

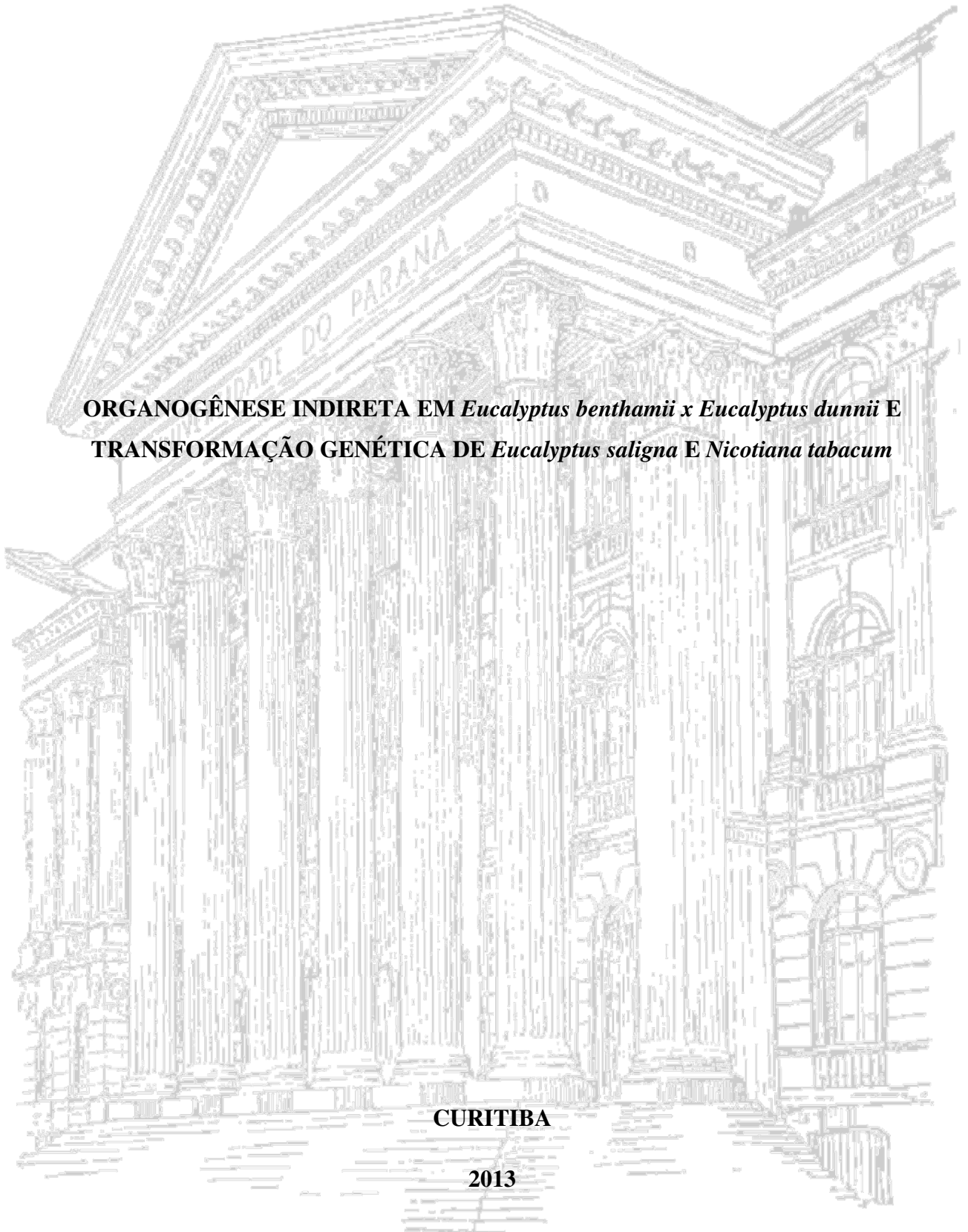
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

YOHANA DE OLIVEIRA CAUDURO

ORGANOGÊNESE INDIRETA EM *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii* E
TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE *Eucalyptus saligna* E *Nicotiana tabacum*

CURITIBA

2013



YOHANA DE OLIVEIRA CAUDURO

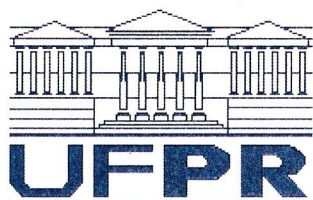
**ORGANOGENESE INDIRETA EM *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii* E
TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE *Eucalyptus saligna* E *Nicotiana tabacum***

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

Orientador: Dr^a Marguerite G. G. Quoirin
Co-orientador: Dr. João Carlos Bespalhok Filho
Dr^a Juliana Degenhardt-Goldbach

CURITIBA

2013



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



PARECER

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal, reuniram-se para realizar a arguição da Tese de DOUTORADO, apresentada pela candidata **YOHANA DE OLIVEIRA CAUDURO**, sob o título **“ORGANOGENESE INDIRETA EM *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii* e TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE *Eucalyptus saligna* E *Nicotiana tabacum*”**, para obtenção do grau de Doutor em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná.

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

Curitiba, 28 de Maio de 2013.

Professora Dra. Louise Larissa May De Mio
Coordenadora do Programa

Dra. Elisa Serra Negra Vieira
Primeira Examinadora

Professora Dra. Erika Amano
Segunda Examinadora

Professor Dr. Cicero Deschamps
Terceiro Examinador

Dra. Juliana Degenhardt-Goldbach
Quarta Examinadora

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

*Ao meu esposo Frederico, amor da minha vida, e ao Nicolas, presente de Deus para nossa família e que já nos preenche de alegria antes mesmo de chegar.
Aos meus pais, Uéder e Marinez e aos meus irmãos, Uéder Junior e Mylana.
Verdadeiro amor, presentes de Deus e bênçãos na minha vida.
Minha família é o maior tesouro que Deus me deu!*

DEDICO

*Ao Senhor Jesus Cristo, minha força e refúgio,
Verdadeiro e único Caminho.*

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

Ao Poderoso Deus, por sempre me guiar e sustentar, sobretudo ao longo dessa difícil e importante jornada. Muito obrigada Senhor por todo cuidado, por toda luz no meu caminho e pela sua fidelidade e bondade infinita.

A Universidade Federal do Paraná, ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia-Produção Vegetal e ao Laboratório de Micropropagação de Plantas pela oportunidade de concretizar esse importante objetivo na minha vida.

Ao CNPq por viabilizar a execução desse trabalho. A Embrapa Florestas e aos Laboratórios de Botânica Estrutural e de Análise e Tecnologia de Sementes da UFPR, pelas parcerias nas análises.

A Professora Marguerite Quoirin pela oportunidade, compreensão e ensinamentos transmitidos ao longo desses 9 anos de orientação em pesquisa.

A Comissão de Orientação, composta pelo prof. João Carlos Bessalho Filho e pela Dra. Juliana Degenhardt-Goldbach, pelo incentivo constante, sugestões e palavras de ânimo. A Dra Isabel Gerhardt (Embrapa) que, mesmo sem integrar oficialmente a comissão, auxiliou em várias discussões e na execução das análises moleculares na Embrapa.

Aos professores do curso de pós-graduação Luiz Antonio Biasi, Katia Zuffellato, Francine Cuquel e Maristela Panobianco pela amizade, exemplo e troca de experiências.

A banca de pré-defesa, composta pela Prof^a Dra. Luciana Lopes Fortes Ribas, Prof^a Dra. Erika Amano e Prof. Dr. João Carlos Bessalho Filho pelas sugestões.

Aos meus amigos de caminhada, Valéria Lopes, Mariane Schuk, Elis Borcioni, André Luiz Lopes da Silva, Fernanda Pinto, Laís Adamuchio, Vanessa Reinhardt, Clarissa Mudry, Caroline Frizzo, Cassiana de Oliveira, Melicia Gavazza, Camila Ribeiro, Carlos Maduro, Adriana Santos e Rubens, por todo o carinho, momentos alegres, ajuda e energia positiva.

Aos meus amigos e irmãos de fé, Luciana S. Abrahão Pires, Paulo de Tarso de Lara Pires pelo carinho, apoio e oração. A Marianne Bernardes e a Renata Grunennvaldt pela amizade e importante ajuda nas análises na Embrapa.

A toda a minha família, em especial aos meus pais, por todo amor, conselhos, incentivo, orações, que foram essenciais em todos os momentos. Ao meu esposo, puro amor e alegria na minha vida, pelas palavras de força, ânimo e por tornar tudo mais alegre e leve. A todos que aqui não foram mencionados, mas que de alguma forma contribuíram para que esse trabalho fosse realizado (renderia uma grande lista), todo o meu carinho e gratidão!

ORGANOGENESE INDIRETA EM *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii* E TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE *Eucalyptus saligna* E *Nicotiana tabacum*

RESUMO

O melhoramento das espécies vegetais via transformação genética pode ser uma alternativa para minimizar os impactos negativos causados pelo meio ambiente. O híbrido *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii* é um material promissor para tolerância ao frio e à geada. Contudo, ainda não há estudos relacionados à organogênese, etapa essencial para o desenvolvimento de protocolos eficientes de transformação. Diante disto, o primeiro capítulo desta tese teve como objetivo principal estudar alguns fatores importantes para a organogênese indireta a partir de tecido foliar e para a micropropagação desse híbrido. Foram avaliados diferentes reguladores vegetais e composições salinas dos meios de cultura. No segundo capítulo foram estudados fatores que podem afetar a transformação genética de explantes cotiledonares de *Eucalyptus saligna* mediante co-cultura com *Agrobacterium tumefaciens*, como a exposição dos explantes a uma solução antioxidante, a pré-cultura dos explantes, a influência de diferentes antibióticos na regeneração de gemas e a utilização da acetosiringona nos meios de co-cultura. No terceiro capítulo foram avaliados aspectos fisiológicos, morfológicos e anatômicos de plantas de *Nicotiana tabacum* transformadas com o gene *p5csf129a*. Foram realizadas avaliações morfológicas, quantificação do conteúdo de prolina, estudo da anatomia foliar e análise da germinação de sementes T1 sob diferentes temperaturas. Em relação ao híbrido estudado, foram obtidos resultados preliminares de organogênese e multiplicação, havendo baixa regeneração indireta de gemas em explantes foliares cultivados no meio MS contendo a metade da concentração de nitratos e adicionado de 0,1 µM ANA e 0,5 µM TDZ. Durante o processo de transformação de cotilédones de *E. saligna*, a utilização da solução antioxidante foi dispensável; a pré-cultura dos explantes antes da inoculação com *A. tumefaciens* não melhorou a taxa de regeneração; o antibiótico Augmentin[®] favoreceu a organogênese em relação a cefotaxima; a concentração de canamicina interferiu na sobrevivência dos explantes mantidos em meio seletivo e apresentou efeito sobre a seleção do material transformado e, por fim, a adição da acetosiringona nos meios de co-cultura sólido e líquido teve influência positiva na eficiência da transformação dos explantes cotiledonares. Já as plantas de *N. tabacum* transformadas com o gene *p5csf129a* que apresentaram maior acúmulo de prolina, mostraram diferenças morfológicas nas folhas e flores; após a exposição à baixa temperatura, as sementes dos eventos transformados tiveram taxa de germinação superior em relação ao controle. As estruturas foliares analisadas não apresentaram diferenças qualitativas no que se refere a anatomia, porém, diferenças quantitativas foram percebidas, como o ângulo de inserção da nervura secundária com a primária diferente nas folhas das plantas com os maiores valores de prolina encontrados em comparação com o controle.

Palavras-chave: morfogênese, regulador vegetal, antibióticos, estresse abiótico, prolina, engenharia genética, *p5csf129a*.

INDIRECT ORGANOGENESIS IN *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii* AND GENETIC TRANSFORMATION OF *Eucalyptus saligna* AND *Nicotiana tabacum*

ABSTRACT

Plant breeding through genetic transformation can be an alternative way to minimize negative effects due to environment, through the insertion of genes that induce stress tolerance. *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii* hybrid is a promising material for these studies due to its tolerance to cold and frost. However, there are no studies related to its organogenesis and micropropagation yet, what is fundamental to develop efficient transformation protocols. The main objective of the first chapter was to study some factors involved with indirect organogenesis in foliar tissue and micropropagation, such as plant growth regulators and saline content of the culture media. The second chapter aimed to study some of the factors that affect the *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of *Eucalyptus saligna* cotyledonary explants, such as exposition of explants to antioxidant solution, preculture, influence of various antibiotics on bud regeneration and addition of acetosyringone to co-culture media. Finally the third chapter aimed to analyze the physiological, morphological and anatomical aspects of *Nicotiana tabacum* plants transformed with *p5csf129a* gene, through morphological evaluations, proline content quantification, study of leaf anatomy and T1 seeds germination study under different temperatures. Preliminary results about organogenesis of the hybrid indicated that bud indirect regeneration in foliar explants was low and only observed in MS N/2 medium supplemented with 0.1 μ M NAA and 0.5 μ M TDZ. In transformation process of *E. saligna* cotyledonary explants, the use of an antioxidant solution was not necessary; explants preculture before inoculation with *A. tumefaciens*; did not improve regeneration rates. Augmentin[®] antibiotic favored organogenesis in relation to cefotaxime; kanamycin concentration interfered with explant survival when maintained in a selective medium and presented effects on selection of transformed material, and finally, the addition of acetosyringone in solid and liquid co-culture media affected positively the transformation efficiency of cotyledonary explants. Plants of *N. tabacum* transformed with *p5csf129a* gene with the highest proline content presented morphological differences both in leaves and flowers. After exposition to low temperatures the seeds from transformed events had higher germination rate than the seeds from wild type plants. The leaf anatomy of the events did not present qualitative differences; however, quantitative differences were noticed, mainly regarding the secondary versus primary vein insertion angle, in leaves of the events with the highest quantities of proline when compared with wild plants.

Keywords: morphogenesis, plant growth regulator, antibiotics, abiotic stress, proline, genetic engineering, *p5csf129a*.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

Figura 1 – Aspecto de explantes foliares de *E. benthamii* x *E. dunnii* em meio de cultura MS acrescido de 0,1 μM de ANA e 0,88 μM de BAP. (A) Explante com calo (aos 14 dias). (B) Explante formando calo e oxidando (aos 21 dias). Barra: 0,5 cm. 45

Figura 2 – Aspecto de explantes foliares de *E. benthamii* x *E. dunnii* em meio MS contendo 0,1 μM de ANA e 0,1 μM de TDZ. (A) Apresentando antocianina, aos 28 dias de cultivo. (B) Com gemas aos 42 dias de cultivo. Barra: 0,5 cm. 48

Figura 3 - Aspecto dos explantes foliares de *E. benthamii* x *E. dunnii* cultivados *in vitro*. A - Meio JADS + 0,1 μM ANA + 0,5 μM TDZ + 250 mg L^{-1} PVP-40 (após 60 dias), B – Meio JADS + 0,1 μM ANA + 0,5 μM TDZ + 250 mg L^{-1} PVP-40 (após 90 dias); C- Meio MS N/2 + 0,1 μM ANA + 0,5 μM TDZ + 250 mg L^{-1} PVP-40 (após 60 dias); D- Regeneração de broto em meio MS N/2 + 0,1 μM ANA + 0,5 μM TDZ + 250 mg L^{-1} PVP-40 (após 90 dias). Barra: 0,5 cm. 51

Figura 4 - Aspecto das brotações de *E. benthamii* x *E. dunnii* aos 28 dias de cultivo *in vitro* em meio de cultura JADS (A), MS (B) e WPM (C) adicionados de 1,11 μM de BAP. Barra: 1 cm. 55

Capítulo 2

Figura 1 – T-DNA do plasmídeo pBI121 utilizado na transformação genética de *Eucalyptus saligna* contendo a construção gênica *p5csf129a* modificada (ZHANG et al., 1995). *p5cs* – gene de *V. aconitifolia*, *nptII* – gene da neomicina fosfotransferase, *gus* – gene repórter que codifica a enzima β -glucuronidase, *NOSP* – promotor do gene da nopalina sintetase, 35S-P – promotor do vírus do mosaico da couve-flor (CaMV), NOS-3' – terminador da nopalina sintetase, RB - borda direita do T-DNA, LB – borda esquerda do T-DNA. (Adaptado de Dibax et al., 2010). 70

Figura 2 - Aspecto dos explantes cotiledonares de *E. saligna gus* positivo sem (A) e com (B) período de pré-cultura de quatro dias. Barra: 0,2 mm. 77

Figura 3- Eletroforese dos produtos do PCR realizado com DNA de *Eucalyptus saligna*. A. Marcador de peso molecular (Ladder 100 pb). B. Eventos regenerados em 12,5 ou 25 mg L^{-1} de canamicina. C. Controle negativo. D. Controle positivo: DNA da bactéria contendo o gene *gus*. A flecha indica a banda do gene *gus* em três eventos regenerados e mantidos em 12,5 mg L^{-1} de Km. 80

Figura 4- Eletroforese dos produtos do PCR realizado com DNA de *Eucalyptus saligna*. A. marcador de peso molecular (Ladder 100 pb). B. Eventos de plantas de *E. saligna* regenerados em 12,5 ou 25 mg L^{-1} de canamicina. C. Controle positivo: DNA plasmidial contendo o gene *p5csf129a*. D. Controle negativo. 81

Figura 5 – Aspecto de explantes cotiledonares de *Eucalyptus saligna* aos 50 dias após a inoculação com *Agrobacterium tumefaciens*. A. Explante oxidado em meio com 300 mg L^{-1} de Augmentin[®]. B. Explante regenerando gemas em meio com 300 mg L^{-1} de

Augmentin®. C. Explante oxidado em meio contendo 500 mg L-1 de cefotaxima. D. Explante regenerando gemas em meio com 500 mg L-1 de cefotaxima. Barra: 0,5 cm..... 82

Figura 6 – Expressão do gene *GUS* em tecidos cotiledonares de *Eucalyptus saligna*, após 5 e 12 dias de co-cultura com *Agrobacterium tumefaciens*. T1: AS (50 µM) no meio de co-cultura sólido. T2: AS no meio de co-cultura líquido. T3: AS no meio de co-cultura sólido e líquido. T4: controle sem AS. T5: controle não transformado. 85

Capítulo 3

Figura 1 – A. Detalhe das cápsulas maduras e sementes de *Nicotiana tabacum*. Barra: 0,5 cm. 102

Figura 2 – A. Co-cultura de explantes foliares de *Nicotiana tabacum* na suspensão bacteriana. B. Explante *gus* positivo, aos 5 dias da transformação. C. Explante regenerando gemas após 35 dias da inoculação com a bactéria. D. Culturas *in vitro*. Barra: 0,5 cm... 104

Figura 3- Eletroforese dos produtos do PCR realizado com DNA de folhas transformadas de *Nicotiana tabacum*. A. marcador de peso molecular (Ladder 100 pb). B. Nove eventos regenerados em meio de seleção. C. Controle negativo: planta controle não transformada. D. Controle positivo: DNA plasmidial contendo o gene *gus*. E. Branco.. 104

Figura 4- Eletroforese dos produtos do PCR realizado com DNA de folhas transformadas de *Nicotiana tabacum*. A. marcador de peso molecular (Ladder 100 pb). B. Nove eventos regenerados em meio de seleção. C. Controle positivo: DNA plasmidial contendo o gene *p5csf129a*. D. Controle negativo. 104

Figura 5 - Concentração de prolina em folhas de *Nicotiana tabacum* em plantas controle e eventos transformados com o gene *p5csf129a*, aos 80 dias da aclimatização..... 105

Figura 6- Desempenho de variáveis morfológicas em plantas de *Nicotiana tabacum* transformadas com o gene *p5csf129a*, aos 20, 40, 60, 80 e 100 dias após a aclimatização em casa de vegetação..... 107

Figura 7 – Aspecto das plantas de *Nicotiana tabacum* em casa de vegetação, aos 80 dias da aclimatização. Da esquerda para a direita: controle, eventos 1, 2, 7, 11, 12 e 13. 108

Figura 8 – Flores de *Nicotiana tabacum* após 85 dias da aclimatização. A. Controle. B. Planta transformada com o gene *p5csf129a* (Evento 2). Barra: 1 cm. Seta amarela indica a diferença no comprimento do estilete..... 109

Figura 9 - Secções transversais do mesófilo de eventos transformados de *Nicotiana tabacum* com o gene *p5csf219a* e controle. Controle. 1; *p5cs-1*; 2. *p5cs-2*; 7. *p5cs-7*; 11. *p5cs-11*; 12. *p5cs-12*; 13. *p5cs-13*. Folhas retiradas do 5º nó a partir do ápice de plantas com 6 meses de cultivo em casa de vegetação. Ead: epiderme adaxial. Eab: epiderme abaxial. PP: parênquima paliçádico. PL: parênquima lacunoso. Barra: 100 µm 115

Figura 10 - Secções transversais do mesófilo de *Nicotiana tabacum*. C: Controle; 1. *p5cs-1*; 2. *p5cs-2*; 7. *p5cs-7*; 11. *p5cs-11*; 12. *p5cs-12*; 13. *p5cs-13*. Seta preta: indica parede celular. Barra: 20 µm..... 116

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1- Efeito de BAP na calogênese e oxidação de explantes foliares de *E. benthamii* x *E. dunnii* aos 14 e 28 dias da cultura em meio MS contendo 0,1 µM de ANA..... 45

Tabela 2- Calogênese e organogênese em explantes foliares de *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii*, cortados em água ou em solução antioxidante*, cultivados *in vitro* em meio MS contendo 0,1 µM de ANA e quatro concentrações de TDZ, após 42 dias. Média de 2 experimentos..... 47

Tabela 3- Calogênese e organogênese em explantes foliares de *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii* cultivados *in vitro* em meios MS N/2 e JADS, contendo 0,1 µM de ANA e duas concentrações de TDZ, com e sem PVP-40, após 70 dias. Média de 2 experimentos..... 50

Tabela 4 - Efeito de três meios de cultura adicionados de 1,11 µM de BAP na multiplicação de brotações de *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii*. Média de 2 experimentos..... 55

Capítulo 2

Tabela 1 – Explantes cotiledonares de *Eucalyptus saligna* oxidados, com calo e gemas, tratados com solução antioxidante antes da inoculação com *Agrobacterium tumefaciens*. Média de dois experimentos. Avaliação após 60 dias de cultivo 75

Tabela 2 – Efeito da pré-cultura dos explantes cotiledonares por 4 dias na calogênese e organogênese após 60 dias da inoculação e na expressão do gene *gus* após 5 dias da inoculação com *Agrobacterium tumefaciens*, em meio de cultura MS (com a concentração dos sais reduzida pela metade), adicionado de 250 mg L⁻¹ de cefotaxima e 50 mg L⁻¹ de canamicina. Média de dois experimentos..... 76

Tabela 3 - Efeito de três concentrações de Km sobre a organogênese de explantes cotiledonares de *Eucalyptus saligna* após co-cultura com *Agrobacterium tumefaciens*. Média de dois experimentos..... 79

Tabela 4 – Efeito do Augmentin[®] e da cefotaxima na organogênese indireta de explantes cotiledonares de *Eucalyptus saligna* inoculados com a bactéria, aos 60 dias de cultivo. Média de 2 experimentos..... 83

Tabela 5 – Efeito da acetosiringona (AS) na organogênese de explantes cotiledonares de *Eucalyptus saligna*, após 60 dias da inoculação com a bactéria. Média de 2 experimentos.84

Capítulo 3

Tabela 1 – Massa seca de plantas de *Nicotiana tabacum* controle e transformadas com o gene *p5csf129a* após 140 dias em casa de vegetação..... 111

Tabela 2 - Características anatômicas da lâmina foliar de <i>Nicotiana tabacum</i> transformada com o gene <i>p5csf129a</i> e do controle..	113
Tabela 3 – Valores do teste Qui-Quadrado para a hipótese de segregação das amostras das sementes T1 do controle e dos eventos de <i>Nicotiana tabacum</i> transformados com o gene <i>p5csf129a</i>	117
Tabela 4 – Taxa de germinação de sementes T1 de <i>Nicotiana tabacum</i> transformado com o gene <i>p5csf129a</i> , em diferentes temperaturas após 27 meses da transformação	121
Tabela 5 - Índice de Velocidade de Germinação (IVG) de sementes T1 de <i>Nicotiana tabacum</i> transformado com o gene <i>p5csf129a</i> , após 27 meses da transformação, em diferentes temperaturas.....	122

LISTA DE ABREVIATURAS

2,4-D	ácido 2,4-diclorofenoxiacético
AIB	ácido indolbutírico
ANA	ácido naftalenoacético
AS	acetosiringona
ATP	adenosina trifosfato
Aug	Augmentin [®]
BAP	6-benzilaminopurina
CaMV 35S	promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor
CQB	Certificado de Qualidade em Biossegurança
Cx	cefotaxima
DNA	ácido desoxirribonucléico
dNTP	desoxinucleotídeo trifosfato
DO	densidade ótica
EDTA	ácido etileno diamino tetracético
EROs	espécies reativas de oxigênio
GA3	ácido giberélico 3
<i>gus</i>	gene codificante da enzima β -glucuronidase
IPEF	Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais
JADS	meio de cultura de Correia (1993) e Correia et al. (1995)
Km	canamicina
MS	meio de Murashige e Skoog (1962)
MS/2	meio de Murashige e Skoog com a concentração de sais reduzida à metade
<i>nos</i>	gene da nopalina sintetase
<i>nptII</i>	gene da neomicina fosfotransferase II
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
pb	pares de base
PBI121	vetor binário de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
PCR	reação em cadeia da polimerase
PVP	polivinilpirrolidona
Rif	rifampicina
rpm	rotações por minuto
Taq DNA	polimerase termoestável proveniente da bactéria <i>Thermus aquaticus</i>
T-DNA	DNA de transferência
TDZ	thidiazuron
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)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	14
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1 O GÊNERO <i>Eucalyptus</i>	16
2.2 <i>Eucalyptus benthamii</i> x <i>Eucalyptus dunnii</i>	16
2.3 <i>Eucalyptus saligna</i>	18
2.4 TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE <i>Eucalyptus</i>	19
2.5 FATORES QUE INFLUENCIAM A TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA VIA <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	21
2.5.1 Regeneração.....	21
2.5.2 Utilização de acetosiringona.....	22
2.5.3 Efeito da pré-cultura	23
2.5.4 Antibióticos seletivos e agentes bactericidas	23
2.6 O PAPEL DA PROLINA NA TOLERÂNCIA AO ESTRESSE.....	24
2.7 REFERÊNCIAS	27
3 ORGANOGÊNESE INDIRETA A PARTIR DE EXPLANTES FOLIARES E MULTIPLICAÇÃO <i>in vitro</i> DE BROTAÇÕES DE <i>Eucalyptus benthamii</i> X <i>Eucalyptus dunnii</i>.....	36
RESUMO	36
ABSTRACT	37
3.1 INTRODUÇÃO	38
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	40
3.2.1 Material vegetal e meios de cultura.....	40
3.2.2 Condições gerais de cultura	41
3.2.3 Organogênese indireta de <i>Eucalyptus benthamii</i> x <i>Eucalyptus dunnii</i>	41
3.2.3.1 Utilização de combinações de BAP e ANA	41
3.2.3.2 Utilização de combinações de ANA e TDZ e de solução antioxidante	42
3.2.3.3 Utilização de dois meios de cultura, do PVP e do TDZ combinado com ANA	42
3.2.4 Utilização de diferentes meios de cultura na multiplicação de brotações	43
3.2.5 Delineamento experimental e análise estatística	44
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
3.3.1 Organogênese indireta de <i>Eucalyptus benthamii</i> x <i>Eucalyptus dunnii</i>	44

3.3.1.1 Efeito de combinações de BAP e ANA.....	44
3.3.1.2 Efeito de combinações de ANA e TDZ e de solução antioxidante	46
3.3.1.3 Efeito de dois meios de cultura, do PVP e do TDZ combinado com ANA.	49
3.3.2 Efeito de diferentes meios de cultura na multiplicação de brotações	53
3.4 CONCLUSÕES	56
3.5 REFERÊNCIAS	57
4 OTIMIZAÇÃO DA TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE <i>Eucalyptus saligna</i> VIA	
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	65
RESUMO	65
ABSTRACT	66
4.1 INTRODUÇÃO.....	67
4.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	69
4.2.1 Local dos experimentos	69
4.2.2 Material vegetal	69
4.2.3 Condições gerais de cultura.....	69
4.2.4 Desinfestação e germinação <i>in vitro</i>	69
4.2.5 Cepa bacteriana e vetor binário	70
4.2.6 Condições de cultura da bactéria, inoculação e co-cultura.....	70
4.2.7 Avaliação da expressão do gene <i>gus</i>	71
4.2.8 Solução antioxidante durante a excisão dos explantes cotiledonares.....	71
4.2.9 Pré-cultura de explantes cotiledonares	72
4.2.10 Utilização de diferentes concentrações do antibiótico canamicina (Km) na regeneração de gemas e transformação genética	72
4.2.11 Regeneração de gemas em explantes cotiledonares na presença de antibióticos.....	73
4.2.12 Acetosiringona (AS) na eficiência da transformação	74
4.2.13 Extração de DNA e análise de integração do transgene.....	74
4.2.14 Delineamento experimental e análise estatística	75
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	75
4.3.1 Efeito da solução antioxidante durante a excisão dos explantes cotiledonares.....	75
4.3.2 Influência da pré-cultura na eficiência da transformação.....	76
4.3.3 Utilização de diferentes concentrações de canamicina na seleção das células transformadas	78
4.3.4 Efeito de dois antibióticos na regeneração de gemas em explantes cotiledonares.....	82
4.3.5 Efeito da acetosiringona (AS) na eficiência da transformação.....	84

4.4 CONCLUSÕES	86
4.5 REFERÊNCIAS	87
5 CAPITULO 3 – ESTUDO DE PLANTAS DE <i>Nicotiana tabacum</i> TRANSFORMADAS COM O GENE <i>p5csf129a</i>.....	93
RESUMO	93
ABSTRACT	94
5.1 INTRODUÇÃO.....	95
5.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	96
5.2.1 Local dos experimentos	96
5.2.2 Material vegetal	96
5.2.3 Condições gerais de cultura	96
5.2.4 Desinfestação, germinação e multiplicação <i>in vitro</i>	97
5.2.5 Cepa bacteriana e vetor binário	97
5.2.6 Condições de cultura da bactéria, inoculação e co-cultura.....	97
5.2.7 Avaliação da expressão do gene <i>gus</i>	98
5.2.8 Extração de DNA e análise de integração do transgene.....	98
5.2.9 Aclimatização das plantas	99
5.2.10 Determinação do teor de prolina	99
5.2.11 Análises morfológicas de T0	100
5.2.12 Análises anatômicas das folhas	100
5.2.13 Análise da segregação de sementes T1	101
5.2.14 Análise do efeito do frio na germinação de T1	102
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	103
5.3.1 Expressão do gene <i>gus</i> e integração do gene <i>p5csf129a</i>	103
5.3.2 Determinação do teor de prolina	105
5.3.3 Análises morfológicas de plantas T0.....	106
5.3.4 Análises anatômicas das folhas	112
5.3.5 Análise da segregação e efeito do frio na germinação de sementes em T1	117
5.4 CONCLUSÕES	123
5.5 REFERÊNCIAS	124
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	129
ANEXOS	130

1 INTRODUÇÃO GERAL

A grande demanda de matéria-prima, principalmente para a produção de celulose, carvão vegetal e madeira sólida para serrarias, justifica o forte desenvolvimento dos plantios com algumas espécies do gênero *Eucalyptus* (ALFENAS et al., 2004). Em 2011, no Brasil esses plantios totalizaram cerca de 4,8 milhões de hectares, representando um aumento de 2,5% em relação a 2010 (ABRAF, 2012). As principais áreas de distribuição dos plantios estão em Minas Gerais (1.401.787 ha), São Paulo (1.031.677 ha), Bahia (607.440 ha), Mato Grosso do Sul (475.528 ha), Rio Grande do Sul (280.198 ha), Espírito Santo (197.512 ha) e Paraná (188.530 ha) (ABRAF, 2012).

Considerando a importância econômica das espécies florestais, árvores maduras com características fenotípicas desejáveis vêm sendo selecionadas ao longo do tempo e incorporadas em programas de melhoramento, visando à obtenção de genótipos mais produtivos (GARTLAND et al., 2003). Embora a contribuição desses programas tenha sido expressiva para o aumento da produtividade no setor florestal, os mesmos têm esbarrado em limitações conseqüentes de características intrínsecas a essas espécies, destacando-se o longo tempo necessário para as plantas atingirem uma estabilidade fenotípica e maturidade reprodutiva, dificuldade de controle nos cruzamentos entre espécies, baixa variabilidade genética, entre outras (DIOUF, 2003; POUPIN e ARCE-JOHNSON, 2005; NEHRA et al. 2005).

Diante disso, na década de 80, as técnicas biotecnológicas vieram juntar-se ao melhoramento genético convencional, permitindo a obtenção de genótipos com maior produtividade e qualidade. Dentre essas técnicas, destaca-se a transformação genética, a qual consiste na introdução controlada de um gene ou fragmento de DNA no genoma de uma célula receptora e sua posterior expressão (DIOUF, 2003). Dessa forma, a transformação abre novas perspectivas aos programas de melhoramento, ampliando e disponibilizando novos genes para determinadas características impostas pela incompatibilidade sexual ou pela variabilidade genética (SARTORETTO et al., 2008).

Embora a transformação genética tenha alcançado avanços consideráveis nos últimos anos, ela é fortemente afetada por diversos fatores relacionados à cultura de tecidos vegetais. Além de um protocolo eficiente de regeneração *in vitro*, existem outros fatores que podem afetar o sucesso da transformação genética por meio de *Agrobacterium tumefaciens*. Dentre eles, destacam-se a presença de compostos fenólicos e osmoprotetores, a pré-cultura e co-

cultura, as cepas de *A. tumefaciens*, a composição da suspensão bacteriana (QUOIRIN e QUISEN, 2006), além do tipo e concentração dos antibióticos seletivos e bactericidas, composições salinas do meio de cultura, balanço entre os reguladores vegetais, entre outros.

Além dos entraves impostos pelo cultivo *in vitro*, a estabilidade do transgene e sua possível influência na expressão de outros genes ou, até mesmo, a influência da sua superexpressão ou supressão, necessitam ser considerados. De acordo com Brasileiro e Dusi (1999), muitas vezes a expressão do gene introduzido é instável, podendo declinar ou mesmo desaparecer durante o desenvolvimento da planta transgênica. Ainda de acordo com esses autores, existe uma evidente interação entre os transgenes, onde as sequências de DNA de uma inserção podem interferir na expressão do transgene de outra inserção. Assim, fenômenos como co-supressão, epistasia e silenciamento de gene podem ser frequentemente observados (BRASILEIRO e DUSI, 1999). Esses fenômenos podem ser evidenciados, em alguns casos, por meio do fenótipo das plantas transformadas.

Este trabalho teve como objetivo inicial definir um protocolo de organogênese e transformação para o híbrido *E. benthamii* x *E. dunnii*. Contudo, tendo em vista a baixa taxa de organogênese encontrada no híbrido, o trabalho voltou-se para o estudo de fatores que podem interferir na eficiência da transformação genética de *Eucalyptus saligna*. Entretanto, as plantas regeneradas não foram transformadas com o gene de interesse, o *p5csf129a*, somente com o gene repórter. Finalmente o trabalho foi direcionado para a transformação genética de uma planta modelo com o gene *p5csf129a*, com o intuito de analisar possíveis alterações que a inserção do transgene poderia causar em T1.

Diante do exposto, o objetivo geral desse trabalho foi estudar os principais entraves encontrados durante a organogênese e transformação de espécies recalcitrantes, como o *Eucalyptus*, e verificar as consequências da transformação com o gene *p5csf219a* de uma espécie modelo. Para isso, o trabalho foi dividido em três capítulos. O primeiro capítulo teve como objetivo principal estabelecer um protocolo de organogênese para o híbrido *E. benthamii* x *E. dunnii*, visto a falta de relatos na literatura sobre o tema e o grande potencial do híbrido para estudos com transformação genética. O segundo capítulo visou estudar o efeito de alguns fatores que podem afetar a transformação genética em explantes cotiledonares de *E. saligna*. Por fim, o terceiro capítulo objetivou avaliar as possíveis modificações morfofisiológicas e anatômicas decorrentes da inserção do gene *p5csf129a* em plantas de *Nicotiana tabacum*, além da germinação de sementes T1 sob diferentes temperaturas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O GÊNERO *Eucalyptus*

O gênero *Eucalyptus* é um dos membros da família Myrtaceae, composto por mais de 700 espécies (BROOKER, 2000). Este gênero está ganhando importância econômica em todo o mundo por ser largamente explorado como uma das principais fontes de biomassa (GIRIJASHANKAR, 2011). A grande demanda de matéria-prima, principalmente para a produção de celulose, carvão vegetal e madeira sólida para serrarias, justifica o forte desenvolvimento dos plantios com algumas espécies do gênero *Eucalyptus* (ALFENAS et al., 2004).

Em 2011, os plantios de *Eucalyptus* no Brasil totalizaram cerca de 4,8 milhões de hectares, representando um aumento de 2,5% em relação a 2010 (ABRAF, 2012). Neste mesmo ano, o aumento da área plantada de *Eucalyptus* foi alavancado pelos investimentos de empresas nacionais do segmento de Papel e Celulose, sendo que as maiores expansões ocorreram nos Estados do Tocantins (37,8%), Mato Grosso do Sul (25,7%), Paraná (16,6%) e Maranhão (9,5%) (ABRAF, 2012).

No Brasil, na área de florestas plantadas com *Eucalyptus*, predomina *Eucalyptus grandis*, que ocupa 55% da área total, seguido de 17% com *Eucalyptus saligna*, 9% com *Eucalyptus urophylla*, 2% com *E. viminalis*, 11% com híbridos de *E. grandis* x *E. urophylla* e 6% com outras espécies. A maioria dos plantios está localizada nas regiões sul e sudeste do país (CAMPOS et al., 2011).

2.2 *Eucalyptus benthamii* x *E. dunnii*

Uma das primeiras populações genéticas base de *E. benthamii* no Brasil, foi introduzida pela Embrapa Florestas - CNPF no ano de 1988, em Colombo - PR. Esse povoamento consta de famílias misturadas de sete a dez matrizes da procedência Wentworth Falls (NSW), Austrália (GRAÇA; SHIMIZU; TAVARES, 1999). No ano de 2005, com a finalidade de ampliar a base genética da população de *E. benthamii* existente no Brasil, a Embrapa Florestas importou 36 lotes de sementes na forma de progênies de polinização aberta, e ainda, lotes adicionais formados a partir da mistura de sementes colhidas em árvores

pertencentes a duas populações naturais (PALUDZYSZYN FILHO; SANTOS; FERREIRA, 2006).

Estudos apontam grande probabilidade de uso da espécie para fins industriais e energéticos (HIGA; PEREIRA, 2003; PALUDZYSZYN FILHO; SANTOS; FERREIRA, 2006). Entretanto, atualmente, não é aconselhado o seu uso para serraria, pois além das rachaduras do topo das toras e tábuas, apresenta empenamento e rachaduras internas durante a secagem, com índices elevados de contração volumétrica e de coeficiente de anisotropia, mesmo em condições amenas de secagem em temperatura ambiente e a sombra (HIGA; PEREIRA, 2003).

No Brasil, o híbrido introduzido pela Embrapa Florestas, na região de Colombo - PR, apresentou alta resistência à geadas, rápido crescimento, boa forma de fuste e alta homogeneidade do talhão (GRAÇA; SHIMIZU; TAVARES, 1999). Em plantio experimental realizado em Guarapuava - PR, Paludzyszyn Filho, Santos e Ferreira (2006) também constataram forte tolerância de *E. benthamii* a geadas, sendo essa superior ao *E. dunnii*. Essas características tornaram *E. benthamii* uma excelente opção para reflorestamentos em regiões de clima frio, principalmente em localidades onde ocorrem geadas frequentes e severas, como no Sul do Brasil (GRAÇA; SHIMIZU; TAVARES, 1999; PALUDZYSZYN FILHO; SANTOS; FERREIRA, 2006).

E. dunnii Maiden apresenta características adequadas para a produção de celulose (FERREIRA et al., 1997) e potencialidade para a confecção de chapas de madeira-cimento (LATORRACA; IWAKIRI, 2000). Pereira et al. (1986) concluíram que a espécie produziu madeira de qualidade inferior como fonte de energia, ao comparar com *E. viminalis* e bracinga (*Mimosa scabrella*). Estes autores relataram, porém, que os altos níveis de produtividade observados compensaram esse resultado e *E. dunnii* foi considerada como uma das principais alternativas para a produção de madeira para fins energéticos na Região Sul do Brasil.

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

Por ser um híbrido espontâneo recente, há poucos trabalhos publicados sobre *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii* na literatura. Estudos envolvendo a miniestaquia

de três clones, denominados H12, H19 e H20, foram recentemente publicados (BRONDANI et al., 2010; BRONDANI et al., 2012; KRATZ, et al., 2012).

Há relatos iniciais sobre o cultivo *in vitro* destes mesmos três clones (BRONDANI et al., 2009; BRONDANI et al., 2011). Brondani et al. (2009) testaram diferentes concentrações de NaOCl na assepsia de segmentos nodais dos clones H12, H19 e H20 para o estabelecimento *in vitro* em meio MS, bem como de BAP para a multiplicação e ANA para o alongamento. Foi recomendada a concentração de 0,5% de NaOCl para a desinfestação dos segmentos nodais. A concentração de BAP no meio de cultura MS/2 (com a concentração dos sais reduzida de metade) que promoveu maior proliferação de gemas axilares para o clone H12 aos 60 dias foi estimada na faixa de 0,25 a 0,30 mg L⁻¹ e, para o alongamento destas brotações, foi recomendado 0,25 a 0,75 mg L⁻¹ de ANA com 0,05 mg L⁻¹ de BAP. Os mesmos autores (Brondani et al., 2011) determinaram a concentração ótima de BAP e ANA para a proliferação de gemas e a relação entre BAP e ácido giberélico (GA3) em dois meios de cultura (MS e MS/2) para o alongamento de brotações dos três clones. A combinação de 0,50 mg L⁻¹ de BAP e 0,05 mg L⁻¹ de ANA proporcionou melhor proliferação de gemas para os genótipos H12 e H20. Os autores também recomendaram as concentrações de 0,10 e 0,20 mg L⁻¹ de GA3 combinadas com 0,10 mg L⁻¹ de BAP em MS/2, por promoverem melhores resultados no alongamento, para os clones H12 e H20, respectivamente. Eles também concluíram que o enraizamento foi baixo, tanto para condições *in vitro* quanto para *ex vitro*.

Tendo em vista a possibilidade do híbrido entre *E. benthamii* e *E. dunnii* poder associar características interessantes de ambos materiais, como a tolerância a geadas e a qualidade da madeira, aliado a possibilidade dos programas de melhoramento otimizarem a expansão da cultura em ambientes adversos a partir da transformação genética de plantas, estudos *in vitro* com esse material tornam-se fundamentais para essa finalidade.

2.3 *Eucalyptus saligna*

A espécie *Eucalyptus saligna* está relativamente bem adaptada em todo o território nacional (FERRAZ e COUTINHO, 1984), porém não apresenta tolerância ao frio (LE ROUX e VAN STADEN, 1991), sendo suscetível aos efeitos da geada. *E. saligna* também é considerada suscetível à seca e pouco tolerante ao excesso de umidade (ALFENAS et al., 2004), o que resulta em produtividades significativamente reduzidas quando as plantações dessa espécie são expostas a estresses abióticos (BOYER, 1982). Porém, clones selecionados

podem ter a sua produtividade aumentada pela incorporação da tolerância a estresses abióticos pela transformação genética dentro de programas de melhoramento genético (BARRUETO CID et al., 1999).

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).

Até a data, poucos estudos *in vitro* foram conduzidos para a espécie *E. saligna*. Informações relacionadas à organogênese indireta de gemas surgiram com os estudos de DIBAX et al. (2010b). Eles verificaram diferenças na resposta morfogênica na regeneração de gemas entre cotilédones e folhas de acordo com combinações de ANA e TDZ. Em explantes foliares, o meio de cultura MS com a concentração dos nitratos de amônio e potássio reduzidas à metade, com 0,1 μM de ANA e 1,0 μM de TDZ, induziu a formação de calos em 73% dos explantes, regeneração de gemas em 30% e um número médio de 13 gemas por explante. Já em explantes cotiledonares, este mesmo meio de cultura favoreceu a calogênese em 85% dos explantes, regeneração de gemas em 40%, um número médio de 4,25 gemas por explante, além de 45% de mortalidade dos explantes.

2.4 TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE *Eucalyptus*

A transformação genética, além de acelerar o processo de melhoramento, transpõe as barreiras de incompatibilidade sexual que algumas plantas apresentam, com a introdução de genes específicos em células vegetais (MORAES-FERNANDES, 1987). 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 (QUOIRIN e QUISEN, 2006).

Estudos utilizando o método indireto de transferência de genes, ou seja, por meio de *A. tumefaciens*, são mais frequentes em *Eucalyptus* do que os métodos diretos, como por exemplo em *E. globulus* (CHRIQUI et al., 1991; AZMI et al., 1997; MORALEJO et al., 1998; NUGENT et al., 2001), *E. grandis* (ESMERALDO et al., 1997; PURSE, 1997), *E.*

camaldulensis (MULLINS et al., 1997; HO et al., 1998; VALÉRIO et al., 2003), *E. gunnii* (CHRIQUI et al., 1991), *E. grandis* x *E. urophylla* (TOURNIER et al., 2003; GONZALEZ et al., 2002; ALCANTARA et al., 2011) e *E. saligna* (DIBAX, et al., 2010). Além desses, estudos recentes utilizando o método indireto também foram publicados. Ouyang et al. (2012) obtiveram plantas transgênicas de *Eucalyptus urophylla* resistentes a *Phytophthora capsici* expressando o gene *Rs-AFP2*, que codifica uma proteína antifúngica. Matsunaga et al. (2012) inseriram o gene *codA* (*choline oxidase gene*) em *Eucalyptus globulus* e comprovaram a tolerância à salinidade nas plantas transformadas.

Tendo em vista a tolerância a estresse abiótico, Dibax et al. (2010) evidenciaram um aumento significativo nos níveis de prolina nos tecidos foliares de *E. saligna* transformados com o gene *p5csf129a*, sendo que a quantidade de prolina acumulada na parte aérea das plantas transformadas foi quatro vezes superior a quantidade encontrada em plantas controle. Uma forma de induzir a tolerância aos mais diversos tipos de estresses abióticos é por meio da utilização dos genes *dreb*, que são induzidos pelo frio e seca, cujos estudos de transformação genética com *E. camaldulensis* e o híbrido *E. grandis* x *E. urophylla* foram realizados (KONDO et al., 2002).

Quisen (2007) iniciou estudos de transformação genética em *Eucalyptus camaldulensis*, objetivando a utilização da espécie na fitorremediação de áreas contaminadas com metais pesados, através da inserção do promotor do gene *cgmt1*. Esse gene codifica a proteína metalotioneína que atua na proteção das células quando expostas a concentrações excessivas de metais pesados.

No processo de fabricação da celulose, se faz necessária a separação da celulose da lignina e este processo apresenta um custo elevado, além de ser poluente. Visando a redução da produção de lignina, Tournier et al. (2003) transformaram *E. grandis* x *E. urophylla* com as construções antisense do gene *cad* (álcool cinamil desidrogenase), uma enzima chave no processo de lignificação, isolado de *E. gunnii* (GRIMA-PETTENATI et al., 1993). Os autores verificaram inibição da atividade *cad* e redução na biossíntese de lignina.

A resistência a insetos pode ser obtida pela inserção de genes *cry* (de *Bacillus thuringiensis*). HARCOURT et al. (2000) obtiveram plantas transgênicas de *Eucalyptus camaldulensis* expressando o gene *cry3A*, mostrando resistência a larvas de *Chrysophthata bimaculata*, *C. agrícola* e *C. variicolis*.

2.5 FATORES QUE INFLUENCIAM A TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE *Eucalyptus* VIA *Agrobacterium tumefaciens*

2.5.1 – Regeneração

Para o estabelecimento de um protocolo de transformação é primordial que se tenha já estabelecido um eficiente método de regeneração, que possibilite o desenvolvimento de plantas inteiras a partir das células transformadas, visando sua posterior clonagem.

O sucesso da regeneração *in vitro* depende do controle da morfogênese, que é influenciada por vários fatores de base genética, pelo tipo de explante, pelos componentes nutricionais, reguladores vegetais e condições de incubação (GIRI et al., 2004).

Nos trabalhos realizados por BRONDANI et al. (2009 e 2011) foram estudados o estabelecimento *in vitro*, a multiplicação e o alongamento de três clones de *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii*, denominados H12, H19 e H20, não sendo contemplada a regeneração de gemas adventícias. Esses estudos iniciais foram importantes para o conhecimento do comportamento do híbrido em relação à micropropagação, que é uma etapa importante do programa de melhoramento genético via transformação. Entretanto, há carência de informações fundamentais sobre o processo de regeneração, necessário para o melhoramento via transformação genética. Além disso, a eficiência da regeneração em cultura de tecidos tem sido descrita como uma característica quantitativa, que varia frequentemente entre espécies vegetais e dentro de uma mesma espécie, entre subespécies, variedades, cultivares ou ecotipos. Variações na regeneração de brotos podem ser problemáticas especialmente quando clones elite tem difícil regeneração (DECOOK et al., 2006).

Tecidos e órgãos de plantas são cultivadas *in vitro*, em meios artificiais, que fornecem os nutrientes necessários para o crescimento. O sucesso da cultura de tecidos como forma de propagação de plantas é fortemente influenciado pela natureza do meio de cultura utilizado (GEORGE et al., 2008). Para um crescimento normal e vigoroso sob condições *in vitro*, uma planta requer elementos no meio de cultura como os macronutrientes, micronutrientes, reguladores vegetais, vitaminas, aminoácidos e outros compostos nitrogenados, e fontes de carbono (açúcares) (YASEEN et al., 2013).

Na regeneração via organogênese, a influência exercida pela composição dos meios de cultura tem sido estudada em várias espécies do gênero *Eucalyptus* (QUISEN et al., 2009). Esta influência pode variar em função da composição em macro e micronutrientes do meio de cultura, do uso de agentes antioxidantes, do balanço entre os reguladores vegetais utilizados,

dentre outros. Dibax et al. (2010a) estudaram a influência dos meios de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), WPM (LLOYD e MCCOWN, 1980) e JADS (CORREIA et al., 1995), adicionados de 2,7 μM de ANA e 4,4 μM de BAP, na organogênese em explantes cotiledonares de *Eucalyptus camaldulensis*. Estes autores obtiveram maior formação de brotações com a utilização dos meios MS e WPM, 57,5 e 55% respectivamente, enquanto que no meio JADS houve formação de brotos em apenas 35% dos explantes. Esses resultados demonstram que o meio de cultura utilizado exerce influência nessa fase, o que explica a diferença nas taxas de regeneração encontradas, mesmo quando utilizadas a mesma combinação e concentração de reguladores vegetais. De maneira geral, grande parte dos trabalhos com espécies de *Eucalyptus* relataram o uso de thidiazuron (TDZ), em concentrações que variam de 0,05 a 2,5 μM , para a indução de calos a partir de diferentes tecidos, como, por exemplo, folhas (DIBAX et al., 2010b) e folhas cotiledonares (AZMI et al., 1997; NUGENT et al., 2001).

Há relatos mostrando que a capacidade organogênica é fortemente afetada após o contato com *A. tumefaciens*. Dentre os fatores envolvidos, a utilização do antibiótico na eliminação da bactéria após a co-cultura (NAUERBY et al., 1997), bem como a presença de agentes seletivos no meio de cultura (GONZÁLEZ, 2002), merecem destaque.

2.5.2 Utilização de acetosiringona

A virulência da *Agrobacterium tumefaciens* é devida à expressão dos genes *vir* e é induzida naturalmente por compostos fenólicos liberados pelos tecidos feridos da planta (STACHEL e NESTER, 1986). A adição desses compostos nos meios de cultura estabelecidos nos protocolos de transformação tem como objetivo estimular a virulência da *Agrobacterium*, sendo que os mais utilizados para esse fim são: acetosiringona, hidroxacetosiringona e os álcoois sinapil e coniferil (QUOIRIN e QUISEN, 2006).

Em *E. grandis* x *E. urophylla* é recomendada a utilização de 50 μM de acetosiringona nos meios de pré-cultura, de reativação celular e de co-cultura (TOURNIER et al., 2003). Estudo com *E. globulus* concluiu que a concentração de acetosiringona varia em função do clone e do meio de cultura utilizado, sendo que a concentração recomendada oscila de 20 a 100 μM (VALÉRIO, 2000).

2.5.3 Efeito da pré-cultura

O período de pré-cultura compreende o período anterior ao contato do explante com a bactéria. Sangwan et al. (1992) mostraram que a adição de auxina e citocinina na pré-cultura em *Arabidopsis thaliana* induzem a desdiferenciação celular, aumentando a frequência de transformação.

Em espécies do gênero *Eucalyptus*, já foram relatados períodos de pré-cultura variando de um a oito dias, porém períodos de um a cinco dias são mais comuns (QUOIRIN e QUISEN, 2006). Em alguns trabalhos, o período de pré-cultura recomendado variou de um a seis dias (HO et al., 1998; MORALEJO et al., 1998; TOURNIER et al., 2003; ALCANTARA, et al., 2011), com resultados superiores a não utilização da pré-cultura.

Contudo, para *Vigna mungo*, a pré-cultura dos explantes em meio de regeneração não proporcionou o aumento do nível de expressão do gene *gus*, sendo a maior expressão encontrada em explantes não submetidos a pré-cultura (SAINI e JAIWAL, 2007).

2.5.4 Antibióticos seletivos e agentes bactericidas

Os antibióticos utilizados regularmente na transformação genética de plantas podem exercer duas funções distintas. A primeira delas diz respeito ao sistema de seleção dos transformantes. A segunda função está relacionada à supressão ou eliminação de *Agrobacterium tumefaciens* da cultura *in vitro* após o período de co-cultura necessário para que ocorra a transferência do T-DNA contendo o transgene de interesse para o tecido hospedeiro (QUISEN et al., 2009).

Dentre os genes de seleção, o da neomicina fosfotransferase (*nptII*) é o mais utilizado para a seleção de células transformadas, pois é a enzima *nptII* que inativa antibióticos aminoglicosilados como as canamicinas A, B e C, neomicina e gentamicina, dentre outros (BRASILEIRO e DUSI, 1999).

As concentrações ótimas de canamicina (Km) para a seleção das células transformadas sem prejuízo para a regeneração são muito variáveis. Por exemplo, na seleção de células transformadas de *E. camaldulensis*, Mullins et al. (1997) utilizaram 9 mg L⁻¹ de Km, da mesma forma que Quisen et al. (2009). Por outro lado, Ho et al. (1998), trabalhando com a mesma espécie, utilizaram 40 mg L⁻¹ de Km, obtendo a inibição da calogênese. Já para *E.*

globulus, as concentrações de Km definidas para seleção de calos transformados foram 100 mg L⁻¹ (SERRANO et al., 1996) e 75 mg L⁻¹ (MORALEJO et al., 1998).

Após o período de co-cultura com a solução bacteriana, os tecidos vegetais necessitam ser descontaminados com antibióticos que eliminem as células bacterianas, não mais desejáveis nesse momento, para que não interfiram no crescimento e desenvolvimento das células vegetais. Os principais antibióticos bactericidas utilizados na transformação de *Eucalyptus* são a cefotaxima, em concentrações que variam de 200 a 600 mg L⁻¹, carbenicilina, timentina e amoxicilina (MACHADO et al., 1997; MORALEJO et al., 1998; GONZÁLES et al., 2002; SPOKEVICIUS et al., 2005), além de Augmentin[®] (amoxicilina/ácido clavulânico) (QUISEN et al., 2009; TOURNIER et al., 2003).

2.6 O PAPEL DA PROLINA NA TOLERÂNCIA AO ESTRESSE

A L-prolina é um dos 20 aminoácidos presentes nas proteínas de todos os organismos vivos (CHERIAN et al., 2006). Nas plantas, a prolina 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).

Srinivas e Balasubramanian (1995) relataram que a prolina protege a membrana celular e as proteínas contra os efeitos adversos causados por altas concentrações de íons inorgânicos e temperaturas extremas, além de funcionar como um osmólito compatível inibitório da agregação de proteínas. 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).

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. Esse gene mutante, chamado de *p5csf129a*, foi utilizado para estabelecer resultados comparativos de quantidade de prolina acumulada em plantas de *Nicotiana tabacum* expressando o gene selvagem *p5cs*. A partir daí, alguns trabalhos foram publicados relatando a transformação

genética de algumas espécies de plantas com esse gene mutante, visando o suprimento ou aumento da expressão das enzimas chaves envolvidas no metabolismo da prolina e estas plantas apresentaram, de uma forma geral, maior tolerância a estresses abióticos.

Hong et al. (2000) constataram em plantas transgênicas de tabaco expressando o gene mutante *p5csf129a*, um acúmulo de prolina 2 vezes superior do que nas plantas não transformadas sob condições normais de cultivo e, sob estresse salino, os níveis de prolina foram ainda maiores nas plantas transgênicas.

Em plantas do porta-enxerto citrange Carrizo, transformadas com o gene mutante *p5csf129a*, houve acúmulo de altas concentrações de prolina nas folhas e, conseqüentemente, estas apresentaram maior tolerância ao estresse hídrico (MOLINARI et al., 2004).

Dibax et al. (2010b) evidenciaram um aumento significativo nos níveis de prolina nos tecidos foliares de *E. saligna* transformados com o gene *p5csf129a*, sendo que a quantidade de prolina acumulada na parte aérea das plantas transformadas foi quatro vezes superior à quantidade encontrada em plantas controle.

Em citrumelo Swingle transformado com o gene *p5csf129a*, Campos et al. (2011) observaram que o aumento do conteúdo de prolina nas folhas das plantas transgênicas desempenhou um papel importante contra o estresse oxidativo induzido pelo período de déficit hídrico e afetou a atividade de enzimas antioxidantes.

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). Resultados preliminares mostraram que a expressão induzida do gene *p5cs*, na segunda geração de plantas transgênicas de arroz, proporcionou um aumento da biomassa refletindo no aumento da massa fresca de raiz e da parte aérea sob condições de estresse hídrico e salino (ZHU et al., 1998).

Há vários relatos na literatura do efeito positivo que o acúmulo de prolina acarreta nas plantas devido à proteção contra condições abióticas adversas. Contudo, há poucos relatos referentes a alterações morfológicas, fisiológicas e anatômicas possivelmente causadas pelo acúmulo exagerado de prolina nas plantas. Hare et al. (2002) verificaram danos na ultraestrutura de cloroplastos e mitocôndrias em plântulas de *Arabidopsis thaliana* tratadas com prolina exógena. Esse fato indica possíveis danos que este aminoácido pode causar quando as plantas acumulam prolina em altas concentrações.

A expressão antisense do gene *p5cs* inibiu a produção de prolina em *Arabidopsis thaliana*, 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.

Esses trabalhos demonstraram que a inserção de transgenes que estimulam a superprodução de prolina podem afetar outras rotas metabólicas e celulares ou até mesmo, a expressão de outros genes, responsáveis pelo controle da morfogênese.

2.7 REFERÊNCIAS

ALCANTARA, G. B.; BESPALHOK FILHO, J. C.; QUOIRIN, M. Organogenesis and transient genetic transformation of the hybrid *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*. **Scientia Agricola**, v. 68, n. 2, p. 246-251, 2011.

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

ASSIS, T. F. de; BAUER, J. F. dos S.; TAFAREL, G. Sintetização de híbridos de *Eucalyptus* por cruzamentos controlados. **Ciência Florestal**, v. 3, n.1, p. 161-170, 1993.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTORES DE FLORESTAS PLANTADAS. **Anuário Estatístico da ABRAF 2012**: ano base 2011. Brasília, 2012, 145p. Disponível em <<http://www.abraflor.org.br/estatisticas/ABRAF12/ABRAF12-BR.pdf>>. Acesso em 10 de novembro de 2012.

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

BAJAJ, S.; JAYAPRAKASH, T.; LI-FREI, L.; HO, T. H. D.; WU, R. Transgenic approaches to increase dehydration-stress tolerance in plants. **Molecular Breeding**, v. 5, p. 493-503. 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.

BOYER J.S. Plant productivity and environment. **Science**, v.218, p. 443-448,1982.

BRASILEIRO, A.C.M.; DUSI, D.M.A. Transformação genética de plantas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPH, 1999. p. 679-735.

BRONDANI, G. E.; DUTRA, L., F.; GROSSI, F.; WENDLING, I.; HORNIG, J. Estabelecimento, multiplicação e alongamento *in vitro* de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cambage X *Eucalyptus dunnii* Maiden. **Revista Árvore**, v. 33, n. 1, p. 11-19, 2009.

BRONDANI, G. E.; GROSSI, F.; WENDLING, I.; DUTRA, L. F.; ARAUJO, M. A. Aplicação de IBA para o enraizamento de miniestacas de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cambage x *Eucalyptus dunnii* Maiden. **Acta Scientiarum-Agronomy**, v. 32, n. 4, p. 667-674, 2010.

BRONDANI, G. E.; DUTRA, L.F.; WENDLING, I.; GROSSI, F.; HANSEL, F.A.; ARAUJO, M. A. Micropropagation of an Eucalyptus hybrid (*Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii*). **Acta Scientiarum-Agronomy**, v. 33, n. 4, p. 655-663, 2011.

BRONDANI, G. E.; WENDLING, I.; BRONDANI, A. E.; ARAUJO, M. A.; SILVA, A. L. L.; GONÇALVES, A. N. Dynamics of adventitious rooting in mini-cuttings of *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii*. **Acta Scientiarum-Agronomy**, v. 34, n. 2, p. 169-178, 2012.

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

CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios Nutritivos. In: TORRES, A.C.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI; Embrapa-CNPQ, 1998. v.1, p.87-133.

CAMPOS, D. T. S.; SILVA, M. C. S.; DA LUZ, J. M. R.; TELESFORA, R. J.; KASUYA, M. C. M. Colonização micorrízica em plantios de eucalipto. **Revista Árvore**, v. 35, n. 5, p. 965-974, 2011.

CAMPOS, M. K. F.; CARVALHO, K.; SOUZA, F. S. S.; MARUR, C. J.; PEREIRA, L. F. P.; BESPALHOK-FILHO, J.C.; VIEIRA, L. G. E. Drought tolerance and antioxidant enzymatic activity in transgenic 'Swingle' citrumelo plants over-accumulating proline. **Environmental and Experimental Botany**, v. 72, p. 242–250, 2011.

CHERIAN, S.; REDDY, M. P.; FERREIRA, R. B. Transgenic plants with improved dehydration-stress tolerance: Progress and future prospects. **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 (p. 70-80) **Proceedings IUFRO Symposium**, Durban, South Africa, 2-6 Sept. 1991.

CORREIA D.; GONÇALVES A. N.; COUTO, H. T. Z.; RIBEIRO, M. C. Efeito do meio de cultura líquido e sólido no crescimento e desenvolvimento de gemas de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* na multiplicação in vitro. **IPEF**, n. 48/49, p. 107-116, 1995.

DECOOK, R.; LALL, S.; NETTLETON, D.; HOWELL, S. H. **Genetic Regulation of Gene Expression During Shoot Development in *Arabidopsis***. *Genetics*, v. 172, p. 1155–1164, 2006.

DIBAX, R.; QUISEN, R. C.; BONA, C.; QUOIRIN, M. Plant Regeneration from cotyledonary explants of *Eucalyptus camaldulensis* Dehn and histological study of organogenesis *in vitro*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n. 2, p. 311-318, 2010a.

DIBAX, R.; DESCHAMPS, C.; BESPALHOK FILHO, J. C.; VIEIRA, L. G. E.; MOLINARI, H. B. C.; CAMPOS, M. K. F. DE; QUOIRIN, M. Organogenesis and *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of *Eucalyptus saligna* with *P5CS* gene. **Biologia Plantarum**, v. 54, n. 1, p. 6-12. 2010b.

DIOUF, D. Genetic transformation of forest trees. **African Journal of Biotechnology**, v.2, n.10, p.328-333, 2003.

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

FERRAZ, E. S. B. e COUTINHO, A. R. Efeitos da geada na madeira de *Eucalyptus saligna*. **IPEF**, v. 28, p.57-62,1984.

FERREIRA, G. W.; GONZAGA, J. V.; FOELKEL, C. E. B.; ASSIS, T. F.; RATNIEKS, E.; DA SILVA, M. C. M. Qualidade da celulose kraft-antraquinona de *Eucalyptus dunnii* plantado em cinco espaçamentos em relação ao *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus saligna*. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 7, n. 1, p. 41-63, 1997.

GARTLAND, K. M. A.; CROW, R. M.; FENNING, T. M.; GARTLAND, J. S. Genetically modified trees: production, properties, and potential. **Journal of Arboriculture**, v.29, n.5, p.259-266, 2003.

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK, G. J. et al. **Plant Propagation by Tissue Culture**. Springer Netherlands, 2008. 65-113p.

GERARD, H.; LE SAOS, J.; BILLARD, J. P.; TREMOLIERES, A.; BOUCAUD, 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.

GIRI, C. C.; SHYAMKUMAR, B.; ANJANEYULU, C. Progress in tissue culture, genetic transformation and applications of biotechnology to trees: an overview. **Trees**, v. 18, p. 115–135, 2004.

GIRIJASHANKAR, V. Genetic transformation of *Eucalyptus*. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 17, n. 1, p. 9-23, 2011.

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

GRAÇA, M. E. C.; SHIMIZU, J. Y.; TAVARES, F. R. Capacidade de rebrota e de enraizamento de *Eucalyptus benthamii*. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n. 39, p. 135-138, 1999.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPQ, 1998. v.1, p.183-260.

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

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.

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.

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.

HIGA, R. C. V.; PEREIRA, J. C. D. **Usos potenciais do *Eucalyptus benthamii* Maiden et Cambage**. Colombo: Embrapa Florestas - CNPF, 2003. 4 p. (Comunicado Técnico, 100).

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.

HONG, Z.; LAKKINENI, K.; ZHANG, Z.; VERMA, D. P. S. Removal of feedback inhibition of Δ 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.

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 D1-pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants. **Plant Physiology**, v.108, p.1387- 1394, 1995.

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.

KRATZ, D.; WENDLING, I.; PIRES, P. P. Miniestaquia de *Eucalyptus benthamii* x *E. dunnii* em substratos a base de casca de arroz carbonizada. **Scientia Forestalis**, v. 40, n. 96, p. 547-556, 2012.

LATORRACA, J. V. de F.; IWAKIRI, S. Efeito do tratamento das partículas de *Eucalyptus dunnii* (Maid.), da variação da relação madeira-cimento e do uso de aditivos sobre as propriedades físicas e mecânicas de chapas de madeira-cimento. **Cerne**, Lavras, v. 6, n. 1, p. 68-76, 2000.

LE ROUX, J. J.; VAN STADEN, J. Micropropagation and tissue culture of Eucalyptus – a review. **Tree Physiology**, v.9, p. 435-477, 1991

LLOYD, G.; MCCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **International Plant Propagation Society Proceedings**, v. 30, p. 421-427, 1980.

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. **Proceedings** of IUFRO Conference on

Sylviculture and Improvement of *Eucalypts*, 2:192-199. 1997.

MATSUNAGA, E.; NANTO, K.; OISHI, M.; EBINUMA, H.; MORISHITA, Y.; SAKURAI, N.; SUZUKI, H.; SHIBATA, D.; SHIMADA, T. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Eucalyptus globulus* using explants with shoot apex with introduction of bacterial choline oxidase gene to enhance salt tolerance. **Plant Cell Reports**, v.31, n.1, p. 225-235, 2012.

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.

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

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

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, n. 3, p. 473-497, 1962.

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.

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

NEHRA, N.S., BECWAR, M.R., ROTTMANN, W.H., PEARSON, L., CHOWDHURY, K., CHANG, S., WILDE, H.D., KODRZYCKI, R.J., ZHANG, C., GAUSE, K.C., PARKS, D.W. AND HINCHEE, M.A. Forest biotechnology: Innovative methods, emerging opportunities. **In Vitro Cellular and Developmental Biology –Plant**, v. 41, n. 6, p.701–717, 2005.

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.

OUYANG, L. J.; HE, W. H.; HUANG, Z. C.; ZHAO, L. Y.; PENG, S. H.; SHA, Y. E.; ZENG, F. H.; LU, X. Y. Introduction of the *RS-AFP2* gene into *Eucalyptus urophylla* for resistance to *Phytophthora capsici*. **Journal of Tropical Forest Science**, v. 24, n. 2, p. 198-208, 2012.

PALUDZYSZYN FILHO, E.; SANTOS, P. E. T. dos; FERREIRA, C. A. **Eucaliptos indicados para plantio no Estado do Paraná**. Colombo: Embrapa Florestas - CNPF, 2006. 45 p. (Documentos, 129).

PEREIRA, J. C. D.; HIGA, A. R.; SHIMIZU, J. Y.; HIGA, R. C. V. Comparação da qualidade da madeira de três procedências de *Eucalyptus dunnii* Maiden, para fins energéticos. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n. 13, p. 9-16, 1986.

POUPIN, M.; ARCE-JOHNSON, P. Transgenic trees for a new era. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v.41, p.91- 101, 2005.

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

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

QUISEN, R. C.; OLIVEIRA, Y.; PILEGGI, M.; CUQUEL, F.; QUOIRIN, M. Selective agents and *A. tumefaciens* overgrowth-control antibiotics in *Eucalyptus camaldulensis* cotyledonary culture. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, n. 6, p. 1485-1492, 2009.

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.

SAINI, R.; JAIWAL, P.K. *Agrobacterium tumefaciens*: mediated transformation of blackgram: an assessment of factors influencing the efficiency of *uidA* gene transfer. **Biologia Plantarum**, v. 51, p. 69-74, 2007.

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

SARTORETTO, L.M.; SALDANHA, C.W.; CORDER, M.P.M. Transformação genética: estratégias e aplicações para o melhoramento genético de espécies florestais. **Ciência Rural**, v. 38, n. 3, p. 861-871, 2008.

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.

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.

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.

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.

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.

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, n. 4, p. 403-411, 2003.

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

YASEEN, M.; AHMAD, T.; SABLOK, G.; STANDARDI, A.; I HAFIZ, I. A. Review: role of carbon sources for in vitro plant growth and development. **Molecular Biology Reports**, v. 40, p. 2837-2849, 2013.

ZHANG, C. S.; LU, Q.; VERMA, D. P. S. Removal of feedback inhibition of Δ^1 -Pyrroline-5-carboxylate synthetase, a bifunctional enzyme catalyzing the first two steps of proline biosynthesis in plants. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 35, p. 20491-20496, 1995.

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 INDIRETA A PARTIR DE EXPLANTES FOLIARES E MULTIPLICAÇÃO *in vitro* DE BROTAÇÕES DE *Eucalyptus benthamii* X *Eucalyptus dunnii*

RESUMO

O melhoramento via transformação genética pode ser uma alternativa para minimizar os impactos negativos causados pelo meio ambiente, mediante a inserção de genes de tolerância a estresses ambientais. O híbrido *Eucalyptus benthamii* x *E. dunnii* pode ser promissor para estes estudos, uma vez que apresenta tolerância à baixa temperatura e a geadas. Contudo, ainda não existem estudos relacionados à organogênese desse híbrido, que são essenciais para o desenvolvimento de protocolos eficientes de transformação. Diante disto, este trabalho teve como objetivo verificar o efeito de diferentes concentrações de citocininas (BAP e TDZ) combinadas ao ANA, e a resposta do tecido à solução antioxidante e os meios de cultura JADS, MS e MS N/2, com a metade da concentração dos nitratos de amônio e potássio, durante a organogênese indireta a partir de folhas. Além disso, foi avaliada a influência dos meios MS, WPM e JADS, adicionados de BAP, durante a fase de multiplicação dos brotos. Foram obtidos resultados preliminares de organogênese, onde houve regeneração indireta de gemas em explantes foliares, entretanto, em taxas baixas. O clone utilizado foi mais responsivo ao TDZ do que a BAP durante a calogênese e formação de gemas, sendo o meio de cultura MS N/2 suplementado com 0,1 µM de ANA e 0,5 µM de TDZ o que promoveu maior formação de gemas e brotos (5,8% e 6,6%, respectivamente). Verificou-se elevada oxidação dos tecidos (de 63,3 a 100%), mesmo na presença de 250 mg L⁻¹ de PVP nos meios de cultura. Quanto à multiplicação dos brotos, os meios de cultura MS e WPM acrescidos de 1,11 µM de BAP proporcionaram maior número de brotações por explante, variando de 5,20 a 9,28 brotações. O híbrido *E. benthamii* x *E. dunnii* apresenta difícil regeneração, porém boa resposta durante a multiplicação das brotações, sendo os meios MS e WPM os mais indicados nesta fase.

Palavras-chave: regeneração, espécie lenhosa, regulador vegetal, meio de cultura.

INDIRECT ORGANOGENESIS FROM FOLIAR EXPLANTS AND *in vitro* MULTIPLICATION OF *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii* SHOOTS

ABSTRACT

Improvement through genetic transformation can be an alternative way to minimize negative effects of environment factors on plants, through the insertion of genes inducing stress tolerance. The *Eucalyptus benthamii* x *E. dunnii* hybrid is a promising material for these studies, once it is tolerant to cold and frost. However, for this hybrid there are no studies related to organogenesis yet, that are fundamental to develop efficient transformation protocols. The present work had two objectives. The first one was to verify the effect of cytokinins (BAP and TDZ) in different concentrations, combined to NAA, together with tissue response to antioxidant solution and the influence of JADS, MS and MS N/2 (with half concentration of ammonium and potassium nitrates) culture media, during indirect organogenesis in leaf explants. The second objective was to study the influence of MS, WPM and JADS media, supplemented with BAP, during the shoot multiplication phase. For organogenesis preliminary results showed that indirect bud regeneration from foliar explants was obtained, however with a low regeneration rate. Moreover, the explants were more reactive to TDZ than to BAP during callogenesis and bud formation. MS N/2 culture medium, supplemented with 0.1 μM NAA and 0.5 μM TDZ, was the most indicated for bud and shoot formation (5.8% and 6.6%, respectively). Furthermore, a considerable oxidation of the explants was observed (63.3 to 100%), even in the presence of 250 mg L^{-1} PVP in tested media. Concerning shoot multiplication, MS and WPM culture media, supplemented with 1.11 μM BAP, are recommended (5.20 to 9.28 shoots per explant). It is concluded from this study that the hybrid *E. benthamii* x *E. dunnii* presents difficult regeneration, but good response during the shoot multiplication, and the MS and WPM media are the most indicated during this phase.

Keywords: regeneration, woody species, plant growth regulator, culture medium.

3.1 INTRODUÇÃO

O *Eucalyptus* é o segundo gênero florestal mais plantado na região Sul do Brasil, para produção de celulose, papel e energia (AUER e DOS SANTOS, 2011). As geadas são um dos motivos que impedem a expansão da eucaliptocultura na região, sobretudo na fase inicial do desenvolvimento. O híbrido *Eucalyptus benthamii* x *E. dunnii* pode ser promissor para plantios em regiões frias e sujeitas a geada. Materiais oriundos da hibridação espontânea entre *E. benthamii* e *E. dunnii* estão sendo avaliados pela Embrapa Florestas (Colombo-PR) e vem apresentando superioridade em relação aos progenitores quanto ao crescimento e tolerância a geada (PALUDZYSZYN FILHO et al., 2006).

O melhoramento via transformação genética pode ser uma alternativa para minimizar os impactos negativos causados pelo meio ambiente à expansão da cultura, mediante a inserção de genes de tolerância, como por exemplo, de tolerância à seca, além de características relacionadas com o aumento da produtividade e qualidade da madeira. Ainda, de acordo com Pasquali e Zanettini (2007), a transformação genética pode reduzir o tempo necessário para a introdução de novas características de interesse. Entretanto, para o estabelecimento de um protocolo de transformação é primordial que se tenha estabelecido um eficiente método de organogênese e micropropagação que possibilitem, respectivamente, a regeneração de plantas inteiras a partir das células transformadas e sua posterior clonagem.

A micropropagação, ou propagação vegetativa *in vitro*, é a aplicação mais utilizada da cultura de tecidos vegetais e consiste na cultura asséptica de células, tecidos, órgãos e de seus componentes, sob condições físicas e químicas definidas *in vitro* (THORPE, 2007). O sucesso da regeneração *in vitro* depende do controle da morfogênese, que é influenciada por vários fatores de base genética, pelo tipo de explante, pelos componentes nutricionais, reguladores vegetais e condições de incubação (GIRI et al., 2004).

Até o presente momento existem poucos estudos relacionados à micropropagação de *E. benthamii* x *E. dunnii* (BRONDANI et al., 2009 e 2011), sendo que os trabalhos visaram definir as melhores condições para o estabelecimento *in vitro*, multiplicação e alongamento de três clones distintos, não sendo contemplada a regeneração de gemas adventícias. Entretanto, há relatos sobre a micropropagação de outros híbridos, como *E. tereticornis* x *E. camaldulensis* (BISHT et al., 1999), *E. tereticornis* x *E. grandis* (JOSHI et al., 2003), *E. erythronema* x *E. stricklandii* (GLOCKE et al., 2006) e *E. grandis* x *E. urophylla* (PEREIRA-NETTO et al., 2006; ALCANTARA et al., 2011), dentre outros.

Com isso nota-se a carência de informações fundamentais sobre o processo de organogênese em eucalipto, necessário para a transformação genética. Além disso, de acordo com Grattapaglia e Machado (1998), a variabilidade na resposta morfo genética *in vitro* existe, não apenas entre espécies do mesmo gênero, mas também entre genótipos da mesma espécie (diferentes cultivares e clones), sendo necessária a definição de protocolos diferenciados.

Além disso, a eficiência da regeneração em cultura de tecidos tem sido descrita como uma característica quantitativa, que varia frequentemente entre espécies vegetais e dentro de uma mesma espécie, entre subespécies, variedades, cultivares ou ecotipos. Variações na regeneração de brotos são prejudiciais especialmente quando se trata de clones elite (DECOOK et al., 2006).

Tecidos e órgãos de plantas são cultivadas *in vitro*, em meios artificiais, que fornecem os nutrientes necessários para o crescimento. O sucesso da cultura de tecidos como forma de propagação de plantas é fortemente influenciado pela natureza do meio de cultura utilizado (GEORGE et al., 2008). Para um crescimento normal e vigoroso sob condições *in vitro*, uma planta requer elementos no meio de cultura como os macronutrientes, micronutrientes, reguladores vegetais, vitaminas, aminoácidos e outros compostos nitrogenados e fontes de carbono (açúcares) (YASEEN et al., 2013). Em várias espécies do gênero *Eucalyptus*, a influência exercida pela composição dos meios de cultura tem sido estudada na organogênese (QUISEN et al., 2009). Dibax et al. (2010a) estudaram a influência dos meios de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), WPM (LLOYD e MCCOWN, 1980) e JADS (CORREIA et al., 1995), adicionados de 2,7 μM de ácido naftalenoacético (ANA) e 4,4 μM de benzilaminopurina (BAP), na organogênese de explantes cotiledonares de *E. camaldulensis*. Estes autores obtiveram maior formação de brotações com a utilização dos meios MS e WPM, 57,5 e 55% respectivamente, enquanto que no meio JADS houve formação de brotos em apenas 35% dos explantes. Esses resultados demonstram que o meio de cultura utilizado exerce influência nessa fase, o que explica a diferença nas taxas de regeneração encontradas, mesmo quando utilizada a mesma combinação e concentração de reguladores vegetais.

De maneira geral, grande parte dos trabalhos com espécies de *Eucalyptus* também relataram o uso de thidiazuron (TDZ), em concentrações que variam de 0,05 a 2,5 μM , para a indução de calos a partir de diferentes tecidos, como, por exemplo, folhas (DIBAX et al., 2010b) e folhas cotiledonares (AZMI et al., 1997; NUGENT et al., 2001). Contudo, BAP também tem sido utilizado como regulador vegetal estimulante da fase de calogênese em explantes foliares de diversas espécies do gênero *Eucalyptus*, apresentando um efeito positivo durante a fase inicial da regeneração. Dentre essas espécies pode-se mencionar *E.*

camaldulensis (MULLINS et al., 1997), *E. globulus* (MORALEJO et al., 1998), *E. grandis* (LAINÉ e DAVID, 1994; MACHADO et al., 1997), *E. grandis* x *E. urophylla* (TOURNIER et al., 2003) e *E. gunnii* (HERVÉ et al., 2001).

Segundo Glocke et al. (2005), em *Eucalyptus erythronema*, *E. stricklandii*, *E. erythronema* x *E. stricklandii* cv. ‘Urrbrae Gem’ e o “Híbrido 2.5”, BAP induziu a regeneração de brotações a partir de hipocótilos e cotilédones, mas em folhas, a organogênese foi mais difícil. Em pau-brasil (ARAGÃO et al., 2011), a utilização de BAP estimulou a formação de calos em segmentos nodais de forma significativa em todas as concentrações testadas (2,5; 3,5 e 4,5 μM). A combinação de 0,54 μM de ANA e 3,3 μM de BAP promoveu a maior taxa de calogênese (96,88%) em *Casuarina cunninghamiana* (JIANG et al., 2012).

Na micropropagação de espécies de *Eucalyptus*, de acordo com Del Ponte et al. (2001), BAP tem sido o regulador vegetal mais utilizado em meio de cultura, para a estimulação e proliferação de gemas axilares (SANKARA-RAO, 1998; TRINDADE et al., 1990; NICCOL et al., 1994).

A oxidação fenólica é um problema encontrado frequentemente na micropropagação de plantas perenes, como eucalipto, manga, banana, dentre outros (BARRUETO CID; TEIXEIRA, 2010). Segundo estes autores, além do carvão ativado e do PVP (polivinilpirrolidona), existem outros produtos que podem prevenir a oxidação, como o ácido cítrico, o ácido ascórbico, a L-cisteína, dentre outros.

Diante disto, este trabalho teve como objetivos verificar o efeito de diferentes reguladores vegetais, antioxidantes e diferentes composições salinas dos meios de cultura durante a organogênese indireta, a partir de folhas de *E. benthamii* x *E. dunnii*, e estudar a influência de diferentes composições salinas do meio durante a fase de multiplicação dos brotos.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Material vegetal e meios de cultura

No presente trabalho foi utilizado o clone 8 do híbrido *Eucalyptus benthamii* x *E. dunnii*, selecionado pelo Programa de Melhoramento da Embrapa-Florestas (Colombo-PR). Segmentos nodais de plantas provenientes de estacas mantidas em casa-de-vegetação foram desinfestados por meio de imersão em solução de etanol 70% por 15 segundos, seguida de

imersão em solução de 2% (NaOCl) por 10 minutos e tríplice lavagem em água bidestilada e autoclavada. Os explantes foram então inoculados em meio de cultura MS suplementado com 30 g L^{-1} de sacarose e 7 g L^{-1} de ágar.

Após o estabelecimento da cultura, o material foi mantido durante três subcultivos em meio de cultura de multiplicação composto pelo meio MS adicionado de $1,11 \mu\text{M}$ de BAP, 30 g L^{-1} de sacarose e 7 g L^{-1} de ágar até a instalação dos experimentos em seus respectivos meios de cultura, conforme indicado.

3.2.2 Condições gerais de cultura

A cultura inicial foi mantida em frascos de vidro com 9 cm de altura e 6 cm de diâmetro, vedados com tampa de polipropileno, contendo aproximadamente 25 mL de meio de cultura. Esses mesmos frascos foram utilizados no experimento de multiplicação. As condições da sala de crescimento foram: luz fluorescente branca fria com irradiância de $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, fotoperíodo de 16 h e temperatura de $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$. Após a instalação dos experimentos, as culturas permaneceram nas mesmas condições, exceto quando indicado, sendo mantidas em placas de Petri com 2 cm de altura e 10 cm de diâmetro, contendo aproximadamente 25 mL de meio de cultura e vedadas com filme PVC.

Os meios de cultura utilizados nos experimentos foram suplementados com 30 g L^{-1} de sacarose e 7 g L^{-1} de ágar.

3.2.3 Organogênese indireta de *Eucalyptus benthamii* x *E. dunnii*

3.2.3.1 Utilização de combinações de BAP e ANA

Folhas com aproximadamente 0,6 cm de comprimento, localizadas na região apical de brotações na quarta subcultura, mantidas em meio de multiplicação (MS com $1,1 \mu\text{M}$ BAP) foram utilizadas como explantes no experimento de organogênese indireta. Cada folha foi seccionada no sentido transversal à nervura central e cada segmento (apical e basal), com aproximadamente 0,3 cm de comprimento, foi inoculado de modo aleatório quanto à face em

contato com o meio nos seguintes tratamentos: (1) MS + 0,1 μM de ANA (controle); (2) MS + 0,1 μM de ANA + 0,4 μM de BAP; (3) MS + 0,1 μM de ANA + 0,8 μM de BAP; (4) MS + 0,1 μM de ANA + 2,2 μM de BAP e (5) MS + 0,1 μM de ANA + 4,4 μM de BAP. Cada tratamento apresentou seis repetições, sendo cada repetição composta por uma placa de Petri contendo 10 explantes.

As culturas foram mantidas em sala de crescimento, no escuro. A cada 14 dias os explantes foram subcultivados no mesmo meio de cultura. Aos 14 e 28 dias após a instalação do experimento, foram avaliadas as porcentagens de oxidação e formação de calos. O experimento foi repetido e os dados apresentados consistem na média dos dois ensaios.

3.2.3.2 Utilização de combinações de ANA e TDZ e de solução antioxidante

Segmentos foliares com aproximadamente 0,6 cm retirados da porção apical de tufos na quinta subcultura, foram cortados com aproximadamente 0,3 cm de comprimento, em água ou em solução antioxidante composta por ácido ascórbico (250 mg L^{-1}), ácido cítrico (25 mg L^{-1}) e PVP-40 (1000 mg L^{-1}) (TOURNIER et al., 2003), no sentido transversal e inoculados aleatoriamente em meio de cultura MS contendo 0,1 μM de ANA e diferentes concentrações de TDZ. O experimento foi delineado em esquema bifatorial (2x5) e os fatores analisados foram: presença ou não da solução antioxidante no momento do corte e quatro concentrações de TDZ (0,1; 0,5; 1,0 e 2,0 μM) e testemunha. Cada tratamento apresentou seis repetições, sendo cada repetição composta por uma placa de Petri contendo 10 explantes.

As culturas foram mantidas no escuro em sala de crescimento por um período de 42 dias. A cada 14 dias procedeu-se à transferência dos explantes para mesmo tratamento. Após este período foram avaliadas as porcentagens de explantes oxidados e necrosados, formando calo, apresentando antocianina, formando gemas (foi considerado como gemas as brotações não alongadas cujas folhas apresentaram menos que 0,5 cm de comprimento, sem a presença de caule) e o número de gemas por explante. O experimento foi repetido e os dados apresentados consistem na média dos dois ensaios.

3.2.3.3 Utilização de dois meios de cultura, do PVP e do TDZ combinado com ANA

Folhas, com aproximadamente 0,5 cm de comprimento, de tufos mantidos em meio de multiplicação, na oitava subcultura, foram cortadas pela metade no sentido transversal e

colocadas em placas de Petri de forma aleatória quanto à face em contato com o meio de cultura.

Os meios de cultura testados foram: MS N/2 (MURASHIGE e SKOOG, 1962, modificado, com redução das concentrações de NH_4NO_3 e KNO_3 pela metade), e JADS (CORREIA et. al, 1995) com vitaminas e compostos orgânicos dos mesmos meios, ambos contendo $0,1 \mu\text{M}$ de ANA.

Além do fator meio de cultura foi estudado o efeito da presença do antioxidante PVP-40 (250 mg L^{-1}) e de duas concentrações ($0,1$ e $0,5 \mu\text{M}$) de TDZ no meio de cultura. O experimento foi delineado em esquema trifatorial ($2 \times 2 \times 2$) e os fatores analisados foram: dois meios de cultura (MS N/2 e JADS), presença ou não de PVP-40 (250 mg L^{-1}) e duas concentrações de TDZ ($0,1$ e $0,5 \mu\text{M}$). Cada tratamento foi constituído de seis repetições, sendo cada repetição composta por uma placa de Petri contendo 10 explantes.

As culturas foram mantidas no escuro por 45 dias e transferidas para luz até os 70 dias, sendo que a cada 15 dias os explantes foram transferidos para placas com os mesmos meios de cultura dos tratamentos, porém novos. Após 70 dias de cultivo, as variáveis analisadas foram: porcentagem de explantes oxidados, formando calo, apresentando antocianina, formando gemas (foi considerado como gemas as brotações não alongadas cujas folhas apresentaram menos que $0,5 \text{ cm}$ de comprimento, sem a presença de caule), formando brotações e o número de brotações formadas por explante regenerando. O experimento foi repetido e os dados apresentados consistem na média dos dois ensaios.

3.2.4 Utilização de diferentes meios de cultura na multiplicação de brotações

Brotações com aproximadamente $0,8 \text{ cm}$ de altura contendo de uma a duas gemas cada, isoladas de tufos subcultivados cinco vezes no meio MS com $1,11 \mu\text{M}$ de BAP, foram cultivadas em três meios de cultura, MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), JADS (CORREIA et al., 1995) ou WPM (LLOYD e McCOWN, 1980), acrescidos de $1,11 \mu\text{M}$ de BAP, das substâncias orgânicas específicas de cada meio e 30 mg L^{-1} de sacarose (Anexo 1) e 7 g L^{-1} de ágar. A cada 28 dias, as brotações foram subcultivadas para os mesmos meios de cultura, sendo individualizadas com aproximadamente duas gemas, totalizando quatro subcultivos. As seguintes variáveis foram avaliadas: porcentagem de oxidação, de explantes apresentando clorose total ou parcial, massa fresca e número médio de brotos por explante.

Neste experimento, cada tratamento foi conduzido com cinco repetições, sendo cada repetição composta por um frasco de cultivo contendo cinco brotações. O experimento foi repetido e os dados apresentados consistem na média dos dois ensaios.

3.2.5 Delineamento experimental e análise estatística

Em todos os experimentos, o delineamento estatístico foi o inteiramente casualizado. Primeiramente, foi aplicado um teste de homogeneidade de variâncias (Bartlett) e, em seguida, as médias obtidas entre as repetições de cada experimento foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. No experimento de multiplicação os dados foram transformados para arcsen $\sqrt{x/100}$. A análise estatística foi realizada utilizando o programa computacional ASSISTAT (SILVA e AZEVEDO, 2009).

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Organogênese indireta de *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii*

3.3.1.1 Efeito de combinações de BAP e ANA

Na primeira avaliação, as maiores porcentagens de explantes formando calo (91,6 e 81,6) foram verificadas nos meios contendo 0,1 μM de ANA com 0,8 e 2,2 μM de BAP, respectivamente (Tabela 1 e Anexo 2). Observou-se, aos 14 dias de cultivo, que ANA e BAP retardaram significativamente a oxidação (Anexo 3) em relação ao tratamento controle, além de favorecer a formação de calos. Isso porque os explantes cultivados na ausência de BAP apresentaram baixa taxa de formação de calos e conseqüentemente, oxidaram.

O tratamento contendo 0,88 μM de BAP proporcionou maior porcentagem de calogênese também na segunda avaliação em relação aos explantes sobreviventes da primeira avaliação, sendo estatisticamente superior aos demais tratamentos (Anexo 4). Os calos observados nesse ensaio apresentavam coloração bege e consistência compacta. Entretanto, ao final de 28 dias, os explantes sobreviventes oxidaram totalmente, mesmo permanecendo no escuro.

Notou-se que os explantes respondiam de forma positiva aos estímulos hormonais de BAP presentes no meio de cultura, pois num primeiro momento ocorreu o intumescimento do tecido e posterior formação de calos (Figura 1A). Tal fato demonstra que os reguladores vegetais foram capazes de induzir os mecanismos envolvidos com a aquisição de competência do tecido para realizar a dediferenciação celular. Contudo, o tecido não prosseguiu a diferenciação e conseqüente regeneração de brotos pelo fato de ser oxidado (Figura 1B).

Tabela 1- Efeito de BAP na calogênese e oxidação de explantes foliares de *E. benthamii* x *E. dunnii* aos 14 e 28 dias de cultura em meio MS contendo 0,1 μ M de ANA.

BAP (μ M)	1ª avaliação (14 dias)		2ª avaliação (28 dias)*	
	Explantes com calo (%)	Oxidação (%)	Explantes com calo (%)	Explantes oxidados (%)
0,0	11,6 c	88,3 a	10,0 d	100
0,4	71,6 b	28,3 b	66,6 b	100
0,8	91,6 a	8,3 c	80,0 a	100
2,2	81,6 ab	18,3 bc	41,6 c	100
4,4	68,3 b	31,6 b	31,6 c	100
CV (%)	14,49	26,9	13,04	

Médias seguidas com letra idêntica na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. Análises de variância (Anexos 2 a 4). *avaliação realizada sobre a porcentagem de explantes sobreviventes aos 14 dias.

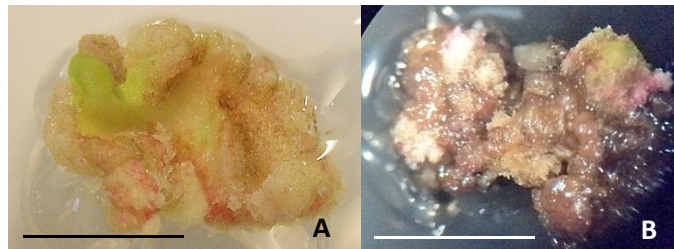


Figura 1 – Aspecto de explantes foliares de *E. benthamii* x *E. dunnii* em meio de cultura MS acrescido de 0,1 μ M de ANA e 0,88 μ M de BAP. (A) Explante com calo (aos 14 dias). (B) Explante formando calo e oxidando (aos 21 dias). Barra: 0,5 cm.

Os resultados do presente experimento mostraram que o tecido apresentou resposta positiva a BAP, mas alguns fatores endógenos, como os fenóis, podem estar impedindo a sua diferenciação em gemas adventícias, tendo em vista o expressivo acúmulo de compostos fenólicos nos explantes, assim como observado por Werner et al. (2010), na calogênese de explantes de pau-brasil. Nas plantas lenhosas acumulam-se polifenóis e produtos de oxidação, como melanina, suberina, lignina, cutina e calose em torno da superfície incisada, os quais modificam a composição do meio de cultivo e a absorção de metabólitos (ANDRADE et al.,

2000). De acordo com Preece (2008), a oxidação dos compostos fenólicos constitui um fator limitante no crescimento das culturas *in vitro*.

A concentração de ANA utilizada no meio de cultura pode ter ocasionado algum efeito negativo sobre a calogênese e regeneração do tecido, uma vez que não foram testadas concentrações inferiores a 0,1 μM . Embora seja reportado em vários trabalhos na literatura que o ANA combinado a BAP foi fundamental para a formação de calos e gemas (ALMEIDA et al., 2003; DIBAX et al., 2005), outros autores observaram efeitos prejudiciais quando a auxina foi adicionada (0,5 μM) ou quando apresentava-se em concentrações elevadas (5,3 e 10,7 μM) (MARQUES et al. 2011; TALLÓN et al., 2013). Dibax et al. (2005) testaram diferentes combinações de ANA e BAP durante a organogênese de *E. camaldulensis*, e observaram que na concentração de 4,4 μM de BAP, a formação de calos foi favorecida com a presença de ANA na maior concentração (5,4 μM). Contudo, a porcentagem de regeneração foi superior quando ANA estava na concentração intermediária (2,7 μM), sendo inferior na maior concentração e na ausência de ANA, o que demonstrou que este regulador vegetal exerceu influência durante a regeneração dos explantes.

Outro fator que pode estar associado à capacidade dos explantes regenerarem gemas seria o seu próprio metabolismo hormonal, pois é ele que determinará, em última análise, o balanço hormonal endógeno para indução da organogênese (PERES e KERBAUY, 1999). Desse modo, explantes com alta atividade de citocinina oxidase, enzima que degrada citocininas, podem não chegar a um balanço auxina/citocinina endógeno indutor da formação de gemas, mesmo que sejam adicionadas elevadas concentrações de citocininas ao meio de cultura (PERES, 2002).

De uma forma geral pode-se constatar, no presente ensaio, que o híbrido em questão é responsivo a BAP, sendo a calogênese induzida até a concentração de 0,8 μM de BAP combinada com 0,1 μM de ANA e reduzida em concentrações de BAP superiores. Além disso, a permanência dos explantes em meio contendo BAP e ANA por tempo superior a 14 dias parece ter favorecido a oxidação, havendo a necessidade de outros testes envolvendo diferentes reguladores e a utilização de antioxidante.

3.3.1.2 Efeito de combinações de ANA e TDZ e de solução antioxidante

Houve interação significativa entre os fatores para a variável porcentagem de formação de calos e porcentagem de explantes com antocianina. Já para as variáveis

relacionadas com a regeneração, não houve diferença entre os tratamentos utilizados (Anexos 5 a 9). Contudo, analisando a porcentagem de oxidação, observou-se diferenças estatísticas significativas entre os resultados obtidos nas diferentes concentrações de TDZ.

Os explantes foliares responderam de forma positiva ao TDZ na calogênese, tanto os cortados em água, quanto os cortados em solução antioxidante (Tabela 2). Já no tratamento controle, sem a presença do TDZ, grande parte dos explantes necrosaram, tornando-se pretos, além de não terem formado calos. A combinação de 0,1 μM de ANA com 0,1 μM de TDZ promoveu a calogênese em 100% dos explantes, em ambas as condições de corte, assim como encontrado na combinação de 0,1 μM de ANA com 0,5 μM de TDZ, na presença da solução antioxidante.

Tabela 2 - Calogênese e organogênese em explantes foliares de *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii*, cortados em água ou em solução antioxidante*, cultivados *in vitro* em meio MS contendo 0,1 μM de ANA e quatro concentrações de TDZ, após 42 dias. Média de 2 experimentos.

Porcentagem de explantes necrosados** e oxidados					
Tratamento	TDZ (μM)				
	0,0 **	0,1	0,5	1,0	2,0
Água	86,6 aA	0,0 aB	0,0 aB	1,6 aB	1,6 aB
Antioxidante	83,3 aA	0,0 aB	0,0 aB	0,0 aB	3,3 aB
Porcentagem de explantes formando calo					
Solução	TDZ (μM)				
	0,0	0,1	0,5	1,0	2,0
Água	0,0 aD	100 aA	85 bB	88,3 aB	70 bC
Antioxidante	1,6 aC	100 aA	100 aA	86,6 aB	85 aB
Porcentagem de explantes com antocianina					
Solução	TDZ (μM)				
	0,0	0,1	0,5	1,0	2,0
Água	0,0 aB	51,6 aA	0,0 aB	0,0 aB	0,0 aB
Antioxidante	0,0 aB	23,3 bA	1,6 aB	1,6 aB	0,0 aB
Porcentagem de explantes regenerando gema					
Solução	TDZ (μM)				
	0,0	0,1	0,5	1,0	2,0
Água	0,0 aA	0,0 aA	0,0 aA	0,0 aA	0,0 aA
Antioxidante	0,0 aA	1,6 aA	0,0 aA	0,0 aA	1,6 aA
Número médio de gemas por explante regenerando					
Solução	TDZ (μM)				
	0,0	0,1	0,5	1,0	2,0
Água	0,0 aA	0,0 aA	0,0 aA	0,0 aA	0,0 aA
Antioxidante	0,0 aA	2,0 aA	0,0 aA	0,0 aA	3,0 aA

¹Valores seguidos de letras minúsculas idênticas nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. Análises de variância (Anexos 5 a 9). *Ácido ascórbico (250 mg L⁻¹), ácido cítrico (25 mg L⁻¹) e PVP-40 (1g L⁻¹). ** Nos explantes deste tratamento foi observada necrose.

Em relação ao experimento anterior, verificou-se que o TDZ, diferentemente de BAP, além de promover a calogênese, também possibilitou a regeneração de gemas adventícias, embora em baixas taxas. Segundo Mok et al. (1987), de acordo com sua estrutura química, as citocininas são classificadas em dois grupos: as derivadas da adenina (como a 6-benzilaminopurina - BAP) e as derivadas das feniluréias (como o N-phenyl-N'-1,2,3-thidiazol-5-ylurea - Thidiazuron, TDZ). De acordo com Guo et al. (2011), estudos recentes mostraram que o TDZ é frequentemente associado com o metabolismo dos reguladores vegetais. O modo de ação do TDZ pode ser atribuído, dentre outros, a sua habilidade em acumular e translocar auxinas (MURCH e SAXENA, 2001) e, dessa maneira, afetando a organogênese.

A combinação de 0,1 μM de ANA com 0,1 μM de TDZ favoreceu, significativamente, o acúmulo de antocianinas nos explantes (Figura 2A), sendo esse acúmulo maior nos explantes cortados em água. A produção de antocianina pelo tecido pode estar relacionada com a presença de estresse oxidativo. As plantas apresentam um sistema de defesa contra o estresse oxidativo constituído de enzimas antioxidantes, tais como superóxido dismutase e peroxidase, bem como de compostos com atividade antioxidante, podendo-se citar carotenóides, antocianinas e compostos fenólicos. Tanto as enzimas quanto outros compostos metabolizam as espécies reativas de oxigênio (EROs) formadas sob situações de estresse (NOCTOR e FOYER, 1998; SELOTE et al., 2004). Possivelmente, as folhas desse tratamento sofreram estresse devido à ausência do antioxidante no momento do corte, à presença do TDZ, ou devido a alguma alteração quanto à luminosidade, desencadeando a produção de antocianina.

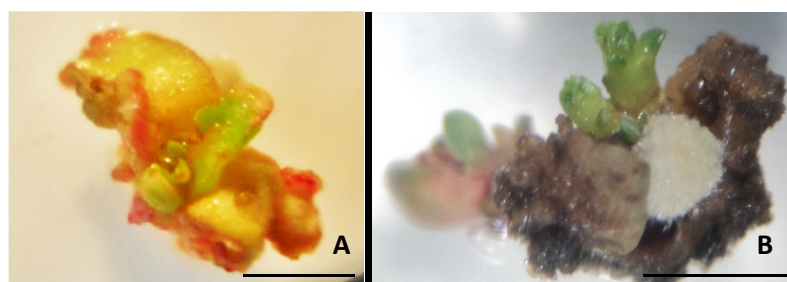


Figura 2 – Aspecto de explantes foliares de *E. benthamii* x *E. dunnii* em meio MS contendo 0,1 μM de ANA e 0,1 μM de TDZ. (A) Apresentando antocianina, aos 28 dias de cultivo. (B) Com gemas aos 42 dias de cultivo. Barra: 0,5 cm.

Ainda, segundo Gómez-Zelédón e Jiménez (2011), a produção *in vitro* de antocianinas pode ser potencializada utilizando elicitores e fatores de estresse. Além disso, estes mesmos

autores relataram que as antocianinas têm sido bastante estudadas, tanto pela sua alta capacidade antioxidante (KONG et al., 2003; PRIOR, 2003; EINBOND et al., 2004), como pela sua capacidade de eliminar radicais livres (WANG et al., 1997; ESPÍN et al., 2000), dentre outros.

Embora a solução antioxidante não tenha reduzido a necrose no tratamento sem TDZ, os explantes cortados nesta solução apresentaram formação de gemas na presença de TDZ (Tabela 2), que pode ter sido influenciada pela solução antioxidante utilizada. Dan (2008) classificou a maioria dos antioxidantes usados na cultura de tecidos de plantas em três grupos com base em suas funções *in vitro*. O autor relacionou o ácido ascórbico, ácido cítrico e o PVP, utilizados na solução do presente experimento, como um grupo de antioxidantes que podem reduzir o escurecimento dos tecidos e promover a organogênese, embriogênese somática e o crescimento de brotações durante a micropropagação de diferentes espécies de plantas. Além disso, Stasolla e Yeung (1999) observaram que o ácido ascórbico auxiliou de forma positiva a conversão de embriões de *Picea glauca*, de 47% (controle) para 79% e atribuíram esse fato a um possível efeito desse antioxidante no controle da divisão celular. Com isso, inferimos que os antioxidantes de forma conjunta ou isolada também podem ter proporcionado condições favoráveis para o explante expressar o seu potencial organogênico.

Após 42 dias de cultivo, os explantes que produziram gemas foram transferidos para meio de cultura MS contendo 0,05 μM de ANA e 1,0 μM de BAP. Após 30 dias notou-se oxidação total destes explantes.

De acordo com os resultados obtidos, observa-se que as células do tecido vegetal adquiriram competência organogênica e responderam à presença do TDZ, iniciando a calogênese e a formação de gemas em baixa taxa. Além disso, verificou-se que em 42 dias de cultura as gemas não adquiriram tamanho suficiente para serem separadas do explante inicial.

3.3.1.3 Efeito de dois meios de cultura, do PVP e do TDZ combinado com ANA.

A calogênese foi observada nos meios de cultura testados somente quando adicionados de 0,5 μM de TDZ (Tabela 3 e Figura 3), sendo a maior porcentagem de formação de calos (83,3%) encontrada no meio JADS com 0,5 μM de TDZ e sem PVP-40 (Tabela 3), embora diferente estatisticamente apenas do meio MS N/2 sem a presença do PVP-40 (53,3%). Percebe-se que a adição de 0,5 μM de TDZ nos dois meios de cultura foi importante para formação de calos na espécie estudada (Tabela 3). Houve diferenças significativas entre as

duas concentrações de TDZ no meio MS N/2 para a porcentagem de oxidação, formação de gemas, formação de calos e brotos e para o número de brotos por explante (Tabela 3 e Anexos 10 a 15).

Tabela 3 - Calogênese e organogênese em explantes foliares de *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii* cultivados *in vitro* em meios MS N/2 e JADS, contendo 0,1 µM de ANA e duas concentrações de TDZ, com e sem PVP-40, após 70 dias. Média de 2 experimentos.

Porcentagem de explantes oxidados						
TDZ	MS N/2			JADS		
(µM)	PVP-40	PVP-40	Média ¹	PVP-40	PVP-40	Média
	0	250 mg L ⁻¹		0	250 mg L ⁻¹	
0,1	100,0	100,0	100 aA	100,0	100,0	100,0 aA
0,5	63,3	68,3	65,8 bB	100,0	100,0	100,0 aA
Porcentagem de explantes formando calos						
TDZ	MS N/2			JADS		
(µM)	PVP-40	PVP-40		PVP-40	PVP-40	
	0	250 mg L ⁻¹		0	250 mg L ⁻¹	
0,1	0,0 bB	0,0 bB		0,0 bB	0,0 bB	
0,5	53,3 aB	55,0 aAB		83,3 aA	78,3 aAB	
Porcentagem de explantes formando gemas						
TDZ	MS N/2			JADS		
(µM)	PVP-40	PVP-40	Média ¹	PVP-40	PVP-40	Média
	0	250 mg L ⁻¹		0	250 mg L ⁻¹	
0,1	0,0	0,0	0,0 bA	0,0	0,0	0,0 Aa
0,5	5,0	6,6	5,8 aA	0,0	0,0	0,0 aB
Porcentagem de explantes formando brotos						
TDZ	MS N/2			JADS		
(µM)	PVP-40	PVP-40	Média ¹	PVP-40	PVP-40	Média
	0	250 mg L ⁻¹		0	250 mg L ⁻¹	
0,1	0,0	0,0	0,0 bA	0,0	0,0	0,0 aA
0,5	5,0	8,3	6,6 aA	0,0	0,0	0,0 aB
Número médio de brotos por explante regenerando						
TDZ	MS N/2			JADS		
(µM)	PVP-40	PVP-40	Média ¹	PVP-40	PVP-40	Média
	0	250 mg L ⁻¹		0	250 mg L ⁻¹	
0,1	0,0	0,0	0,0 bA	0,0	0,0	0,0 aA
0,5	2,3	3,0	2,6 aA	0,0	0,0	0,0 aB
Porcentagem de explantes com antocianina						
TDZ	MS N/2			JADS		
(µM)	PVP-40	PVP-40		PVP-40	PVP-40	
	0	250 mg L ⁻¹		0	250 mg L ⁻¹	
0,1	0,0aA	0,0aA		0,0aA	0,0aA	
0,5	5,0aA	0,0aA		0,0aA	0,0aA	

¹Médias seguidas de letras minúsculas idênticas nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. Análises de variância (Anexos 10 a 15).

No presente experimento, o tratamento com 0,5 μM de TDZ, em meio MS N/2 e com PVP, permitiu a formação de calos em 55% dos explantes. Somente nesse meio de cultura observou-se a formação de gemas e brotações (Figura 3C e 3D), sendo que a suplementação deste com PVP-40 permitiu a formação de gemas em 6,6% dos explantes, a formação de brotos em 8,3% dos explantes e o maior número médio de brotos por explante (3,0). Já na ausência do PVP-40, a formação de gemas e brotos foi de 5% e notou-se a produção de antocianina, o que não foi observado nos demais tratamentos. Em explantes foliares de *E. saligna*, Dibax et al. (2010b) compararam três combinações de ANA e TDZ (0,1 μM ANA e 1,0 μM TDZ; 0,1 μM ANA e 1,5 μM TDZ; 0,1 μM ANA e 2,0 μM TDZ) no meio de cultura MS N/2 e encontraram maior porcentagem de formação de calos (73%) utilizando 0,1 μM de ANA e o dobro da concentração de TDZ (1,0 μM).

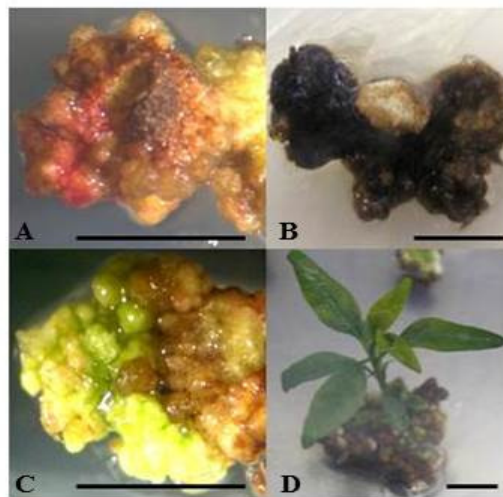


Figura 3 - Aspecto dos explantes foliares de *E. benthamii* X *E. dunnii* cultivados *in vitro*. A - Meio JADS + 0,1 μM ANA + 0,5 μM TDZ + 250 mg L^{-1} PVP-40 (após 60 dias), B – Meio JADS + 0,1 μM ANA + 0,5 μM TDZ + 250 mg L^{-1} PVP-40 (após 90 dias); C- Meio MS N/2 + 0,1 μM ANA + 0,5 μM TDZ + 250 mg L^{-1} PVP-40 (após 60 dias); D- Regeneração de broto em meio MS N/2 + 0,1 μM ANA + 0,5 μM TDZ + 250 mg L^{-1} PVP-40 (após 90 dias). Barra: 0,5 cm.

No presente trabalho, a interação entre o tipo de meio de cultura e a concentração de TDZ foi significativa para a porcentagem de oxidação, de formação de gemas e brotos, e do número de brotos. O TDZ é um regulador vegetal bastante utilizado na indução da calogênese em explantes de várias espécies de *Eucalyptus* (MACHADO et al., 1997; BARRUETO CID et al., 1999; CHANG et al., 2000; TOURNIER et al., 2003; ALVES et al., 2004a). Em *Eucalyptus saligna*, a maior porcentagem de explantes foliares formando calos

(73%) foi encontrada no meio MS N/2 com 0,1 μM de ANA e 1,0 μM de TDZ (DIBAX et al., 2010b), embora sem diferença em relação a 1,5 μM de TDZ (72%).

A presença de 250 mg L^{-1} de PVP-40 nos meios de cultura não reduziu a oxidação dos tecidos. Todos os explantes sofreram oxidação e as menores taxas (63,3 e 68,3%) foram encontradas nos meios MS N/2 com e sem PVP-40, suplementados com 0,5 μM de TDZ e 0,1 μM de ANA (Tabela 3), sem diferença estatística entre elas. Todos os explantes cultivados no meio de cultura JADS oxidaram parcialmente até a formação dos calos e totalmente até o final do experimento (Figura 3B).

A maior oxidação e conseqüentemente o maior escurecimento do meio observado no meio JADS em relação ao MS N/2, pode ter ocorrido devido aos elevados teores de cobre e ferro contidos no primeiro meio, os quais estão em concentrações superiores às do meio MS (Anexo 1). A enzima polifenoloxidase, catalisadora da oxidação de compostos fenólicos a quinonas, contém cobre (KIM et al., 2001). Com isso, infere-se que a maior disponibilidade de cobre no meio de cultura JADS pode ter favorecido a atividade dessa enzima, ocasionando a oxidação.

As diferenças entre os resultados em função da composição dos meios de cultura utilizados revelaram efeito significativo do fator meio de cultura nas variáveis avaliadas, exceto para porcentagem de explantes contendo antocianina. O meio de cultura JADS apresenta menores concentrações de sódio, cloro, manganês, zinco e molibdênio quando comparado com o MS, entretanto, possui o dobro da concentração de fósforo, 1,6 vezes a concentração de cálcio, 50 vezes a de cobre e 200 vezes a de ferro. Considerando as vitaminas, neste meio de cultura a concentração de tiamina é 50 vezes superior a do meio MS, além de conter pantotenato de cálcio e outros aminoácidos e de não apresentar glicina na sua composição (Anexo 1).

Nesse experimento, o híbrido *E. benthamii* x *E. dunnii* apresentou pouca resposta ao TDZ nas concentrações testadas, bem como alta tendência a oxidação, mesmo em presença de um antioxidante no meio de cultura, sendo a utilização de 250 mg L^{-1} de PVP-40 ineficiente para o material estudado. Alves et al. (2004b) também observaram o escurecimento do meio durante a organogênese de explantes caulinares de *E. grandis* x *E. urophylla*, quando utilizaram 800 mg L^{-1} de PVP. Resultado semelhante foi obtido por Borges et al. (2011) que utilizaram a mesma concentração de PVP (800 mg L^{-1}) durante a multiplicação de clones de *E. urophylla* x *E. globulus* e de *E. grandis* x *E. globulus* e observaram a oxidação. De acordo com os resultados encontrados com a utilização do PVP-40 nesse experimento, outros

antioxidantes adicionados ao meio de cultura, como o ácido ascórbico e o ácido cítrico, podem ser uma alternativa para conter a oxidação e não interferir na organogênese.

A ineficiência do antioxidante utilizado no controle da oxidação pode ser decorrente do conteúdo endógeno de fenóis nos tecidos ou da atividade das enzimas polifenoloxidasas. De acordo com Rickard et al. (1979) e Padmaja et al. (1982), os fenóis presentes nos ferimentos são oxidados para o-quinonas ou polímeros pela ação da polifenoloxidase. Infere-se que, havendo uma quantidade baixa das enzimas que oxidam estes compostos fenólicos, ou uma quantidade excessiva de substrato, haverá estresse oxidativo e um maior acúmulo de EROs, culminando com a oxidação e posterior morte do tecido.

3.3.2 Efeito de diferentes meios de cultura na multiplicação de brotações

No primeiro e segundo subcultivo, o maior número médio de brotos por explante (9,28 e 9,24 respectivamente) foi obtido no meio MS, sendo superior aos demais meios testados. Já nos demais subcultivos não houve diferença significativa entre os tratamentos (Tabela 4 e Anexos 16 a 32). O número de brotos por explante encontrado ao final deste experimento em todos os meios de cultura testados foi satisfatório se comparado ao de outros trabalhos. Gomes e Canhoto (2003) utilizaram 0,9 μM de BAP combinado com 0,05 μM de ANA em MS/2 para proliferação de gemas de *E. nitens* Maiden, e após três subcultivos, obtiveram apenas 2,25 brotos por explante e consideraram os resultados como promissores. Borges et al. (2011), ao testarem os meios de cultura MS e JADS durante a multiplicação de 21 clones de híbridos de *E. urophylla* x *E. globulus* e seis clones de *E. grandis* x *E. globulus*, encontraram melhores resultados em meio MS (0,6 a 3,8 brotações médias) do que em meio JADS (0,4 a 3,0 brotações médias) na segunda e terceira introdução *in vitro*.

No presente experimento, na presença de 1,11 μM de BAP em meio MS, ao final de 28 dias obteve-se um número de brotações por explante superior ao obtido por Brondani et al. (2009) com o mesmo híbrido, clone H12. Em meio MS/2 adicionado de 1,33 μM de BAP, após 30 dias de cultivo, esses autores observaram uma produção de 6,9 gemas/explante e, após 60 dias, 20,2 gemas/explante. Em ambos os casos, o explante inicial consistiu de brotações contendo de uma a duas gemas axilares.

No meio MS, uma alta percentagem de brotações apresentou clorose foliar parcial, sendo maior que nos meios WPM e JADS em todos os subcultivos (Tabela 4). Entretanto, a clorose observada em todos os tratamentos não se mostrou limitante ao desenvolvimento das

brotações. A clorose é um sintoma relacionado à deficiência de uma série de nutrientes, como nitrogênio, potássio, magnésio, cloro, manganês, ferro e molibdênio (TAIZ e ZEIGER, 2004). Schottz et al. (2007) observaram a clorose durante o cultivo *in vitro* de mogno quando utilizaram o meio de cultura MS, que contém altas concentrações desses nutrientes, sugerindo que os sintomas não são apenas relacionados com a deficiência de nutrientes.

O meio de cultura MS possui uma série de peculiaridades em relação ao WPM e ao JADS quanto à composição salina (Anexo 1). Possui alta concentração de nitrogênio total, sendo praticamente o dobro da concentração encontrada no JADS que, por sua vez, é o dobro da concentração do WPM. O meio MS, em relação aos outros meios, contém iodo, o dobro da concentração de potássio e menor quantidade de cloro. Quanto ao meio JADS, este possui maior concentração de magnésio, cobalto, cobre, ferro e fósforo, porém apresenta menores teores de molibdênio e manganês que os meios MS e WPM, o que pode favorecer a clorose. Estas diferenças nas concentrações dos nutrientes, combinadas com as vitaminas e com o regulador vegetal utilizado podem ter favorecido o aparecimento da clorose no meio MS. Além disso, a composição salina do meio de cultura MS pode não ter suprido as exigências específicas da espécie em relação os demais meios testados.

A massa fresca dos brotos cultivados no meio de cultura MS foi significativamente superior à dos demais meios de cultura no primeiro e segundo subcultivos e somente ao meio JADS no terceiro e quarto subcultivos (Tabela 4).

No presente estudo, as brotações mantidas em meio de cultura MS tinham folhas maiores e mais alongadas em relação às brotações dos outros tratamentos (Figura 4), observação também feita por Borges et al. (2011) no caso de *E. globulus* cultivado em meio MS e JADS. Esse fato certamente se refletiu nos valores de massa fresca (384 mg) encontrados no primeiro subcultivo.

A oxidação foi superior no meio JADS em relação aos outros meios em todos os subcultivos, assim como observado no experimento de organogênese. A oxidação encontrada nesta fase também foi observada por Brondani et al. (2009) nos clones H19 e H20 de *E. benthamii* x *E. dunnii* cultivados em meio MS/2 com diferentes concentrações de BAP. Esses clones tiveram um comportamento recalcitrante na fase de multiplicação, com elevada taxa de oxidação, fator que impediu os cultivos subsequentes. Da mesma forma, Borges et al. (2011) observaram maior escurecimento do meio de cultura JADS em relação ao MS durante a multiplicação de *E. urophylla* x *E. globulus*. Os autores atribuíram esse escurecimento à oxidação de compostos fenólicos liberados pelo explante. No presente experimento, a oxidação observada pode ser atribuída ao comportamento do material em relação às

diferenças nutricionais encontradas entre os meios de cultura testados, além da liberação de compostos fenólicos pelo explante.

Tabela 4 - Efeito de três meios de cultura adicionados de 1,11 μ M de BAP na multiplicação de brotações de *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii*. Média de 2 experimentos.

1º subcultivo				
Tratamento	Nº médio de brotos/explante	Massa fresca/explante (mg)	Oxidação* (%)	Clorose parcial (%)
JADS	4,88 b	63,0 b	38,48 a	12,0 b
WPM	5,20 b	107,0 b	6,20 b	8,0 b
MS	9,28 a	384,0 a	12,40 b	88,0 a
2º subcultivo				
JADS	4,78 b	53,0 b	41,53 a	14,0 b
WPM	5,64 b	114,0 b	10,62 b	10,0 b
MS	9,24 a	379,0 a	7,84 b	90,0 a
3º subcultivo				
JADS	6,88 a	67,0 b	36,39 a	16,0 b
WPM	9,08 a	87,0 ab	6,76 b	0,0 b
MS	8,04 a	160,0 a	6,76 b	76,0 a
4º subcultivo				
JADS	7,00 a	60,0 b	28,0 a	12,0 b
WPM	8,92 a	87,0ab	4,0 b	8,0 b
MS	8,40 a	153,0 a	8,0 b	72,0 a

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. * dados transformados para $\arcsen \sqrt{x/100}$. Análises de variância (Anexos 16 a 32).

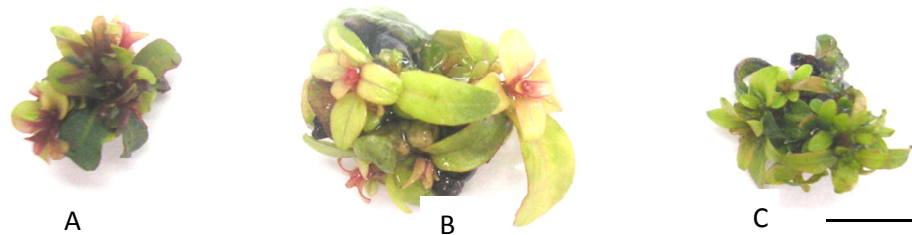


Figura 4 - Aspecto das brotações de *E. benthamii* x *E. dunnii* aos 28 dias de cultivo *in vitro* em meio de cultura JADS (A), MS (B) e WPM (C) adicionados de 1,11 μ M de BAP. Barra: 1 cm.

Observou-se de uma maneira geral que, embora tenha sido desenvolvido especificamente para *E. grandis*, o meio de cultura JADS não foi superior aos demais meios testados para a promoção da organogênese e multiplicação de brotações. Provavelmente, esse fato seja devido às exigências específicas das espécies.

3.4 CONCLUSÕES

Baseando-se nos resultados obtidos no presente estudo, pode-se concluir que:

- O híbrido *Eucalyptus benthammi* x *E. dunnii* apresenta difícil regeneração, sendo necessária a realização de estudos complementares para obtenção de um eficiente protocolo de regeneração.
- Foram obtidos resultados preliminares quanto à organogênese, onde houve regeneração indireta de brotos em explantes foliares, entretanto, em taxas baixas.
- O clone utilizado é mais responsivo ao TDZ do que ao BAP para a formação de gemas, sendo recomendado o meio MS N/2 suplementado com 0,1 µM de ANA e 0,5 µM de TDZ.
- A oxidação dos tecidos foi alta, mesmo na presença de 250 mg L⁻¹ de PVP.
- O meio de cultura MS é recomendado na multiplicação de brotações nos dois cultivos iniciais e WPM nos dois cultivos posteriores, ambos adicionados de 1,11 µM de BAP.

3.5 REFERÊNCIAS

- ALCANTARA, G. B.; BESPALHOK FILHO, J. C.; QUOIRIN, M. Organogenesis and transient genetic transformation of the hybrid *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*. **Scientia Agricola**, v. 68, n. 2, p. 246-251, 2011.
- ALMEIDA, W. A. B.; MOURÃO-FILHO, F. A. A.; PINO, L. E.; BOSCARIOL, R. L.; RODRIGUEZ, A. P. M.; MENDES, B. M. J. Genetic transformation and plant recovery from mature tissues of *Citrus sinensis* L. Osbeck. **Plant Science**, v. 164, p. 203–211, 2003.
- 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, n. 5, p. 421-430, 2004a.
- ALVES, E. C. S. C.; XAVIER, A.; OTONI, W. C. Organogênese *in vitro* a partir de explante caulinar na regeneração de clones de *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden x *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake. **Revista Árvore**, v. 28, n. 5, p. 643-653, 2004b.
- ANDRADE, M. W.; LUZ, J. M. Q.; LACERDA, A. S.; MELO, P. R. A. Micropropagação da aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All). **Ciência e Agrotecnologia**, v.24, n.1, p.174-180, 2000.
- ANDRADE, W. F.; ALMEIDA, M.; GONÇALVES, A. N. Multiplicação *in vitro* de *Eucalyptus grandis* sob estímulo com benzilaminopurina. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 12, p. 1715-1719, 2006.
- ARAGÃO, A. K. O.; ALOUFA, M. A. I.; COSTA, I. A. O efeito do BAP (6-benzilaminopurina) sobre a indução de brotos em explantes de pau-brasil. **Cerne**, v. 17, n. 3, p. 339-345, 2011.
- AUER, C. G.; dos SANTOS, A. F. Doenças em eucaliptos destinados à produção de energia na região Sul do Brasil. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 31, n. 68, p. 373-379, 2011.
- AZMI, A. et al. Bud regeneration from *Eucalyptus globulus* clones and seedlings through hormonal imbalances induced by *Agrobacterium tumefaciens* strain. **Plant Science**, v. 127, n. 1, p. 81-90, 1997.
- 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 *Eucalyptus urophylla*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 56, n. 1, p. 17-23, 1999.

BARRUETO CID, L. P.; TEIXEIRA, J. B. Oxidação fenólica, vitrificação e variação somaclonal. In: BARRUETO CID, L.P. (Org.). **Cultivo in vitro de plantas**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2010. p. 50-66.

BISHT, P. SHARMA V. K.; JOSHI I.; KAPOOR M. L. Micropropagation of newly produced F1 hybrid of *Eucalyptus* (*E. tereticornis* Sm. x *E. camaldulensis* Dehn. Southern Form). **Silvae Genetica**, v. 48, n. 2, p. 104-108, 1999.

BORGES, S. R.; XAVIER, A.; OLIVEIRA, L. S.; LOPES, A. P.; OTONI, W. C. Multiplicação *in vitro* de clones híbridos de *Eucalyptus globulus*. **Revista Árvore**, v. 35, n. 2, p. 173-182, 2011.

BRONDANI, G. E.; DUTRA, L., F.; GROSSI, F.; WENDLING, I.; HORNIG, J. Estabelecimento, multiplicação e alongamento *in vitro* de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cambage X *Eucalyptus dunnii* Maiden, **Revista Árvore**, v. 33, n. 1, p. 11-19, 2009.

BRONDANI, G. E.; DUTRA, L.F.; WENDLING, I.; GROSSI, F.; HANSEL, F.A.; ARAUJO, M. A. Micropropagation of an Eucalyptus hybrid (*Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii*). **Acta Scientiarum - Agronomy**. v. 33, n. 4, p. 655-663, 2011.

CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios Nutritivos. In: TORRES, A.C.;; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI; Embrapa-CNPQ, 1998. v.1, p.87-133.

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*. **Taiwan Journal of Forestry Sciences**, v. 15, p. 81-90, 2000.

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 gemas de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* na multiplicação *in vitro*. **IPEF**, n. 48/49, p. 107-116, 1995.

DAN, Y. Biological functions of antioxidants in plant transformation. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, v. 44, p. 149–161, 2008.

DECOOK, R.; LALL, S.; NETTLETON, D.; HOWELL, S. H. **Genetic Regulation of Gene Expression During Shoot Development in Arabidopsis**. *Genetics*, v. 172, p. 1155–1164, 2006.

DEL PONTE, E. M.; MATTEI, V. L.; PETERS, J. A. ASSIS, T. F. Multiplicação e enraizamento *in vitro* de *Eucalyptus globulus* subsp. *globulus* Labill. **Revista Árvore**, v.25, n.1, p.1-8, 2001.

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

DIBAX, R. ; QUISEN, R. C. ; BONA, C. ; QUOIRIN, M. Plant Regeneration from cotyledonary explants of *Eucalyptus camaldulensis* Dehn and histological study of organogenesis *in vitro*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n. 2, p. 311-318, 2010a.

DIBAX, R.; DESCHAMPS, C.; BESPALHOK FILHO, J. C.; VIEIRA, L. G. E.; MOLINARI, H. B. C.; CAMPOS, M. K. F. DE; QUOIRIN, M. Organogenesis and *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of *Eucalyptus saligna* with *P5CS* gene. **Biologia Plantarum**, v. 54, n. 1, p. 6-12. 2010b.

EINBOND L.S.; REYNERTSON K.A.; LUO X-D, BASILE MJ, KENELLY EJ. Anthocyanin antioxidants from edible fruits. **Food Chemistry**, v. 84, n. 1, p. 23-28, 2004.

ESPÍN J.C., SOLER-RIVAS C., WICHERS H.J., GARCÍA-VIGUERA C. Anthocyanin based natural colorants: A new source of antiradical activity for foodstuff. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 5, p. 1588-1592, 2000.

GIRI, C. C.; SHYAMKUMAR, B.; ANJANEYULU, C. Progress in tissue culture, genetic transformation and applications of biotechnology to trees: an overview. **Trees**, v. 18, p. 115–135, 2004.

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK, G. J. et al. **Plant Propagation by Tissue Culture**. Springer Netherlands, 2008. 65-113p.

GLOCKE, P., COLLINS, G., SEDGLEY, M. *In vitro* organogenesis from seedling explants of the ornamentals *Eucalyptus erythronema*, *E. stricklandii* and the interspecific hybrid *E. erythronema* x *E. stricklandii* cv. ‘Urrbrae Gem’. **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 80, p. 97–104, 2005.

GLOCKE, P.; DELAPORTE, K., COLLINS, G.; SEDGLEY, M. Micropropagation of juvenile tissue of *Eucalyptus erythronema* x *Eucalyptus stricklandii* cv. “Urrbrae Gem”. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, v. 42, p. 139-143, 2006.

GOMES, F.; CANHOTO, J. M. Micropropagation of *Eucalyptus nitens* Maiden (Shining Gum). **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, v. 39, p. 316-321, 2003.

GÓMEZ-ZELEDÓN, J.; JIMÉNEZ, V. M. Producción in vitro de antocianinas – Revisión. **Acta Biológica Colombiana**, v. 16, n. 1, 2011.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq, 1998. v.1, p.183-260.

GUO, B.; ABBASI, B. H.; ZEB, A.; XU, L. L.; WEI, Y. H. Thidiazuron: A multi-dimensional plant growth regulator. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 45, p. 8984-9000, 2011.

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.

JIANG, Q.; ZHANG, Y.; ZHONG, C.; ZENG, B.; BOGUSZ, D.; FRANCHE, C. Establishment of an *in vitro* plant regeneration protocol for *Casuarina cunninghamiana* Miq. via indirect organogenesis. **New Forests**, v. 43, p.143–154, 2012.

JOSHI, I.; BISHT, P.; SHARMA, V. K.; UNİYAL, D. P. *In vitro* clonal propagation of mature Eucalyptus F1 hybrid (*Eucalyptus tereticornis* Sm. x *E. grandis* Hill ex. Maiden). **Silvae Genetica**, v. 52, n. 3-4, p. 110-113, 2003.

KIM, J. Y.; SEO, Y. S.; KIM, J. E.; SUNG, S.K.; SONG, K. J.; GYNHEUNG, A.; KIM, W. T. Two polyphenol oxidases are differentially expressed during vegetative and reproductive development and in response to wounding in the Fuji apple. **Plant Science**, v. 161, n. 6, p. 1145–1152, 2001.

KONG J-M, CHIA L-S, GOH N-K, CHIA T-F, BROUILLARD R. Analysis and biological activities of anthocyanins. **Phytochemistry**, v. 64, n. 5, p. 923-933, 2003.

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

LLOYD, G.; MCCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **International Plant Propagation Society Proceedings**, v. 30, p. 421-427, 1980.

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. **Proceedings** of IUFRO Conference on Sylviculture and Improvement of *Eucalypts*, 2:192-199. 1997.

MARQUES, N. T.; NOLASCO, G. B.; LEITAO, J. P. Factors affecting in vitro adventitious shoot formation on internode explants of *Citrus aurantium* L. cv. Brazilian. **Scientia Horticulturae**, v.129, p. 176–182, 2011.

MOK, M. C.; MOK, D. W. S.; TURNER, J. E.; MUJER, C. V. Biological and biochemical effects of cytokinin-active phenylurea derivates in tissue culture systems. **HortScience**, v.22, n.6, p.1194-7, 1987.

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

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, n. 3, p. 473-497, 1962.

MURCH, S.J.; SAXENA, P. K. Molecular fate of thidiazuron and its effects on auxin transport in hypocotyls tissues of *Pelargonium x hortorum* Bailey. **Plant Growth Regulation**, v. 35, p. 269–275, 2001.

NICCOL, R.J.; REGAN, P.A; DE FILIPPIS, L. F. Simplified protocol for the micropropagation of selected *Eucalyptus* and *Banksia* species. **Australian Forestry**, v. 57, n. 4, p. 143-147, 1994.

NOCTOR, G.; FOYER, C. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. **Annual Review Plant Physiology Molecular Biology**, v.49, p.249-279, 1998.

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, n. 3, p. 388-391, 2001.

PADMAJA, G.; BALAGOPAL, C.; POTTY, V.P. Polifenoles y el deterioro fisiológico en yuca. Yuca; **Boletim Informativo**, Cali, v.10, n.5, 1982.

PALUDZYSZYN FILHO, E.; SANTOS, P. E. T. DOS; FERREIRA, C. A. Eucaliptos indicados para plantio no Estado do Paraná. Embrapa Florestas – CNPF. Documentos 129. 2006.

PASQUALI, G.; ZANETTINI, M. H. B. Transgênese florestal. In: BORÉM, A. (ed). **Biotecnologia florestal**. Viçosa. 2007, 317-334.

PEREIRA-NETTO, A. B.; OLIVEIRA, M. M. C. C.; RAMIREZ, J. A. ; GALAGOVSKY, L. R. Shooting control in *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* hybrid: comparative effects of 28-homocastasterone and a 5 α -monofluoro derivative. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 86, n. 3, p. 329-335, 2006.

PERES, L. E. P.; KERBAUY, G. B. High cytokinin accumulation following root tip excision changes the endogenous auxin-to-cytokinin ratio during root-to-shoot conversion in *Catsetum fimbriatum* Lindl. (Orchidaceae). **Plant Cell Reports**, v. 18, p. 1002-1006, 1999.

PERES, L. E. P. As bases fisiológicas e genéticas da regeneração de plantas *in vitro*: um conhecimento útil para o desenvolvimento de protocolos biotecnológicos. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 25, p. 44-48, 2002.

PREECE, J. Plant physiological factors affecting growth and morphogenesis. In: George, E.F.; Hall, M.A.; & De Klerk, G. (orgs.). **Plant Propagation by Tissue Culture**. Dordrecht, Springer, 3rd Edition, p. 403-422. 2008.

PRIOR RL. Fruit and vegetables in the prevention of cellular oxidative damage. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 78, n. 3, p. 570S-578S, 2003.

QUISEN, R. C.; OLIVEIRA, Y.; PILEGGI, M.; CUQUEL, F.; QUOIRIN, M. Selective agents and *A. tumefaciens* overgrowth-control antibiotics in *Eucalyptus camaldulensis* cotyledonary culture. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, n. 6, p. 1485-1492, 2009.

QUOIRIN, M.; LEPOIVRE, P. Etude de milieux adaptés aux cultures in vitro de *Prunus* sp. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v. 78, p. 437-442. 1977.

RICKARD, J.E.; MARRIOTT, J.; GAHAN, P.B. Oclusions in cassava xylem vessels associated with vascular discoloration. **Annals of Botany**, Colchester, v.4, n.43, p.523-526, 1979.

SANKARA-RAO, K. *In vitro* meristem cloning of *Eucalyptus tereticornis* Sm. **Plant Cell Reports**, v. 7, p. 546-549, 1988.

SCHOTTZ, E. S.; KALIL FILHO, A. N.; TRACZ, A. L.; KOEHLER, H.; RIBAS, L. L. F.; QUOIRIN, M. *In vitro* multiplication of *Swietenia macrophylla* King (Meliaceae) from juvenile shoots. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 17, n. 2, p. 109-117, 2007.

SELOTE, D. S.; BHARTI, S.; CHOPRA, R.; K. Drought acclimation reduces O₂ accumulation and lipid peroxidation in wheat seedlings. **Biochemistry and Biophysics Research Communication**, v.314, p.724-729, 2004.

SILVA, F. DE A. S.; AZEVEDO, C. A. V. DE. Principal Components Analysis in the Software Assisat-Statistical Attendance. 2009. In: World Congress on computers in Agriculture, 7, Reno-NV-USA: American Society of Agricultural and Biological Engineers.

STASOLLA, C.; YEUNG, E. C. Ascorbic acid improves conversion of white spruce somatic embryos. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, v. 35, p. 316-319, 1999.

TALLÓN, C. I.; PORRAS, I.; PÉREZ-TORNERO, O. High efficiency *in vitro* organogenesis from mature tissue explants of *Citrus macrophylla* and *C. aurantium*. **In Vitro Cellular Developmental Biololy-Plant**, v. 49, p.145–155, 2013.

THORPE, T. A. History of plant tissue culture. **Molecular Biotechnology**, v. 37, p. 169-180, 2007.

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, n. 4, p. 403-411, 2003.

TRINDADE, H.; FERREIRA, J.G.; PAIS, M.S. ALONI, R. The role os cytokinin and auxin in rapid multiplication of shoots of *Eucalyptus globulus* grown *in vitro*. **Australian Forestry**, v. 53, n. 3, p. 221-223, 1990.

WANG, H.; CAO, G.; PRIOR, R. L. Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 2, p. 304-309, 1997.

WERNER, E. T.; CUZZUOL, G. R. F.; PESSOTTI, V.; LOPES, F. P.; ROGER, J. A. R. Controle da calogênese do pau-brasil *in vitro*. **Revista Árvore**, v. 33, n. 6, p. 987-996, 2009.

WERNER, E. T.; MILANEZ, C. R. D.; MENGARDA, L. H. G.; VENDRAME, W. A.; CUZZUOL, G. R. F. Meios de cultura, reguladores de crescimento e fontes de nitrogênio na regulação da calogênese do pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.) **Acta Botanica Brasilica**, v. 24, n. 4, p. 1046-1051, 2010.

YASEEN, M.; AHMAD, T.; SABLOK, G.; STANDARDI, A.; I HAFIZ, I. A. Review: role of carbon sources for in vitro plant growth and development. **Molecular Biology Reports**, v. 40, p. 2837–2849, 2013.

4 OTIMIZAÇÃO DA TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE *Eucalyptus saligna* VIA *Agrobacterium tumefaciens*

RESUMO

Este estudo teve como objetivos avaliar, em experimentos distintos, o efeito de alguns fatores que podem afetar a transformação de explantes cotiledonares de *Eucalyptus saligna* via *Agrobacterium tumefaciens*, como a exposição dos explantes a uma solução antioxidante, a pré-cultura dos explantes, o uso de diferentes antibióticos e a adição de acetosiringona aos meios de co-cultura. Para verificar o efeito do antioxidante, foi testada uma solução composta por ácido ascórbico (250 mg L^{-1}), ácido cítrico (25 mg L^{-1}) e PVP-40 (1 g L^{-1}). A pré-cultura foi realizada por um período de 4 dias após o corte dos explantes, em meio de cultura MS suplementado com $4,4 \text{ } \mu\text{M}$ de BAP e $2,7 \text{ } \mu\text{M}$ de ANA, anterior a co-cultura com a bactéria. Para o estudo do efeito da canamicina (Km), testou-se três concentrações ($12,5$; 25 e 50 mg L^{-1}) combinadas com 300 mg L^{-1} de Augmentin[®], após o período de co-cultura. A influência do antibiótico foi avaliada através da manutenção dos explantes cotiledonares em meio contendo 300 mg L^{-1} de Augmentin[®] e 50 mg L^{-1} de Km ou 500 mg L^{-1} de cefotaxima e 50 mg L^{-1} de Km. Para avaliar o efeito da acetosiringona (AS), foi adicionado $50 \text{ } \mu\text{M}$ de AS ao meio de co-cultura sólido ou ao meio de co-cultura líquido ou nos dois meios. Ao final do presente trabalho, concluiu-se que a utilização da solução antioxidante testada é dispensável no momento da excisão de explantes em *E. saligna*, que não houve efeito da pré-cultura antes da inoculação dos explantes cotiledonares com *A. tumefaciens* e que o antibiótico Augmentin[®] favoreceu a organogênese em relação à cefotaxima. A concentração de $12,5 \text{ mg L}^{-1}$ de canamicina favoreceu a sobrevivência dos explantes mantidos em meio seletivo e apresentou efeito positivo sobre a seleção do material transformado. A adição da acetosiringona nos meios de co-cultura líquido e sólido melhorou a eficiência da transformação dos explantes cotiledonares.

Palavras-chave: antibiótico, organogênese, canamicina, acetosiringona, espécie florestal.

**OPTIMIZATION OF *Agrobacterium tumefaciens*-MEDIATED TRANSFORMATION
OF *Eucalyptus saligna***

ABSTRACT

This study aimed to evaluate, in separate experiments, the effect of some factors that may affect the genetic transformation of cotyledonary explants of *Eucalyptus saligna* mediated by *Agrobacterium tumefaciens*, such as the explant immersion in an antioxidant solution, explant preculture, different antibiotics that affect bud regeneration and of the presence of acetosyringone in co-culture media. To verify the antioxidant effect, a solution made of ascorbic acid (250 mg L⁻¹), citric acid (25 mg L⁻¹) and PVP-40 (1g L⁻¹) was tested. Preculture of the explants before the co-culture with bacteria was done over a period of 4 days, in MS culture medium supplemented with 4.4 μM BAP and 2.7 μM NAA. To study the effects of kanamycin (Km), three concentrations were tested (12.5; 25 and 50 mg L⁻¹), combined with 300 mg L⁻¹ of Augmentin[®], after the co-culture period. Influence of antibiotic was evaluated through cotyledonary explants maintenance in a medium containing 300 mg L⁻¹ Augmentin[®] and 50 mg L⁻¹ Km or 500 mg L⁻¹ cefotaxime and 50 mg L⁻¹ Km. To evaluate acetosyringone (AS) effect, 50 μM AS were added into solid co-culture medium or into liquid co-culture medium or into both media. At the end of this work it was concluded that the tested antioxidant solution is dispensable at the moment of explants excision in *E. saligna*; there was no effect of preculture before inoculation of cotyledonary explants with *A. tumefaciens*; Augmentin[®] helped organogenesis in comparison with cefotaxime; Km concentration of 12.5 mg L⁻¹ allowed explant survival when maintained in selective medium and, finally, AS addition in the liquid and solid co-culture media had positive effect on the transformation efficiency of cotyledonary explants.

Keywords: antibiotic, organogenesis, kanamycin, acetosyringone, forest species.

4.1 INTRODUÇÃO

O gênero *Eucalyptus* possui importância econômica em todo o mundo por ser a espécie mais largamente explorada como uma das principais fontes de biomassa (GIRIJASHANKAR, 2011). A grande demanda de matéria-prima, principalmente para a produção de celulose, carvão vegetal, óleos essenciais e madeira sólida para serrarias, justifica o forte desenvolvimento dos plantios com algumas espécies do gênero *Eucalyptus* (ALFENAS et al., 2004).

Em 2011, os plantios de *Eucalyptus* no Brasil totalizaram cerca de 5,8 milhões de hectares, representando um aumento de 2,5% em relação a 2010 (ABRAF, 2012). Da área de florestas plantadas com *Eucalyptus*, predomina *E. grandis*, que ocupa 55% da área total, seguido de 17% com *E. saligna*, 9% com *E. urophylla*, 2% com *E. viminalis*, 11% com híbridos de *E. grandis* x *E. urophylla* e 6% com outras espécies. A maioria dos plantios está localizada nas regiões sul e sudeste do país (CAMPOS et al., 2011).

As principais características que os programas de transformação genética com espécies florestais buscam inserir são relacionadas à redução do teor e composição da lignina, resistência a pragas e doenças, tolerância a herbicidas, aumento na produção de biomassa, remoção de poluentes por meio da fitorremediação, aumento da absorção de fósforo (VALDETARO et al., 2011), além da tolerância a estresses abióticos.

Além disso, segundo Quoirin e Quisen (2006), os principais alvos considerados no melhoramento de *Eucalyptus* via engenharia genética são as modificações na biossíntese de lignina ou redução do seu conteúdo, modificação nas propriedades das fibras, resistência a insetos e herbicidas e tolerância a estresses abióticos.

A espécie *E. saligna* está relativamente bem adaptada em todo o território nacional (FERRAZ e COUTINHO, 1984), porém esta espécie não apresenta tolerância ao frio (LE ROUX e VAN STADEN, 1991), sendo suscetível aos efeitos da geada. *E. saligna* também é considerado suscetível à seca e pouco tolerante ao excesso de umidade (ALFENAS et al., 2004), o que resulta em produtividades significativamente reduzidas quando as plantações são expostas a estresses abióticos (BOYER, 1982). Porém, clones selecionados podem ter a sua produtividade aumentada pela incorporação de genes relacionados à tolerância a estresses abióticos, pela transformação genética dentro de programas de melhoramento genético (BARRUETO CID et al., 1999).

Até o momento, poucos estudos *in vitro* foram conduzidos para a espécie *E. saligna*. Informações relacionadas à organogênese indireta de gemas surgiram com os estudos de

DIBAX et al. (2010). Além de verificarem diferenças na resposta morfogênica na regeneração de gemas entre cotilédones e folhas, os autores também estudaram a influência do BAP na multiplicação de gemas e de combinações de ANA e TDZ na indução de organogênese indireta a partir de explantes foliares.

Estudos recentes de transformação genética via *Agrobacterium tumefaciens*, foram realizados com *E. urophylla* (OUYANG et al., 2012) e *E. globulus* (MATSUNAGA et al., 2012), cujos objetivos foram promover a resistência a *Phytophthora capsici* e a tolerância à salinidade, respectivamente.

Alguns trabalhos também tem sido realizados para a otimização de protocolos de transformação genética. Alcantara et al. (2011), por exemplo, relataram que a eficiência de transformação genética do híbrido de *E. grandis* × *E. urophylla* é afetada pela duração da pré e da co-cultura e pela adição de acetosiringona nos meios de cultura. Já Quisen et al. (2009), estudaram o efeito de diferentes concentrações do antibiótico canamicina na seleção de células transformadas de *E. Camaldulensis* e verificaram diferenças quanto à regeneração em meio de cultura contendo antibióticos.

Dibax et al. (2010) evidenciaram um aumento significativo nos níveis de prolina nos tecidos foliares de *E. saligna* transformados com o gene *p5csf129a*, sendo que a quantidade de prolina acumulada na parte aérea das plantas transformadas foi quatro vezes superior a quantidade encontrada em plantas controle. Contudo, o protocolo estabelecido apresentou uma eficiência de 0,5% (1:200: explante transformado por explantes inoculados) (DIBAX et al., 2010), demonstrando a necessidade de novos estudos para otimizá-lo.

Visando contribuir com o protocolo de transformação de *Eucalyptus saligna*, este estudo teve como objetivos avaliar o efeito de alguns fatores que afetam a transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, como a exposição dos explantes a uma solução antioxidante, a pré-cultura dos explantes, a influência de diferentes bactericidas na regeneração de gemas e o efeito da utilização da acetosiringona na eficiência da transformação.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Local dos experimentos

Os trabalhos de transformação genética foram conduzidos no Laboratório de Micropropagação de Plantas do Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná (CQB 114/99).

4.2.2 Material vegetal

Para os ensaios de transformação genética foram utilizados cotilédones de *E. saligna*, oriundos de sementes cedidas pela Embrapa Florestas e pelo IPEF.

4.2.3 Condições gerais de cultura

As culturas *in vitro* foram mantidas em sala de crescimento, sob luz fluorescente branca fria com fluxo de fótons de $46,8 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, fotoperíodo de 16 h e temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Foram utilizadas placas de Petri de 2 cm de altura e 10 cm de diâmetro, contendo aproximadamente 25 mL de meio de cultura e vedadas com filme PVC. Todos os meios de cultura foram autoclavados durante 20 min a 120°C .

4.2.4 Desinfestação e germinação *in vitro*

A desinfestação foi realizada pela imersão das sementes em etanol 70% com Tween-20[®] (3 gotas/100ml) por 3 min e, posteriormente em NaOCl 6% durante 30 min. Em seguida, as sementes foram enxaguadas três vezes em água destilada autoclavada e inoculadas em meio de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) com redução dos sais pela metade (MS/2), suplementado com 30 g L^{-1} de sacarose e 6 g L^{-1} de ágar e pH ajustado para 5,8.

A solução bacteriana foi pipetada para tubo eppendorf estéril e centrifugada a 5.000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi descartado e as bactérias ressuspensas em meio de cultura MS líquido, com redução dos nitratos pela metade, 30 g L⁻¹ de sacarose e pH ajustado para 5,8. Os explantes cotiledonares foram inoculados na solução bacteriana e mantidos por 30 min em agitador orbital (120 rpm). Em seguida foram co-cultivados por 5 dias em meio de cultura MS N/2 sólido (com a redução dos nitratos pela metade), contendo 2,7 µM de ANA e 4,4 µM de BAP (DIBAX et al., 2005). Após a co-cultura sólida, os explantes foram transferidos para meio de cultura contendo os antibióticos seletivo e bactericida, de acordo com os experimentos.

4.2.7 Avaliação da expressão do gene *gus*

A avaliação da expressão do gene *gus* foi realizada por meio da reação histoquímica catalisada pela enzima β-glucuronidase na presença do tampão X-gluc (JEFFERSON, 1987). No total, 15 explantes de cada tratamento foram imersos na solução tampão composta por 10 mM de Na₂EDTA.H₂O, 0,1% de Triton X-100, 0,1 mM de NaH₂PO₄, 0,5 mM de K₄Fe(CN)₆ e 250 µg.mL⁻¹ de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-glucuronídeo e incubados a 37 °C por 16 h. Após o período de reação, os explantes foram mantidos em etanol 70% para eliminação da clorofila.

A determinação da expressão do gene *gus* foi visual e considerou-se como *gus* positivo o tecido que apresentou uma ou mais regiões com a coloração azul. A análise da expressão foi realizada após cinco e 12 dias da inoculação do tecido com a bactéria, conforme indicado em cada experimento.

4.2.8 Solução antioxidante durante a excisão dos explantes cotiledonares

Após 12 dias da semeadura em meio MS/2, os cotilédones das plântulas foram excisados para serem utilizados como explantes para a transformação genética. Este experimento teve por objetivo avaliar o efeito da exposição dos explantes à solução antioxidante no momento da excisão. Os tratamentos foram: a) corte dos explantes em solução antioxidante composta por ácido ascórbico (250 mg L⁻¹), ácido cítrico (25 mg L⁻¹) e PVP-40 (1g L⁻¹) (TOURNIER et al., 2003); b) corte dos explantes em água autoclavada.

Após o corte, os explantes foram inoculados na solução bacteriana por 30 min e submetidos a co-cultura sólida em meio MS N/2 (com a redução dos nitratos pela metade), contendo 2,7 μM de ANA e 4,4 μM de BAP, 30 gL^{-1} de sacarose e 6 gL^{-1} , por 5 dias. Após a co-cultura sólida os explantes foram transferidos, a cada 15 dias, para mesmo meio de cultura acrescido de 250 mgL^{-1} de Cx e 50 mgL^{-1} de km e procedeu-se a avaliação das seguintes variáveis: porcentagens de oxidação, formação de calos e regeneração de gemas (foi considerado como gemas as brotações não alongadas cujas folhas apresentaram menos que 0,5 cm de comprimento, sem a presença de caule) até os 60 dias. Cada tratamento possuiu quatro repetições, sendo cada repetição composta por 50 cotilédones. O experimento foi repetido uma vez.

4.2.9 Pré-cultura de explantes cotiledonares

Nesse experimento, os explantes cotiledonares foram submetidos aos seguintes tratamentos após o corte: a) um período de pré-cultura de 4 dias em meio de cultura MS suplementado com 4,4 μM de BAP e 2,7 μM de ANA, anterior a co-cultura com a bactéria; b) ausência da pré-cultura, onde a inoculação na solução bacteriana ocorreu logo após o corte dos explantes.

Após a inoculação e a co-cultura em meio MS N/2 (com a redução dos nitratos pela metade), contendo 2,7 μM de ANA e 4,4 μM de BAP, as avaliações foram realizadas a cada 15 dias de cultivo, sendo as variáveis analisadas: porcentagem de oxidação, formação de calos e regeneração de gemas (foi considerado como gemas as brotações não alongadas cujas folhas apresentaram menos que 0,5 cm de comprimento, sem a presença de caule) até os 60 dias e expressão do gene *gus* aos 5 dias. Cada tratamento teve quatro repetições, sendo cada repetição composta por 50 cotilédones. O experimento foi repetido uma vez.

4.2.10 Utilização de diferentes concentrações do antibiótico canamicina (Km) na regeneração de gemas e transformação genética

Ao final do período de co-cultura (5 dias), explantes cotiledonares foram transferidos para o mesmo meio acrescido do antibiótico bactericida Augmentin[®] - Sandoz (amoxicilina/ácido clavulânico - 1g/125mg) e de Km visando a eliminação da bactéria. Os tratamentos foram: a) 300 mg L^{-1} de Augmentin[®] e 50 mg L^{-1} de Km; b) 300 mg L^{-1} de Augmentin[®] e 25

mg L⁻¹ de Km; c) 300 mg L⁻¹ de Augmentin® e 12,5 mg L⁻¹ de Km. As placas de Petri contendo os explantes foram mantidas em condições de sala de crescimento, no escuro, por um período de 60 dias, sendo realizadas subculturas no mesmo meio de cultura a cada 15 dias. As culturas foram transferidas para luz por igual período. Foi realizada a avaliação das seguintes variáveis ao final de 60 e 120 dias de cultura: porcentagem de explantes oxidados, de explantes formando calos e de explantes regenerando gemas (foi considerado como gemas as brotações não alongadas cujas folhas apresentaram menos que 0,5 cm de comprimento, sem a presença de caule).

Após cada avaliação, foi realizada a transferência dos tecidos não oxidados para mesmo meio de cultura. Além do teste histoquímico da β-glucuronidase (JEFFERSON, 1987) realizado aos cinco dias da inoculação para verificar a expressão transiente do gene *gus*, foi realizado o PCR após 180 dias da transformação para verificação da expressão estável deste gene.

Cada tratamento possuiu cinco repetições, sendo cada repetição composta por uma placa de Petri contendo 20 explantes. O experimento foi repetido duas vezes.

4.2.11 Regeneração de gemas em explantes cotiledonares na presença de antibióticos

No presente experimento, ao final do período de co-cultura (5 dias), os explantes cotiledonares foram transferidos para o mesmo meio acrescido de Km e de diferentes antibióticos visando a eliminação da bactéria. Os tratamentos foram: a) 300 mg L⁻¹ de Augmentin® e 50 mg L⁻¹ de Km e b) 500 mg L⁻¹ de cefotaxima e 50 mg L⁻¹ de Km, tendo como base as concentrações sugeridas por Quisen et al. (2009), pertencentes a classe dos antibióticos β-lactâmicos (GUIMARÃES et al., 2010). As placas de Petri contendo os explantes foram mantidas em condições de sala de crescimento, no escuro, por um período de 60 dias, sendo subcultivadas para o mesmo meio de cultura a cada 15 dias. Foi realizada a avaliação das seguintes variáveis: porcentagem de explantes oxidados, porcentagem de explantes formando calos, porcentagem de explantes regenerando gemas (foi considerado como gemas as brotações não alongadas cujas folhas apresentaram menos que 0,5 cm de comprimento, sem a presença de caule) e porcentagem de explantes apresentando contaminação por *Agrobacterium tumefaciens*. A avaliação da presença da bactéria foi visual.

Após cada avaliação, foi realizada a transferência dos tecidos não oxidados para o mesmo meio de cultura. Cada tratamento possuiu seis repetições, sendo cada repetição composta por uma Placa de Petri contendo 20 explantes. O experimento foi repetido uma vez.

4.2.12 Acetosiringona (AS) na eficiência da transformação

Na transformação de explantes cotiledonares, durante o período de inoculação com a bactéria foi adicionado 50 μM de acetosiringona (AS) ao meio de cultura, segundo os tratamentos a seguir: 1- adição de AS durante a co-cultura sólida; 2- adição de AS durante a co-cultura líquida; 3- adição de AS nas duas co-culturas; 4- sem adição de AS; e 5- controle não transformado. Após a co-cultura, os explantes foram transferidos para meio de cultura (o mesmo da pré-cultura) adicionado dos antibióticos seletivo (Km 50 mg L^{-1}) e bactericida (Augmentin[®] 300 mg L^{-1}).

As culturas foram mantidas em de sala de crescimento, no escuro, por um período de 60 dias, sendo subcultivadas para mesmo meio de cultura a cada 15 dias. A cada 30 dias foram avaliadas as porcentagens de oxidação, formação de calos e regeneração de gemas (foi considerado como gemas as brotações não alongadas cujas folhas apresentaram menos que 0,5 cm de comprimento, sem a presença de caule). Após cada avaliação, foi realizada a transferência dos tecidos não oxidados para mesmo meio de cultura.

Foi realizado o teste histoquímico da β -glucuronidase (JEFFERSON, 1987) para verificar a expressão do gene *gus* após cinco e 12 dias da inoculação.

Cada tratamento possuiu cinco repetições, sendo cada repetição composta por uma placa de Petri contendo 20 explantes. O experimento foi repetido uma vez.

4.2.13 Extração de DNA e análise de integração do transgene

A extração do DNA genômico foi realizada de acordo com a metodologia de Doyle e Doyle (1987). Foram utilizadas aproximadamente três folhas de material vegetal cultivado *in vitro* (folhas provenientes de plantas putativas e de plantas controle mantidas *in vitro* com 180 dias da transformação).

A análise das plantas transformadas foi realizada por reação em cadeia da polimerase (PCR) para detectar a presença do transgene *gus* e *p5csf129a*. Cada reação (25 μL) continha 20 mM de Tris-HCl, 1,5 mM de MgCl_2 , 2 mM de cada dNTP, 1,0 U de *Taq* polimerase, 50 ng de DNA e 10 μM de cada oligonucleotídeo. Foram utilizados primers específicos, tanto para o gene *gus* (primers: 5'CAGCGCGAAGTCTTTATATACCG3' e 5'ATGCGTCACCACGGTGATATCG3'), quanto para o gene *p5csf129a* (primers: 5'AGCAACTCAACTCTCTCGGA3' e 5'CCACTCTAG ACTTGTCGCCA3'). As amostras

foram submetidas ao seguinte programa de temperaturas em termociclador (Applied Biosystems, Veriti, 96 Well Thermal Cycler) para a amplificação do fragmento: 94° por 3 min, seguido de 30 ciclos de amplificação a 94° por 1 min, 52° por 1min, 72° por 1min; 72° por 7 min e 4° até o momento da aplicação no gel. Os produtos das reações de PCR foram aplicados em gel de agarose 1,5% (p/v) contendo 0,5 µg de brometo de etídeo e, após eletroforese em tampão TBE 1X, foram visualizados sob luz UV.

4.2.14 Delineamento experimental e análise estatística

Em todos os experimentos, o delineamento estatístico foi o inteiramente casualizado. Primeiramente, foi aplicado um teste de homogeneidade de variâncias (Bartlett) e, em seguida, as médias obtidas entre as repetições de cada experimento foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. A análise estatística foi realizada utilizando o programa computacional ASSISTAT (SILVA e AZEVEDO, 2009).

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Efeito da solução antioxidante durante a excisão dos explantes cotiledonares

Não houve diferença estatística significativa entre os tratamentos em relação às variáveis analisadas. Obteve-se alta porcentagem de oxidação (83,2 e 87,2%) ao final de 60 dias, indicando que o tratamento não foi eficiente no controle da oxidação. Houve formação de calos em 62,8 e 63,6% dos explantes sobreviventes e baixa regeneração de gemas (Tabela 1 e Anexos 33 a 35).

Tabela 1 – Explantes cotiledonares de *Eucalyptus saligna* oxidados, com calo e gemas, tratados com solução antioxidante antes da inoculação com *Agrobacterium tumefaciens*. Média de dois experimentos. Avaliação após 60 dias de cultivo.

Tratamento	Explantes oxidados (%)*	Explantes com calo (%)*	Explantes com gema (%)*
Antioxidante	83,2 a	62,8 a	2,4 a
Água	87,2 a	63,6 a	2,0 a
CV (%)	3,75	3,88	7,04

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. Análises de variância (Anexos 33 a 35). Meio de cultura: meio MS N/2 contendo 2,7 µM de ANA e 4,4 µM de BAP, 250 mg L⁻¹ de cefotaxima e 50 mg L⁻¹ de canamicina. *Em relação ao número de explantes totais/iniciais.

De acordo com Quoirin e Quisen (2006), durante o processo de organogênese, nos primeiros dias ou no primeiro mês de cultura, é importante manter os explantes no escuro ou sob baixa intensidade luminosa a fim de evitar a oxidação. Além dessa prática auxiliar no controle da oxidação, a utilização de uma solução antioxidante durante a excisão dos explantes também é recomendada por Tournier et al. (2003) para *E. grandis* x *E. urophylla*. Contudo, no presente experimento, os explantes não responderam positivamente ao tratamento com a solução recomendada por Tournier et al. (2003) e apresentaram alta taxa de oxidação.

Os resultados desse experimento indicaram que a utilização do antioxidante testado no momento do corte não auxiliou na redução da oxidação do tecido.

4.3.2 Influência da pré-cultura na eficiência da transformação

A pré-cultura não interferiu no processo de regeneração e as médias não diferiram estatisticamente das obtidas no tratamento sem a pré-cultura (Anexos 36 a 38). Da mesma forma, em relação a porcentagem de explantes *gus* positivo, os dois tratamentos não diferiram entre si (Tabela 2 e Figura 2).

Os resultados encontrados de oxidação (82,8 e 83,2%) e calogênese (61,2 e 62,5%) sem pré-cultura e com a pré-cultura dos explantes, respectivamente, foram semelhantes aos verificados no experimento anterior.

Tabela 2 – Efeito da pré-cultura dos explantes cotiledonares por 4 dias na calogênese e organogênese após 60 dias da inoculação e na expressão do gene *gus* após 5 dias da inoculação com *Agrobacterium tumefaciens*, em meio de cultura MS (com a concentração dos sais reduzida pela metade), adicionado de 250 mg L⁻¹ de cefotaxima e 50 mg L⁻¹ de canamicina. Média de dois experimentos.

Tratamento	Explantes oxidados (%)*	Explantes com calo (%)*	Explantes com gema (%)*	Explantes expressando gene <i>gus</i> (%)**
Pré-cultura	82,8 a	61,2 a	1,6 a	20
Sem pré-cultura	83,2 a	62,5 a	1,2 a	20
CV (%)	2,47	4,33	12,30	

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. Análises de variância (Anexos 36 a 38). Pré-cultura em meio MS suplementado com 4,4 µM de BAP e 2,7 µM de ANA. Co-cultura em meio MS N/2 suplementado com 4,4 µM de BAP e 2,7 µM de ANA. *Em relação ao número de explantes totais/iniciais.**Análise aos 5 dias da inoculação.

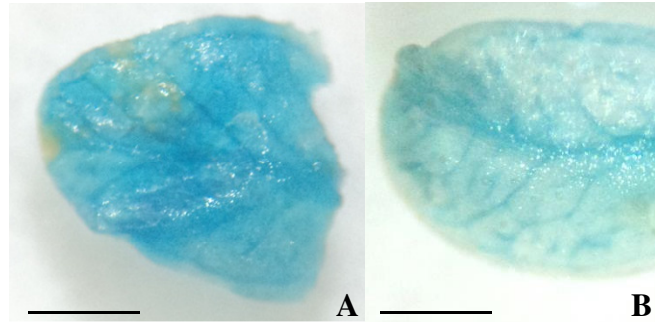


Figura 2 – Aspecto dos explantes cotiledonares de *E. saligna gus* positivos sem (A) e com (B) período de pré-cultura de quatro dias. Barra: 0,2 mm.

Os mecanismos que atuam na promoção da transformação genética mediada por *Agrobacterium* durante a pré-cultura, ainda não são bem compreendidos. Contudo, de acordo com Sangwan et al. (1992), a presença de auxinas e citocininas no meio de pré-cultura induz a desdiferenciação celular, aumentando a frequência da transformação.

Em *E. grandis* × *E. urophylla*, a pré-cultura de dois dias influenciou a expressão do gene *gus* e os explantes tiveram maior taxa de expressão do gene *gus* do que explantes cultivados durante um dia ou sem pré-cultura (ALCANTARA, et al., 2011). Em segmentos de hipocótilo de *E. camaldulensis*, o melhor resultado foi obtido com três dias de pré-cultura, seguidos por dois dias de co-cultura (HO et al., 1998). Nesse sentido, Moralejo et al. (1998) recomendam uma duração de pré-cultura entre 4 e 6 dias, de maneira a aumentar o nível de expressão do gene *gus* em cotilédones e hipocótilos de *E. globulus*.

Vários trabalhos com transformação genética de outras espécies mencionam a utilização da pré-cultura dos explantes antes da co-cultura com *Agrobacterium*, por períodos variáveis. Por exemplo, em melão, Akasaka-Kennedy et al. (2004) realizaram a pré-cultura dos explantes por dois dias (de acordo com testes prévios) e obtiveram expressão transitória e estável em 96,5 e 7,3% dos explantes, respectivamente, e a taxa de transformação excedeu 2,3%. Já Alvarez e Ordás et al. (2007) realizaram pré-cultura de explantes de carvalho por 20, 27 e 34 dias e a maior frequência de transformação (43%) foi encontrada após 20 dias de pré-cultura.

Segundo Saini e Jaiwal (2007), a redução da frequência de transformação em virtude da pré-cultura é devida à cicatrização do ferimento, que é um pré-requisito para a transformação via *Agrobacterium*. Essa redução pode ser atribuída também a um aumento na secreção de compostos que inibem a indução dos genes *vir* ou a diluição das moléculas sinal, que as induzem e que são produzidas no local do ferimento. O ferimento induz a divisão

celular e a produção de compostos fenólicos, como a acetosiringona e a β -hidroxi-acetosiringona. Essas moléculas sinal são reconhecidas por *Agrobacterium* e induzem a expressão dos genes *vir* e, com isso, ativam a transferência do T-DNA (ZAMBRYSKI, 1992).

Já para *Vigna mungo*, a pré-cultura dos explantes por 1, 2 e 3 dias em meio de regeneração não proporcionou o aumento do nível de expressão do gene *gus*, sendo a maior expressão (88%) encontrada em explantes não submetidos a pré-cultura. Já com a pré-cultura durante 3 dias, a frequência de transformação caiu para 4% (SAINI e JAIWAL, 2007). A redução da eficiência da transformação após a pré-cultura foi encontrada também em kiwi (JANSSEN e GARDNER, 1993) e maçã (DE BONDT et al., 1994); já em amendoim não apresentou nenhum efeito (SHARMA e ANJALIAH, 2000).

No presente estudo concluiu-se que a manutenção dos explantes em meio de pré-cultura por quatro dias não favoreceu a organogênese, bem como a expressão do gene *gus*. Com isso, a pré-cultura não foi realizada nos experimentos seguintes.

4.3.3 Utilização de diferentes concentrações de canamicina na seleção das células transformadas

Com relação à percentagem de oxidação e formação de calo não houve diferença significativa entre os três tratamentos (Tabela 3 e Anexos 39 a 42). Os números médios de gemas por explante foram 3,90; 2,53 e 1,62 para três concentrações de Km testadas (12,5; 25 e 50 mg L⁻¹, respectivamente) após 60 dias de período de co-cultura, demonstrando que a concentração de Km pode ter influenciado a organogênese do tecido, mais especificamente durante a diferenciação dos calos em gemas.

Mesmo não sendo verificada diferença estatística entre os tratamentos aos 60 dias da transformação, constatou-se que após 120 dias, o tratamento com a menor concentração de Km (12,5 mg L⁻¹) permitiu a sobrevivência do maior número de explantes. A manutenção dos explantes durante 120 dias nas três concentrações testadas de Km revelou que uma grande quantidade de regenerantes era constituída por escapes, que não possuíam o gene de resistência a canamicina e que necrosaram ao término desse período.

A definição da concentração ideal para a seleção de células transformadas é uma etapa de grande impacto no sucesso de todo um sistema de transformação genética e, para o gênero *Eucalyptus*, mostra-se bastante variável em função dos autores. Mullins et al. (1997) relataram que 9 mg L⁻¹ de Km foi suficiente para selecionar plantas de *E. camaldulensis* transgênicas. Já

para *E. tereticornis*, Prakash e Gurumurthi (2009) estabeleceram um protocolo eficiente, cuja frequência de transformação variou de 14,4 a 21,2%, e cuja concentração de canamicina para selecionar as plantas transformadas, foi 40 mg L⁻¹, sendo que concentrações superiores a esta inibiram totalmente a regeneração.

Tabela 3 - Efeito de três concentrações de Km sobre a organogênese de explantes cotiledonares de *Eucalyptus saligna* após co-cultura com *Agrobacterium tumefaciens*. Média de dois experimentos.

Km (mg L ⁻¹)	<i>gus</i> (%)*	Após 60 dias da Transformação			Número médio gemas/ explante***	Após 120 dias da Transformação	
		Explantes Oxidados (%)**	Explantes com Calo (%)**	Explantes com Gema (%)**		Explantes com gemas (%)**	Explantes necrosados (%)**
12,5	40	31,99 a	67,7 a	24,0 a	3,90 a	12	88
25	47	37,29 a	59,9 a	16,0 b	2,53 b	1	99
50	33	37,96 a	63,9 a	14,6 b	1,62 c	0	100
CV (%)		26,3	20,1	8,2	17,06		

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. Análises de variância (Anexos 39 a 42). * Análise aos 5 dias da inoculação. ** Em relação ao número de explantes totais/iniciais. *** Número médio de gemas por explante com gemas.

Wu et al. (2011) observaram a influência da Km na organogênese indireta em diferentes explantes de maçã. Em meio sem Km, 71,1% dos fragmentos foliares formaram calos e 47,7% desenvolveram brotos, já em meio com 20 mg L⁻¹ de Km, a formação de calos reduziu para 23,2%. Nesse sentido, QUISEN et al. (2009) mostraram que a Km é adequada para a seleção de células transformadas de *E. camaldulensis* na concentração de 9 mg L⁻¹ e observaram também que as doses mais altas do antibiótico foram fitotóxicas, não permitindo a seleção das plantas transformadas. Seus resultados demonstram que a capacidade calogênica e organogênica dos explantes cotiledonares de *E. camaldulensis* foi fortemente influenciada pelo agente seletivo utilizado, pois a partir de 3,0 mg L⁻¹ de Km, mesmo com 1,5 brotações/calos ocorreu uma redução de 50% nas médias obtidas para formação de calos organogênicos e brotações regeneradas em comparação com o tratamento controle. Esta elevada toxicidade da Km em tecidos de eucalipto tem sido observada por diversos autores, como Gonzáles (2002) em *E. grandis*.

Para esse mesmo autor, a existência de variabilidade genética em *Eucalyptus* para tolerância/resistência a alguns antibióticos permite a ocorrência de escapes, bem como diferentes respostas aos antibióticos incorporados no meio de cultura que podem interferir

com a organogênese *in vitro* das espécies. Nesse sentido, Dominguez et al. (2004) comentam que, embora seja necessária uma alta pressão de seleção do antibiótico para o sucesso da transformação de Citrus via *Agrobacterium*, ela inibe a regeneração de brotos na maioria das células transformadas e não transformadas.

De outro lado, quando se diminui a pressão de seleção, promove-se a regeneração de escapes e brotações quiméricas, tornando-se ineficientes os protocolos de transformação (MATTHEWS et al., 1998; DOMINGUEZ et al., 2004; FLACHOWSKY et al., 2008).

Mediante a análise molecular, constatou-se que, mesmo após um longo período em meio com agente seletivo, houve regeneração de escapes no presente experimento. O PCR dos 13 eventos sobreviventes, 12 regenerados em meio contendo 12,5 mg L⁻¹ de Km e um regenerado em meio com 25 mg L⁻¹, indicou a presença do gene *gus* em três eventos do tratamento com 12,5 mg L⁻¹ de Km (Figura 3). A eficiência de transformação no presente experimento foi de 1,5% (3/200), três vezes superior a encontrada por Dibax et al. (2010). Contudo, após os 120 dias de cultura *in vitro* não foi verificada a presença do gene *p5csf129a* nas amostras (Figura 4).

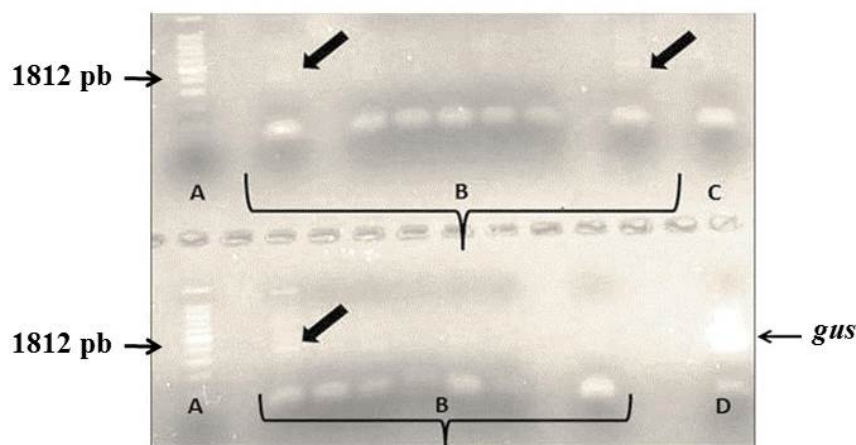


Figura 3- Eletroforese dos produtos do PCR realizado com DNA de *Eucalyptus saligna*. A. Marcador de peso molecular (Ladder 100 pb). B. Eventos regenerados em 12,5 ou 25 mg L⁻¹ de canamicina. C. Controle negativo. D. Controle positivo: DNA da bactéria contendo o gene *gus*. A flecha indica a banda do gene *gus* em três eventos regenerados e mantidos em 12,5 mg L⁻¹ de Km.

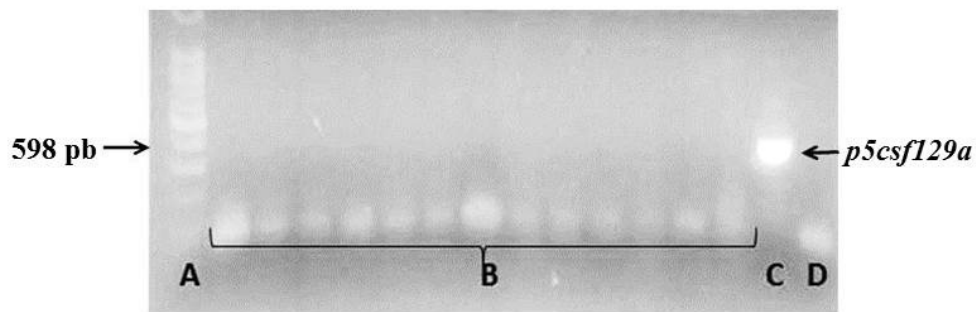


Figura 4- Eletroforese dos produtos do PCR realizado com DNA de *Eucalyptus saligna*. A. marcador de peso molecular (Ladder 100 pb). B. Eventos de plantas de *E. saligna* regenerados em 12,5 ou 25 mg L⁻¹ de canamicina. C. Controle positivo: DNA plasmidial contendo o gene *p5csf129a*. D. Controle negativo.

A ocorrência de algum problema durante a extração do DNA pode ter contribuído para esse resultado negativo, como por exemplo, a presença de compostos fenólicos, já que estes contaminantes, liberados durante a lise celular, aderem irreversivelmente ao DNA, inibindo a digestão com endonucleases de restrição e/ou a amplificação através de PCR (COUCH e FRITZ, 1990). Outra possibilidade seria em relação às condições do PCR, que podem ter sido desfavoráveis à detecção do gene. Além disso, pode ter ocorrido, durante a transferência do T-DNA para a célula vegetal, somente a inserção da porção que continha o gene repórter e o marcador de seleção. Alguns autores mencionam a influência do tamanho do T-DNA na eficiência da transformação via *Agrobacterium tumefaciens*. O T-DNA contido no plasmídeo utilizado nesse experimento apresenta 8,5 kb (CHEN et al., 2003). Park et al. (2000) demonstraram que pequenos fragmentos de T-DNA aumentam a eficiência da transformação em comparação com fragmentos grandes, em tabaco, algodão e arroz. Ao utilizarem T-DNA com 8,4 kb, os autores obtiveram 12%, 5,3% e 10,7% de eficiência em explantes de tabaco, algodão e arroz, respectivamente. Com a utilização de T-DNA contendo 4,3 kb, estes valores aumentaram para 19%, 10,1% e 23,8%.

Em 96 plantas transgênicas de petúnia resistentes a canamicina, Deroles e Gardner (1988) constataram que pelo menos 24 delas haviam perdido uma ou ambas as extremidades do T-DNA. Eles observaram que um pouco mais da metade das plantas transformadas continham o T-DNA intacto. No presente experimento, a construção gênica utilizada continha o gene de interesse na extremidade esquerda do T-DNA (Figura 1) e pode ter perdido esse fragmento durante a transferência.

4.3.4 Efeito de dois antibióticos na regeneração de gemas em explantes cotiledonares

A análise estatística mostrou diferenças significativas entre os tratamentos em todas as variáveis analisadas (Anexos 43 a 46). A utilização do antibiótico Augmentin[®] promoveu um menor percentual de oxidação (56,3%), maior percentual de formação de calos (80,8%) e gemas (46,6%) nos explantes cotiledonares, diferindo estatisticamente do tratamento contendo cefotaxima, que apresentou maior oxidação (79,1%) (Figura 5 e Tabela 4).

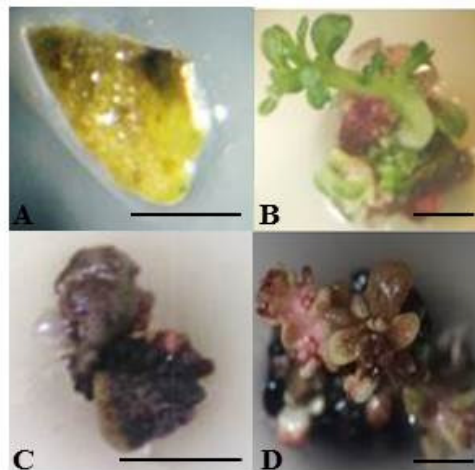


Figura 5 – Aspecto de explantes cotiledonares de *Eucalyptus saligna* aos 50 dias após a inoculação com *Agrobacterium tumefaciens*. A. Explante oxidado em meio com 300 mg L⁻¹ de Augmentin[®]. B. Explante regenerando gemas em meio com 300 mg L⁻¹ de Augmentin[®]. C. Explante oxidado em meio contendo 500 mg L⁻¹ de cefotaxima. D. Explante regenerando gemas em meio com 500 mg L⁻¹ de cefotaxima. Barra: 0,5 cm.

Quisen et al. (2009) utilizando a cepa C58C1 de *A. tumefaciens*, compararam diferentes concentrações destes dois antibióticos, isolados e combinados, durante a organogênese de explantes cotiledonares de *E. camaldulensis* e observaram o mesmo efeito do Augmentin[®]. Neste trabalho, a redução da concentração de Augmentin[®] (300 mg L⁻¹) após 15 dias, para a metade (150 mg L⁻¹), por mais 15 dias, seguido de 100 mg L⁻¹ (por 30 dias) permitiu a formação de gemas com um número médio por explante semelhante ao número obtido com o tratamento controle (5,4 gemas por calos). Em amendoim, a combinação de 200 mg L⁻¹ de cefotaxima com a mesma concentração de Augmentin[®] não somente foi favorável para a eliminação da bactéria, como também para a indução de brotos (TIWARI e TULI, 2012).

Oliveira et al. (2010) estudaram a influência dos antibióticos timentina, cefotaxima, Augmentin[®] e Meropenem na regeneração de brotos a partir de segmentos internodais em cultivares de *Citrus* e concluíram que a timentina e a cefotaxima tiveram efeito positivo na

regeneração. Já Mendes et al. (2009) demonstraram que a cefotaxima causou um efeito negativo na regeneração de brotos a partir de epicótilos de *Citrus*, da mesma maneira que no presente experimento.

Esse efeito variável dos antibióticos requer uma cautelosa avaliação de seus impactos na regeneração de plantas, visto que há vários relatos demonstrando que eles podem apresentar efeitos positivos ou negativos na morfogênese *in vitro* (COSTA et al., 2000; TANG et al., 2004; MENDES et al., 2009). No presente experimento, Augmentin[®] favoreceu a organogênese em relação à cefotaxima, que além de interferir negativamente na calogênese e formação de gemas, favoreceu a oxidação dos explantes (Tabela 4). Possivelmente, como ambos pertencem à mesma classe de antibióticos, a cefotaxima pode ter apresentado um efeito bacteriostático e não bactericida como desejado, o que pode ter influenciado a organogênese do tecido. Contudo, outras concentrações devem ser testadas para a completa comprovação desta hipótese.

Tabela 4 – Efeito do Augmentin[®] e da cefotaxima na organogênese indireta de explantes cotiledonares de *Eucalyptus saligna* inoculados com a bactéria, aos 60 dias de cultivo. Média de 2 experimentos.

Tratamento	Explantes oxidados (%)*	Explantes com calo (%)*	Explantes com gema (%)*	Contaminação por <i>A. tumefaciens</i> (%)*
Augmentin[®] (300 mg L ⁻¹)	56,3 b	80,8 a	46,6 a	18,3 b
Cefotaxima (500 mg L ⁻¹)	79,1 a	64,1 b	10,0 b	40,0 a
CV (%)	10,4	4,1	25,7	19,7

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. Análises de variância (Anexos 43 a 46). Meio de cultura: MS N/2 contendo 2,7 µM de ANA, 4,4 µM de BAP e 50 mg L⁻¹ de Km. *Em relação ao número de explantes totais/iniciais.

Além da influência observada nos aspectos morfogênicos, os dados obtidos revelam diferença estatística significativa entre os dois antibióticos em relação ao controle da *Agrobacterium* (Tabela 4). Após 60 dias de cultivo *in vitro*, a manutenção do antibiótico Augmentin[®] no meio de cultura controlou o ressurgimento da bactéria em 81,7% dos explantes inoculados. Já a cefotaxima não foi tão eficiente nesse aspecto, controlando a infecção em 60% dos explantes. Quisen et al. (2009) também avaliaram a influência desses dois antibióticos no controle de *Agrobacterium tumefaciens* em explantes cotiledonares de *Eucalyptus camaldulensis* e observaram o mesmo resultado. Nesse estudo, a manutenção dos

explantes após a co-cultura em meio contendo 500 mg L⁻¹ de cefotaxima por 30 dias, resultou na contaminação de 97,5% dos explantes inoculados ao final desse período. Já o cultivo dos explantes em meio com 300 mg L⁻¹ de Augmentin[®], resultou em 55% de contaminação no mesmo período.

4.3.5 Efeito da acetosiringona (AS) na eficiência da transformação

A análise estatística revelou diferenças significativas entre os tratamentos em todas as variáveis analisadas (Tabela 8 e Anexos 47 a 50). Os explantes não transformados apresentaram menor oxidação (60%). Já os maiores índices foram observados nos tratamentos contendo acetosiringona nos meios de co-cultura sólido e líquido (82%) e líquido (80%) (Tabela 5).

Tabela 5 – Efeito da acetosiringona (AS) na organogênese de explantes cotiledonares de *Eucalyptus saligna*, após 60 dias da inoculação com a bactéria. Média de 2 experimentos.

Tratamento	Explantes Oxidados (%)	Explantes com calo (%)	Explantes com Gema (%)	Número de Gemas/explante
AS no meio sólido	69,6 ab	30,0 ab	3,6 bc	2,0 b
AS no meio líquido	80,0 a	18,8 c	2,3 cd	1,0 c
AS sólido + líquido	82,0 a	19,7 bc	4,3 b	2,3 ab
Controle sem AS	73,0 ab	27,3 bc	1,3 d	1,0 c
Controle não transformado	60,0 b	39,7 a	12,7	2,6 a
CV (%)	11,6	21,1	20	13,3

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. Análises de variância (Anexos 47 a 50).

Quanto à calogênese, os explantes não transformados (T5) tiveram a maior taxa (39,7%), embora não diferindo estatisticamente do tratamento com AS no meio de cultura sólido (30,0%). Da mesma forma, T5 apresentou maior porcentagem de explantes com gemas (12,7%) e maior número de gemas por explante com gemas (2,6).

Em relação a porcentagem de explantes formando gemas e número médio de gemas por explante, os tratamentos T3 e T1 destacaram-se em relação aos demais e apresentaram os maiores valores (4,3 e 3,6%, respectivamente, de explantes com gemas; 2,3 e 2,0 gemas por explante). Já o controle transformado sem AS (T4) não diferiu do tratamento T2 com 1,3% e 2,3% dos explantes formando gemas, respectivamente.

A análise da expressão transiente do gene *gus*, realizada aos 5 dias da co-cultura com a bactéria, revelou influência da AS no processo de transformação (Figura 6). De uma forma geral, nota-se que a AS influenciou positivamente a expressão do gene *gus*. A expressão transiente no tratamento com adição do composto no meio de co-cultura líquido e sólido (T3), foi observada em 80% dos explantes.

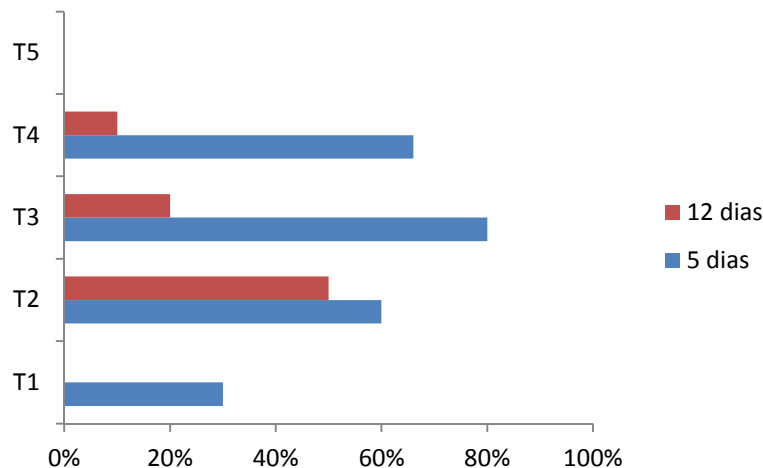


Figura 6 – Expressão do gene *gus* em tecidos cotiledonares de *Eucalyptus saligna*, após 5 e 12 dias de co-cultura com *Agrobacterium tumefaciens*. T1: AS (50 μ M) no meio de co-cultura sólido. T2: AS no meio de co-cultura líquido. T3: AS no meio de co-cultura sólido e líquido. T4: controle sem AS. T5: controle não transformado.

Após 12 dias da co-cultura, a análise revelou maior expressão do gene *gus* nos tratamentos com adição da AS no meio de co-cultura líquido (T2) (50%) e nos meios líquido e sólido (T3) (20%). Já no tratamento sem AS durante a co-cultura, apenas 10% dos explantes expressaram o gene *gus*, demonstrando que a AS influenciou positivamente a transformação.

Concentrações de AS superiores à 50 μ M devem ser testadas, visando favorecer a virulência da bactéria e, consequentemente, a infecção do tecido vegetal. Na literatura, alguns trabalhos recentes mostram que as concentrações indicadas de AS são muito variáveis e muitas vezes, superiores a 50 μ M. Jha et al. (2011) testaram três concentrações (100, 200 e 400 μ M) durante a co-cultura de ápices caulinares de *Pennisetum glaucum* e obtiveram maior frequência de transformação (5,79%) com 400 μ M. Por outro lado, Dutta et al. (2013) encontraram 14% de explantes *gus* positivo com a utilização de 200 μ M no meio de cultura líquido um dia antes da co-cultura de *Leptadenia pyrothnica* com a bactéria.

Bernal et al. (2009) testaram diferentes concentrações de acetosiringona (100, 150 e 200 μ M) durante a co-cultura sólida de calos embriogênicos de arroz com *Agrobacterium*

tumefaciens. Os autores observaram maior expressão do gene *gus* nos explantes co-cultivados com 100 μM de AS e mencionaram que os resultados encontrados são devidos ao efeito estimulante da AS na indução da região *vir*. A mesma concentração de AS (100 μM) foi indicada durante a co-cultura de cotilédones de girassol, cuja máxima frequência de transformação obtida foi de 51% (SUJATHA et al., 2012) e na co-cultura de *Whitania coagulans* (MISHRA et al., 2013).

4.4 CONCLUSÕES

Nas condições em que foi desenvolvido o presente estudo, pode-se verificar:

- A utilização da solução antioxidante testada é dispensável em *Eucalyptus saligna*.
- A pré-cultura dos explantes cotiledonares não afetou a organogênese e a expressão do gene *gus*.
- O antibiótico Augmentin[®] favoreceu a organogênese em relação à cefotaxima.
- A concentração de 12,5 mg L⁻¹ de Km foi eficiente na seleção do material transformado.
- A adição da AS no meio de co-cultura líquido aumentou a eficiência da transformação.
- A eficiência de transformação encontrada no presente trabalho (1,5%) foi superior a encontrada por Dibax et al. (2010b) (0,5%).

4.5 REFERÊNCIAS

- ALCANTARA, G. B. DE; BESPALHOK FILHO, J. C.; QUOIRIN, M. Organogenesis and transient genetic transformation of the hybrid *Eucalyptus grandis* × *Eucalyptus urophylla*. **Scientia Agricola**, v. 68, n. 2, 2011.
- ALFENAS, A. C.; ZAUZA, E. A. V.; MAFIA, R. G.; ASSIS, T. F. **Clonagem e doenças do Eucalipto**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2004. 442 p.
- AKASAKA-KENNEDY, Y.; TOMITA, K.; EZURA, H. Efficient plant regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation via somatic embryogenesis in melon (*Cucumis melo* L.). **Plant Science**, v. 166, p. 763–769, 2004.
- ÁLVAREZ, R.; ORDÁS, R. J. Improved genetic transformation protocol for cork oak (*Quercus suber* L.). **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 91, p. 45–52, 2007.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTORES DE FLORESTAS PLANTADAS. **Anuário Estatístico da ABRAF 2012**: ano base 2011. Brasília, 2012, 145p. Disponível em <<http://www.abraflor.org.br/estatisticas/ABRAF12/ABRAF12-BR.pdf>>. Acesso em 10 de novembro de 2012.
- 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.
- BERNAL, M.P.; HERNÁNDEZ, C.; BARCELÓ, M. T.; DELGADO, M.; ARMAS, R. Quantitative transient *GUS* expression in J-104 rice calli through manipulation of *in vitro* culture conditions. **Revista Colombiana de Biotecnología**, v.11, n. 2, p. 75-84, 2009.
- BOYER J.S. *Plant productivity and environment*. **Science** v.218, p. 443-448,1982.
- BRASILEIRO, A. C. M.; LACORTE, C. Interação *Agrobacterium*-hospedeiro. In: Brasileiro, A. C. M., Carneiro, V. T. C. (1998), **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília, Brasil. Embrapa- SPI/Embrapa-Cenargen, p.75-92.
- CAMPOS, D.; SILVA, T. DA et al. Colonização micorrízica em plantios de eucalipto. **Revista Árvore**, v. 35, n. 5, p. 965-974, 2011.

CHEN, P. Y.; WANG, C. K.; SOONG, S. C.; TO, K. Y. Complete sequence of the binary vector pBI121 and its application in cloning T-DNA insertion from transgenic plants. **Molecular Breeding**, v. 11, p. 287–293, 2003.

CONDE, P.; SOUZA, A.; COSTA, A.; SANTOS, C. A protocol for *Ulmus minor* Mill. Micropropagation and acclimatization. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, n. 92, p. 113-119, 2008.

COSTA, M.G.C.; NOGUEIRA, F.T.S.; FIGUEIRA, M.L.; OTONI, W.C.; BROMMOSCHENKEL, S.H.; CECON, P.R. Influence of the antibiotic timentin on plant regeneration of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cultivars. **Plant Cell Reports**, v.19, p.327-332, 2000.

COUCH, J.A.; FRITZ, P.J. Isolation of DNA from plants high in polyphenolics. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.8, p.8-12, 1990.

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

DEROLES, S. C.; GARDNER, R. C. Analysis of the T-DNA structure in a large number of transgenic petunias generated by Agrobacterium-mediated transformation. **Plant Molecular Biology**, v. 11, p. 365-377, 1988.

DIBAX, R.; DESCHAMPS, C.; BESPALHOK FILHO, J, C.; VIEIRA, L. G. E.; MOLINARI, H. B. C.; CAMPOS, M. K. F. DE; QUOIRIN, M. Organogenesis and *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of *Eucalyptus saligna* with *P5CS* gene. **Biologia Plantarum**, v. 54, n. 1, p. 6-12. 2010a.

DIBAX, R.; DESCHAMPS, C.; BESPALHOK FILHO, J, C.; VIEIRA, L. G. E.; MOLINARI, H. B. C.; CAMPOS, M. K. F. DE; QUOIRIN, M. Organogenesis and *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of *Eucalyptus saligna* with *P5CS* gene. **Biologia Plantarum**, v. 54, n. 1, p. 6-12. 2010b.

DI CIERO, L.; AMARAL, W. Árvores geneticamente modificadas na silvicultura intensiva. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, n.29, p.92-98, 2002.

DOMINGUEZ, A.; CERVERA, M.; PEREZ, R. M.; ROMERO, J.; CARMEN, C.; CUBERO, J.; LOPEZ, M. M.; JUAREZ, J. A.; NAVARRO, L.; PENA, L. Characterisation of regenerants obtained under selective conditions after *Agrobacterium*-mediated transformation

of citrus explants reveals production of silenced and chimeric plants at unexpected high frequencies. **Molecular Breeding**, v. 14, p. 171–183, 2004.

DUTTA, I.; KOTTACKAL, M.; TUMIMBANG, E.; TAJIMA, H.; ZAID, A.; BLUMWALD, E. Sonication-assisted efficient *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of the multipurpose woody desert shrub *Leptadenia pyrotechnica*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 112, p. 289–301, 2013.

FERRAZ, E. S. B. e COUTINHO, A. R. Efeitos da geada na madeira de *Eucalyptus saligna*. **Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais**, v. 28, p.57-62,1984.

FLACHOWSKY, H.; RIEDEL, M.; REIM, S.; HANKE, M. Evaluation of the uniformity and stability of T-DNA integration and gene expression in transgenic apple plants. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.11, p. 1–13, 2008.

GIRIJASHANKAR, V. Genetic transformation of eucalyptus. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 17, n. 1, p. 9-23, 2011.

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

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; MÔNICA TALLARICO PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010.

GUTIÉRREZ-NICOLAS, F.; RAVELO, A. G.; ZÁRATE, R. Seed germination and in vitro propagation of *Maytenus canariensis* through regeneration of adventitious shoots from axillary and apical buds. **Biologia Plantarum**, v. 52, n. 1, p. 173-176, 2008.

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

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.

JHA, P.; SHASHI; RUSTAGI, A.; AGNIHOTRI, P. K.; KULKARNI, V. M.; BHAT, V. Efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of *Pennisetum glaucum* (L.) R. Br. using

shoot apices as explant source. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.107, p. 501–512, 2011.

JANSSEN, B. J.; GARDNER, R. C. The use of transient *GUS* expression to develop on *Agrobacterium*-mediated gene transfer system for kiwifruit. **Plant Cell Reports**. 13: 28-31, 1993.

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

LE ROUX, J. J.; VAN STADEN, J. Micropropagation and tissue culture of Eucalyptus – a review. **Tree Physiology**, v.9, p. 435-477, 1991

MATSUNAGA, E.; NANTO, K.; OISHI, M.; EBINUMA, H.; MORISHITA, Y.; SAKURAI, N.; SUZUKI, H.; SHIBATA, D.; SHIMADA, T. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Eucalyptus globulus* using explants with shoot apex with introduction of bacterial choline oxidase gene to enhance salt tolerance. **Plant Cell Reports**, v.31, n.1, p. 225-235, 2012.

MATTHEWS, H.; DEWEY, V.; WAGONER, W.; BESTWICK, R.K. Molecular and cellular evidence of chimaeric tissues in primary transgenics and elimination of chimaerism through improved selection protocols. **Transgenic Research**, v. 7, p. 123–129, 1998.

MENDES, A.F. da S.; CIDADE, L.C.; OLIVEIRA, M.L.P. de; OTONI, W.C.; SOARES-FILHO, W. dos S.; COSTA, M.G.C. Evaluation of novel beta-lactam antibiotics in comparison to cefotaxime on plant regeneration of *Citrus sinensis* (L.) Osb. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.97, p.331-336, 2009.

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

MISHRA, S.; SANGWAN, R. S.; BANSAL, S.; SANGWAN, N. S. Efficient genetic transformation of *Withania coagulans* (Stocks) Dunal mediated by *Agrobacterium tumefaciens* from leaf explants of in vitro multiple shoot culture. **Protoplasma**, v.250, p. 451–458, 2013.

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

MULLINS, K. V.; LLEWELLYN, D. J.; HARTNEY, V. J.; STRAUSS, S.; DENNIS, 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 bioassay with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.

OLIVEIRA, M. L. P.; COSTA, M. G. C.; SILVA, C. V. S.; OTONI, W. C. Growth regulators, culture media and antibiotics in the *in vitro* shoot regeneration from mature tissue of citrus cultivars. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.45, n.7, p. 654-660, 2010.

OUYANG, L. J.; HE, W. H.; HUANG, Z. C.; ZHAO, L. Y.; PENG, S. H.; SHA, Y. E.; ZENG, F. H.; LU, X. Y. Introduction of the *RS-AFP2* gene into *Eucalyptus urophylla* for resistance to *Phytophthora capsici*. **Journal of Tropical Forest Science**, v. 24, n. 2, p. 198-208, 2012.

PARK, S. Y. et al. Micropropagation of *Salix pseudolasioogyne* from nodal explants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, n.93, p. 341-346, 2008.

PARK, S. H.; LEE, B. M.; SALAS, M. G.; SRIVATANAKUL, M.; SMITH, R. H. Shorter T-DNA or additional virulence genes improve *Agrobacterium*-mediated transformation. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 101, p. 1015–1020, 2000.

PRAKASH, M.G.; GURUMURTHI, K. Genetic transformation and regeneration of transgenic plants from precultured cotyledon and hypocotyl explants of *Eucalyptus tereticornis* Sm. Using *Agrobacterium tumefaciens*. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, v.45, p. 429–434, 2009.

QUISEN, R. C.; OLIVEIRA, Y.; PILEGGI, M.; CUQUEL, F.; QUOIRIN, M. Selective agents and *A. tumefaciens* overgrowth-control antibiotics in *Eucalyptus camaldulensis* cotyledonary culture. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, n. 6, p. 1485-1492, 2009.

SAINI, R.; JAIWAL, P.K. *Agrobacterium tumefaciens*: mediated transformation of blackgram: an assessment of factors influencing the efficiency of *uidA* gene transfer. **Biologia Plantarum**, v. 51, p. 69-74, 2007.

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

SHARMA, K.K.; ANJIAH, V. An efficient method for the production of transgenic plants of peanut (*Arachis hypogaea* L.) through *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation. **Plant Science**, v.159, p. 7-19, 2000.

SUJATHA, M.; VIJAY, S.; VASAVI, S.; REDDY, P. V.; RAO, S. C. *Agrobacterium*-mediated transformation of cotyledons of mature seeds of multiple genotypes of sunflower (*Helianthus annuus* L.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.110, p. 275–287, 2012.

TANG, W.; LUO, H.; NEWTON, R.J. Effects of antibiotics on the elimination of *Agrobacterium tumefaciens* from loblolly pine (*Pinus taeda*) zygotic embryo explants and on transgenic plant regeneration. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 79, p.71-81, 2004.

TIWARI, S.; TULI, R. Optimization of factors for efficient recovery of transgenic peanut (*Arachis hypogaea* L.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 109, p. 111–121, 2012.

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.; CITOVSKEY, V. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of plants: biology and biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 17, p. 147-154, 2006.

VALDETARO, E. B.; CARVALHO, A. P. V.; GAMBA, O. S.; DEMOLINARI, M. S. M.; SILVA, E. Árvores geneticamente modificadas: técnicas, aplicações, riscos e os potenciais impactos associados a sua utilização. *Pesquisa Florestal Brasileira*, v. 31, n. 65, p. 51-61, 2011.

ZAMBRYSKI, P.C. Chronicles from the *Agrobacterium*-plant cell DNA transfer story. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 43, p. 465-490, 1992.

ZHANG, C. S.; LU, Q.; VERMA, D. P. S. Removal of feedback inhibition of Δ^1 -Pyrroline-5-carboxylate synthetase, a bifunctional enzyme catalyzing the first two steps of proline biosynthesis in plants. **The Journal of Biological Chemistry**, v 270, n. 35, p 20491-20496, 1995.

5 CAPITULO 3 – ESTUDO DE PLANTAS DE *Nicotiana tabacum* TRANSFORMADAS COM O GENE *p5csf129a*

RESUMO

Este trabalho objetivou estudar plantas de *Nicotiana tabacum* transformadas com o gene *p5csf129a* sob controle do promotor CaMV35S, verificar possíveis alterações na morfologia e na anatomia foliar das plantas e na germinação de sementes T1 sob diferentes temperaturas, relacionando essas alterações com o conteúdo de prolina da parte aérea. Para tanto, plantas transformadas com 20 meses de cultivo *in vitro*, foram enraizadas e transferidas para casa de vegetação e avaliadas a cada 25 dias, totalizando cinco avaliações. As variáveis analisadas foram: altura da planta (cm), número de folhas, comprimento médio das folhas (cm), largura média das folhas (cm), distância média dos entrenós, número de flores, número de botões florais, comprimento médio das flores e número de frutos. Para o estudo da anatomia, foram realizadas medições da lâmina foliar nas secções transversais, sendo mensurada a espessura total da lamina foliar, espessura da epiderme nas faces adaxial e abaxial, e espessura do parênquima paliçádico e lacunoso, além da verificação do padrão de nervação. Para avaliar a germinação em T1, as sementes foram submetidas a diferentes temperaturas, alternadas e constantes, sendo avaliada a taxa de germinação diariamente durante 16 dias. A quantidade de prolina acumulada na parte aérea das plantas transformadas foi 4 a 11 vezes superior a do controle. Nas plantas transformadas que apresentaram maior acúmulo de prolina, foram observadas diferenças morfológicas nas folhas e flores. Por outro lado, as folhas não apresentaram diferenças qualitativas em relação às estruturas anatômicas analisadas, porém, diferenças quantitativas foram percebidas assim como diferenças no ângulo de inserção da nervura secundária com a primária, em relação ao controle, coincidindo com os maiores valores de prolina encontrados. Após a exposição à temperatura média de 6,7 °C, as sementes dos eventos transformados tiveram taxa de germinação superior (de 85 a 98%) em relação ao controle não transformado (73%). Conclui-se que as plantas que acumularam maiores teores de prolina apresentaram alterações na morfologia externa e anatomia, e as sementes formadas maior tolerância ao frio aplicado durante a germinação.

Palavras-chave: anatomia foliar, frio, germinação, morfogênese, prolina, tabaco.

STUDY OF *Nicotiana tabacum* PLANTS TRANSFORMED WITH *p5csf129a* GENE.**ABSTRACT**

This study aimed to characterize *Nicotiana tabacum* plants transformed with *p5csf129a* gene under control of the CaMV35S promoter, in order to verify alterations in their external morphology, in leaf anatomy, to quantify the proline content of the leaves and to analyze the T1 seeds germination under different temperatures, correlating the results with proline content. Therefore, transformed plants with 20 months of *in vitro* cultivation were rooted and transferred to greenhouse, being evaluated every 25 days, with a total of five evaluations. Analyzed variables were: plant height (cm), leaf number, average length of leaves (cm), leaf width (cm), average internode size, leaf number, floral buds number, average length of flowers and fruit number. For anatomical study, transverse sections of foliar blades were measured, evaluating total thickness of the blade, epidermic thickness in the adaxial and abaxial sides, thickness of palisade and spongy parenchymas, together with the internodal pattern verification. To evaluate germination in T1, seeds were submitted to variable and constant temperatures and the germination rates were evaluated daily during 16 days. The results allowed to conclude that the quantity of accumulated proline in the leaves of transformed plants was 4 to 11 times higher than in the control. In transformed plants that presented the highest proline accumulation, morphological differences in flowers and leaves were observed. On the other hand, leaf anatomical structure did not present qualitative differences; however, in plants with the highest proline values, quantitative differences were noticed such as in primary versus secondary vein insertion angle. After exposition to low temperatures (6.7°C), seeds of the transformed samples had a higher germination rate (85 to 98%) than the control seeds (73%).

Keywords: foliar anatomy, cold, germination, morphogenesis, proline.

5.1 INTRODUÇÃO

A L-prolina é um dos 20 aminoácidos presentes nas proteínas de todos os organismos vivos (CHERIAN et al., 2006). Sua biossíntese a partir do glutamato é catalizada pela enzima P5CS, que apresenta sensibilidade à inibição por retroalimentação. Zhang et al. (1995) produziram uma mutação no gene selvagem *p5cs* de *Vigna aconitifolia* para a remoção desta retroinibição. Desde então, vários trabalhos de transformação genética de plantas vem sendo realizados visando o suprimento ou aumento da expressão das enzimas chaves envolvidas no metabolismo da prolina.

Embora a transformação genética seja rotina para muitas espécies vegetais, ainda apresenta uma eficiência baixa para algumas espécies importantes, como feijão, café e algodão (ARAGÃO, 2002), além de várias lenhosas, dentre elas o gênero *Eucalyptus*. Assim, estudos relacionados à determinação da função de genes ainda estão limitados para estas espécies e devem, quando possível, ser conduzidos em plantas modelo (ARAGÃO et al., 2002). Para este fim, plantas de fumo (*Nicotiana tabacum*) são largamente utilizadas por serem facilmente transformadas, terem ciclo curto e produzirem grande quantidade de sementes (BRASILEIRO, 1998).

Contudo, a integração do transgene no genoma da planta é ao acaso e pode levar a alteração na expressão de outros genes da planta. Assim, fenômenos como co-supressão, epistasia e silenciamento de gene podem ser frequentemente observados (BRASILEIRO e DUSI, 1999). Essas alterações podem estar relacionadas com os diferentes fenótipos observados durante o desenvolvimento de algumas plantas transgênicas. Nanjo et al. (1999), trabalhando com plantas transgênicas de *Arabidopsis thaliana*, observaram anormalidades em sua morfologia foliar, devido a inserção de gene antisense *AtP5CS*. Os autores relacionaram as diferenças morfológicas encontradas nas flores e folhas das plantas transgênicas, com o importante papel que a prolina exerce sobre a morfogênese, nesse caso, pela supressão da sua produção.

Tendo em vista a importância do gene *p5csf129a* para o estudo da tolerância ao frio, este trabalho objetivou relacionar a morfologia externa de plantas de *Nicotiana tabacum* transformadas com o gene *p5csf129a* sob controle do promotor CaMV35S, com o conteúdo de prolina da parte aérea, além de verificar possíveis alterações na anatomia foliar e na germinação de sementes T1 sob diferentes temperaturas.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Local dos experimentos

Os trabalhos de transformação genética foram conduzidos no Laboratório de Micropropagação de Plantas do Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná (CQB 114/99) e as análises moleculares, no Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Florestas – Colombo/PR.

As análises histológicas foram realizadas no Laboratório de Botânica Estrutural do Departamento de Botânica, Setor de Ciências Biológicas da UFPR, os ensaios de germinação no Laboratório de Análise e Tecnologia de Sementes, a quantificação de prolina no Laboratório de Ecofisiologia Vegetal, Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Setor de Ciências Agrárias, UFPR.

5.2.2 Material vegetal

Sementes de *Nicotiana tabacum* (Wild Type - cv. Petit Havana SR-1) foram cedidas pelo IAPAR (Instituto Agrônômico do Paraná) de Londrina/PR.

5.2.3 Condições gerais de cultura

As culturas *in vitro* foram mantidas em sala de crescimento, sob luz fluorescente branca fria com fluxo de fótons de $46,8 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, fotoperíodo de 16 h e temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, em placas de Petri de 2 cm de altura e 10 cm de diâmetro, contendo aproximadamente 25 mL de meio de cultura e vedadas com filme PVC. Todos os meios de cultura foram autoclavados durante 20 minutos a 120°C . Após 30 dias de cultura, as brotações foram transferidas para frascos de vidro com 9 cm de altura e 6 cm de diâmetro, vedados com tampa de polipropileno, contendo aproximadamente 25 mL de meio de cultura.

5.2.4 Desinfestação, germinação e multiplicação *in vitro*

A desinfestação das sementes foi realizada pela imersão em etanol 70% com Tween-20[®] (3 gotas/100 ml), por 1 min, e posteriormente em NaOCl a 1% durante 20 min. Em seguida, as sementes foram enxaguadas 3 vezes em água destilada autoclavada e inoculadas em meio de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose e 6 g L⁻¹ de ágar (Vetec[®]) e o pH foi ajustado para 5,8 (BRASILEIRO, 1998). Após a germinação, as plântulas foram subcultivadas a cada 30 dias para o mesmo meio visando a multiplicação das gemas axilares.

Folhas de plantas micropropagadas no 2º subcultivo foram cortadas em quadrados de aproximadamente 1 cm², os quais foram utilizados como explantes para a transformação genética.

5.2.5 Cepa bacteriana e vetor binário

Foi utilizada a cepa EHA105 de *Agrobacterium tumefaciens*, com o vetor pBI121 carregando os genes *p5csf129a* (ZHANG et al., 1995) e *gus* (da β-glucuronidase), ambos sob controle do promotor 35S do vírus do mosaico da couve flor (CAMV) e o gene *nptII* da neomicinafosfotransferase, controlado pelo promotor *nos* cedida pelo IAPAR - Londrina.

5.2.6 Condições de cultura da bactéria, inoculação e co-cultura

A bactéria foi estocada sob refrigeração (5-10°C), em placas de Petri contendo meio YEB sólido (MILLER, 1972) suplementado com 50 mg L⁻¹ de Km e 25 mg L⁻¹ de rifampicina, sendo mensalmente repicada para novo meio de cultura. Anteriormente à transformação a genética foi transferida para mesmo meio de cultura e mantida a 28°C durante 48h (no escuro). Foram coletadas de duas a três colônias isoladas, com o auxílio de palitos de madeira estéreis, que foram cultivadas em 10 mL de meio YEB líquido adicionado de 50 mg L⁻¹ de Km e 25 mg L⁻¹ de rifampicina a 28° C no escuro por 12h em agitador orbital (150 rpm). A densidade ótica da suspensão bacteriana foi determinada por leitura em espectrofotômetro e a cultura foi diluída em meio MS líquido, até a obtenção de DO_{600nm} = 0,6.

A solução bacteriana foi pipetada para tubo eppendorf estéril e centrifugada a 5.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e as bactérias ressuspensas em 1 mL de MS/2 líquido (com a metade da concentração dos sais do MS). Os explantes foliares foram inoculados em placas de Petri contendo 200 μ L da suspensão bacteriana e 20 mL de meio INFTAB líquido (BRASILEIRO, 1998), composto pelos sais do MS, 100 mg L⁻¹ de mio inositol, 1 mg L⁻¹ de pantotenato de cálcio, 1 mg L⁻¹ de ácido nicotínico, 1 mg L⁻¹ de piridoxina, 1 mg L⁻¹ de tiamina e 0,01 mg L⁻¹ de biotina.

Após co-cultura líquida por 48 horas no escuro, os explantes foram lavados em meio INFTAB líquido e inoculados com a face adaxial em contato com o meio INFTAB sólido, acrescido de 1 mg L⁻¹ de BAP, 500 mg L⁻¹ de cefotaxima e 100 mg L⁻¹ de canamicina, por 15 dias. Em seguida, os explantes foram transferidos para mesmo meio de cultura contendo a mesma concentração de canamicina e a metade da concentração de cefotaxima (250 mg L⁻¹).

5.2.7 Avaliação da expressão do gene *gus*

A avaliação da expressão do gene *gus* foi realizada por meio da reação histoquímica catalisada pela enzima β -glucuronidase na presença do tampão X-gluc (JEFFERSON, 1987). No total, cinco explantes de cada placa foram imersos na solução tampão composta por 10 mM de Na₂EDTA.H₂O, 0,1% de Triton X-100, 0,1 mM de NaH₂PO₄, 0,5 mM de K₄Fe(CN)₆ e 250 μ g.mL⁻¹ de 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucuronídeo e incubados a 37°C por 16 h. Após o período de reação, os explantes foram mantidos em etanol 70% para eliminação da clorofila.

A determinação da expressão do gene *gus* foi visual e considerou-se como *gus* positivo o tecido que apresentou uma ou mais regiões com a coloração azul. A análise da expressão foi realizada após cinco e 90 dias da inoculação do tecido com a bactéria.

5.2.8 Extração de DNA e análise de integração do transgene

A extração do DNA genômico foi realizada de acordo com a metodologia de Doyle e Doyle (1987). Foram utilizadas de duas folhas por evento, retiradas do terço superior de plantas mantidas em sala de crescimento, 16 meses após a transformação.

A análise das plantas transformadas foi realizada por reação em cadeia da polimerase (PCR) para detectar a presença do transgene *p5csf129a*, com aproximadamente 598 pares de base. Foram utilizados primers específicos para o gene *p5csf129a* (primers: 5'AGCAACTCAACTCTCTCGGA3' e 5'CCACTCTAG ACTTGTCGCCA3'). As amostras foram submetidas ao seguinte programa de temperaturas em termociclador (Applied Biosystems, Veriti, 96 Well Thermal Cycler) para a amplificação do fragmento: 94° por 3 min, seguido de 30 ciclos de amplificação a 94° por 1 min, 52° por 1min, 72° por 1 min; 72° por 7 min e 4° até o momento da aplicação no gel. Os produtos das reações de PCR foram aplicados em gel de agarose 1,5% (p/v) contendo 0,5 µg de brometo de etídeo e, após eletroforese em tampão TBE 1X, foram visualizados sob luz UV.

5.2.9 Aclimatização das plantas

Após 20 meses de cultivo *in vitro*, as plantas foram enraizadas em meio MS sólido contendo 100 mg L⁻¹ de Km, sem regulador vegetal, e pré-aclimatizadas em sala de crescimento por um período de 48 horas. A pré-aclimatização consistiu no afrouxamento da tampa dos frascos de cultura e da adição de 10 mL de água destilada. As raízes foram então lavadas para retirada do meio de cultura e as plantas transferidas para vasos plásticos contendo 2,8 kg de solo adicionado de 0,25 g de K₂O, 0,06g de uréia e 0,2 g de P₂O₅, de acordo com as recomendações para a cultura e a análise de solo. A cada 15 dias foi realizada adubação com solução nutritiva composta pelos sais do MS reduzidos pela metade, sem adição de sacarose.

Foram aclimatizadas quatro repetições (plantas) de cada um dos seis eventos *gus* positivo e seis repetições de plantas controle não transformadas. A irrigação dos vasos, em casa de vegetação foi em regime intermitente, sendo programada às 10h e 16h durante 15 min.

5.2.10 Determinação do teor de prolina

A quantificação da concentração de prolina foi realizada conforme protocolo descrito por Bates et al. (1973). Foram coletadas folhas do 4° nó a partir do ápice de todas as plantas com 12 semanas da aclimatização, visando a padronização das amostras, que resultaram em 470 mg de material vegetal por amostra. Após a maceração, a extração foi feita com adição de 4 mL de ácido sulfosalicílico (3%) e, em seguida, o extrato foi centrifugado (12.000 rpm por

10 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, homogeneizadas por 20 s para completa extração de prolina e então, feita a leitura por espectrofotometria (Abs_{520nm}) para a determinação da concentração de prolina.

5.2.11 Análises morfológicas de T0

A cada 25 dias, todas as 30 plantas foram avaliadas, totalizando 5 avaliações. As variáveis analisadas no terço médio de cada planta foram número de folhas, comprimento médio das folhas (cm), largura média das folhas (cm), distância média dos entrenós, número de flores, número de botões, comprimento médio das flores (considerando cálice e corola), número de frutos e altura da planta (cm). Após o término do experimento, foi realizada em cada planta a pesagem da massa seca total, da parte aérea e do sistema radicial.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro repetições/planta (R) por evento. Primeiramente, foi aplicado um teste de homogeneidade de variâncias (Bartlett) e, em seguida, as médias obtidas entre as repetições de cada experimento foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. A análise estatística foi realizada utilizando o programa computacional ASSISTAT (SILVA e AZEVEDO, 2009).

5.2.12 Análises anatômicas das folhas

Duas folhas por repetição de cada evento foram coletadas do 5º nó a partir do ápice da planta para a realização da diafanização e cortes histológicos. Essas técnicas serviram como base para a análise do padrão de nervação e para a descrição foliar qualitativa e quantitativa, respectivamente.

As folhas foram fixadas em FAA 50 (JOHANSEN, 1940), e amostras do terço mediano do limbo foram desidratadas em série etanólica, incluídas e emblocadas em historesina (Leica Historresin®) seguindo as instruções do fabricante. Foram feitas secções

transversais com aproximadamente 4 μm de espessura, em micrótomo rotativo Leica RM2145. As secções foram coradas com azul de toluidina 0,05% em tampão acetado pH 4,7 (O'BRIEN et al. 1965).

Folhas inteiras foram diafanizadas para a classificação da nervação, utilizando-se a metodologia de Strittmatter (1973). A nomenclatura morfológica adotada nas descrições e o padrão de nervação foram aqueles recomendados pelo Leaf Architecture Working Group (1999).

Foram realizadas medições da lâmina foliar com o auxílio de microscópio com câmara clara, sendo 30 medições em cada repetição/planta dos eventos transformados e do controle. Nas secções transversais foi mensurada a espessura total da lamina foliar, espessura da epiderme nas faces adaxial e abaxial e espessura do parênquima paliádico e lacunoso. Foram feitas medições das distâncias de inserção e do ângulo de inserção das nervuras secundárias com a primária, com auxílio de régua e transferidor. Observações referentes a estruturas celulares como parede celular também foram realizadas.

O delineamento experimental empregado foi inteiramente casualizado, com quatro repetições (plantas) por evento, sendo as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

5.2.13 Análise da segregação de sementes T1

Após a frutificação e maturação das cápsulas das plantas T0, sementes T1 foram desinfestadas de acordo com o item 5.2.4 e semeadas em meio MS contendo 100 mg L⁻¹ de canamicina, para verificação da segregação mendeliana (3:1), exceto os eventos 1 e 2 que não produziram sementes. As placas foram mantidas em sala de crescimento, sob luz fluorescente branca fria com fluxo de fótons de 46,8 mmol m⁻² s⁻¹, fotoperíodo de 16 h e temperatura de 25 \pm 2°C, sendo a germinação avaliada após 30 dias da semeadura.

Cada repetição foi composta por uma placa contendo 20 sementes, totalizando 6 repetições por evento, mais o controle. Para a verificação da segregação, foi aplicado o teste de χ^2 .

5.2.14 Análise do efeito do frio na germinação de T1

As sementes coletadas das plantas/repetições (R) que possuíram maior conteúdo de prolina nos eventos 7, 11, 12 e 13 (Figura 1A) foram homogeneizadas, assim como as sementes das plantas controle e colocadas em B.O.D. para verificação da tolerância ao estresse por baixa temperatura.

Durante o período experimental, as sementes foram armazenadas em eppendorf sob refrigeração (5-10°C).

A determinação do teor de água das sementes foi realizada pelo método de estufa a 103 ± 2 °C, durante 17 horas, de acordo com as recomendações das Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009), com duas subamostras de 0,200 g por evento.



Figura 1 – A. Detalhe das cápsulas maduras e sementes de *Nicotiana tabacum*. Barra: 0,5 cm.

O teste de germinação foi conduzido com quatro subamostras de 50 sementes por repetição, sendo essas derivadas da homogeneização das sementes das cápsulas das repetições que possuíram maior conteúdo de prolina. As sementes foram colocadas para germinar em caixas plásticas de 11,0 x 11,0 x 3,5 cm, distribuídas sobre duas folhas de papel mata-borrão, umedecidas com solução de nitrato de potássio (KNO_3) a 0,2%, para superação de dormência, em quantidade equivalente a 2,5 vezes a massa do papel seco. As contagens foram realizadas diariamente até o 16º dia após a semeadura, computando-se a porcentagem de plântulas normais ao final do teste, segundo os critérios estabelecidos nas Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009).

Como método de referência, o teste de germinação foi conduzido sob temperatura alternada de 20 – 30 °C (noite/dia), com fotoperíodo de oito horas (BRASIL, 2009). Para testar a tolerância das sementes a diferentes temperaturas no momento da germinação, as mesmas foram colocadas para germinar nas seguintes condições:

- a) Temperaturas de 15 – 25°C; 30 °C; 25 °C; 20 °C e 15 °C, com fotoperíodo de oito horas;
- b) Tratamento de pré-esfriamento, com temperatura média de 6,7 °C (refrigerador) por cinco dias (BRASIL, 2009). Ao final desse período, as caixas plásticas foram transferidas para incubadora tipo B.O.D. e o teste de germinação foi conduzido normalmente de acordo com o método de referência.

Juntamente com o teste de germinação, em todas as temperaturas testadas foi determinado o índice de velocidade de germinação (MAGUIRE, 1962), por meio da fórmula $IVG = G1/N1 + G2/N2 + \dots + Gn/Nn$, onde: G1, G2, Gn = número de sementes germinadas na primeira, segunda, até a última contagem e N1, N2, Nn = número de semanas desde a primeira, segunda, até a última contagem, mediante contagens diárias de plântulas normais.

O delineamento experimental empregado foi inteiramente casualizado, em esquema bifatorial de 9 x 7 (nove amostras e sete temperaturas), com quatro repetições (4 caixas plásticas contendo 50 sementes cada), sendo as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1 Expressão do gene *gus* e integração do gene *p5csf129a*

Após o período de 5 dias de co-cultura líquida com a solução bacteriana (Figura 2A), a avaliação histoquímica da expressão do gene *gus* (Figura 2B) revelou a expressão transiente desse gene nos explantes. Os explantes iniciaram a regeneração de gemas (Figura 2C) aproximadamente aos 45 dias após o término da co-cultura, e estas foram micropropagadas. Após 90 dias da transformação, a expressão manteve-se nos brotos regenerantes dos explantes que apresentaram *gus* positivo, sendo confirmada mediante coleta de folhas das brotações regeneradas *in vitro* e avaliação histoquímica.

Foram realizadas 16 subculturas em meio contendo 100 mg L⁻¹ de canamicina (Figura 2D) até o momento da coleta de amostras para a realização das reações de PCR para confirmação da presença do gene.

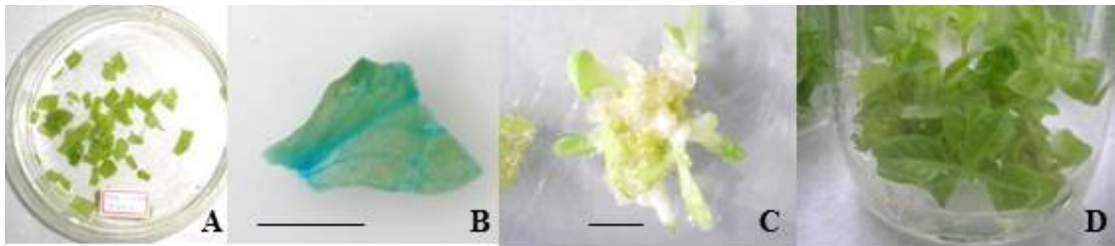


Figura 2 – A. Co-cultura de explantes foliares de *Nicotiana tabacum* na suspensão bacteriana. B. Explante *gus* positivo, aos 5 dias da transformação. C. Explante regenerando gemas após 35 dias da inoculação com a bactéria. D. Culturas *in vitro*. Barra: 0,5 cm.

Nove eventos se destacaram quanto ao vigor e resistência ao antibiótico seletivo. Esses eventos foram denominados eventos 1, 2, 4, 6, 7, 10, 11, 12 e 13.

A análise de PCR realizada 16 meses após a transformação, confirmou a inserção do gene *gus* em sete eventos (Figura 3), denominados eventos 1, 2, 7, 10, 11, 12 e 13. A confirmação da integração do gene *p5csf129a* nos eventos 1, 2, 4, 7, 10, 11, 12 e 13 foi confirmada pela reação de PCR (Figura 4).

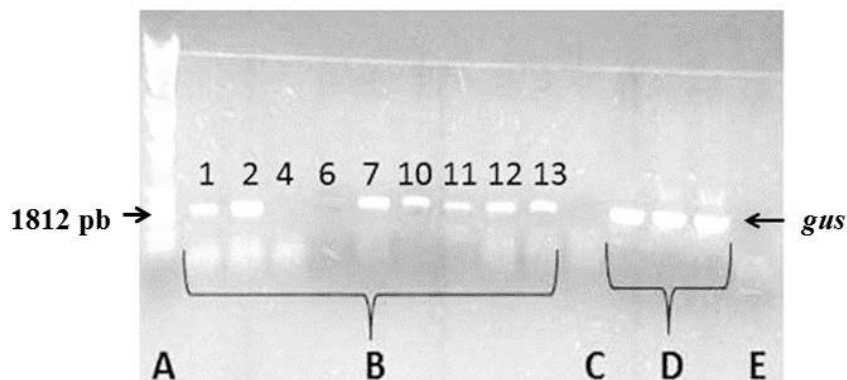


Figura 3- Eletroforese dos produtos do PCR realizado com DNA de folhas transformadas de *Nicotiana tabacum*. A. marcador de peso molecular (Ladder 100 pb). B. Nove eventos regenerados em meio de seleção. C. Controle negativo: planta controle não transformada. D. Controle positivo: DNA plasmidial contendo o gene *gus*. E. Branco.

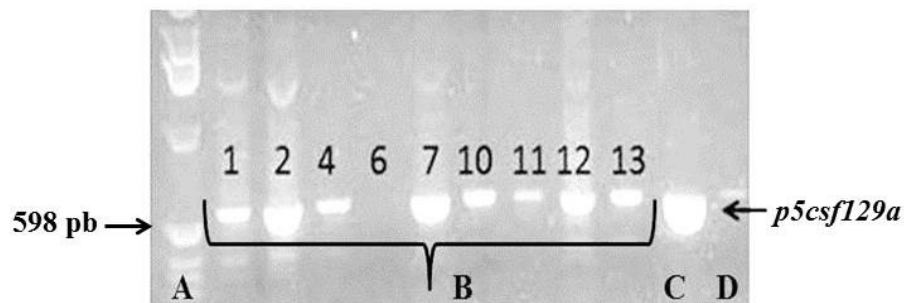


Figura 4- Eletroforese dos produtos do PCR realizado com DNA de folhas transformadas de *Nicotiana tabacum*. A. marcador de peso molecular (Ladder 100 pb). B. Nove eventos regenerados em meio de seleção. C. Controle positivo: DNA plasmidial contendo o gene *p5csf129a*. D. Controle negativo.

Os eventos 4 e 10 apresentaram contaminação por bactéria *in vitro*. Por essa razão, foram descartados e foram aclimatizados em casa de vegetação os eventos 1, 2, 7, 11, 12 e 13 cujas análises moleculares confirmaram a inserção dos genes *gus* e *p5csf129a*, além do controle não transformado.

5.3.2 Determinação do teor de prolina

A quantidade de prolina das folhas das plantas transgênicas foi superior à quantidade encontrada em plantas controle. As plantas controle acumularam um valor médio de 1,18 μmol de prolina/g de massa fresca (Figura 5). Já as plantas transformadas acumularam valores médios que variaram de 4,85 a 13,92 μmol de prolina/g de massa fresca, de acordo com o evento. Foi observado o aumento significativo do conteúdo de prolina nos tecidos foliares das plantas de *Nicotiana tabacum* transformadas com o gene *p5csf129a*. Os eventos 1 e 2 apresentaram os maiores teores de prolina, seguidos dos eventos 12, 11, 13 e 7 (Figura 5).

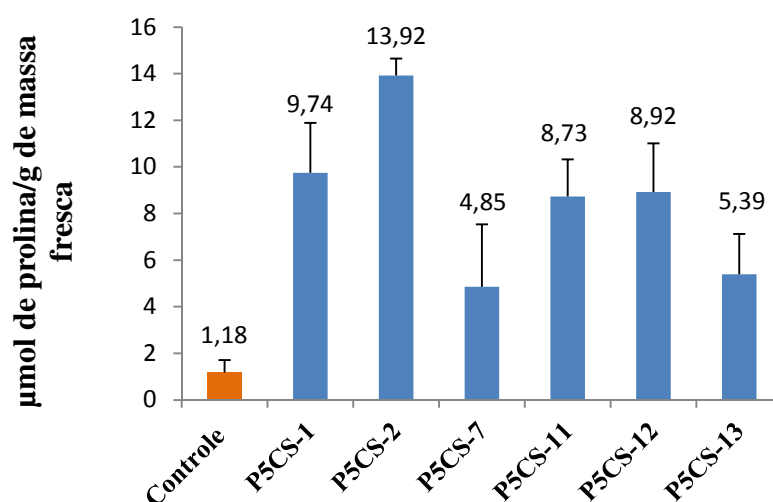


Figura 5 - Concentração de prolina em folhas de *Nicotiana tabacum* em plantas controle e eventos transformados com o gene *p5csf129a*, aos 80 dias da aclimatização.

O teor de prolina do evento 2 (11,8 vezes o valor encontrado no controle) se assemelha aos encontrados por Kavi-Kishor et al. (1995) em tabaco transformado com o gene *p5cs*, sob controle do promotor CaMV35S. Nesse trabalho, o conteúdo de prolina nas plantas transformadas foi 14 vezes superior ao do controle. Já Sawahel e Hassen (2002) obtiveram plantas de trigo transformadas com o mesmo gene, acumulando 12 vezes mais prolina que as

plantas do controle. O acúmulo de prolina mostra-se variável de acordo com a espécie estudada e com o tecido analisado. Por exemplo, na espécie florestal *Larix* sp., o nível de prolina acumulado em massas celulares embriogênicas expressando o gene *p5cs* foi aproximadamente 30 vezes superior ao observado no controle não transformado. Estes níveis permaneceram constantes após a regeneração das plantas em meio de cultura sem canamicina (GLEESON et al., 2005). Já Dibax et al. (2010) obtiveram plantas de *Eucalyptus saligna* transformadas com o gene *p5cs* apresentando um teor médio de 13,39 μmol de prolina por g de massa fresca das folhas, sendo este valor aproximadamente quatro vezes maior que o observado nas plantas não transformadas. Esse teor é semelhante ao encontrado no evento 2 do presente experimento.

Os resultados do presente estudo evidenciaram a expressão do gene *p5csfl29a* em plantas transformadas de tabaco, refletida nos níveis de prolina nas folhas. Plantas transgênicas acumularam quantidades de prolina superiores a do controle, dependendo do evento, em 4 a 11 vezes. As diferenças encontradas quanto ao acúmulo de prolina entre os eventos, podem ser decorrentes da variação no número de cópias do gene inseridas no genoma da planta durante a transformação genética.

5.3.3 Análises morfológicas de plantas T0

A análise estatística revelou, ao longo das cinco avaliações realizadas, diferenças significativas nos parâmetros avaliados entre os eventos transformados e o controle (Anexos 51 a 80).

A Figura 6 apresenta o resultado das avaliações morfológicas. Em relação à variável altura da planta, não houve diferença estatística na avaliação aos 20 dias da aclimatização (Anexo 51). Já nas avaliações seguintes, o evento 12 se destacou entre os demais com os maiores valores (de 15,5 a 66,3 aos 40 e 100 dias, respectivamente) (Figura 6A). A partir de 80 dias, os eventos 1 e 2 apresentaram uma altura menor (Figuras 6A e 7) que os demais eventos e os menores valores para esta variável. Os eventos 1 e 2 foram aqueles que acumularam a prolina em maior concentração (Figura 5).

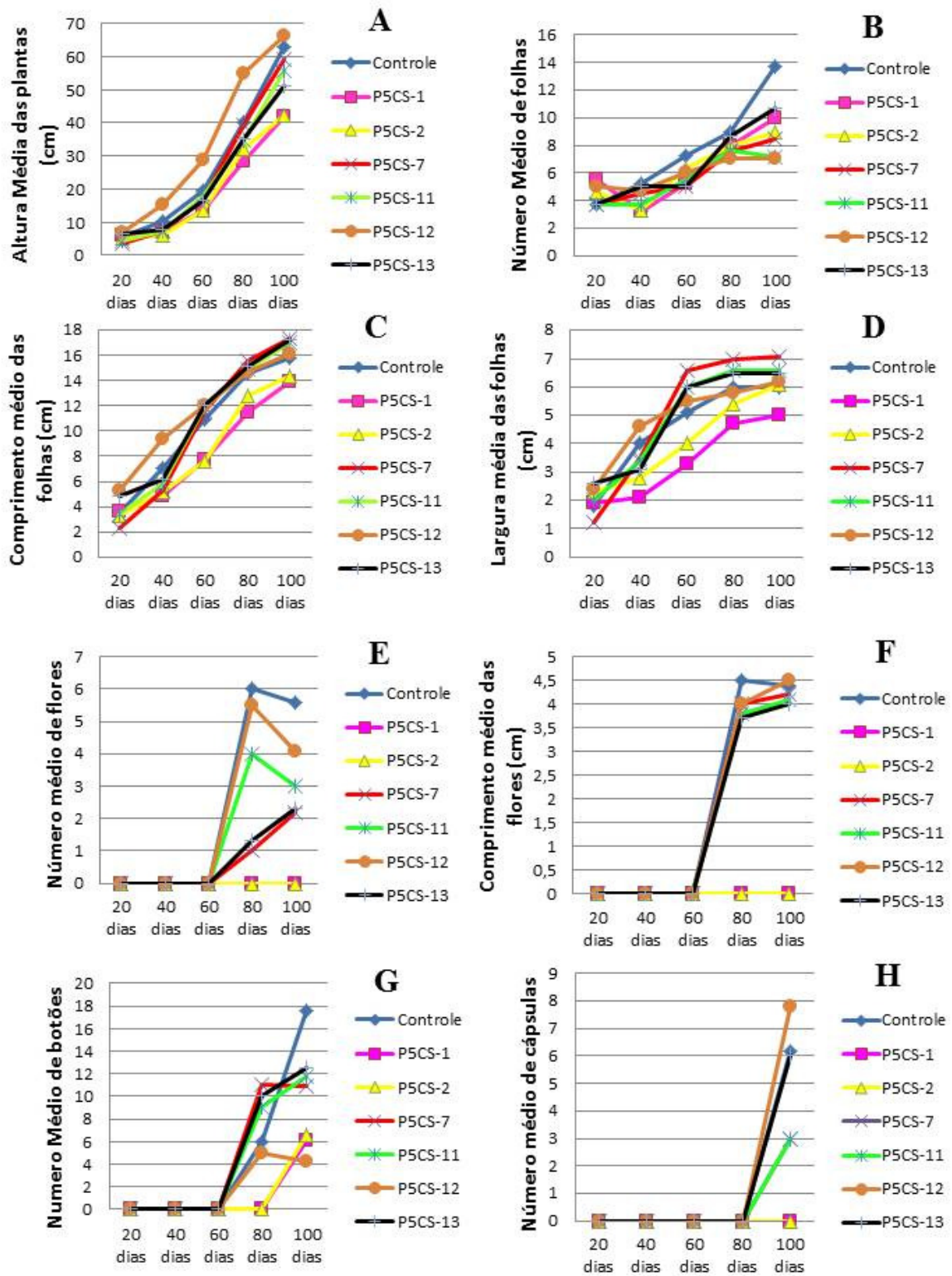


Figura 6- Desempenho de variáveis morfológicas em plantas de *Nicotiana tabacum* transformadas com o gene *p5csf129a*, aos 20, 40, 60, 80 e 100 dias após a aclimatização em casa de vegetação.



Figura 7 – Aspecto das plantas de *Nicotiana tabacum* em casa de vegetação, aos 80 dias da aclimatização. Da esquerda para a direita: controle, eventos 1, 2, 7, 11, 12 e 13.

Quanto à variável número médio de folhas por planta, não houve diferenças estatísticas entre os eventos nas quatro primeiras avaliações (Anexos 52, 57, 62 e 67). Já aos 100 dias, o controle teve média superior dentre os demais (13,7), seguido dos eventos 1 e 13, que não mostraram diferenças estatísticas significativas (10,0 e 10,7, respectivamente) entre si (Figura 6B).

Para o comprimento médio das folhas, aos 20 dias, a análise estatística revelou valores maiores nos eventos 12 e 13, que apresentaram médias de 5,3 e 4,8 cm, respectivamente (Figura 6C e Anexo 53). Contudo, aos 40 dias não foi percebida diferença estatística entre os materiais. Já com 80 e 100 dias os eventos 7, 11, 12, 13 e o controle não diferiram entre si e obtiveram as maiores médias enquanto os eventos 1 e 2 exibiram os menores valores (Figura 6C).

Para a variável largura média das folhas, não houve diferenças nas duas primeiras avaliações (Figura 6D e Anexos 54 e 59). A partir dos 60 dias de cultivo em casa de vegetação, os eventos 1 e 2 apresentaram as menores médias, seguido do evento 12 (Figuras 6D e Anexos 69 e 76). Nas folhas do evento 1 e 2, verificou-se grande diferença morfológica em relação às demais quanto ao padrão de nervação, o qual estava irregular, saliente, além da folha possuir bordas irregulares, coloração verde escura e consistência coriácea. Esses eventos apresentaram maiores acúmulos de prolina no tecido foliar.

A floração ocorreu aproximadamente aos 70 dias da aclimatização, sendo as flores observadas nas duas últimas avaliações, aos 80 e 100 dias (Figura 6E). O número de flores dos eventos 1 e 2 foi insignificante e as flores apresentaram alterações morfológicas determinantes para a polinização (Figura 8). O estilete era mais longo que o estame,

inviabilizando a polinização. A polinização manual foi realizada duas vezes, mas sem sucesso, visto que as flores abortavam após uma semana.



Figura 8 – Flores de *Nicotiana tabacum* após 85 dias da aclimatização. A. Controle. B. Planta transformada com o gene *p5csf129a* (Evento 2). Barra: 1 cm. Seta amarela indica a diferença no comprimento do estilete.

Nanjo et al. (1999) observaram alterações na morfologia das flores de *Arabidopsis thaliana* transformadas com o gene antisense *p5cs* (*Atp5cs*), bem como anormalidades em sua morfologia foliar. As plantas transgênicas apresentavam folhas arredondadas, enquanto as do controle, em forma de espátula. Além disso, as plantas transgênicas apresentavam inflorescências curtas e fertilidade extremamente baixa. Os autores relacionam as diferenças morfológicas encontradas nas flores das plantas transgênicas, com um possível papel que a prolina exerce sobre a morfogênese (NANJO et al., 1999), nesse caso, pela supressão da sua produção.

O controle e o evento 12 apresentaram os maiores números médios de flores (6,0 e 5,5) com 80 dias e 100 dias. (Figura 6E). O comprimento médio das flores foi semelhante em todos os eventos em ambas as avaliações. Além disso, foram observadas diferenças estatísticas entre os números médios de botões aos 80 dias e o evento 7 apresentou a maior média (11,0). Já com 100 dias, os eventos 7, 11, 13 e o controle não diferiram entre si e obtiveram as maiores médias. Esses resultados evidenciaram que o controle floresceu precocemente em relação aos demais eventos, resultando num maior número de flores e botões. Em contrapartida, os eventos 1 e 2, que acumularam maior conteúdo de prolina, foram os mais tardios em produzir botões, além das flores desenvolvidas serem abortadas. Os eventos 7, 11 e 13, por sua vez, apresentaram comportamentos intermediários em relação à formação de flores. Houve considerável produção de botões nesses eventos, mas nem todos os

botões formaram flores, como observado no controle. Por outro lado, o evento 12 seguiu a tendência do controle em relação à rápida formação de flores, contudo, não exibiu o mesmo vigor quanto à produção média de botões na última avaliação.

O presente estudo sugere que a prolina possui influência no controle do florescimento em plantas que a acumulam em grandes quantidades, assim como encontrado por outros autores. Mattioli et al. (2009) compararam em *Arabidopsis thaliana* mutantes *p5cs-1* e *p5cs-2*, isoformas do gene *p5cs*, quanto ao desenvolvimento do embrião e florescimento. Os autores constataram que os embriões das plantas mutantes *p5cs-1* apresentavam-se normais enquanto os mutantes *p5cs-2* homocigotos revelaram má formação e aborto das sementes, devido à ocorrência de alterações na divisão celular, sendo esta interrompida em diferentes estágios. Em relação ao florescimento, plantas *p5cs-2* heterocigotas mostram um atraso significativo em relação aos mutantes *p5cs-1* e controle.

A letalidade dos embriões em plantas *Atp5cs2* heterocigóticas, segundo Lehmann et al. (2010), pode ser causada pela dessecação prematura dos embriões homocigóticos que se desenvolvem mais lentamente que os da planta controle ou que os embriões heterocigóticos. Esses estudos revelam a relação existente, embora ainda não completamente elucidada, entre genes responsáveis pela biossíntese da prolina e alterações observadas durante a formação dos embriões e sementes, além do tempo de florescimento, assim como encontrado no presente trabalho.

Em contrapartida, um efeito estimulante sobre a transição floral foi observado em plantas de tabaco, onde a expressão do gene *RolD* de *Agrobacterium rhizogenes*, que catalisa a conversão direta da ornitina a prolina, resultou em florescimento precoce, floração precoce e incremento da formação de botões florais axilares (TROVATO et al., 2001). De acordo com os autores, esses efeitos poderiam ser causados tanto pelo acúmulo da prolina (produto), quanto pelo esgotamento da ornitina (substrato). Sendo assim, as características observadas tanto podem ser devidas há um possível efeito da prolina no estímulo da biossíntese de glicoproteínas ricas em hidroxiprolina, como as extensinas, que são correlacionadas com mudanças na morfologia e padrões anatômicos nas células, como também pelo esgotamento da ornitina, que é um precursor de poliaminas, envolvidas na floração. Saxena et al. (2008) também encontraram resultados positivos em relação ao florescimento, por meio da aplicação exógena de prolina, em culturas axênicas de feijão. A prolina ocasionou precocidade na floração, aumentou de sua duração e do número de flores.

Contando o número de cápsulas (frutos) aos 100 dias, observou-se que o controle e os eventos 12 e 13 apresentaram as maiores médias, seguidos dos eventos 7 e 11, que não

diferiram entre si (Figura 6H). Os eventos 1 e 2 não chegaram a formar cápsulas com sementes, pelo fato de abortarem as poucas flores que formaram.

Em relação à massa seca das plantas ao final do experimento, ou seja, após 140 dias de cultivo em casa de vegetação, a análise estatística revelou diferenças significativas em todas as variáveis analisadas (Tabela 1). O controle e o evento 2 apresentaram os maiores valores de massa seca da parte aérea (5,43 e 5,65g) seguidos dos eventos 1 e 13 (4,59 e 4,44g).

Tabela 1 – Massa seca de plantas de *Nicotiana tabacum* controle e transformadas com o gene *p5csf129a* após 140 dias em casa de vegetação.

	M.S. Parte Aérea (g)	M.S. Sistema Radicial (g)	M. S. Total (g)
Controle	5,43 a	1,78 a	7,22 a
P5CS-1	4,59 b	1,13 b	5,73 b
P5CS-2	5,65 a	1,45 a	7,11 a
P5CS-7	3,96 c	1,21 b	5,18 c
P5CS-11	3,13 c	0,91 b	4,04 c
P5CS-12	3,81 c	0,87 b	4,68 c
P5CS-13	4,44 b	0,56 b	5,01 c
CV (%)	12,03	27,47	13,73

Valores seguidos de letras minúsculas idênticas nas colunas não diferem entre si pelo teste Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro. Análise de variância (Anexos 83 a 85).

O controle e o evento 2 também apresentaram maiores médias de massa seca do sistema radicial (1,78 e 1,45 g, respectivamente) e de massa seca total (7,22 e 7,11 g). Diferentemente, em plantas de *E. saligna* de 120 dias transformadas com o mesmo gene, os valores de massa fresca foram inferiores aos do controle, tanto na parte aérea como nas raízes (Dibax et al., 2010). Os autores relacionaram este resultado com a redução do crescimento resultante da expressão do gene *p5csf129a*. Essa redução pode estar relacionada com a concentração de prolina, visto que as plantas controle de *E. saligna* possuíam maior concentração de prolina (3,42 $\mu\text{mol/g}$ de massa fresca) que as plantas controle do presente experimento (1,18 $\mu\text{mol/g}$ de massa fresca).

Kumar et al. (2010) observaram maiores valores de peso fresco em plantas de arroz transformadas com o gene *p5csf129a* em relação ao controle não transformado durante estresse salino e atribuíram esse resultado a expressão do gene, que permitiu um maior acúmulo de prolina e, conseqüentemente, maior produção de biomassa sob condições de estresse. Diferentemente do encontrado no presente estudo, os autores também observaram maior crescimento em altura nas plantas transformadas, com exceção de um evento.

No presente estudo, dentre os eventos transformados, as plantas que acumularam maior conteúdo de prolina na parte aérea (eventos 1 e 2) obtiveram maiores valores de massa seca total. Contudo, esses eventos apresentaram altura reduzida (Figura 6A), além das folhas exibirem menor comprimento e largura em relação ao controle. Essa redução em altura pode estar relacionada à utilização de um promotor constitutivo, visto que nesse caso, o gene é expresso todo tempo em toda a planta, ocasionando um gasto de energia superior em detrimento do crescimento.

KASUGA et al. (1999) observaram que plantas de *A. thaliana* transformadas com o fator de transcrição *dreb1a*, envolvido com a expressão de genes que conferem tolerância a estresses salino, hídrico e térmico, tiveram seu crescimento em altura reduzido em relação ao controle não transformado. Os autores atribuíram o fenótipo encontrado com o efeito da utilização do promotor constitutivo 35S do vírus do mosaico da couve flor (CaMV), pois quando utilizado um promotor estresse-induzido, essa diferença não foi evidente. Diante disso, o fato das plantas transgênicas que mais expressaram o gene *p5csf129a* do presente estudo possuírem menor altura (evento 1 e 2), pode ser uma evidência deste mesmo efeito negativo que a utilização de um promotor constitutivo pode ocasionar.

5.3.4 Análises anatômicas das folhas

As folhas dos eventos transformados e controle não apresentaram diferenças significativas quanto aos aspectos qualitativos. De forma geral, as folhas são anfiestomáticas, com estômatos mais frequentes na face abaxial. A lâmina foliar possui epiderme unisseriada na face abaxial e adaxial (Figura 9).

O mesofilo é classificado como dorsiventral com parênquima paliçádico com uma camada. No controle e nos eventos 7, 12 e 13, o parênquima paliçádico mostra-se menos compacto com células de tamanho irregular. Já nos eventos 1, 2 e 11, as células apresentam-se mais alongadas e mais compactas (Figura 9). O parênquima lacunoso possui de 5 a 6 camadas de células, com espaços intercelulares com tamanhos variados nos eventos transformados e, nas plantas controle, de forma geral, com menores espaços intercelulares (Figura 9).

Por outro lado, em relação às estruturas anatômicas mensuradas, a análise estatística mostrou diferenças significativas entre o controle e os eventos transformados para as variáveis

espessura total, espessura do parênquima paliçádico, lacunoso e espessura da epiderme na face inferior (Tabela 2 e Anexos 86 a 90), não sendo observadas diferenças entre os materiais quanto a espessura da epiderme na face superior.

Tabela 2 – Características anatômicas da lâmina foliar de *Nicotiana tabacum* transformada com o gene *p5csf129a* e do controle.

	Espessura total (µm)	Epiderme da face adaxial (µm)	Parênquima paliçádico (µm)	Parênquima lacunoso (µm)	Epiderme da face abaxial (µm)
Controle	230,2 b	27,5 a	71,1 b	114,0 b	17,5 b
P5CS-1	287,5 a	29,7 a	85,8 a	147,7 a	24,1 a
P5CS-2	308,3 a	30,5 a	90,5 a	165,3 a	21,9 a
P5CS-7	250,0 b	27,9 a	68,0 b	134,0 b	20,0 b
P5CS-11	288,6 a	27,5 a	88,8 a	149,8 a	22,4 a
P5CS-12	247,5 b	25,7 a	77,9 b	124,4 b	19,5 b
P5CS-13	233,9 b	21,1 a	69,8 b	118,2 b	18,6 b
CV (%)	10,23	8,32	10,82	13,56	11,15

Valores seguidos de letras minúsculas idênticas nas colunas não diferem entre si pelo teste Scott-Knott ao nível 5% de probabilidade de erro. Análise de variância (Anexos 86 a 90).

Os eventos 1, 2 e 11 apresentaram os maiores valores de espessura total da lâmina foliar (287,5; 308,3 e 288,6 µm), assim como do parênquima paliçádico (85,8; 90,5 e 88,8 µm), do parênquima lacunoso (147,7; 165,3 e 149,8 µm) e da epiderme abaxial (24,1; 21,9 e 22,4 µm) (Tabela 5). Essas alterações anatômicas podem estar relacionadas com o maior acúmulo de prolina, visto que esses eventos apresentaram acúmulo considerável de prolina em relação ao controle. Além disso, na literatura há relato que relaciona a espessura da lâmina foliar como sendo inversamente proporcional ao tamanho da folha (MEDRI e LLERAS, 1979). Esse fato foi observado em relação aos eventos 1 e 2, que possuíram menor largura e comprimento das folhas.

Possivelmente, as alterações morfológicas encontradas no presente estudo estejam relacionadas com um possível efeito negativo da superprodução de prolina na biossíntese de proteínas nas células das plantas transgênicas, visto que, de acordo com Nanjo et al. (1999), a prolina, além de atuar como um osmoprotetor, é um constituinte de proteínas estruturais como as extensinas, que desempenham um papel importante na morfogênese das folhas, devido a sua participação na estrutura da parede celular. Esses autores encontraram diferenças anatômicas entre plantas de *Arabidopsis thaliana* controle e transformadas com o gene antisense *Atp5cs*. Nas plantas transgênicas, as células epidérmicas e do parênquima paliçádico eram significativamente aumentadas em tamanho e observou-se que o aumento anormal das células do parênquima lacunoso causou maior espaçamento intercelular, assim como observado no presente trabalho (Figura 9). Os autores ainda relataram que as plantas

transgênicas apresentaram redução significativa de proteínas ricas em prolina (PRPs) e glicoproteínas ricas em hidroxiprolina (HRGPs) e conseqüentemente, da biossíntese de proteínas estruturais da parede celular. No presente estudo foi verificada diferença no aspecto da parede celular dos eventos 1 e 2, cujas bordas não eram retas como as do controle e dos demais eventos (Figura 10). Essa observação pode estar relacionada com a produção de proteínas estruturais da parede celular, visto que nesses eventos houve maior acúmulo de prolina.

As folhas das plantas controle e transformadas são simples, alternas e sésseis. Em todas as amostras, o limbo foliar apresentou formato elíptico, simétrico, com margens irregulares. O formato da base é do tipo decorrente enquanto o formato do ápice é acuminado.

A nervação é do tipo broquidódroma com espaçamento irregular entre as nervuras secundárias em todas as amostras analisadas. Contudo, para o controle e os eventos 7, 11 e 13 o ângulo formado pela nervação secundária em relação à primária é crescente no sentido da base. De maneira contrária, os eventos 1, 2 e 12 apresentaram ângulo decrescente no sentido da base, também semelhantes entre si e diferentes em relação ao controle. Tais eventos obtiveram também maior acúmulo de prolina. O ângulo de inserção formado nos eventos 1 e 2 variou, em média, de 38 a 46°. Já no controle e demais eventos, este variou de 51 a 54°. O espaçamento da inserção da nervura secundária com a nervura primária apresentou pequena variação entre o controle e as amostras transformadas (1,2 a 1,4 cm).

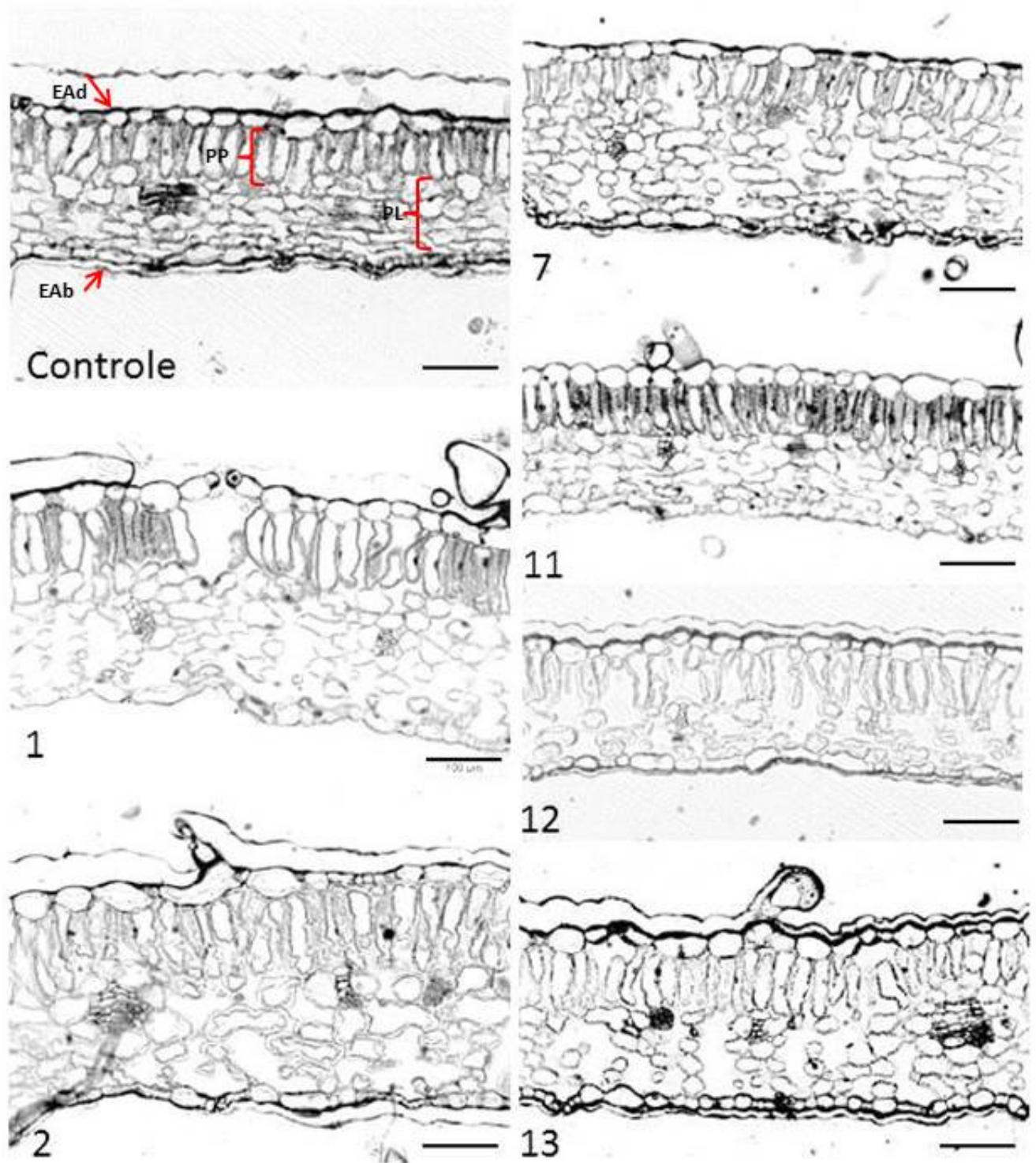


Figura 9 - Secções transversais do mesófilo de eventos transformados de *Nicotiana tabacum* com o gene *p5csf219a* e controle. Controle. 1. *p5cs-1*; 2. *p5cs-2*; 7. *p5cs-7*; 11. *p5cs-11*; 12. *p5cs-12*; 13. *p5cs-13*. Folhas retiradas do 5º nó a partir do ápice de plantas com 6 meses de cultivo em casa de vegetação. Ead: epiderme adaxial. Eab: epiderme abaxial. PP: parênquima paliçádico. PL: parênquima lacunoso. Barra: 100 μ m.

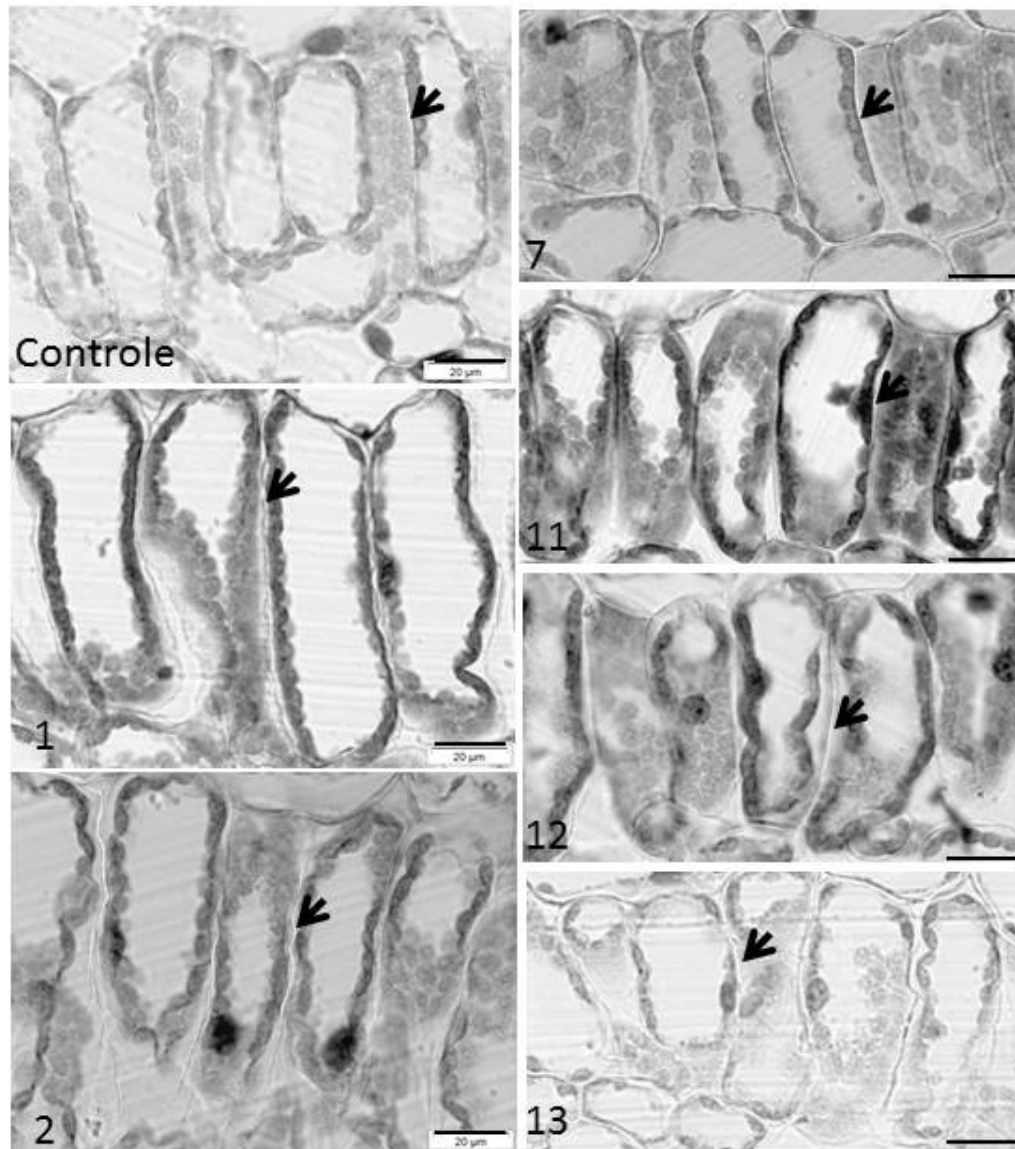


Figura 10 – Secções transversais do mesófilo de *Nicotiana tabacum*. C: Controle. 1. *p5cs-1*; 2. *p5cs-2*; 7. *p5cs-7*; 11. *p5cs-11*; 12. *p5cs-12*; 13. *p5cs-13*. Seta preta: indica parede celular. Barra: 20 μm .

As diferenças anatômicas percebidas nesse estudo podem estar relacionadas tanto ao maior acúmulo de prolina observado nas plantas transgênicas, quanto à interferência do transgene na expressão de outros genes envolvidos com a morfogênese. O RNA das plantas do presente experimento foi extraído para futuras investigações a respeito da possível interferência do gene *p5csf129a* na expressão de genes envolvidos com a formação das estruturas foliares e florescimento. Alguns genes, que regulam o padrão de formação das folhas e nervuras, já foram estudados e podem auxiliar no entendimento das alterações

observadas. Nesse sentido, estudos recentes foram publicados sobre os genes *ATHB8* (DONNER et al., 2009; DONNER et al., 2010) e *FORKED 1* (HOU et al., 2010) em *Arabidopsis thaliana*, e o gene *STENOFOLIA 1* (TADEGE et al., 2011) em *Medicago truncatula* e *Nicotiana sylvestris*, dentre outros. Além desses, genes responsáveis pelo florescimento, como por exemplo, o *FLOWERING LOCUS T (FT)* de *Arabidopsis thaliana* (CORBESIER et al., 2007; TAMAKI et al., 2007), podem ser estudados.

5.3.5 Análise da segregação e efeito do frio na germinação de sementes em T1

O teste do qui-quadrado revelou que a hipótese é verdadeira nos eventos transformados, ou seja, a segregação seguiu o padrão mendeliano, com proporção 3:1 (Tabela 3). Os valores de qui-quadrado encontrados (0,60; 0,74; 1,06 e 1,67) são menores que os tabelados e, portanto, não são significativos. Já no controle a hipótese foi rejeitada, como esperado, por se tratarem de sementes não transformadas, que não apresentam resistência à canamicina.

Tabela 3 - Valores do teste Qui-Quadrado para a hipótese de segregação das amostras das sementes T1 do controle e dos eventos de *Nicotiana tabacum* transformados com o gene *p5csf129a*.

Tratamentos	Teste de Qui-quadrado (χ^2)
Controle	60,00 **
P5CS-7	0,60 ^{n.s.}
P5CS-11	0,74 ^{n.s.}
P5CS-12	1,07 ^{n.s.}
P5CS-13	1,67 ^{n.s.}

** Significativo a 1% n.s. Não Significativo

Os dados referentes ao teor de água das sementes foram semelhantes para os eventos estudados, apresentando uma variação de 6,0 a 7,6% (Tabela 4). A uniformidade entre os materiais para essa variável é fundamental para a padronização das avaliações e obtenção de resultados consistentes (MARCOS FILHO, 2005).

Quanto ao efeito do frio na germinação, a análise estatística revelou interação significativa entre os fatores estudados (Anexo 81). Nas temperaturas de referência (20-30 °C), o controle apresentou 61% de germinação, não diferindo estatisticamente do evento 12 (R1) (63%) (Tabela 4). Houve destaque nos eventos 11 (R1 e R2), 12 (R2) e 13 (R1), que

apresentaram porcentagem de germinação de 93 a 97% (Tabela 4). Esses valores indicam que as sementes do controle e da repetição 1 do evento 12 possuíam qualidade fisiológica inferior às demais.

Quando a temperatura foi diminuída em 5 °C (tratamento 15-25 °C), as taxas de germinação dos eventos e do controle não diferiram das taxas obtidas na temperatura de referência exceto 7R1 (Tabela 3). Novamente, os eventos que apresentaram maior taxa de germinação foram 11 (R1 e R2), 12 (R2) e 13 (R1 e R2). Contudo, foi observado um decréscimo significativo na velocidade de germinação em todos os eventos (Tabela 5) e, nesse tratamento, o aparecimento das plântulas iniciou-se após 10 dias da instalação do teste.

Analisando o desempenho do controle nos tratamentos com temperatura constante (30, 25, 20 e 15 °C), notou-se que apresentou taxa de germinação estatisticamente superior às obtidas em temperaturas alternadas (77, 76 e 76%, respectivamente), exceto aos 15 °C, onde a taxa de germinação das sementes controle foi estatisticamente inferior (51%) às das demais temperaturas. Na temperatura de 15°C, os eventos 7 (R1), 12 (R1 e R2) e 13 (R1 e R2) também apresentaram redução da taxa de germinação (Tabela 4); além disso, nessa temperatura o índice de velocidade de germinação foi o mais baixo, variando de 0,21 a 3,5 (Tabela 5), sendo que a formação de plântulas teve início somente após 13 dias de incubação

O único evento que não sofreu alterações quanto à germinação em todas as temperaturas testadas, se destacando entre os demais, foi o evento 11 (R1 e R2), cujas taxas de germinação variaram de 87 a 100%. As sementes da repetição 12 R2 também mostraram bom desempenho, embora aos 15 °C tenham sofrido significativa redução na germinação (68%). Já as sementes de 12 R1, embora tenham apresentado médias de germinação menores que R2 e terem a germinação reduzida drasticamente (8%) aos 15 °C, possuíam alta capacidade de recuperação, atingindo 88% de germinação após tratamento com frio e transferência para as condições ótimas de temperatura (20-30 °C), sendo este o maior valor de germinação deste material em todas as temperaturas testadas.

A manutenção das sementes em baixa temperatura (6,7°C) durante 5 dias não provocou redução da taxa de germinação em relação às taxas obtidas nas temperaturas de referência, pelo contrário, elevou essa taxa em todos os materiais, exceto nos eventos 11, 12R2 e 13R1. Comparando a taxa de germinação entre todos os materiais nesse tratamento, o controle foi o que apresentou menor taxa de germinação (73%), diferindo estatisticamente em relação a todos os eventos transformados.

No controle, o comportamento da taxa de germinação no tratamento com frio (73%) foi semelhante ao observado nas temperaturas constantes de 20, 25 e 30°C (76, 76 e 77%,

respectivamente). Esse fato pode ser explicado devido a aclimação ao frio. Muitas plantas podem aumentar a tolerância ao estresse por frio após a exposição a baixas temperaturas, sem congelamento. Este processo adaptativo, conhecido como aclimação ao frio, induz inúmeras alterações fisiológicas que envolvem expressões gênicas na planta (GUY, 1990; THOMASHOW, 1999). Seki et al. (2002) identificaram 53 genes induzíveis por frio a partir de 7000 cDNAs de *Arabidopsis thaliana* pela técnica de “microarray”, sendo provável que estes genes estejam relacionados com a aclimação e tolerância ao frio.

A capacidade dos eventos transformados superarem o estresse causado pela baixa temperatura e ainda alcançarem taxas de germinação satisfatórias, superiores às do controle não transformado, possivelmente está relacionado, além da aclimação natural ao frio, com o maior acúmulo de prolina nas sementes dos eventos transformados. Este osmoprotetor possivelmente contribuiu para a proteção das membranas celulares, que são as estruturas mais suscetíveis ao estresse por frio. De acordo com Taiz e Zeiger (2004), a nível molecular, os principais danos causados às plantas pelo resfriamento são: alteração das propriedades das membranas celulares; inibição da fotossíntese, redução das taxas de translocação de carboidratos e respiratórias, inibição da síntese proteica e aumento da degradação das proteínas existentes. Além de seu papel no ajuste osmótico, a prolina contribui para a estabilização de estruturas sub-celulares (por exemplo, membranas e proteínas), eliminação de radicais livres e tampão sob condições de estresse (ASHRAF e FOOLAD, 2007). 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).

As sementes transgênicas possivelmente possuíram maior tolerância ao estresse causado pelo frio e melhor germinação por apresentarem menor dessecação que as sementes controle, já que a prolina auxilia as células no controle do ajustamento osmótico e, conseqüentemente, no controle da perda de água, sendo requerida em concentrações ideais durante a fase da germinação. Em sementes de *Arabidopsis thaliana*, houve redução significativa da germinação quando estas foram submetidas à aplicação exógena de prolina (HARE et al., 2003). Os autores relacionaram esse efeito com a inibição da síntese de prolina pelo mecanismo de feedback. Esse fato evidencia a relação existente entre a síntese da prolina e a promoção da germinação (HARE et al., 2003).

Quanto ao IVG, observa-se que os maiores valores foram alcançados nas temperaturas constantes de 30 °C onde variaram entre os eventos de 8,0 a 11,6 (Tabela 5). Contudo, em

comparação com 25 °C, o índice não apresentou diferença estatística nos eventos 7(R2), 12 (R2) e 13 (R1 e R2) e, nesta temperatura de 25 °C, variou entre os eventos de 6,2 a 10,7.

Aos 15°C, o IVG não variou entre controle e eventos, exceto em relação ao evento 12 R1, que apresentou IVG estatisticamente inferior (Tabela 5). Esse mesmo evento apresentou menor taxa de germinação, assim como o controle (Tabela 3). No tratamento com frio, diferentemente da taxa de germinação (Tabela 4) o controle e os eventos não diferiram em relação ao IVG (Tabela 5), ou seja, tanto as sementes controle como as transformadas tiveram a mesma velocidade de germinação sob as diferentes condições de temperatura impostas.

Tabela 4 – Taxa de germinação de sementes T1 de *Nicotiana tabacum* transformado com o gene *p5csf129a*, em diferentes temperaturas após 27 meses da transformação.

GERMINAÇÃO (%)									
TEMPERATURAS	EVENTOS								
	CONTROLE	7R1	7R2	11R1	11R2	12R1	12R2	13R1	13R2
20-30°C	61 bC	68 cB	75 bB	95 aA	97 aA	63 bC	93 aA	95 aA	87 bA
15-25°C	56 bC	77 bB	79 bB	91 aA	95 aA	60 bC	90 aA	88 aA	89 bA
30°C	77 aC	83 bB	80 bB	100 aA	95 aA	69 bC	84 aB	77 bC	92 aA
25°C	76 aC	82 bB	87 aB	99 aA	87 aB	61 bD	91 aA	94 aA	96 aA
20°C	76 aB	70 cC	75 bB	96 aA	94 aA	63 bC	94 aA	96 aA	88 bA
15°C	51 bD	65 cC	85 aB	99 aA	90 aB	8 cE	68 bC	82 bB	83 bB
6,7C°/20-30°C	73 aB	96 aA	85 aA	98 aA	97 aA	88 aA	93 aA	91 aA	95 aA
CV(%)	8,01								
Teor de água (%)	6,4	7,3	6,7	6,0	6,4	6,8	7,6	6,3	6,0

Valores seguidos de letras minúsculas idênticas nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem entre si pelo teste Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro. Análise de variância (Anexo 81).

Tabela 5 - Índice de Velocidade de Germinação (IVG) de sementes T1 de *Nicotiana tabacum* transformado com o gene *p5csf129a*, após 27 meses da transformação, em diferentes temperaturas.

IVG									
TEMPERATURAS	EVENTOS								
	CONTROLE	7R1	7R2	11R1	11R2	12R1	12R2	13R1	13R2
20-30°C	4,2 cB	4,7 dB	4,9 bB	6,0 cA	6,8 cA	4,5 cB	6,5 bA	6,7 bA	5,0 bB
15-25°C	2,9 dB	4,1 dA	4,1 bA	4,8 dA	5,2 cA	3,1 cB	4,6 cA	4,8 cA	4,7 bA
30°C	8,8 aB	10,6 aA	8,0 aB	11,3 aA	11,6 aA	8,9 aB	10,0 aA	9,6 aB	11,2 aA
25°C	7,2 bC	8,7 bB	8,0 aC	9,8 bA	9,4 bB	6,2 bD	9,0 aB	10,7 aA	10,6 aA
20°C	4,5 cB	4,1 dB	4,6 bB	6,0 cA	5,8 cA	3,8 cB	5,7 bA	6,0 bA	5,5 bA
15°C	1,6 dA	2,0 eA	2,6 cA	3,5 dA	3,0 dA	0,21 dB	2,32 dA	2,9 dA	2,6 cA
6,7°C/20-30°C	4,4 cA	6,0 cA	5,3 bA	6,0 cA	6,0 cA	5,3 bA	5,8 bA	5,7 bA	6,0 bA
CV(%)	14,5								

Valores seguidos de letras minúsculas idênticas nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem entre si pelo teste Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro. Análise de variância (Anexo 82).

5.4 CONCLUSÕES

Pode-se concluir, de acordo com os resultados obtidos nas condições experimentais deste trabalho, que as plantas transformadas que acumularam maiores teores de prolina apresentaram diferenças na altura da parte aérea, no comprimento e na largura das folhas, na morfologia floral e tiveram crescimento reduzido, além de alterações na anatomia. As sementes das plantas transformadas demonstraram maior tolerância ao frio durante a germinação que as sementes das plantas controle. Além disso:

- A quantidade de prolina acumulada na parte aérea de plantas transformadas com o gene *p5csf129a* foi 4 a 11 vezes superior a do controle não transformado.
- Foram observadas diferenças morfológicas nos eventos transformados, sendo a produção de sementes inviabilizada nos eventos 1 e 2.
- As folhas não apresentaram diferenças qualitativas em relação às estruturas anatômicas.
- As folhas dos eventos 1, 2 e 12 apresentaram alterações no ângulo de inserção da nervura secundária com a primária, em relação ao controle.
- Após a exposição à baixa T°C, as sementes dos eventos transformados tiveram taxa de germinação superior em relação ao controle.

5.5 REFERÊNCIAS

ARAGÃO F. J. L. Development of transformation methods toward producing transgenic plants with abiotic stress tolerance. **JIRCAS Working Report Genetic Engineering of Crop Plants for Abiotic Stress**, v. 23, p. 35-42, 2002.

ARAGÃO F. J. L.; SANTOS, M. O.; MORAIS, L. S.; ROMANO, E. **Metodologias para Transformação Genética de Plantas-Modelo**. Circular técnica nº 15. Brasília, DF. Dezembro, 2002.

ASHRAF, M.; FOOLAD, M. R. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. **Environmental and Experimental Botany**, v. 59, p. 206–216, 2007.

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.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, DF: MAPA /ACS, 2009. 395p.

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

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.

DIBAX, R.; DESCHAMPS, C.; BESPALHOK FILHO, J. C.; VIEIRA, L. G. E.; MOLINARI, H. B. C.; CAMPOS, M. K. F. DE; QUOIRIN, M. Organogenesis and *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of *Eucalyptus saligna* with *P5CS* gene. **Biologia Plantarum**, v. 54, n. 1, p. 6-12. 2010.

DONNER, T. J.; SHERR, I.; SCARPELLA, E. Regulation of preprocambial cell state acquisition by auxin signaling in *Arabidopsis* leaves. **Development**, v. 136, p. 3235-3246, 2009.

DONNER, T. J.; SHERR, I.; SCARPELLA, E. Auxin signal transduction in *Arabidopsis* vein formation. **Plant Signaling & Behavior**, v. 5, n.1, p. 70-72, 2010.

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.

GUY, C. L. Cold acclimation and freezing stress tolerance: role of protein metabolism. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 41, p. 187–223, 1990.

HANDAYANI, N. S. N.; TANAKA, N.; YOSHIDA, K. Phenotype of Transgenic Tobacco Plants (*Nicotiana tabacum* cv. Petit Havana SR-1) Expressing 1724orf13 Gene of *Agrobacterium rhizogenes* strain MAFF301724. **Indonesian Journal of Biotechnology**, v. 12, n. 2, p. 980-987, 2007.

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.

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.

HOU, H.; ERICKSON, J.; MESERVY, J.; SCHULTZ, E. A. FORKED1 encodes a PH domain protein that is required for PIN1 localization in developing leaf veins. **The Plant Journal**, v. 63, p. 960–973, 2010.

JOHANSEN, D.A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw Hill Book. 523p. 1940.

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.

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 γ -1-pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants. **Plant Physiology**, v. 108, p. 1387–1394, 1995.

KUMAR, V.; SHRIRAM, V.; KAVI KISHOR, P. B.; JAWALI, N.; SHITOLE, M. G. Enhanced proline accumulation and salt stress tolerance of transgenic *indica* rice by over-expressing *P5CSF129A* gene. **Plant Biotechnology Reports**, v. 4, p. 37–48, 2010.

LEAF ARCHITECTURE WORKING GROUP. **Manual of leaf architecture: morphological description and categorization of dicotyledonous and net-veined monocotyledonous Angiosperms**. Washington: Smithsonian Institution, 1999.

LEHMANN, S.; FUNCK, D.; SZABADOS, L.; RENTSCH, D. Proline metabolism and transport in plant development. **Amino Acids**, v. 39, p. 949–962, 2010.

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.

MAGUIRE, J.D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, v.2, n.1, p.176-177, 1962.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: FEALQ, 1, ed. 2005. 495p.

MATTIOLI, R.; FALASCA, G.; SABATINI, S.; ALTAMURA, M. M.; COSTANTINO, P.; TROVATO, M. The proline biosynthetic genes *P5CS1* and *P5CS2* play overlapping roles in *Arabidopsis* flower transition but not in embryo development. **Physiologia Plantarum**, v. 137, p. 72–85. 2009.

MEDRI, M.E.; LLERAS, E. Ecofisiologia de plantas da amazônia. Anatomia foliar e ecofisiologia de *Bertholletia excelsa* Humb. & Bonpl. (Castanha-do-Pará) - Lecythidaceae. **Acta Amazônica**, Manaus, v.9, n.1, p.15-23, 1979.

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

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.

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

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

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.

O'BRIEN, T.P., N. FEDER & M.E. MCCULLY. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protoplasma**, v. 59, p. 368-373, 1965.

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.

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.

SAXENA, S.N.; KAUSHIK, N.; SHARMA, R. Effect of abscisic acid and proline on *in vitro* flowering in *Vigna aconitifolia*. **Biologia Plantarum**, v. 52, n. 1, p. 181-183, 2008.

SEKI, M.; NARUSAKA, M.; ISHIDA, J.; NANJO, T.; FUJITA, M.; OONO, Y.; KAMIYA, A.; NAKAJIMA, M.; ENJU, A.; SAKURAI, T.; SATOU, M.; AKIYAMA, K.; TAJI, T.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; CARNINCI, P.; KAWAI, J.; HAYASHIZAKI, Y.; SHINOZAKI, K. Monitoring the expression profiles of 7000 *Arabidopsis* genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. **Plant Journal**, v. 31, p.279–292, 2002.

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

STRITTMATTER, C.G.D. Nueva técnica de diafanización. **Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica**, v. 15, p. 126-129, 1973.

TADEGE, M.; LIN, H.; BEDAIR, M.; BERBEL, A.; WEN, J.; ROJAS, C. M.; NIU, L.; TANG, Y.; SUMNER, L.; RATET, P.; MCHALE, N. A.; MADUEÑO, F.; MYSOREA, K. S.

STENOFOLIA Regulates Blade Outgrowth and Leaf Vascular Patterning in *Medicago truncatula* and *Nicotiana sylvestris*. **The Plant Cell**, v. 23, p.2125–2142, 2011.

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

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

TIMASHEFF, S. N. Protein-solvent preferential interactions, protein hydration, and the modulation of biochemical reactions by solvent components. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 15, p. 9721-9726, 2002.

TROVATO, M.; MARAS, B.; LINHARES, F.; COSTANTINO, P. The plant oncogene *rolD* encodes a functional ornithine cyclodeaminase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 23, p. 13449–13453, 2001.

ZHANG, C. S.; LU, Q.; VERMA, D. P. S. Removal of feedback inhibition of Δ^1 -Pyrroline-5-carboxylate synthetase, a bifunctional enzyme catalyzing the first two steps of proline biosynthesis in plants. **The Journal of Biological Chemistry**, v 270, n. 35, p 20491-20496, 1995.

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.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Pela primeira vez, foram obtidos resultados quanto à organogênese do híbrido *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii*. Embora a regeneração tenha ocorrido em taxas baixas, os resultados encontrados são importantes para a definição de novos estudos relacionados com a regeneração dos explantes foliares. Testes envolvendo outras combinações e concentrações de reguladores vegetais, utilização de tratamento pulso com BAP, além da adição do carvão ativado e de outros antioxidantes no meio de cultura, poderão ser realizados. É recomendada também a utilização de outros clones visando à comparação da resposta morfogênica.

Quanto aos resultados dos experimentos de transformação genética de *Eucalyptus saligna* via *Agrobacterium tumefaciens*, é notória a necessidade de melhoria na eficiência do protocolo a partir de explantes cotiledonares. Contudo, o antibiótico bactericida mostrou ter importante efeito na organogênese dos explantes transformados, podendo esse efeito ser mais explorado em experimentos futuros, assim como a utilização da acetosiringona, a partir de testes envolvendo outras concentrações.

Em relação ao estudo realizado com plantas transgênicas de *Nicotiana tabacum*, foi evidenciado que altas quantidades de prolina na parte aérea da planta transformada com gene *p5csf129a* estão relacionadas com a tolerância ao frio das sementes, com alterações na morfologia foliar e floral, na anatomia foliar e com modificações do crescimento. Sugere-se a continuidade dos estudos moleculares por meio da realização de Southern Blot, visando à determinação do número de cópias do gene *p5csf129a* inseridas nas plantas transformadas, além de estudos da expressão diferencial do gene. Também se recomenda a utilização de promotores estresse induzido visando determinar de forma conclusiva o efeito do gene *p5csf129a* controlado por esse tipo de promotor sobre as características das plantas transformadas.

ANEXOS

CAPÍTULO 1

ANEXO 1- COMPOSIÇÃO IÔNICA DOS MEIOS DE CULTURA MS, MS N/2, JADS e WPM.

Íons	MS	MS N/2	JADS	WPM
<i>Macroelementos (mM)</i>				
NO ₃ ⁻	39,40	19,70	22,00	9,70
H ₂ PO ₄ ⁻	1,25	1,25	3,00	1,25
SO ₄ ²⁻	1,80	1,80	3,38	7,44
K ⁺	20,10	15,07	11,00	12,61
Ca ²⁺	3,00	3,00	5,00	3,00
Mg ²⁺	1,50	1,50	3,00	1,50
NH ₄ ⁺	20,61	10,30	4,00	5,00
Total N	60,01	30,00	26,00	14,70
NH ₄ ⁺ / NO ₃ ⁻	0,52	0,52	0,18	0,51
<i>Micronutrientes (µM)</i>				
B ⁺	100	100	50,3	100
Na ⁺	0,20	0,20	0,40	0,20
Cl ⁻	6.000	6.000	1,0	1.310
Co ²⁺	0,11	0,11	1,0	-
Cu ²⁺	0,10	0,10	5,00	0,10
Fe ²⁺	100	100	200	100
I ⁻	5,00	5,00	0	-
Mn ²⁺	132	132	75,6	132
Mo ²⁻	1,03	1,03	0,62	1,03
Zn ²⁺	30	30	14,9	30
<i>Compostos orgânicos (mg L⁻¹)</i>				
Tiamina.HCl	0,1	0,1	5,0	1,0
Piridoxina.HCl	0,5	0,5	0,5	0,5
Ácido nicotínico	0,5	0,5	0,5	0,5
Glicina	2,0	2,0	0	2,0
Mio-inositol	100	100	100	100
Arginina	-	-	7,0	-
Glutamina	-	-	145,0	-
Cisteína	-	-	2,5	-
Pantotenato de cálcio	-	-	2,4	-
Sacarose	30000	30000	30000	30000

ANEXO 2 - RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL PORCENTAGEM DE EXPLANTES INTUMECIDOS NA 1ª AVALIAÇÃO DO EXPERIMENTO EFEITO DO BAP E ANA:

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Tratamentos	4	23333.33333	5833.33333	65.7895 **
Resíduo	25	2216.66667	88.66667	
Total	29	25550.00000		

Média: 65

CV (%): 14,49

ANEXO 3 - RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL PORCENTAGEM DE EXPLANTES OXIDADOS NA 1ª AVALIAÇÃO DO EXPERIMENTO EFEITO DO BAP E ANA:

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Tratamentos	4	23333.33333	5833.33333	65.7895 **
Resíduo	25	2216.66667	88.66667	
Total	29	25550.00000		

Média: 35
CV (%): 26,09

ANEXO 4 - RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL PORCENTAGEM DE CALOGÊNESE NA 2ª AVALIAÇÃO DO EXPERIMENTO EFEITO DO BAP E ANA:

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Tratamentos	4	18620.00000	4655.00000	129.3056 **
Resíduo	25	900.00000	36.00000	
Total	29	19520.00000		

Média: 46
CV (%): 13,04

ANEXO 5 - RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL PORCENTAGEM DE EXPLANTES OXIDADOS DO EXPERIMENTO EFEITO DO TDZ E ANA E ANTIOXIDANTE:

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
A	1	6.66667	6.66667	0.4348 ns
B	4	68056.66667	17014.16667	1109.6196 **
A*B	4	43.33333	10.83333	0.7065 ns
Resíduo	50	766.66667	15.33333	
Total	59	68873.33333		

Média: 17.66667
CV (%): 22.16

ANEXO 6 - RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL PORCENTAGEM DE EXPLANTES FORMANDO CALOS, DO EXPERIMENTO EFEITO DO TDZ E ANA E ANTIOXIDANTE:

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
A	1	540.00000	540.00000	27.0000 **
B	4	78466.66667	19616.66667	980.8333 **
A*B	4	826.66667	206.66667	10.3333 **
Resíduo	50	1000.00000	20.00000	
Total	59	80833.33333		

Média: 71,66
CV (%): 6,24

ANEXO 7 - RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL PORCENTAGEM DE EXPLANTES COM ANTOCIANINA, DO EXPERIMENTO EFEITO DO TDZ E ANA E ANTIOXIDANTE:

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
A	1	375.00000	375.00000	23.9362 **
B	4	13210.00000	3302.50000	210.7979 **
A*B	4	2050.00000	512.50000	32.7128 **
Resíduo	50	783.33333	15.66667	
Total	59	16418.33333		

Média: 7,83
CV (%): 50,53

ANEXO 8 - RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL PORCENTAGEM DE EXPLANTES REGENERANDO GEMA, DO EXPERIMENTO EFEITO DO TDZ E ANA E ANTIOXIDANTE:

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
A	1	6.66667	6.66667	2.0000 ns
B	4	10.00000	2.50000	0.7500 ns
A*B	4	10.00000	2.50000	0.7500 ns
Resíduo	50	166.66667	3.33333	
Total	59	193.33333		

Média: 0,33
CV (%): 54,77

ANEXO 9 - RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL NÚMERO MÉDIO DE GEMAS POR EXPLANTES REGENERANDO, DO EXPERIMENTO EFEITO DO TDZ E ANA E ANTIOXIDANTE:

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
A	1	0.06667	0.06667	2.0000 ns
B	4	0.10000	0.02500	0.7500 ns
A*B	4	0.10000	0.02500	0.7500 ns
Resíduo	50	1.66667	0.03333	
Total	59	1.93333		

Média: 0,033
CV (%): 54,77

ANEXO 10 - RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL PORCENTAGEM DE EXPLANTES OXIDADOS, DO EXPERIMENTO EFEITO DO MEIO DE CULTURA, PVP E TDZ:

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
A	1	3502.08333333	3502.08333333	33.2213*
B	1	18.75000000	18.75000000	0.1779
C	1	3502.08333333	3502.08333333	33.2213*
A*B	1	18.75000000	18.75000000	0.1779
A*C	1	3502.08333333	3502.08333333	33.2213*
B*C	1	18.75000000	18.75000000	0.1779
A*B*C	1	18.75000000	18.75000000	0.1779
Resíduo	40	4216.66666667	105.41666667	
Total	47	14797.91666667		

Média: 91,4
CV (%): 11,22

ANEXO 11 - RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL PORCENTAGEM DE FORMAÇÃO DE CALOS, DO EXPERIMENTO EFEITO DO MEIO DE CULTURA, PVP E TDZ:

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
A	1	10208.33333333	10208.33333333	28.2910*
B	1	3333.33333333	3333.33333333	9.2379*
C	1	32033.33333333	32033.33333333	88.7760*
A*B	1	3675.00000000	3675.00000000	10.1848*
A*C	1	75.00000000	75.00000000	0.2079
B*C	1	2700.00000000	2700.00000000	7.4827*
A*B*C	1	2408.33333333	2408.33333333	6.6744**
Resíduo	40	14433.33333333	360.83333333	
Total	47	68866.66666667		

Média: 41,6
CV (%): 45,5

ANEXO 12 - RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL PORCENTAGEM DE FORMAÇÃO DE GEMAS, DO EXPERIMENTO EFEITO DO MEIO DE CULTURA, PVP E TDZ:

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
A	1	102.08333333	102.08333333	14.4118*
B	1	2.08333333	2.08333333	0.2941
C	1	102.08333333	102.08333333	14.4118*
A*B	1	2.08333333	2.08333333	0.2941
A*C	1	102.08333333	102.08333333	14.4118*
B*C	1	2.08333333	2.08333333	0.2941
A*B*C	1	2.08333333	2.08333333	0.2941
Resíduo	40	283.33333333	7.08333333	
Total	47	597.91666667		

Média: 1,45
CV (%): 18,24

ANEXO 13 - RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL PORCENTAGEM DE FORMAÇÃO BROTOS, DO EXPERIMENTO EFEITO DO MEIO DE CULTURA, PVP E TDZ:

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
A	1	133.33333333	133.33333333	12.3077*
B	1	8.33333333	8.33333333	0.7692
C	1	133.33333333	133.33333333	12.3077*
A*B	1	8.33333333	8.33333333	0.7692
A*C	1	133.33333333	133.33333333	12.3077*
B*C	1	8.33333333	8.33333333	0.7692
A*B*C	1	8.33333333	8.33333333	0.7692
Resíduo	40	433.33333333	10.83333333	
Total	47	866.66666667		

Média: 1,66
CV (%): 19,74

ANEXO 14 - RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL NÚMERO MÉDIO DE BROTOS, DO EXPERIMENTO EFEITO DO MEIO DE CULTURA, PVP E TDZ:

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
A	1	0.01333333	0.01333333	12.3077*
B	1	0.00083333	0.00083333	0.7692
C	1	0.01333333	0.01333333	12.3077*
A*B	1	0.00083333	0.00083333	0.7692
A*C	1	0.01333333	0.01333333	12.3077*
B*C	1	0.00083333	0.00083333	0.7692
A*B*C	1	0.00083333	0.00083333	0.7692
Resíduo	40	0.04333333	0.00108333	
Total	47	0.08666667		

Média: 0,016
CV (%): 19,74

ANEXO 15 - RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL PORCENTAGEM DE EXPLANTES COM ANTOCIANINA, DO EXPERIMENTO EFEITO DO MEIO DE CULTURA, PVP E TDZ:

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
A	1	18.75000000	18.75000000	2.1429
B	1	18.75000000	18.75000000	2.1429
C	1	18.75000000	18.75000000	2.1429
A*B	1	18.75000000	18.75000000	2.1429
A*C	1	18.75000000	18.75000000	2.1429
B*C	1	18.75000000	18.75000000	2.1429
A*B*C	1	18.75000000	18.75000000	2.1429
Resíduo	40	350.00000000	8.75000000	
Total	47	481.25000000		

Média: 0,62
CV (%): 47,32

ANEXO 16 - RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL NÚMERO MÉDIO DE BROTOS DO 1º SUBCULTIVO, DO EXPERIMENTO EFEITO DE DIFERENTES MEIOS NA MULTIPLICAÇÃO:

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Tratamentos	2	60.18133	30.09067	6.8161 *
Resíduo	12	52.97600	4.41467	
Total	14	113.15733		

Média: 6,45
CV (%): 32,55

ANEXO 17 - RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL MASSA FRESCA DO 1º SUBCULTIVO, DO EXPERIMENTO EFEITO DE DIFERENTES MEIOS NA MULTIPLICAÇÃO:

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Tratamentos	2	0.30386	0.15193	24.8965 **
Resíduo	12	0.07323	0.00610	
Total	14	0.37709		

Média: 0,18
CV (%): 42,19

ANEXO 18 - RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL PORCENTAGEM DE OXIDAÇÃO DO 1º SUBCULTIVO, DO EXPERIMENTO EFEITO DE DIFERENTES MEIOS NA MULTIPLICAÇÃO:

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Tratamentos	2	2933.25879	1466.62940	7.8524 **
Resíduo	12	2241.30035	186.77503	
Total	14	5174.55914		

Média: 19,03
CV (%): 71,80

ANEXO 19 - RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL PORCENTAGEM DE CLOROSE PARCIAL DO 1º SUBCULTIVO, DO EXPERIMENTO EFEITO DE DIFERENTES MEIOS NA MULTIPLICAÇÃO:

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Tratamentos	2	20320.00000	10160.00000	54.4286 **
Resíduo	12	2240.00000	186.66667	
Total	14	22560.00000		

Média: 36
CV (%): 37,95

ANEXO 20 - RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL MASSA SECA DO 1º SUBCULTIVO, DO EXPERIMENTO EFEITO DE DIFERENTES MEIOS NA MULTIPLICAÇÃO:

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Tratamentos	2	0.00036	0.00018	7.2172 **
Resíduo	12	0.00030	0.00002	
Total	14	0.00065		

Média: 0,01
CV (%): 35,31

ANEXO 21 - RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL NÚMERO MÉDIO DE BROTO DO 2º SUBCULTIVO, DO EXPERIMENTO EFEITO DE DIFERENTES MEIOS NA MULTIPLICAÇÃO:

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Tratamentos	2	55.98533	27.99267	10.7006 **
Resíduo	12	31.39200	2.61600	
Total	14	87.37733		

Média: 6,55

CV (%): 24,68

ANEXO 22 - RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL MASSA FRESCA DO 2º SUBCULTIVO, DO EXPERIMENTO EFEITO DE DIFERENTES MEIOS NA MULTIPLICAÇÃO:

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Tratamentos	2	0.29590	0.14795	22.4144 **
Resíduo	12	0.07921	0.00660	
Total	14	0.37510		

Média: 0,18

CV (%): 44,56

ANEXO 23 - RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL PORCENTAGEM DE OXIDAÇÃO DO 2º SUBCULTIVO, DO EXPERIMENTO EFEITO DE DIFERENTES MEIOS NA MULTIPLICAÇÃO:

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Tratamentos	2	3497.52634	1748.76317	7.5007 **
Resíduo	12	2797.74418	233.14535	
Total	14	6295.27053		

Média: 20

CV (%): 76,33

ANEXO 24 - RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL PORCENTAGEM DE CLOROSE PARCIAL DO 2º SUBCULTIVO, DO EXPERIMENTO EFEITO DE DIFERENTES MEIOS NA MULTIPLICAÇÃO:

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Tratamentos	2	16373.33333	8186.66667	19.8065 **
Resíduo	12	4960.00000	413.33333	
Total	14	21333.33333		

Média: 33,3

CV (%): 60,99

ANEXO 25 - RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL NÚMERO MÉDIO DE BROTO DO 3º SUBCULTIVO, DO EXPERIMENTO EFEITO DE DIFERENTES MEIOS NA MULTIPLICAÇÃO:

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Tratamentos	2	12.11200	6.05600	1.7826
Resíduo	12	40.76800	3.39733	
Total	14	52.88000		

Média: 8

CV (%): 23,03

ANEXO 26 - RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL MASSA FRESCA DO 3º SUBCULTIVO, DO EXPERIMENTO EFEITO DE DIFERENTES MEIOS NA MULTIPLICAÇÃO:

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Tratamentos	2	0.02387	0.01193	4.6711 *
Resíduo	12	0.03066	0.00255	
Total	14	0.05453		

Média: 0,1

CV (%): 47,99

ANEXO 27 - RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL PORCENTAGEM DE OXIDAÇÃO DO 3º SUBCULTIVO, DO EXPERIMENTO EFEITO DE DIFERENTES MEIOS NA MULTIPLICAÇÃO:

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Tratamentos	2	2926.32636	1463.16318	8.9433 **
Resíduo	12	1963.25961	163.60497	
Total	14	4889.58597		

Média: 16,64

CV (%): 76,83

ANEXO 28 - RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL PORCENTAGEM DE CLOROSE PARCIAL DO 3º SUBCULTIVO, DO EXPERIMENTO EFEITO DE DIFERENTES MEIOS NA MULTIPLICAÇÃO:

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Tratamentos	2	16053.33333	8026.66667	66.8889 **
Resíduo	12	1440.00000	120.00000	
Total	14	17493.33333		

Média: 30,66

CV (%): 35,72

ANEXO 29 - RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL NÚMERO MÉDIO DE BROTO DO 4º SUBCULTIVO, DO EXPERIMENTO EFEITO DE DIFERENTES MEIOS NA MULTIPLICAÇÃO:

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Tratamentos	2	9.86133	4.93067	2.8165
Resíduo	12	21.00800	1.75067	
Total	14	30.86933		

Média: 8,10

CV (%): 16,32

ANEXO 30 - RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL MASSA FRESCA DO 4º SUBCULTIVO, DO EXPERIMENTO EFEITO DE DIFERENTES MEIOS NA MULTIPLICAÇÃO:

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Tratamentos	2	0.02302	0.01151	6.2061 *
Resíduo	12	0.02226	0.00185	
Total	14	0.04528		

Média: 0,1

CV (%): 42,88

ANEXO 31 - RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL PORCENTAGEM DE OXIDAÇÃO DO 4º SUBCULTIVO, DO EXPERIMENTO EFEITO DE DIFERENTES MEIOS NA MULTIPLICAÇÃO:

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Tratamentos	2	1653.33333	826.66667	7.7500 **
Resíduo	12	1280.00000	106.66667	
Total	14	2933.33333		

Média: 13,33

CV (%): 77,45

ANEXO 32 - RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL PORCENTAGEM DE CLOROSE PARCIAL DO 4º SUBCULTIVO, DO EXPERIMENTO EFEITO DE DIFERENTES MEIOS NA MULTIPLICAÇÃO:

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Tratamentos	2	12853.33333	6426.66667	53.5556 **
Resíduo	12	1440.00000	120.00000	
Total	14	14293.33333		

Média: 30,66

CV (%): 35,72

CAPÍTULO 2

ANEXO 33 - RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL PORCENTAGEM DE EXPLANTES OXIDADOS, DO EXPERIMENTO EFEITO DE ANTIOXIDANTE:

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Tratamentos	1	40.00000	40.00000	3.9216 ^{ns}
Resíduo	8	81.60000	10.20000	
Total	9	121.60000		

Média: 85,2
CV (%): 3,75

ANEXO 34 - RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL PORCENTAGEM DE EXPLANTES COM CALO, DO EXPERIMENTO EFEITO DE ANTIOXIDANTE:

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Tratamentos	1	1.60000	1.60000	0.2667 ^{ns}
Resíduo	8	48.00000	6.00000	
Total	9	49.60000		

Média: 63,2
CV (%): 3,88

ANEXO 35 - RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL PORCENTAGEM DE EXPLANTES COM GEMA, DO EXPERIMENTO EFEITO DE ANTIOXIDANTE:

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Tratamentos	1	0.40000	0.40000	0.1667 ^{ns}
Resíduo	8	19.20000	2.40000	
Total	9	19.60000		

Média: 2,20
CV (%): 7,04

ANEXO 36 - RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL PORCENTAGEM DE EXPLANTES OXIDADOS, DO EXPERIMENTO EFEITO DA PRÉ-CULTURA:

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Tratamentos	1	0.40000	0.40000	0.0952 ^{ns}
Resíduo	8	33.60000	4.20000	
Total	9	34.00000		

Média: 83,00
CV (%): 2,47

ANEXO 37 - RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL PORCENTAGEM DE EXPLANTES COM CALO, DO EXPERIMENTO EFEITO DA PRÉ-CULTURA:

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Tratamentos	1	6.40000	6.40000	0.8889 ^{ns}
Resíduo	8	57.60000	7.20000	
Total	9	64.00000		

Média: 62,00
CV (%): 4,33

ANEXO 38 - RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL PORCENTAGEM DE EXPLANTES COM GEMA, DO EXPERIMENTO EFEITO DA PRÉ-CULTURA:

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Tratamentos	1	0.40000	0.40000	0.1333 ^{ns}
Resíduo	8	24.00000	3.00000	
Total	9	24.40000		

Média: 1,40
CV (%): 12,3

ANEXO 39 - RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL PORCENTAGEM DE EXPLANTES OXIDADOS, DO EXPERIMENTO CONCENTRAÇÕES DE CANAMICINA:

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Tratamentos	2	106.99721	53.49861	0.6039 ^{ns}
Resíduo	12	1063.04176	88.58681	
Total	14	1170.03897		

Média: 35,7
CV (%): 26,3

ANEXO 40 - RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL PORCENTAGEM DE EXPLANTES COM CALO, DO EXPERIMENTO CONCENTRAÇÕES DE CANAMICINA:

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Tratamentos	2	152.75045	76.37523	0.4593 ns
Resíduo	12	1995.63584	166.30299	
Total	14	2148.38629		

Média: 63,8
CV (%): 20,1

ANEXO 41 - RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL PORCENTAGEM DE GEMAS POR EXPLANTE, DO EXPERIMENTO CONCENTRAÇÕES DE CANAMICINA:

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Tratamentos	2	255.76533	127.88267	57.3208 **
Resíduo	12	26.77200	2.23100	
Total	14	282.53733		

Média: 18,2
CV (%): 8,2

ANEXO 42 - RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL NÚMERO MÉDIO DE GEMAS POR EXPLANTE COM GEMA, DO EXPERIMENTO CONCENTRAÇÕES DE CANAMICINA:

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Tratamentos	2	13.15733	6.57867	31.3270**
Resíduo	12	2.52000	0.21000	
Total	14	15.67733		

Média: 2,68
CV (%): 17

ANEXO 43 - RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL PORCENTAGEM DE EXPLANTES OXIDADOS, DO EXPERIMENTO DIFERENTES ANTIBIÓTICOS BACTERICIDAS:

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Tratamentos	1	1518.75000	1518.75000	30.1240**
Resíduo	10	504.16667	50.41667	
Total	11	2022.91667		

Média: 67,9
CV (%): 10,45

ANEXO 44 - RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL PORCENTAGEM DE EXPLANTES COM CALO, DO EXPERIMENTO DIFERENTES ANTIBIÓTICOS BACTERICIDAS:

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Tratamentos	1	833.33333	833.33333	90.9091**
Resíduo	10	91.66667	9.16667	
Total	11	925.00000		

Média: 72,5
CV (%): 4,18

ANEXO 45 - RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL PORCENTAGEM DE EXPLANTES COM GEMA, DO EXPERIMENTO DIFERENTES ANTIBIÓTICOS BACTERICIDAS:

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Tratamentos	1	4033.33333	4033.33333	75.6250**
Resíduo	10	533.33333	53.33333	
Total	11	4566.66667		

Média: 28,33
CV (%): 25,78

ANEXO 46 - RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL PORCENTAGEM DE EXPLANTES COM CONTAMINAÇÃO, DO EXPERIMENTO DIFERENTES ANTIBIÓTICOS BACTERICIDAS:

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Tratamentos	1	1408.33333	1408.33333	42.2500**
Resíduo	10	333.33333	33.33333	
Total	11	1741.66667		

Média: 29,16
CV (%): 19,79

ANEXO 47 - RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL PORCENTAGEM DE EXPLANTES OXIDADOS, DO EXPERIMENTO EFEITO DA ACETOSIRINGONA:

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Tratamentos	4	1507.21990	376.80498	5.2318 **
Resíduo	20	1440.44248	72.02212	
Total	24	2947.66238		

Média: 72,8
CV (%): 11,64

ANEXO 48 - RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL PORCENTAGEM DE EXPLANTES COM CALO, DO EXPERIMENTO EFEITO DA ACETOSIRINGONA:

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Tratamentos	4	1475.38838	368.84709	11.1981 **
Resíduo	20	658.76928	32.93846	
Total	24	2134.15766		

Média: 27,16
CV (%): 21,13

ANEXO 49 - RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL PORCENTAGEM DE EXPLANTES COM GEMA, DO EXPERIMENTO EFEITO DA ACETOSIRINGONA:

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Tratamentos	4	411.87506	102.96876	109.1495 **
Resíduo	20	18.86748	0.94337	
Total	24			

Média: 4,84
CV (%): 20,03

ANEXO 50 - RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL NÚMERO MÉDIO DE GEMAS POR EXPLANTE, DO EXPERIMENTO EFEITO DA ACETOSIRINGONA:

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Tratamentos	4	19.01000	4.75250	463.6585 **
Resíduo	20	0.20500	0.01025	
Total	24	19.21500		

Média: 1,21
CV (%): 8,37

CAPÍTULO 3

ANEXO 51 - RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL ALTURA DA PLANTA, NA 1ª AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA:

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Tratamentos	6	38.18224	6.36371	1.4212 ^{ns}
Resíduo	21	94.03198	4.47771	
Total	27	132.21421		

Média: 5,54
CV (%): 38,14

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

ANEXO 52 - RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL NÚMERO DE FOLHAS, NA 1ª AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA:

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Tratamentos	6	13.32713	2.22119	1.5245 ^{ns}
Resíduo	21	30.59667	1.45698	
Total	27	43.92380		

Média: 4,30
CV (%): 28,06

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

ANEXO 53 - RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL COMPRIMENTO MÉDIO DAS FOLHAS, NA 1ª AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA:

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Tratamentos	6	23.68445	3.94741	2.7106 *
Resíduo	21	30.58149	1.45626	
Total	27	54.26594		

Média: 3,79

CV (%): 31,80

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

ANEXO 54 - RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL LARGURA MÉDIA DAS FOLHAS, NA 1ª AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA:

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Tratamentos	6	5.52753	0.92125	2.7509 *
Resíduo	21	7.03276	0.33489	
Total	27	12.56028		

Média: 2,06

CV (%): 28,01

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

ANEXO 55 - RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL DISTÂNCIA DE ENTRENÓS, NA 1ª AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA:

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Tratamentos	6	0.94276	0.15713	6.2595**
Resíduo	21	0.52714	0.02510	
Total	27	1.46990		

Média: 1,39

CV (%): 11,39

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

ANEXO 56 - RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL ALTURA DA PLANTA, NA 2ª AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA:

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Tratamentos	6	251.30357	41.88393	2.5243 ^{ns}
Resíduo	21	348.43750	16.59226	
Total	27	599.74107		

Média: 8,76

CV (%): 46,46

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

ANEXO 57 - RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL NÚMERO DE FOLHAS, NA 2ª AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA:

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Tratamentos	6	15.86334	2.64389	0.5992 ^{ns}
Resíduo	21	92.66667	4.41270	
Total	27	108.53001		

Média: 4,26

CV (%): 49,29

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

ANEXO 58 - RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL COMPRIMENTO MÉDIO DAS FOLHAS, NA 2ª AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA:

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Tratamentos	6	59.08000	9.84667	1.9762 ^{ns}
Resíduo	21	104.63502	4.98262	
Total	27	163.71501		

Média: 6,30

CV (%): 35,41

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

ANEXO 59 - RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL LARGURA MÉDIA DAS FOLHAS, NA 2ª AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA:

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Tratamentos	6	15.37030	2.56172	1.6248 ^{ns}
Resíduo	21	33.10982	1.57666	
Total	27	48.48012		

Média: 3,42

CV (%): 36,67

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

ANEXO 60 - RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL DISTÂNCIA DE ENTRENÓS, NA 2ª AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA:

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Tratamentos	6	0.91719	0.15287	1.0074 ^{ns}
Resíduo	21	3.18667	0.15175	
Total	27	4.10386		

Média: 1,50

CV (%): 25,89

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

ANEXO 61 - RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL ALTURA DA PLANTA, NA 3ª AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA:

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Tratamentos	6	630.58477	105.09746	2.6538 [*]
Resíduo	21	831.66670	39.60318	
Total	27	1462.25147		

Média: 18,23

CV (%): 34,51

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

ANEXO 62 - RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL NÚMERO DE FOLHAS, NA 3ª AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA:

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Tratamentos	6	16.35334	2.72556	1.4614 ^{ns}
Resíduo	21	39.16667	1.86508	
Total	27	55.52001		

Média: 5,76

CV (%): 23,70

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

ANEXO 63 - RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL COMPRIMENTO MÉDIO DAS FOLHAS, NA 3ª AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA:

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Tratamentos	6	97.96949	16.32825	4.7472 ^{**}
Resíduo	21	72.23056	3.43955	
Total	27	170.20005		

Média: 10,58

CV (%): 17,51

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

ANEXO 64 - RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL LARGURA MÉDIA DAS FOLHAS, NA 3ª AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA:

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Tratamentos	6	32.81653	5.46942	7.5771 ^{**}
Resíduo	21	15.15849	0.72183	
Total	27	47.97502		

Média: 5,27

CV (%): 16,11

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

ANEXO 65 - RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL DISTÂNCIA DE ENTRENÓS, NA 3ª AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA:

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Tratamentos	6	1.77869	0.29645	0.2748 ^{ns}
Resíduo	21	22.65418	1.07877	
Total	27	24.43287		

Média: 2,10

CV (%): 49,43

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

ANEXO 66 - RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL ALTURA DA PLANTA, NA 4ª AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA:

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Tratamentos	6	1744.22762	290.70460	2.5013 ^{ns}
Resíduo	21	2440.66668	116.22222	
Total	27	4184.89430		

Média: 37,90

CV (%): 28,44

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

ANEXO 67 - RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL NÚMERO DE FOLHAS, NA 4ª AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA:

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Tratamentos	6	11.50000	1.91667	1.1667 ^{ns}
Resíduo	21	34.50000	1.64286	
Total	27	46.00000		

Média: 8,00

CV (%): 16,02

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

ANEXO 68 - RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL COMPRIMENTO MÉDIO DAS FOLHAS, NA 4ª AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA:

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Tratamentos	6	52.67033	8.77839	5.0229**
Resíduo	21	36.70117	1.74767	
Total	27	89.37150		

Média: 14,22
CV (%): 9,30

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

ANEXO 69 - RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL LARGURA MÉDIA DAS FOLHAS, NA 4ª AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA:

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Tratamentos	6	14.60792	2.43465	13.3124**
Resíduo	21	3.84062	0.18289	
Total	27	18.44854		

Média: 6,04
CV (%): 7,08

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

ANEXO 70 - RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL NÚMERO MÉDIO DE FLORES, NA 4ª AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA:

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Tratamentos	6	24.21429	4.03571	60.3203**
Resíduo	21	1.40500	0.06690	
Total	27	25.61929		

Média: 0,71
CV (%): 36,21

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

ANEXO 71 - RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL COMPRIMENTO MÉDIO DE FLORES, NA 4ª AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA:

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Tratamentos	6	45.85794	7.64299	9017.0112**
Resíduo	21	0.01780	0.00085	
Total	27	45.87574		

Média: 1,11
CV (%): 2,62

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

ANEXO 72 - RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL NÚMERO MÉDIO DE BOTÕES, NA 4ª AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA:

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Tratamentos	6	41.00000	6.83333	104.3636**
Resíduo	21	1.37500	0.06548	
Total	27	42.37500		

Média: 1,25
CV (%): 20,47

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

ANEXO 73 - RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL ALTURA DA PLANTA, NA 5ª AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA:

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Tratamentos	6	2207.96429	367.99405	1.7438 ^{ns}
Resíduo	21	4431.75000	211.03571	
Total	27	6639.71429		

Média: 54,28
CV (%): 26,76

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

ANEXO 74 - RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL NÚMERO DE FOLHAS, NA 5ª AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA:

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Tratamentos	6	121.71429	20.28571	8.0000 ^{**}
Resíduo	21	53.25000	2.53571	
Total	27	174.96429		

Média: 9,53
CV (%): 16,70

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

ANEXO 75 - RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL COMPRIMENTO MÉDIO DAS FOLHAS, NA 5ª AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA:

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Tratamentos	6	46.61293	7.76882	4.3562 ^{**}
Resíduo	21	37.45135	1.78340	
Total	27	84.06429		

Média: 16,04
CV (%): 8,32

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

ANEXO 76 - RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL LARGURA MÉDIA DAS FOLHAS, NA 5ª AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA:

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Tratamentos	6	10.12441	1.68740	8.0685 ^{**}
Resíduo	21	4.39184	0.20914	
Total	27	14.51625		

Média: 6,26
CV (%): 7,30

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

ANEXO 77 - RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL NÚMERO MÉDIO DE FLORES, NA 5ª AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA:

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Tratamentos	6	123.00214	20.50036	6.1063 ^{**}
Resíduo	21	70.50250	3.35726	
Total	27	193.50464		

Média: 3,14
CV (%): 52,23

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

ANEXO 78 - RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL COMPRIMENTO MÉDIO DE FLORES, NA 5ª AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA:

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Tratamentos	6	29.17754	4.86292	5.1271 **
Resíduo	21	19.91788	0.94847	
Total	27	49.09541		

Média: 1,09

CV (%): 46,55

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

ANEXO 79 - RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL NÚMERO MÉDIO DE BOTÕES, NA 5ª AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA:

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Tratamentos	6	362.25357	60.37560	3.8685 **
Resíduo	21	327.74500	15.60690	
Total	27	689.99857		

Média: 7,59

CV (%): 52,03

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

ANEXO 80 - RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL NÚMERO MÉDIO DE FRUTOS, NA 5ª AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA:

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Tratamentos	6	235.93304	39.32217	5.8944 **
Resíduo	21	140.09375	6.67113	
Total	27	376.02679		

Média: 3,83

CV (%): 27,27

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

ANEXO 81 - RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA PORCENTAGEM DE GERMINAÇÃO:

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
A	8	35647.17460	4455.89683	102.8441 **
B	6	8628.48413	1438.08069	33.1915 **
AxB	48	16403.15873	341.73247	7.8873 **
Tratamentos	62	60678.81746	978.69060	22.5886 **
Resíduo	189	8188.75000	43.32672	
Total	251	68867.56746		

Média: 82,1

CV (%): 8,01

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

ANEXO 82 - RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO:

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
A	8	165.83386	20.72923	27.7452 **
B	6	1512.32923	252.05487	337.3646 **
AxB	48	74.79579	1.55825	2.0856 **
Tratamentos	62	1752.95888	28.27353	37.8429 **
Resíduo	189	141.20738	0.74713	
Total	251	1894.16625		

Média: 5,96

CV (%): 14,5

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

ANEXO 83 - RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL MASSA SECA DA PARTE AÉREA:

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Tratamentos	6	19.31687	3.21948	11.2995 **
Resíduo	21	5.98336	0.28492	
Total	27	25.30024		

Média: 4,43

CV (%): 12,03

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

ANEXO 84 - RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL MASSA SECA DO SISTEMA RADICIAL:

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Tratamentos	6	2.76063	0.46011	3.7318 *
Resíduo	21	2.58914	0.12329	
Total	27	5.34977		

Média: 1,27

CV (%): 27,47

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < .05$)

ANEXO 85 - RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL MASSA SECA DA PLANTA INTEIRA:

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Tratamentos	6	33.74452	5.62409	9.1409 **
Resíduo	21	12.92059	0.61527	
Total	27	46.66511		

Média: 5,71

CV (%): 13,73

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

ANEXO 86 - RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL ESPESSURA TOTAL, DA ANÁLISE ANATÔMICA:

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Tratamentos	6	22545.49468	3757.58245	5.1569 **
Resíduo	21	15301.53706	728.64462	
Total	27	37847.03175		

Média: 263,77
CV (%): 10,23

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

ANEXO 87 - RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL ESPESSURA DA EPIDERMES SUPERIOR, DA ANÁLISE ANATÔMICA:

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Tratamentos	6	64.18732	10.69789	1.9701 ^{ns}
Resíduo	21	114.03463	5.43022	
Total	27	178.22195		

Média: 28,01
CV (%): 8,32

ANEXO 88 - RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL ESPESSURA DO PARÊNQUIMA PALIÇÁDICO, DA ANÁLISE ANATÔMICA:

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Tratamentos	6	2172.57579	362.09597	4.9712 **
Resíduo	21	1529.62850	72.83945	
Total	27	3702.20430		

Média: 78,91
CV (%): 10,82

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

ANEXO 89 - RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL ESPESSURA DO PARÊNQUIMA LACUNOSO, DA ANÁLISE ANATÔMICA:

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Tratamentos	6	8505.95111	1417.65852	4.1564 **
Resíduo	21	7162.72326	341.08206	
Total	27	15668.67437		

Média: 136,23
CV (%): 13,56

ANEXO 90 - RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL ESPESSURA DA EPIDERMES INFERIOR, DA ANÁLISE ANATÔMICA:

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Tratamentos	6	128.37506	21.39584	4.0487 **
Resíduo	21	110.97680	5.28461	
Total	27	239.35186		

Média: 20,61
CV (%): 11,15

