



LARISSA TANCREDI ISRAEL DE LIMA

**INFLUÊNCIA DE DOIS VETORES NA
EFICIÊNCIA DA TRANSFORMAÇÃO
GENÉTICA DE UM HÍBRIDO COMERCIAL
UROGRANDIS VIA *Agrobacterium rhizogenes***

LAVRAS – MG

2013

LARISSA TANCREDI ISRAEL DE LIMA

**INFLUÊNCIA DE DOIS VETORES NA EFICIÊNCIA DA
TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE UM HÍBRIDO COMERCIAL
UROGRANDIS VIA *Agrobacterium rhizogenes***

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

Dr. Luciano Vilela Paiva

Coorientadores

Dr. Eduardo Romano

Dra. Evânia Galvão Mendonça

LAVRAS – MG

2013

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Lima, Larissa Tancredi Israel de.

Influência de dois vetores na eficiência da transformação genética de um híbrido comercial urograndis via *Agrobacterium rhizogenes* / Larissa Tancredi Israel de Lima. – Lavras : UFLA, 2013.

61 p. : il.

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

Orientador: Luciano Vilela Paiva.

Bibliografia.

1. *Eucalyptus*. 2. Infiltração a vácuo. 3. Bar. 4. CAHB12. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 631.523

LARISSA TANCREDI ISRAEL DE LIMA

**INFLUÊNCIA DE DOIS VETORES NA EFICIÊNCIA DA
TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE UM HÍBRIDO COMERCIAL
UROGRANDIS VIA *Agrobacterium rhizogenes***

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 30 de julho de 2013.

Dr. Luciano Vilela Paiva

UFLA

Dr. Eduardo Romano de Campos Pinto

EMBRAPA

Dr. Leonardo Zebral Rodrigues

UFLA

Dr. Luciano Vilela Paiva
Orientador

LAVRAS – MG

2013

À minha mãe, Maria José que, com seu amor incondicional, sempre me apoiou nas minhas decisões e me deu forças para seguir em busca dos meus sonhos.

DEDICO

Ao meu irmão, Jamil, pelo carinho, apoio e amizade.

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus por ter me amparado em todos os momentos difíceis e por ter me dado força para seguir em frente.

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

Ao CNPQ e CAPES pela concessão da bolsa.

Ao meu Orientador Dr. Luciano Paiva pela confiança e por ter me dado a oportunidade de trabalhar com transformação genética de eucalipto.

À minha Coorientadora Dr. Evânia Galvão, que se tornou uma grande amiga e me ajudou em todos os momentos. Obrigada pelos ensinamentos e pela ajuda na execução deste trabalho.

Ao meu Coorientador, Dr. Eduardo Romano, que foi minha inspiração para no futuro me tornar pesquisadora e por ter me dado a primeira oportunidade de estágio na área. Obrigada por acreditar no meu potencial.

Aos amigos do programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, principalmente, Mayara Holanda, Natália Vieira, Patrick Callegari, Evellyn Couto, Marcelo Helmich e tantos outros que fizeram com que este momento da minha vida fosse mais feliz e especial.

Aos amigos do Laboratório Central de Biologia Molecular, Andressa, Luana, Marlúcia, Jéssica, Fabrício, Heliete, Luciana, pelos momentos de trabalho e descontração. Muito Obrigada, sem a presença de vocês os dias não seriam tão agradáveis.

Aos amigos do grupo Eucalipto, Flávia, Ana Carla, Nathália, Guilherme, Wesley, Mateus, Evânia e Martin. Sem vocês eu não seria capaz de realizar este trabalho, vocês são muito especiais. Em especial gostaria de agradecer à Flávia Balieiro, que me ajudou muito em todas as etapas deste trabalho, sua ajuda foi fundamental.

Aos amigos que fizeram da minha estada em Lavras a melhor possível João, Gabriel, Marcelo, Natália, Stênia, Ana Paula, João Paulo, Mateus, Ana Carolina, Barbara, Nathália, Viviane, Tânia.

Ao Gabriel, Michelle, Natália e Kollien que foram como uma família durante os anos que morei em Lavras.

Às companheiras de República que sempre tiveram paciência, durante os momentos difíceis e que foram as melhores companhias para se dividir uma casa. São muitas histórias para a vida toda. Muito Obrigada, Mayara e Marline.

Gostaria de agradecer, também, ao Guilherme, Jéssica, Mayara, Andressa, Evellyn; vocês foram as melhores companhias em todas as festas. Cacá e Barretinha, vocês são as melhores companhias para comer, ver filmes e todos os tipos de programas “relax”.

Aos amigos da EMBRAPA Marcelo, Natália, Mariana, Fernando, Erich, Bruna, Rafaela, Isabela, Rafael, Cristina e Rebeca, vocês são mais que especiais na minha vida. Muito obrigada por todos os momentos maravilhosos que compartilhamos nos laboratórios, nas viagens para congressos, na copa do PBI e nas saídas após o expediente.

Aos amigos que fiz durante minha Graduação Renata, André, Raphael, Daniela, sem vocês os anos de graduação não seriam tão agradáveis e produtivos.

Aos amigos de uma vida Laís, Taina, Priscila, Felipe, Elaine, vocês já fazem parte da minha família. Muito obrigada por sempre torcerem por mim, por vibrarem com as minhas conquistas.

À minha Família, que é parte fundamental do que eu sou hoje; sem o amor, incentivo e dedicação eu não teria conseguido chegar até aqui. Muito Obrigada Mãe, Pai, Jamil, Avó Amine, Tia Izabel, Tio Guilherme, Tia Nazaré, Tio José, Tia Ana e aos meus primos queridos Igor, Ian, Ivar, Luís Otávio, João,

Alessandra, Flávia, Viviane, minha pequena princesa Bárbara e os novos membros da família Inácio, Vitor e Vicente.

E a todos que direta ou indiretamente me ajudaram a realizar mais um sonho.

Muito Obrigada!

“O conhecimento serve para encantar as
pessoas, não para humilhá-las.”

Mário Sérgio Cortella

RESUMO GERAL

O *Eucalyptus* é, amplamente, cultivado em razão das várias características como, rápido crescimento, extensa adaptabilidade e pela qualidade da madeira que é largamente utilizada. Tendo em vista a importância econômica das espécies florestais, a transformação genética abre novas perspectivas aos programas de melhoramento, ampliando e disponibilizando novos genes que conferem tolerância aos estresses abióticos, resistência aos estresses bióticos e o aumento de produtividade, entre outras características. A eficiência da transformação depende da combinação de métodos eficientes e técnicas de regeneração. A transformação, via *Agrobacterium rhizogenes*, tem sido utilizada por ser um método com rápida obtenção de resultados, sendo muito usada no estudo de interação cepa bacteriana, construção gênica e planta. Com isso, este trabalho foi realizado com o objetivo de transformação de um híbrido comercial de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*, a partir do método de infiltração a vácuo, com a cepa MSU440, utilizando duas construções gênicas diferentes. Um plasmídeo (pCAMBIA3301), contendo o gene Bar que confere tolerância ao herbicida PPT e o outro plasmídeo (PB2GW7), contendo o gene CAHB12, um fator de transcrição que confere tolerância ao déficit hídrico. A transformação, utilizando o plasmídeo pCAMBIA3301, obteve uma taxa de transformação de, aproximadamente, 18% e a transformação com o plasmídeo PB2GW7 obteve uma taxa de, aproximadamente, 3,8% de plantas com raízes transformadas. Por meio dos resultados obtidos, pode-se observar uma diferença considerável nas taxas de transformação, indicando que o plasmídeo pode interferir de forma considerável na transformação via *Agrobacterium rhizogenes* cepa MSU440. O número de plantas que sobreviveram ao período de cocultivo foi muito abaixo do esperado, o que deve ser levado em consideração na análise dos resultados.

Palavras chave: *Eucalyptus*. Infiltração a vácuo. Bar. CAHB12.

GENERAL ABSTRACT

Eucalyptus is widely cultivated due to its rapid growth, extensive adaptability and the quality of wood which is widely used. Because of the economic importance of forest species, genetic transformation opens new perspectives in breeding programs, expanding and providing new genes which grant tolerance to abiotic stresses, resistance to biotic stresses and increased productivity, amongst other features. The transformation efficiency depends on the combination of efficient methods and regeneration techniques. Transformation via *Agrobacterium rhizogenes* has been used as a method due to the fast result obtaining, commonly used in the study of the bacteria strain, gene construction and plant interaction. Thus, this work aimed at the transformation of a commercial hybrid of *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* from the vacuum infiltration method with the MSU440 strain, using two different gene constructions. A plasmid (pCambia3301) containing the Bar gene which confers tolerance to the PPT herbicide, and the other plasmid (PB2GW7) containing the CAHB12 gene, a transcription factor which confers tolerance to water deficit. The transformation using the pCAMBIA3301 plasmid obtained a transformation rate of approximately 18%, and the transformation with the PB2GW7 plasmid obtained a rate of approximately 3.8% of transformed roots. With the results obtained, we can observe a considerable difference in the transformation rates. This indicates that the plasmid may interfere considerably in the transformation via MSU440 strain of *Agrobacterium rhizogenes*. However, the number of plants that survived the period of co-culture was much lower than expected, which should be taken into consideration when analyzing the results.

Keywords: *Eucalyptus*. Vacuum infiltration. Bar. CAHB12.

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	
1	INTRODUÇÃO GERAL 12
2	REFERENCIAL TEÓRICO 14
2.1	O gênero <i>Eucalyptus</i> 14
2.2	Tolerância ao déficit hídrico 16
2.3	Métodos de transformação Genética 19
2.4	O Gene Bar e o Fator de transcrição <i>Coffea arabica Homeobox 12</i> (CAHB12) 22
3	CONSIDERAÇÕES GERAIS 25
	REFERÊNCIAS 27
SEGUNDA PARTE – ARTIGO	
	ARTIGO 1 Influência de dois vetores na eficiência da transformação genética de um híbrido comercial urograndis via <i>Agrobacterium rhizogenes</i> 35
1	INTRODUÇÃO 37
2	MATERIAL E MÉTODOS 41
2.1	Obtenção do Material Vegetal 41
2.2	Plasmídeo e Transformação Bacteriana 42
2.3	Transformação das plantas via <i>Agrobacterium rhizogenes</i> 43
2.4	Extração de DNA genômico e análise via PCR 44
2.5	Avaliação da eficiência de transformação 47
3	RESULTADOS 48
4	DISCUSSÃO 52
5	CONCLUSÃO 56
	REFERÊNCIAS 58

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO GERAL

O eucalipto é uma espécie cultivada em larga escala em várias regiões tropicais e subtropicais em todo mundo. As grandes áreas de cultivo se devem às suas características favoráveis como rápido crescimento, facilidade de manejo, diversidade de espécies e a possibilidade de atendimento a uma ampla gama de propósitos industriais (SANTOS; GERALDI; GARCIA, 2003).

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, garantem um carvão, facilmente, renovável e de boa qualidade. As espécies mais utilizadas no Brasil para estes fins são *E. grandis*, *E. saligna*, *E. camladulensis* e *E. urophylla*, assim como seus híbridos (SANTOS, 2010).

Tendo em vista a importância econômica das espécies florestais, a transformação genética abre novas perspectivas aos programas de melhoramento, ampliando e disponibilizando novos genes que conferem tolerância aos estresses abióticos, resistência aos estresses bióticos e o aumento de produtividade, entre outras características. A incorporação de novas características em cultivares de importância agrônômica permitirá, futuramente, alcançar o aumento da produtividade, em particular, as expansões no segmento de celulose e papel (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTORES DE FLORESTAS PLANTADAS - ABRAF, 2013).

Visando à diminuição do custo da implantação das florestas e à redução da perda de plantas, a biotecnologia vem sendo utilizada na obtenção de eventos transgênicos resistentes ao estresse hídrico (ABRAF, 2013). Estudos ecofisiológicos mostraram que o déficit hídrico é o principal fator limitante no

crescimento das mudas de eucalipto, pois o crescimento e desenvolvimento dessas mudas dependem, principalmente, da quantidade de água disponível no solo, aumentando, assim, os custos para a implantação da floresta. O déficit hídrico, também, tem sido determinante nos plantios e na definição dos genótipos que irão compor as florestas (VILLAR et al., 2011). Outro fator importante é a interferência das ervas daninhas no crescimento das florestas plantadas de eucalipto, onde a utilização de herbicidas é uma prática comum na eliminação dessas plantas, porém a utilização desses herbicidas pode acarretar em intoxicação da parte aérea da planta, gerando prejuízos (TUFFI, 2006).

A eficiência da transformação genética depende de fatores que podem interferir na taxa de transformação e os principais são a susceptibilidade do material vegetal à cepa bacteriana, densidade da suspensão bacteriana, condições de incubação, tipo de explante, idade do explante, utilizado para transformação, modo de lesão do tecido, adição de compostos fenólicos ao meio de cocultivo, o que ativa região de virulência (*vir*) e a escolha da cepa bacteriana a ser utilizada (LIN; KWORK; DORAN, 2003; STACHEL et al., 1985).

Diante do exposto, o presente trabalho foi realizado com o objetivo de transformação de híbridos de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* visando ao estudo da influência de dois vetores na eficiência da transformação genética via *Agrobacterium rhizogenes*

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 O gênero *Eucalyptus*

O eucalipto é originário da Austrália, pertence à família *Myrtaceae*, ordem *Myrtales*, possuindo mais de 700 espécies e híbridos. Apresenta rápido crescimento e período de rotação curto, adaptando-se a uma ampla variedade de ambientes. As espécies *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus urophylla* e seus híbridos são mais cultivadas em regiões subtropicais e temperadas, *E. camadulensis* em regiões áridas e semi-áridas e *E. globulus* em climas temperados livres de geadas. Os maiores produtores de eucalipto são Brasil, Espanha, África do Sul e Portugal. No Brasil as espécies mais plantadas são: *E. grandis* x *E. urophylla*, *E. grandis*, *E. saligna* e *E. urophylla* (LUÍS et al., 2011; POKE et al., 2005).

As plantações de *Eucalyptus* são uma importante fonte de matéria prima para aplicação em diferentes indústrias incluindo celulose, papel, siderurgia, carvão vegetal, lenha, compensados, lâminas e painéis reconstituídos (AGGARWAL; KUMAR; SUDHAKARA REDDY, 2011). O *Eucalyptus* é mais amplamente cultivado nas áreas tropicais e subtropicais do mundo por causa do seu rápido crescimento, extensa adaptabilidade e pela qualidade da madeira largamente utilizada. Porém as espécies de crescimento rápido são mais sensíveis às mudanças climáticas, com isso, um dos objetivos do melhoramento genético é a obtenção de genótipos tolerantes a essas mudanças para estender as áreas de plantio de espécies comerciais de *Eucalyptus* (NAVARRO et al., 2011).

Para a economia brasileira e para a sociedade em geral, o setor florestal contribui com uma parcela importante da geração de produtos, tributos, divisas, empregos e renda, contribuindo para o desenvolvimento da indústria nacional de base florestal. No âmbito social, as atividades da cadeia produtiva do setor

promovem a geração de empregos e renda e, ao fixarem as populações no campo, auxiliam, também, na melhoria da qualidade de vida nas áreas rurais (ABRAF, 2013).

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 (SILVICULTURA, 2010)

No ano de 2012 a área plantada com o gênero totalizou 5.102.030 ha, representando crescimento de 4,8% (228.078 ha) frente ao ano de 2011 e 53% estavam concentrados na região Sudeste. Em âmbito estadual, Minas Gerais, São Paulo, Bahia, Mato Grosso do Sul, Rio Grande do Sul, Espírito Santo e Paraná detinham 83,6% dos plantios do gênero *Eucalyptus*. Neste mesmo ano o aumento da área plantada foi alavancado pelos investimentos de empresas nacionais do segmento de Papel e Celulose, haja vista que as maiores expansões ocorreram nos Estados do Tocantins (39,9%) e Mato Grosso do Sul (19%)(ABRAF, 2013).

Tendo em vista a importância econômica da espécie em várias áreas do setor industrial, e o aumento significativo na sua produção, a biotecnologia vem sendo utilizada para aumentar os ganhos em produtividade e sustentabilidade. As técnicas como cultura de tecidos, marcadores moleculares e transformação genética, unidas ao melhoramento convencional permitem a obtenção de genótipos mais produtivos e competitivos (XAVIER; OTONI, 2009).

A engenharia genética oferece uma oportunidade de inserir novos genes à cultura, aumentando, assim, a produtividade da espécie e diminuindo a perda decorrente de estresses bióticos e abióticos. Os estudos de transformação genética de espécies arbóreas estão focados em modificações da celulose ou biossíntese, aumento de biomassa e modificação no teor de lignina. Outros

estudos incluem tolerância a estresses bióticos e abióticos (GIRIJASHANKAR, 2011; GRATTAPAGLIA; RESENDE, 2010; SPOKEVICIUS et al., 2005). Um significativo avanço na transformação genética de *Eucalyptus* tem sido obtido, por meio da transformação via *Agrobacterium tumefaciens* e *Agrobacterium rhizogenes* (MACRAE; STADEN, 1993; SARTORETTO et al., 2008; SERRANO et al., 1996).

Considerando os fatores citados, no Brasil, o eucalipto tem sido extensivamente utilizado em plantios florestais por diversas razões como: grande plasticidade do gênero, em função da diversidade de espécies 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).

2.2 Tolerância ao déficit hídrico

A água é o principal constituinte do tecido vegetal, representando 50% da massa fresca de plantas lenhosas e cerca de 80% a 95% nas plantas herbáceas, sendo necessária como reagente no metabolismo vegetal, transporte e translocação de solutos, na turgência celular, na abertura e fechamento dos estômatos e na penetração do sistema radicular, portanto uma pequena redução na disponibilidade de água no solo pode afetar, drasticamente, o metabolismo das plantas, afetando o crescimento, desenvolvimento e a produtividade das culturas em muitos ambientes. A água é responsável pela forma e estrutura dos órgãos e essencial para o crescimento e desenvolvimento das culturas, sejam elas anuais ou perenes (MENDHAM et al., 2011; TAIZ; ZEIGER, 2004).

Tanto a seca quanto o excesso de sal no solo são estresses que podem levar à ocorrência de déficit hídrico em células vegetais, afetando, praticamente,

todos os aspectos fisiológicos e metabólicos, atrasando o crescimento e o desenvolvimento da planta. Esses estresses são fatores ambientais que limitam a produção das culturas e a distribuição vegetal das espécies que sofrem com esses problemas. Muitas das respostas moleculares e celulares das plantas a esses estresses têm sido estudadas em níveis fisiológicos e bioquímicos (CHEN et al., 2005; SHINOZAKI, 2006; ZHU, 2002a).

Quando submetidas a condições de estresse hídrico, as plantas disparam uma complexa cascata de sinalização (dependente ou não do ácido abscísico – ABA) e acumulam alguns compostos conhecidos como osmólitos, dentre eles estão a prolina, açúcares solúveis, compostos quaternários de amônio (glicina betaína, prolina betaína, B-alanina betaína e colina -0-sulfato) e o composto terciário de sulfato, 3-dimetilsulfoniopropionato, que culmina com a ativação de uma série de mecanismos de resposta responsáveis por conferir tolerância ao estresse (ASHRAF; FOOLAD, 2007; CHEN et al., 2005; TODAKA et al., 2012).

O ABA é um fitohormônio que merece um enfoque maior, pois em altas concentrações na célula pode induzir a expressão de vários genes, também, induzíveis por estresses bióticos e abióticos (CHEN et al., 2005). Além disso, ele desempenha um papel central em respostas de estresse hídrico, em razão da sua função de regular a perda de água por transpiração a partir do movimento estomático (ROELFSEMA; HEDRICH; GEIGER, 2012; SHINOZAKI; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2007; XIONG; SCHUMAKER; ZHU, 2002; ZHOU et al., 2012).

A expressão de muitos genes é induzida nessa situação, e alguns fatores de transcrição já foram identificados como reguladores de diversas etapas relacionadas com a resposta ao estresse hídrico, como por exemplo, CBF/DREB e ABF (SHINOZAKI, 2006; ZHU, 2002b). Outros genes relacionados ao déficit hídrico em plantas foram relatados, atuando diretamente ou induzindo à ativação

de outros genes em rotas envolvidas com a resposta à tolerância a esse tipo de estresse (ASHRAF; FOOLAD, 2007; CHEN et al., 2005; TODAKA et al., 2012). O alelo LEW-2 (do inglês 'leaf wilting') do gene *AtCesA8/IRX1*, isolado de um mutante de *Arabidopsis*, é um dos genes que estão envolvidos na tolerância contra estresses osmóticos, tais como a seca e o salino, dentre outros. Os autores deste trabalho verificaram que as plantas mutantes acumulam níveis mais altos de osmólitos e ABA e são mais tolerantes à seca do que o tipo selvagem (CHEN et al., 2005).

O gene *AtNCED3* (*Arabidopsis thaliana* 9-cis-epoxycarotenoid deoxygenase) é outro gene que, também, está envolvido com a tolerância ao estresse osmótico provocado pela ausência de água. Em condições de estresse hídrico, esse gene apresenta um papel crucial na biossíntese de ABA decorrente da condição de desidratação à qual a planta foi submetida (HUH et al., 2010; SANTOS; GERALDI; GARCIA, 2003; URANO et al., 2009; WOO et al., 2011).

Outras estratégias vêm sendo utilizadas para aumentar a tolerância ao frio e salinidade em plantas, incluindo a super expressão de prolina e sua acumulação nas células das plantas. O efeito benéfico da aplicação de prolina tem sido verificado em diversos tipos de estresse como o salino, o hídrico e aquele induzido pelo frio. A prolina ministrada exogenamente pode facilitar o ajuste osmótico e, conseqüentemente, favorecer a manutenção do crescimento sob condições de estresse salino (DIBAX et al., 2010).

Existem interesses consideráveis acerca da expansão de plantios de *Eucalyptus* para ambientes mais secos, principalmente, em função da chance de utilizar regiões com condições adversas e consideradas inviáveis para o estabelecimento da cultura (DWIVEDI; ALAVALAPATI, 2009). Poucos são os trabalhos na literatura acerca da transformação genética de *Eucalyptus* relacionados com o estresse causado por déficit hídrico, justificando a

necessidade de desenvolver pesquisas que almejem produzir plantas tolerantes a essas condições e, conseqüentemente, mais produtivas.

2.3 Métodos de transformação Genética

A transformação genética utiliza dois métodos para realizar a transferência de genes para a planta: forma direta e indireta. Na transferência direta o principal método é a biobalística, e na transferência indireta utilizam-se bactérias como mediadoras da transferência, entre elas os principais vetores utilizados são a *Agrobacterium tumefaciens* (*A.tumefaciens*) e *Agrobacterium rhizogenes* (*A. rhizogenes*). Existem vários fatores que influenciam na eficiência da transformação via *Agrobacterium*, como: densidade da suspensão bacteriana, condições de incubação, tipo de explante, idade do explante utilizado para transformação, modo de lesão do tecido, adição de compostos fenólicos ao meio de cocultivo, o que ativa região de virulência (*vir*), e a escolha da cepa a ser utilizada (ALCANTARA et al., 2011; ANDRADE et al., 2003).

O método de transformação utilizando *Agrobacterium tumefaciens* foi proposto a partir de estudos da doença chamada galha-da-coroa. Com a infecção, um tumor é formado e com isso há a proliferação descontrolada de células, podendo levar à morte das plantas (TORRES, 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 inúmeros genes, entre eles os oncogenes, responsáveis pela patogenicidade da bactéria (GASSER; FRALEY, 1989).

Sendo assim, há possibilidades de utilizar linhagens da *Agrobacterium* como vetores no processo de transformação de plantas. Para tal, são excluídos os

oncogenes, obtendo-se uma linhagem “desarmada” e o gene é inserido entre as extremidades da região-T (SARTORETTO et al., 2008).

A transformação via *A. tumefaciens* cepa EHA105 é considerada mais eficiente do que a cepa LBA4404, por ser derivada de uma cepa super virulenta (A281) enquanto que a LBA4404 é derivada de uma cepa menos virulenta (Ach5), porém, a sua eliminação de tecidos vegetais é, relativamente, mais fácil em baixas concentrações de antibióticos do que a cepa EAH105 (AGGARWAL; KUMAR; SUDHAKARA REDDY, 2011; TERAkami et al., 2007).

Várias cepas de *A. tumefaciens* foram utilizadas em trabalhos de transformação genética de espécies de *Eucalyptus*, dentre essas pode-se destacar a cepa LBA 4404 (GONZÁLEZ, 2002; PRAKASH; GURUMURTHI, 2009); EHA 101 (KAWAZU, 2003), EHA 105 (CHENG, 2006; DIBAX et al., 2010) e AGL1 (NAVARRO et al., 2011). Em estudo de transformação de *Eucalyptus tereticornis* usando *A. tumefaciens* cepa LBA4404, a frequência média de transformação foi de 21,29% no caso de cotilédones e de 14,43% no caso de hipocótilo (PRAKASH; GURUMURTHI, 2009). Foi observada que eficiência da transformação genética foi maior quando a acetoseringona foi adicionada ao meio durante a pré-cultura e co-cultura (ALCANTARA et al., 2011).

A *A. rhizogenes*, também, vem sendo utilizada em estudos de transformação genética. Essa é uma bactéria fitopatogênica gram-negativa que provoca a produção de raízes adventícias em cabeleira em plantas dicotiledôneas e em algumas monocotiledôneas, a qual consiste de raízes altamente ramificadas que crescem, rápida e patologicamente, na ausência de reguladores de crescimento exógenos nos locais feridos. A transformação mediada por *A. rhizogenes* leva a produção de plantas quiméricas, compreendendo um complexo de raízes transgênicas em cabeleira, ligadas a brotos e folhas não transformados. As 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 (BROOThAERTS et al., 2005).

Por comparação, as cepas de *A. rhizogenes* MSU440 e R1000 são consideradas de alta virulência, exibindo a morfologia esperada para plantas transformadas (LUÍS et al., 2011). A *A. rhizogenes* transfere o T-DNA do plasmídeo Ri (root inducing) para o genoma da planta e, também, o T-DNA do vetor binário, permitindo a integração do transgene (JIAN et al., 2009).

A transformação genética mediada por *A. rhizogenes* tornou-se uma ferramenta poderosa para os estudos de função de genes de raiz, em virtude de sua metodologia simples e rápida (CAO et al., 2012). Esta particularidade das *A. rhizogenes* foi de grande importância para a biotecnologia vegetal, em função de 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; SIMPSON, 2004).

A transformação genética via *A. 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-3-metilglutaril-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 transformação (MACHADO et al., 1997) e transformação de espécies de eucalipto de difícil enraizamento (MACRAE; STADEN, 1993).

2.4 O Gene Bar e o Fator de transcrição *Coffea arabica* Homeobox 12 (CAHB12)

Espécies de eucalipto destinadas a plantios comerciais apresentam rápido crescimento e boa adaptabilidade em campo, mas sofrem interferência de plantas daninhas, especialmente, nos primeiros anos de cultivo, tendo como consequência o decréscimo qualitativo e quantitativo da sua produção. Esse fato coloca as plantas daninhas como um grande problema para implantação e manutenção de florestas de eucalipto, tornando o manejo adequado da flora invasora indispensável, o que tem fomentado o interesse de vários pesquisadores nas últimas décadas.

O uso dos herbicidas é prática comum para o controle dessas plantas, por demonstrar elevada eficiência, baixo custo e facilidade de aplicação. Todavia, a aplicação dirigida ao controle das ervas daninhas pode causar intoxicação na parte aérea da planta, causando injúrias nas folhas, o que pode ser uma porta de entrada para patógenos (TUFFI SANTOS et al., 2005).

Com isso, a obtenção de plantas tolerantes a herbicidas é de grande importância para o cultivo de eucalipto. Genes que conferem tolerância a herbicidas são muito utilizados como agentes de seleção para a transformação genética de plantas, vários estudos que utilizaram o gene Bar como marcador de seleção foram publicados nos últimos anos (HOLLAND; WALTER, 2005; RAMAN; RANA; PAWAN, 2007; VENKATA; KARUPPANNAN, 2010; WANG et al., 2003; YABOR et al., 2010).

O gene Bar, codifica a enzima fosfinotricina-N-acetiltransferase (PAT). A PAT catalisa a detoxificação pela acetilação do grupamento amino livre, contido na fosfinotricina (PPT), incapacitando, assim, a sua competição de forma inibitória com a glutamina sintase. O PPT, um análogo da glutamina, é tóxico à planta e age na glutamina sintase, uma enzima chave para a assimilação de amônio e para a regulação da assimilação de nitrogênio na planta. Quando as

plantas passam pelo processo de transformação e o T-DNA é inserido no genoma, a planta irá incorporar esta característica, tornando-se resistente ao PPT.

O PPT (FINALE®) é um herbicida não seletivo, utilizado há mais de 20 anos no manejo da vegetação, para formar a palha no sistema plantio direto. O primeiro sintoma da ação do FINALE® é o amarelecimento da folhagem e outros tecidos verdes da planta, seguido de murchamento e morte da planta, processo que demora 1 a 2 semanas.

O controle de ervas daninhas é de extrema importância para o sucesso na implantação de florestas de eucalipto, assim como a quantidade de água disponível para a planta, principalmente, no estágio de muda, onde a planta tem maior necessidade de irrigação. Vários estudos que buscam genes ligados à tolerância ao déficit hídrico vem sendo desenvolvidos, dentre esses estudos alguns fatores de transcrição foram identificados.

Os genes homeobox apresentam um domínio conservado de 60 aminoácidos (homeodomínio), e são encontrados em diversos organismos eucarióticos. Geralmente estes fatores de transcrição estão envolvidos com processos de diferenciação e desenvolvimento celular. Em plantas existem 8 sub-famílias de genes homeobox: Zinc-finger homeobox, Bell, Knox, Wushel-like, HD-Zip-I, -II, -III, e -IV. Todos os genes homeobox relacionados até o momento com a resposta ao estresse hídrico fazem parte da subfamília HD-Zip-I, uma classe encontrada, exclusivamente, em plantas (ROCHA et al., 2005).

Estudos recentes têm mostrado que os fatores de transcrição que pertencem à família homeobox, também, podem estar envolvidos na modulação da resposta ao stress de seca e sinalização de ABA, controlando o desenvolvimento vegetal em tais condições (DENG et al., 2006; DEZAR et al., 2005; HENRIKSSON et al., 2005). Por exemplo, os genes ATHB6 e ATHB7 em *Arabidopsis thaliana* e o seu ortólogo putativo no girassol, HAHB4, sugerem

que esses genes podem regular o crescimento da planta em resposta ao hormônio ABA, em condições de déficit hídrico, e aumentar a tolerância à seca (HIMMELBACH et al., 2002; MANAVELLA et al., 2006; SÖDERMAN et al., 1999).

Dentre os fatores de transcrição da família homeobox, o CAHB12 e o CAHB1 foram identificados dentro do Programa “Genoma Café”. Os níveis de expressão desses genes homeobox foram analisados e submetidos a condições de estresse hídrico em plantas de *Coffea arabica* e todos os genes homeobox de café apresentaram seu padrão de expressão modulado pela condição de déficit hídrico em folhas, caules e raízes, sendo este padrão diferente para cada gene. O CAHB12 foi induzido, especificamente, em condições de déficit hídrico em folha e raízes de café, indicando a sua importância na resposta ao estresse. Sob controle do promotor 35S, o gene CAHB12 é capaz de conferir maior tolerância ao déficit hídrico e estresse salino de plantas da espécie *A. thaliana*, em diferentes fases do seu desenvolvimento (FERREIRA et al., 2012)

3 CONSIDERAÇÕES GERAIS

A transformação genética é um método capaz de colaborar para o sucesso dos plantios florestais, contribuindo com técnicas que auxiliem no aumento de produtividade sem aumentar a área de produção, reduzindo gastos na implantação e manejo na cultura tanto no viveiro quanto em campo, e promovendo a geração de genótipos mais tolerantes e resistentes a estresses abióticos e bióticos. Dentre os abióticos, o estresse gerado pelo déficit hídrico merece destaque, pois leva à perda de grande quantidade de material vegetal no campo e eleva os custos de produção da espécie, relacionados, principalmente, com a irrigação. O estresse gerado pelo uso de herbicidas, também, é de grande importância econômica, pois pode gerar perdas na produção, já que os herbicidas podem causar danos à parte aérea das plantas.

A transformação genética pode ser realizada pelo método direto e indireto. O método de transformação indireta, via *Agrobacterium*, é o mais utilizado para dicotiledôneas. Em trabalhos, cujo objetivo é a obtenção de plantas somente com as raízes transgênicas, a transformação, via *Agrobacterium rhizogenes*, é o método utilizado. Por meio dessa técnica, é produzida uma planta quimérica, com raízes transgênicas e parte aérea normal. Por ser um método com rápida obtenção de resultados, é muito utilizado no estudo de interação da construção gênica, cepa bacteriana e a planta.

A eficiência da transformação genética depende de fatores que podem interferir na taxa de transformação e os principais são a susceptibilidade do material vegetal à cepa bacteriana, o método utilizado, durante a infecção, o acréscimo de compostos fenólicos, durante o processo de infecção e no período de cocultivo e a interação construção gênica, cepa bacteriana e explante.

Visto isso, os estudos de novos genes relacionados com a tolerância ao déficit hídrico e a herbicidas são necessários para a obtenção de genótipos mais adaptados, diminuindo, assim, os gastos com as florestas plantadas.

Com isso, este trabalho foi realizado com o objetivo de estudar a influência de dois vetores na transformação genética, utilizando o método de infiltração a vácuo, com a cepa MSU440 de *A. rhizogenes*. Para avaliação da eficiência do protocolo com híbrido comercial de *E. grandis* X *E. urophylla* denominado LCBM2, foi utilizado o plasmídeo pCAMBIA 3301, contendo o gene Bar, que confere tolerância ao herbicida PPT, e o plasmídeo PB2GW7 que contém o gene CAHB12 que confere tolerância ao estresse hídrico, para a transformação genética.

REFERÊNCIAS

- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTORES DE FLORESTAS PLANTADAS. **Anuário Estatístico da ABRAF, ano base 2012**. Brasília, 2013.
- AGGARWAL, D.; KUMAR, A.; SUDHAKARA REDDY, M. Agrobacterium tumefaciens mediated genetic transformation of selected elite clone(s) of Eucalyptus tereticornis. **Acta Physiologiae Plantarum**, Berlin, v. 33, n. 5, p. 1603-1611, 13 jan 2011.
- ALCANTARA, G. B. et al. Organogenesis and transient genetic transformation of the hybrid Eucalyptus grandis × Eucalyptus urophylla Organogênese e transformação genética transiente do híbrido Eucalyptus grandis × Eucalyptus urophylla. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 68, p. 246-251, Apr. 2011.
- ANDRADE, G. M. et al. Biologia molecular do processo de infecção por Agrobacterium spp. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 5, p. 465-476, 2003.
- ASHRAF, M.; FOOLAD, M. R. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 59, p. 206-216, 2007.
- BROOHTAERTS, W. et al. Gene transfer to plants by diverse species of bacteria. **BMC Plant Biology**, Cambridge, v. 433, p. 9-78, 2005.
- CAO, B. et al. Safety assessment of dehydration-responsive element-binding (DREB) 4 protein expressed in E. coli. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 50, n. 11, p. 4077-84, Nov. 2012.

CHEN, Z. et al. Disruption of the cellulose synthase gene , AtCesA8 / IRX1 , enhances drought and osmotic stress tolerance in Arabidopsis. **The Plant Journal**, Hoboken, v. 43, p. 273-283, 2005.

DENG, X. et al. A homeodomain leucine zipper gene from *Craterostigma plantagineum* regulates abscisic acid responsive gene expression and physiological responses. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 61, p. 469-489, 2006.

DEZAR, C. A. et al. Hahb-4 , a sunflower homeobox-leucine zipper gene , is a developmental regulator and confers drought tolerance to Arabidopsis thaliana plants. **Transgenic Research**, London, v. 14, p. 429-440, 2005.

DIBAX, R. et al. Transformation of *Eucalyptus saligna* with P5CS gene. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 54, n. 1, p. 6-12, 2010.

DWIVEDI, P.; ALAVALAPATI, J. R. R. Stakeholders' perceptions on forest biomass-based bioenergy development in the southern US. **Energy Policy**, Surrey, v. 37, n. 5, p. 1999-2007, May 2009.

FERREIRA, M. A. et al. **Utilização do gene Homeobox de café CAHB12 na produção de plantas transgênicas mais tolerantes ao déficit hídrico e estresse salino**. 2012. Disponível em: <<http://www.google.com/patents/WO2012061911A2?cl=pt>>. Acesso em: 22 jan. 2013.

GIRIJASHANKAR, V. Genetic transformation of eucalyptus. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, Lucknow v. 17, n. 1, p. 9-23, 12 fev 2011.

GONZÁLEZ, E. R. **Transformação genética de *Eucalyptus grandis* e do híbrido *E . grandis* x *E . urophylla* via *Agrobacterium***. 2002. 93 p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

GRATTAPAGLIA, D.; RESENDE, M. D. V. Genomic selection in forest tree breeding. **Tree Genetics & Genomes**, Switzerland, v. 7, n. 2, p. 241-255, Oct. 2010.

HENRIKSSON, E. et al. Homeodomain Leucine Zipper Class I Genes in Arabidopsis . Expression Patterns and Phylogenetic Relationships 1 [w]. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 139, p. 509-518, Sept. 2005.

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**, Cambridge, v. 10, n. 1, p. 237, 2010.

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

HIMMELBACH, A. Homeodomain protein ATHB6 is a target of the t al. Protein phosphatase ABI1 and regulates hormone responses in Arabidopsis. **The EMBO Journal**, London, v. 21, n. 12, p. 3029-3038, 2002.

HOLLAND, J. A. C. L.; WALTER, L. J. G. C. Consistent and stable expression of the nptII , uidA and bar genes in transgenic Pinus radiata after Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation using nurse cultures. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 23, p. 606-616, 2005.

HUH, S. M. et al. Arabidopsis Annexins AnnAt1 and AnnAt4 Interact with Each Other and Regulate Drought and Salt Stress Responses. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 51, n. 9, p. 1499-1514, 2010.

JIAN, B. et al. Agrobacterium rhizogenes-mediated transformation of Superroot-derived Lotus corniculatus plants: a valuable tool for functional genomics. **BMC Plant Biology**, Cambridge, v. 14, n. 7, p. 1-14, 2009.

SHINOZAKI, K. S. Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 57, p. 781-803, 2006.

KIM, Y. et al. Enhanced accumulation of phytosterol and triterpene in hairy root cultures of platycodon grandiflorum by overexpression of panax ginseng 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A Reductase. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 61, p. 1928-1934, 2013.

LIN, H. W.; KWOK, K. H.; DORAN, P. M. Development of Linum flavum hair root for production of coniferin. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 25, n. 7, p. 521-525, 2003.

LUÍS, R. et al. Induction of transgenic hairy roots in soybean genotypes by Agrobacterium rhizogenes - mediated transformation. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, Brasília, v. 46, n. 9, p. 1070-1075, 2011.

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. Agrobacterium rhizogenes-mediated transformation to improve rooting ability of eucalypts. **Tree Physiology**, Oxford, v. 12, n. 4, p. 411-8, June 1993.

MANAVELLA, P. A. et al. Cross-talk between ethylene and drought signalling pathways is mediated by the sunflower Hahb-4 transcription factor. **The Plant Journal**, Hoboken, v. 48, p. 125-137, 2006.

MENDHAM, D. S. et al. Soil water depletion and replenishment during first- and early second-rotation *Eucalyptus globulus* plantations with deep soil profiles. **Agricultural and Forest Meteorology**, Amsterdam, v. 151, n. 12, p. 1568-1579, Dec. 2011.

MORA, A. L.; GARCIA, C. H. **A cultura do eucalipto no Brasil**. São Paulo: [s.n.], 2000.

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, n. 1, p. 50-63, Jan. 2011.

POKE, F. S. et al. Genomic research in *Eucalyptus*. **Genetica**, Dordrecht, v. 125, n. 1, p. 79-101, Sept. 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 & Developmental Biology - Plant**, Columbia, v. 45, n. 4, p. 429-434, Dec. 2009.

RAMAN, S.; RANA, S.; PAWAN, P. S. *Agrobacterium tumefaciens* mediated transfer of *Phaseolus vulgaris* α -amylase inhibitor-1 gene into mungbean *Vigna radiata* (L.) Wilczek using bar as selectable marker. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 26, p. 187-198, 2007.

ROCHA, G. et al. Identification and characterization of homeobox genes in *Eucalyptus*. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 3, p. 511-519, 2005.

ROELFSEMA, M. R. G.; HEDRICH, R.; GEIGER, D. Anion channels: master switches of stress responses. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 17, n. 4, p. 221-229, 2012.

SANTOS, P.; GERALDI, I.; GARCIA, J. Estimativas de parâmetros genéticos de propriedades físicas e mecânicas da madeira em *Eucalyptus grandis* Estimates of genetic parameters for physical and mechanical properties of wood in *Eucalyptus grandis*. **Scientia Florestalis**, Piracicaba, n. 63, p. 54-64, 2003.

SARTORETTO, L. M. et al. Transformação genética□: estratégias e aplicações para o melhoramento genético de espécies florestais. **Ciência Ruaral**, Santa Maria, v. 38, n. 3, p. 861-871, 2008.

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, n. 295, p. 285-290, 1996.

SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Gene networks involved in drought stress response and tolerance. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 58, n. 2, p. 221-227, 2007.

SILVICULTURA, S. B. **Fatos e números do Brasil florestal**. . [S. l: s. n.], 2010.

SÖDERMAN, E. et al. The HD-Zip gene *ATHB6* in *Arabidopsis* is expressed in developing leaves, roots and carpels and up-regulated by water deficit conditions. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 40, p. 1073-1083, 1999.

SPOKEVICIUS, A. V. et al. Agrobacterium-mediated in vitro transformation of wood-producing stem segments in eucalypts. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 23, n. 9, p. 617-24, Feb. 2005.

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* 1. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 137, p. 1345-1353, Apr. 2005.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

TERAKAMI, S. et al. Agrobacterium-mediated transformation of the dwarf pomegranate (*Punica granatum* L. var. *nana*). **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 26, n. 8, p. 1243-51, Aug. 2007.

TODAKA, D. et al. Toward understanding transcriptional regulatory networks in abiotic stress responses and tolerance in rice. **Rice a Springer Open Journal**, Tokyo, v. 5, p. 1-9, 2012.

TUFFI, L. D. **Efeitos diretos e indiretos do glyphosate em eucalipto**. [S. l.: s. n.], 2006.

TUFFI SANTOS, L. et al. Leaf growth and morphoanatomy of Eucalypt under the effect of Glyphosate drift. **Planta Daninha**, Rio de Janeiro, v. 26, n. 1, p. 133-142, 2005.

URANO, K. et al. Characterization of the ABA-regulated global responses to dehydration in *Arabidopsis* by metabolomics. **The Plant Journal**, Hoboken, v. 57, p. 1065-1078, 2009.

VENKATA, M.; KARUPPANNAN, R. Selectable marker elimination in the T₀ generation by Agrobacterium-mediated co-transformation involving Mungbean yellow mosaic virus TrAP as a non-conditional negative selectable marker and bar for transient positive selection. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 29, p. 473-483, 2010.

VILLAR, E. et al. RNA-Seq reveals genotype-specific molecular responses to water deficit in eucalyptus. **BMC Genomics**, Leiden, v. 12, p. 1471-2164, 2011.

WANG, Y. et al. Co-transfer and expression of chitinase , glucanase , and bar genes in creeping bentgrass for conferring fungal disease resistance. **Plant Science**, Limerick, v. 165, p. 497-506, 2003.

WOO, D. H. et al. Arabidopsis lenc1 mutant displays reduced ABA accumulation by low AtNCED3 expression under osmotic stress. **Journal of Plant Physiology**, Minneapolis, v. 168, n. 2, p. 140-147, 2011.

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

XIONG, L.; SCHUMAKER, K.; ZHU, J. K. Cell signaling during cold, drought, and salt stress. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 14, p. 165-183, 2002.

YABOR, L. et al. Characterization of a field-grown transgenic pineapple clone containing the genes chitinase , AP24 and bar. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, Columbia, v. 46, p. 1-7, 2010.

ZHOU, M. L. et al. Improvement of drought and salt tolerance in Arabidopsis and Lotus corniculatus by overexpression of a novel DREB transcription factor from Populus euphratica. **Gene**, Rochester, v. 506, n. 1, p. 10-7, Sept. 2012.

ZHU, J. K. Salt and drought stress signal. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 53, p. 247-273, 2002a.

ZHU, J. K. Salt and drought stress signal. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 53, p. 247-73, 2002b.

SEGUNDA PARTE – ARTIGO

ARTIGO 1 **Influência de dois vetores na eficiência da transformação genética de um híbrido comercial urograndis via *Agrobacterium rhizogenes***

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

RESUMO

Tendo em vista a importância das espécies florestais, a transformação genética abre novas perspectivas aos programas de melhoramento, ampliando e disponibilizando novos genes que conferem tolerância aos estresses abióticos, resistência aos estresses bióticos e o aumento de produtividade entre outras características. A eficiência da transformação depende da combinação de métodos eficientes e técnicas de regeneração. A transformação via, *Agrobacterium rhizogenes*, tem sido usada por ser um método com rápida obtenção de resultados, sendo muito utilizada no estudo de interação cepa bacteriana, construção e planta. Com isso este trabalho foi realizado com o objetivo de transformação de um híbrido comercial de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* denominado LCBM 2, a partir do método de infiltração a vácuo com a cepa MSU440, utilizando duas construções diferentes, sendo um plasmídeo (pCAMBIA3301), contendo o gene Bar, que confere tolerância ao herbicida PPT, e o outro plasmídeo (PB2GW7), contendo o gene CAHB12, um fator de transcrição que confere tolerância ao déficit hídrico. As plantas tiveram a base cortada e foram submetidas a vácuo durante 4 min a 400 mmHg. As raízes foram co-cultivadas em meio MS por 5 dias a 19 °C. Após 90 dias as raízes foram coletadas e o DNA extraído para a realização das análises via PCR. A transformação, utilizando o plasmídeo pCAMBIA3301, obteve uma taxa de transformação de, aproximadamente 18%, enquanto que a transformação com o plasmídeo PB2GW7 obteve uma taxa de aproximadamente 3,8% de plantas com raízes transformadas. Por meio dos resultados obtidos, pode-se observar uma diferença considerável nas taxas de transformação, indicando que o plasmídeo pode interferir de forma considerável na transformação via *Agrobacterium rhizogenes*. Porém o número de plantas que sobreviveram ao período de cocultivo foi muito abaixo do esperado, o que deve ser levado em consideração na análise dos resultados.

Palavras-chave: *Eucalyptus*. Infiltração a vácuo. Bar. CAHB12

1 INTRODUÇÃO

O eucalipto é uma espécie de grande importância econômica no cenário mundial, sendo uma das espécies florestais mais cultivadas nos países tropicais e subtropicais, em razão de sua alta adaptabilidade, capacidade crescimento e qualidade da madeira (SANTOS; GERALDI; GARCIA, 2003).

As espécies de eucalipto destinadas a plantios comerciais apresentam rápido crescimento e boa adaptabilidade em campo, mas sofrem interferência de plantas daninhas, especialmente, nos primeiros anos de cultivo, tendo como consequência o decréscimo qualitativo e quantitativo da sua produção. O uso dos herbicidas é uma prática comum para o controle dessas plantas, por demonstrar elevada eficiência, baixo custo e facilidade de aplicação. Todavia, a aplicação dirigida ao controle das ervas daninhas pode causar intoxicação na parte aérea da planta, causando injúrias nas folhas, o que pode ser uma porta de entrada de patógenos (TUFFI SANTOS et al., 2005).

Com isso a obtenção de plantas tolerantes a herbicidas é de grande importância para o cultivo de eucalipto. Genes que conferem tolerância a herbicidas são muito utilizados como agentes de seleção para a transformação genética de plantas. Vários estudos que utilizaram o gene Bar como marcador de seleção foram publicados nos últimos anos (HOLLAND; WALTER, 2005; RAMAN; RANA; PAWAN, 2007; VENKATA; KARUPPANNAN, 2010; WANG et al., 2003; YABOR et al., 2010).

O controle de ervas daninhas é de extrema importância para o sucesso na implantação de florestas de eucalipto, assim como a quantidade de água disponível para a planta, principalmente, no estágio de muda, onde a planta tem maior necessidade de irrigação. O déficit hídrico, também, tem sido determinante nos plantios e na definição dos genótipos que irão compor as florestas. Vários estudos que buscam genes ligados à tolerância ao déficit hídrico vêm sendo desenvolvidos, dentre esses estudos alguns fatores de transcrição foram identificados.

Dentre os fatores de transcrição da família homeobox, o CAHB12 foi identificado dentro do Programa “Genoma Café”. Os níveis de expressão desse gene homeobox foram analisados e submetidos a condições de estresse hídrico em plantas de *Coffea arabica* e apresentou seu padrão de expressão modulado pela condição de déficit hídrico em folhas, caules e raízes. O CAHB12 é induzido, especificamente, em condições de déficit hídrico em folha e raízes de café, indicando a sua importância na resposta ao estresse. Sob controle do promotor 35S, o gene CAHB12 é capaz de conferir maior tolerância ao déficit hídrico e estresse salino de plantas da espécie *A. thaliana*, em diferentes fases do seu desenvolvimento (FERREIRA et al., 2012).

Tendo em vista a importância econômica da espécie em várias áreas do setor industrial, e o aumento significativo na sua produção, a biotecnologia vem sendo utilizada para aumentar os ganhos, principalmente, em produtividade, sendo necessária a obtenção de genótipos mais produtivos e resistentes/tolerantes ao estresse biótico e abiótico (NAVARRO et al., 2011; XAVIER; OTONI, 2009).

A introdução de genes de interesse em clones comerciais de eucalipto, via transformação genética, oferece uma excelente oportunidade para acelerar o processo de obtenção de genótipos superiores, já que a aplicação dos métodos convencionais de melhoramento na área florestal, embora eficiente, é relativamente lenta. A transformação genética pode ser realizada pelo método direto e indireto. O método transformação indireta, via *Agrobacterium*, é o mais utilizado para dicotiledôneas. Em trabalhos, cujo objetivo é a obtenção de plantas somente com as raízes transgênicas, a transformação, via *Agrobacterium rhizogenes*, é o método utilizado. Por meio dessa técnica é produzida uma planta quimérica, com raízes transgênicas e parte aérea normal. Por ser um método com rápida obtenção de resultados, é muito utilizado no estudo de interação da construção gênica, cepa bacteriana e a planta (ALCANTARA et al., 2011; ANDRADE et al., 2003; BROOHTAERTS et al., 2005).

Existem poucos relatos na literatura sobre transformação de *Eucalyptus* via *A. rhizogenes*. Um dos trabalhos foi realizado com o objetivo de estudar o efeito de diferentes cepas de *A. rhizogenes* (LBA 9402, R1601 e TR8,3) na infecção de espécies de eucalipto como *E. grandis*, *E. dunnii* e *E. nitens* (MACRAE; STADEN, 1993). Em outro trabalho, também, foi testada a eficiência de cinco cepas de *A. rhizogenes* (A4, LBA 9601, R1601, 2659 e 8196) em híbrido de *E. grandis* X *E. urophila*. Porém, nos dois trabalhos, seus resultados só foram avaliados, visualmente, com presença e ausência da formação de raízes em cabeleira e não foram feitos testes moleculares para a confirmação dos possíveis transformantes (MACHADO et al., 1997) .

Em um trabalho recente, a suscetibilidade do híbrido *E.grandis* X *E.urophylla* em ser infectado pela *Agrobacterium rhizogenes* foi descrita (MENDONÇA, 2011). Neste trabalho foi otimizado um protocolo para a transformação de eucalipto utilizando a cepa MSU440 pelo método de infecção por infiltração a vácuo, onde foi verificada uma alta taxa de transformação. Em outro trabalho mais recente foi utilizado um híbrido comercial de *E.grandis* X *E.urophylla* diferente do utilizado por Mendonça(2011), porém o método de transformação e a cepa bacteriana foram os mesmos, sendo que a taxa de transformação foi maior que a relatada anteriormente (BALIEIRO, 2013).

Considerando a importância de estudar a interação entre cepa bacteriana, construção gênica e planta, este trabalho teve como objetivo a transformação de híbridos de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* visando ao estudo da influência de dois vetores na eficiência da transformação genética via *Agrobacterium rhizogenes*, utilizando o método de transformação infiltração a vácuo, com a cepa MSU440 de *A. rhizogenes*, utilizando os plasmídeos pCAMBIA 3301 contendo o gene Bar, que confere tolerância ao herbicida PPT, e o plasmídeo PB2GW7 que contém o gene CAHB12, que confere tolerância ao estresse hídrico, para a transformação genética.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção do Material Vegetal

Meristemas de um híbrido comercial de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*, denominado LCBM2, foram estabelecidos *in vitro*. Os ápices de mini estacas foram excisados e desinfestados com pastilhas de paraformaldeído por 40 minutos em câmara de fluxo laminar. As regiões meristemáticas foram isoladas com o auxílio de lupa estereoscópica Zeiss e inoculadas em potes contendo meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), mantidas 10 dias no escuro. Após 10 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 27 ± 2 °C. Após 90 dias, as plântulas foram transferidas para meio de enraizamento MS com ausência de vitaminas e suplementos com 4,90 μM de AIB (ácido 3-indolbutírico).

Todos os meios foram acrescidos de 3% de sacarose, solidificados com 0,17% de phytigel e autoclavados a 121°C a 1 atm por 40 minutos.

As plântulas com, aproximadamente 30 dias em meio de enraizamento, foram utilizadas para os ensaios de transformação genética via *Agrobacterium rhizogenes*.

2.2 Plasmídeo e Transformação Bacteriana

Para a transformação das plantas, foram utilizados os plasmídeos pCAMBIA 3301, que contêm o promotor p35SCaMV e o gene de seleção Bar, que codifica a enzima fosfinotricina-N-acetiltransferase (PAT) e confere resistência às plantas transformadas ao herbicida PPT (Figura 1). Este plasmídeo, também, possui um gene que confere resistência ao antibiótico canamicina às bactérias transformadas. O outro plasmídeo utilizado foi o PB2GW7, que contém o gene CAHB12, um fator de transcrição que confere a tolerância ao estresse hídrico, o promotor p35SCaMV e gene de seleção Bar, que codifica a enzima fosfinotricina-N-acetiltransferase (PAT), e confere resistência às plantas transformadas ao PPT. Este plasmídeo, também, possui um gene que confere resistência aos antibióticos Estreptomicina e Espectinomicina às bactérias transformadas (Figura 2).

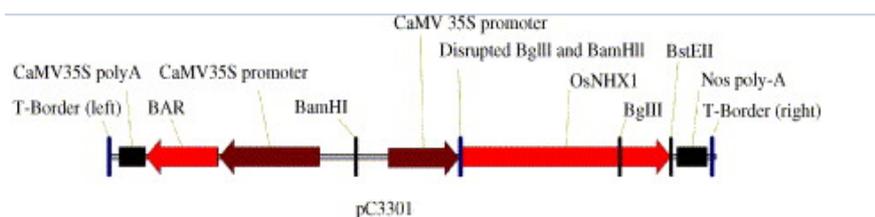


Figura 1 Plasmídeo pCAMBIA 3301

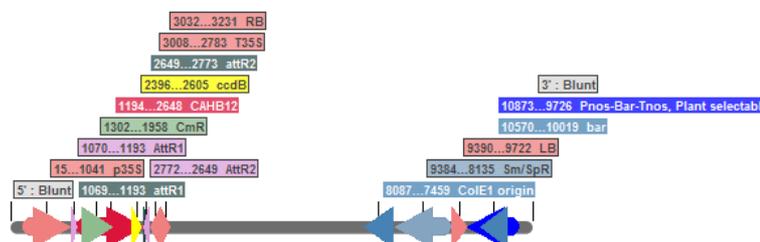


Figura 2 Plasmídeo PB2GW7

Os plasmídeos foram transferidos para *Agrobacterium rhizogenes* cepa MSU440 por eletroporação. Uma colônia da *Agrobacterium*, transformada com o plasmídeo pCAMBIA3301, foi inoculada em meio líquido Luria Both (LB) suplementado com 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de Canamicina e uma colônia da *Agrobacterium* transformada com o plasmídeo PB2GW7 foi inoculada em meio LB líquido suplementado com 300 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de Estreptomicina e 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ Espctinomicina .

As culturas foram incubadas em shaker a 28°C e 200 rpm por 48 horas. Após o período de crescimento da cultura de células bacterianas, os inóculos foram centrifugados a 5000g por 10 minutos e o pellet foi ressuspensionado em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com 30 mg.L^{-1} de sacarose e 100 μM de acetoseringona até atingir uma OD (600) de 0,7 , para transformação das raízes.

2.3 Transformação das plantas via *Agrobacterium rhizogenes*

Para os experimentos de transformação, foram utilizadas 325 explantes, que estavam a 30 dias em meio de enraizamento, e 100

explantes como controle, nas mesmas condições. A solução bacteriana com OD600 de 0.7 foi utilizada no processo de transformação.

O método de infecção utilizado para transformação das plantas foi corte na base e infiltração a vácuo. As plantas que foram transformadas tiveram a base radicular cortada e foram transferidas para um elermeyer de 10 mL contendo a cultura bacteriana. Os elermeyers foram levados para câmara de vácuo a 400 mmHg por 4 minutos (CANCHE-MOO et al., 2006) . Após este processo, as plantas foram inoculadas, horizontalmente, em placas de petri contendo meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962). Sobre o meio foi colocado uma folha de papel filtro estéril e os explantes inoculados foram co-cultivados em BOD por 5 dias à temperatura de 19 °C. As plantas controle foram infiltradas em meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) na ausência de bactérias.

Para eliminar as bactérias, após o período de co-cultivo, as plantas foram transferidas para meio de enraizamento, MS com ausência de vitaminas e suplementados com 4,90µM de AIB (ácido 3-indolbutírico), contendo o antibiótico Tioxina (Tioxin ®) na concentração de 500 mg.L⁻¹, mantidos em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 h e temperatura de 27 ± 2° C até o enraizamento, que ocorreu em, aproximadamente, 3 meses.

2.4 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 tecido vegetal (raiz) foram macerados em

nitrogênio líquido, transferidos para tubo Eppendorf de 2 mL contendo 1 mL de tampão de extração (2% p/v de CTAB; 2M NaCl; 100 mM tris-HCl pH 8,0; 25 mM EDTA pH 8,0) pré-aquecido a 65 °C. A este volume foi adicionado 2% (v/v) de β -mercaptoetanol, a solução foi homogeneizada e incubada por 40 minutos a 65 °C sendo homogeneizado por inversão a cada 10 minutos. Em seguida foi feito choque térmico em gelo por 5 minutos e centrifugado por 10 minutos a 13,4 g.

A fase aquosa foi coletada e transferida para um novo tubo onde foi acrescentado o mesmo volume de clorofórmio/ álcool isoamílico (24:1), a solução foi homogeneizada por 30 segundos e centrifugada por 10 minutos a 13,4g. O sobrenadante foi coletado e transferido para um novo tubo com 4 μ L de RNase A, na concentração de 100 μ g/mL, e incubado a 37°C por 30 minutos. Em seguida foi adicionando 240 μ L de álcool isopropílico gelado, a solução foi homogeneizada por inversão dos tubos e incubada a -20°C por 2 horas. Após a precipitação a solução foi centrifugada por 20 minutos a 13,4g.

Posteriormente, o sobrenadante foi descartado, o pellet lavado em 400 μ L de etanol absoluto e ressuspendido em 20 μ L de água ultrapura autoclavada. As amostras foram armazenadas a -20° C. A integridade do DNA foi verificada em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio e quantificado em espectrofotômetro (Nanodrop® Espectrophotometer ND-1000) a A (260 nm).

A confirmação da presença do gene Bar no DNA plasmidial foi realizada por análise de PCR, utilizando 1 U de GoTaq® Flexi DNA polimerase(Promega ®), 3 μ L tampão 5 X, 0,6 mMol.L⁻¹ dNTP mix, 1,75

mM de MgCl, 0,5 ng de cada *primer* 5' AGAAACCACGTCATGCC3', 5' TGCACCATCGTCAACCAC3' (amplificando um fragmento de 407pb) e 6,66 ng/ μ L do DNA plasmidial, completando o volume final com água ultrapura autoclavada para 15 μ L.

A reação foi submetida ao termociclador *Eppendorf Mastercycler*, que foi programado com temperatura de desnaturação inicial de 95 °C, por 5 minutos, seguidos de 30 ciclos de amplificação compostos de 3 etapas: 95 °C, por 30 segundos; 62,5 °C, por 30 segundos; 72 °C, por 2 minutos. Após os 30 ciclos, as amostras foram submetidas a uma etapa final de extensão de 3 minutos a 72 °C.

A confirmação da presença do gene CAHB12 no DNA plasmidial foi realizada por análise de PCR, utilizando 1 U de GoTaq® Flexi DNA polimerase(Promega ®), 3 μ L tampão 5 X, 0,6 mMol.L⁻¹ dNTP mix, 1,75 mM de MgCl, 0,5 ng de cada *primer* 5' CATGTTTAATCGGGAGGCAAAG 3', 5' TAGCAAAGGCCATCTGAGAAA 3' (amplificando um fragmento de 558pb) e 6,66 ng/ μ L do DNA plasmidial, completando o volume final com água ultrapura autoclavada para 15 μ L.

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

2.5 Avaliação da eficiência de transformação

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 co-cultivo (RIBAS et al., 2011).

3 RESULTADOS

De um total de 200 plantas transformadas com o plasmídeo pCMABIA3301, 44 plantas sobreviveram ao processo de cocultivo. Após o período de 3 meses de inoculação do híbrido LCBM2 em meio de enraizamento, foi observado o desenvolvimento de raízes, sendo algumas com fenótipo raiz em cabeleira. Para confirmação das possíveis transformantes, foi extraído o DNA das raízes das plantas sobreviventes para a análise via PCR. Para a realização desta análise utilizaram-se *primers* específicos para amplificação do gene Bar.

Das 44 plantas que sobreviveram ao período de cocultivo, 8 plantas apresentaram o amplicon de 407 pb, correspondente ao tamanho esperado para o gene Bar, observado no gel demonstrativo das análises via PCR (Figura 3). Não houve amplificação da planta controle negativo (C-p) nem do controle negativo da reação (C-r). O controle positivo, plasmídeo pCAMBIA 3301 (C+) e a planta controle positivo (BB4) apresentaram amplicon do tamanho esperado, 407pb. As colunas 7, 17, 40, 24, 63, 65, 69 representam os fragmentos amplificados do gene Bar, indicando a raiz transformada. As colunas 2, 11, 14, 15, 16, 23, 41, 42 indicam as raízes não transformadas.

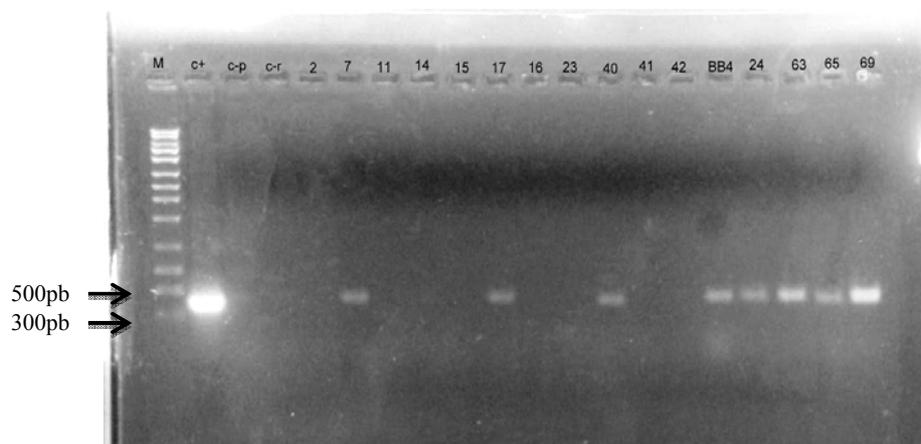


Figura 3 Gel demonstrativo das análises via PCR das raízes transformadas com o plasmídeo pCMABIA3301

Nota: Onde M representa o marcador molecular, c+ o controle positivo, c-p a planta controle negativo, c-r o controle da reação. As colunas 7,17,40, 24, 63, 65 e 69 representam as plantas transformadas e as colunas 2, 11, 14, 15, 16, 23, 41, 42 representam as plantas não transformadas

Neste caso, a infecção da cepa MSU440 de *Agrobacterium rhizogenes* com o plasmídeo pCMABIA3301 pelo processo de infiltração a vácuo do híbrido LCBM2 permitiu a obtenção de, aproximadamente, 18 % de plantas com raízes transformadas.

Para o experimento de transformação com o plasmídeo PB2GW7, 125 plantas foram utilizadas e 26 plantas sobreviveram ao processo de cocultivo. Após o período de 3 meses de inoculação do híbrido LCBM2, em meio de enraizamento, foi observado o desenvolvimento de raízes, sendo algumas com fenótipo raiz em cabeleira. Para confirmação das possíveis transformantes, foi extraído o DNA das raízes das plantas sobreviventes para a análise via PCR. Para a realização desta análise utilizaram-se *primers* específicos para amplificação do gene CAHB12.

Das 26 plantas que sobreviveram ao período de cocultivo, somente 1 apresentou o amplicon de 548pb, correspondente ao tamanho esperado para o gene CAHB12, observado no gel das análises via PCR (Figura 4). Não houve amplificação da planta controle negativo (C-p) nem do controle negativo da reação (C-r). O controle positivo, plasmídeo PB2GW7 (C+), apresentou amplicon do tamanho esperado, 548pb. A coluna 18 representa o fragmento amplificado do gene CAHB12, indicando a raiz transformada. As colunas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7,8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 19, 20,21, 22, 23, 24, 25 e 26 indicam as raízes não transformadas.

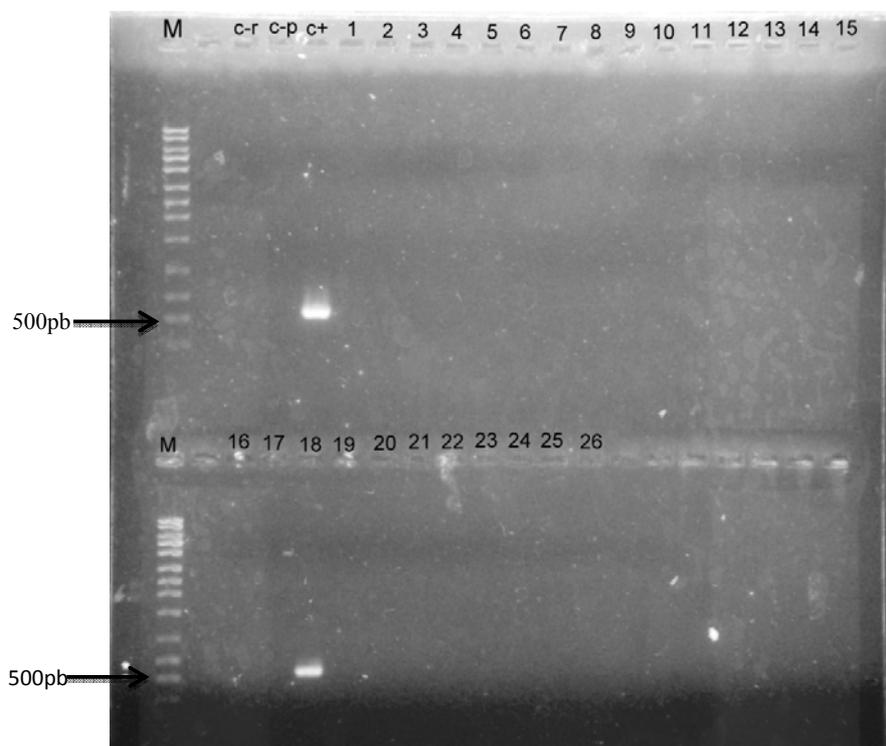


Figura 4 Gel das análises via PCR das raízes transformadas com o plasmídeo PB2GW7

Nota: Onde M representa o marcador molecular, c-r o controle negativo da reação, c-p a planta controle negativo, c+ o controle positivo da reação. As colunas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 representam as raízes não transformadas e a coluna 18 representa a única planta com raiz transformada

Neste caso, a infecção da cepa MSU440 de *Agrobacterium rhizogenes* com o plasmídeo PB2GW7 pelo processo de infiltração a vácuo, utilizando o híbrido LCBM2, permitiu uma taxa de transformação de, aproximadamente, 3,8%.

4 DISCUSSÃO

A eficiência de um processo de transformação genética via *Agrobacterium rhizogenes* depende de fatores como a susceptibilidade do material vegetal, a cepa da bactéria utilizada e pelo acréscimo de compostos fenólicos durante o processo de infecção.

O método de infiltração a vácuo tem apresentado bons resultados, na obtenção de plantas transgênicas de feijão (LIU et al., 2005), arábida (CLOUGH; BENT, 1998), café (LEELAVATHI et al., 2004) e trigo (CHENG, 1997). Isso se deve ao fato do processo aumentar a penetração de células de *Agrobacterium* nos tecidos vegetais e, assim, permitir a integração desses genes no genoma da planta (SUBRAMANYAM et al., 2011).

O método de infiltração a vácuo foi considerado mais eficiente para transformação de eucalipto por Balieiro (2013) e Mendonça (2011), em cujo primeiro trabalho foi usado o mesmo híbrido comercial, LCBM2, e a mesma cepa bacteriana utilizada no presente trabalho, e no segundo trabalho foi utilizada a mesma cepa bacteriana e o híbrido utilizado foi o LCBM1. É possível observar uma diferença considerável na taxa de eficiência da transformação entre os dois trabalhos citados. No presente trabalho a taxa de transformação foi de 18%, utilizando o plasmídeo pCAMBIA3301, e de 3,8%, utilizando o plasmídeo PB2GW7 e, nos trabalhos anteriores mencionados esta taxa foi de 40 e 70%, respectivamente. Neste estudo a taxa de eficiência de transformação deve ser analisada com cautela, em função do menor número de plantas que foram analisadas (44 plantas transformadas com o plasmídeo

pCMABIA3301 e 26 plantas transformadas com o plasmídeo PB2GW7) em relação aos trabalhos citados, como é possível visualizar na Tabela 1. Este resultado foi observado anteriormente por Bosselut et al. (2011), onde que para o genótipo P.2175 foi obtido uma eficiência de 21% de transformação, via *Agrobacterium rhizogenes* cepa A4R. Este resultado foi analisado com cautela pelos autores, pois o número de plantas analisadas, para este genótipo, foi baixo em comparação com os demais, em virtude da taxa de sobrevivência do genótipo P.2175 ao período de cocultivo.

Tabela 1 Análise da eficiência do método de transformação por infiltração a vácuo utilizado em diferentes trabalhos

Autores	Híbrido	Plasmídeo	Nº de plantas transformadas	Nº de plantas analisadas	Taxa de eficiência (%)
Mendonça (2011)	LCBM2	pEZR(H)-LN	200	60	40
Balieiro (2013)	LCBM1	pEZR(H)-LN	200	100	70
Presente trabalho	LCBM2	pCAMBIA3301	200	44	18
Presente trabalho	LCBM2	PB2GW7	125	26	3,8

Nesse trabalho foi utilizado o plasmídeo pCAMBIA3301 e o plasmídeo PB2GW7, enquanto que em Balieiro (2013) e Mendonça (2011) o plasmídeo utilizado foi o pEZR (H)- LN. Essa diferença pode ter contribuído de forma considerável sobre a taxa de eficiência da transformação influenciando nos resultados obtidos. No entanto serão

necessários estudos mais aprofundados para afirmar que o plasmídeo interferiu na eficiência da transformação via *Agrobacterium rhizogenes*.

Balieiro (2013) testou o mesmo método de transformação com a mesma cepa bacteriana, porém, com outro híbrido comercial de *E. grandis* x *E. urophilla* (LCBM1) e obteve uma taxa de transformação de 70%, o que pode ser explicado, também, pela maior susceptibilidade do material vegetal à cepa bacteriana, resultado que corrobora com as observações feitas por Lin, Kwork e Doran (2003).

Em trabalho anterior, as cepas A4, R1601, 2659, 8196 e LBA9402 de *Agrobacterium rhizogenes* foram testadas em outro híbrido de *E. grandis* x *E. urophilla*. Foi verificado que a cepa R1601 apresentou o melhor resultado em relação as demais, com eficiência de 20% (MACHADO et al., 1997). Macrae e Staden (1993) testaram as cepas LBA9402, R1601 e TR3 em diferentes espécies (*E. grandis*, *E. dunni* e *E. nitens*), os autores verificaram que a cepa LBA9402 apresentou melhores resultados nas 3 espécies, obtendo 80% na formação de raízes em cabeleira. Para os dois trabalhos foi possível observar a formação do fenótipo raízes em cabeleira, no entanto não foram realizados testes moleculares que confirmam a transformação das plantas. Isto pode gerar falsos positivos, uma vez que há a formação de raízes em cabeleira, também, em plantas não transformadas, como foi observado em Balieiro (2013) e no presente trabalho.

Neste contexto, das 26 plantas que sobreviveram ao período de cocultivo, transformadas com o plasmídeo PB2GW7, aproximadamente 7 plantas apresentaram o fenótipo raiz em cabeleira, porém como observado na figura 2, apenas 1 planta foi confirmada pelas análise via PCR e tida

como transformada. Das 44 que sobreviveram ao período de cocultivo, transformadas com o plasmídeo pCAMBI3301, aproximadamente 12 plantas apresentaram o fenótipo de raiz em cabeleira e apenas 8 plantas foram confirmadas pelas análises via PCR (figura 1), que corrobora para a hipótese de que possam existir falsos positivos nos resultados obtidos por Machado et al. (1997) e Macrae e Staden (1993).

Nos resultados das análises via PCR são demonstrados que os parâmetros, utilizados para o processo de transformação, não apresentaram uma alta eficiência, visto que os resultados obtidos foram muito abaixo do esperado, uma vez que no presente trabalho foi utilizado um protocolo considerado eficiente por outros autores para a transformação genética de eucalipto. Serão necessários mais estudos acerca da interação cepa bacteriana, construção gênica, método de infecção e genótipo utilizado, para entender qual fator alterou de forma considerável o resultado do presente trabalho.

5 CONCLUSÃO

O método por infiltração a vácuo, utilizando a cepa de *Agrobacterium rhizogenes* MSU440 e os plasmídeos pCAMBIA 3301 e PB2GW7, não obtiveram uma taxa de transformação considerada eficiente para o híbrido LCBM2 entre *E.grandis* x *E.urophylla*. O trabalho, também, verificou que a taxa de sobrevivência, após o período de cocultivo, foi baixo para a técnica, o que pode ter interferido de forma considerável nos resultados obtidos.

ABSTRACT

Due to the economic importance of forest species, genetic transformation opens new perspectives in breeding programs, expanding and providing new genes which confer tolerance to abiotic stresses, resistance to biotic stress and increased productivity, amongst other features. The transformation efficiency depends on the combination of efficient methods and regeneration techniques. Transformation via *Agrobacterium rhizogenes* has been used as a method due to the fast result obtaining, commonly used in the study of the bacteria strain, gene construction and plant interaction. Thus, this work aimed at the transformation of a commercial hybrid of *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* from the vacuum infiltration method with the MSU440 strain, using two different gene constructions. A plasmid (pCambia3301) containing the Bar gene which confers tolerance to the PPT herbicide, and the other plasmid (PB2GW7) containing the CAHB12 gene, a transcription factor which confers tolerance to water deficit. The plants were cut at the base and subjected to vacuum for 4 min at 400 mmHg. The roots were co-cultured in MS medium for 5 days at 19°C. After 90 days, the roots were collected and the DNA extracted in order to perform the PCR analyzes. The transformation using the PCAMBIA3301 plasmid obtained a transformation rate of approximately 18%, while the transformation with the PB2GW7 plasmid obtained a rate of approximately 3.8% of plants with transformed roots. With the results obtained, we can observe a considerable difference in transformation rates. This indicates that the plasmid may interfere considerably in the transformation via *Agrobacterium rhizogenes*. However, the number of plants that survived the period of co-culture was much lower than expected, which should be taken into consideration when analyzing the results.

Keywords: Eucalyptus. Vacuum infiltration. Bar. CAHB12.

REFERÊNCIAS

- ALCANTARA, G. B. et al. Organogenesis and transient genetic transformation of the hybrid *Eucalyptus grandis* × *Eucalyptus urophylla* Organogênese e transformação genética transiente do híbrido *Eucalyptus grandis* × *Eucalyptus urophylla*. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 68, p. 246-251, Apr. 2011.
- ANDRADE, G. M. et al. Biologia molecular do processo de infecção por *Agrobacterium* spp. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 5, p. 465-476, 2003.
- BALIEIRO, F. P. **Transformação genética de híbridos de urograndis**. Lavras: UFLA, 2013.
- BROOHAERTS, W. et al. Gene transfer to plants by diverse species of bacteria. **BMC Plant Biology**, Cambridge, v. 433, p. 9-78, 2005.
- CANCHE-MOO, R. L. R. et al. Genetic transformation of *Coffea canephora* by vacuum infiltration. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 84, n. 3, p. 373-377, Jan. 2006.
- CHENG, M. et al. Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 115, n. 3, p. 971-980, 1997.
- CLOUGH, S. J.; BENT, A. F. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**, Hoboken, v. 16, n. 6, p. 735-43, Dec. 1998.
- FERREIRA, M. A. et al. **Utilização do gene Homeobox de café CAHB12 na produção de plantas transgênicas mais tolerantes ao déficit hídrico e estresse salino**. [S. l.: s. n.], 2012.

HOLLAND, J. A. C. L.; WALTER, L. J. G. C. Consistent and stable expression of the nptII , uidA and bar genes in transgenic *Pinus radiata* after *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation using nurse cultures. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 23, p. 606-616, 2005.

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 Reports**, Berlin, v. 22, n. 7, p. 465-70, Feb. 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, 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, n. 3, p. 189-197, Oct. 2005.

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

MACRAE, S.; STADEN, J. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation to improve rooting ability of eucalypts. **Tree Physiology**, Oxford, v. 12, n. 4, p. 411-418, June 1993.

MENDONÇA, E. G. **Transformação genética e rejuvenescimento in vitro de híbridos naturais de *Eucalyptus urophylla***. Lavras: UFLA, 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, n. 1, p. 50-63, Jan. 2011.

RAMAN, S.; RANA, S.; PAWAN, P. S. Agrobacterium tumefaciens mediated transfer of Phaseolus vulgaris α -amylase inhibitor-1 gene into mungbean Vigna radiata (L .) Wilczek using bar as selectable marker. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 26, p. 187-198, 2007.

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**, Cambridge, v. 11, n. 1, p. 92, 2011.

SANTOS, P.; GERALDI, I.; GARCIA, J. Estimativas de parâmetros genéticos de propriedades físicas e mecânicas da madeira em Eucalyptus grandis Estimates of genetic parameters for physical and mechanical properties of wood in Eucalyptus grandis. **Scientia Florestalis**, Piracicaba, n. 63, p. 54-64, 2003.

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, n. 3, p. 425-36, Mar. 2011.

TUFFI SANTOS, L. et al. Leaf growth and morphoanatomy of Eucalypt under the effect of Glyphosate drift. **Planta Daninha**, Rio de Janeiro, v. 26, n. 1, p. 133-142, 2005.

VENKATA, M.; KARUPPANNAN, R. Selectable marker elimination in the T₀ generation by Agrobacterium-mediated co-transformation involving Mungbean yellow mosaic virus TrAP as a non-conditional negative selectable marker and bar for transient positive selection. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 29, p. 473-483, 2010.

WANG, Y. et al. Co-transfer and expression of chitinase , glucanase , and bar genes in creeping bentgrass for conferring fungal disease resistance. **Plant Science**, Limerick, v. 165, p. 497-506, 2003.

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

YABOR, L. et al. Characterization of a field-grown transgenic pineapple clone containing the genes chitinase , AP24 , and bar. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, Columbia, v. 46, p. 1-7, 2010.