



FLÁVIA PEREIRA BALIEIRO

**TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE HÍBRIDOS
DE UROGRANDIS**

LAVRAS - MG

2013

FLÁVIA PEREIRA BALIEIRO

TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE HÍBRIDOS DE UROGRANDIS

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, área de concentração em Biologia Molecular, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Prof. Dr. Luciano Vilela Paiva

Coorientadores

Dra. Evânia Galvão Mendonça

Prof. Dra. Vanessa Cristina Stein

LAVRAS – MG

2013

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

Balieiro, Flávia Pereira.

Transformação genética de híbridos de urograndis / Flávia
Pereira Balieiro. – Lavras : UFLA, 2013.

85 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2013.

Orientador: Luciano Vilela Paiva.

Bibliografia.

1. Eucalipto. 2. Biobalística. 3. *Agrobacterium rhizogenes*. 4.
Agrobacterium tumefaciens. 5. gfp. I. Universidade Federal de
Lavras. II. Título.

CDD – 660.65

FLÁVIA PEREIRA BALIEIRO

TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE HÍBRIDOS DE UROGRANDIS

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, área de concentração em Biologia Molecular, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 26 de fevereiro de 2013

Dr. Breno Régis Santos	UNIFAL
Dra. Andréa Almeida Carneiro	EMBRAPA
Dr. Leandro Eugenio Cardamone Diniz	EMBRAPA

Prof. Dr. Luciano Vilela Paiva
Orientador

LAVRAS – MG

2013

Aos meus pais, João e Carmen,
Por todo apoio, incentivo, amor e carinho sem fim.

DEDICO

Ao Eduardo, por todo amor e companheirismo;
À Evânia, por todos os ensinamentos e amizade.

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me amparado em todos os momentos em que procurei seu auxílio, ter me acalmado quando necessário e me dado forças para sempre seguir em frente;

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Programa de Pós Graduação em Biotecnologia Vegetal, pela oportunidade;

A Capes, pela concessão da bolsa;

Ao meu orientador, Luciano Vilela Paiva, pela confiança e por acreditar em meu trabalho. Pelas correções e incentivos desta dissertação e principalmente por me permitir trabalhar com eucalipto e transformação genética;

Ao meu sempre coorientador de coração, Breno Régis Santos, por estar presente nos momentos que mais precisei e por ter me apresentado a ideia de fazer esse mestrado. Obrigada por participar de tantos momentos importantes na minha vida;

À minha coorientadora Vanessa, por todo auxílio, todo desabafo, por escutar quando era preciso apenas escutar e aconselhar quando era necessário. Obrigada por me incentivar e me ajudar a traçar novos caminhos adiante,

À coorientadora Evânia, por todos ensinamentos, todos momentos juntas, pelos finais de semana me acompanhando e ajudando na execução deste trabalho. Por toda paciência, amizade e apoio incondicional;

Aos amigos do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, principalmente Emanuelle, Luana, Kátia, Jean, Danielle, Joáz, Tatiana, Valquíria, Rafaela, Patrick e tantos outros que fizeram destes momentos mais alegres;

Aos amigos do Laboratório Central de Biologia Molecular, principalmente Mayara, Andressa, Marlúcia, Horllys, Jéssica, Kalynka, Gustavo, Heliete e Fabrício, pelos momentos de trabalho e também de descontração;

Aos grandes amigos do grupo Eucalipto, Evânia, Larissa, Wesley, Ana Carla, Nathália e Matheus; por todos os momentos de alegrias e tristezas compartilhadas. Vocês são muito especiais!

À Tânia e ao Guilherme, por toda contribuição neste trabalho apesar da distância. Por toda torcida, carinho e amizade dentro e fora do laboratório. Vocês fizeram a diferença nesta caminhada!

Às amigas da República Bioergue; Larissa e Nayara, por toda compreensão e carinho;

Às amigas Thaís e Marinês, por compartilharem tristezas, angústias, alegrias e tantos outros sentimentos, pois sem vocês por perto essa caminhada não teria a mesma graça. Obrigada pela amizade e carinho constantes.

Aos amigos de Lavras, Ludmilla, Jeane, João Paulo, Luiz Carlos, Laiane, Jean e tantos outros, pelo apoio, incentivo e amizade;

Aos amigos de Barretos, Marina, Marcos, Mariana, Flávia, Paula e Patrícia que, apesar da distância, a amizade é desde sempre e para sempre;

Aos meus tios, tias e primos, pela preocupação e incentivo;

Ao meu namorado Eduardo, por todo amor, companheirismo, paciência, pela presença constante em minha vida, apesar da distância, e por compreender minhas ausências sempre apoiando na conclusão deste mestrado;

Aos meus pais, João e Carmem, pelo amor incondicional, por constituírem-se do meu porto seguro, minha base e acreditarem em mim sempre. Sem vocês eu não teria chegado até aqui!

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

OBRIGADA

RESUMO GERAL

O eucalipto é uma das espécies lenhosas mais plantadas devido à demanda, principalmente, nos projetos industriais do segmento de papel e celulose. Com isso, nas últimas duas décadas vários grupos de pesquisa relataram diferentes protocolos de transformações genéticas e tentativas para o desenvolvimento de eucaliptos transgênicos. As plantas transgênicas representam uma ferramenta de grande importância para estudos moleculares, genéticos, bioquímicos e fisiológicos além da expressão e silenciamento permitindo a produção de novos genótipos de plantas. A eficiência da transformação depende da combinação de métodos eficientes e técnicas de regeneração. A transformação via *Agrobacterium rhizogenes* tem sido utilizada como uma ferramenta para estudos funcionais de genes. Com este trabalho propõe-se um processo de transformação por esse método com alta eficiência utilizando um híbrido de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*. A partir do método de infiltração a vácuo, durante 4 min a 400 mmHg, com a cepa de *Agrobacterium rhizogenes* MSU440 obteve-se uma taxa de 70% de plantas com raízes transformadas. Para o processo de transformação de calos foram testados quatro métodos diferentes, três constituíram-se de métodos indiretos via *Agrobacterium tumefaciens*, agitação, infiltração a vácuo e sonicação e outro método direto utilizando bombardeamento. O processo de infiltração a vácuo mostrou-se o mais eficiente com 1,46% de plantas transformadas. As transformações foram realizadas com o gene repórter *gfp* (*Green Fluorescent Protein*) que provou ser ideal para estabelecer protocolos de transformação genética em eucalipto.

Palavras-chave: Eucalipto. *Agrobacterium tumefaciens*. *Agrobacterium rhizogenes*. Biobalística. *gfp*.

GENERAL ABSTRACT

Eucalyptus is one of the most planted woody species due to its demand, especially from projects in the paper and cellulose industrial segment. Thus, in the last two decades, many research groups reported different genetic transformation protocols and attempts to develop transgenic eucalyptus. The transgenic plants represent a tool of great importance for molecular, genetic, biochemical and physiological studies, in addition to the expression and silencing, which allows the production of new plant genotypes. The efficiency of the transformation depends on the combination of efficient methods and regeneration techniques. The transformation via *Agrobacterium rhizogenes* has been used as a tool for functional studies of genes. This work proposes a transformation process through this highly efficient method using a *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* hybrid. We obtained a 70% rate of plants with transformed roots using a vacuum infiltration method during 4 min at 400 mmHg, with MSU440 *Agrobacterium rhizogenes* strain. For the callus transformation process we tested four different methods, three indirect via *Agrobacterium tumefaciens*, agitation, vacuum infiltration and sonication, and the other direct using bombardment. The vacuum infiltration process was shown to be the most efficient with 1.46% of transformed plants. The transformations were done with the *gfp* (*Green Fluorescent Protein*) reporter gene which proved to be ideal to establish genetic transformation protocols in eucalyptus.

Keywords: Eucalyptus. *Agrobacterium tumefaciens*. *Agrobacterium rhizogenes*. Biobalistics

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	
1	INTRODUÇÃO GERAL	11
2	REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1	O gênero <i>Eucalyptus</i>	13
2.2	Transformação genética via <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	15
2.3	Transformação genética via <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	16
2.4	Transformação genética via Biobalística	18
2.5	Gene repórter	20
3	CONSIDERAÇÕES GERAIS	22
	REFERÊNCIAS	23
	SEGUNDA PARTE - ARTIGOS	30
	ARTIGO 1 Transformação genética de um híbrido comercial entre <i>Eucalyptus grandis</i> x <i>Eucalyptus urophylla</i> via <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	30
1	INTRODUÇÃO	333
2	MATERIAIS E MÉTODOS	366
2.1	Material vegetal e condições de cultivo	366
2.2	<i>Agrobacterium rhizogenes</i> e Plasmídeo.....	366
2.3	Transformação das plantas via <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	377
2.4	Análise via GFP	388
2.5	Extração de DNA genômico e análise via PCR	388
2.6	Avaliação.....	40
3	RESULTADOS	411
4	DISCUSSÃO	444
5	CONCLUSÃO	477
	REFERÊNCIAS	488
	ARTIGO 2 Transformação genética de híbrido entre <i>Eucalyptus</i> <i>grandis</i> x <i>Eucalyptus urophylla</i> via <i>Agrobacterium tumefaciens</i> e biobalística	522
1	INTRODUÇÃO	575
2	MATERIAIS E MÉTODOS	617
2.1	Material vegetal.....	61
2.1.1	Obtenção de plantas.....	61
2.1.2	Obtenção de calos.....	61
2.2	Processo de transformação.....	622
2.2.1	Plasmídeo	622
2.2.2	Transformação mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	633
2.2.3	Transformação via Biobalística	644
2.2.3.1	Preparo das partículas.....	644

2.2.3.2	Precipitação do DNA sob as micropartículas	644
2.3	Avaliação dos calos via GFP	655
2.4	Seleção das plantas transformadas por <i>A. tumefaciens</i>	666
2.5	Extração do DNA genômico e PCR	677
3	RESULTADOS	699
4	DISCUSSÃO	766
5	CONCLUSÃO	822
	REFERÊNCIAS	833

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO GERAL

Dentre as espécies florestais, o eucalipto se destaca para o uso da engenharia genética devido ao seu grande uso comercial tornando necessária a obtenção de genótipos mais produtivos, tolerantes aos estresses abióticos e resistentes aos bióticos. O plantio em larga escala deste gênero deve-se ao rápido crescimento, a alta produtividade florestal e a expansão e direcionamento de novos investimentos por parte de empresas que utilizam sua madeira como matéria prima em processos industriais. Em particular, as expansões previstas no segmento de celulose e papel têm sido a alavanca do crescimento nas áreas plantadas deste grupo de espécies (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS PRODUTORES DE FLORESTAS PLANTADAS, ABRAF, 2012).

No estado de Minas Gerais as espécies de eucalipto são mais utilizadas para a produção de carvão vegetal. Suas características intrínsecas como rápido crescimento e densidade de madeira considerável garantem um carvão facilmente renovável e de boa qualidade. As espécies mais utilizadas no Brasil para estes fins são *Eucalyptus grandis*, *Eucalyptus saligna*, *Eucalyptus camaldulensis* e *Eucalyptus urophylla*, assim como seus híbridos (SANTOS et al., 2010).

Os programas de melhoramento têm contribuído de forma expressiva para o aumento da produtividade deste gênero, porém, os mesmos possuem limitações consequentes de características intrínsecas a essas espécies, destacando-se o longo tempo necessário para as plantas atingirem uma estabilidade fenotípica e maturidade reprodutiva (DIOUF, 2003; POUPIN; ARCE-JOHNSON, 2005).

A busca de novas tecnologias capazes de aumentar a produtividade das florestas comerciais tem merecido destaque no que se refere aos avanços na engenharia genética que implicam na modificação direta do genoma de um organismo alvo por meio da análise e manipulação de DNA ou inserção de fragmentos do mesmo com função conhecida (COSTANZA; MCCORD, 2009).

A partir da transformação genética se pode incorporar genes desejáveis que expressem características de interesse econômico, como alta produção de biomassa, resistência à patógenos e tolerância a estresses bióticos e abióticos (GONZALEZ et al., 2002). Mas para isso é necessário ter um protocolo estabelecido e eficiente para a espécie, de transformação genética

Genes repórter tem desempenhado um papel importante no desenvolvimento e otimização de protocolos de transformação de plantas. Os genes repórter mais utilizados são os das proteínas β -glucuronidase e luciferase, porém, para a identificação desses genes é necessário a adição de um substrato destrutivo (JORDAN, 2000).

O gene *gfp* (*Green Fluorescent Protein*) possui como vantagem a formação de um cromóforo fluorescente que requer apenas a excitação sob a luz ultravioleta ou azul para emitir fluorescência verde no material transformado (CHALFIE et al. 1994).

Diante do exposto, o a autora do presente trabalho teve como objetivo estabelecer protocolos de transformação genética de híbridos entre *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* via *Agrobacterium rhizogenes*, *Agrobacterium tumefaciens* e biobalística utilizando o gene *gfp* como repórter.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 O gênero *Eucalyptus*

Eucalyptus é um gênero da família Myrtaceae, composto por arbustos e árvores de grande porte. Existem cerca de 670 espécies de eucalipto descritas, além de muitas subespécies e alguns híbridos naturais (ABRAF, 2007). O eucalipto é originário da Austrália e regiões próximas como Timor, Indonésia, Papua Nova Guiné, Molucas, Irian Jaya e sul das Filipinas, em uma faixa compreendida entre latitudes 9° N e 44° S (ELDRIGE et al., 1993). Apresenta uma ampla plasticidade e dispersão mundial, crescendo satisfatoriamente em diferentes situações edafoclimáticas, extrapolando àquelas das regiões de origem (SANTOS; AUER; GRIGOLETTI JÚNIOR, 2001). Devido a sua grande importância econômica possui hoje uma área de plantio estimada em 20 milhões de hectares em todo o mundo (GIT Forestry 2011).

O gênero *Eucalyptus* ganha a cada dia uma importância econômica mundial maior pelo fato de suas espécies serem altamente exploradas para biomassa. Entre as 700 espécies e híbridos, *E. grandis* é a espécie mais cultivada nos países subtropicais e regiões temperadas, *E. camaldulenses* é encontrada em regiões áridas e semi-áridas enquanto que *E. globulus* é adaptado a climas temperados com geadas severas. (TEULIERES; MARQUE, 2007).

Segundo Dossa et al. (2002), a produtividade do eucalipto pode ser considerada como um dos principais fatores que determinam sua expansão no mercado de papel, carvão, celulose e serraria. Sendo que, no Brasil, existem plantios de eucaliptos melhor adaptados que atingem rendimentos próximos a 60 m³/ha ano, dados expressivos se comparados a espécies nativas do seu país de origem, a Austrália que apresentam 25 m³/ha.

O eucalipto por ser uma árvore que produz fibras curtas é mais usado do que as espécies que apresentam madeiras de fibras longas como o pinus. As fibras curtas o tornam de grande importância para indústria de papel, de móveis devido a suas características de suavidade, brilho e baixa resistência, além de sua madeira ser em linha reta com alta densidade (GIRIJASHANKAR, 2011).

Devido aos fatores citados, no Brasil, o eucalipto tem sido extensivamente utilizado em plantios florestais por diversas razões como: grande plasticidade do gênero devido à diversidade de espécie adaptadas a diferentes condições de clima e solo; elevada produção de sementes e facilidade de propagação vegetativa. Essas características se devem ao melhoramento genético, manejo, e adequação aos mais diferentes usos industriais com ampla aceitação no mercado (MORA; GARCIA, 2000).

Assim, 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, 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, SBS, 2010).

A Associação Mineira de Silvicultura destaca que, em 2009, no Brasil foram produzidos 40% do total de carvão vegetal consumido no mundo, o qual se destinou à produção de ferro gusa, aço, ferro ligas, e silício metálico. Por sua vez, o país consumiu cerca de 34 milhões de m³ desse insumo. O estado de Minas Gerais figura como maior produtor e consumidor, pois possui o maior parque siderúrgico a carvão vegetal do mundo, o que contribui de forma direta para a participação do setor florestal (ASSOCIAÇÃO MINEIRA DE SILVICULTURA, AMS, 2010).

2.2 Transformação genética via *Agrobacterium rhizogenes*

Várias espécies de bactérias são capazes de transferir genes para o genoma de plantas superiores. Entre elas, as mais estudadas são as *Agrobacterium tumefaciens* e *Agrobacterium rhizogenes* (BROOHAERTS et al. 2005).

A. rhizogenes são bactérias gram-negativas do solo responsáveis pelo desenvolvimento do fenômeno chamado “raiz em cabeleira” em plantas dicotiledôneas e em algumas monocotiledôneas. Esta particularidade das *A. rhizogenes* foi de grande importância para a biotecnologia vegetal, devido à sua capacidade de hospedar e modificar o genoma da planta, o que resulta em um número significativo de relatos bem sucedidos de transformações via *A. rhizogenes* (HERRERA-ESTRELLA et al., 2004).

A capacidade desta bactéria em formar “raízes em cabeleira” é conferida por um plasmídeo conhecido como plasmídeo de indução de raiz (Ri). A infecção por *A. rhizogenes* resulta na transferência de uma porção do plasmídeo Ri ao genoma da planta hospedeira, onde é integrado de forma estável e expresso promovendo a proliferação de raízes no local infectado (HODGES et al. 2004).

Essas raízes em cabeleira possuem um crescimento ilimitado em meios de cultura isentos de reguladores de crescimento e, além disso, raízes transformadas são muitas vezes capazes de regenerar plantas inteiras viáveis e capazes de manter sua estabilidade genética durante subculturas contínuas e regeneração de plantas (BROOHAERTS et al., 2005).

A transformação genética via *Agrobacterium rhizogenes* tem sido utilizada para diversas finalidades como produção de metabólitos secundários em *Catharanthus roseus* (ZHOU et al., 2012); elucidar a função do HMGR (ácido 3-hidroxi-3metilglutaril-coenzima A redutase) na biossíntese dos terpenos

em *Platycodon grandiflorum* (KIM et al., 2013); caracterização de promotores (HERNANDEZ-GARCIA et al., 2010) e silenciamento de genes via RNAi em soja (SUBRAMANIAN et al., 2005), entre outros. Existem poucos relatos na literatura sobre a transformação genética de espécies do gênero *Eucalyptus* via *A. rhizogenes*. Os trabalhos se limitam a testes de protocolo (MACHADO et al., 1997) e transformação em espécies de eucalipto de difícil enraizamento (MACRAE; STADEN, 1993).

2.3 Transformação genética via *Agrobacterium tumefaciens*

Esse método foi proposto a partir de estudos de uma doença chamada galha-da-coroa causada por *Agrobacterium*. Com a infecção um tumor é formado e com isso há a proliferação descontrolada de células, podendo levar a morte das plantas (TORRES; CALDAS; BUSO, 1999). Para isso, a bactéria transfere genes contidos em uma região específica do plasmídeo Ti (indutores de tumor), denominada T-DNA sendo responsável pela transferência de DNA e sintomas da doença (VALDETARO et al., 2011). Nessa região existem genes, entre eles os oncogenes, responsáveis pela patogenicidade da bactéria (GASSER; FRALEY, 1989).

Sendo assim, há possibilidades de utilizar linhagens de *Agrobacterium* como vetores no processo de transformação de plantas. Para tal, são excluídos os oncogenes, obtendo-se uma linhagem “desarmada” e o vetor é inserido entre as extremidades da região-T (SARTORETTO; CID; BRASILEIRO, 2002).

Dentre os principais fatores que influenciam na transformação genética via *A. tumefaciens* pode-se destacar a cepa de agrobactéria utilizada e o tratamento de inoculação bacteriana. Várias cepas de *A. tumefaciens* foram utilizadas em trabalhos de transformação genética de espécies de *Eucalyptus*, dentre essas se pode destacar a cepa LBA 4404 (GONZÁLEZ et al., 2002;

PRAKASH; GURUMURTHI, 2009) na transformação de *E. tereticornis* e de híbridos de *E. grandis* x *E. urophylla*; EHA 101 na transformação de *E. camaldulensis* (KAWAZU, 2003), EHA 105 na transformação de *E. saligna*, *E. grandis*, *E. dunnii*, *E. urophylla* e híbridos de *E. grandis* x *E. urophylla* (CHENG, 2006; DIBAX et al., 2010) e AGL1 na transformação de *E. camaldulensis* e de híbridos entre *E. grandis* x *E. urophylla* (HARCOURT et al., 2000; NAVARRO et al., 2011).

Com relação ao tratamento de inoculação, a infecção dos explantes pela imersão em solução bacteriana foi utilizada para transformação de *E. camaldulensis* (HARCOURT et al., 2000 e KAWAZU, 2003), *E. saligna* (DIBAX et al., 2010), *E. grandis*, *E. dunnii*, *E. urophylla* e híbridos de *E. grandis* x *E. urophylla* (CHENG, 2006). Alguns autores relataram que o tratamento de sonicação dos explantes por 15 15 ss no momento da inoculação garantiu uma maior eficiência na transformação (GONZÁLEZ et al., 2002; TOURNIER et al., 2003). Segundo Quoirin e Quisen (2006), a aplicação de ultrassom em tecidos de plantas induz a formação de poros microscópicos, os quais permitem a exposição de tecidos internos à infecção por *A. tumefaciens*, o que resulta no aumento dos níveis de expressão transitória do T-DNA. Dessa forma, a eficiência do processo de transformação pode ser aumentada, uma vez que os micro-ferimentos resultantes do tratamento de sonicação induzem a liberação de compostos fenólicos. Estes autores indicam que o sonicador utilizado na transformação geralmente é do tipo banho maria e utiliza uma frequência de 40 kHz.

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), onde os autores inocularam os explantes em solução bacteriana e submeteram a infiltração a vácuo a 400 mmHg por 4 minutos.

Diversos estudos têm mostrado a eficiência da transferência de genes via *Agrobacterium*. Spokevicius et al. (2005), trabalhando com eucalipto, demonstraram a possibilidade de transferir genes via *Agrobacterium* com altos níveis de estabilidade. Prakash e Gurumurthi (2009) obtiveram bons resultados para transferência de gene em *E. tereticones* usando explantes cotiledonares e hipocótilos.

Dibax et al. (2010) apresentaram resultados referentes a transformação via *A. tumefaciens* em *E. saligna* utilizando o gene *P5CSF129A* da via das prolinas.

O sistema de transformação utilizando *A.tumefaciens* possui como vantagem um custo mínimo em equipamentos e protocolos relativamente fáceis, e também, plantas transformadas por esse método normalmente apresentam um baixo número de cópias do DNA heterólogo evitando assim um possível silenciamento gênico (ANDRADE, 2001).

2.4 Transformação genética via Biobalística

A biobalística faz uso de processos físicos de transferência de DNA em células vivas. É um método independente de vírus ou bactérias e não existem limitações relacionadas à patógeno-hospedeiro. Também é uma técnica que não está limitada a espécies e genótipos. Além disso, neste processo podem ser utilizados vetores com tamanho, sequência ou conformação maiores (ALTPETER et al., 2005).

O uso desta técnica de transformação também permite utilizar diversos tecidos alvo como folhas, meristemas, calos, células em suspensão entre outros.

O processo de transformação genética está relacionado ao tipo de tecido, portanto para diferentes tecidos existem diferentes condições de transformação (BARBOSA, 2010).

Devido a essas vantagens a biobalística vem sendo bastante explorada em espécies florestais. Em 1993, foi descrita a primeira metodologia, por bombardeamento, para obtenção de coníferas transgênicas da espécie *Picea glauca* (ELLIS et al., 1993). Em 1998, foi publicado o primeiro trabalho de transformação para o gênero *Pinus*, pelo bombardeamento de culturas embriogênicas de *Pinus radiata* (WALTER et al., 1998). Essa mesma técnica foi também utilizada para obtenção de plantas transgênicas de *Picea mariana* (CHAREST; DEVANTIER; LACHANCE, 1996; TIAN et al., 2000), *Larix laricina* (KLIMASZEWSKA et al., 1997), *Picea abies* (WALTER et al., 1999; CLAPHAM et al., 2000), entre outras.

A principal vantagem do bombardeamento de partículas encontra-se na possibilidade de transferência de genes independentemente do genótipo e sem precisar considerar a compatibilidade entre o hospedeiro e bactéria, tal como exigido pelo sistema de *Agrobacterium*. O bombardeamento é também mais rápido e mais fácil de manipulação. No entanto, essa técnica pode apresentar introdução de múltiplas cópias de DNA que podem sofrer fragmentação e/ou recombinação (HADI; MCMULLEN; FINER, 1996).

Poucos são os relatos de transformação genética via biobalística em espécies do gênero *Eucalyptus*. A primeira tentativa de otimização dos parâmetros biológicos e físicos para bombardeamento de partículas em *E. globulus* foi realizado por Rochange et al. (1995) que baseados em estudos de expressão transitória do gene *gus*, observaram que ambos os dispositivos, tungstênio e ouro apresentaram eficiência de transformação semelhantes e informou que embriões cultivados com seis dias de idade são os mais adequados para a transformação genética do eucalipto.

Mais tarde, Serrano et al. (1996), pela primeira vez relataram a regeneração bem-sucedida de uma única planta *E. globulus* a partir de transformação via biobalística utilizando embriões zigóticos. Biobalística foi também utilizada para transformação genética de hipocótilos e cotilédones de híbridos *E. grandis* x *E. urophylla* (SARTORETTO; CID; BRASILEIRO, 2002).

2.5 Gene repórter

Com a finalidade de avaliar a eficiência do processo de transformação, genes repórteres, que codificam proteínas facilmente detectáveis, podem ser utilizados para a produção de plantas transgênicas. Dentre os genes repórteres, os mais utilizados são: gene *uidA*, isolado de *Escherichia coli*, codifica para a β -glucuronidase (GUS), detectada por métodos histoquímicos; gene *gfp*, extraído de medusa *Aequorea victoria*, codifica para *green fluorescent protein* (GFP); e o 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).

Em eucaliptos o gene repórter mais utilizado é o *uidA*. Prakash e Gurumurthi (2009) utilizaram esse gene para estabelecer um protocolo de transformação, via *A. tumefaciens*, em cotilédones e hipocótilos de *E. tereticornis*. Matsununga et al. (2012) utilizaram o gene *uidA* para seleção das plantas transformadas de *E. globulus* visando tolerância à salinidade. Para *E. gangis* x *E. urophylla*, González et al. (2002) estabeleceram um protocolo de transformação utilizando o método de sonicação e o gene *gus* a partir de sementes.

A proteína GFP tem a capacidade de emitir luz fluorescente verde e pode ser expressa em um organismo heterólogo a partir da transformação genética (CHALFIE et al., 1994).

O GFP não é tóxico para as células, além disso substratos e co-fatores não são necessários para sua fluorescência, com isso, a expressão do GFP pode ser monitorada diretamente em células vivas permitindo que os transformantes possam ser visualmente identificados sem que seus tecidos sejam destruídos (JORDAN, 2000).

A utilização de um marcador visual para aumentar a eficiência de transformação a partir da redução do tempo e do número de material a ser avaliado na etapa de triagem tem sido demonstrada em várias espécies (STEWART 2001). Ribas et al., (2011) utilizaram o gene *gfp* para estabelecer um eficiente protocolo de transformação para calos embriogênicos de *Coffea arabica* (L.); esse gene repórter também foi utilizado para estabelecer protocolos de transformação e regeneração de tecidos foliares em *Citrus sinensis* L. (ULLAH; FU, 2012), em arroz (SAIKA et al. 2012), sorgo (LIU; GODWIN, 2012), entre outros.

Navarro et al. (2011) utilizaram o gene *gfp* em híbridos entre *E. grandis* x *E. urophylla* visando selecionar partes transformadas de calos obtidos a partir de folhas e assim possibilitar a regeneração de plantas transformadas. Isso é possível pelo fato do GFP não ser um método destrutivo diferentemente do *gus* (CHALFIE et al., 1994).

3 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Poucos trabalhos relatam protocolos eficientes de transformação genética para o gênero *Eucalyptus* sendo que esse estudo faz-se necessário devido a alta demanda para inserção de genes de interesse como resistência a patógenos, tolerância a estresses, entre outros visando a formação de plantas transgênicas que possam ser incluídas nos programas de melhoramento.

Com isso, é preciso a obtenção de metodologias eficientes que visam estabelecer os melhores parâmetros como, processo de transformação, cepa, entre outros, para inserção desses genes de interesses com alta eficiência.

Visto isso, com as pesquisas do primeiro artigo do presente trabalho objetivou estabelecer uma metodologia de transformação via *Agrobacterium rhizogenes*, utilizando a cepa MSU440 em um híbrido comercial de *E. grandis* x *E. urophylla*.

No segundo artigo, avaliou-se a eficiência de diferentes processos de transformação via método indireto, utilizando *Agrobacterium tumefaciens* (agitação, sonicação e infiltração) e método direto via biobalística, visando assim, estabelecer o melhor processo para obtenção de plantas transgênicas.

REFERÊNCIAS

ACERETO-ESCOFFIE, P. O. M. et al. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Musa acuminata* cv. “Grand Nain” scapels by vacuum infiltration. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, 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.

ALTPETER, F. et al. Particle bombardment and the genetic enhancement of crops: myths and realities. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 15, n. 3, p. 305–32, Apr. 2005.

ANDRADE, A. **Avaliação de parâmetros que influenciam a transformação genética de *E. grandis* via *Agrobacterium***. 2001. 123 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Genética e Melhoramento de Plantas)-Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” Piracicaba, 2001.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS PRODUTORES DE FLORESTAS PLANTADAS. **Anuário estatístico**: ano base 2006. Brasília, 2007. 15 p. Disponível em: <<http://www.abraflor.org.br/estatísticas>>. Acesso em: 20 jan. 2012.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS PRODUTORES DE FLORESTAS PLANTADAS. **Anuário estatístico**: ano base 2011. Brasília, 2012. 80 p. Disponível em: <<http://www.abraflor.org.br/estatísticas>>. Acesso em: 05 mar. 2013.

ASSOCIAÇÃO MINEIRA DE SILVICULTURA. **Estatísticas**. Disponível em: <<http://www.silviminas.com.br>>. Acesso em: 16 ago. 2010.

BARBOSA, A. L. **Regeneração de plantas a partir de calos embriogênicos e discos foliares visando a transformação genética de cana-de-açúcar (*Saccharum SSP.*)**. 2010. 64 p. Dissertação (Mestrado Fisiologia e Bioquímica de Plantas)-Universidade de São Paulo. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2010.

BROOThAERTS, W. et al. Gene transfer to plants by diverse species of bacteria. **Nature**, v. 10, n. 433, p. 629-633, Feb. 2005.

CANCHE-MOO, R. L. R. et al. Genetic transformation of *Coffea canephora* by vacuum infiltration. . **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**: an international journal on the cell biology of higher plants, Dordrecht , v.84, p.373–377, 2006.

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

CHAREST, P. J.; DEVANTIER, Y.; LACHANCE, D. Stable genetic-transformation of *Picea mariana* (black spruce) via particle bombardment. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, Columbia, v. 32, p. 91-99, 1996

CHENG. *Eucalyptus urophylla* transformation and selection. Patent: US20060101537 A1, May 11, 2006

CLAPHAM, D. et al. Gene transfer by particle bombardment to embryogenic cultures of *Picea abies* and the production of transgenic plantlets. **Scandinavian Journal of Forest Research**, v. 15, p. 151-160, 2000.

COSTANZA, A.; McCORD, S. **Forest biotechnology and its responsible use**. [S. l.]: Institute of Forest Biotechnology, 2009.

DIBAX. R. et al. Organogenesis and *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Eucalyptus saligna* with P5CS gene. **Biology Plant**, Czech Republic, v. 54, n. 1, p. 6–12, 2010.

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

DOSSA, D. et al. **Produção e rentabilidade do eucalipto em empresas florestais**. Colombo: Embrapa, 2002. p. 4.

ELDRIGE, K. G. et al. **Eucalypt domestication and breeding**. New York: Oxford University, 1993. p. 288.

ELLIS, D. D. et al. Stable transformation of *Picea glauca* by particle acceleration. **Nature Biotechnology**, v. 11, p. 84-89, 1993.

GASSER, C. S.; FRALEY, R. T. Genetically engineering plants for crop improvement. **Science**, v. 244, p. 1293-1299, 1989.

GIRIJASHANKAR, V. Genetic transformation of eucalyptus. **Physiology Molecular Biology Plants**, v. 17, n. 1, p. 9–2, 2011.

GIT FORESTRY. **Cultivated eucalyptus global map 2010**. 2011. Disponível em: <<http://www.git-forestry.com>>. Acesso em: 10 dez. 2012.

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

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

HARCOURT, R. L. et al. Insect- and herbicide-resistant transgenic eucalyptus. **Molecular Breeding**, v. 6, n. 1, p. 307–315, 2000.

HERNANDEZ-GARCIA, C. M. et al. High level transgenic expression of soybean (*Glycine max*) *GmERF* and *Gmubi* gene promoters isolated by a novel promoter analysis pipeline. **BMC Plant Biology**, London, v. 4, n. 10, p. 237, Nov. 2010.

HERRERA-ESTRELLA, L.; SIMPSON, J.; MARTÍNEZ-TRUJILLO, M. Transgenic plants: an historical perspective. In: PENÁ, L. (Ed.). **Methods in molecular biology: transgenic plants—methods and protocols**. Totowa: Humana, 2004. v. 286. p. 3–31

HODGES, L. D.; CUPERUS, J.; REAM, W. *Agrobacterium rhizogenes* GALLS protein substitutes for *Agrobacterium tumefaciens* single-stranded DNA-binding protein VirE2. **Journal Bacteriology**, v. 186, n. 10, p. 3065–3077, 2004.

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**, Oxford, v. 6, p. 3901-3907, 1987.

JORDAN, M. C. Green fluorescent protein as a visual marker for wheat transformation. **Plant Cell Report**, Berlin, v. 19, p. 1069–1075, 2000.

KAWAZU, T. **Process for transformation of mature trees of *eucalyptus plants***. Patent US 6563024. May 13, 2003.

KIM, Y. K. et al. Enhanced accumulation of phytosterol and triterpene in hairy root cultures of *Platycodon grandiflorum* by overexpression of *Panax ginseng* HMGR. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 8, p. 1928-1934, Feb. 2013.

KLIMASZEWSKA, K. et al. *Larix laricina* (tamarack) - somatic embryogenesis and genetic transformation. **Canadian Journal of Forest Research**, Ottawa, v. 27, p. 538-550, 1997.

LIU, G.; GODWIN, I. D. Highly efficient sorghum transformation. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 31, n. 6, p. 999–1007, June 2012.

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

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

MORA, A. L.; GARCIA, C. H. **A cultura do Eucalipto no Brasil**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Silvicultura, 2000. p. 112.

MATSUNUNGA, E. et al. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Eucalyptus globulus* using explants with shoot apex with introduction of bacterial choline oxidase gene to enhance salt tolerance. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 31, p. 225-235, 2012.

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

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**, Columbia, v. 45, n. 4, p. 429-34, 2009.

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

QUOIRIN, M.; QUISEN, R. Advances in genetic transformation of Eucalyptus species. In: FRANCHE, C. (Ed.). **Molecular biology tropical plants**. Kerala: Research Signpost, 2006. p. 41–56.

RIBAS, A. F. et al. Agrobacterium-mediated genetic transformation of *Coffea arabica* (L.) is greatly enhanced by using established embryogenic callus cultures. **BMC Plant Biology**, London, v. 11, n. 1, p. 92, May 2011.

ROCHANGE, F. et al. DNA delivery into eucalyptus-globulus zygotic embryos through biolistics - optimization of the biological and physical parameters of bombardment for 2 different particle guns. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 14, n. 10, p. 674-8, 1995.

SAIKA, H. et al. Sequential monitoring of transgene expression following agrobacterium-mediated transformation of rice. **Plant and Cell Physiology**, v. 53, n. 11, p. 1974–1983, 2012.

SANTOS, A. F.; AUER, C. G.; GRIGOLETTI JÚNIOR, A. **Doenças do eucalipto no sul do Brasil**: identificação e controle. Colombo: Embrapa, 2001.

SANTOS, A. F. dos et al. Ocorrência de mancha foliar bacteriana em plantios de eucalipto no Estado de Mato Grosso e de Santa Catarina. **Tropical Plant Pathology**, Lavras, v. 35, p. 232, 2010.

SARTORETTO, L. M.; CID, L. P. B.; BRASILEIRO, A. C. M. Biolistic transformation of *Eucalyptus grandis* x *E-urophylla* callus. **Functional Plant Biology**, Collingwood, v. 29, n. 8, p. 917-24, 2002.

SERRANO, L. et al. Genetic transformation of *Eucalyptus globulus* through biolistics: complementary development of procedures for organogenesis from zygotic embryos and stable transformation of corresponding proliferating tissue. **Journal of Experimental Botany**, v. 47, p. 285-290, 1996.

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. 2012.

SPOKEVICIUS, A. V. et al. *Agrobacterium*-mediated in vitro transformation of wood-producing stem segments in eucalypts. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 23, p. 617-24, 2005.

STEWART, C. N. The utility of green fluorescent protein in transgenic plants. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 20, p. 376–382, 2001

SUBRAMANIAN, S. et al. RNA interference of soybean isoflavone synthase genes leads to silencing in tissues distal to the transformation site and to enhanced susceptibility to *Phytophthora sojae*. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 137, p. 1-9, 2005.

TEULIERES, C.; MARQUE, C. Eucalyptus. In: PUA, E. C.; DAVEY, M. R. (Ed.). **Biotechnology in agriculture and forestry 60, transgenic crops**. New York: V. Springer, 2007. p. 387–402.

TIAN, L. N. et al. Hygromycin resistance is an effective selectable marker for biolistic transformation of black spruce (*Picea mariana*). **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 19, p. 358-362, 2000.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa, 1999. 864 p.

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

ULLAH, E.; FU, K. X. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation and regeneration of transgenic plants using leaf segments as explants in Valencia sweet orange. . **Plant Cell, Tissue and Organ Culture: an international journal on the cell biology of higher plants**, Dordrecht, n. 109, p. 383–390, 2012.

VALDERATO, E. B. et al. Árvores geneticamente modificadas: técnicas, aplicações, riscos e os potenciais impactos associados a sua utilização. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 31, n. 65, p. 51-61, 2011.

WALTER, C. et al. Stable transformation and regeneration of transgenic plants of *Pinus radiata* D. Don. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 17, p. 460-468, 1999.

ZHOU, M. L. et al. An protocol for genetic transformation of *Catharanthus roseus* by *Agrobacterim rhizogenes* A4. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 166, n. 7, p. 1674-1684, Apr. 2012.

SEGUNDA PARTE - ARTIGOS

ARTIGO 1 Transformação genética de um híbrido comercial entre
Eucalyptus grandis x *Eucalyptus urophylla* via *Agrobacterium*
rhizogenes

Flávia Pereira Balieiro¹

Arquivo normalizado de acordo com a NBR 6022 (ABNT, 2003)

¹ Autor para correspondência: f.balieiro@hotmail.com – Universidade Federal de Lavras

RESUMO

Este trabalho é parte de um projeto que visa estabelecer protocolos de transformação genética para dois híbridos de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*. Baseado em um trabalho anterior com o híbrido LCBM2, um eficiente protocolo de transformação de raízes via *Agrobacterium rhizogenes* foi testado no híbrido LCBM1 de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*. Raízes foram transformadas via *Agrobacterium rhizogenes* pelo método de infiltração a vácuo com a cepa MSU440 contendo o plasmídeo pEZR (H)-LN, com o gene repórter *gfp*. As plantas tiveram a base cortada e foram submetidas a vácuo durante 4 min a 400 mmHg. As raízes foram cocultivadas em meio MS por 5 dias à 19 °C. Após 90 dias as raízes foram visualizadas em microscópio de fluorescência Zeiss HBO 100 para análise via GFP e depois realizada análise via PCR. Ao total foram analisadas 100 plantas e destas 70% apresentaram amplificação de um fragmento contendo 400 pb confirmando assim, a presença do gene *gfp*. Com isso, pode-se inferir que o método de transformação e a cepa utilizada constituem-se em uma eficiente metodologia para o genótipo estudado.

Palavras-chave: Eucalipto. *Agrobacterium rhizogenes*. *gfp*.

**Genetic transformation of a *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*
commercial hybrid via *Agrobacterium rhizogenes***

ABSTRACT

This work is part of a project which aimed at establishing genetic transformation protocols for two *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* hybrids. Based on a previous work with the LCBM2 hybrid, an efficient root transformation via *Agrobacterium rhizogenes* protocol was tested on the LCBM1 *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* hybrid. Roots were transformed via *Agrobacterium rhizogenes* by the vacuum infiltration method with the MSU440 strain containing the pEZR (H)-LN plasmid, with the *gfp* reporter gene. The plants had their base cut and were submitted to vacuum during 4 min at 400 mmHg. The roots were co-cultivated in a MS medium for 5 days at 19 °C. After 90 days, the roots were visualized in a Zeiss HBO 100 fluorescence microscope for analysis via GFP and, subsequently, via PCR. A total of 100 plants were analyzed and, of these, 70% presented amplification of a fragment containing 400 pb, thus, confirming the presence of the *gfp* gene. Thus, we may infer that the transformation method and the strain used constitute an efficient methodology for the studied genotype.

Keywords: *Eucalyptus*. *Agrobacterium rhizogenes*. *gfp*.

1 INTRODUÇÃO

O eucalipto é uma das espécies florestais mais cultivadas nos países tropicais e subtropicais devido à sua alta adaptabilidade, capacidade de crescimento e qualidade da madeira (NAVARRO et al., 2011). Devido à alta demanda de produtos comerciais provenientes do gênero *Eucalyptus*, torna-se necessário a obtenção de genótipos mais produtivos e tolerantes/resistentes a estresses abióticos e bióticos.

Os programas de melhoramento têm contribuído de forma expressiva para o aumento da produtividade deste gênero, porém os mesmos possuem limitações consequentes de características intrínsecas a essas espécies, destacando-se o longo tempo necessário para as plantas atingirem uma estabilidade fenotípica e maturidade reprodutiva (DIOUF, 2003; POUPIN; ARCEJOHNSON, 2005).

Dessa forma, a transformação genética abre novas perspectivas aos programas de melhoramento permitindo acelerar o processo para obtenção de mais genótipos adicionando novos genes, principalmente aqueles que não ocorrem naturalmente no eucalipto, sendo que estes materiais transformados podem ser rapidamente incorporados aos programas de melhoramento convencional, reduzindo assim o tempo necessário para a geração de novos cultivares (PRAKASH et al., 2009).

Para algumas espécies vegetais importantes, incluindo a maioria das espécies lenhosas, ainda não está estabelecido um método de transformação eficiente (RIBAS et al., 2011). Em função do comportamento genético diferenciado entre genótipos, faz-se necessária a

busca de metodologias de transformação genética adequadas a cada espécie e híbrido.

Uma das técnicas de transformação genética é a mediada por *Agrobacterium rhizogenes* em que, sua infecção é seguida pela transferência, integração e expressão do T-DNA do plasmídeo e tem como consequência a formação do fenômeno chamado “raiz em cabeleira” (BROOHAERTS et al., 2005). As raízes em cabeleira são facilmente distinguíveis pelo crescimento rápido, altamente ramificadas na ausência de reguladores de crescimento e pelo crescimento radicular plagiotrópico (COLLIER et al., 2005).

As mudanças fenotípicas dessas raízes ocorrem devido à interação da região TL-DNA, pois essa região possui locos chamados *rolA*, *rolB*, *rolC* e *rolD* envolvidos na formação das raízes em cabeleira (WHITE et al., 1985; CHRISTEY, 2001).

A transformação por *A. rhizogenes* tem como vantagem ser um método rápido, com elevado número de transformantes obtidos, sendo utilizada para identificar genes em potencial e caracterizar sua expressão nos tecidos estavelmente transformados (CAO et al., 2009).

Para a caracterização da expressão gênica, faz-se necessário o estudo prévio de um protocolo de transformação genética eficiente em que são utilizados genes repórter como o *gfp*. A proteína verde fluorescente da água-viva tornou-se um marcador muito eficaz em transformação genética devido às vantagens de não destruir o material vegetal e poder ser analisado em tempo real (STEWART, 2001).

Poucos são os relatos de transformação via *A. rhizogenes* em eucalipto. Macrae e Staden (1993) estudaram o efeito de diferentes cepas

de *A. rhizogenes* (LBA9402, R1601 e TR 8,3) na infecção de espécies de eucalipto como *E. grandis*, *E. dunii* e *E. nitens*. Em outro trabalho também foi testada a eficiência de cinco cepas de *A. rhizogenes* em um híbrido de *E. grandis* x *E. urophylla* (MACHADO et al., 1997). Em ambos trabalhos não foi apresentada nenhuma análise via gene repórter ou análise molecular, e a eficiência do processo foi estabelecida por esses autores apenas pela formação do fenótipo raiz em cabeleira.

Tendo em vista a pouca informação quanto ao processo de transformação via *A. rhizogenes* para eucalipto, o objetivo com este trabalho foi identificar a eficiência do processo de transformação no híbrido LCBM1, via gene repórter *gfp*, utilizando o processo de infecção e cepa que foram estabelecidos em trabalhos anteriores com uma diferente variedade de urograndis.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Material vegetal e condições de cultivo

Meristemas de um híbrido comercial de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*, denominado como LCBM1, foram estabelecidos *in vitro*. Os meristemas foram desinfestados com pastilhas de paraformaldeído durante 40 min e posteriormente foram inoculados em meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) e mantidos no escuro. Após 7 dias os meristemas foram transferidos para o meio de multiplicação MS acrescido de 5,70 µM de AIA (ácido 3-indolacético) e 0,35 µM de BAP (6-benzilaminopurina) e mantidos em fotoperíodo de 16 horas a 25±2 °C. Após 3 meses as plântulas formadas foram transferidas para meio de enraizamento MS com ausência de vitaminas e suplementado com 4,90 µM de AIB (ácido 3-indolbutírico).

Todos os meios tiveram acréscimo de 3% de sacarose, solidificados com 0,17% de phytagel e autoclavados a 121 °C e 1 atm.

Plantas com 30 dias em meio de enraizamento foram utilizadas no processo de transformação genética.

2.2 *Agrobacterium rhizogenes* e Plasmídeo

O plasmídeo utilizado nas transformações foi o pEZR (H)-LN cedido pela Universidade de Wageningen (Holanda). Este vetor possui o

gene *gfp* como gene repórter, o promotor p35SCaMV e o gene de seleção *hptIII* para conferir resistência à higromicina. O plasmídeo foi transferido para *Agrobacterium rhizogenes* cepa MSU440 por eletroporação. Uma colônia da *Agrobacterium* transformada foi inoculada em meio líquido Luria broth (LB) suplementado com Kanamicina (50 mg.L^{-1}). A cultura foi incubada em shaker a $28 \text{ }^\circ\text{C}$ e 200 rpm por 48 horas. Quando atingiram uma OD_{600} de 0,7 as células bacterianas foram centrifugadas a $15,5 \text{ g}$ por 10 min e o pellet foi ressuspêndido em meio MS suplementado com 30 mg.L^{-1} de sacarose e $100 \text{ } \mu\text{M}$ de acetoseringona para transformação das raízes.

2.3 Transformação das plantas via *Agrobacterium rhizogenes*

Para o experimento de transformação foram utilizadas 200 plantas que estavam a 45 dias em meio de enraizamento e 50 plantas como controle nas mesmas condições. A solução bacteriana com OD_{600} de 0.7 foi utilizada no processo de infiltração a vácuo.

As plantas a serem transformadas tiveram a base radicular cortada e foram transferidas para elermeyer de 10 mL contendo a cultura bacteriana. Os elermeyers foram levados para câmara de vácuo estéril e submetidos a vácuo de 400 mmHg por 4 minutos (CANCHE-MOO et al., 2006), as plantas controle foram infiltradas em meio de cultura MS na ausência de bactéria. Após este processo, as plantas foram cocultivadas em meio de cultura MS acrescido de $100 \text{ } \mu\text{M}$ de acetoseringona por 5 dias a $19 \text{ }^\circ\text{C}$ em câmara de crescimento B.O.D no escuro.

Após o período de cocultivo as plantas foram transferidas para meio de enraizamento acrescido de 500 mg.L⁻¹ de Tioxin[®] (Ticarcilina dissódica) com o objetivo de eliminar as bactérias utilizadas na transformação. As plantas foram mantidas nesse mesmo meio que foi renovado a cada 30 dias com concentrações decrescentes (400, 300, 200 e 100 mg.L⁻¹) do antibiótico Tioxin[®] até crescimento total das raízes, o que ocorreu em aproximadamente 90 dias.

2.4 Análise via GFP

As raízes foram visualizadas em microscópio de fluorescência Zeiss HBO 100 com a objetiva de 20x e filtro FITC, para análise de GFP.

2.5 Extração de DNA genômico e análise via PCR

Para extração do DNA genômico foi utilizado o protocolo de extração CTAB (Cationic Hexadecyl Trimethyl Ammonium Bromide). Aproximadamente 200 mg de raízes foram macerados em nitrogênio líquido e transferidos para tubo Eppendorf de 2 mL o qual continha 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. Posteriormente foi adicionado 2% (v.v⁻¹) de β-mercaptoetanol, e a solução foi incubada por 40 minutos a 65 °C e depois centrifugada (13,4 g) por 10 minutos.

O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e foi adicionado o mesmo volume de clorofórmio: álcool isoamílico 24:1 (v.v⁻¹), seguido de homogeneização e nova centrifugação (13,4 g) 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 incubada 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 (13,4g).

Posteriormente, o sobrenadante foi descartado, o pellet lavado em 400 µL de etanol absoluto e ressuspendido com 30 µL de água ultrapura autoclavada. As amostras foram armazenadas a -20 °C. O DNA genômico foi quantificado em espectrofotômetro (Nanodrop[®] ND-1000) a A₂₆₀ nm.

A confirmação da presença do gene *gfp* foi realizada por análise de PCR utilizando 1 U de GoTaq[®] Flexi DNA polimerase (Promega[®]), 3 µL tampão 5 X, 0,6 mMol.L⁻¹ dNTP mix, 1,75 mM de MgCl, 0,5 ng de cada *primer* 5'AAGGGCGAGGAGCTGTTTCAC3', 5'TGTTGCCGTCCTCCTTGAAGTC3' e 6,66 ng/µL de DNA, completando o volume final com água ultrapura autoclavada para 15 µL.

A amplificação foi realizada em termociclador *Eppendorf*[®] *Mastercycler*, programado com temperatura de desnaturação inicial de 95 °C, por 5 minutos, 30 ciclos de amplificação compostos de 3 etapas: 95 °C, por 30 segundos; 63 °C, por 30 segundos e 72 °C, por 2 minutos, com uma extensão final de 2 minutos a 72 °C.

Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 0,8% (m.v⁻¹) corados com Brometo de Etídio (0,5 µg.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 min, o gel foi visualizado sob luz ultravioleta e a imagem captada pelo fotodocumentador EDAS 290 (Kodak[®]).

2.6 Avaliação

A eficiência de transformação foi calculada pela proporção (p) de plantas transformadas ($p = x/n$), em que 'x' corresponde ao número de plantas transformadas confirmadas por PCR e 'n' o número de plantas que sobreviveram ao período de cocultivo (RIBAS, 2011).

3 RESULTADOS

De um total de 200 plantas transformadas, 100 plantas sobreviveram ao processo de cocultivo. Após 90 dias da inoculação do híbrido LCBM1 com *Agrobacterium rhizogenes* MSU440 foi observado o desenvolvimento do fenótipo raiz em cabeleira no local infectado, demonstrando que este híbrido também é susceptível a *A. rhizogenes*.

Estas raízes foram visualizadas em microscópio de fluorescência sob a luz azul e algumas apresentaram a cor verde fluorescente intensa, que corresponde à integração, estabilidade e expressão do gene *gfp*, confirmando assim a eficiência da transformação genética via *Agrobacterium rhizogenes*. As raízes controle e não transformadas apresentaram uma coloração verde, porém com menor intensidade (Figura 1).

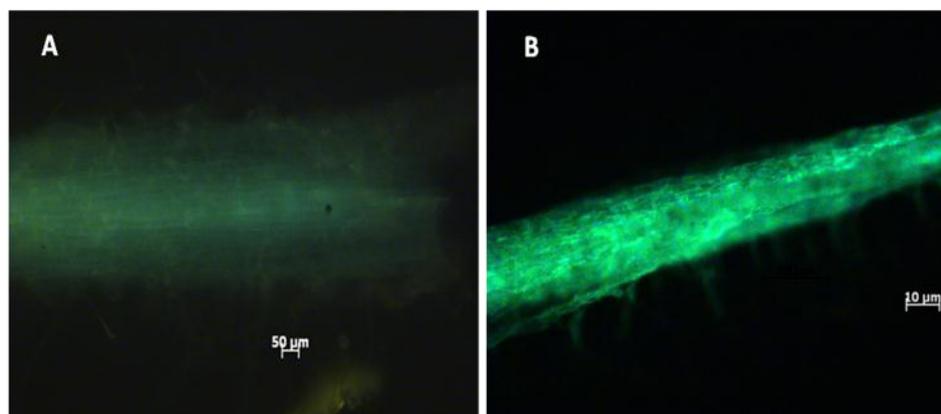


Figura 1 Raiz de híbrido entre *E. grandis* x *E. urophylla*, 90 dias após o cocultivo com *A. rhizogenes*. (A) Raiz não transformada. (B) Raiz transformada com expressão do GFP sob luz fluorescente.

De acordo com a metodologia utilizada, foi observado que algumas vezes a intensidade da fluorescência não permitia a distinção clara entre as raízes transformadas que possuem a expressão do gene *gfp* daquelas não transformadas.

Esta dificuldade operacional foi minimizada pela análise dos transformantes via técnica de PCR. Para tal, extraiu-se o DNA das raízes das plantas sobreviventes e utilizou-se *primers* específicos para amplificar o gene *gfp*.

Das 100 plantas que sobreviveram ao processo de cocultivo, em 70 foram observadas um amplicon de 400 pb correspondente ao tamanho esperado para o gene *gfp* observado no gel representativo das análises de PCR (Figura 2). Não houve amplificação nas plantas controle (PC). C+ indica o controle positivo - plasmídeo pEZR (H)-LN, C- o controle negativo da reação. Colunas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 11, 12 e 14 representam fragmentos amplificados do gene *gfp* indicando raízes positivamente

transformadas e colunas 7, 9, 13, 15 e 16 indicam raízes não transformadas.

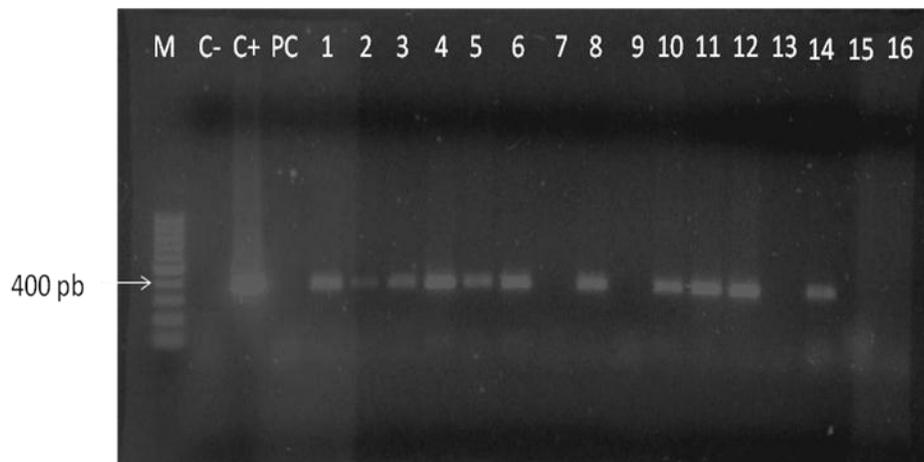


Figura 2 Gel representativo da análise de PCR do DNA isolado de raízes de eucalipto transformado com pEZR (H)-LN.

Neste caso, a infecção da cepa MSU440 pelo processo de infiltração a vácuo no híbrido LCBM1, permitiu a obtenção de 70% de plantas com raízes transformadas, o que pode ser considerado uma alta taxa de eficiência no processo de transformação genética adotado.

A próxima etapa em um processo de transformação é a análise do número de cópias inseridas no transgênico, que normalmente é feita pelas análises de PCR em tempo real ou *Southern blot*. Os procedimentos para verificar esse número de cópias inseridas nas raízes geneticamente modificadas estão em andamento.

4 DISCUSSÃO

A eficiência de um processo de transformação genética via *Agrobacterium rhizogenes* depende de diversos fatores, sendo o principal a susceptibilidade do material vegetal e a estirpe da bactéria utilizada.

Nesse trabalho testou-se a eficiência da bactéria MSU440 pelo método de infiltração a vácuo em um híbrido comercial de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*.

Das 100 plantas que sobreviveram ao cocultivo, 70 delas apresentaram via PCR a amplificação de 400 pb correspondente ao gene *gfp* integrado no genoma das plantas, obtendo-se uma eficiência de aproximadamente 70%.

Em outro trabalho utilizando a mesma cepa e a mesma metodologia, no entanto, com outro híbrido comercial de *E. grandis* x *E. urophylla*, foi verificado uma eficiência de 40% de transformação (MENDONÇA, 2011). Portanto, a diferença verificada nos dois trabalhos reside na combinação entre a cepa bacteriana e o genótipo utilizado, e que corroboram com as observações feitas por Lin et al. (2003).

Outras cepas de *Agrobacterium rhizogenes* (A4, R1601, 2659, 8196 e LBA9402) também foram testadas em outro híbrido de *E. grandis* x *E. urophylla* (MACHADO et al.; 1997). Neste trabalho verificou-se que a cepa R1601 apresentou os melhores resultados, promovendo uma eficiência de 20%. Em outro trabalho foi realizado também teste de cepas de *A. rhizogenes* (LBA9402, R160 e TR 8,3) em diferentes espécies de eucalipto como *E. grandis*, *E. dunnii* e *E. nitens* (MACRAE; STADEN.;

1993). Os autores verificaram que a cepa LBA9402 apresentou os melhores resultados, pois nas três espécies de eucalipto obteve-se 80% na formação de raízes em cabeleira. Porém, para ambos os autores a eficiência foi avaliada apenas mediante uma análise visual da presença de raízes em cabeleira.

No presente trabalho, foi verificado que nem todas as plantas com esse fenótipo possuíam o gene *gfp* integrado, o que também pode ter ocorrido nos trabalhos citados, com a possibilidade destes terem falsos positivos em seus resultados.

Outro fator que pode interferir no processo de transformação é o método utilizado durante a infecção do tecido pela bactéria. O processo de infiltração a vácuo é um sistema de transformação que tem apresentado bons resultados na produção de plantas transgênicas de feijão (LIU et al., 2005), *Arabidopsis* (CLOUGH; BENT 1998), café (CANCHE-MOO et al., 2006), algodão (LEELAVATHI et al., 2004) e trigo (CHENG et al., 1997). Isso se deve ao fato deste processo aumentar a penetração de células de *Agrobacterium* nos tecidos vegetais e com isso, permitir a integração de genes no genoma vegetal (SUBRAMANYAM et al., 2011).

A eficiência da transformação genética também pode ser afetada pelo acréscimo de compostos fenólicos durante o processo de infecção e no período de cocultivo. O mais utilizado tem sido o composto acetoseringona que possui a capacidade de ativar os genes de virulência presentes no plasmídeo (STACHEL et al., 1985). Subramanyan et al. (2011) ao estudarem a eficiência desse composto na transformação genética de banana verificaram que conforme o aumento da concentração

de acetoseringona, maior era a eficiência do processo de transformação. No presente trabalho, apesar de não ter sido testada outras concentrações de acetoseringona, a adição de 100 μ M na transformação do híbrido de *E. grandis* x *E. urophylla* pode ter contribuído significativamente para o grande aumento na eficiência da transformação.

A análise da expressão do gene *gfp* é considerada um método de avaliação não destrutivo e de visualização em tempo real (STEWART 2001). A metodologia utilizada no presente estudo não permitiu em alguns casos, a distinção clara entre os materiais transformados e não transformados. Esse resultado difere dos trabalhos demonstrados para outras espécies como soja (WEBER; BODANESE-ZANETTINI, 2011), cenoura (BARANSKI et al., 2006) e pimenta (AARROUF et al., 2012). Porém, em eucalipto, Mendonça (2011) também obteve dificuldade com a visualização desse gene repórter.

Isso pode ter ocorrido visto que o GFP possui modificações, constituindo assim variáveis desse gene, como exemplo o eGFP, smGFP, sGFP, entre outros (STEWART, 2001). Com isso, o filtro utilizado pode não ser o correspondente para o gene utilizado neste trabalho dificultando a visualização dos tecidos transformados, sendo assim necessária a utilização da técnica de PCR para confirmar a eficiência do processo de transformação.

As PCRs demonstraram que os parâmetros utilizados no processo de transformação apresentaram uma alta eficiência sendo esta essencial para trabalhos como rastreamento de genes e potenciais promotores nos tecidos estavelmente transformados (CHO et al., 2000).

5 CONCLUSÃO

O método por infiltração a vácuo e a cepa de *A. rhizogenes* MSU440 formam um conjunto eficiente para a transformação genética do híbrido LCBM1 entre *E. grandis* x *E. urophylla*.

O trabalho verificou dificuldades na visualização do gene *gfp*, sendo preciso a utilização da técnica de PCR para estabelecer a eficiência do processo.

O híbrido LCBM1 pode ser utilizado para teste de expressão de genes de interesse visto que se obtêm com ele uma alta taxa de transformação genética, 70%, e baixa taxa na mortalidade de plantas.

REFERÊNCIAS

- ARROUF, J. et al. *Agrobacterium rhizogenes*-dependent production of transformed roots from foliar explants of pepper (*Capsicum annuum*): a new and efficient tool for functional analysis of genes. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 31, p. 391–401, 2012.
- BARANSKI, R.; KLOCKE, E.; SCHUMANN, G. Green fluorescent protein as an efficient selection marker for *Agrobacterium rhizogenes* mediated carrot transformation. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 25, p. 190–197, 2006.
- BROOThAERTS, W. et al. Gene transfer to plants by diverse species of bacteria. **Nature**, v. 10, n. 433, p. 629-633, Feb. 2005.
- CANCHE-MOO, R. L. R. et al. Genetic transformation of *Coffea canephora* by vacuum infiltration. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture: an international journal on the cell biology of higher plants**, Dordrecht, v. 84, n. 3, p. 373–377, Mar. 2006.
- CAO, D. et al. Assessment of conditions affecting *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of soybean. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture: an international journal on the cell biology of higher plants**, Dordrecht, v. 96, p. 45-52, 2009.
- CHENG, M. et al. Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Physiology**, Washington, v. 115, p. 971–980, 1997.
- CHO, H. J.; FARRAND, S. K.; NOEL, G. R. High-efficiency induction of soybean hairy roots and propagation of the soybean cyst nematode. **Planta**, Berlin, v. 210, p. 195-204, 2000.
- CHRISTEY, M. C. Invited review: use of ri-mediated transformation for productions of transgenic plants. **In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, Columbia, v. 37, p. 687-700, 2001.

CLOUGH, S. J.; BENT, A. F. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. **Plant Journal: for cell and molecular biology**, Oxford, v. 16, p. 735–743, 1998.

COLLIER, R. et al. *Ex vitro* composite plants: an inexpensive, rapid method for root biology. **Plant Journal: for cell and molecular biology**, Oxford, v. 43, p. 449-457, 2005.

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

LEELAVATHI, S. et al. A simple and rapid *Agrobacterium* mediated transformation protocol for cotton (*Gossypium hirsutum* L.): embryogenic calli as a source to generate large numbers of transgenic plants. **Plant Cell Report**, Berlin, v. 22, p. 465–470, 2004.

LIN, H. W.; KWOK, 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.

LIU, Z. et al. The novel use of a combination of sonication and vacuum infiltration in *Agrobacterium*- mediated transformation of kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) with *lea* gene. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 16, p. 189–197, 2005.

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

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

MENDONÇA, E. G. **Transformação genética e rejuvenescimento in vitro de híbridos naturais de *Eucalyptus urophylla***. 2011. 82 p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

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

NAVARRO, M. et al. Two EguCBF1 genes overexpressed in *Eucalyptus* display a different impact on stress tolerance and plant development. **Plant Biotechnology Journal**, Oxford, v. 9, p. 50-63, 2011.

POUPIN, M.; ARCE-JOHNSON, P. Transgenic trees for a new era. **In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, Columbia, v. 41, p. 91- 101, 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**, Columbia, v. 45, n. 4, p. 429-34, 2009.

RIBAS, A. F. et al. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of *Coffea arabica* (L.) is greatly enhanced by using established embryogenic callus cultures. **BMC Plant Biology**, London, v. 11, n. 1, p. 92, 2011.

STACHEL, S. E. et al. Identification of the signal molecules produced by wounded plant cells that activate *Agrobacterium tumefaciens*. **Nature**, v. 318, p. 624–629, Dec. 1985.

STEWART, C. N. The utility of green fluorescent protein in transgenic plants. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 20, p. 376–382, 2001.

SUBRAMANYAM, K. et al. Highly efficient *Agrobacterium* – mediated transformation of banana cv. Rasthali (AAB) via sonication and vacuum infiltration. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 30, p. 425-436, 2011.

WEBER, R. L. M.; BODANESE-ZANETTIN, M. H. Induction of transgenic hairy roots in soybean genotypes by *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 46, n. 9, p. 1070-1075, set. 2011.

WHITE, F. F. et al. Molecular and genetic analysis of the transferred DNA regions of the root-inducing plasmid of *Agrobacterium rhizogenes*. **Journal Bacteriology**, Washington, v. 164, n. 1, p. 33-44, Oct. 1985.

ARTIGO 2 Transformação genética de híbrido entre *Eucalyptus grandis*
x *Eucalyptus urophylla* via *Agrobacterium tumefaciens* e
biobalística

Flávia Pereira Balieiro²

Arquivo normalizado de acordo com a NBR 6022 (ABNT, 2003)

² Autor para correspondência: f.balieiro@hotmail.com – Universidade Federal de Lavras

RESUMO

Objetivou-se neste trabalho comparar os sistemas de transformação genética mediados por *Agrobacterium tumefaciens* e biobalística em um híbrido comercial de eucalipto. Para o sistema de *A. tumefaciens* foram avaliados três métodos de infecção: agitação, sonicação e infiltração a vácuo. Meristemas do híbrido comercial denominado de LCBM 2, foram inoculados em meio de indução de calos MS modificado suplementado com auxina e citocinina. Após 10 dias mantidos no escuro os calos formados foram submetidos a diferentes processos de transformação. Para o método de agitação, o procedimento foi realizado durante 30 min a 100 rpm em shaker, a sonicação dos calos foi realizada durante 15 s a uma frequência de 40 kHz, e o terceiro método testado, infiltração a vácuo por 4 min e 400 mmHg. Para o processo de biobalística, os calos foram colocados em meio osmótico com 120 mg.L⁻¹ de sacarose durante 24 horas antes e depois do bombardeamento que foi realizado a uma pressão de gás Hélio de 1200 PSI e distância do alvo de 9 cm. Após o cocultivo, em meio de indução MS com acréscimo de 100 µM de acetoseringona durante 5 dias, os calos foram transferidos para meio de regeneração. Para análise via GFP, os calos foram visualizados em microscópio de fluorescência Zeiss HBO 100. Para análise via PCR, utilizou-se DNA extraído de folhas das plantas regeneradas. Os procedimentos adotados neste estudo para os métodos de agitação e sonicação utilizando o sistema de infecção com *A. tumefaciens* mostraram-se ineficientes para o híbrido LCBM2, visto que nenhum explante sobreviveu às etapas de cocultivo e processo de seleção.

Entretanto quando se utilizou o método de infiltração a vácuo, obteve-se uma eficiência de 1,46% de plantas transformadas. Foi também obtido sucesso de transformantes quando o híbrido LCBM2 foi submetido ao processo de transformação direto via biobalística. No entanto a porcentagem de eficiência de 0,71% foi abaixo do método por infiltração.

Palavras-chave: Eucalipto. *Agrobacterium tumefaciens*. Biobalística. *gfp*.

Genetic transformation of a *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* hybrid via *Agrobacterium tumefaciens* and biobalistics

ABSTRACT

This work aimed at comparing the genetic transformation systems mediated by *Agrobacterium tumefaciens* and biobalistics in a eucalyptus commercial hybrid. For the *A. tumefaciens* system we evaluated three infection methods: agitation, sonication and vacuum infiltration. Meristems from the commercial hybrid denominated LCBM2 were inoculated in a callus inducing MS medium supplied with auxin and cytokine. After ten days maintained in the dark, the calluses formed were submitted to different transformation processes. For the agitation method, the procedure was performed during 30 min at 100 rpm in a shaker, the sonication of the calluses was performed during 15 seconds at a frequency of 40 kHz, and the third method tested was vacuum infiltration for 4 min and 400 mmHg. For the biobalistics process, the calluses were placed in an osmotic medium with 120 mg.L⁻¹ of sucrose during 24 hours before and after the bombardment, which was performed at a helium gas pressure of 1200 PSI and a distance of 9 cm to the target. After the co-cultivation, in a MS induction medium added with 100 µM of acetosyringon during 5 days, the calluses were transferred to the regeneration medium. For the GFP analysis, the calluses were visualized in a Zeiss HBO 100 fluorescence microscope. For the PCR analysis, we used DNA extracted from the leaves of regenerated plants. The procedures adopted in this study for the agitation and sonication methods, using the *A. tumefaciens* infection system, were showed to be inefficient

for the LCBM2 hybrid, seen that no explant survived the co-cultivation stages and selection process. However, when using the vacuum infiltration method, we obtained an efficiency of 1.46% of transformed plants. We also obtained success when the LCNM2 hybrid was submitted to the direct transformation process via biobalistics. However, the efficiency percentage of 0.71% was below that of the infiltration method.

Keywords: Eucalyptus. *Agrobacterium tumefaciens*. Biobalistics. *gfp*.

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Eucalyptus* é plantado na Austrália, Ásia, África do Sul, América Latina e algumas partes da Europa principalmente para a produção de celulose, papel, carvão vegetal, utilização na indústria siderúrgica, entre outros. Este gênero possui diversas vantagens com destaque para o rápido crescimento, fácil adaptação a diferentes solos e climas e uso comerciais diversos. No Brasil, a área de plantios de *Eucalyptus* totalizou 4.873.952 ha em 2011 representando crescimento de 2,5% (119.617 ha) referente ao ano de 2010. O principal fator que alavancou esse crescimento foi o estabelecimento de novos plantios frente à demanda futura de projetos (ABRAF, 2012).

Esta versatilidade de uso e potencial de crescimento tem levado a um aumento expressivo do interesse para as espécies de eucalipto. Paralelamente a esta expansão de área cultivada, cresce a demanda por genótipos melhorados com resistência e tolerância aos diferentes estresses bióticos e abióticos.

Para a introdução de características desejáveis mediante a transformação genética de plantas é necessário acesso a um protocolo de regeneração *in vitro* assim como um sistema eficiente de transformação, seja a partir de métodos indiretos (*Agrobacterium tumefaciens*) ou diretos (biobalística) (GONZÁLEZ et al., 2002).

Os primeiros trabalhos com transformação genética de eucalipto focaram nos métodos de eletroporação e polietilenoglicol com

protoplastos de *E. grunni* (TEULIERS et al., 1991). Os protoplastos obtidos não foram viáveis para regenerar plantas.

Posteriormente, outros trabalhos apresentaram resultados positivos com transformação de *E. camaldulensis* utilizando o sistema *Agrobacterium tumefaciens* (MULLINS et al., 1997; HO et al., 1998; HARCOURT et al., 2000). Foi demonstrado por HO et al. (1998), utilizando a cepa EHA101, que cerca de 10% dos calos sobreviveram ao processo de infecção e apenas duas plantas transformadas foram regeneradas.

O sistema *Agrobacterium tumefaciens* também foi testado em hipocótilos e cotilédones de outras espécies de eucalipto como *E. tereticones* (PRAKASH; GURUMURTHI 2009), *E. saligna* (DIBAX et al., 2010) e *E. globulus* (MATSUNUNGA et al., 2012). Com aumento significativo na eficiência de transformação com resultados de até 7% com a cepa EHA105 (MATSUNUNGA et al., 2012)

O sucesso da transformação genética quando se utiliza o sistema *Agrobacterium tumefaciens* depende da eficiência da bactéria em infectar o tecido alvo. Várias tentativas têm sido desenvolvidas para facilitar este contato, com destaque para os processos de agitação, sonicação e infiltração a vácuo.

Para o método de agitação, a solução bacteriana é colocada em contato com o tecido alvo e ambos são agitados. Esta metodologia foi empregada com sucesso por Al Abdallat et al (2011) em *Crataegus aronia*, porém em *E. saligna* foi utilizado o processo de contato da solução bacteriana sem a agitação, obtendo uma eficiência de 0,5% de plantas transformadas (DIBAX et al., 2010).

Outro método utilizado é o processo de sonicação que consiste em submeter o tecido a breves períodos de ultrassom na presença da cultura bacteriana (LIU et al., 2006). Esse processo foi utilizado em outro híbrido de *E. grandis* x *E. urophylla* apresentando aproximadamente 17% de eficiência de transformação (GONZÁLEZ et al., 2002).

A técnica de infiltração a vácuo também permite um aumento na transferência de genes, pois melhora a penetração de células bacterianas nos tecidos vegetais (OLIVEIRA et al., 2009). Este processo foi utilizado com sucesso na obtenção de plantas transgênicas de feijão (LIU et al., 2005), soja (MARIASHIBU et al., 2013) e álamo (TAKATA; ERIKSSON, 2012). Porém, não foram encontrados relatos utilizando essa metodologia em espécies de eucalipto.

Outra via de transformação genética é a partir de métodos diretos como a biobalística. Esta técnica foi relatada pela primeira vez no gênero *Eucalyptus* por Rochange et al. (1995) que utilizaram embriões zigóticos de *E. globulus* para testar duas diferentes partículas, ouro e tungstênio. Porém, estes autores não tiveram sucesso no processo de regeneração do material alvo. Outros trabalhos utilizando também *E. globulus* complementaram o estudo de transformação dessa espécie obtendo a regeneração dos tecidos, porém, baixa eficiência de transformação (SERRANO et al., 1996).

Foram encontrados poucos trabalhos na literatura relatando a eficiência dos diferentes métodos de transformação genética com os híbridos *E. grandis* x *E. urophylla*. Como é sabido que a eficiência destes métodos é genótipo dependente, propôs-se neste estudo verificar a

viabilidade destes diferentes métodos na transformação de um híbrido comercial de *E. grandis* x *E. urophylla*.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Material vegetal

2.1.1 Obtenção de plantas

Meristemas de um híbrido comercial de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*, denominado como LCBM2, foram estabelecidos *in vitro*. Os meristemas foram desinfestados com pastilhas de paraformaldeído durante 40 min e posteriormente foram inoculados em meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) e mantidos no escuro. Após 7 dias os meristemas foram transferidos para o meio de multiplicação MS acrescido de 5,70 μM de AIA e 0,35 μM de BAP e mantidos em fotoperíodo de 16 horas a 25 ± 2 °C. Após 3 meses as plântulas formadas foram transferidas para meio de enraizamento MS com ausência de vitaminas e suplementado com 4,90 μM de AIB.

Todos os meios tiveram acréscimo de 3% de sacarose, solidificados com 0,17% de phytigel e autoclavados a 121 °C e 1 atm.

2.1.2 Obtenção de calos

Para a indução de calos, foram utilizados ápices meristemáticos provenientes das plantas estabelecidas *in vitro*. Os meristemas foram inoculados em meio de cultura MS modificados, solidificado em 4,8 g.L^{-1} de ágar e suplementado com 20 g.L^{-1} de sacarose, auxina e citocinina (valores não citados por confidencialidade). Os explantes foram mantidos

no escuro durante 10 dias até o processo de transformação. Após este período os calos foram mantidos por mais 20 dias em meio de indução e depois transferidos para meio de regeneração MS modificado, acrescido de 20 mg.L^{-1} , auxina e citocinina (valores não citados por confidencialidade). Os calos foram mantidos em fotoperíodo de 16 horas à temperatura de $26 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ até regeneração.

2.2 Processo de transformação

2.2.1 Plasmídeo

O plasmídeo utilizado nas transformações foi o pEZR (H)-LN cedido pela Universidade de Wageningen (Holanda). Este vetor possui o gene *gfp* como gene repórter, o promotor p35SCaMV e o *hptIII* como gene de seleção para conferir resistência à higromicina. O plasmídeo foi transferido para *Agrobacterium tumefaciens* cepa EHA105 por eletroporação. Uma colônia da *Agrobacterium* transformada foi inoculada em meio líquido Luria broth (LB) suplementado com Kanamicina (50 mg.L^{-1}). A cultura foi incubada em shaker a $28 \text{ }^\circ\text{C}$ e 200 rpm por 48 horas. Quando atingiram O.D.₆₀₀ de 0,4 as células bacterianas foram centrifugadas a $15,5 \text{ g}$ por 10 min e o pellet foi ressuscitado em meio MS suplementado com 30 mg.L^{-1} de sacarose e $100 \text{ } \mu\text{M}$ de acetoseringona.

2.2.2 Transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens*

Para o processo de transformação via *A. tumefaciens* (EHA 105) foram utilizados calos de 10 dias, e testados três tratamentos de infecção: agitação em shaker, infiltração a vácuo e sonicação. Cada tratamento foi composto por 100 calos infectados e por 50 calos não infectados.

Para obtenção das células bacterianas, a cultura foi centrifugada a 5000 g por 10 minutos e o pellet ressuscitado em meio de cultura MS líquido suplementado com 20 g.L⁻¹ de sacarose e 100 µM de acetoseringona até atingir uma DO₆₀₀ de 0,4. No tratamento de agitação em shaker os calos foram transferidos para tubo Falcon de 50 mL contendo a cultura bacteriana de acordo com a técnica descrita por Al Abdallat et al (2011), e mantidos sob agitação de 100 rpm por 30 minutos.

Para o processo de infiltração a vácuo, os calos foram transferidos para um elermeyer de 10 ml contendo a cultura bacteriana e todos foram submetidos, dentro de uma câmara estéril, a vácuo de 400 mmHg por 4 minutos (CANCHE-MOO et al., 2006).

No caso do tratamento de sonicação os calos foram colocados dentro de tubos Falcon e transferidos para um sonicador tipo banho maria por 15 s a uma frequência de 40 kHz (TOURNIER et al., 2003; QUOIRIN; QUISEN, 2006).

Os calos controle foram submetidos aos respectivos processos em meio de cultura MS, no entanto, na ausência de bactéria.

Após o período de cocultivo por cinco dias, na ausência de luz, os calos foram transferidos para meio de regeneração MS solidificado em

4,8 g.L⁻¹ de ágar e suplementado com 20 g.L⁻¹ de sacarose, auxina, citocinina e 500 mg.L⁻¹ de Tioxin[®]. Os calos permaneceram em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas a 26±2 °C até a avaliação dos possíveis transformantes.

2.2.3 Transformação via Biobalística

2.2.3.1 Preparo das partículas

O preparo das micropartículas e a precipitação do DNA foi realizado em ambiente asséptico. Foram pesadas 60 mg de micropartículas de tungstênio M10 acrescentado 1 ml de etanol 70% misturando vigorosamente em vórtex durante 20 min. Posteriormente, as partículas foram centrifugadas a 14,1 g durante 5 min. O sobrenadante foi removido e ao precipitado foi adicionado 1 ml de água ultrapura estéril sendo homogeneizado em agitador. As partículas foram centrifugadas a 14,1 g durante 5 min, o sobrenadante foi descartado e o procedimento de lavagem foi repetido duas vezes.

Após a última lavagem o sobrenadante foi descartado e as partículas ressuspensas em 1 ml de glicerol estéril 50% (v/v).

2.2.3.2 Precipitação do DNA sob as micropartículas

Uma alíquota de 50 µL da suspensão de micropartículas foi transferida para um tubo de microcentrífuga. Foram adicionados as micropartículas 5 µL de DNA plasmidial (500 ng), 50 µL de CaCl₂ 2,5 M

e 20 μL de espermidina 0,1 M para precipitação e aglomeração das micropartículas. O aglomerado foi deixado em repouso por 3 min e em seguida centrifugado a 4,8g por 5 s. O precipitado foi lavado 3 vezes com 150 μL de etanol 70%, depois foi incubado a temperatura ambiente, sob agitação constante, por 3 min e em repouso por 3 min.

A solução contendo micropartículas e DNA foi centrifugada durante 5 segundos a 4,8 g e o sobrenadante removido cuidadosamente. Ao precipitado foi acrescentado 60 μL de etanol absoluto homogeneizando vigorosamente. Alíquotas de 7 μL foram distribuídas na região central de cada membrana e os calos organogênicos foram bombardeados em duas horas após este procedimento.

O tratamento de transformação via biobalística constituiu-se de 100 calos organogênicos com 10 dias. Estes foram inoculados em meio osmótico com 120 mg.L^{-1} de sacarose durante 12 horas antes e depois do bombardeamento.

Foi realizado o bombardeamento a uma pressão do gás Hélio de 1200 PSI e distância de 9 cm do alvo, como controle foram bombardeados 50 calos com partículas sem DNA aderido, constituindo assim o tratamento controle.

2.3 Avaliação dos calos via GFP

Foi realizada análise visual da expressão do gene *gfp* em calos utilizando microscópio de fluorescência Zeiss HBO 100 com a objetiva de 40x e o filtro FITC. Estes foram considerados *gfp* positivos quando

apresentaram pontos ou áreas de expressão verde sob luz fluorescente verde e quando os mesmo pontos ou áreas desapareceram sob a exposição à luz fluorescente vermelha (ALCANTRA et al., 2011).

2.4 Seleção das plantas transformadas por *A. tumefaciens*

Com a finalidade de avaliar a sensibilidade a higromicina, plantas do híbrido LCBM2 entre *E. grandis* x *E. urophylla*, estabelecidas *in vitro* a partir do cultivo de meristemas, foram inoculadas em frascos contendo 50 mL de meio de cultura MS suplementado com 3% de sacarose e concentrações crescentes do antibiótico higromicina (5; 10,0; 25,0 e 50,0 mg.L⁻¹) e na ausência deste.

O meio foi solidificado com 0,17% de phytigel e o pH foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a 121 °C por 20 minutos. O antibiótico esterilizado foi adicionado ao meio autoclavado em câmara de fluxo laminar.

O experimento foi mantido em sala de crescimento com temperatura e luminosidade controladas por 30 dias. Ao final do experimento foi avaliada a taxa de mortalidade das plantas. A dosagem foi considerada letal quando 100% das plantas do tratamento estivessem mortas.

O delineamento estatístico foi inteiramente casualizado contendo 5 tratamentos, 6 repetições e 5 parcelas. Foi realizada uma análise de regressão e as médias das concentrações comparadas pelo teste de tukey a 5% de significância pelo programa SISVAR[®].

2.5 Extração do DNA genômico e PCR

A inserção do gene nas plantas que sobreviveram ao meio seletivo foi confirmada pela amplificação do fragmento de DNA, utilizando a técnica de PCR.

Para extração do DNA genômico foi utilizado o protocolo de extração CTAB (Cationic Hexadecyl Trimethyl Ammonium Bromide). Aproximadamente 200 mg de folhas foram maceradas em nitrogênio líquido e transferidas para microtubos de 2 mL o qual continha 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. Posteriormente foi adicionado 2% (v.v⁻¹) de β-mercaptoetanol, e a solução foi incubada por 40 minutos a 65 °C e centrifugada (13,4 g) por 10 minutos.

O sobrenadante foi transferido para um novo tubo adicionando o mesmo volume de clorofórmio: álcool isoamílico 24:1 (v/v), seguido de homogeneização e nova centrifugação (13,4 g) por 10 minutos. A fase aquosa foi transferida para um novo microtubo onde se adicionou 4 µL de RNase na concentração estoque de 100 µg.mL⁻¹, após adição foi incubada 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 (13,4 g).

Posteriormente, o sobrenadante foi descartado, o pellet lavado em 400 µL de etanol absoluto e ressuspenso com 30 µL de água ultrapura

autoclavada. As amostras foram armazenadas a -20 °C. O DNA genômico foi quantificado em espectrofotômetro (Nanodrop® ND-1000) a A₂₆₀ nm.

A confirmação da presença do gene *gfp* foi realizada por análise de PCR utilizando 1 U de GoTaq® Flexi DNA polimerase (Promega®), 3 µL tampão 5 X, 0,6 mMol.L⁻¹ dNTP mix, 1,75 mM de MgCl, 0,5 ng de cada *primer* 5'AAGGGCGAGGAGCTGTTCAC3', 5'TGTTGCCGTCCTCCTTGAAGTC3' e 6,66 ng/µL de DNA, completando o volume final com água ultrapura autoclavada para 15 µL.

A amplificação foi realizada em termociclador *Eppendorf*® *Mastercycler*, programado com temperatura de desnaturação inicial de 95 °C, por 5 minutos, 30 ciclos de amplificação compostos de 3 etapas: 95 °C, por 30 segundos; 63 °C, por 30 segundos; 72 °C, por 2 minutos com uma extensão final de 2 minutos a 72 °C.

Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 0,8% (m.v⁻¹) corados com Brometo de Etídio (0,5 µg/mL), 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 min, o gel foi visualizado sob luz ultravioleta e a imagem captada pelo fotodocumentador (EDAS 290, Kodak®).

3 RESULTADOS

No experimento realizado para verificar a dose letal do antibiótico higromicina, verificou-se pela análise de regressão que houve diferença significativa entre as concentrações utilizadas do antibiótico, sendo que para o híbrido LCBM 2 a concentração de 50 mg.L^{-1} provocou mortalidade de todas as plantas, portanto considerada a concentração letal (FIGURA 1).

Em função destes resultados, adotou-se a estratégia para seleção das plantas transformadas usando doses crescentes do antibiótico higromicina a cada 30 dias até a concentração final de 50 mg.L^{-1} . As plantas que sobreviveram a esse processo foram consideradas como possíveis plantas transformadas.

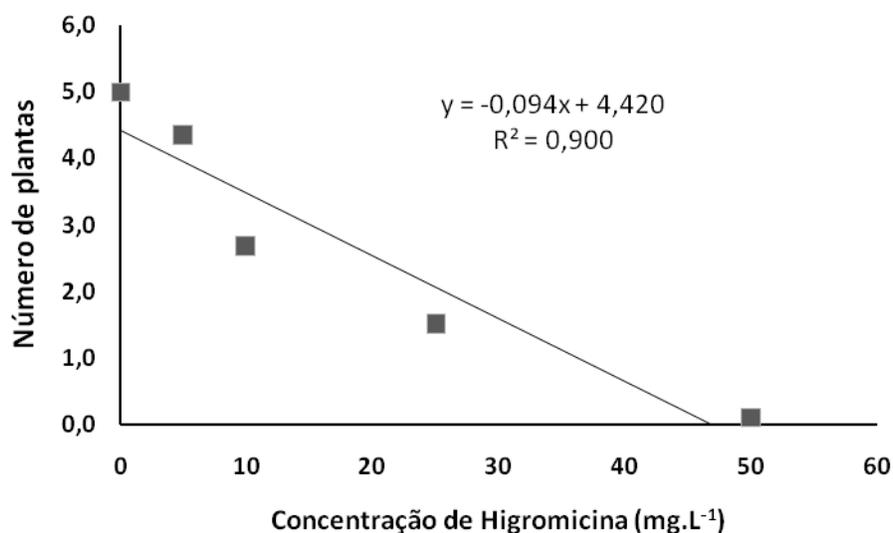


Figura 1 Curva de mortalidade do híbrido LCBM2 de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*.

Foi realizada análise visual da expressão do gene *gfp* em calos utilizando microscópio de fluorescência Zeiss HBO 100 (Figura 2). Estes calos foram considerados *gfp* positivos quando apresentaram pontos ou áreas de expressão verde sob luz fluorescente verde e quando os mesmo pontos ou áreas desapareceram sob a exposição à luz fluorescente vermelha. Devido à baixa resolução e contraste entre os calos transformados e não transformados, e também devido à impossibilidade operacional para visualização de todas as plantas que sobreviveram ao processo de seleção, optou-se pela confirmação dos transformantes via técnica da PCR.

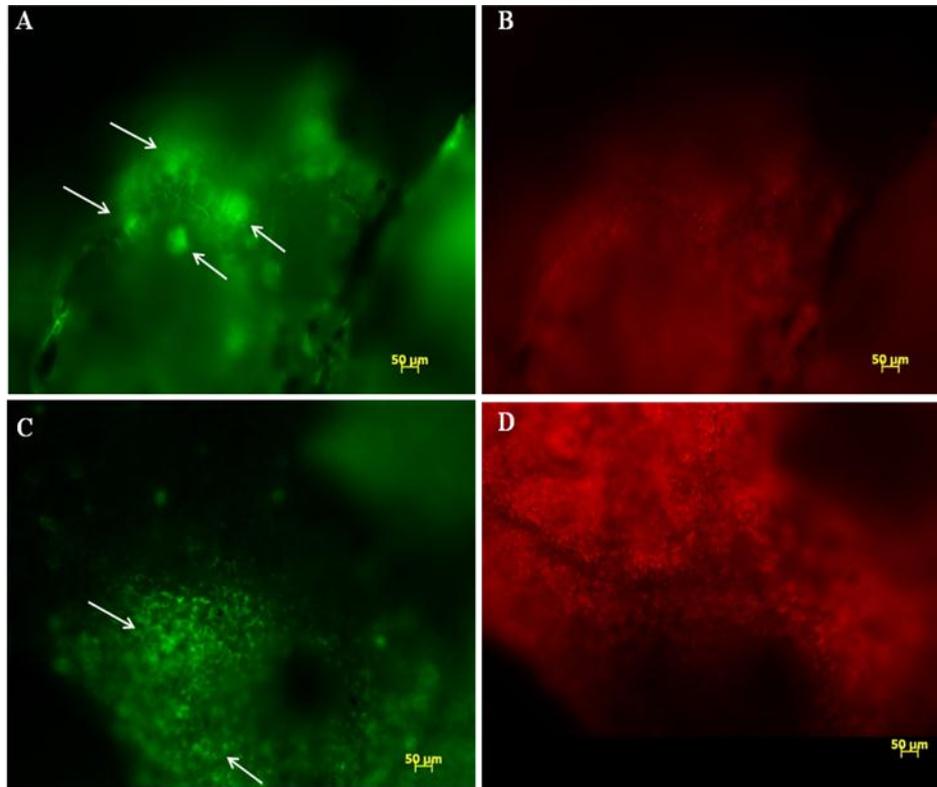


Figura 2 Calo de *E. grandis* x *E. urophylla*, quinze dias após o co-cultivo com *A. tumefaciens* e biobalística. (A e C) As setas indicam a expressão da GFP sob luz fluorescente verde. (B e D) Calos sob luz fluorescente vermelha.

A eficiência dos diferentes métodos de infecção testados neste estudo pode ser observada na Tabela 1. Para cada método foram inicialmente transformados 100 calos. Verificou-se pelo número de calos sobreviventes que o método direto a partir da biobalística foi o que causou menor injúria ao explante, sendo que aproximadamente 70% dos calos sobreviveram ao processo de infecção.

Tabela 1 Resultado dos calos obtidos, número de plantas regeneradas, número de plantas selecionadas e plantas transformadas em cada método

Método	N° de calos	N° de plantas regeneradas	N° de plantas selecionadas	N° de plantas transformadas	Eficiência	
Indiretos	Controle	10	600	0	-	-
	Agitação	0	-	-	-	-
	Controle	30	1800	0	-	-
	Sonicação	15	900	0	-	-
	Controle	77	4620	0	-	-
	Infiltração	50	3000	45	44	1,46%
Direto	Controle	81	4860	0	-	-
	Biobalística	70	4200	83	30	0,71%

Entre os métodos indiretos mediados por *Agrobacterium tumefaciens*, o da infiltração foi o que proporcionou menor dano aos calos, sobrevivendo 50% destes ao processo de infecção, seguido pela sonicação com 15% de calos sobreviventes. O processo de agitação foi o que causou maior injúria ao explante, ocorrendo uma mortalidade de 100% dos calos transformados.

Batista (2011) em estudos anteriores com o mesmo híbrido observou que cada calo obtido gera durante o processo de organogênese aproximadamente 60 plantas. A medida da eficiência dos diferentes métodos foi baseada na proporção do número de plantas que tiveram a inserção do gene comprovada, em relação ao total de plantas regeneradas.

Em função da metodologia de agitação, adotada neste estudo, causar mortalidade de todos os calos, não foi possível avaliar a eficiência de transformação deste tratamento.

Para o processo de sonicação, das 900 plântulas regeneradas, nenhuma sobreviveu às etapas de seleção com o antibiótico higromicina.

No método de infiltração, das 3000 plântulas regeneradas, 45 sobreviveram às etapas de seleção com o antibiótico e dentre estas, 44 foram validadas como transgênicas, obtendo-se uma eficiência de transformação de 1,46%. Esta confirmação foi realizada a partir da técnica da PCR com *primers* específicos para o gene *gfp*, os quais amplificaram um amplicon de aproximadamente 400 pb. Como pode ser visualizado, a partir do gel representativo da análise de PCR de quinze plantas que sobreviveram ao processo seletivo (Figura 2), mostrou que apenas uma não teve o DNA amplificado (coluna 10), sendo esta planta considerada como não transgênica. A coluna C- representa o controle

negativo da reação, PC1 e PC2 plantas controle negativo, C+ controle positivo (plasmídeo), colunas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 e 15 plantas obtidas após processo de seleção.

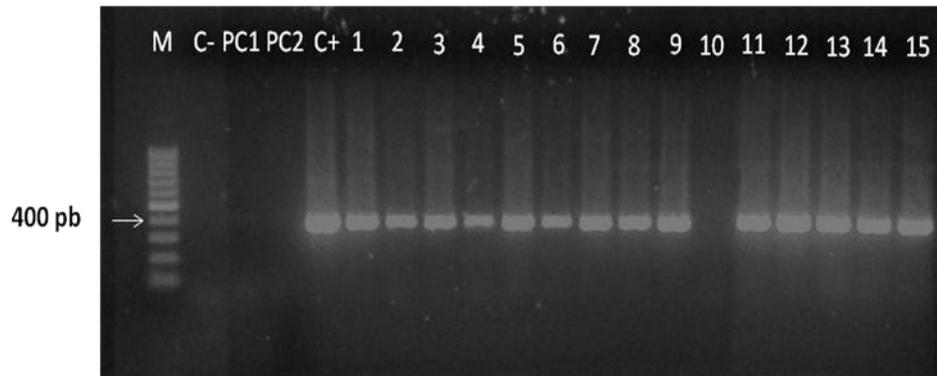


Figura 2 Análise da PCR com DNA isolado de folhas de eucalipto transformado *Agrobacterium tumefaciens* contendo o vetor pEZR (H)-LN). M (marcador peso molecular 100 pb).

No caso da biobalística, das 4200 plântulas regeneradas, 83 sobreviveram ao processo de seleção com o antibiótico higromicina e dentre estas, 30 foram validadas como transgênicas obtendo-se uma eficiência de transformação de 0,71%. Esta confirmação também foi realizada a partir da técnica de PCR para o gene *gfp* (Figura 3). Dentre as plantas analisadas, 53 não apresentaram o amplicon ao gene *gfp* representadas pelas colunas 11, 12, 13 e 15. A coluna C- representa o controle negativo da reação, PC1 e PC2 plantas controle negativo e C+ controle positivo (plasmídeo).

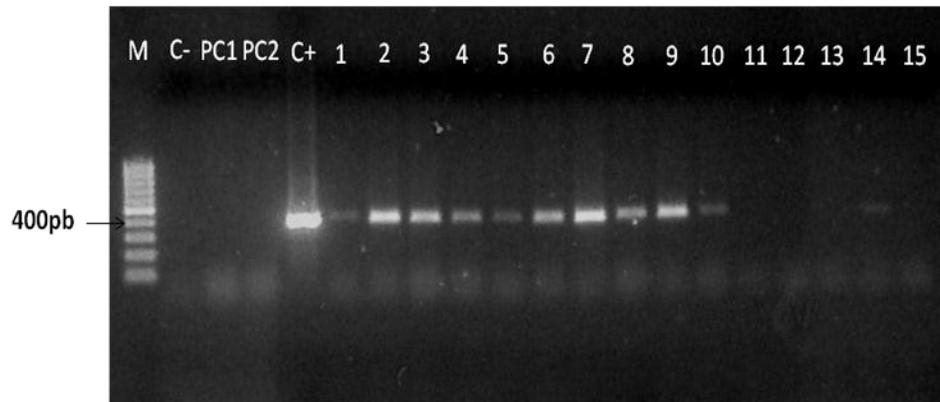


Figura 3 Análise da PCR com DNA isolado de folhas de eucalipto transformado por biobalística com partículas contendo o vetor pEZR (H)-LN). M (marcador peso molecular 100 pb).

4 DISCUSSÃO

O objetivo com este trabalho foi desenvolver um protocolo de transformação genética eficiente para um híbrido entre *E. grandis* x *E. urophylla* a fim de que posteriormente esse protocolo possa ser utilizado para inserção de genes de interesse. Embora já se tenha obtido sucesso em transformar *E. camaldulensis* (DIALLO; DUHOUX, 1984) a escolha em trabalhar com o híbrido de *E. grandis* x *E. urophylla* deve-se ao fato deste ser um híbrido de alto valor comercial.

O híbrido LCBM2 entre *E. grandis* x *E. urophylla* foi escolhido para o presente estudo devido à alta capacidade organogênica que possui em condições de cultivo *in vitro*. Estudos prévios realizados mostram que em média cada calo organogênico deste híbrido, obtido a partir de meristema, possui potencial para gerar 60 plântulas aproximadamente (BATISTA, 2012). Segundo Pena et al. (2007), os meristemas, por serem tecidos jovens, geram calos com alta capacidade regenerativa. No entanto, alguns autores mencionam que nem todos os calos gerados são organogênicos, devido ao fato de estes possuírem alta concentração de compostos fenólicos e baixa concentração de citocininas endógenas (TOURNIER et. al., 2003).

Provavelmente as condições de cultivo *in vitro* estabelecidas por Batista (2012) para este híbrido foram suficientes para minimizar os efeitos negativos de compostos fenólicos e para suprir as demandas hormonais necessárias aos processos de regeneração.

Outro problema relatado na literatura, que afeta a organogênese é a adição de antibióticos ao meio de cultura visando eliminar as bactérias após o processo de cocultivo (SERRANO et. al., 1996). No presente estudo, a adição do antibiótico Tioxin[®] não afetou a formação de brotos nos calos do híbrido LCBM2, visto que o número de plantas obtidas em calos submetidos ao antibiótico foi semelhante ao número de plantas que foram obtidas com calos que não passaram pelo processo da transformação.

Além da capacidade regenerativa do material vegetal, outro fator extremamente importante é a metodologia utilizada no processo de transformação genética. No presente trabalho, para a transformação do híbrido LCBM2, foi proposto comparar três metodologias (agitação, sonicação e infiltração) utilizando o método indireto por *Agrobacterium tumefaciens* e uma metodologia pelo processo direto da biobalística.

Para o processo de agitação, os explantes foram agitados juntamente com a solução bacteriana por um período de 30 min. Todos os 100 calos transformados ficaram com aspectos necrosados e nenhuma plântula foi regenerada. Provavelmente, o dano físico associado ao processo da agitação em combinação com o tempo de cocultivo foram os fatores que promoveram a mortalidade total dos calos.

Estes resultados corroboram com os experimentos de Dibax et al. (2010) os quais verificaram que o processo de imersão da *Agrobacterium tumefaciens* na espécie *E. saligna* por 30 min promoveu uma baixa eficiência de transformação, por volta de 0,5%. Importante ressaltar que tais autores não utilizaram o procedimento de agitação durante o

cocultivo, o que provavelmente favoreceu esta pequena taxa de sucesso, não danificando fisicamente os calos.

O tempo de infecção também é um fator importante a ser considerado. Experimentos com hipocótilos de *E. globulus* cocultivados por um período variando de 1 a 5 minutos, mostraram um aumento considerável na eficiência da transformação, com taxas proporcionais variando entre 4 a 7,4% (MATSUNUNGA et. al., 2012).

Outra metodologia testada foi o processo de sonicação. Segundo alguns autores este método gera micro feridas na superfície do tecido vegetal, o que facilita a penetração das bactérias e aumenta a liberação de compostos fenólicos pela ruptura da parede celular, que são moléculas atrativas e sinalizadoras para a infecção bacteriana (GONZÁLEZ et al., 2002).

No processo de sonicação adotado no presente estudo, uma porcentagem pequena de calos (15%) sobreviveu ao cocultivo, entretanto, nenhuma das plântulas regeneradas foi eficientemente infectada pela bactéria.

Resultados contraditórios foram obtidos por González et al., (2002), que ao transformarem sementes de um híbrido de *E. grandis* x *E. urophylla* pelo método da sonicação, obtiveram altas taxas de transformantes, por volta de 17,64%. Estes autores atribuíram esta alta eficiência ao processo da sonicação que foi realizado em duas etapas, uma antes e outra durante a etapa de infecção. No presente estudo, o processo de injúria no tecido pela sonicação foi realizado apenas uma vez, durante a etapa de infecção. Outros possíveis fatores que podem justificar a diferença nos resultados entre os dois trabalhos são o tipo tecido vegetal,

o genótipo e as cepas bacterianas utilizados no processo de transformação genética.

No presente trabalho foi utilizada a cepa EHA105 para infectar calos do híbrido entre *E. grandis* x *E. urophylla*, enquanto que no trabalho de González et. al. (2002), foi utilizada a cepa LBA4404 para infectar sementes de um outro híbrido. Esta combinação da cepa LBA4404 com este híbrido foi mais favorável ao processo infectivo, promovendo assim uma maior eficiência no processo.

Dentre os métodos indiretos testados com *Agrobacterium tumefaciens*, apenas aquele que utilizou o processo da infiltração possibilitou a obtenção de plantas transformadas. O sistema de infiltração a vácuo promoveu uma mortalidade de aproximadamente 50% dos calos. Das 3000 plântulas regeneradas, 44 foram consideradas transformadas pela comprovação via PCR da presença do gene *gfp*, dando uma eficiência de 1,46% no processo.

Esta eficiência pode ser considerada alta quando analisa-se o processo como um todo, levando em consideração a alta capacidade organogênica do híbrido LCBM2. Como cada meristema, em condições apropriadas, gera um calo organogênico, para se obter 44 plantas transformadas, teremos que inocular apenas 100 meristemas na etapa inicial.

Não foram encontrados relatos na literatura de transformação genética de eucalipto via *A. tumefaciens* utilizando infiltração a vácuo, porém este método foi utilizado em outras espécies com sucesso para transformar embriões somáticos de *Coffea canephora* (CANCHE-MOO et al., 2006), escalpes de *Musa acuminata* cv. “Grand Nain” (ACERETO-

ESCOFFIE´ et al., 2005) e estacas de álamo (TAKARA; ERIKSSON, 2012).

O método de infiltração a vácuo foi comparado com o da sonicação para verificar a eficiência da *A. tumefaciens* em infectar cotilédones de soja (MARIASHIBU et. al., 2013). Neste estudo, o processo da infiltração mostrou-se melhor que o da sonicação, apresentando eficiência de aproximadamente 9,45% e 5,21%, respectivamente.

O método direto por biobalística também foi eficiente para se obter plantas transformadas. Este processo foi o que promoveu menor injúria no explante, permitindo que uma porcentagem maior de calos (70%) sobrevivesse ao processo de transformação. Das 4200 plantas regeneradas a partir destes calos, 30 foram confirmadas como transgênicas, dando um percentual de 0,71% de eficiência.

Usando o mesmo raciocínio anterior, a cada 100 meristemas inoculados no início do processo, este será finalizado com 30 eventos transformantes pelo método da biobalística.

Estes resultados diferem de outros autores que utilizaram o mesmo método. Serrano et al., (1996) avaliaram a eficiência do processo da biobalística em transformar embriões zigóticos de *E. globulus*. Embora tenham conseguido regenerar embriões, obtiveram apenas uma planta transformada.

A principal vantagem do método por bombardeamento encontra-se na possibilidade de transferência de genes para qualquer tipo de célula ou tecido independente do genótipo sem precisar considerar a interação genótipo x cepa que é importante para o sistema *Agrobacterium*. No

entanto, esta técnica apresenta a possibilidade de múltiplas cópias de DNA, que podem ser fragmentadas, recombinadas ou não expressas (HADI et. al., 1996).

Os procedimentos para avaliar o número de cópias dos transgenes inseridos nas plantas transformadas encontram-se em andamento e os resultados serão inseridos neste artigo.

5 CONCLUSÃO

Os métodos de agitação e sonicação adotados mostraram-se ineficientes afetando a capacidade regenerativa dos explantes e/ou capacidade de infecção pelas cepas bacterianas.

Os métodos de infiltração e biobalística foram considerados eficientes para transformar um híbrido comercial entre *E. grandis* x *E. urophylla*. Em função da capacidade regenerativa deste genótipo, a aplicação destes dois métodos permite a geração de um grande número de eventos transgênicos.

O processo por infiltração obteve a maior eficiência com 1,46% de plantas transformadas, enquanto que a biobalística apresentou 0,71% de eficiência.

REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS PRODUTORES DE FLORESTAS PLANTADAS. **Anuário estatístico**: ano base 2011. Brasília, 2012. 80 p. Disponível em: <<http://www.abraflor.org.br/estatísticas>>. Acesso em: 5 mar. 2013.

ACERETO-ESCOFFIE, P. O. M. et al. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Musa acuminata* cv. “Grand Nain” scalps by vacuum infiltration. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 105, n. 3, p. 359–371, July 2005.

AL ABDALLAT, A. M.; SAWWAN, J. S.; AL ZOUBI, B. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of callus cell of *Crataegus aronia*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**: an international journal on the cell biology of higher plants, Dordrecht, v. 104, p. 31-39, 2011.

BATISTA, T. R. **Organogênese e embriogênese somática de híbrido de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla***. 2012. 74 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

CANCHE-MOO, R. L. R. et al. Genetic transformation of *Coffea canephora* by vacuum infiltration. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**: an international journal on the cell biology of higher plants, Dordrecht, v. 84, n. 3, p. 373–377, Mar. 2006.

DIALLO, N.; DUHOUX, E. Organogênese et Multiplication «in vitro» chez l'*Eucalyptus*. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 115, n. 3, p. 177-182, July 1984.

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

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

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

HARCOURT, R. L. et al. Insect- and herbicide-resistrant transgenic eucalypts. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 6, p. 307-315, 2000.

HO, C. K. et al. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Eucalyptus camaldulensis* and production of transgenic plants. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 17, p. 675–680, 1998.

LIU, Y.; YANG, H.; SAKANISHI, A. Ultrasound: mechanical gene transfer into plant cells by sonoporation. **Biotechnology Advances**, New York, v. 24, p. 1–16, 2006.

LIU, Z. et al. The novel use of a combination of sonication and vacuum infiltration in *Agrobacterium*- mediated transformation of kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) with lea gene. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 16, p. 189–197, 2005.

MARIASHIBU, T. S. et al. Vacuum infiltration enhances the *Agrobacterium*-mediated genetic transformation in Indian soybean cultivars. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 35, p. 41–54, 2013.

MATSUNAGA, E. et al. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Eucalyptus globules* using explants with shoot apex with introduction of bacterial choline oxidase gene to enhance salt tolerance. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 31, p. 225–235, 2012.

- MULLINS, K. V. et al. Regeneration and transformation of *Eucalyptus camaldulensis*. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 16, p. 787–791, 1997.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Compenhagen, v. 15, p. 473 - 497, 1962.
- OLIVEIRA, M. L. P. et al. High-efficiency Agrobacterium-mediated transformation of citrus via sonication and vacuum infiltration. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 28, p. 387–395, 2009.
- PENA, L. et al. Citrus Biotechnology. In: PUA, E. C.; DAVEY, M. R. (Ed.). **Forestry agriculture**. Berlin: Transgenic Crops V. Springer, 2007. v. 60, p. 35–50.
- 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**, Columbia, v. 45, n. 4, p. 429-34, 2009.
- QUOIRIN, M.; QUISEN, R. Advances in genetic transformation of *Eucalyptus* species. In: FRANCHE, C. (Ed.). **Molecular biology tropical plants**. Kerala: Research Signpost, 2006. p. 41–56.
- ROCHANGE, F. et al. DNA delivery into eucalyptus-globulus zygotic embryos through biolistics - optimization of the biological and physical parameters of bombardment for 2 different particle guns. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 14, n. 10, p. 674-678, 1995.
- SERRANO, L. et al. Genetic transformation of *Eucalyptus globulus* through biolistics: complementary development of procedures for organogenesis from zygotic embryos and stable transformation of corresponding proliferating tissue. *Journal of Experimental Botany*, Oxford, v. 47, p. 285-290, 1996.
- TAKATA, N.; ERIKSSON, M. E. A simple and efficient transient transformation for hybrid aspen (*Populus tremula* × *P. tremuloides*). **Plant Methods**, v. 8, n. 1, p. 30, Aug. 2012.

TEULIÈRES, C. et al. Transient foreign gene expression in polyethylene/glycol treated or electropulsated *Eucalyptus Gunnii* protoplasts. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**: an international journal on the cell biology of higher plants, Dordrecht, v. 25, p. 125-132, 1991.

TOURNIER, V. et al. An efficient procedure to stably introduce genes into an economically important pulp tree (*Eucalyptus grandis* × *Eucalyptus urophylla*). **Transgenic Research**, London, v. 12, n. 4, p. 403–411, Aug. 2003.