



EVÂNIA GALVÃO MENDONÇA

**TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA E
REJUVENESCIMENTO *IN VITRO* DE
HÍBRIDOS NATURAIS DE *Eucalyptus urophylla***

**LAVRAS - MG
2011**

EVÂNIA GALVÃO MENDONÇA

**TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA E REJUVENESCIMENTO *IN VITRO*
DE HÍBRIDOS NATURAIS DE *Eucalyptus urophylla***

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fisiologia Vegetal, área de concentração em Biologia Molecular, para a obtenção do título de “Doutor”.

Orientador

Prof. Dr. Luciano Vilela Paiva

Coorientadores

Prof. Dra. Vanessa Cristina Stein

Prof. Dr. Breno Régis Santos

LAVRAS – MG
2011

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Mendonça, Evânia Galvão.

Transformação genética e rejuvenescimento *in vitro* de híbridos naturais de *Eucalyptus urophylla* / Evânia Galvão Mendonça. – Lavras : UFLA, 2011.

69 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2011.

Orientador: Luciano Vilela Paiva.

Bibliografia.

1. Eucalipto. 2. Biotecnologia. 3. Enraizamento. 4. Cultivo *in vitro*. 5. Raízes em cabeleira. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 583.420487322

EVÂNIA GALVÃO MENDONÇA

**TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA E REJUVENESCIMENTO *IN VITRO*
DE HÍBRIDOS NATURAIS DE *Eucalyptus urophylla***

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fisiologia Vegetal, área de concentração em Biologia Molecular, para a obtenção do título de “Doutor”.

APROVADA em 02 de dezembro de 2011.

Breno Régis Santos

UNIFAL

Hélder Bolognani Andrade

V&M Florestal

Andréa Almeida Carneiro

EMBRAPA

Anderson Cleiton José

UFLA

Prof. Dr. Luciano Vilela Paiva
(Orientador)

LAVRAS – MG
2011

Ao meu marido Gilson, pelo incentivo, motivação e por compreender minha
ausência durante o doutorado.

Aos meus pais Mariana e Jacy pelo carinho e apoio.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por acalantar meu coração nos momentos de dificuldade e desespero, pois em todos os momentos desta caminhada senti sua presença ao meu lado.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Programa de Pós Graduação em Agronomia/Fisiologia Vegetal pela oportunidade.

À Fapemig pela concessão da bolsa.

Ao meu orientador Luciano Vilela Paiva, pelo incentivo, confiança e por acreditar na minha capacidade. Aprendi e cresci muito trabalhando com você.

Ao meu padrinho e coorientador Breno por plantar a sementinha do doutorado no meu coração, se não fosse pelo seu incentivo nada disso teria sido possível.

A minha coorientadora e querida amiga Vanessa, pelo carinho, incentivo e ajuda. É muito bom trabalhar com você. Vanessa você é uma pessoa sem comparação.

Ao professor Chalfun pela ajuda em todos os momentos.

Aos alunos do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fisiologia Vegetal, em especial a Amanda, Carla, Cintia, Gabriela e Kamila...foram muitos os momentos de sofrimento juntas!!!

Aos amigos do Laboratório Central de Biologia Molecular, em especial Marlúcia, Luciene, Anderson e Gabriel.

Agradeço especialmente ao Grupo Eucalipto, José Renato, Guilherme e com carinho todo especial as queridas amigas Flávia e Tânia.

A minha mãe, Mariana, e ao meu pai, Jacy, por sempre acreditarem e confiarem em mim.

Ao meu marido Gilson, por compreender minhas ausências e por estar sempre ao meu lado.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a minha formação.

MUITO OBRIGADA!!!!

RESUMO

O *Eucalyptus* é uma espécie nativa da Austrália pertencente à família Myrtaceae. Devido à variabilidade genética intrínseca da espécie e a boa adaptabilidade pode ser utilizada para plantios em áreas críticas e sua madeira destinada a diversos fins. No intuito de buscar uma metodologia que agregue características de interesse econômico ao eucalipto o trabalho foi executado em duas partes. A primeira teve o objetivo de promover o rejuvenescimento *in vitro* e aumentar a taxa de enraizamento de dois clones comerciais (VM 02 e VM 04) de híbridos naturais de *Eucalyptus urophylla* da empresa V&M Florestal. O cultivo *in vitro* teve início com ápices meristemáticos e as plantas originadas desses meristemas foram subcultivadas, enraizadas e aclimatizadas para o enraizamento das miniestacas *ex vitro*. A partir do enraizamento foi possível observar que para o clone VM 02 três subcultivos foram suficientes para proporcionar o enraizamento de 100% das miniestacas cultivadas *ex vitro* e para o clone VM 04 apenas um subcultivo *in vitro* foi necessário para proporcionar o rejuvenescimento das plantas, sendo este resultado também observado pelo enraizamento de aproximadamente 100% das estacas *ex vitro*. Por meio de análise histoquímica com lugol e cloreto férrico foi observado que o número de amiloplastos e a quantidade de fenóis são maiores nas gerações em que as miniestacas não enraízam. A partir dos resultados encontrados conclui-se que o rejuvenescimento foi fator determinante para o enraizamento de miniestacas dos clones VM 02 e VM 04. No segundo experimento o objetivo foi otimizar um protocolo de transformação genética para um híbrido de *Eucalyptus urophylla* via *Agrobacterium rhizogenes*. Para este estudo foi utilizado como material vegetal brotação deste híbrido, cultivado *in vitro*, em meio de multiplicação. As brotações foram submetidas a dois métodos de infecção da agrobactéria: ferimento por corte na base das estacas e infiltração a vácuo. O tempo de cocultivo foi de 5 dias e a análise das raízes potencialmente transgênicas foi realizada por análise visual da expressão do GFP e pela PCR com *primers* específicos para o gene *gfp*. Foi possível observar o crescimento de raízes a partir do décimo dia após a infecção e neste período algumas já apresentavam o fenótipo de raiz em cabeleira. Verificou-se que o híbrido de eucalipto estudado é susceptível a transformação genética via *Agrobacterium rhizogenes* e que o método de infecção por infiltração a vácuo proporcionou uma menor mortalidade dos explantes e eficiência de transformação de 44%. Por meio destes resultados conclui-se que é possível transformar raízes do híbrido de *E. urophylla* utilizando *A. rhizogenes*.

Palavras-chave: Biotecnologia. Cultivo *in vitro*. Enraizamento. Gene repórter.

ABSTRACT

Eucalyptus is a species native to Australia and it belongs to the Family Myrtaceae. Due to the species' intrinsic genetic variability and good adaptability, *Eucalyptus* can be used for plantations in critical areas and its wood, destined to several purposes. In order to search for a methodology that associates characteristics of economic interest, this work has been carried out in two steps. The first step aimed to promote the rejuvenation *in vitro* and increase the rooting rate of two commercial clones (VM 02 and VM 04) of natural hybrids of *Eucalyptus urophylla* from the company V&M Florestal. The cultivation *in vitro* started with meristematic apices and the plants originated from these meristems were subcultured, rooted and acclimatized in order to be rooted *ex vitro*. From this rooting, it was possible to observe that, for clone VM 02, three subcultures were enough to provide the rooting of 100% of the mini-cuttings, rooted *ex vitro*, while for VM 04, only one subculture *in vitro* was necessary to provide plant rejuvenation. This result has also been observed with the rooting of approximately 100% of the cuttings *ex vitro*. By means of histochemical analysis with lugol and ferric chloride, it could be seen that the number of amyloplasts and the amount of phenols are higher in the generations in which the mini-cuttings do not root. From these results, it can be concluded that rejuvenation was an important factor for the rooting of mini-cuttings of clones VM 02 and VM 04. The aim of the second experiment was to optimize a protocol of genetic transformation for a hybrid of *Eucalyptus urophylla* via *Agrobacterium rhizogenes*. For this study, sprouts of this hybrid were used as vegetal material, cultivated *in vitro*, in multiplication media. The sprouts were subjected to two methods of infection with the agrobacteria: injury by cutting the base of the bud and vacuum infiltration. The co-culture lasted for 5 days and the analysis of the potentially transgenic roots was carried out by visual analysis of GFP expression and by PCR with specific primers for *gfp* gene. It was possible to observe the plants' growth from the tenth day after the infection, being that some of them already had the phenotype of hairy root. It could be verified that the studied hybrid of eucalyptus is susceptible to genetic transformation via *Agrobacterium rhizogenes* and that the infection by vacuum infiltration provided a lower mortality rate of the explants and a transformation efficiency of 44%. With these results, we conclude that it is possible to transform roots of the hybrid of *E. urophylla* using *A. rhizogenes*.

Keywords: Biotechnology, cultivation *in vitro*, rooting, reporter gene.

SUMÁRIO

_____	Capítulo 1 Introdução Geral.....	1
2	REFERENCIAL TEÓRICO	4
2.1	Importância econômica do eucalipto	4
2.2	Produção comercial de mudas e rejuvenescimento	6
2.3	Micropropagação do <i>Eucalyptus</i>	7
2.4	Transformação genética.....	9
3	CONSIDERAÇÕES GERAIS	13
_____	REFERÊNCIAS.....	15
_____	CAPÍTULO 2 Rejuvenescimento <i>in vitro</i> de híbridos naturais de <i>Eucalyptus urophylla</i>	20
1	INTRODUÇÃO.....	21
2	MATERIAL E MÉTODOS	25
2.1	Material vegetal.....	25
2.2	Cultivo <i>in vitro</i>	25
2.2.1	Obtenção de plantas.....	25
2.2.2	Subcultivo e enraizamento <i>in vitro</i>	26
2.3	Aclimatização das plantas	27
2.4	Análises histoquímicas.....	27
3	RESULTADO E DISCUSSÃO	29
3.1	Enraizamento <i>ex vitro</i>	29

3.2	Análise histoquímica.....	31
4	CONCLUSÃO.....	40
	REFERÊNCIAS.....	41
	Capítulo 3 Otimização de um protocolo de transformação genética para <i>Eucalyptus</i> via <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	44
1	INTRODUÇÃO.....	45
2	MATERIAL E MÉTODOS	49
2.1	Material vegetal.....	49
2.2	Cultivo <i>in vitro</i>	49
2.2.1	Obtenção de plantas.....	49
2.3	Processo de transformação.....	50
2.3.1	Plasmídeo.....	50
2.3.2	Transformação bacteriana.....	52
2.3.3	Extração do DNA plasmideal - miniprep.....	52
2.3.4	Digestão e Amplificação	53
2.3.5	Células competentes de <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	54
2.3.6	Transformação das estirpes de <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	55
2.3.7	Crescimento de células bacterianas e condições de cocultivo para transformação via <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	55
2.3.8	Transformação mediada por <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	56
2.4	Expressão do gene <i>gfp</i> e seleção pela PCR das plantas transformadas via <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	57
3	RESULTADO E DISCUSSÃO	59

3.1	Transformação de <i>Escherichia coli</i> , extração do DNA plasmideal e digestão	59
3.2	Transformação das raízes de eucalipto por corte na base da planta e infiltração a vácuo	60
3.3	Triagem molecular das raízes transgênicas.....	62
4	CONCLUSÃO.....	68
	<u>REFERÊNCIAS.....</u>	69

Capítulo 1 Introdução Geral

1 INTRODUÇÃO GERAL

Espécies do gênero *Eucalyptus* são responsáveis pelas maiores áreas de reflorestamento no mundo. Isso se deve ao grande número de espécies desse gênero e à grande plasticidade ecológica, tornando-o matéria-prima de inúmeras indústrias florestais.

O aumento crescente de plantios com espécies do gênero *Eucalyptus* vem despertando a atenção de empresas e de instituições de pesquisa no Brasil. O incremento da área destinada à cultura do eucalipto ocorre à medida que ganhos são alcançados em produtividade florestal, visando atender à crescente demanda por madeira destinada para fins energéticos, produção de celulose, papel e construção civil. Além disso, a espécie é rica em óleos essenciais que são amplamente utilizados nas indústrias farmacêuticas e de perfumaria.

Atualmente, para a propagação vegetativa de *Eucalyptus* spp., utiliza-se a técnica de miniestaquia que é utilizada com êxito na propagação de clones selecionados. As principais vantagens da utilização dessa técnica é a redução da área produtiva (adoção de minijardim), diminuição do período de enraizamento e aclimatização, e principalmente redução de reguladores vegetais para indução do enraizamento. A miniestaquia possibilitou a obtenção de consideráveis ganhos decorrente, principalmente, do aumento dos índices de enraizamento, da redução do tempo para a formação da muda e pela utilização de propágulos com maior grau de juvenilidade.

Apesar das vantagens obtidas com a técnica de miniestaquia, com passar do tempo de cultivo, as plantas matrizes podem perder a juvenilidade levando a produção de miniestacas com baixo potencial de enraizamento ou mesmo a partir de material jovem o enraizamento pode ser baixo para algumas espécies de *Eucalyptus*.

Para as espécies de difícil enraizamento a multiplicação *in vitro*, por meio do subcultivo de meristemas, é uma alternativa viável por proporcionar um maior rejuvenescimento dos clones visando o melhoramento da capacidade de enraizamento.

Aliada à micropropagação, nos últimos anos, a transformação genética em plantas lenhosas tem despertado atenção no setor florestal. A transformação genética pode contribuir significativamente para o desenvolvimento vegetativo do eucalipto por meio da introdução de genes associados a características como teores de celulose e lignina da parede celular, estresses como seca, salinidade, pragas, doenças, entre outras.

A aplicação da biotecnologia, juntamente com a propagação de clones produtivos e em associação ao melhoramento de espécies do gênero *Eucalyptus*, pode levar a um aumento de produtividade, atendendo a uma demanda crescente por produtos florestais de qualidade e baixo custo de produção, proporcionando maior rentabilidade para o produtor.

Sendo assim o objetivo deste trabalho foi verificar a eficiência do cultivo *in vitro* em rejuvenescer dois clones comerciais da empresa V&M Florestal com a finalidade de promover um aumento na taxa de enraizamento e desenvolver um protocolo de transformação genética do híbrido de *Eucalyptus urophylla* via *Agrobacterium rhizogenes*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Importância econômica do eucalipto

O gênero *Eucalyptus*, pertencente à família Myrtaceae, é composto por mais de 700 espécies (SHARMA, 2006). Apesar de ser uma espécie nativa do continente australiano é encontrado em diferentes condições ambientais, sendo muitas espécies e híbridos cultivados em larga escala em várias regiões de clima tropical e subtropical em todo o mundo, incluindo Argentina, Austrália, Brasil, Marrocos, Portugal, África do Sul, Espanha, Estados Unidos e Uruguai (ELDRIDGE et al., 1994).

A atividade florestal no Brasil tem significativa importância econômica e social disponibilizando uma ampla gama de produtos comerciais. A grande versatilidade de usos se deve a diversidade existente entre as espécies fazendo com que o eucalipto apresente características físico-mecânicas que permitam inúmeras utilizações como matéria-prima. Sua madeira é utilizada para a construção, a biomassa para a produção de polpa de celulose e papel e na indústria siderúrgica o carvão vegetal é o mais importante combustível e redutor do minério de ferro (Instituto de Desenvolvimento Integrado de Minas Gerais, INDI, 2006). Há, ainda, uma série de subprodutos destinados à indústria de cosméticos, farmacêutica, dentre outras (BANDYOPADHYAY et al., 1999). Essas características tornam o eucalipto uma espécie tropical de grande importância econômica em âmbito mundial (SARTORETTO et al., 2008).

As indústrias brasileiras que utilizam o eucalipto como matéria-prima para a produção de papel, celulose e demais derivados representam 5% do Produto Interno Bruto, gerando US\$3 bilhões em impostos e US\$16 bilhões em exportações (segundo maior em superávit comercial) e emprega mais de 2 milhões de pessoas (SOCIEDADE BRASILEIRA DE SILVICULTURA, 2010).

A área de plantio com *Eucalyptus* no Brasil totalizou 4.754.334 ha em 2010 e a área cultivada continua em processo de expansão; em 2010 o crescimento apresentado foi de 5,3% o que representa 238.604 ha (ABRAF, 2011). Neste cenário o estado de Minas Gerais é o maior em área de plantio totalizando em 2010 1.400.000 ha (ABRAF, 2011) destinados principalmente à produção de carvão vegetal. Com base nesses dados observa-se a importância do eucalipto por ser uma espécie de uso múltiplo, com possibilidade de atender a todos os segmentos da indústria de base florestal, principalmente para extração de celulose e produção de carvão vegetal onde historicamente tem dado contribuição especial.

Dentre as espécies de eucalipto, as mais utilizadas em plantios comerciais no Brasil são: *E. grandis* (55%), *E. saligna* (17%), *E. urophylla* (9%) e *E. viminalis* (2%). De modo geral os plantios de eucalipto estão concentrados em três espécies: *E. grandis*, *E. saligna* e *E. urophylla*, além do híbrido *E. grandis* x *E. urophylla*, que atende perfeitamente as exigências industriais (SILVA, 2005).

Em se tratando de produtos de florestas plantadas, o Brasil figura como o maior exportador mundial de celulose e fibra de eucalipto, e com base nas expectativas de crescimento de demanda, haverá necessidade significativa de aumento de plantio e produtividade (ABRAF, 2011). Porém, por razões ambientais e empresariais, é necessário que o aumento da produção seja dado mais em função do aumento na produtividade em campo, além do industrial, do que no aumento de área.

Desta forma a biotecnologia pode ser utilizada para obtenção de ganhos em produtividade e sustentabilidade (XAVIER; OTONI, 2009). (GOLLE et al., 2009). As técnicas biotecnológicas, como a cultura de tecidos, utilização de marcadores moleculares e transformação genética, unem-se ao melhoramento

convencional, permitindo a obtenção de genótipos mais produtivos e competitivos (SARTORETTO et al., 2008).

2.2 Produção comercial de mudas e rejuvenescimento

A produção comercial de mudas de *Eucalyptus*, a partir de genótipos superiores, tem sido baseada no enraizamento de estacas, no qual a técnica de miniestaquia tem se tornado uma importante ferramenta para aumentar a competitividade entre as empresas florestais, transformando os ganhos genéticos em benefícios para a indústria (ASSIS et al., 2004).

A miniestaquia pode ser considerada uma especialização da estaquia convencional e consiste na utilização de brotações de plantas propagadas pelo processo de estaquia ou mudas produzidas por sementes (FERRIANI et al., 2010). O interesse na introdução da miniestaquia para diversas espécies se relaciona à redução da área produtiva (adoção do minijardim), diminuição do período de enraizamento e aclimação, e principalmente na redução de reguladores vegetais para indução do enraizamento (HIGASHI et al., 2000; XAVIER et al., 2003; WENDLING et al., 2005; FERRIANI et al., 2010).

O desenvolvimento da técnica teve início na década de 90 para o gênero *Eucalyptus* (HIGASHI et al., 2000). Sua aplicação tem possibilitado a propagação de genótipos de difícil enraizamento, com ampliação da porcentagem de miniestacas enraizadas e melhoria do sistema radicial, influenciando diretamente o desempenho de mudas em campo (ALFENAS et al., 2004).

A propagação de eucalipto por miniestaquia tem se mostrado um método eficiente para obtenção de material homogêneo, com características genéticas desejáveis, produzido a partir de plantas matrizes selecionadas. A miniestaquia é uma técnica de propagação vegetativa cujo princípio é o aproveitamento do

potencial juvenil dos propágulos para indução do enraizamento. Entretanto, apesar da juvenildade do material vegetativo, alguns clones podem apresentar uma pequena taxa de enraizamento (FERRIANI et al., 2010).

Segundo Titon (2001) a dificuldade de enraizamento de certos clones na cultura do eucalipto por meio da miniestaquia é atribuída à maturação do material vegetal, levando à adoção de técnicas de reversão ao estado juvenil mediante a utilização da micropropagação.

Para o rejuvenescimento de espécies florestais a micropropagação tem sido considerada a técnica mais eficiente, mas seu uso ainda é limitado pela falta de domínio da técnica (WENDLING; XAVIER, 2001). Segundo Borém (2007) quando se visa o aumento da capacidade de enraizamento a partir do rejuvenescimento de clones selecionados na idade adulta é recomendado no mínimo 12 subcultivos na fase de multiplicação.

Por ser um método de propagação vegetativa a micropropagação permite manter as características da planta matriz possibilitando a clonagem de espécies que não se propagam facilmente. Desta forma a otimização do processo de micropropagação também tem como vantagem o incremento acelerado do número de plantas derivadas de determinado genótipo o que ocasiona uma redução do tempo de multiplicação, possibilitando clonar grande quantidade de plantas em uma área reduzida e com maior controle sobre a sanidade do material que se propaga (MROGINSKI; ROCA, 1996).

2.3 Micropropagação do *Eucalyptus*

Dentre as várias técnicas de propagação *in vitro*, atualmente, a micropropagação tem sido aquela de maior interesse científico. Entre as aplicações na área florestal destacam-se aquelas relacionadas com a conservação de germoplasma *in vitro*, aceleração dos programas de melhoramento pela

multiplicação de clones superiores, rejuvenescimento de clones selecionados, obtenção de sementes sintéticas (embriões somáticos) e limpeza clonal. Os benefícios também estão relacionados à obtenção de culturas livres de microrganismos patogênicos visando atender à demanda por um processo de propagação clonal sustentável, pela possibilidade de patenteamento de processos/ materiais obtidos por meio da biotecnologia e pelo processo servir como base para outras técnicas biotecnológicas como a transformação genética (XAVIER; WENDLING; SILVA, 2009).

Em espécies florestais inúmeros trabalhos têm sido desenvolvidos no intuito de tornar esta tecnologia acessível e economicamente viável. No entanto algumas desvantagens e dificuldades são encontradas durante o processo como: a necessidade de desenvolvimento de protocolos otimizados para diferentes espécies ou grupos de clones e a recalcitrância das culturas à propagação *in vitro* de espécies lenhosas (XAVIER; OTONI; PENCHEL, 2007). Além desses fatores, devido ao fato das espécies florestais serem relativamente pouco domesticadas, avanços biotecnológicos relativos à propagação *in vitro* têm sido pouco expressivos se comparados com outras culturas de expressão agrícola. Entretanto é reconhecido o grande potencial de impacto da utilização desta biotecnologia na silvicultura clonal e na indústria de base florestal (PENCHEL; OTONI; XAVIER 2007; XAVIER; WENDLING; SILVA, 2009).

A multiplicação e enraizamento de plântulas *in vitro* são processos que necessitam de estudos minuciosos no que diz respeito à adequação de protocolos específicos para cada espécie em estudo. Na micropropagação de eucalipto não é diferente, para cada espécie ou clone estudado há a necessidade de se adequar protocolos de estabelecimento, multiplicação e enraizamento para que se obtenha uma planta com qualidade fitossanitária e com características adaptativas vantajosas que propiciem um bom desenvolvimento *in vivo* após o processo de aclimatização.

A etapa de multiplicação consiste em se estimular a brotação seriada de um explante, geralmente, um tecido com características meristemáticas, visando à obtenção do maior número possível de brotos. Estes, por sua vez, passarão por posterior processo de rizogênese.

A obtenção de uma plântula com um sistema radicular bem desenvolvido é de grande importância para a sua sobrevivência e crescimento nas novas condições ambientais. O propósito da rizogênese é a formação de raízes adventícias nas partes aéreas obtidas no estágio de multiplicação, o que permite a constituição de plantas completas, para posterior aclimatização.

2.4 Transformação genética

No intuito de atender à demanda do setor florestal a transformação genética em plantas lenhosas tem despertado atenção. A transformação genética de *Eucalyptus* tem sido o objeto de estudos de vários grupos de pesquisa nos últimos anos, tanto no setor público como no privado (GIRIJASHANKAR, 2011).

Normalmente a transformação genética utiliza duas estratégias para realizar a transferência de genes para plantas: forma direta ou indireta. Na transferência direta o principal método é o da biobalística e na transferência indireta utilizam-se bactérias como vetor para promover a transferência do gene. Algumas espécies de bactérias são capazes de transferir genes para plantas superiores (BROOHAERTS et al. 2005) entre elas os principais vetores utilizados são *Agrobacterium tumefaciens* e *Agrobacterium rhizogenes*.

Agrobacterium tumefaciens é o agente causal da galha-da-coroa, doença que afeta a maioria das plantas dicotiledôneas e caracteriza-se pelo crescimento de tumores na junção entre o caule e a raiz (coroa). A formação desses tumores é o resultado de um processo natural de transferência de genes de *Agrobacterium*

spp. para o genoma da planta infetada. As células vegetais infectadas por *A. tumefaciens* adquirem a propriedade de multiplicarem-se de maneira autônoma sem a necessidade de estímulos externos (ANDRADE; SARTORETTO; BRASILEIRO, 2003). Várias cepas de *A. tumefaciens* foram utilizadas em trabalhos de transformação genética de espécies de *Eucalyptus*, dentre essas pode-se destacar a cepa LBA 4404 (PRAKASH; GURUMURTHI, 2009; GONZÁLEZ et al, 2002) na transformação de *E. tereticornis* e de híbridos de *E. grandis* x *E. urophylla*; EHA 101 (KAWAZU, 2003) na transformação de *E. camaldulensis*, EHA 105 (CHANG et al., 2006; DIBAX, et al., 2010) na transformação de *E. saligna*, *E. grandis*, *E. dunnii*, *E. urophylla* e híbridos de *E. grandis* x *E. urophylla* e AGL1 (HARCOURT et al., 2000; NAVARRO et al., 2011) na transformação de *E. camaldulensis* e de híbridos de *E. grandis* x *E. urophylla*.

A *Agrobacterium rhizogenes* é uma bactéria de solo que infecta os tecidos da planta e leva a formação de raízes adventícias chamadas de “raiz em cabeleira”. Diversas espécies de plantas são susceptíveis à infecção por *A. rhizogenes* e alguns trabalhos sugerem o uso de *A. rhizogenes* para a transformação genética em plantas susceptíveis (BROOHTHAERTS et al., 2005).

Durante o processo de transformação genética a infecção por *A. rhizogenes* é seguida pela transferência, integração e expressão do T-DNA (TR-DNA, TL-DNA) do plasmídeo Ri com a subsequente formação do fenótipo de raiz em cabeleira (GRANT; DOMMISSE; CONNER, 1991). *In vitro*, as raízes em cabeleira são facilmente distinguíveis pelo seu crescimento rápido por serem altamente ramificadas e pelo crescimento radicular plagiotrópico (CHRISTEY, 2001). As mudanças fenotípicas características são devido, predominantemente, ao TL-DNA (TAYLOR et al., 1985) uma vez que esta região possui os locos (*rolA*, B, C, D) envolvidos na formação de raiz em cabeleira (WHITE et al., 1985; CHRISTEY, 2001). O TR-DNA contém genes (*aux1*, *aux2*, *rolB* TR,

mas1, *mas2* e *ags*) para a síntese de agropina e biossíntese de auxina (Van der SALM; HANISCH ten CATE ; DONS, 1996).

O método de transformação mediado por *A.rhizogenes* foi utilizado para manipulação genética de plantas com diversas finalidades como: produção de raízes com potencial fitoquímico em *Solanum nigrum* (SHANKS; MORGAN, 1999), produção de metabólicos secundários em raízes de *Panax* sp. (CHOI et al., 2000), fitorremediação em raízes de *Thlapsi caerulescens* (NEDELKOSKA; DORAN, 2000), tolerância ao estresse hídrico em *Coffea arabica* (STEIN, 2009), dentre outras. Existem poucos relatos na literatura sobre a transformação genética de espécies do gênero *Eucalyptus* via *A. rhizogenes* e os trabalhos descritos na literatura se limitam a testes de protocolo (MACHADO et al., 1997) e transformação em espécies de eucalipto de difícil enraizamento (MACRAE; STADEN, 1993).

Muitos autores sugerem que o sucesso da transformação genética de plantas por *A. rhizogenes* depende tanto da construção quanto da interação entre a cepa bacteriana e a planta (CHRISTEY, 2001). Outros fatores como o genótipo e o tipo de ferimento provocado no tecido da planta, síntese de indutores fenólicos, fixação da bactéria na planta, transferência do T-DNA para o citoplasma da planta, translocação do T-DNA para o núcleo e integração deste podem ser limitantes para o processo de transformação genética (GELVIN, 2000).

A eficiência da transformação pode ser aumentada pelo uso de linhagens de *Agrobacterium* altamente virulentas (HANSEN; WRIGHT, 1999), pela indução de ferimentos nos tecidos a serem transformados e pela adição de compostos fenólicos como a acetoseringona.

Com a finalidade de aumentar a eficiência da transformação genética, a infecção do explante pode ser realizada por meio do corte na base das microestacas com lâmina infectada por bactéria (STEIN, 2009). Outro método

que objetiva aumentar a eficiência da transformação é a utilização da infiltração a vácuo. Este tratamento elimina o ar existente nos espaços intercelulares e ajuda a penetração das bactérias nos tecidos (QUOIRIN; QUISEN, 2006). Esse método foi utilizado para transformação de espécies como *Musa acuminata* cv. “Grand Nain” (ACERETO-ESCOFFIE' et al., 2005) e *Coffea canephora* (CANCHE-MOO et al., 2006), no qual os autores inocularam os explantes em solução bacteriana e submeteram a infiltração a vácuo a 400 mmHg por 4 minutos.

Com a finalidade de avaliar a eficiência do processo de transformação, plantas transgênicas podem ser detectadas baseadas na expressão de genes repórteres que codificam proteínas facilmente detectáveis. Dentre os genes repórteres, os mais utilizados são: gene *uidA*, isolado de *Escherichia coli*, codifica para a β -glucuronidase (GUS) que pode ser detectada por métodos histoquímicos; gene *gfp*, isolado da medusa *Aequorea victoria*, codifica para “green fluorescent protein” (GFP); gene *luc*, isolado do vagalume *Photinus pyralis*, codifica para a luciferase. Em espécies florestais, os genes repórteres mais utilizados são: o gene *uidA* (JEFFERSON; KAVANAGH; BEVAN, 1987) e o gene *gfp* (CHALFIE et al., 1994; ALCANTARA, 2008). A proteína codificada pelo gene *gfp* pode ser facilmente detectada a olho nu, sem necessidade de substrato ou marcações adicionais, pela excitação por luz UVA na faixa de 395 a 470 nm, emitindo uma fluorescência verde (509 nm) *in vivo*.

3 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Atualmente várias empresas do setor florestal possuem clones altamente produtivos que apresentam baixa taxa de enraizamento quando introduzidos no viveiro comercial. A dificuldade de enraizamento das mudas pode ocorrer devido ao envelhecimento do material vegetal por barreiras anatômicas ou pela presença de substâncias inibidoras do enraizamento.

A empresa V&M Florestal possui clones do seu programa de melhoramento, como os híbridos naturais de *Eucalyptus urophylla* (VM 02 e VM 04) que são produtivos, mas apresentam baixa taxa de enraizamento no viveiro.

Os clones VM 02 e VM 04 possuem IMA (Incremento Médio Anual) de 40 m³ e densidade básica da madeira de 530 kg.m⁻³ e 580 kg.m⁻³ respectivamente. Além disso, o clone VM 04 mostra-se tolerante ao déficit hídrico. No entanto, quando esses clones foram introduzidos no viveiro comercial apresentaram baixa taxa de enraizamento (VM 04 com valores variando de 40 a 60 % de enraizamento e o VM 02 com valores inferiores).

No sentido de aumentar a taxa de enraizamento desses clones, a cultura de tecidos por meio do subcultivo *in vitro* foi utilizada para promover o rejuvenescimento das plantas, retomando a capacidade de enraizamento das mudas. Apesar do número de subcultivos necessários para o rejuvenescimento *in vitro* ser variável de acordo com a espécie e demandar um tempo considerável este trabalho é justificado pelas características vantajosas que eles possuem.

Outra técnica biotecnológica capaz de contribuir para o sucesso dos plantios florestais é a transformação genética de plantas. A transformação genética pode ser realizada de forma direta ou indireta, sendo que dentre os métodos, a transformação indireta via *Agrobacterium* é a mais utilizada para dicotiledôneas de um modo geral. Em trabalhos cujo objetivo é produzir plantas

apenas com raízes transgênicas a transformação via *Agrobacterium rhizogenes* é utilizada. Por meio desta técnica é produzida uma planta quimérica, com raízes transgênicas e parte aérea normal. Entretanto, para que se tenha sucesso no processo de transformação a etapa primordial é a otimização de um protocolo que permita a obtenção de um grande número de plantas transformadas. Sendo assim, neste trabalho, objetivou-se desenvolver uma metodologia eficiente para transformação de raízes de eucalipto que poderá ser utilizada em trabalhos futuros de transformação genética utilizando genes de interesse como os genes *SHN* e *DREB* que conferem a característica de tolerância ao déficit hídrico.

REFERÊNCIAS

- ACERETO-ESCOFFIE', P. O. M. et al. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Musa acuminata* cv. "Grand Nain" scalps by vacuum infiltration. **Scientia Horticulturae**, [S.l.], v. 105, p. 359–371, 2005.
- ALCANTARA, G. B. **Transformação genética de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* com o gene *gfp* sob controle de promotores *CBFS* induzidos pelo frio**. 2008. 141 p. Tese (Doutorado em Agronomia/Produção Vegetal) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.
- ANDRADE, G. M.; SARTORETTO, L. M.; BRASILEIRO, A. C. M. Biologia Molecular do Processo de Infecção por *Agrobacterium* spp. **Fitopatologia Brasileira**, [S.l.], v. 28, p. 465-476, 2003.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTORES DE FLORESTAS PLANTADAS – ABRAF. **Anuário estatístico da ABRAF**: ano base 2011. Brasília, DF: ABRAF, 2011. 120 p. Disponível em: <<http://www.abraflor.org.br/estatisticas/ABRAF09-BR.asp>>. Acesso em: 9 nov. 2011.
- ASSIS, T. F.; FETT-NETO, A. G.; ALFENAS, A. C. Current techniques and prospects for the clonal propagation of hardwood with emphasis on *Eucalyptus*. In: WALTER, C.; CARSON, M. (Ed.) **Plantation forest biotechnology for the 21th century**. New Delhi, Índia, Research sign Post, v. 1, p. 303-333, 2004.
- BANDYOPADHYAY, S. et al. Efficient plant regeneration from seedling explants of two commercially important temperate eucalypt species *Eucalyptus nitens* and *Eucalyptus globulus*. **Plant Science**, Philadelphia, v. 140, n. 2, p. 189-198, 1999.
- BORÉM, A. **Biotechnology florestal**. Viçosa, MG: UFV, 2007.
- BROOThAERTS, W. et al. Gene transfer to plants by diverse species of bacteria. **Nature**, [S.l.], v. 433, p. 629-633, 2005.
- CANCHE-MOO, R. L. R. et al. Genetic transformation of *Coffea canephora* by vacuum infiltration. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, [S.l.], v. 84, p. 373–377, 2006.

CHALFIE, M. et al. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. **Science**, [S.l.], v.263, p. 802-805, 1994.

CHANG, S. et al. Eucalyptus urophylla transformation and selection. United States patent US 20060101537 A1, 2006 May 11 .

CHOI, Sung Mee. Pilot-scale culture of adventitious roots of ginseng in a bioreactor system. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, [S.l.], v. 62, n. 3, p. 187-193, 2000.

CHRISTEY, M. C. Invited Review: Use of Ri-mediated transformation for productions of transgenic plants. **In vitro Cell. Dev. Biol.-Plant**, [S.l.], v. 37, p. 687-700, 2001.

DIBAX, R. et al. Organogenesis and Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of *Eucalyptus saligna* with P5CS gene. **Biol Plant**, [S.l.], v. 54, n. 1, p. 6–12, 2010.

ELDRIDGE, K. et al. ***Eucalyptus domestication and breeding***. New York: Oxford University, 1994. 228 p.

FERRIANI, A. P; ZUFFELLATO-RIBAS, K. C; WENDLING, I. Miniestaquia aplicada a espécies florestais. **Revista Agro@mbiente On-line**, v. 4, n. 2, p. 102-109, 2010. Disponível em:
<<http://ufir.br/revista/index.php/agroambiente/article/viewFile/363/300>>.
Acesso em: 25 nov. 2011.

GELVIN, S. B. *Agrobacterium* and plant genes involved in T-DNA transfer and integration. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, [S.l.], v. 51, p. 223-256, 2000.

GIRIJASHANKAR, V. Genetic transformation of eucalyptus. **Physiol Molecular Biology Plants**, [S.l.], v. 17, n. 1, p. 9-23, 2011.

GONZÁLEZ, E.R. et al. Production of transgenic *Eucalyptus grandis* × *E. urophylla* using the sonication-assisted *Agrobacterium* transformation (SAAT) system. **Funct Plant Biol**, [S.l.], v. 29, n. 1, p. 97–102, 2002.

GOOR, A. Y.; BARNEY, C. W. **Special plantations**. New York: The Ronald Company, 1968. cap. 5, p. 213-271.

GRANT, J. E.; DOMMISSE, E. M.; CONNER, A. J. Gene transfer to plants using *Agrobacterium*. Murray DR, ed. 1991. **Advanced Methods324 BIRCH in Plant Breeding and Biotechnology**. Wallingford, Engl: CAB Int, p.50-73.

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

HARCOURT RL, K. J. et al. Insect- and herbicide-resistant transgenic eucalyptus. **Mol Breed**, [S.l.], v. 6, p. 307–315, 2000.

HIGASHI, E. N.; SILVEIRA, R. L. V. A.; GONÇALVES, A. N. Propagação vegetativa de *Eucalyptus*: princípios básicos e sua evolução no Brasil, **Circular Técnica IPEF**, n. 192, São Paulo: Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais, 2000, 11p.

INSTITUTO DE DESENVOLVIMENTO INTEGRADO DE MINAS GERAIS - **INDI**. 2006. Disponível em: <http://www.mdic.gov.br/sistemas_web/renai/public/arquivo/arq1272637416.pdf>. Acesso em 27 dez. 2006.

JEFFERSON, R. A.; KAVANAGH, T. A.; BEVAN, M. W. GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. **EMBO Journal**, [S.l.], v. 6, p. 3901-3907, 1987.

KAWAZU, T. Process for transformation of mature trees of eucalyptus plants. United States patent US 6563024. 2003 May 13.

MACHADO, L. O. R. et al. *Agrobacterium* strain specificity and shooty tumour formation in eucalypt (*Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*). **Plant Cell Reports**, [S.l.], v. 16, p. 299-303, 1997.

MACRAE, S.; STADEN, J. V. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation to improve rooting ability of eucalypts. **Tree Physiology**, [S.l.], v. 12, p. 411-418, 1993.

MROGINSKI, L. A.; ROCA, W. M. Micropropagación de la yerba mate (*Ilex paraguariensis* St.Hil): efecto del origen del explante en el establecimiento *in vitro* de los cultivos. **Phyton**, Buenos Aires, v. 59, n. 1/2, p. 161-170, 1996.

NAVARRO, M. et al. Two EuguCBF1 genes overexpressed in *Eucalyptus* display a different impact on stress tolerance and plant development. **Plant Biotechnology Journal**, [S.l.], v. 9, p. 50-63, 2011.

NEDELKOSKA, Tatjana V.; DORAN, Pauline M. Hyperaccumulation of cadmium by hairy roots of *Thlapsi caerulescens*. **Biotechnology and Bioengineering**, [S.l.], v. 67, n. 5, p. 607-615, 2000.

PENCHEL R. M., OTONI, W. C., XAVIER, A. Tecnologia de biorreatores e propagação in vitro. In: BORÉM (Ed). **Biociencia Florestal**, Viçosa: UFV. 2007. p. 75-92.

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**, [S.l.], v. 45, p. 429-434, 2009.

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

SARTORETTO, M. L. Transformação genética: estratégias e aplicações para o melhoramento genético de espécies florestais. **Ciência Rural**, [S.l.], v. 38, n. 3, p. 861-871, 2008.

SHANKS, J. V.; MORGAN. J. Plant ‘hairy root’ culture. **Current Opinion in Biotechnology**, [S.l.], v. 10, n. 2, p. 151-155, 1999.

SHARMA, J. **Development of Biotechnological Tools for the Genetic Improvement of selected elite clones of Eucalyptus tereticornis Sm.** Dissertatinon (2006) Thapar Institute of Engineering and Technology.

SILVA, J. C. Cresce presença de eucalipto no Brasil. **Revista da Madeira**, [S.l.], n. 92, ano15, 2005.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE SILVICULTURA. As plantações de eucalipto no Brasil. 2010. Disponível em: <http://www.sbs.org.br/destaques_plantacoesnobrasil.htm>. Acesso em: 27 jun. 2011.

STEIN, V. C. **Biotechnological approaches to improve drought tolerande of Coffea arabica**. 2009. 97 p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

TAYLOR, B. H. et al. **Mol Gen Genet**, [S.l], v. 201, p.554-557, 1985.

TITON, M. **Propagação clonal de *Eucalyptus grandis* por miniestaquia e microestaquia**. 2001. 65 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2001.

VAN der SALM, T. P. M.; HANISCH ten CATE, C. H.; DONS, H. J. M. Prospects for applications of *rol* genes for crop improvement. **Plant Molecular Biology Reports**, [S.l], v. 14, p. 207-228, 1996.

XAVIER, A.; OTONI, W. C. Aplicações da micropropagação na clonagem de *Eucalyptus* no Brasil. **Agronomía Costarricense**, [S.l], v. 33, n. 2, p. 303-307, 2009.

XAVIER, A.; OTONI, W. C.; PENCHEL, R. M. Micropropagação e enxertia in vitro de espécies florestais. In: BORÉM, A. (ed.) **Biotechnologia florestal**. Viçosa, 2007. p. 55-74.

XAVIER, A.; SANTOS, G. A.; OLIVEIRA, M. L. Enraizamento de miniestaca caulinar e foliar na propagação vegetativa de cedro-rosa (*Cedrela fissilis* Vell.), **Revista Árvore**, Viçosa, v. 27, n.3, p.351-356, 2003b.

XAVIER, A.; WENDLING, L.; SILVA, R. L. **Silvicultura clonal**: princípios e técnicas. Viçosa, MG: Ed. UFV, 2009. 272 p.

WENDLING, I.; FERRARI, M. P.; DUTRA, L. F. Produção de mudas de corticeira-do-mato (*Erythrina falcata* Bentham) por miniestaquia a partir de propágulos juvenis, **Comunicado Técnico Embrapa Florestas**, Colombo, n.130, Outubro, 2005.

WENDLING, I.; XAVIER, A. Gradiente de maturação e rejuvenescimento aplicado em espécies florestais. **Floresta e Ambiente**, [S.l], v. 8, n. 1, p. 187-194, 2001.

WHITE, F. F. et al. Molecular and genetic analysis of the transferred DNA regions of the root-inducing plasmid of *Agrobacterium rhizogenes*. **J. Bacteriol**, [S.l], v. 164, p. 33-44, 1985.

CAPÍTULO 2 Rejuvenescimento *in vitro* de híbridos naturais de *Eucalyptus urophylla*

RESUMO

Na clonagem de *Eucalyptus* o rejuvenescimento das plantas utilizando a técnica de micropropagação tem como principal objetivo aumentar a taxa de enraizamento das mudas originadas dos clones de difícil enraizamento. A redução da taxa de enraizamento das miniestacas ocorre principalmente devido ao envelhecimento das matrizes, presença de barreiras anatômicas e/ou pela presença de substâncias inibidoras. Desta forma este trabalho teve por objetivo verificar a eficiência do rejuvenescimento *in vitro* no aumento da taxa de enraizamento de dois híbridos naturais (VM 02 e VM 04) de *Eucalyptus urophylla* do programa de melhoramento da empresa V&M Florestal. O cultivo *in vitro* teve início a partir de 200 regiões meristemáticas de cada clone. Os meristemas foram excisados, desinfestados com paraformaldeído e inoculados em meio de cultura. As plantas originadas desses meristemas foram denominadas de geração 1 (G1) e quando atingiram 3 cm de altura, 100 meristemas foram isolados, inoculados em meio de cultura e as plantas originadas desse segundo subcultivo foram denominadas de geração 2 (G2). Cem plantas originadas da (G1) foram inoculadas em meio de cultura de enraizamento onde permaneceram por 30 dias. Após este período, as plantas foram aclimatizadas e utilizadas para produção de mudas *ex vitro*. Este processo foi repetido até que as mudas atingissem uma taxa de enraizamento *ex vitro* maior que 80%. Foi possível observar que para o clone VM 02 foram necessários três subcultivos *in vitro* para proporcionar o aumento na taxa de enraizamento *ex vitro* e para o clone VM 04 apenas um cultivo *in vitro* proporcionou o aumento na taxa de enraizamento. Após o estabelecimento do número de subcultivos necessários para promover o rejuvenescimento dos clones VM 02 e VM 04 a relação do enraizamento com a presença de amido e compostos fenólicos na base das miniestacas foi avaliada por meio de análises histoquímicas. Foi observado que as plantas das gerações que não enraizavam apresentavam um maior número de grãos de amido nas células do parênquima cortical e medular e uma maior quantidade de compostos fenólicos. A partir dos dados obtidos foi possível concluir que o rejuvenescimento *in vitro* é um fator determinante para o enraizamento de miniestacas dos clones VM 02 e VM 04 e que o amido e os compostos fenólicos estão diretamente relacionados com o enraizamento desses clones.

Palavras-chave: Produção de mudas. V&M Florestal. Amido. Compostos fenólicos.

ABSTRACT

In cloning of *Eucalyptus*, plant rejuvenation using micropropagation aims to increase the rooting rate of the sprouts originated from clones that hardly root. The reduction of the mini-cuttings rooting rate occurs mainly due to the aging of matrixes, the presence of anatomic barrier or the presence of inhibitory substances. Thus, this study aimed to verify the efficiency of rejuvenation *in vitro* to increase rooting rate of two natural hybrids (VM 02 and VM 04) of *Eucalyptus urophylla* from the “V&M Florestal” program of improvement. The cultivation *in vitro* began with 200 meristematic areas of each clone. The meristems were excised, disinfested with paraformaldehyde and inoculated in culture media. The plants originated from these meristems were called Generation 1 (G1) and when they reached 3 cm in height, 100 meristems were isolated, inoculated in culture media and the plants originated from this second subculture were denominated Generation 2 (G2). A hundred plants originated from (G1) were inoculated in rooting culture media, where they were kept for 30 days. After this period, the plants were acclimatized and used to produce sprouts *ex vitro*. We repeated this process until the moment when the sprouts reached a rooting rate *ex vitro* higher than 80%. It was possible to observe that, for clone VM 02, three subcultures *in vitro* were necessary to provide an increase on the rooting rate *ex vitro*, while for clone VM 04, only one subculture was enough to provide this increase. After establishing the necessary number of subcultures to provide rejuvenation to clones VM 02 and VM 04, the relation between rooting and presence of starch and phenolic compounds in the base of the mini-cuttings was evaluated by means of histochemical analysis. It was observed that the plants of the generation that did not root contained a higher number of starch grains in the cortical and medullar parenchyma and a higher quantity of phenolic compounds. From these data, it was possible to conclude that rejuvenation *in vitro* is a determining factor for the rooting of mini-cuttings VM 02 and VM 04 and that the amount of starch and phenolic compounds is directly related to the rooting of these clones.

Keywords: Sprouts production, V&M Florestal, starch, phenolic compounds.

1 INTRODUÇÃO

Em silvicultura, a propagação vegetativa é amplamente utilizada para multiplicar plantas-elite obtidas em programas de cruzamentos ou selecionadas a partir de populações naturais, sendo etapa essencial na propagação de espécies lenhosas economicamente importantes (CUNHA et al., 2009).

O sistema de clonagem de *Eucalyptus* é baseado no enraizamento de miniestacas obtidas a partir de genótipos superiores e, dessa forma, a propagação vegetativa tem se tornado uma importante ferramenta para aumentar a produtividade das florestas, transformando os ganhos genéticos em benefícios para a indústria (ASSIS; FETT-NETO; ALFENAS, 2004). Porém, mesmo a partir da propagação de material jovem, pela técnica de miniestaquia, o enraizamento pode ser baixo para algumas espécies de *Eucalyptus* (XAVIER; COMÉRIO, 1996) em razão do acúmulo de inibidores de enraizamento.

Assim a importância de se conhecer a presença de barreiras anatômicas e os efeitos dos fatores que afetam a formação das raízes e suas implicações passa a ser crucial para o sucesso da produção de mudas via enraizamento adventício. Mokotedi et al. (2000) afirmam que o enraizamento adventício é genótipo-dependente, de forma que diferentes espécies, híbridos e mesmo diferentes clones da mesma espécie podem requerer diferentes condições de cultivo.

O rejuvenescimento ou revigoramento de tecidos adultos pode ser obtido via micropropagação por sucessivos subcultivos *in vitro* (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Assis e Mafía (2007) relatam que o subcultivo sucessivo de tecidos adultos melhora o enraizamento. Complementam, ainda, que a micropropagação promove a homogeneização fisiológica dos tecidos, seja em potencial de enraizamento ou qualidade do sistema radicular. Desta forma, o

aumento do número de subcultivos no cultivo *in vitro* de eucalipto restaura as características juvenis aumentando o potencial de enraizamento (ASSIS, 1996).

Diante do exposto o objetivo deste trabalho foi verificar a eficiência do rejuvenescimento *in vitro* no aumento da taxa de enraizamento *ex vitro* de dois clones de híbridos naturais de *Eucalyptus urophylla*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi conduzido de outubro de 2009 a junho de 2011. Os experimentos de cultivo *in vitro* foram realizados no Laboratório Central de Biologia Molecular (LCBM) da Universidade Federal de Lavras (UFLA), MG. A aclimatização das plantas e cultivo *ex vitro* foram conduzidos no viveiro comercial, de mudas clonadas de eucalipto, da empresa Pró Mudas, localizado no município de Lavras, MG.

2.1 Material vegetal

Para execução deste trabalho foram utilizados dois clones comerciais de híbridos de naturais de *Eucalyptus urophylla* denominados VM 02 e VM 04 pertencentes ao programa de melhoramento da empresa V&M Florestal. Os clones foram propagados vegetativamente a partir da técnica de miniestaquia convencional com manejo e nutrição de acordo com os procedimentos adotados pelo viveiro.

2.2 Cultivo *in vitro*

2.2.1 Obtenção de plantas

Para obtenção e cultivo das plantas tanto *in vitro* quanto *ex vitro* a mesma metodologia foi adotada para os dois híbridos.

Plantas matrizes dos clones VM 02 e VM 04 fornecidas pela empresa foram denominados de viveiro 02 e viveiro 04. Brotações dessas matrizes tiveram os ápices excisados e levados para câmara de fluxo laminar onde foram desinfestados com pastilha de paraformoldeído durante 40 minutos. Após a

desinfestação, duzentas regiões meristemáticas de cada clone foram isoladas com auxílio de lupa estereoscopia Zeiss e inoculadas em pote contendo meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962). Após inoculação, os potes contendo os meristemas foram mantidos por 5 dias no escuro para evitar oxidação e posteriormente foram transferidos para sala de crescimento nas condições de fotoperíodo de 16 h, irradiância de $40 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ fornecida por luz branca fria e temperatura de $26\pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$.

Após o estabelecimento dos meristemas *in vitro* estes foram transferidos para meio de cultura de multiplicação (LCBM-M) e os explantes originados desse cultivo foram denominados de Geração 1 (G1 02 e G1 04).

2.2.2 Subcultivo e enraizamento *in vitro*

O primeiro subcultivo (G1) foi mantido em meio de multiplicação até que os explantes atingissem aproximadamente 3 cm de altura. A partir desses explantes duzentos meristemas foram isolados, utilizando-se lupa estereoscopia Zeiss e cultivados nas mesmas condições descritas no item 2.2.1. Essa geração foi denominada de Geração 2 (G2 02 e G2 04) e esse procedimento foi repetido para que fossem obtidas as próximas gerações. Os subcultivos tiveram intervalo de 6-8 semanas para que as brotações atingissem 3 cm de altura.

Das brotações originadas em cada geração de subcultivo, cem foram isoladas e inoculadas em meio de cultura de enraizamento (LCBM-E), permanecendo por 30 dias em sala de cultivo sob fotoperíodo de 16 h, com irradiância de $40 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ fornecida por luz branca fria e temperatura de $26\pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$.

2.3 Aclimatização das plantas

Todas as plantas cultivadas em meio de cultura de enraizamento foram transferidas para tubos de polietileno de 56 cm³ contendo substrato comercial de enraizamento. Após o plantio, os tubetes contendo as mudas foram transferidos para casa de vegetação e mantidos em condições de aproximadamente 90% de umidade relativa do ar, temperatura média de 31°C, sob um sistema de nebulização automático ativado a cada 5 minutos. No final do período de 21 dias, as plantas foram transferidas para casa de sombra, mantidas em condições de 50% de sombreamento fornecido por tela sombrite e sob um sistema de nebulização, onde permaneceram por 7 dias. Após esse período, as plantas sobreviventes foram consideradas aclimatizadas.

Após a aclimatização as plantas foram cultivadas no minijardim clonal do viveiro sob as condições de fertirrigação ideais para a formação de matrizes.

O estaqueamento das miniestacas provenientes das matrizes de diferentes gerações de subcultivo foi realizado mensalmente, utilizando-se os mesmos padrões adotados no viveiro, até que a porcentagem de enraizamento fosse maior que 80%, sendo esta taxa considerada satisfatória em viveiros comerciais.

2.4 Análises histoquímicas

Após o estabelecimento do número de subcultivos necessários para promover o rejuvenescimento do clone VM 02 e do clone VM 04 a relação do enraizamento com a presença de amido e compostos fenólicos na base das miniestacas foi avaliada por meio de análises histoquímicas.

Para estas análises cepas padronizadas com aproximadamente 10 cm de comprimento do clone VM 02 (viveiro, G1, G2, G3 e G4) e do clone VM 04

(viveiro, G1, G2, e G3) foram coletadas (Figura 1A) e amostras da base das estacas, contendo aproximadamente 1 cm de comprimento, foram fixadas em etanol 70%. Após a remoção das bases, as cepas foram plantadas em tubete contendo substrato comercial para enraizamento (Figura 1B) e mantidas em casa de vegetação nas mesmas condições descritas no item 2.3 onde permaneceram por 21 dias.

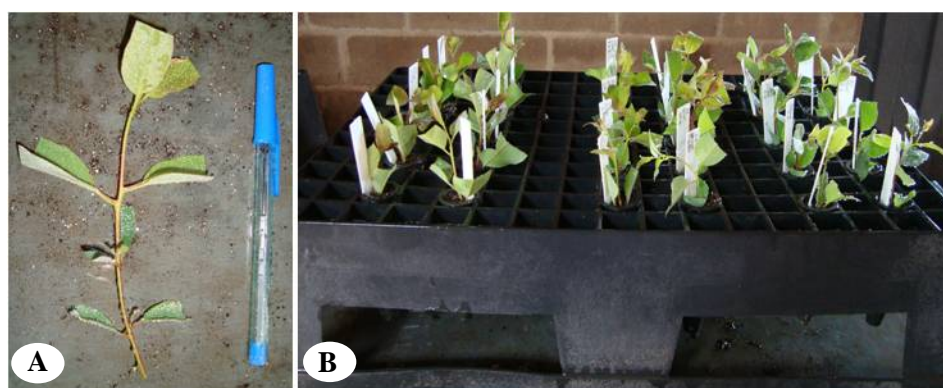


Figura 1 Aspecto visual da miniestaca do híbrido natural de *Eucalyptus urophylla* (A). Miniestacas dos clones VM 02 e VM 04 plantadas em tubete (B).

Para os testes histoquímicos foram realizados cortes transversais nas estacas com auxílio de um micrótomo de mesa. Os cortes foram corados com corantes específicos e fixados em lâmina contendo glicerina 50%. Para a identificação de compostos fenólicos foi utilizado a solução de cloreto férrico segundo Johansen (1940) e para a identificação de amido foi utilizado o reagente de lugol segundo Jensen (1962). Foram confeccionadas lâminas semipermanentes imediatamente fotografadas após a coloração em microscópio óptico Zeiss acoplado a uma câmera digital Cannon Power Shot A630.

3 RESULTADO E DISCUSSÃO

3.1 Enraizamento *ex vitro*

Para o clone VM 02 o enraizamento das miniestacas foi obtido no terceiro subcultivo (G3) e para o clone VM 04 o enraizamento das miniestacas foi observado a partir do primeiro subcultivo (G1).

Portanto para o clone VM 02 três ciclos de subcultivo *in vitro* (G3) foram suficientes para promover o enraizamento de aproximadamente 100% das miniestacas e esse comportamento também foi observado na Geração 4 (Figura 2). Para o clone VM 04 apenas um subcultivo *in vitro* (G1) foi suficiente para proporcionar esse resultado (Figura 3) que também se manteve nas Gerações 2 e 3.

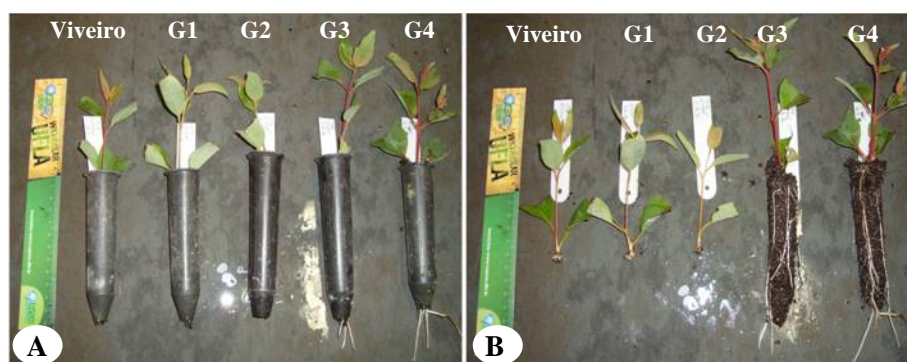


Figura 2 Rejuvenescimento do clone VM 02 do híbrido natural de *Eucalyptus urophylla*, 21 dias após estaqueamento. Plantas de viveiro, Geração 1 (G1), Geração 2 (G2), Geração 3 (G3) e Geração 4 (G4). (A) Plantas no tubete. (B) Plantas sem tubete. Régua 30 cm.



Figura 3 Rejuvenescimento do clone VM 04 do híbrido natural de *Eucalyptus urophylla*, 21 dias após o estaqueamento. Plantas de viveiro, Geração 1 (G1), Geração 2 (G2), Geração 3 (G3). (A) Plantas no tubete. (B) Plantas sem tubete. Régua 30 cm.

Esse resultado sugere que o clone VM 04 possui uma menor quantidade de inibidores para o enraizamento que o clone VM 02, pois apenas um subcultivo *in vitro* foi suficiente para proporcionar o rejuvenescimento e consequentemente o enraizamento das cepas. Nas cepas originadas das plantas viveiro G1 e G2 (VM 02) e viveiro (VM 04) não foi observado o enraizamento. Esses resultados podem ser correlacionados com os dados de viveiro apresentados pela empresa. No clone VM 02 onde a taxa de enraizamento em viveiro era menor que 40%, foram necessários três subcultivos *in vitro* para promover o enraizamento de aproximadamente 100% das cepas, já o clone VM 04 que possuía uma taxa de enraizamento das cepas variando de 40-60% foi necessário apenas um subcultivo *in vitro*. Esse resultado confirma a hipótese da presença de uma maior concentração de inibidores para o enraizamento do clone VM 02. Essa hipótese foi escolhida porque segundo informações obtidas da empresa as matrizes não eram velhas, portanto a hipótese de envelhecimento do material deve ser descartada. A diminuição do potencial de enraizamento devido ao envelhecimento ou maturidade da planta doadora tem sido reportado para

várias espécies, podendo ocorrer devido a diminuição da sensibilidade do tecido envelhecido, acúmulo de substâncias inibitórias e/ou o decréscimo do conteúdo de auxina endógena responsável pela formação de raiz (HUNSEN, 2011). Jing-Wei; Su-Juan; Gui-Yun (2010) sugerem que o ácido indolacético (AIA) endógeno é um importante promotor do enraizamento e pode ser acumulado depois de subcultivos *in vitro*. As mudanças nos níveis de auxina depois de 8 subcultivos explicam o relacionamento entre o nível de AIA e a capacidade de enraizamento em microestacas de castanha (JING-WEI; SU-JUAN; GUI-YUN, 2010).

A ausência de resposta positiva ao desenvolvimento radicial do clone VM 02 (viveiro G1 e G2) e do clone VM 04 (viveiro) podem estar relacionadas à necessidade de alguns cofatores que atuam conjuntamente com as auxinas para a emissão de raízes. De acordo com Weaver (1986) em plantas de difícil enraizamento os cofatores estão presentes em quantidades insuficientes ou ainda existem substâncias inibidoras em concentrações elevadas nas mesmas. Desse modo, mesmo que a concentração de auxina seja suficiente para a iniciação radicial, o efeito da auxina e de outras substâncias promotoras do enraizamento podem ser anulados.

3.2 Análise histoquímica

Em secções transversais das bases das miniestacas enraizadas verificou-se que as raízes formadas apresentavam conexão vascular após 21 dias de permanência em substrato de enraizamento (Figura 4).

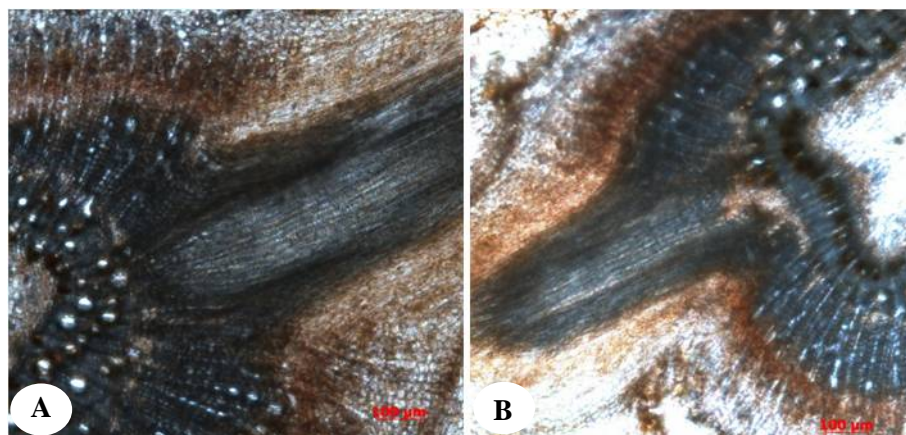


Figura 4 Secções transversais da base das miniestacas caulinares dos híbridos naturais de *E. urophylla*. (A) clone VM 02, Geração 3. (B) clone VM 04, Geração 1. Escala 100 µM.

A conexão vascular de raízes originadas a partir do câmbio ou de tecidos próximos pode ocorrer com a diferenciação dos elementos xilemáticos e floemáticos ou pela diferenciação de células ou tecidos vizinhos ao primórdio (IRITANI; SOARES; GOMES, 1986). A observação da conexão vascular em estacas de eucalipto comprova a funcionalidade das raízes formadas as quais apresentam capacidade de absorção. Segundo Negrelle e Doni (2001) os tecidos que se encontram em fase mais jovem, com reservas suficientes e na presença de substâncias promotoras do enraizamento, possuem melhores condições para a desdiferenciação celular, fase anterior à divisão celular necessária para a indução radicial e conseqüente formação dos primórdios.

A partir da análise histoquímica com reagente lugol foi possível observar a presença de um grande número de amiloplastos distribuído em todo parênquima cortical e medular nas miniestacas dos clones VM 02 e VM 04. A presença dos amiloplastos no parênquima medular do clone VM 02 pode ser visualizada na Figura 5 onde se observou que as miniestacas do viveiro apresentam um grande número de amioplastos (Figura 5A) que reduzem

gradualmente nas gerações de subcultivo. Foi possível observar que na terceira e quarta gerações a ocorrência de amiloplastos é muito pequena (Figura 5D e E).

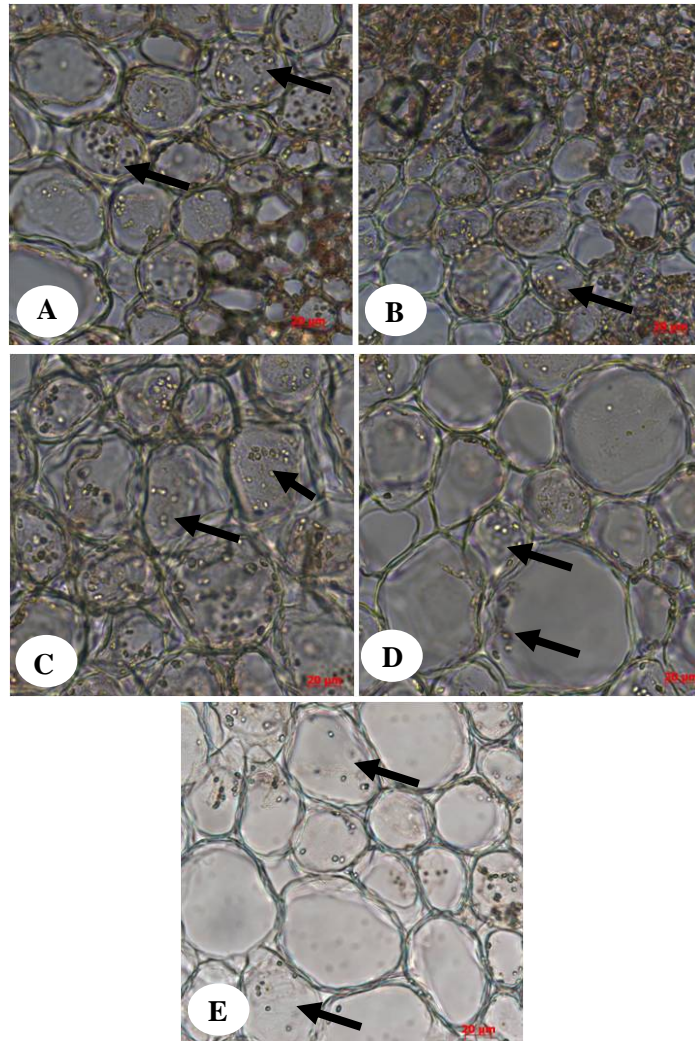


Figura 5 Fotomicrografia do corte transversal da base de miniestacas do clone VM 02 do híbrido natural de *Eucalyptus urophylla*, coradas com lugol. (A) Plantas de viveiro. (B) Primeira geração de subcultivo. (C) Segunda geração de subcultivo. (D) Terceira geração de subcultivo. (E) Quarta geração de subcultivo. As setas pretas indicam amiloplastos. Escala 20 μ M.

Para o clone VM 04 observou-se visualmente que a partir do primeiro subcultivo as plantas apresentaram uma redução no número de amiloplastos em comparação com a geração do viveiro (Figura 6A e B) e estes diminuem com os subcultivos.

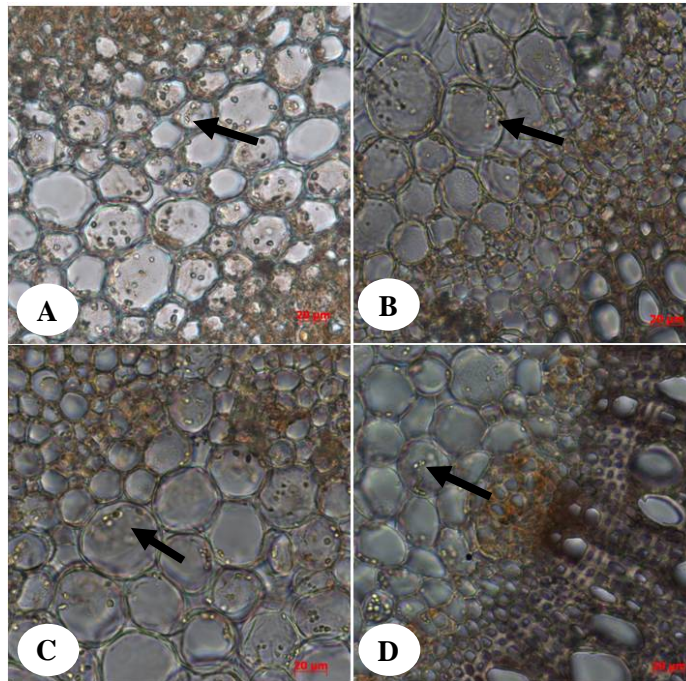


Figura 6 Fotomicrografia do corte transversal da base de miniestacas do clone VM 04 do híbrido natural de *Eucalyptus urophylla*, coradas com lugol. (A) viveiro. (B) Primeira geração de subcultivo. (C) Segunda geração de subcultivo. (D) Terceira geração de subcultivo. As setas pretas indicam amiloplastos. Escala 20 μ M.

Com relação à presença de amido nas cepas de eucalipto as observações estão de acordo com Duarte e Debur (2005) os quais afirmaram que o teor de carboidratos nas estacas é variável e geralmente os ramos mais maduros e mais lignificados mostram tendência em apresentar altos teores de carboidratos.

Segundo os mesmos autores as células do parênquima cortical e dos raios do xilema do caule podem conter um grande número de amiloplastos.

Nas estacas de eucalipto, embora a análise quantitativa de amido não tenha sido realizada, aparentemente os maiores teores de amido foram verificados nas plantas de viveiro e nas plantas dos subcultivos que não apresentaram raiz.

Podemos verificar que as plantas viveiro 02, viveiro 04 e das primeiras gerações de subcultivo possuem mais reservas de amido por estarem em estágios mais avançados de maturação e metabolicamente utilizam a rota de armazenamento. Plantas que passaram por um maior número de subcultivos *in vitro*, por estarem com seu estado juvenil ativo, são mais aptas a utilizar os produtos da fotossíntese para seu desenvolvimento e organogênese, promovendo maior capacidade de enraizamento. Van Huylenbroeck e De Riek (1995) observaram durante o enraizamento de *Spathiphyllum* que o amido parece não ser metabolizado, pois, verificou-se que o seu conteúdo não diminui durante o enraizamento. Os autores afirmam que o CO₂ fixado na fotossíntese é incorporado em sacarose e diretamente transportado, verificando-se um aumento na atividade das enzimas Sacarose Fosfato Sintase e Sacarose Sintase, suportando a translocação de sacarose para o tecido de demanda. Desta forma pode-se inferir que o amido armazenado está relacionado com a dificuldade de enraizamento das miniestacas.

O teste histoquímico com cloreto férrico revelou a presença de compostos fenólicos nas células do parênquima cortical e do parênquima medular dos clones VM 02 e VM 04 (Figuras 7 e 8).

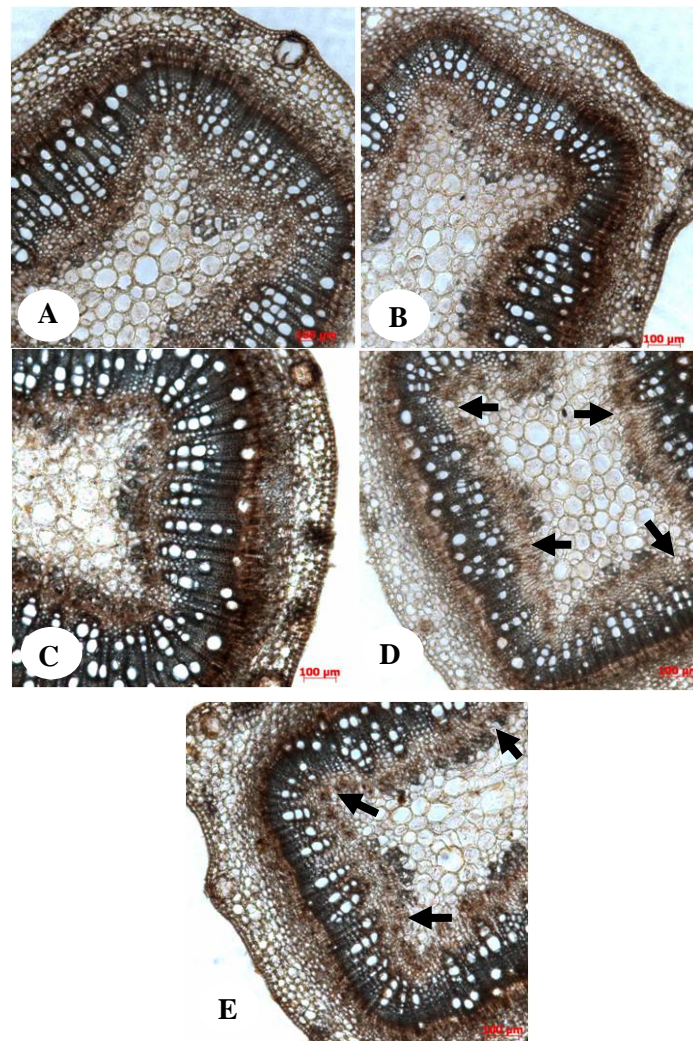


Figura 7 Fotomicrografia do corte transversal de miniestacas do clone VM 02 do híbrido natural de *Eucalyptus urophylla* coradas com cloreto férrico. (A) viveiro. (B) Primeira geração de subcultivo. (C) Segunda geração de subcultivo. (D) Terceira geração de subcultivo. (E) Quarta geração de subcultivo. As setas pretas indicam pontos com redução de compostos fenólicos. Escala 100 μ M.

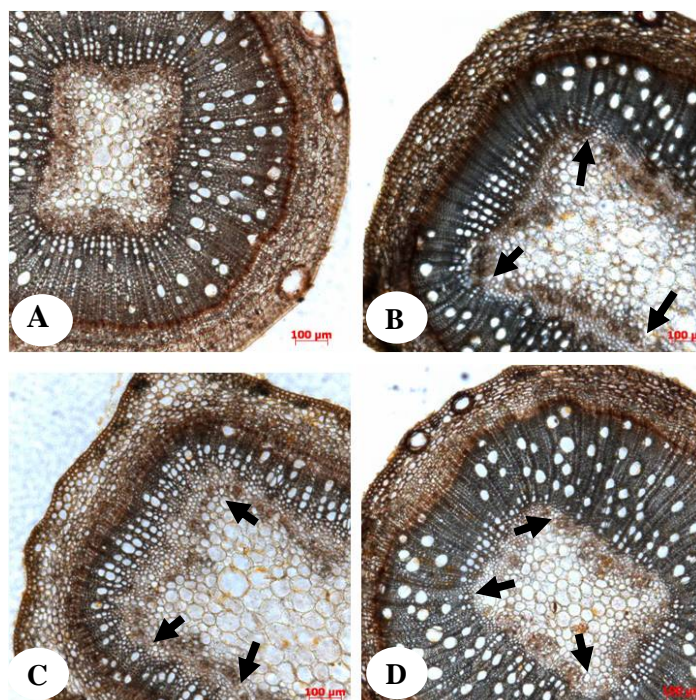


Figura 8 Fotomicrografia do corte transversal de miniestacas do clone VM 04 do híbrido natural de *Eucalyptus urophylla* coradas com cloreto férrico. (A) viveiro. (B) Primeira geração de subcultivo. (C) Segunda geração de subcultivo. (D) Terceira geração de subcultivo. As setas pretas indicam pontos com redução de compostos fenólicos. Barra 100 µM.

O teste histoquímico com cloreto férrico, para a detecção de compostos fenólicos, resultou em reações mais intensas no parênquima axial do floema secundário e no parênquima medular mais próximo ao xilema (Figuras 7 e 8). Estes resultados estão de acordo com os de Duarte e Debur (2005) que relataram a ocorrência de compostos fenólicos em maior concentração no córtex e nos raios do xilema do caule de *Maytenus muelleri*.

Pode-se observar que à medida que plantas foram subcultivadas houve uma redução na intensidade de reação do corante, havendo uma descontinuidade no anel formado no parênquima medular (Figuras 7 e 8 indicados por seta preta). Essa característica é evidenciada principalmente quando se compara a análise

histoquímica dos cortes das miniestacas viveiro e G3 do clone VM 02 e viveiro e G1 do clone VM 04. Esse resultado sugere que houve uma redução de barreiras favorecendo assim o desenvolvimento das raízes. Apesar de ser possível observar uma relação entre a redução de fenóis e o enraizamento das miniestacas estes resultados não são determinantes, pois seriam necessários estudos específicos para identificar a composição química desses compostos fenólicos, a fim de esclarecer se estes poderiam ou não estar influenciando o enraizamento. Segundo Ono e Rodrigues (1996) os compostos fenólicos podem tanto inibir (monofenóis) como ativar (polifenóis) o enraizamento de estacas.

Segundo DE KLERK; KRIEKEN; JONG, 1999, devido à sua ação antioxidante, os compostos fenólicos (polifenóis) presentes nas estacas podem estimular a formação de raízes adventícias protegendo o ácido indol acético (AIA) da oxidação. Maynard e Bassuk (1988) relataram que os compostos fenólicos endógenos existentes nas estacas, principalmente aqueles do grupo dos monofenóis, são responsáveis pela ativação da síntese do complexo enzimático AIA oxidase/peroxidase, o qual promove a destruição do AIA endógeno, reduzindo conseqüentemente, a indução do enraizamento em estacas.

Neste trabalho pode-se observar que as miniestacas que não enraizavam possuíam calo na base e o tamanho destes diminuiu nas gerações de subcultivo até desaparecerem por completo nas miniestacas enraizadas (Figuras 2B e 3B). Segundo Husen e Pal (2006), Husen e Pal (2007) a redução da formação de calos na base é benéfica para o enraizamento em estacas. Isso ocorre porque o aumento da calogênese tem sido associado ao balanço desfavorável de auxina e nutriente (açúcar) nas células meristemáticas da zona de enraizamento (HUNSEN, 2002; HUSEN; PAL, 2007).

A formação de calos na base das miniestacas também pode estar relacionada com a alta concentração de AIA e de polifenóis que atuam como agentes antioxidantes de moléculas de auxina. Os compostos fenólicos

antioxidantes como os fenóis do tipo flavonóide podem participar do transporte polar das auxinas (JACOBS; RUBERY, 1998) o que poderia levar ao acúmulo de AIA na base dos propágulos (FERRIANI; ZUFFELLATO-RIBAS; WENDLING, 2010).

Os resultados encontrados neste trabalho indicam que os subcultivos promovem o rejuvenescimento e o aumento da capacidade de enraizamento de miniestacas de eucalipto, mas o número de ciclos é espécie-específico. As análises histoquímicas revelam diferenças no conteúdo de amido e fenóis uma vez que os compostos fenólicos observados podem ser correlacionados com efeito negativo no enraizamento.

4 CONCLUSÃO

O rejuvenescimento por micropropagação é eficiente para aumentar a capacidade de enraizamento dos clones VM 02 e VM 04 de híbridos naturais de *Eucalyptus urophylla*. O número de ciclos para proporcionar o rejuvenescimento é espécie-específico.

A presença de amido foi verificada nas miniestacas coletadas dos clones VM 02 e VM 04 e em todos os subcultivos.

Os compostos fenólicos foram reduzidos à medida que as plantas foram subcultivadas estando diretamente relacionados ao enraizamento.

Os clones VM 02 e VM 04 podem ser reincorporados aos programas de produção de mudas da empresa V&M Florestal.

REFERÊNCIAS

- ASSIS, T. F. Melhoria genética do eucalipto. **Informe Agropecuário**, [S.l.], v. 18, n. 185, p. 32-51, 1996.
- ASSIS, T. F.; FETT-NETO, A. G.; ALFENAS, A. C. Current techniques and prospects for the clonal propagation of hardwood with emphasis on *Eucalyptus*. In: WALTER, C.; CARSON, M. (Ed.) **Plantation forest biotechnology for the 21st century**. New Delhi, Índia, Research sign Post, v. 1, p. 303-333, 2004.
- ASSIS, T. F.; MAFIA, R. G. Hibridação e clonagem. In: BORÉM, A. (Ed.) **Biociencia florestal**. Viçosa: [s.n.], 2007. p. 93-121.
- CUNHA, A. C. M. C. M. et al. Papel da Nutrição Mineral na Formação de Raízes Adventícias em Plantas Lenhosas. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, n. 50, p. 35-47, jan./jun., 2009.
- DE KLERK, G. J.; KRIEKEN, W. V. D.; JONG, J. C. The formation of adventitious roots: new concepts, new possibilities. Review. **In Vitro Cellular Developmental Biology Plant**, [S.l.], v.35, p.189-99, 1999.
- DUARTE, M. R.; DEBUR, M. C. S. Stem and leaf morphoanatomy of *Maytenus ilicifolia*. **Fitoterapia**, [S.l.], v. 76, p. 41-9, 2005.
- FERRIANI, A. P.; ZUFFELLATO-RIBAS, K. C.; WENDLING, I. Miniestaquia aplicada a espécies florestais. **Revista Agro@mbiente On-line**, v. 4, n. 2, p. 102-109, 2010. Disponível em: <>. Acesso em: 25 nov. 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. 43-76.
- HUSEN, A. **Physiological effects of phytohormones and mineral nutrients on adventitious root formation and clonal propagation of *Tectona grandis* Linn. f.** 2002, PhD Dissertation, Forest Research Institute, Dehra Dun, 2002.
- HUSEN, A.; PAL, M. Variation in shoot anatomy and rooting behaviour of stem cuttings in relation to age of donor plants in teak (*Tectona grandis* Linn. f.). **New Forests**, [S.l.], vol. 31, n. 1, p. 57-73, 2006.

HUSEN, A.; PAL, M. Metabolic changes during adventitious root primordium development in *Tectona grandis* linn. f. (Teak) cuttings as affected by age of donor plants and auxin (IBA and NAA) treatment. **New Forests**. [S.l], v. 33, n. 3, p. 309-323, 2007.

IRITANI, C.; SOARES, R. V.; GOMES, A. V. Aspectos morfológicos da aplicação de reguladores de crescimento nas estacas de *Ilex paraguariensis* St. Hilaire. **Acta Biológica Paranaense**, [S.l], v. 15, n. 1-4, p. 21-46, 1986.

JACOBS, M.; RUBERY, P. H. Naturally occurring auxin transport regulators. **Science**, [S.l], v. 241, n. 4863, p. 346-349, 1988.

JENSEN, W. A. **Botanical histochemistry: principles and practice**. W.H. Freeman, San Francisco, 1962.

JING-WEI, H.; SU-JUAN, G.; GUI-YUN, W. Effects of *in vitro* subculture on the physiological characteristics of adventitious root formation in microshoots of *Castanea mollissima* cv. 'yanshanhong'. **Journal of Forestry Research**, [S.l], v. 21, n. 2, p. 155-160, 2010.

JOHANSEN, D. A. 1940. Plant microtechnique. New York, McGraw-Hill, New York. JKERTESZ, Z.I. **The pectic substances**, New York: Interscience, 1951.

MAYNARD, B. O. K.; BASSUK, N. L. Etiolation and banding effects on adventitious root formation. In: DAVIS, T.D.; HAISSIG, B.E.; SANKHLA, N. **Adventitious root formation in cuttings**. Portland, Oregon: Dioscorides Press, 1988. p. 29-46.

MOCOTEDI, M. E. O. et al. In vitro rooting and subsequent survival of two clones of cold-tolerante *Eucalyptus grandis* X *Eucalyptus nitens* Hybrid. **HortScience**, [S.l], v. 35, n. 6, p. 1163-1165, 2000.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised médium for rapid growth and biossays with tobacco cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 473-407, 1962.

NEGRELLE, R. R. B.; DONI, M. E. Efeito da maturidade dos ramos na formação de mudas de guaco por meio de estaquia. **Horticultura Brasileira**, [S.l], v. 19, p. 351-5, 2001.

ONO, E. O.; RODRIGUES, J. D. **Aspectos da fisiologia do enraizamento de estacas caulinares**. Jaboticabal, FUNEP. 1996.

VAN HUYLENBROECK, J. M.; DE RIEK, J. Sugar and starch metabolism during ex vitro rooting and acclimatization of micropropagated *Spathiphyllum* 'Petite' plantlets. **Plant Science**, [S.l.], v. 111, p. 19-25, 1995.

WEAVER, R. Y. **Reguladores del crecimiento de las plantas en la agricultura**. 3. ed. Barcelona: Trillas, 1986. 540p.

XAVIER, A.; COMÉRCIO, J. Microestaquia: uma maximização da micropropagação de *Eucalyptus*. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 20, p. 9-16, 1996.

**Capítulo 3 Otimização de um protocolo de transformação genética para
Eucalyptus via *Agrobacterium rhizogenes***

RESUMO

As *Agrobacterium rhizogenes* são bactérias fitopatogênicas utilizadas para transformação genética de raízes que produzem plantas quiméricas com raiz transgênica e parte aérea não transgênica. O fenótipo de raiz em cabeleira observado em plantas transformadas se deve a transferência e integração no genoma da planta do T-DNA (TR-DNA e TL-DNA) que contém locos e genes envolvidos na formação de raiz em cabeleira e biossíntese de auxina. Este trabalho foi realizado com a finalidade de avaliar a susceptibilidade de um híbrido natural de *Eucalyptus urophylla* a cepa de *Agrobacterium rhizogenes* MSU440 e otimizar o método de infecção bacteriana. Plantas de eucalipto, com aproximadamente 3 cm de comprimento, obtidas após 40 dias de cultivo *in vitro* foram utilizadas para transformação genética via *A. rhizogenes* contendo o plasmídeo pEZR (H)-LN. Foram realizados dois tratamentos: ferimento na base da planta com lâmina contaminada por bactéria e infiltração a vácuo. Em cada experimento de transformação genética 200 plantas foram infectadas, sendo o tratamento controle composto por 20 plantas. Após a infecção as plantas foram cocultivadas por 5 dias a temperatura de 19 °C. Trinta dias após a infecção a expressão do gene repórter *gfp* foi observada e a seleção das plantas transformadas foi realizada pela amplificação do fragmento de DNA utilizando a técnica de PCR com *primers* específicos para o gene *gfp*. A inoculação do híbrido de *E. urophylla* com *A. rhizogenes* resultou no desenvolvimento de raízes em forma de cabeleira no local infectado, uma vez que no método de infecção por corte na base, 25% das plantas sobreviveram e destas apenas 5% apresentaram raiz. No método de infecção por infiltração a vácuo 30% das plantas sobreviveram e enraizaram. A partir da PCR foi possível confirmar a transformação das raízes submetidas à infecção por corte na base e infiltração a vácuo. No tratamento de infecção por corte na base, das 10 plantas que enraizaram, 50% (5 plantas) amplificaram um fragmento de 400 pb correspondente ao gene *gfp*. No tratamento de infecção por infiltração a vácuo, das 60 plantas que enraizaram a transformação foi confirmada em 44% (26 plantas) pela amplificação do gene *gfp*. Por meio dos resultados obtidos pode-se verificar que o híbrido de eucalipto estudado foi susceptível a transformação genética via *Agrobacterium rhizogenes* e por resultar em um maior número de plantas transformadas, sugere-se o método de infecção por infiltração a vácuo para transformação genética de híbridos naturais de *Eucalyptus urophylla* via *Agrobacterium rhizogenes* MSU440.

Palavras-chave: T-DNA. Raiz em cabeleira. Fluorescência verde. Eucalipto

ABSTRACT

Agrobacterium rhizogenes is a kind of phytopathogenic bacteria used in genetic transformation of roots, producing chimerical plants that have transgenic roots and non-transgenic aerial parts. The “hairy root” phenotype, which can be seen in transformed plants, is due to the transference and integration in the T-DNA plant genome (TR-DNA and TL-DNA) which contains loci and genes involved in the formation of this type of root and in the biosynthesis of auxin. This work was carried out aiming to evaluate the susceptibility of a natural hybrid of *Eucalyptus urophylla* to the strain of *Agrobacterium rhizogenes* MSU440 and to optimize the method of bacterial infection. Eucalyptus sprouts with 3 cm in length, obtained after 40 days of cultivation *in vitro*, were used in the genetic transformation via *A. rhizogenes*, containing the plasmid pEZR (H)-LN. Two treatments were carried out: injury by cutting the base of the plant with an infected blade and vacuum infiltration. For each experiment of genetic transformation, 200 plants were infected, being that the control treatment had 20 plants. After the infection, the plants were co-cultivated for five days at 19°C. 30 days after the infection, the expression of the *gfp* reporter gene was observed and the selection of transformed plants was carried out by amplification of DNA fragments, using PCR with specific primers for *gfp* gene. The inoculation of *A. rhizogenes* on hybrids of *E. urophylla* resulted in the development of bunched roots in the infected place. 25% of the plants that were infected by cutting on the base survived and out of these, 5% developed roots. 30% of the plants that were infected by vacuum infiltration survived and rooted. From PCR, it was possible to confirm the transformation of the roots subjected to infection by vacuum infiltration. In the treatment with infection by cutting, out of the 10 plants, 50% (5 plants) amplified a fragment with 400bp correspondent to *gfp* gene. In the treatment with infection by vacuum infiltration, the transformation of 44% of the 60 plants (26 plants) that rooted was confirmed by amplification of *gfp* gene. From these results, it was possible to verify that the hybrid of eucalyptus studied was susceptible to genetic transformation via *Agrobacterium rhizogenes* and due to the higher amount of transformed plants, we suggest the method of infection by vacuum infiltration to perform the genetic transformation of natural hybrids of *Eucalyptus urophylla* via *Agrobacterium rhizogenes* MSU440

Keywords: T-DNA, hairy root, green fluorescence, eucalyptus.

1 INTRODUÇÃO

Eucalyptus é um gênero de grande importância no cenário mundial e os plantios se destinam principalmente a produção de madeira para celulose, carvão vegetal, postes, lenha e óleos essenciais (PRAKASH; GURUMURTHI, 2009).

A cultura do eucalipto se encontra disseminada por quase todo o território nacional e grande parte da área de cultivo apresenta limitações ao desenvolvimento das plantas, dentre essas se destacam os diversos níveis de estresse e a presença de espécies invasoras que comprometem o estabelecimento das plântulas. Esses fatores trazem prejuízos causados pelos aumentos nos custos e dificuldades no controle (DIBAX et al., 2010).

Com a finalidade de minimizar os prejuízos causados pelos estresses, a engenharia genética oferece a possibilidade de obter plantas capazes de se desenvolverem em condições adversas. As técnicas biotecnológicas permitem adicionar novos genes, incluindo aqueles que não ocorrem naturalmente no genoma do *Eucalyptus*, sem o envolvimento da reprodução sexual (PRAKASH; GURUMURTHI, 2009).

Nos últimos anos procedimentos para a produção de plantas transgênicas via *Agrobacterium tumefaciens* e *Agrobacterium rhizogenes* foram desenvolvidos. A *A. rhizogenes* é um patógeno de solo que provoca a formação de raízes adventícias geneticamente modificadas (Ri T-DNA) e a transformação leva a produção de plantas quiméricas, compreendendo a produção de um sistema de raízes transgênicas em cabeleira, ligado a brotos e folhas não transgênicos (CHABAUD et al., 2006).

O T-DNA contendo o transgene de interesse é geralmente cotransformado com o Ri T-DNA selvagem da *A. rhizogenes* o qual contém os genes *root locus (rol)* responsáveis pela proliferação das raízes (CHABAUD et al., 2006). O parâmetro limitante na exploração desse sistema é o uso de cepas

de *A. rhizogenes* com relativamente baixa virulência, como Arqua-1 e K599, que promovem um número reduzido de raízes Ri T-DNA transformadas com crescimento e morfologia comparáveis com raízes normais (COLLIER et al., 2005). Por comparação, cepas como a MSU440 e R1000 são geralmente consideradas de alta virulência exibindo raízes transformadas com estrutura e crescimento anormais (CHABAUD et al., 2006).

Outro fator importante para o estabelecimento de uma estratégia eficiente para transferência do gene utilizando *Agrobacterium* depende do sucesso da interação entre a bactéria e a planta assim como do método de infecção utilizado (QUOIRIN; QUISEN, 2006).

No intuito de obter um protocolo de transformação genética eficiente para eucalipto o objetivo deste trabalho foi avaliar a susceptibilidade de um híbrido natural de *Eucalyptus urophylla* a cepa de *Agrobacterium rhizogenes* MSU440 e otimizar o método de infecção bacteriana.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi conduzido no Laboratório Central de Biologia Molecular (LCBM) da Universidade Federal de Lavras, em Lavras, MG.

2.1 Material vegetal

O material vegetal utilizado neste trabalho foi obtido de plantas matrizes de um híbrido natural de *E. urophylla*, cultivadas no viveiro comercial da empresa Pró-Mudas. As matrizes foram levadas até o laboratório para se estabelecer o cultivo *in vitro* e conseqüentemente a produção de plantas que foram posteriormente utilizadas nos ensaios de transformação genética via *Agrobacterium rhizogenes*.

2.2 Cultivo *in vitro*

2.2.1 Obtenção de plantas

Os ápices das miniestacas foram excisados e desinfestados com pastilha de paraformaldeído durante 40 minutos. A região meristemática foi isolada com o auxílio de lupa estereoscópica Zeiss e inoculada em pote contendo meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962). Após inoculação, os potes com os meristemas foram mantidos por 5 dias no escuro e depois transferidos para fotoperíodo de 16 h, com irradiância de $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fornecida por luz branca fria e temperatura de 26 ± 2 °C. Para os ensaios de transformação foram utilizadas plantas com aproximadamente 3 cm de comprimento obtidas após 40 dias de cultivo *in vitro*.

2.3 Processo de transformação

2.3.1 Plasmídeo

Para transformação de plantas foi utilizado o plasmídeo pEZR (H)-LN contendo o gene repórter *gfp*, o gene higromicina fosfotransferase para a seleção de plantas e o gene da canamicina para seleção das bactérias transformadas (Figura 1). Este plasmídeo, contendo estes cassetes gênicos, foi cedido pelo pesquisador Mark Aarts da Universidade de Wageningen – Holanda.

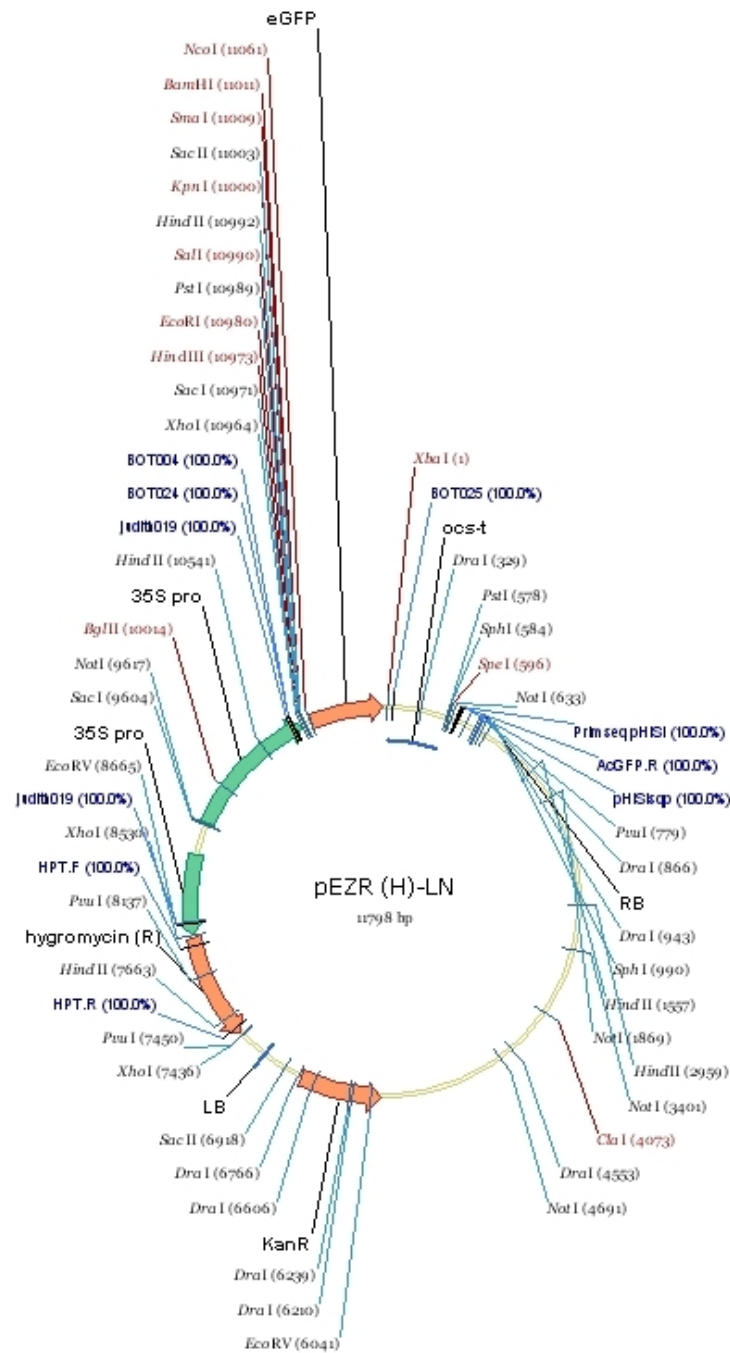


Figura 1 Plasmídeo pEZR (H)-LN contendo o gene repórter *gfp*.

2.3.2 Transformação bacteriana

Foi utilizado o método da eletroporação (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989) para transformar células competentes da bactéria *Escherichia coli* com o plasmídeo pEZR (H)-LN. Para tal, 1 μL do produto da ligação foi adicionado a 100 μL de células competentes de *E. coli* e colocado em gelo por 1 minuto. Logo em seguida este volume foi transferido para cubeta de eletroporação gelada que foi acoplada ao Eletroporador 2510 da Eppendorf. As células bacterianas foram submetidas a um pulso de 2500 V por 5 segundos e em seguida foram transferidas para tubo Eppendorf contendo 0,5 mL de meio de cultura Luria-Bertani (LB) líquido onde permaneceram incubadas por 1 h a 37 °C. Logo após a incubação, 100 μL da cultura foi plaqueada em placa de Petri contendo 30 mL de meio de cultura LB sólido suplementado com 50 mg.L^{-1} de Canamicina.

Após o plaqueamento, as culturas foram mantidas a 37 °C durante 16 h para permitir o crescimento das colônias bacterianas transformadas. Após esse período as colônias que cresceram foram selecionadas para o processo de extração de DNA plasmídeo.

2.3.3 Extração do DNA plasmídeo - miniprep

O plasmídeo foi extraído das células bacterianas por lise alcalina e a cultura bacteriana foi incubada por 16 horas em meio LB líquido suplementado com 50 mg.L^{-1} de Canamicina. Para sedimentação das células bacterianas o conteúdo de cada tubo foi transferido para microtubos e submetido à centrifugação por 2 minutos a 16.000 g. O sobrenadante foi descartado e o pélete ressuspenso em 200 μL de solução P1 (Tris-HCl 50 mM pH 8,0; EDTA 10 mM pH 8,0; RNase A 0,1 g.L^{-1}) e homogeneizado no vórtex. Para a lise celular,

200 µL de solução P2 (SDS 1%, NaOH 200 mM) foi adicionado e após a homogeneização cada tubo foi incubado à temperatura ambiente durante 5 minutos. Para a precipitação foram adicionados 200 µl de solução P3 (Acetato de Potássio 3M pH 5,5 com ácido acético glacial), o volume foi homogeneizado e incubado em gelo por 10 minutos. Em seguida, os tubos foram submetidos à centrifugação, a 16.000 g, por 10 minutos, à temperatura ambiente. Após a centrifugação, o sobrenadante contendo o DNA plasmideal foi transferido para um novo tubo, onde foram adicionados 450 µL de isopropanol. O volume dos tubos foi homogeneizado e centrifugado a 16.000 g, por 10 minutos, à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e adicionado 1 mL de etanol 75% para lavagem do pélete. O pélete foi novamente centrifugado a 16.000 g, por 5 minutos e o sobrenadante descartado. O pélete foi seco em centrífuga a vácuo (Eppendorf Concentrator 5301) por 5 minutos e após secagem completa, ressuspendido em 40 µL de água ultra pura. A quantificação do DNA plasmideal foi realizada em espectrofotômetro (Nanodrop® Spectrophotometer ND-1000) a A_{260} nm. Posteriormente, o DNA plasmideal foi armazenado a -20 °C.

2.3.4 Digestão e Amplificação

Para verificar a identidade das colônias isoladas o DNA plasmideal isolado por miniprep foi digerido por enzimas de restrição e os fragmentos obtidos foram comparados com o plasmídeo originalmente transformado. Para a digestão do plasmídeo foi utilizado a enzima de restrição *XhoI*, que no vetor utilizado gera fragmentos de tamanhos 1000, 2500 e 8300 pb.

A confirmação da presença do gene *gfp* no DNA plasmideal foi realizada por análise de PCR utilizando 1 Unidade de Taq DNA polimerase

(Sigma[®]), 1 μL tampão 10 X, 0,5 μL dNTP mix (10 mMol.L^{-1}), 0,6 μL de cada *primer* 5'AAGGGCGAGGAGCTGTTCAC3', 5'TGTTGCCGTCCTCCTTGA AGTC3' e 1 μL do DNA plasmideal (0,5 μg).

A reação foi submetida ao termociclador *Eppendorf Mastercycler*, programado com temperatura de desnaturação inicial de 95 °C, por 5 minutos, seguidos de 30 ciclos de amplificação compostos de 3 etapas: 95 °C, por 30 segundos; 63 °C, por 30 segundos; 72 °C, por 2 minutos. Após os 30 ciclos as amostras foram submetidas a uma etapa final de 3 minutos a 72 °C.

Os produtos amplificados e digeridos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 0,8% (m.v^{-1}) corados com 2 μL de Brometo de Etídio (0,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), sob corrente elétrica de 110 V em Tampão TAE (0,001 M EDTA pH 8,0; 0,04 M TRIS pH 8,0; 0,02 M ácido acético), por um período de aproximadamente 90 minutos. O gel foi visualizado sob luz ultravioleta e a imagem captada pelo fotodocumentador EDAS 290 (Kodak[®]).

2.3.5 Células competentes de *Agrobacterium rhizogenes*

A cultura bacteriana para o preparo de células competentes foi iniciada a partir de uma colônia da estirpe de *A. rhizogenes* MSU440. As bactérias foram inoculadas em 2 mL de meio de cultura LB sem NaCl e mantidos a 28°C por 24 h a 200 rpm. Logo após, este volume foi inoculado em 1 litro de meio de cultura LB sem NaCl e incubado nas condições de temperatura e agitação anteriores, até que a cultura atingisse DO_{600} máxima de 0,8. Após o crescimento, as células foram mantidas em gelo por 30 minutos e em todas as etapas subsequentes de centrifugação as condições foram de 3000 rpm por 15 minutos a 4 °C. Após a primeira centrifugação o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 1 litro de água ultra pura gelada, na próxima etapa o pélete foi ressuspensado em 0,5 litro de água ultra pura gelada e centrifugadas novamente. Após esta fase,

o pélete foi eluído em 20 mL de glicerol 10% gelado, centrifugado e ressuspenso em 3 mL de glicerol 10% gelado. As células eletro-competentes foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer -80 °C em alíquotas de 100 µL.

2.3.6 Transformação das estirpes de *Agrobacterium rhizogenes*

O plasmídeo isolado da *E. coli* foi introduzido em *A. rhizogenes* pelo método de eletroporação (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989) conforme item 2.3.2.

As *A. rhizogenes* MSU440 eletroporadas foram selecionadas em meio LB sólido contendo Canamicina (50 mg.L⁻¹). Posteriormente uma colônia foi inoculada em meio de cultura LB líquido acrescido de 50 mg.L⁻¹ de Canamicina e as células bacterianas foram mantidas sob agitação de 200 rpm durante 48 h à temperatura de 28°C. Após o crescimento das células bacterianas, estas foram estocadas em glicerol 60% na proporção de 1:1 e armazenadas a -80 °C em freezer.

2.3.7 Crescimento de células bacterianas e condições de cocultivo para transformação via *Agrobacterium rhizogenes*

O processo de crescimento da bactéria foi realizado a partir de uma colônia de *A. rhizogenes* inoculada em meio de cultura LB líquido suplementado de 50 mg.L⁻¹ de Canamicina. A cultura foi mantida sob agitação de 200 rpm durante 48 h à temperatura de 28 °C. No processo de cocultivo as plantas foram inoculadas horizontalmente em placas de petri contendo meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962). Sobre o meio de cultura foi adicionado uma

folha de papel filtro estéril. Os explantes inoculados foram cocultivados em BOD por 5 dias à temperatura de 19 °C (o tempo de cocultivo e a temperatura foram determinados por meio de testes preliminares).

2.3.8 Transformação mediada por *Agrobacterium rhizogenes*

Para a transformação via *A. rhizogenes* foram realizados dois tratamentos (ferimento da base da planta com lâmina contaminada por bactéria e infiltração a vácuo) com o plasmídeo pEZR (H)-LN que possui o gene repórter *gfp*. Em cada tratamento de transformação foram infectadas 200 plantas e o tratamento controle foi composto por 20 plantas.

No tratamento de ferimento na base da planta uma alíquota de 200 µL da cultura bacteriana foi plaqueada em meio de cultura LB contendo 50 mg.L⁻¹ de Canamicina e incubada por 48 h à 28 °C. As plantas foram infectadas através do corte com lâmina de bisturi contendo colônias de bactérias *A. rhizogenes* e as plantas do grupo controle foram cortadas com a lâmina livre de bactéria. As plantas foram cocultivadas nas condições citadas no item 2.3.7.

No tratamento de infiltração a vácuo, após o período de crescimento da cultura de células bacterianas, essas foram centrifugadas a 5000 g por 10 minutos e o precipitado ressuscitado em meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) líquido contendo 20 g.L⁻¹ de sacarose e 100 µM de acetoseringona até atingir uma DO₆₀₀ de 0,7. As plantas a serem transformadas tiveram a base cortada e transferidas para elermeyer de 10 mL contendo a cultura bacteriana. Os elermeyers foram levados para câmara de vácuo estéril e submetidas a vácuo de 400 mmHg por 4 minutos (CANCHE-MOO et al., 2006). Após este processo, as plantas foram cocultivadas nas condições citadas no item 2.3.7. As plantas controle foram infiltradas em meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) na ausência de bactéria.

Com a finalidade de eliminar as bactérias, após o período de cocultivo, as plantas dos tratamentos fermento da base e infiltração a vácuo foram transferidas para meio de cultura de enraizamento contendo o antibiótico Tioxina (Tioxin[®]) na concentração de 500 mg.L⁻¹ e mantidos em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 h e temperatura de 26±2 °C até o enraizamento.

2.4 Expressão do gene *gfp* e seleção pela PCR das plantas transformadas via *Agrobacterium rhizogenes*

Aos trinta dias após inoculação com *A. rhizogenes* a expressão do gene *gfp* foi observada. Para isso, as plantas foram transferidas para placas de petri, contendo meio de cultura de enraizamento (LCBM-E) e levadas ao microscópio. Foi utilizado o microscópio de fluorescência Zeiss HBO 100 equipado com laser de comprimento de onda 488 nm, para fluorescência verde e 577 nm para fluorescência vermelha.

A seleção das plantas transformadas foi realizada pela amplificação do fragmento de DNA utilizando a técnica de PCR com *primers* específicos para o gene *gfp*.

Para extração do DNA genômico foi utilizado o protocolo de extração CTAB (Cationic Hexadecyl Trimethyl Ammonium Bromide) Doyle e Doyle (1990) com modificações. Aproximadamente 200 mg de tecido vegetal foi macerado em nitrogênio líquido e transferido para tubo Eppendorf de 2 mL contendo 1 mL de tampão de extração (2% p.v⁻¹ de CTAB; 2,5% p.v⁻¹ de PVP-40; 2M NaCl; 100 mM tris-HCl pH 8,0; 25 mM EDTA pH 8,0) pré-aquecido a 65 °C. A este volume foi adicionado 2% v.v⁻¹ de β-mercaptoetanol, sendo a solução incubada por 40 minutos a 65 °C e centrifugada (11.000 rpm) por 10 minutos.

O sobrenadante foi transferido para um novo tubo adicionando o mesmo volume de clorofórmio: álcool isoamílico 24:1 (v.v⁻¹), seguido de homogeneização e nova centrifugação (11.000 rpm) por 10 minutos. A fase aquosa foi transferida para um tubo novo onde foi adicionado 4 µL de Rnase A na concentração estoque de 100 µg.mL⁻¹ e incubado a 37 °C por 30 minutos. Para a precipitação foi adicionado 240 µL de álcool isopropílico PA gelado e incubado a -20 °C por 1 hora. Após a precipitação o material foi centrifugado durante 20 minutos (11.000 rpm).

Posteriormente, o sobrenadante foi descartado, o pélete foi lavado em 400 µL de etanol absoluto e ressuspenso em 30 µL de água Milli-Q autoclavada. As amostras foram armazenadas a -20° C. A integridade do DNA foi verificada em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio. O DNA genômico foi quantificado em espectrofotômetro (Nanodrop[®] Espectrophotometer ND-1000) a A₂₆₀ nm. A PCR para o gene *gfp* foi realizada conforme item 2.3.4.

Com a finalidade de excluir a possibilidade de resultado falso positivo, foi realizada uma PCR para o gene da Canamicina com as raízes que apresentaram amplificação para o gene *gfp*. As condições da PCR foram as mesmas descritas no item 2.3.4.

3 RESULTADO E DISCUSSÃO

3.1 Transformação de *Escherichia coli*, extração do DNA plasmideal e digestão

Para verificar a identidade das colônias selecionadas, o DNA plasmideal foi isolado por miniprep e comparado com o plasmídeo originalmente transformado por digestão com enzima de restrição. O plasmídeo pEZR (H)-LN foi digerido com 3 Unidades de *Xho*I (Figura 2A).

Para confirmar a presença do gene *gfp* o plasmídeo foi submetido à amplificação por PCR (Figura 2B). Após a separação dos produtos da PCR por eletroforese em gel de agarose, confirmou-se a transformação da *E. coli* pela presença da banda de tamanho esperado (~400 pb) para o gene *gfp*.

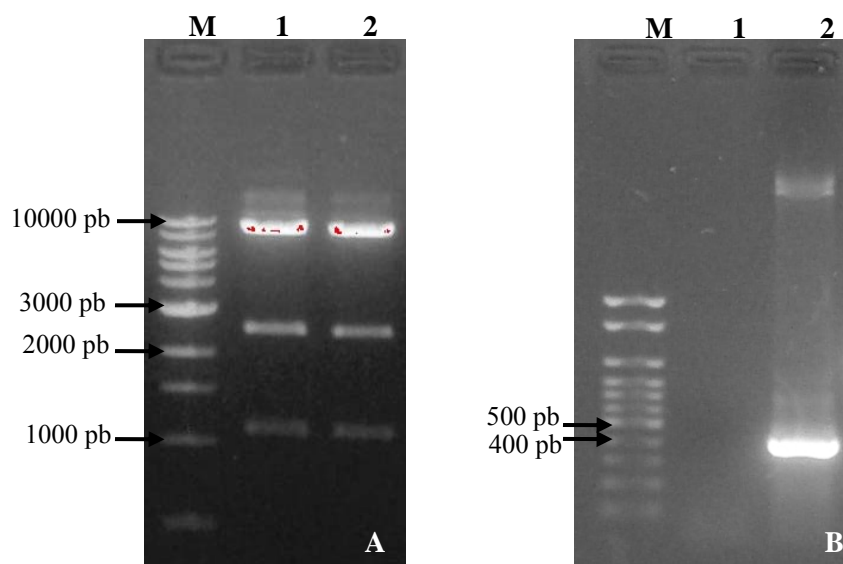


Figura 2 (A) Perfil da digestão dos plasmídeos isolados por miniprep de colônias de *E.coli*. (1 e 2) plasmídeo pEZR (H)-LN digerido com 3 Unidades de *Xho*I. (M) Marcador 1Kb. (B) Separação de bandas em gel de agarose a 0,8%. (1) Controle negativo. (2) Produto de PCR do plasmídeo pEZR (H)-LN para o gene *gfp*. (M) Marcador 100 pb.

Após a confirmação da identidade do plasmídeo pEZR (H)-LN este foi utilizado para transformar a cepa de *A. rhizogenes* MSU440.

3.2 Transformação das raízes de eucalipto por corte na base da planta e infiltração a vácuo

A inoculação do híbrido natural de *Eucalyptus urophylla* com *Agrobacterium rhizogenes* MSU440 resultou no desenvolvimento de raízes em forma de cabeleira no local infectado demonstrando a susceptibilidade deste híbrido a *A. rhizogenes*.

Os dois métodos de infecção (corte na base e infiltração a vácuo) foram capazes de induzir enraizamento no híbrido de eucalipto transformado, no entanto, a porcentagem de sobrevivência das plantas foi dependente do método de infecção utilizado. No método de infecção por corte na base, dos 200 explantes infectados, 75% morreram no primeiro mês após o tratamento de infecção e dos 25% que sobreviveram somente 5% apresentaram raízes. No método de infecção por infiltração a vácuo, dos 200 explantes inoculados 70% morreram e 30% sobreviveram e enraizaram. A alta mortalidade dos explantes pode ter sido ocasionada tanto pelo estresse gerado pelo método de infecção quanto pelo cocultivo. Durante o cocultivo os explantes foram inoculados em placas de petri na horizontal e com pouco contato entre o explante e o meio de cultura. O papel de filtro foi utilizado com a finalidade de evitar a proliferação excessiva das bactérias (Figura 3). Este fato pode ter limitado a absorção de nutrientes e principalmente de água durante a fase de cocultivo, pois após este período observou-se que alguns explantes encontravam-se desidratados. Estes fatores podem ter contribuído para elevada mortalidade observada nos experimentos de transformação.

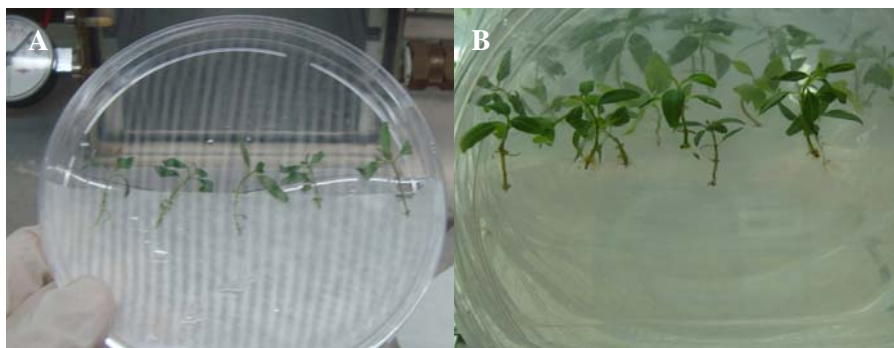


Figura 3 Explantes do híbrido de *E. urophylla* x *E. grandis*. (A) Explantes inoculados em placa de petri contendo papel filtro. (B) Explantes após 5 dias de co-cultivo na ausência de luz em temperatura de 19 °C.

Nos dois métodos de infecção foi observado o surgimento de raízes a partir do quinto dia da inoculação e aos 30 dias o aspecto característico de raiz em cabeleira pôde ser verificado. O padrão observado nas raízes da planta controle contrasta com as características fenotípicas das raízes transformadas (Figuras 4A, B e C). Apesar de não se ter avaliado a fluorescência de todas as raízes que apresentavam o fenótipo de raiz em cabeleira, a fluorescência verde emitida pela presença do gene *gfp* observada em algumas raízes, confirmou a transformação genética via *Agrobacterium rhizogenes* (Figura 4E).

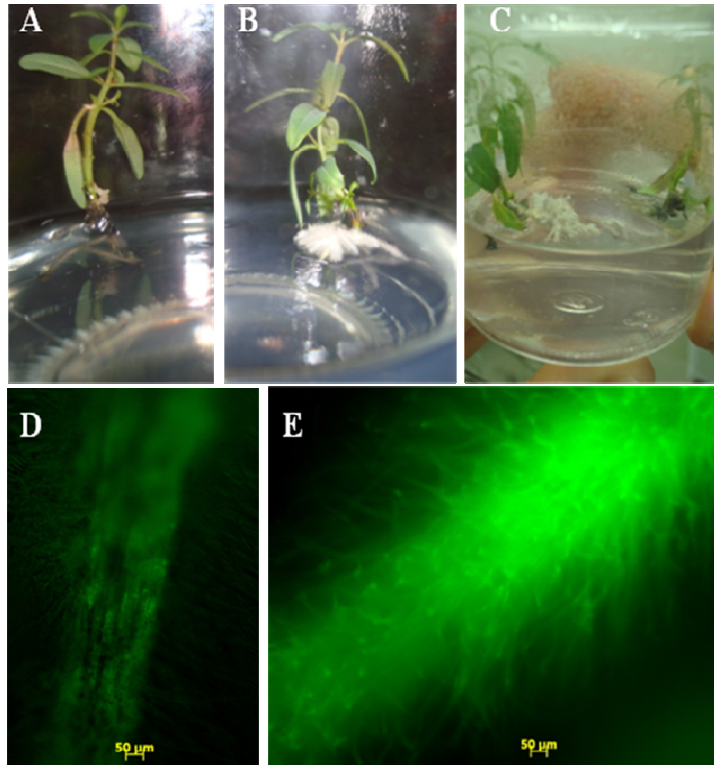


Figura 4 Raízes do híbrido natural de *E. urophylla*. (A) Controle. (B e C) Raízes transformadas com *Agrobacterium rhizogenes* contendo o plasmídeo pEZR (H)-LN 30 dias após a transformação. (D) Controle. (E) Raiz com fluorescência verde expressando GFP.

Devido à impossibilidade operacional para visualização da expressão do gene *gfp* em todas as raízes das plantas submetidas ao processo de transformação genética via *A. rhizogenes*, as raízes foram excisadas das plantas e a confirmação das plantas quiméricas foi realizada via PCR.

3.3 Triagem molecular das raízes transgênicas

A partir da PCR com *primers* específicos para o gene *gfp* foi possível confirmar a transformação das raízes submetidas à infecção por corte na base e

infiltração a vácuo. No primeiro tratamento (infecção por corte na base) foi verificado por análise da PCR que das plantas infectadas com *A. rhizogenes* contendo o plasmídeo pEZR (H)-LN, 50% (das plantas que emitiram raiz) apresentavam raiz transformada (Figura 5).

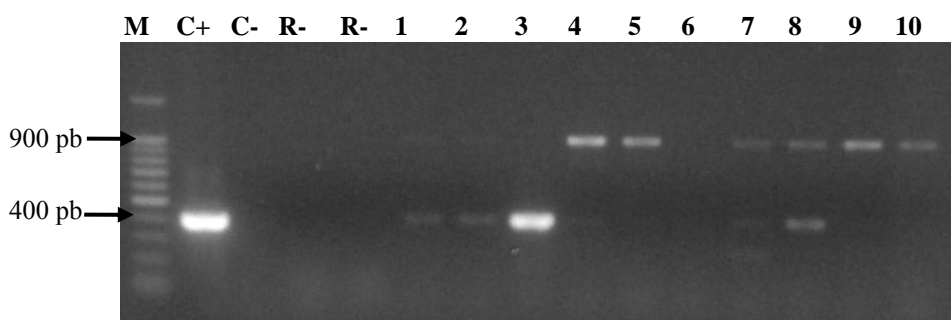
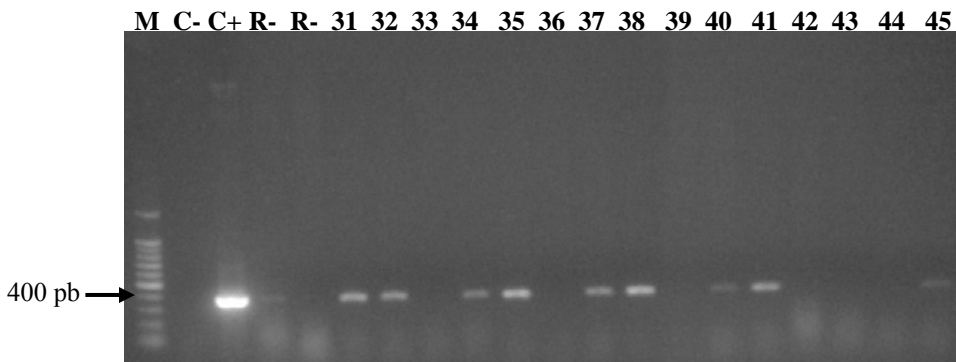
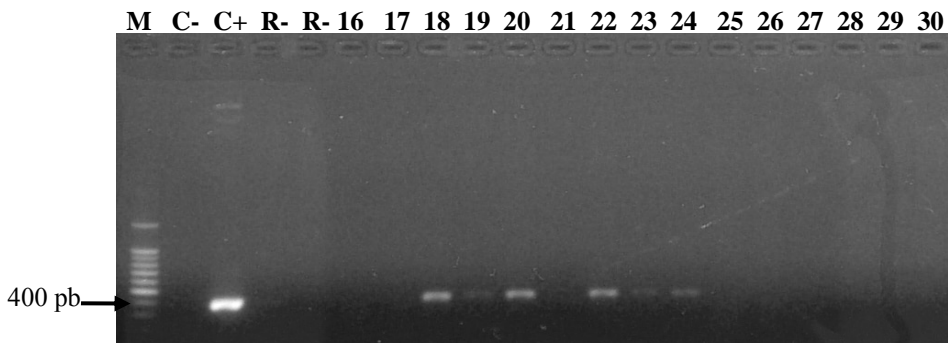
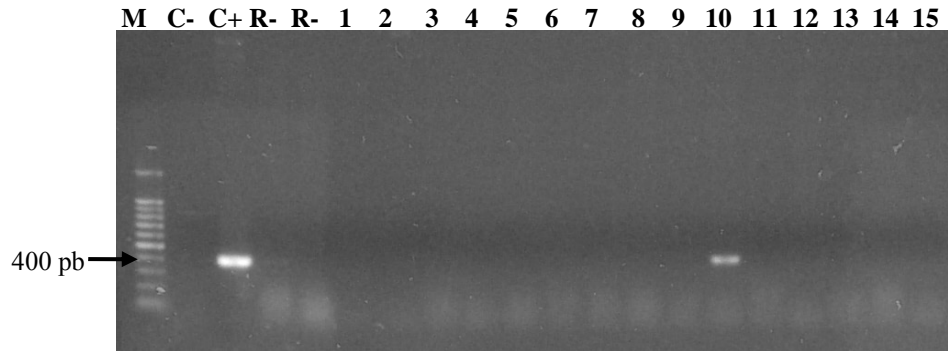


Figura 5 Análise da PCR do DNA isolado de raízes de eucalipto transformado com pEZR (H)-LN pelo método de infecção de corte na base. C+ (controle positivo - plasmídeo pEZR (H)-LN). C- (controle negativo da reação). R- (raiz de plantas controle negativo). Fragmentos amplificados do gene *gfp* (colunas 1, 2, 3, 7 e 8) indicando raízes positivamente transformadas com fragmento de 400 pb. Colunas 4, 5, 6, 9 e 10 indicando raízes não transformadas. Marcador 100 pb.

A partir da PCR foi possível observar a amplificação de um fragmento de 400 pb (Figura 5, colunas 1, 2, 3, 7 e 8) e também foi observado a amplificação de um fragmento inespecífico de 900 pb (Figura 5, colunas 4, 5, 7, 8, 9 e 10).

No tratamento de infecção a vácuo foi verificado por análise de PCR que das plantas infectadas com *A. rhizogenes* contendo o plasmídeo pEZR (H)-LN aproximadamente 44% (das plantas que emitiram raiz) apresentavam raízes transformadas (Figura 6). Nesse tratamento foi observado apenas um fragmento de tamanho esperado (400 pb).



“...continua...”

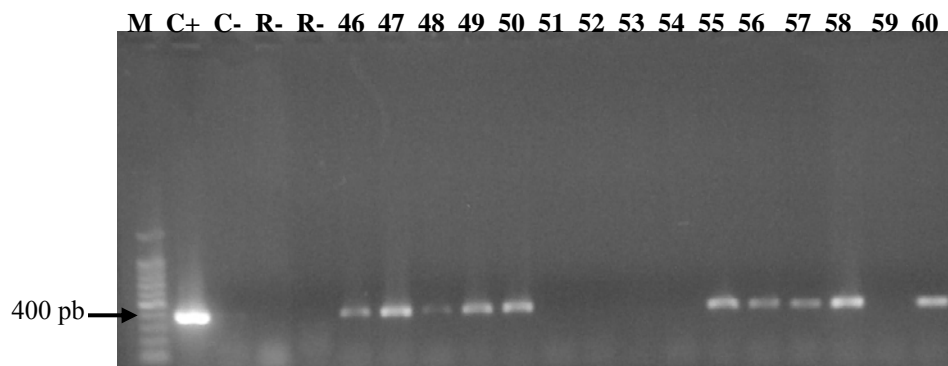


Figura 6 Análise da PCR do DNA isolado de raízes de eucalipto transformado com pEZR (H)-LN, pelo método de infiltração a vácuo. C+ (controle positivo - plasmídeo pEZR (H)-LN). C- (controle negativo da reação). R- (raiz de plantas controle negativo). Fragmentos amplificados do gene *gfp* (colunas 10, 18, 19, 20, 22, 23, 24, 31, 32, 34, 35, 37, 38, 40, 41, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 55, 56, 57, 58 e 60) indicando raízes positivamente transformadas. Ausência de fragmentos amplificados do gene *gfp* (colunas 1-9; 11-17; 21; 25-30; 33; 36; 39; 42- 44; 51-54 e 59) indicando raízes não transformadas. Marcador 100 pb.

De acordo com os resultados obtidos pode-se verificar que o número de plantas que apresentaram raízes transformadas é variável de acordo com o método utilizado. Segundo Stein (2009) um dos mais importantes fatores que determinam a eficiência de transformação é a metodologia utilizada.

Apesar de não terem sido encontrados relatos na literatura de transformação genética de eucalipto via *A. rhizogenes* utilizando infiltração a vácuo, este método foi utilizado para transformação genética de embriões somáticos de *Coffea canephora* (CANCHE-MOO et al., 2006) e escalpes de *Musa acuminata* cv. “Grand Nain” (ACERETO-ESCOFFIE et al., 2005). Apesar da utilização de outros tecidos para transformação e a infecção ter sido realizada por *Agrobacterium tumefaciens*, os autores demonstraram a eficiência do método de transformação por infiltração a vácuo.

Stein (2009), utilizando a metodologia de infecção por corte e a cepa de *A. rhizogenes* MSU440, encontrou uma porcentagem variável de transformantes

entre as espécies testadas, onde obteve 32% de raízes transformadas em *Brassica*, 17% em *Arabidopsis thaliana* e 42% de raízes de *Coffea arabica* expressando pREDRoot (fluorescência vermelha). Alpizar et al. (2006) avaliando a eficiência de transformação via *A. rhizogenes* A4 encontraram 44% de expressão do gene repórter *gus* em raízes de *Coffea arabica*.

Segundo Lin; Kwork e Doran (2003) a eficiência da transformação depende da susceptibilidade das espécies de plantas e da estirpe de *Agrobacterium* utilizada no processo de transformação.

Com a finalidade de excluir a possibilidade de contaminação das raízes por *A. rhizogenes* o DNA dos explantes que apresentaram resultado positivo quando amplificados com *primers* para o gene *gfp* foram submetidos a uma nova PCR com *primers* específicos para o gene de resistência a Canamicina (Figura 7).

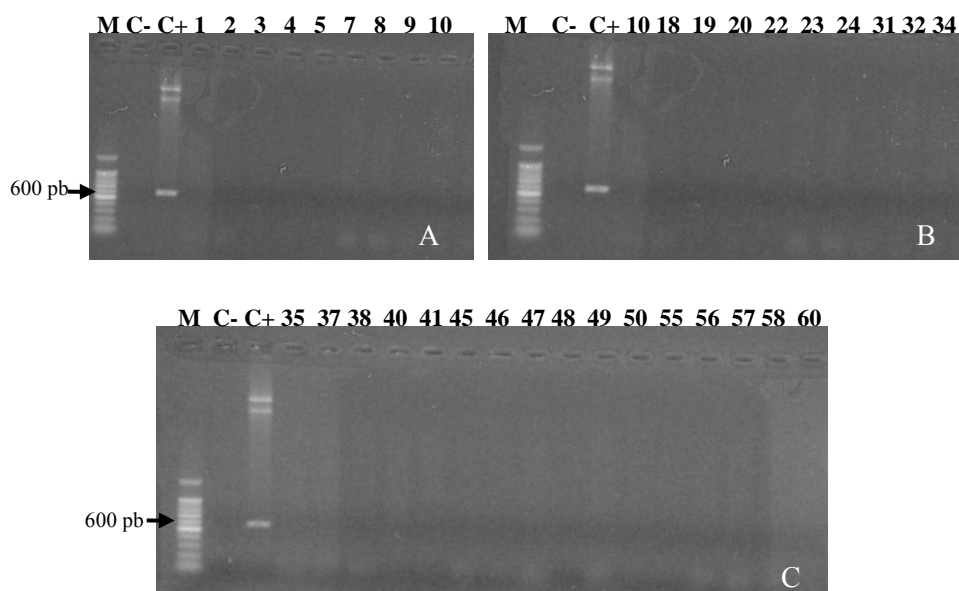


Figura 7 Análise da PCR do DNA isolado de raízes de eucalipto transformado com pEZR (H)-LN. (A) Infecção por corte na base. (B e C). Infecção pelo método de infiltração a vácuo. C+ (controle positivo - plasmídeo pEZR (H)-LN). C- (controle negativo da reação). Marcador 100 pb.

Como nas raízes transformadas não houve amplificação do fragmento correspondente ao gene de resistência a Canamicina (Figura 6 A, B e C) foi possível observar que os subcultivos das plantas em meio de cultura contendo o antibiótico Tioxin[®] foram eficientes para controlar o crescimento da *A. rhizogenes*.

De acordo com os resultados obtidos pôde-se verificar que a transformação da base do explante de *E. urophylla*, propagado *in vitro*, foi alcançada utilizando-se os métodos de inoculação da cultura bacteriana por meio do ferimento causado pelo corte na base e por infiltração a vácuo, resultando na produção de plantas quiméricas, com parte aérea normal e raízes transformadas (Figura 4B e C).

Pelos resultados observados neste trabalho podemos sugerir que o método de infecção por infiltração a vácuo pode ser considerado mais eficiente por proporcionar uma menor mortalidade dos explantes transformados e conseqüentemente um maior número de plantas com raízes transformadas. Com a finalidade de reduzir a mortalidade das plantas sugere-se reduzir o tempo de cocultivo em combinação com outros métodos de inoculação durante o cocultivo.

Os experimentos encontram-se em andamento e o número de cópias do gene *gfp* inserido nas raízes das plantas será avaliado por quantificação absoluta por meio da técnica de PCR em tempo real.

4 CONCLUSÃO

O híbrido natural de *Eucalyptus urophylla* foi susceptível a transformação via *Agrobacterium rhizogenes* cepa MSU440.

Os métodos de infecção por corte na base e infiltração a vácuo promoveram a transformação genética das raízes de eucalipto, sendo que o segundo proporcionou menor mortalidade das plantas.

O método de infecção por corte na base proporcionou uma eficiência de transformação de 50% e o método de infiltração a vácuo proporcionou uma eficiência de 44%.

O método de transformação por infiltração a vácuo foi considerado mais eficiente por proporcionar uma menor mortalidade das plantas e consequentemente um maior número de plantas com raízes transformadas.

REFERÊNCIAS

- ALPIZAR, E. et al. Efficient production of *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots and composite plants for studying gene expression in coffee roots. **Plant Cell Rep**, [S.l.], v. 25, p. 959–967, 2006.
- ANDRADE, G. M.; SARTORETTO, L. M.; BRASILEIRO, A. C. M. Biologia molecular do processo de infecção por *Agrobacterium* spp. **Fitopatologia Brasileira**, [S.l.], v. 28, p. 465-476, 2003.
- ACERETO-ESCOFFIE', P. O. M. et al. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Musa acuminata* cv. "Grand Nain" scalps by vacuum infiltration. **Scientia Horticulturae**, [S.l.], v. 105, p. 359–371, 2005.
- CANCHE-MOO, R. L. R. et al. Genetic transformation of *Coffea canephora* by vacuum infiltration. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, [S.l.], v.84, p.373–377, 2006.
- CHABAUD, M. et al. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated root transformation. **Medicago truncatula handbook** version nov. 2006, p.1-8.
- COLLIER, R. et al. *Ex vitro* composite plants: an inexpensive, rapid method for root biology. **Plant J**, [S.l.], v. 43, p. 449-457, 2005.
- DIBAX, R. et al. Organogenesis and *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Eucalyptus saligna* with P5CS gene. **Biol Plant**, [S.l.], v. 54, n. 1, p. 6–12, 2010.
- DOYLE, J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, [S.l.], v.12, p. 13-15, 1990.
- QUOIRIN, M.; QUISEN, R. Advances in genetic transformation of *Eucalyptus* species. In: Franche C. (Eds) **Molecular Biology Tropical Plants**. Research Signpost, Kerala, p. 41–56, 2006.
- LIN, H. W.; KWORK, K. H.; DORAN, P. M. Development of *Linum flavum* hair root cultures for production of coniferin. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 25, n. 7, p. 521-525, Apr. 2003.

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

PORTEUS, M. H.; CARROLL, D. Gene targeting using zinc finger nucleases. **Nat Biotechnol**, [S.l.], v. 23, p. 967–973, 2005.

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**, [S.l.], v. 45, p. 429-434, 2009.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: a laboratory manual**. 2. ed. N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

STEIN, V. C. **Biotechnological approaches to improve drought tolerande of *Coffea Arabica***. 2009. 97 p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.