo expressão do gene *GUS* na base do pecíolo após 7 dias em meio seletivo; (D) Segmento foliar não inoculado; (E) Segmento foliar exibindo expressão do gene *GUS* na região do corte após 5 dias de co-cultura; (F) Segmento foliar exibindo manchas de expressão do gene *GUS* após 7 dias de co-cultura. Barras = 2mm.

Nestas regiões, após 5 dias de co-cultura, houve maior frequência de pequenas manchas isoladas em 50% dos explantes observados (Anexo 11 e Figura 10E). Considerando que um protocolo de regeneração já estava disponível para este tipo de explante, segmentos foliares foram escolhidos para o teste subsequente, onde diferentes densidades óticas da solução de *A. tumefaciens* foram comparadas no intuito de aumentar a expressão do gene *GUS* nos segmentos foliares.

4.3.1.2 Comparação entre explantes inoculados em soluções bacterianas com DO_{600nm} de 0,25, 0,50 e 1,00

Os resultados da expressão do gene *GUS* em segmentos foliares inoculados com diferentes DO_{600nm} estão apresentados na Figura 11 e Anexo 12. As comparações realizadas entre explantes inoculados com soluções de *Agrobacterium* em 3 densidades óticas mostraram que os maiores valores de expressão do gene *GUS* após 5 dias de co-cultura foram obtidos com a $DO_{600nm} = 1,00$ onde 100% dos explantes apresentaram a atividade do gene (Figura 11).

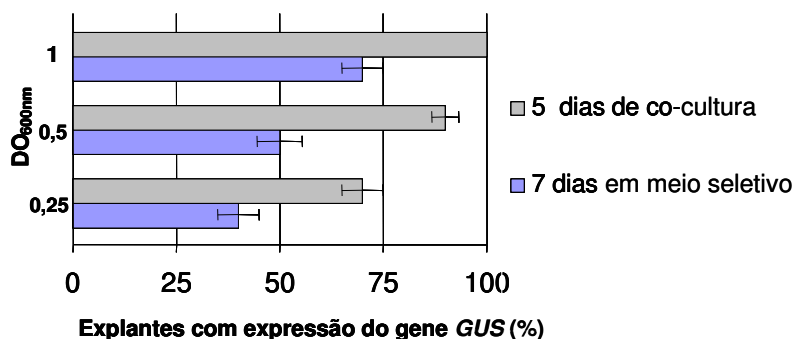


Figura 11 - Expressão do gene *GUS* em explantes foliares de *E. saligna* inoculados com *A. tumefaciens* com três densidades óticas após 5 dias de co-cultura e 7 dias em meio seletivo.

Neste tratamento correspondente a $DO_{600nm}=1,0$, foi observado que 20% dos explantes apresentaram expressão do gene *GUS* em 0 a 5% da área foliar, 30% dos explantes apresentaram expressão do gene *GUS* em 6 a 25% da área foliar, 30% em 26 a 51% e 20% em mais de 51% da área (Anexo 12). Após 7 dias em meio seletivo, a expressão foi confirmada em 70% dos explantes (Figura 11), porém a expressão foi limitada (Anexo 12) a menos de 25% do explante.

Com relação à inoculação com solução bacteriana de $DO_{600nm} = 0,50$ (Figura 11 e Anexo 12), foi observado que 50% dos explantes apresentaram expressão do gene *GUS* em 6 a 25% da área foliar, 30% dos explantes apresentaram expressão do gene *GUS* em 26 a 51% da área foliar e 10% em mais de 51% da área foliar

(Anexo 12). Após 7 dias em meio seletivo, a expressão foi confirmada em 50% dos explantes e, apesar da expressão ter sido inferior após 7 dias da transferência dos explantes para o meio seletivo, quando comparada a $DO_{600nm}=1,0$, a expressão foi predominante nos locais promissores para a divisão celular das células transformadas, ou seja, nos locais de corte e região da base do pecíolo.

Optou-se pela utilização da $DO_{600nm} = 0,50$, pelo fato da $DO_{600nm} = 1,00$ superar os valores utilizados na literatura para outras espécies de *Eucalyptus* e também por representar um fator de risco para a eliminação da *A. tumefaciens* após o período de co-cultura dos explantes. Com a utilização da solução bacteriana de $DO_{600nm} = 0,25$ (Figura 11 e Anexo 12) valores inferiores foram observados e este tratamento não foi utilizado no protocolo de regeneração de plantas visando a transformação.

4.3.2 Transformação genética em *E. saligna* com o gene *P5CSF129A*

O resultado do experimento de transformação a partir de explantes foliares de *E. saligna*, onde foram obtidos explantes exibindo indução de calos e regeneração de gemas após inoculação e sob seleção, podem ser observados na Tabela 8.

No controle, a formação de calos teve início aos 15 dias após o isolamento e aos 30 dias de cultivo constatou-se que os locais predominantes de origem dos calos foram a região onde os explantes foram cortados e a base do pecíolo. As gemas tiveram origem dos inúmeros calos de coloração verde isolados das protuberâncias formadas na base do pecíolo da região de corte após 60 dias do início do cultivo. Com relação aos explantes transformados, o processo de indução de calos ocorreu em um intervalo de tempo maior que no tratamento controle. Nos explantes controle, os calos foram induzidos em meio de regeneração após 30 dias de cultivo, já nos explantes transformados, os calos formaram-se após 90 dias (Figura 12 A e B).

No tratamento controle, a formação de calos foi de 56% enquanto que nos explantes inoculados a taxa foi de 8%. Com relação aos explantes que regeneraram gemas, os valores foram de 28% e 0,5% para os explantes inoculados e sob

seleção, respectivamente (Tabela 8). O número médio de gemas por explante foi de 15 no controle e 4 para o explante inoculado (Tabela 8).

Tabela 8 - Obtenção de calos e gemas em segmentos foliares de *E. saligna* não inoculados e após a inoculação com *A. tumefaciens* e seleção das células transformadas.

Tratamentos	Explantos formando calos (%)	Explantos regenerando gemas(%)	Nº médio de gemas por explante	Explantos oxidados (%)
Controle	56	28	15	72
Inoculado	8	0,5	4	99,5%

A porcentagem de explantes oxidados durante a indução da organogênese foi de 72% no tratamento controle enquanto que no tratamento de transformação, aproximadamente 120 dias após o início do cultivo, a taxa de mortalidade dos explantes foi de 99,5% (Tabela 8). Dos 4 explantes que formaram calos após a inoculação e cultivo em meio seletivo, 3 explantes oxidaram após a transferência para o meio de indução de gemas e apenas um explante permaneceu e induziu 4 gemas neste experimento (Tabela 8), as quais foram alongadas e multiplicadas. Estas gemas foram alongadas inicialmente num período de 14 dias em meio contendo 1,45 μM de GA_3 (Figura 12C). Após 45 dias da transferência para o meio de multiplicação contendo 1,11 μM de BAP, oito tufo com cinco gemas foram obtidos e, a cada 15 dias, foram realizadas novas subdivisões dos tufo e transferências para o meio de multiplicação para obtenção de material suficiente para os testes de PCR e Southern blot.

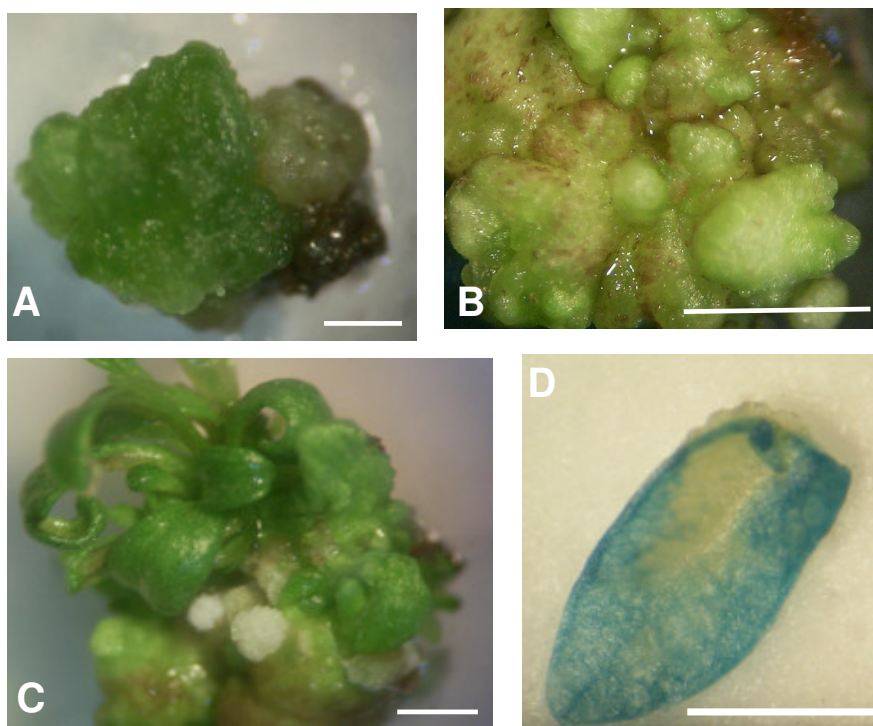


Figura 12 - (A e B) Indução de calos e gemas no segmento foliar de *E. saligna* que originou o evento 1. (A) Calos induzidos em meio seletivo MSM contendo 0,1 μM de ANA e 1,0 μM de TDZ 90 dias após a inoculação. (B) Indução de gemas em meio de cultura MSM contendo 0,67 μM de ANA e 1,11 μM de BAP. (C) Indução do alongamento das gemas após 14 dias em meio de cultura MSM contendo 1,45 μM de GA_3 . (D) Expressão estável do gene *GUS* em folha do evento 1 após a fase de multiplicação. Barras = 2 mm.

Em estudos de transformação em *Vitis* spp. (LOWE e KRUL, 1991) e *Sorghum* (CARVALHO et al., 2004), foi observado que as células vegetais reagem à infecção por *Agrobacterium* com uma reação de hipersensibilidade que acarreta a morte das células e a conseqüente morte dos explantes, fato este que pode explicar a alta porcentagem de mortalidade dos explantes evidenciada nesta pesquisa. Pinheiro et al. (1999), ressaltam que a resistência local das células vegetais pode ser

reconhecida pela chamada reação de hipersensibilidade (*hypersensitive reaction*, ou HR), com a morte de células situadas nos locais por onde o agressor entra no vegetal. Com isso, a planta impede o acesso do patógeno a células vizinhas, limitando a infecção. Embora essa reação tenha sido identificada há quase 100 anos, não está claro se sua característica primária (morte celular) tem alguma relação direta na resistência celular ou é consequência de mecanismos de sinalização que de fato levariam aos eventos capazes de inibir a ação do patógeno.

Recentemente, Yuan et al. (2007) demonstraram que o ácido salicílico, um dos compostos fenólicos produzidos pelo metabolismo vegetal afeta diretamente o processo de infecção por *Agrobacterium tumefaciens*, inibindo a indução de genes *vir* em concentrações inferiores às quais poderiam interferir no crescimento vegetal. Estudos realizados com plantas de *Arabidopsis* geneticamente modificadas para aumentar a biossíntese do ácido salicílico revelaram-se relativamente recalcitrantes à infecção, sugerindo que este composto além de sua conhecida função na regulação dos mecanismos de defesa da planta, pode também interferir diretamente nos processos de infecção por *Agrobacterium tumefaciens*.

O efeito inibitório do antibiótico cefotaxima na regeneração de explantes inoculados com *A. tumefaciens* também foi observado por Quisen (2007). Este autor verificou a ocorrência de oxidação em explantes cotiledonares de *E. camaldulensis* e os resultados observados sugerem que a toxicidade do antibiótico, principalmente nos estágios iniciais de diferenciação celular e regeneração, é devida à concentração elevada de cefotaxima (500 mg.L^{-1}).

De acordo com as informações descritas acima, sugere-se que pelo menos quatro fatores podem ter contribuído para a mortalidade dos explantes observada nesta pesquisa. O primeiro fator está relacionado com o efeito do antibiótico canamicina, que naturalmente induz a morte dos tecidos não transformados, o segundo fator refere-se à concentração de cefotaxima utilizada que pode ter sido maior que o necessário e ter contribuído para um possível efeito inibitório da organogênese, o mecanismo celular de defesa da célula vegetal contra a infecção por *Agrobacterium* e finalmente, o possível efeito do ácido salicílico inibindo a indução de genes *vir*.

O teste histoquímico realizado 150 dias após a inoculação indicou a expressão estável do gene *GUS* em toda a área foliar das gemas obtidas no material putativo (Figura 12 D). Estes resultados confirmam os obtidos por Ho et al. (1998) quando estudaram a expressão estável do gene *GUS* em plantas transformadas de *E. camaldulensis* com os genes *GUS* e *NPTII* sob controle do mesmo promotor. Segundo estes autores, a expressão do gene *GUS* em toda a área foliar foi observada como no presente caso.

O material putativo foi micropropagado e utilizado para as análises moleculares e bioquímicas destinadas a comprovar a presença do gene *P5CSF129A* no genoma das plantas obtidas e estudar as mudanças provocadas por sua expressão nessas plantas.

4.3.3 Análises moleculares da integração do transgene *P5CSF129A*

A inserção do transgene *P5CSF129A* no genoma de *E. saligna* foi detectada nas plantas putativas por reação em cadeia da polimerase (PCR) seguida de eletroforese. Essas plantas apresentaram o fragmento esperado de 598 pb (Figura 13). Como esperado, plantas não transgênicas que passaram pelo mesmo protocolo de regeneração não apresentaram o fragmento.

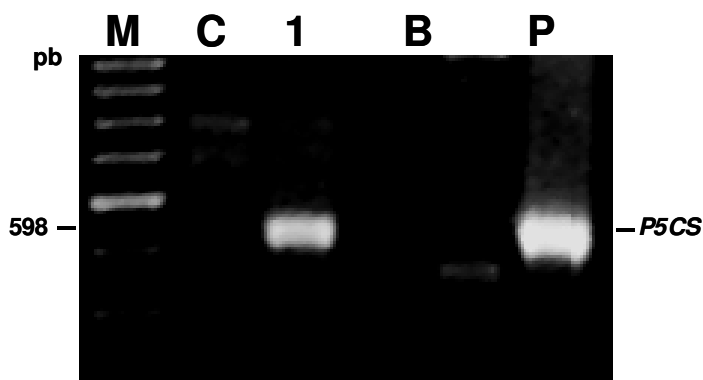


Figura 13 - Eletroforese dos produtos do PCR realizado com DNA de *E. saligna*. Coluna M – marcador de peso molecular (Ladder 100 pb); coluna C – controle negativo (planta de *E. saligna* não inoculada); coluna 1 – evento 1; coluna B – branco; coluna P – plasmídeo pBI121- *P5CSF129A*.

Para confirmar a integração e o número de cópias do gene *P5CSF129A* no genoma de *E. saligna*, foi realizado Southern blot de plantas do evento 1 que se mostraram positivas para o PCR. Os resultados preliminares mostraram uma hibridização cruzada entre o gene *P5CS* de *Vigna aconitifolia* e o gene de *E. saligna* nas plantas não transformadas, não sendo possível confirmar a integração e o número de cópias do gene *P5CS* (Figura 14). Assim, procedeu-se ao uso da sonda do gene *GUS* para comprovar a integração do T-DNA no genoma do *E. saligna*. O resultado final comprovou a transformação genética do evento 1 e revelou a inserção de duas cópias do gene *GUS* na planta de *E. saligna* (Figura 15). Desta forma conclui-se que a eficiência de transformação obtida no experimento 1 (Tabela 8) foi de 0,5%.

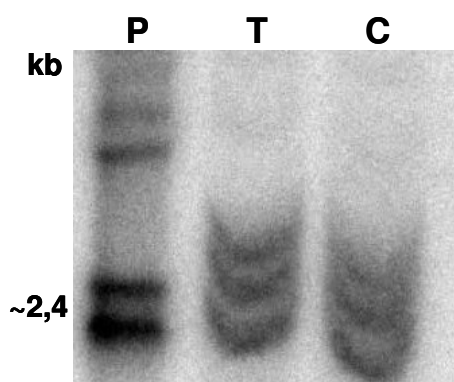


Figura 14 - Resultado do Southern blot realizado com DNA de *E. saligna* utilizando a sonda do gene *P5CSF129A*. Coluna P – Plasmídeo pB1121-*P5CSF129A*; coluna T – planta transgênica de *E. saligna*; coluna C – controle negativo (planta de *E. saligna* não transformada) exibindo três cópias isomórficas entre o gene *P5CS* de *V. aconitifolia* e o gene de *E. saligna*.

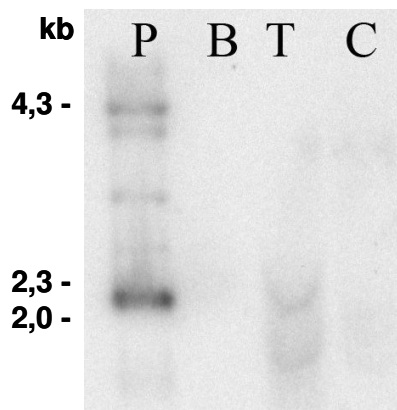


Figura 15 - Resultado do Southern blot realizado com DNA de *E. saligna* utilizando a sonda do gene *GUS*. Linha P – plasmídeo pBI121-*P5CSF129A*, linha B – branco; linha T – planta transgênica de *E. saligna* demonstrando a inserção de duas cópias do gene *GUS* no genoma; linha C – controle negativo (planta de *E. saligna* não transformada).

4.3.4 Determinação da massa fresca total e do teor de prolina na parte aérea e raízes de plantas controle e plantas transformadas com o gene *P5CSF129A*

A massa fresca total da parte aérea de plantas controle (não inoculadas) e de plantas transgênicas cultivadas sob condições normais de casa-de-vegetação foi diferente. As plantas controle apresentaram um valor médio de 17,48 g de massa fresca e as plantas transformadas 10,65 g (Figuras 16 e 17). Este resultado mostra uma redução da massa fresca da parte aérea em plantas de *E. saligna* transformadas com o gene *P5CSF129A* de 39,07 % em relação às plantas controle. Esta observação pode estar relacionada à redução do crescimento resultante da expressão do gene *P5CSF129A*. De acordo com os resultados observados em plantas de *A. thaliana* e *Nicotiana tabacum*, a superexpressão de genes que codificam enzimas da via de síntese de osmoprotetores, controlados por promotores constitutivos, induziram uma redução do crescimento nas plantas transformadas em comparação com as plantas controle, sob condições normais de cultivo (PILON-SMITS et al., 1998; KASUGA et al., 1999).

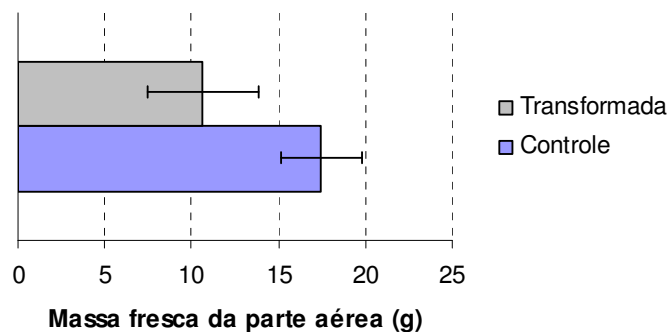


Figura 16 - Massa fresca (g) da parte aérea em plantas de *E. saligna* controle (não transformadas) e em plantas transformadas com o gene *P5CSF129A* (média + desvio-padrão) (n=4).

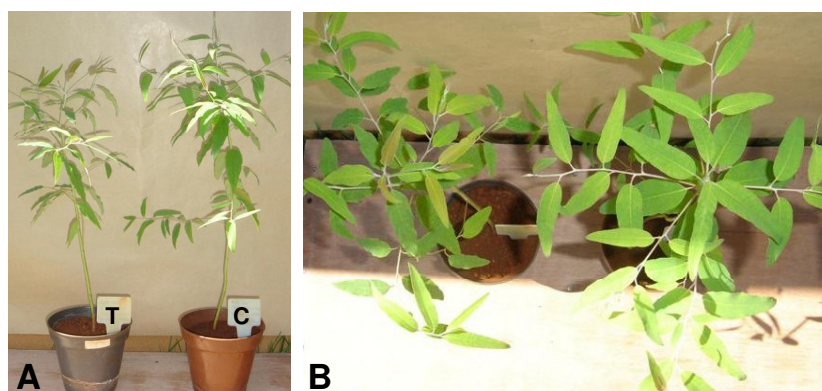


Figura 17 - Plantas de *E. saligna* controle e transformadas com o gene *P5CSF129A*, 150 dias após a aclimatização. (A) planta controle (direita) e planta transformada (esquerda); (B) planta transformada (esquerda) e planta controle (direita).

Com relação a massa fresca total das raízes das plantas controle e transgênicas, as plantas controle acumularam um valor médio de 11,87 g de massa fresca (Figura 18). Já as plantas transformadas apresentaram um valor médio de 8,94 g, o que representa uma redução de 24,68 % em comparação com as plantas controle (Figura 18). De acordo com a análise morfológica visual comparativa entre

as raízes das plantas controle e transformadas, sugere-se que as plantas controle apresentaram raízes mais velhas e lignificadas, enquanto que nas plantas transformadas, as raízes eram jovens e tenras (Figura 19).

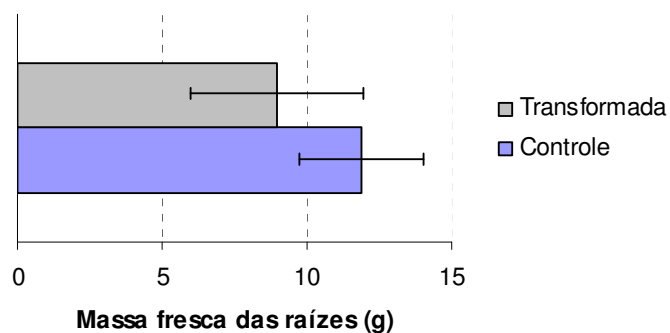


Figura 18 - Massa fresca (g) das raízes em plantas de *E. saligna* controle (não transformadas) e em plantas transformadas com o gene *P5CSF129A* (média + desvio-padrão) (n=4).



Figura 19 - Comparação entre as raízes de plantas de *E. saligna* controle e transformadas com o gene *P5CSF129A*. (A) Plantas controle exibindo raízes lignificadas. (B) Plantas transformadas exibindo raízes jovens e tenras, 150 dias após a aclimatização.

A quantidade de prolina acumulada na parte aérea das plantas transgênicas foi superior à quantidade encontrada em plantas controle (Figura 20). As plantas controle acumularam um valor médio de 3,42 μM de prolina/g de massa fresca (Figura 20). Já as plantas transformadas acumularam um valor médio de 13,39 μM por g de massa fresca, sendo este valor aproximadamente 4 vezes maior que o

observado no tratamento controle (Figura 20). Este resultado evidenciou um aumento significativo dos níveis de prolina nos tecidos foliares das plantas de *E. saligna* transformadas com o gene *P5CSF129A*.

O aumento de prolina acumulada nas plantas de *E. saligna* observado neste trabalho foi proporcionalmente inferior aos observados para outras espécies transformadas com o gene *P5CS* cultivadas na ausência de estresse. Para a espécie florestal *Larix* sp. (GLEESON et al., 2005), o nível de prolina acumulado em massas celulares embriogênicas expressando o gene *P5CS* foi de aproximadamente 1 μM de prolina/g de massa fresca, valor 30 vezes superior ao observado no controle não transformado, sendo que após a regeneração das plantas em meio de cultura sem canamicina, os níveis de prolina observados permaneceram inalterados. Em plantas de tabaco (KAVI-KISHOR et al. 1995) e trigo (SAWAHEL e HASSAN, 2002) expressando o gene *P5CS*, o aumento dos níveis de prolina em comparação com as plantas controle não transformadas foi de 14 e 12 vezes, respectivamente.

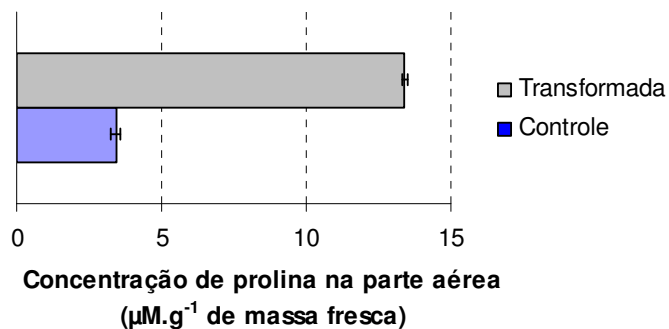


Figura 20 - Concentração de prolina da parte aérea de plantas de *E. saligna* controle (não transformadas) e de plantas transformadas (média + desvio-padrão) (n=4).

Com relação à quantidade de prolina encontrada nas raízes de plantas de *E. saligna* controle e transgênicas, a diferença entre os valores observados no controle e nas plantas transformadas não foi significativa (Figura 21). De acordo com Kavi-Kishor et al. (2005), algumas evidências apontam a existência de transportadores específicos de prolina (*ProT*) em plantas, como por exemplo os transportadores que

foram isolados e caracterizados em *Arabidopsis*. Segundo estes mesmos autores, os resultados observados em plantas de alfafa indicaram que a prolina produzida pela planta é sintetizada preferencialmente nas raízes, e que grande parte da prolina produzida é exportada para a parte aérea da planta. Diante da evidência de que a prolina possa ser sintetizada em maior quantidade nas raízes e da possibilidade da atuação de transportadores específicos para este aminoácido, possivelmente estas informações estão relacionadas aos resultados referentes ao maior acúmulo de prolina na parte aérea das plantas de *E. saligna* transformadas com o gene *P5CSf129A*.

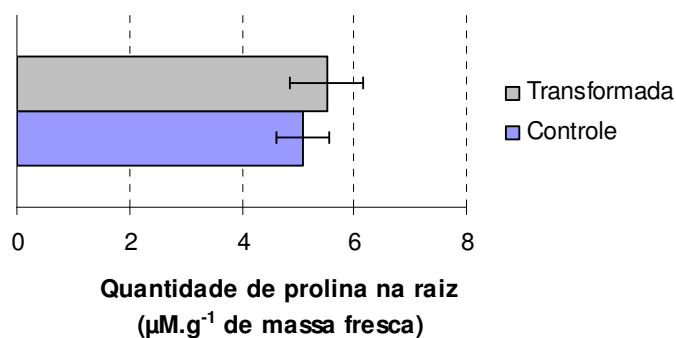


Figura 21 - Concentração de prolina nas raízes de *E. saligna* controle (não transformadas) e de plantas transformadas (média + desvio-padrão) (n=4).

4.4 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos nas condições experimentais estabelecidas nesta pesquisa, podemos concluir que:

- Houve integração e expressão do gene *P5CSF129A* em um evento de *E. saligna*;
- O evento de *E. saligna* transformado com o gene *P5CSF129A* apresentou redução na massa fresca total da parte aérea e raiz em comparação com as plantas não transformadas obtidas com o mesmo protocolo de regeneração;
- A quantidade de prolina acumulada na parte aérea de plantas transformadas foi quatro vezes superior a quantidade encontrada em plantas controle, evidenciando um aumento nos níveis de prolina nos tecidos foliares das plantas transgênicas;
- A quantidade de prolina acumulada na raiz de plantas transformadas não foi superior à quantidade encontrada em plantas controle, evidenciando que este aminoácido não é acumulado nas raízes de *E. saligna* transformadas.

4.5 REFERÊNCIAS

BATES, L.S.; WALDREN, R.P.; TEARE, I. D. Rapid determination of free proline for water stress studies. **Plant and Soil**, v. 39, p. 205-207, 1973.

BRODY, J. R.; KERN, S. E. Sodium boric acid: a Tris-free, cooler conductive medium for DNA electrophoresis. **BioTechniques**, v. 36, p. 214-216, 2004.

CARVALHO, C. H. S.; ZEHR, U. B.; GUNARATNA, N.; ANDERSON, J.; KONONOWICZ, H. H; HODGES, T. K.; AXTELL, J. D. *Agrobacterium*-mediated transformation of sorghum: factors that affect transformation efficiency. **Genetics and Molecular Biology**, v. 27, p. 259-269, 2004.

COSTA, M. G. C.; NOGUEIRA, F. T. S.; OTONI, V.C.; BROMMONSCKENKEL, S. M. Transformação genética de cultivares de tomateiro industrial mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 12(2), p. 107-118, 2000.

DANDEKAR, A. M.; McGRANAHAN, G.H.; JAMES, D.J. Transgenic woody plants. In: KUNG, S.; WU, R. **Transgenic plants**. San Diego: Academic Press, p. 129-151, 1993.

DE BONDT, A.; EGGERMONT, K.; DRUART, P.; DE VIL, M.; GODERIS, I.; VANDERLEYDEN, J.; BROEKAERT, W.F. *Agrobacterium* mediated transformation of apple (*Malus domestica* Borkh): an assessment of factors affecting gene transfer efficiency during early transformation steps. **Plant Cell Reports**, New York, v. 13, p. 587-593, 1994.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, p.13-15, 1990.

ESMERALDO, M.V.; CARVALHEIRA, S. B. R. C.; BRASIL, A. A.; FIGUEIREDO, S. A.; BARRUETO CID, L. P.; BRASILEIRO, A. C. M. Analysis of different parameters affecting *Agrobacterium* -mediated transformation of *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*. In: IUFRO Conference on Silviculture and Improvement of Eucalypts (pp.19-23), Salvador, Brazil, 24-29 August, 1997.

GLEESON, D.; WALTER, M. A. L.; PARKINSON, M. Overproduction of proline in transgenic hybrid larch (*Larix x leptoeuropaea* (Dengler)) cultures renders them tolerant to cold, salt and frost. **Molecular Breeding**, v. 15, p. 21–29, 2005.

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

GUIMARÃES, C. S.; LACORTE, C.; BRASILEIRO, A. C. M. Transformação genética em espécies florestais. **Ciência Florestal**, v.13, p. 167 – 178, 2003.

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

HARE, P. D.; CRESS, W. A. Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. **Plant Growth Regulation**, v.21, p.79-102, 1997.

HIGA, A. R.; GARCIA, C. H.; SANTOS, E. T. Geadas, prejuízos à atividade florestal. **Silvicultura**, São Paulo, v.15, p.40-43, 1994.

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.

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

HOOD, E. E.; GELVIN, S. B.; MELCHERS, L. S.; HOEKEMA, A. New *Agrobacterium* helper plasmids for gene transfer to plants. **Transgenic Research**, v.2, p.208-218, 1993.

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

KASUGA, M.; LIU, Q.; MIURA, S.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. **Nature Biotechnology**, v.17, p.287-291, 1999.

KAVI KISHOR, P.B.; HONG, Z.; MIAO, G. H.; HU, C.; VERMA, D. P. S. Overexpression of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants. **Plant Physiology**, v. 108, p. 1387–1394, 1995.

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.

MACHADO, L. DE O. R.; PENCHEL, R. M.; TEULIÈRES, C.; BERTOLUCCI, F. L.; BOUDET, A. M. Transformation and regeneration studies of elite eucalypt hybrids: optimisation of physical and biological parameters. In: **IUFRO Conference on Silviculture and Improvement of Eucalypts** (p.192-197), Salvador, Brazil, p.24-29 August, 1997.

MILLER, J. H. **Experiments in Molecular Genetics**. New York : Cold Spring Harbor Laboratory, 1972.

MOLINARI, H. **Transformação genética e identificação de genes diferencialmente expressos em cana-de-açúcar variedade RB 855156 submetidas à déficit hídrico via co-cultivo**. Tese de doutorado. Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Produção Vegetal. Universidade Federal do Paraná, 2006.

MORA, A. L.; GARCIA, C. H. Eucalypt cultivation in Brazil. São Paulo: **Sociedade Brasileira de Silvicultura**, p. 112, 2000.

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

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

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

PILON-SMITS, E. A .H.; TERRY, N.; SEARS, T.; KIM, H.; ZAYED, A.; HWANG, S.; VANDUN, K.; VOOGD, E.; VERWOERD, T. C.; KRUTWAGEN, R.W.H.H.; GODDIJIN, O. J. M. Trehalose-producing transgenic tobacco plant show improved growth performance under drought stress. **Journal of Plant Physiology** v.152,p.525-532. 1998.

PINHEIRO, M. M.; SANDRONI, M.; LUMMERZHEIM, M.; OLIVEIRA, D. E. A defesa das plantas contra as doenças. **Ciência Hoje**, v.147, 1999.

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

SAMBROOK, J.; MANIATIS, T; FRITSCH, E. F. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2.ed. New York: Cold Spring Harbor, 1989.

SAWAHEL, W. A; HASSAN, A. H. Generation of transgenic wheat plants producing high levels of the osmoprotectant proline. **Biotechnology Letters**, v.4, p. 721–725. 2002.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE SILVICULTURA (SBS). **Fatos e Números do BrasilFlorestal**.Disponívelem:<http://www.sbs.org.br/FatoseNumerosdoBrasilFlorestal.pdf>. Acesso on line em 10 de maio de 2007.

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

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.

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

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. Down regulation of cinnamylalcohol dehydrogenase, a lignification enzyme, in *Eucalyptus camaldulensis*. **Molecular Breedings**, v. 12, p. 157-167, 2003.

YUAN, Z. C.; EDLIND, M. P.; LIU, P.; SAENKHAM, P.; BANTA, L. M.; WISE, A. A.; RONZONE, E.; BINNS, A. N.; KERR, K.; NESTER, E. W. The plant signal salicylic acid shuts down expression of the vir regulon and activates quormone-quenching genes in *Agrobacterium*. **Proceedings of The National Academy of Sciences of United States of America**, v. 104, p. 11790-11795, 2007.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

- O processo de organogênese e micropropagação de *E. saligna* atendeu às expectativas para a realização dos trabalhos de transformação genética. Os resultados referentes ao protocolo de regeneração de plantas aqui estabelecido, poderão ser otimizados para futuras pesquisas com outros genótipos da espécie;
- De acordo com os resultados de obtenção do evento transformado, concluiu-se que o baixo índice de explantes transformados pode ser devido à baixa eficiência da integração do T-DNA nas células. Sugere-se para as futuras pesquisas de transformação para esta espécie a utilização de um número maior de cortes nos segmentos foliares, bem como, a utilização de tratamentos alternativos que visem o aumento da eficiência de transformação, como por exemplo a utilização de compostos fenólicos no momento da inoculação dos explantes, inoculação a vácuo e sonicação. A utilização de antibióticos alternativos a cefotaxima, como por exemplo a Augmentin[®] e o Meropenem[®] que já foram utilizados para outras espécies de eucalipto, também pode contribuir para uma maior sobrevivência dos explantes inoculados;
- As plantas transgênicas que foram obtidas nesta pesquisa permitirão o estabelecimento de experimentos visando a comprovação do aumento da tolerância de plantas de *E. saligna* transformadas com o gene *P5CSF129A* ao estresse causado pelo frio e seca. Para tanto, resultados referentes à expressão do gene induzida pelo estresse e suas implicações fisiológicas serão de fundamental importância para a conclusão deste estudo e possibilitarão a utilização futura destas plantas no sistema produtivo;
- Ficou comprovado nesta pesquisa que as plantas transformadas, em condições normais de cultivo, acumularam 4 vezes mais prolina que as plantas controle. Portanto, será necessário estudar o efeito do nível de

estresse na expressão do gene mediante a obtenção de resultados moleculares, fisiológicos e bioquímicos que comprovem a atuação da prolina na resistência ao estresse, justificando desta forma a futura utilização das plantas de *E. saligna* transformadas com o gene *P5CSF129A* no sistema produtivo;

- Resultados preliminares demonstraram uma redução da massa fresca da parte aérea em plantas de *E. saligna* transformadas com o gene *P5CSF129A* de 39,07% em relação às plantas controle. Com base nesta informação, estudos relacionados ao crescimento e desenvolvimento destas plantas serão necessários para comprovar possíveis alterações relacionadas com o alto nível de síntese de prolina nas plantas transgênicas, bem como a utilização de um plasmídeo contendo o mesmo gene sob controle de um promotor induzível.

ANEXOS

ANEXO 1 - Meio de cultura MS modificado (MS/2) utilizado para a germinação das sementes de *E. saligna* e o enraizamento.

Componente	Fórmula química	Concentrações do meio MS (mg.L ⁻¹)	Concentrações do meio de cultura MS/2 (mg.L ⁻¹)
Nitrato de amônio	NH ₄ NO ₃	1650	825
Nitrato de potássio	KNO ₃	1900	950
Cloreto de cálcio	CaCl ₂ .2H ₂ O	441	220,5
Sulfato de magnésio	MgSO ₄ .7H ₂ O	370	185
Fosfato de potássio	KH ₂ PO ₄	170	85
Sódio EDTA	Na ₂ EDTA	37,25	18,625
Iodeto de potássio	KI	0,83	0,415
Sulfato de ferro	FeSO ₄ .7H ₂ O	27,85	13,925
Sulfato de manganês	MnSO ₄ .H ₂ O	16,9	8,45
Sulfato de zinco	ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6	4,3
Ácido bórico	H ₃ BO ₃	6,2	3,1
Molibdato de sódio	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25	0,125
Cloreto de cobalto	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025	0,0125
Sulfato de cobre	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	0,0125
Ácido nicotínico	C ₆ H ₅ NO ₂	0,5	0,5
Cloridrato de piridoxina	C ₆ H ₁₂ ClNO ₂	0,5	0,5
Cloridrato de tiamina	C ₁₂ H ₁₈ Cl ₂ N ₄ OS	0,5	0,5
Glicina	C ₂ H ₅ NO ₂	2,0	2,0
Mio-inositol	C ₆ H ₁₂ O ₆	100,0	100,0
Agar		7.000	7.000
Sacarose	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	30.000	20.000

ANEXO 2 - Meio de cultura MS utilizado para a organogênese a partir de folhas cotiledonares de *E. saligna*

Componente	Fórmula química	Concentrações do meio MS (mg.L ⁻¹)	Concentrações do meio MS modificado (MS) (mg.L ⁻¹)	
			1 período de 30 dias	
			FASE 1 Indução de calos	FASE 2 Indução de gemas
Nitrato de amônio	NH ₄ NO ₃	1650	1650	1650
Nitrato de potássio	KNO ₃	1900	1900	1900
Cloreto de cálcio	CaCl ₂ .2H ₂ O	441	441	441
Sulfato de magnésio	MgSO ₄ .7H ₂ O	370	370	370
Fosfato de potássio	KH ₂ PO ₄	170	170	170
Sódio EDTA	Na ₂ EDTA	37,25	37,25	37,25
Iodeto de potássio	KI	0,83	0,83	0,83
Sulfato de ferro	FeSO ₄ .7H ₂ O	27,85	27,85	27,85
Sulfato de manganês	MnSO ₄ .H ₂ O	16,9	16,9	16,9
Sulfato de zinco	ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6	8,6	8,6
Ácido bórico	H ₃ BO ₃	6,2	6,2	6,2
Molibdato de sódio	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25	0,25	0,25
Cloreto de cobalto	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025	0,025	0,025
Sulfato de cobre	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	0,025	0,025
Ácido nicotínico	C ₆ H ₅ NO ₂	0,5	0,5	0,5
Cloridrato de piridoxina	C ₈ H ₁₂ ClNO ₂	0,5	0,5	0,5
Cloridrato de tiamina	C ₁₂ H ₁₈ Cl ₂ N ₄ OS	0,5	0,5	0,5
Glicina	C ₂ H ₅ NO ₂	2	2	2
Mio-inositol	C ₆ H ₁₂ O ₆	100	100	100
Agar		7.000	7.000	7.000
Sacarose	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	30.000	30.000	30.000

Reguladores vegetais	Peso molecular	Concentração utilizada (µM)	Concentração utilizada (µM)
ANA	186,2	2,70	2,70
BAP	225,3	4,44	4,44

ANEXO 3 - Meio de cultura MS com as concentrações de nitratos de potássio e amônio reduzidas à metade (MSM) utilizado para a multiplicação das gemas de *E. saligna*

Componente	Fórmula química	Concentração do meio MS (mg.L ⁻¹)	Meio MS modificado (MSM) Concentrações (mg.L ⁻¹)
Nitrato de amônio	NH ₄ NO ₃	1650	825
Nitrato de potássio	KNO ₃	1900	950
Cloreto de cálcio	CaCl ₂ .2H ₂ O	441	441
Sulfato de magnésio	MgSO ₄ .7H ₂ O	370	370
Fosfato de potássio	KH ₂ PO ₄	170	170
Sódio EDTA	Na ₂ EDTA	37,25	37,25
Iodeto de potássio	KI	0,83	0,83
Sulfato de ferro	FeSO ₄ .7H ₂ O	27,85	27,85
Sulfato de manganês	MnSO ₄ .H ₂ O	16,9	16,9
Sulfato de zinco	ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6	8,6
Ácido bórico	H ₃ BO ₃	6,2	6,2
Molibdato de sódio	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25	0,25
Cloreto de cobalto	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025	0,025
Sulfato de cobre	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	0,025
Vitaminas			
Ácido nicotínico	C ₆ H ₅ NO ₂	0,5	0,5
Cloridrato de piridoxina	C ₆ H ₁₂ ClNO ₂	0,5	0,5
Cloridrato de tiamina	C ₁₂ H ₁₈ Cl ₂ N ₄ OS	0,5	0,5
Glicina	C ₂ H ₅ NO ₂	2	2
Mio-inositol	C ₆ H ₁₂ O ₆	100	100
Agar		7.000	7.000
Sacarose	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	30.000	30.000
Regulador vegetal	Peso molecular	Concentração utilizada (µM)	
BAP	225,3	0,11	

ANEXO 4 - Meio de cultura MS com as concentrações de nitratos de potássio e amônio reduzidas à metade (MSM) utilizado para a organogênese a partir de folhas de *E. saligna*

Componente	Fórmula química	Concentração original do meio MS (mg.L ⁻¹)	Meio MS modificado (MSM) Concentração utilizada (mg.L ⁻¹)	
			2 períodos de 15 dias	
			FASE 1 Indução de calos	FASE 2 Indução de gemas
Nitrato de amônio	NH ₄ NO ₃	1650	825	825
Nitrato de potássio	KNO ₃	1900	950	950
Cloreto de cálcio	CaCl ₂ .2H ₂ O	441	441	441
Sulfato de magnésio	MgSO ₄ .7H ₂ O	370	370	370
Fosfato de potássio	KH ₂ PO ₄	170	170	170
Sódio EDTA	Na ₂ EDTA	37,25	37,25	37,25
Iodeto de potássio	KI	0,83	0,83	0,83
Sulfato de ferro	FeSO ₄ .7H ₂ O	27,85	27,85	27,85
Sulfato de manganês	MnSO ₄ .H ₂ O	16,9	16,9	16,9
Sulfato de zinco	ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6	8,6	8,6
Ácido bórico	H ₃ BO ₃	6,2	6,2	6,2
Molibdato de sódio	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25	0,25	0,25
Cloreto de cobalto	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025	0,025	0,025
Sulfato de cobre	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	0,025	0,025
Vitaminas				
Ácido nicotínico	C ₆ H ₅ NO ₂	0,5	0,5	0,5
Cloridrato de piridoxina	C ₈ H ₁₂ ClNO ₂	0,5	0,5	0,5
Cloridrato de tiamina	C ₁₂ H ₁₈ Cl ₂ N ₄ OS	0,5	0,5	0,5
Glicina	C ₂ H ₅ NO ₂	2	2	2
Mio-inositol	C ₆ H ₁₂ O ₆	100	100	100
Agar		7.000	7.000	7.000
Sacarose	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	30.000	30.000	30.000
Carvão ativado		-	-	-

Reguladores vegetais	Peso molecular	Concentração utilizada (µM)	Concentração utilizada (µM)
ANA	186,2	0,1	0,67
BAP	225,3	-	1,11
TDZ	220,2	1,0	-

ANEXO 5 - Meio de cultura MS com as concentrações de nitratos de potássio e amônio reduzidas à metade (MSM) utilizado para o alongamento das brotações de *E. saligna*

Componente	Fórmula química	Concentração original do meio MS (mg.L ⁻¹)	Meio MS modificado (MSM) Concentração utilizada (mg.L ⁻¹)
Nitrato de amônio	NH ₄ NO ₃	1650	825
Nitrato de potássio	KNO ₃	1900	950
Cloreto de cálcio	CaCl ₂ .2H ₂ O	441	441
Sulfato de magnésio	MgSO ₄ .7H ₂ O	370	370
Fosfato de potássio	KH ₂ PO ₄	170	170
Sódio EDTA	Na ₂ EDTA	37,25	37,25
Iodeto de potássio	KI	0,83	0,83
Sulfato de ferro	FeSO ₄ .7H ₂ O	27,85	27,85
Sulfato de manganês	MnSO ₄ .H ₂ O	16,9	16,9
Sulfato de zinco	ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6	8,6
Ácido bórico	H ₃ BO ₃	6,2	6,2
Molibdato de sódio	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25	0,25
Cloreto de cobalto	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025	0,025
Sulfato de cobre	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	0,025
Vitaminas			
Ácido nicotínico	C ₆ H ₅ NO ₂	0,5	0,5
Cloridrato de piridoxina	C ₆ H ₁₂ ClNO ₂	0,5	0,5
Cloridrato de tiamina	C ₁₂ H ₁₈ Cl ₂ N ₄ OS	0,5	0,5
Glicina	C ₂ H ₅ NO ₂	2	2
Mio-inositol	C ₆ H ₁₂ O ₆	100	100
Agar		7.000	7.000
Sacarose	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	30.000	30.000
Carvão ativado		-	2.500

ANEXO 6 - Resultados da análise de variância para as variáveis analisadas durante o processo de indução de gemas adventícias a partir de folhas de *E. saligna*

FATOR DE VARIAÇÃO	GRAUS DE LIBERDADE	QUADRADO MÉDIO			
		Explantes formando calos (%)	Explantes regenerando gemas (%)	Gemas por explante (N°)	Explantes oxidados (%)
TRATAMENTOS	3	13616,70**	1726,67**	329,17 **	1522,50**
ERRO	36	340,56	15,55	17,78	25,56
C. DE VARIAÇÃO (%)		68,97	57,45	49,62	13,75
TESTE DE BARTLETT		0,48 ^{ns}	0,45 ^{ns}	0,11 ^{ns}	0,69 ^{ns}

^{ns} não significativo

** significativo ao nível de 5% de probabilidade

ANEXO 7 - Resultados da análise de variância para as variáveis analisadas durante o processo de enraizamento das microestacas de *E. saligna*

FATOR DE VARIAÇÃO	GRAUS DE LIBERDADE	QUADRADO MÉDIO			
		% Enraizamento	% calos	N° médio de raízes	Comprimento médio da raiz principal (cm)
TRATAMENTOS	4	469,81**	20479,70 **	0,54**	3,82**
ERRO	45	231,09	289,58	0,09	0,08
C. DE VARIAÇÃO (%)		22,80	27,77	22,50	23,93
TESTE DE BARTLETT		0,68 ^{ns}	0,24 ^{ns}	0,06 ^{ns}	0,10 ^{ns}

^{ns} não significativo

** significativo ao nível de 5% de probabilidade

ANEXO 8 - Meio de cultura MS com as concentrações de nitratos de potássio e amônio reduzidas à metade (MSM) utilizado para os experimentos de transformação genética de *E. saligna*

Componente	Fórmula química	Composição original do meio MS	Meio MS modificado (MSM)					
			Concentração utilizada (mg.L ⁻¹)					
Nitrato de amônio	NH ₄ NO ₃	1650	825	825	825	825	825	825
Nitrato de potássio	KNO ₃	1900	950	950	950	950	950	950
Cloreto de cálcio	CaCl ₂ .2H ₂ O	441	441	441	441	441	441	441
Sulfato de magnésio	MgSO ₄ .7H ₂ O	370	370	370	370	370	370	370
Fosfato de potássio	KH ₂ PO ₄	170	170	170	170	170	170	170
Sódio EDTA	Na ₂ EDTA	37,25	37,25	37,25	37,25	37,25	37,25	37,25
Iodeto de potássio	KI	0,83	0,83	0,83	0,83	0,83	0,83	0,83
Sulfato de ferro	FeSO ₄ .7H ₂ O	27,85	27,85	27,85	27,85	27,85	27,85	27,85
Sulfato de manganês	MnSO ₄ .H ₂ O	16,9	16,9	16,9	16,9	16,9	16,9	16,9
Sulfato de zinco	ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6	8,6	8,6	8,6	8,6	8,6	8,6
Ácido bórico	H ₃ BO ₃	6,2	6,2	6,2	6,2	6,2	6,2	6,2
Molibdato de sódio	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Cloreto de cobalto	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025
Sulfato de cobre	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025
Vitaminas								
Ácido nicotínico	C ₆ H ₅ NO ₂	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Cloridrato de piridoxina	C ₆ H ₁₂ ClNO ₂	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Cloridrato de tiamina	C ₁₂ H ₁₈ Cl ₂ N ₄ OS	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Glicina	C ₂ H ₅ NO ₂	2	2	2	2	2	2	2
Mio-inositol	C ₆ H ₁₂ O ₆	100	100	100	100	100	100	100
Agar		7000	7000	7000	7000	7000	7000	7000
Sacarose	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	30000	30000	30000	30000	30000	30000	30000

Reguladores vegetais	Peso molecular	Concentrações utilizadas (µM)					
ANA	186,2	0,1	0,1	0,1	0,67	-	-
BAP	225,3	-	-	-	1,11	-	1,11
TDZ	220,2	1,0	1,0	1,0	-	-	-
GA3	346,4	-	-	-	-	1,45	-
Antibióticos seletivos		Concentrações utilizadas (mg.L ⁻¹)					
Cx		-	500	250	-	-	-
Km		-	50	0	-	-	-

ANEXO 9 - Composição do meio de cultura YEB (Miller, 1972) utilizado para o cultivo de *A. tumefaciens*

Componentes do meio de cultura YEB	Meio sólido Concentração (g.L ⁻¹)	Meio líquido Concentração (g.L ⁻¹)
Extrato de levedo	1,0	1,0
Extrato de carne	5,0	5,0
Triptona	5,0	5,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,02	1,02
Sacarose	0,5	0,5
Agar	15	-

pH = 7,5

ANEXO 10 - Distribuição da expressão do gene *GUS* em dois tipos de explantes foliares de *E. saligna* após 3 e 5 dias de co-cultura

Tipo de explante	Avaliações	Porcentagem de explantes em cada categoria				
		Porcentagem de área foliar expressando o gene <i>GUS</i>				
		s/ expressão	0 – 5%	6 – 25%	26 – 50%	51 – 100%
Folhas inteiras	Controle	100	-	-	-	-
	3 dias de co-cultura	20	0	70	10	0
	5 dias de co-cultura	0	0	10	40	50
Segmentos foliares	Controle	100	-	-	-	-
	3 dias de co-cultura	10	20	60	10	0
	5 dias de co-cultura	0	0	20	40	40

ANEXO 11 - Distribuição da expressão do gene *GUS* em explantes foliares de *E. saligna* inoculados com *A. tumefaciens*, co-cultivados com a bactéria por 3 e 5 dias seguidos de 7 dias em meio seletivo contendo 500 mg.L⁻¹ Cx e 50 mg.L⁻¹ de Km

Tipo de explante	Amostragem	Expressão do gene <i>GUS</i> após 7 dias em meio seletivo				
		s/ expressão	0 – 5%	6 – 25%	26 – 50%	51 – 100%
Folhas inteiras	Controles	100	-	-	-	-
	3 dias de co-cultura	60	40	0	0	0
	5 dias de co-cultura	50	40	10	0	0
Segmentos foliares	Controles	100	-	-	-	-
	3 dias de co-cultura	70	30	0	0	0
	5 dias de co-cultura	50	50	0	0	0

ANEXO 12 - Distribuição da expressão do gene *GUS* em explantes foliares de *E. saligna* inoculados com soluções de *A. tumefaciens* de diferentes densidades óticas 5 dias após a co-cultura e depois de 7 dias de cultivo em meio seletivo

DO _{600nm} da solução bacteriana	Avaliação	Porcentagem de explantes em cada categoria				
		Porcentagem de área foliar expressando o gene <i>GUS</i>				
		s/ expressão	0 - 5%	6-25%	26-51%	51-100%
Controle não inoculado	Após 5 dias de co- cultura	100	-	-	-	-
	Após 7 dias em meio seletivo	100	-	-	-	-
0,25	Após 5 dias de co- cultura	30	20	40	10	0
	Após 7 dias em meio seletivo	60	40	0	0	0
0,50	Após 5 dias de co- cultura	10	0	50	30	10
	Após 7 dias em meio seletivo	50	0	30	20	0
1,00	Após 5 dias de co- cultura	0	20	30	30	20
	Após 7 dias em meio seletivo	30	20	50	0	0