



CHAIANE FERNANDES VAZ

**OTIMIZAÇÃO DE PARÂMETROS DE
TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA E
CRIOPRESERVAÇÃO DE *Eucalyptus grandis* X
*Eucalyptus urophylla***

**LAVRAS - MG
2016**

CHAIANE FERNANDES VAZ

**OTIMIZAÇÃO DE PARÂMETROS DE TRANSFORMAÇÃO
GENÉTICA E CRIOPRESERVAÇÃO DE *Eucalyptus grandis* X *Eucalyptus
urophylla***

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

Orientador
Prof. Dr. Luciano Vilela Paiva

**LAVRAS – MG
2016**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Vaz, Chaiane Fernandes.

Otimização de parâmetros de transformação genética e
criopreservação de *Eucalyptus grandis* X *Eucalyptus urophylla* /
Chaiane Fernandes Vaz. – Lavras : UFLA, 2016.

112 p. : il.

Dissertação (mestrado acadêmico)–Universidade Federal de
Lavras, 2016.

Orientador(a): Luciano Vilela Paiva.

Bibliografia.

1. *Agrobacterium tumefaciens*. 2. Ápices caulinares. 3. *Droplet-
vitrification*. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CHAIANE FERNANDES VAZ

**OTIMIZAÇÃO DE PARÂMETROS DE TRANSFORMAÇÃO
GENÉTICA E CRIOPRESERVAÇÃO DE *Eucalyptus grandis* X *Eucalyptus
urophylla***

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

APROVADA em 11 de março de 2016.

Dr. Diogo Pedrosa Corrêa da Silva	UFLA
Dr(a). Evânia Galvão Mendonça	UFRRJ

Prof. Dr. Luciano Vilela Paiva
Orientador

**LAVRAS-MG
2016**

Aos meus melhores amigos, meus pais Ivan e Denise, meus exemplos de vida,
de perseverança e dedicação.

Dedico

Ao meu namorado Thales

Ofereço

AGRADECIMENTOS

A DEUS, que todos os dias da minha vida me deu forças para nunca desistir.

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

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pela concessão da bolsa.

Ao professor Luciano Vilela Paiva pela orientação, pelo profissionalismo, paciência e ensinamentos e pelo apoio ao meu trabalho.

Aos professores do curso de Fisiologia Vegetal por todos os ensinamentos necessários para a minha formação profissional.

Ao meu pai Ivan pelo apoio, carinho, dedicação em todos os momentos de minha vida e desta jornada, pelas palavras de incentivo por me escutar nas horas de desespero, pela paciência e pelo amor incondicional que supera a distância! Te amo.

Aos meus irmãos Larissa, Cailane, Calisson pelo carinho, amizade e amor!

A minha Mãe Denise e ao meu Padrasto Gilnei, e meu irmão Théo pelo amor, carinho, amizade, por me apoiarem em todos os passos da minha vida, por estarem mesmo longe, mas estarem presente na minha vida de alguma forma! Mãe obrigada pelas palavras de consolo, pelas palavras de incentivo nas horas de desespero, por ser minha amiga e companheira, nosso amor supera qualquer distância que possa existir! Amo Vocês.

Ao meu irmão Acauã, minha cunhada Jéssica e minha afilhada Antonella, pelo amor, carinho e amizade, pelas conversas e descontração. Amo vocês!

Ao meu namorado Thales, por todo companheirismo, amizade e paciência em todos os momentos, principalmente nos mais árduos. Por estar do meu lado sempre em todos os momentos da minha Vida. Te amo!

À minha avó Deolinda e aos meus padrinhos Adriana e Ricardo e meu primo Júnior pelo amor, amizade e apoio.

À minha amiga Amanda, que apareceu em minha vida sem querer e hoje é uma pessoa muito especial, mais que uma amiga é minha irmã de coração! Obrigado por me acalmar nas horas de desespero, por me ajudar sempre que eu precisei, por estar ao meu lado, obrigado pelos momentos de descontração, pelos almoços e jantares, por conviver comigo todos os dias e por fazer parte desta jornada e principalmente pela amizade que será eterna.

À minha amiga Mariuth que foi um presente grandioso quando vim para Lavras. Obrigado, pelo carinho, amor, dedicação e por fazer parte desta jornada, e pela grande amizade que será eterna.

Aos meus amigos Márcio e Fabíola pelo carinho, pelo apoio, amizade e incentivo.

Aos amigos e companheiros do Laboratório Central de Biologia Molecular, por todos os momentos de descontração e trabalho vividos e pelos ensinamentos.

Às minhas amigas Jussara e Heliete, que não polparam esforços para me ajudar em qualquer momento ao longo desta jornada.

Aos amigos do Grupo Eucalipto, Flávia, Wesley, Lara, Marieli, Guilherme pela amizade e minha amiga Natália Chagas por toda a ajuda durante o experimento, companheirismo e apoio compartilhado.

Aos Pós-doutorando Leonardo Zebal, e Marlúcia Pádua. Obrigado pelo carinho, pelas ajudas ao longo do experimento e por me escutarem e me aconselharem nos momentos de dificuldade.

Muito Obrigado!

“É melhor tentar e falhar, que preocupar-se e ver a vida passar; é melhor tentar, ainda que em vão, que sentar-se fazendo nada até o final. Eu prefiro na chuva caminhar, que em dias tristes em casa me esconder. Prefiro ser feliz, embora louco, que em conformidade viver.”

Marthin Luther King

RESUMO

O objetivo do trabalho foi estabelecer parâmetros de transformação genética para o híbrido *Eucalyptus grandis* X *Eucalyptus urophylla*, mediado por *Agrobacterium tumefaciens*, bem como realizar a criopreservação de ápices caulinares para o mesmo híbrido, visando seu armazenamento e sua conservação. Os calos organogênicos deste híbrido foram submetidos a diferentes processos de transformação, infiltração a vácuo (4 e 8 minutos com pressão de 400 mmHg), sonicação (15 e 30 segundos a uma frequência de 40 kHz), os tratamentos foram aplicados de forma combinada e isolada. Paralelamente, foram avaliados três concentrações de acetoseringona (100 µM, 200 µM e 300 µM) e três temperaturas de co-cultivo (19 °C, 22 °C e 25 °C). Dentre os parâmetros estudados, a maior média da expressão transiente foi obtida quando se utilizou o método de infecção por infiltração a vácuo durante 4 minutos com média de expressão transiente da atividade do GUS (4,4), a adição de 100 µM de acetoseringona com média de expressão transiente (0,76), e o co-cultivo sob temperatura de 19 °C com maior média de expressão transiente (2,6). Para o processo de criopreservação foi determinado o meio de cultura para a regeneração dos ápices, testando diferentes concentrações de BAP (0,14 µM; 1,42 µM) e BAP (0,14 µM) em combinação com AIA (5,10 µM), após 30 dias avaliou-se percentagem de regeneração de plantas, formação de calos e plantas hiper-hídricas. Para a criopreservação realizou-se o pré-cultivo dos ápices em meio MS suplementado com sacarose a 0,2 M por 24 horas e sacarose 0,5 M por mais 24 horas e foram avaliados seis tempos de exposição ao PVS2 (20, 40, 60, 80, 100 e 120 minutos) e posterior imersão em nitrogênio líquido. Após 30 dias avaliou-se percentagem de sobrevivência e após 60 dias percentagem de regeneração dos ápices. As observações histológicas e ultra-estruturais dos ápices foram realizadas em diferentes fases do processo de criopreservação e após uma semana de recuperação. As variáveis analisadas foram plasmólise, danos celulares, núcleos pinóticos e ruptura de membrana. Para avaliação da percentagem de plasmólise foram realizadas medições da área da parede celular e do citoplasma em três camadas dos ápices caulinares (L1; L1-L3; L7-L9), utilizando o software image-Pro Plus®. A concentração de 0,14 µM de BAP promoveu melhores taxas de regeneração (80%) sem presença de plantas hiper-hídricas. A criopreservação foi bem sucedida quando os ápices foram expostos ao crioprotetor por 60 minutos de PVS2, com maiores taxas de regeneração (66%), proporcionando uma maior integridade celular, sem a presença de núcleos pinóticos, com baixas taxas de plasmólise.

Palavras-chave: *Agrobacterium tumefaciens*. Ápices caulinares. *Droplet-vitrification*.

ABSTRACT

This study aimed was to establish genetic transformation parameters for the hybrid *Eucalyptus grandis* X *Eucalyptus urophylla*, mediated by *Agrobacterium tumefaciens* as well as perform the cryopreservation of shoot tips for the same hybrid, aiming storage and conservation. The organogenic hybrid calluses were subjected to different transformation process, vacuum infiltration (4 to 8 minutes at 400 mmHg), sonication (15 and 30 seconds at a frequency of 40 kHz), combined and isolation. At the same time, were evaluated three concentrations of acetosyringone (100 μ M, 200 μ M and 300 μ M) and three temperatures of co-cultivation (19° C, 22° C and 25° C). Among the studied parameters, the mean value of the transient expression was obtained when using the infection method by vacuum infiltration for 4 minutes with mean transient expression of GUS activity (4,4), the addition of 100 μ M of acetosyringone mean transient expression (0.76), and co-cultivation at a temperature of 19° C with higher average transient expression (2.6). For the cryopreservation process was pre-determined regeneration medium of shoot tips using different concentrations of BAP (0,14 μ M; 1,42 μ M) and BAP (0,14 μ M) in combination with IAA (5,10 μ M), after 30 days it was evaluated the percentage of plant regeneration, calluses formation and vitrified plants. To cryopreservation was performed pre-cultivation of shoot tips on MS medium supplemented with 0.2 M sucrose for 24 hours and 0.5 M sucrose for 24 hours and were evaluated six times of exposure to PVS2 (20, 40, 60, 80, 100 and 120 minutes) and subsequent immersion in liquid nitrogen, after 30 days it was evaluated percent survival and after 60 days it was evaluated the percentage of shoots. Histological and ultrastructural observations of the apices were made in different stages of the cryopreservation process, and after one week of recovery, through light and scanning microscopy, of which measurements were made using plasmolysis image-Pro Plus software. The concentration of BAP 0,14 μ M best promoted regeneration rates (80%) without the presence of vitrified plants. Cryopreservation was successful using 0.2 M and 0.5 M sucrose in the pre-cultivation and exposure to a cryoprotectant for 60 minutes, providing no irreversible damage cells, resulting in higher survival rates (66%). The histopathological and ultrastructural analysis of the shoot tips were made during the cryopreservation process for the treatment of exposure for 60 minutes was found to increased cell integrity without the presence of picnotics nucleus with low plasmolysis rates when compared with treatments exposed to longer times (80 and 120 minutes) to the PVS2.

Keywords: *Agrobacterium tumefaciens*. Shoot tips. *Droplet-vitrification*.

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	12
1 INTRODUÇÃO GERAL	13
2 REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1 Gênero <i>Eucalyptus</i>	16
2.2 Transformação genética de eucalipto.....	18
2.2.1 Parâmetros relacionados ao aumento da eficiência de transformação genética de plantas mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	20
2.2.2 Gene repórter	22
2.3 Criopreservação	23
2.4 Análises histocitológicas e ultraestruturais	27
REFERÊNCIAS	29
SEGUNDA PARTE	40
ARTIGO 1 Otimização dos parâmetros de transformação genética de <i>Eucalyptus grandis</i> X <i>Eucalyptus urophylla</i>	41
1 INTRODUÇÃO	44
2 MATERIAIS E MÉTODOS	46
2.1 Obtenção de calos.....	46
2.2 Vetor binário e cepa de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	46
2.3 Processo de Transformação mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	47
2.3.1 Método de infecção	47
2.3.2 Concentração de Acetoseringona	49
2.3.3 Temperatura de co-cultivo	49
2.4 Ensaio Histoquímico da B-glucuronidase.....	50
2.5 Análise de dados.....	50
3 RESULTADOS	51

3.1 Métodos de infecção.....	51
3.2 Concentração de Acetoseríngona	53
3.3 Temperatura de co-cultivo	55
4 DISCUSSÃO	56
5 CONCLUSÕES.....	62
REFERÊNCIAS.....	63
ARTIGO 2 Criopreservação de ápices caulinares de <i>E.grandis</i> X <i>E.urophylla</i>	67
1 INTRODUÇÃO.....	70
2 MATERIAIS E MÉTODOS	73
2.1 Material Vegetal.....	73
2.2 Regeneração de ápices caulinares <i>in vitro</i>	73
2.3 <i>Droplet-Vitrification</i>	74
2.4 Análises histológicas	75
2.4.1 Análises histológicas quantitativas	77
2.4 Microscopia eletrônica de Varredura	78
2.5.1 Análise estatística	78
3 RESULTADOS	79
3.1 Regeneração dos ápices caulinares <i>in vitro</i>	79
3.2 <i>Droplet-Vitrification</i>	80
3.3 Análises histocitológicas qualitativas	84
3.4 Análises quantitativas.....	94
3.5 Microscopia eletrônica de varredura	96
4 DISCUSSÃO	98
5 CONCLUSÕES.....	107
REFERÊNCIAS.....	107

PRIMEIRA PARTE

Introdução geral

1 INTRODUÇÃO GERAL

O gênero *Eucalyptus* pertence à família das Myrtaceae e abrange mais de 700 espécies, que são amplamente distribuídas em regiões tropicais e subtropicais. Devido a sua capacidade de adaptação a diferentes condições edafoclimáticas, sua plasticidade e seu potencial de uso têm sido largamente explorados representando um significativo impacto na economia mundial (MOURA et al., 2012; PRINSEN et al., 2012).

No Brasil, os plantios de árvores de eucalipto ocupam 5,56 milhões de hectares, o que representa 71,9% do total da área plantada com espécies florestais, sendo os estados de Minas Gerais 25,2%, São Paulo 17,6% e Mato Grosso do Sul 14,5% os maiores produtores (INDÚSTRIA BRASILEIRA DE ÁRVORES - IBÁ, 2015).

Nos últimos anos a produtividade média de florestas brasileiras plantadas com eucaliptos saltou de 24 m³/ha/ano para 39 m³/ha/ano (IBÁ, 2015). Esta evolução da produtividade florestal tem colocado o país entre os mais eficientes na produção de matéria prima de eucalipto, destacando-se basicamente na produção de papel e celulose, painéis de madeira industrializada, madeira processada mecanicamente e carvão vegetal, entre outros (MORA; GARCIA, 2000).

Apesar da produtividade alcançada, existem previsões mostrando que, nas próximas décadas, haverá uma alta demanda por produtos dessa origem, realçando a grande importância de se obter genótipos ainda mais produtivos (UN WATER, 2014). De acordo com Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO), a população mundial em 2050 será de aproximadamente 9.5 bilhões, necessitando de uma oferta crescente por madeira industrial, energia, papel e celulose (IBÁ, 2015).

Além da crescente demanda prevista, a produção tem sido afetada por condições adversas, que restringem o crescimento e desenvolvimento das plantas, tais como estresses abióticos como déficit hídrico, altas temperaturas, resfriamento e salinidade e bióticos como pragas e doenças, respectivamente, afetando diretamente a produtividade (LOPES et al., 2011).

Estudos e investimentos em programas de melhoramento vêm aumentando a cada ano, contribuindo de forma expressiva para o aumento da produtividade deste gênero. Assim, tendo em vista as dificuldades inerentes ao melhoramento genético de espécies florestais, e o avanço científico alcançado nos últimos anos, a biotecnologia tem se mostrado uma importante ferramenta com grande potencial para auxiliar a transposição de barreiras enfrentadas pelo melhoramento clássico (GOLLE et al., 2009).

Dentre as técnicas biotecnológicas, a transformação genética merece destaque, uma vez que permite a transferência direta e estável de genes de interesse agrônomo para espécies de valor econômico (GONZÁLEZ et al., 2002). No caso de eucalipto, objetiva-se criar clones com características pontuais modificadas, possibilitando, por exemplo, a alta produção de biomassa, maior quantidade de fibras, maior densidade, resistência a patógenos e a estresses bióticos e abióticos (IBÁ, 2015).

A transformação genética tem sido empregada para muitas espécies vegetais, porém, em muitos casos, a baixa eficiência do processo tem sido um desafio. A eficiência da transformação genética de uma determinada espécie está relacionada a vários fatores como: sistema de seleção dos transformantes, meio de cultura, temperatura, duração do co-cultivo, adição de indutores (exemplo: acetoseringona), tipo de infecção, genótipo, linhagem de *Agrobacterium*, entre outros (SILVA et al., 2010; SILVA et al., 2011). Estes fatores desempenham um papel determinante no processo de desenvolvimento e otimização de protocolo de transformação genética via *Agrobacterium* (HUSSAIN; HUSNAIN;

RIAZUDDIN, 2007; SILVA et al., 2011; TAZEEN; MIRZA, 2004; ZIA et al., 2010).

Além da otimização de um protocolo de transformação genética que possa ser amplamente aplicado a diferentes híbridos de eucalipto, também existe a necessidade da manutenção do germoplasma das linhagens, modificadas geneticamente ou não (PADAYACHEE et al., 2009).

Atualmente, as espécies parentais e híbridos melhorados de eucaliptos são mantidas em jardins clonais, mini-jardins e, em sistemas hidropônicos. Tais sistemas são caros, trabalhosos, demandam grandes extensões de terra, ficam suscetíveis a alterações ambientais repentinas, além de pragas e doenças, que muitas vezes resultam em perdas de acessos importantes (PADAYACHEE et al., 2009; WATT et al., 2000; WATT et al., 2003). Neste sentido, a criopreservação, tem sido amplamente desenvolvida para minimizar alguns destes problemas, oferecendo uma alternativa de baixo custo e benefícios significativos com intuito de armazenamento e conservação do material vegetal, por períodos teoricamente ilimitados (PADAYACHEE et al., 2009).

A criopreservação utiliza o armazenamento do material biológico em nitrogênio líquido à -196°C , e que teoricamente paralisa o metabolismo celular, permitindo o seu armazenamento por períodos indeterminados e possibilitando que após esse tempo, o material seja corretamente recuperado através da técnica de cultura de tecidos, assegurando a obtenção de uma planta ao final do processo. Esta característica é de fundamental importância para a manutenção segura e eficiente dos recursos genéticos da ampla biodiversidade (ENGELMANN, 2011). A criopreservação é particularmente vantajosa para o armazenamento de plantas geneticamente modificadas, devido ao grande número de transformantes utilizados durante os ensaios de validação genética, os quais são submetidos por um longo processo de avaliação dos parâmetros de biossegurança (BLAKESLEY; KIERNAN, 2001; HÄGGMAN et al., 2001; JONES, 2002; REED, 2001).

Diante deste contexto, o presente estudo teve como objetivo estabelecer parâmetros de transformação genética para o híbrido *Eucalyptus grandis* X *Eucalyptus urophylla*, utilizando o método de transformação indireta, mediado por *Agrobacterium tumefaciens*, tendo em vista o aumento da eficiência de transformação, bem como realizar a criopreservação de ápices caulinares para o mesmo híbrido, visando seu armazenamento e sua conservação.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Gênero Eucalyptus

O gênero *Eucalyptus*, pertencente à família Myrtaceae, abrange mais de 700 espécies espalhadas por todo mundo, além de muitas variedades e híbridos com interesse comercial (JUNIOR; COLODETTE, 2013). O eucalipto é uma árvore nativa da Austrália, da Indonésia e exótico nas outras partes do mundo. Atualmente são extensivamente utilizados em plantios de florestas em diversas regiões tropicais e subtropicais do mundo, devido às suas características de rápido crescimento, alta produtividade, capacidade de adaptação e diferentes aplicações para as mais diversas finalidades (AGGARWAL; KUMAR; REDDY, 2010; MORA; GARCIA, 2000).

A atividade florestal no Brasil disponibiliza uma ampla gama de produtos comerciais, como papel e celulose, painéis de madeira industrializada, madeira processada mecanicamente, carvão vegetal, entre outros (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTORES DE FLORESTAS PLANTADAS - ABRAF, 2013; GONZÁLEZ et al., 2002). Podendo também ser utilizados para fins paisagísticos, preservação de espécies nativas e recuperação de áreas degradadas, além de contribuírem na geração de riquezas e empregos (FURTADO; SANTOS; MASSON, 2008; MORA; GARCIA, 2000).

No Brasil, as áreas plantadas com eucalipto totalizam 5,56 milhões de hectares, representando um crescimento de 4,9 % em 2014, quando comparado com o ano anterior. De acordo com as estatísticas, este crescimento tem sido verificado devido ao estabelecimento de novos plantios, visando atender à demanda futura das indústrias do segmento de Papel e Celulose. Os estados de Minas Gerais, São Paulo e Mato Grosso do Sul se destacam no cenário nacional como detentores de 56,9% da área total de plantios florestais nacionais (IBÁ, 2015).

A produtividade média dos plantios brasileiros de eucalipto atingiu 39 m³/ha/ano e, dependendo da região, podem-se obter valores ainda maiores, sendo esses dados expressivos quando comparados com seu país de origem, a Austrália, que apresenta um rendimento médio de aproximadamente 25m³/ ha/ano (IBÁ, 2015; PINTO et al., 2014).

As indústrias de base florestal, que detêm a matéria prima de eucalipto, configuram como um dos setores-chave na economia nacional. O setor vem apresentando um bom desempenho na produção, gerando em torno de 2 milhões de empregos, renda e arrecadação de US\$ 2,5 bilhões, representando 5% do Produto Interno Bruto Nacional (SOARES; MARCIO; SIDNEY, 2014).

O bom desempenho na produção verificada nos últimos anos é devido à eucaliptocultura no Brasil ser intensiva e baseada principalmente em florestas clonais formadas com materiais-elite de elevada produtividade média (MORA; GARCIA, 2000). Dentre as principais espécies cultivadas no Brasil destacam-se *Eucalyptus grandis*, *E. camaldulensis*, *E. saligna* e *E. urophylla*. Além destas espécies inclui-se o híbrido *E. grandis* x *E. urophylla*, conhecido como *E. urograndis* (CONSELHO DE INFORMAÇÕES SOBRE BIOTECNOLOGIA - CIB, 2008). Esse cruzamento confere as melhores características do *E. grandis* (crescimento e qualidade da madeira) e do *E. urophylla* (adaptação à diferentes condições climáticas e resistência às doenças, particularmente ao fungo causador

do cancro do eucalipto). Este híbrido vem sendo um dos clones mais plantados em reflorestamento no Brasil, pela sua grande capacidade de produção de celulose (CIB, 2008).

Apesar do grande avanço, o melhoramento genético convencional florestal enfrenta alguns desafios, como busca continuada por genótipos cada vez mais produtivos, bem como o longo ciclo para que essas plantas atinjam maturidade reprodutiva e fenotípica. Em alguns casos o limite do *pool* gênico, leva às dificuldades na obtenção de cultivares tolerante a estresses bióticos e abióticos (GOLLE et al., 2009).

Para enfrentar estes desafios as técnicas biotecnológicas, tais como a transformação genética aliada ao melhoramento convencional, possibilitam a obtenção de genótipos mais produtivos e competitivos de forma sustentável (GOLLE et al., 2009; MENDONÇA, 2011; PENCHEL; OTONI; XAVIER, 2009; SARTORETTO et al., 2008). Paralelamente, a técnica de criopreservação possibilita a manutenção e variabilidade genética, assegurando as características específicas das plantas geneticamente transformadas, enquanto testes de campos são conduzidos (PADAYACHEE et al., 2009)

2.2 Transformação genética de eucalipto

Com intuito de atender à demanda do setor florestal, a técnica de transformação genética em plantas lenhosas tem sido reportada como uma ferramenta importante na contribuição do aumento global da produtividade (SINCLAIR et al., 2004). E nos últimos anos tem representado o objeto de estudos de vários grupos de pesquisas, tanto no setor público como no setor privado (ALMEIDA, 2002; GIRIJASHANKAR, 2011).

O melhoramento genético de plantas através da transformação genética permite a introdução de características específicas de interesse em um genótipo

desejável, através da incorporação de gene(s) exógeno(s) no genoma das plantas. A possibilidade de acesso a *pools* gênicos é ilimitada, permitindo a transferência de genes selecionados através de diferentes gêneros e reinos (GIRIJASHANKAR, 2011).

Atualmente, diferentes métodos para a transferência de genes em plantas estão disponíveis, e podem estar agrupados em duas categorias: transformação direta e transformação indireta (CARRERA; BARBOSA; RAMIRO, 2010; SARTORETTO et al., 2008). O método de transformação direta pode ser realizado por processos físicos ou químicos, como biobalística, microinjeção, eletroporação e transformação de protoplastos, mediada por PEG (polietilenoglicol) ou fosfato de cálcio. Já os métodos de transformação indireta, utilizam-se bactérias como mediadoras da transferência de genes, entre elas, os principais vetores utilizados são as *Agrobacterium tumefaciens* (*A. tumefaciens*) e *Agrobacterium rhizogenes* (*A. rhizogenes*) (RIBEIRO, 2012; SARTORETTO et al., 2008).

Dentre os métodos, de transformação genética indireta, o método mediado pela *Agrobacterium tumefaciens* é o mais utilizado e relatado em trabalhos com eucalipto (GIRIJASHANKAR, 2011). As bactérias do gênero *A. tumefaciens*, são capazes de infectar plantas naturalmente e produzirem um sintoma conhecido como galha da coroa. Essas bactérias possuem um plasmídeo denominado Ti (*indutores de tumor*), o qual contém as regiões necessárias para a translocação e a inserção do T-DNA (segmento de DNA contendo genes de auxina/citocinina e genes de opina), responsáveis pela transferência do DNA e sintomas da doença (CARRERA; BARBOSA; RAMIRO, 2010; VALDETARO et al., 2011). Outros genes são necessários no processo, entre eles os oncogenes (região *vir*), responsáveis pela patogenicidade da bactéria (GASSER; FRALEY, 1989).

Em função destas características, há possibilidade de utilizar linhagens de *Agrobacterium* como vetores biológicos no processo de transformação de plantas,

visando a inserção de genes de interesse agrônômico. Para tal, são excluídos os oncogenes presentes no T-DNA, obtendo-se uma linhagem “desarmada” e o segmento de DNA de interesse é inserido dentro do T-DNA, segmento flanqueado pelas bordas esquerda e direita indispensáveis para o procedimento de infecção (CARRERA; BARBOSA; RAMIRO, 2010; QUOIRIN; QUISEN, 2006; SARTORETTO et al., 2008)

O sistema de transformação genética utilizando *A. tumefaciens* tem sido largamente utilizado por se tratar de um sistema simples, com protocolos relativamente fáceis e, também, plantas transformadas por esse método normalmente apresentam um baixo número de cópias do DNA, evitando, assim, um possível silenciamento gênico (ANDRADE, 2001; STAFFORD, 2000).

Alguns estudos têm mostrado a eficiência da transferência de genes via *Agrobacterium* para *Eucalyptus tereticornis* quando utilizando cotilédones e hipocótilos, demonstrando uma percentagem de transformação de 21,29% para cotilédones e 14,43% para hipocótilos (PRAKASH; GURUMURTHI, 2009).

Apesar de alguns relatos de sucesso na transformação genética de eucalipto, muitos estudos ainda visam a otimização de protocolo de transformação genética de algumas espécies e híbridos com interesse comercial do gênero *Eucalyptus* (BALIEIRO, 2013; MENDONÇA et al., 2013).

2.2.1 Parâmetros relacionados ao aumento da eficiência de transformação genética de plantas mediada por *Agrobacterium tumefaciens*

A eficiência da transformação genética pode ser aumentada através da manipulação da planta e/ou bactéria, visando melhorar a competência do tecido da planta a infecção da bactéria (CHAKRABARTY et al., 2002; HENZI; CHRISTEY; MCNEIL, 2000; LOPEZ et al., 2004; MONDAL et al., 2001).

A eficiência da transformação genética mediada pela *Agrobacterium tumefaciens* depende de vários fatores (GIRIJASHANKAR, 2011). Dentre eles, está a determinação da fase do explante, onde a célula encontra-se em plena divisão celular (AMOAHA et al., 2001; CHAKRABARTY et al., 2002).

Na maioria dos relatos de transformação genética para o gênero *Eucalyptus*, utiliza-se de tecidos vegetais jovens, sendo os mais utilizados folhas cotiledonares e hipocótilos de plântulas germinadas entre 2 e 15 dias, embriões zigóticos, folhas novas, ápices meristemáticos e sementes em germinação (BALIEIRO, 2013; DIBAX et al., 2010; GONZÁLES et al., 2002; RIBEIRO, 2012; SILVA et al., 2011).

Outro ponto importante, visando aumentar a eficiência da transformação, é a escolha da cepa bacteriana a ser utilizada. Algumas cepas são consideradas mais eficientes, devido a sua maior virulência para infectar o tecido vegetal. Por exemplo, a cepa EHA105 é derivada de uma cepa altamente virulenta (A281), enquanto a cepa LBA4404 é derivada de uma cepa menos virulenta (Ach5). A utilização de cepas menos virulenta, tal como LBA4404, apresenta vantagens em relação à cepa EHA105. Em cepas menos virulenta a eliminação dos tecidos vegetais quanto a sua eliminação dos tecidos vegetais, após a infecção, geralmente é controlada utilizando-se baixas concentrações de antibiótico (AGGARWAL; KUMAR; REDDY, 2011; TERAKAMI et al., 2007).

A performance da infecção das células vegetais pela *Agrobacterium tumefaciens* é dependente da temperatura e presença de indutores químicos, como acetoseringona, que induzem a expressão dos genes *vir* (CHAKRABARTY et al., 2002; CLERCQ et al., 2002; HENZI; CHRISTEY; MCNEIL, 2000; LE et al., 2001; LOPEZ et al., 2004; SILVA et al., 2011; SOMLEVA et al., 2002). As bactérias são atraídas pelas moléculas de sinalização, tais como compostos fenólicos. Após o contato inicial das bactérias com o tecido da planta, os fenóis exudados pelas células vegetais ativam os genes de virulência, os quais são

responsáveis pela transferência do T-DNA da *A.tumefaciens* para os tecidos vegetais (TZFIRA; CITOVSKY, 2006). Alguns estudos sugerem que a adição de acetosseringona no meio pré e/ou de co-cultivo, com temperaturas entorno de 19°C a 22°C, podem aumentar a eficiência do processo de transformação mediada pela *Agrobacterium tumefaciens* em algumas espécies de plantas (ALCANTARA; FILHO; QUOIRIN, 2011; CHAKRABARTY et al., 2002; CLERCQ et al., 2002; COSTA; OTONI; MOORE, 2002; DILLEN et al., 1997).

Os métodos de infecção também são importantes no processo de otimização da transformação. Vários métodos de infecção já foram descritos para diversas espécies de plantas, entre os quais estão: o uso da sonicação (TORRE et al., 2014), agitação (ALCANTARA; FILHO; QUOIRIN, 2011) e infiltração a vácuo (CACHE-MOO et al., 2006). As avaliações destes métodos no processo de transformação de forma separada ou combinada podem auxiliar em uma maior eficiência no processo.

2.2.2 Gene repórter

Para determinação dos melhores parâmetros, visando aumento na eficiência da transformação genética vegetal, genes repórter são utilizados. Estes genes codificam proteínas cuja atividade enzimática é facilmente detectável, denotando as condições transgênicas de células, tecidos e organismos (BALIEIRO, 2013; BRASILEIRO et al., 1999; NONOHAY, 2002). Tecidos transformados podem ser distinguidos dos tecidos não transformados devido à expressão do gene repórter, o qual é visualizado através de coloração ou de autofluorescência (PARK, 2006).

Os genes repórter mais utilizados na avaliação da condição transgênica de células e tecidos são os gene *uidA*, gene *gfp*, e o gene *luc*. Porém, no caso de espécies florestais os genes repórter mais utilizados são o gene *uidA* e o gene *gfp*

(ALCANTARA, 2008; CHALFIE et al., 1994; JEFFERSON; KAVANAGH; BEVAN, 1987).

O gene *uidA*, isolado da bactéria *Escherichia coli*, codifica a enzima β -glucoronidase (GUS) e devido à sua alta sensibilidade, pode ser detectável por métodos qualitativos (histoquímicos) e quantitativos (fluométricos). Esta enzima em contato com o substrato X-Gluc (5- bromo-4-cloro-3-indol glucuronídeo) forma um precipitado de coloração azul. Há algumas vantagens em utilizar o GUS pois é de fácil visualização, a enzima não é facilmente desnaturada e o precipitado é estável. Porém apresenta desvantagem, pois o sistema GUS requer uma análise destrutiva, e o explante não pode ser recuperado (JEFFERSON; KAVANAGH; BEVAN, 1987; PARK, 2006)

A escolha do gene repórter é importante, e deve-se ter cuidado ao selecionar o promotor adequado. Estudos efetuados em *Arabidopsis thaliana*, demonstram que quando se utiliza um promotor fraco, o gene GUS apresenta vantagem de ser detectado mais facilmente em quantidades reduzidas, embora o GFP possa ser visualizado mais rapidamente (MANTIS et al., 2000).

Dentre os genes repórter, o gene *uidA* tem demonstrado eficiência na otimização de parâmetros de transformação genética, via *A. tumefaciens*. Estudos demonstram avaliação da expressão transiente da atividade do GUS em cotilédones e hipocótilos de *E. tereticonis* (70% e 50% respectivamente).

2.3 Criopreservação

A criopreservação consiste na conservação do material biológico em nitrogênio líquido na sua forma líquida à -196°C ou vapor a -150°C. Essa baixa temperatura não permite a ocorrência de reações metabólicas dirigidas termicamente, garantindo a viabilidade do armazenamento do material biológico,

sem que esse sofra modificações ou alterações genéticas por um período indeterminado (SANTOS, 2000).

Este método de conservação garante o armazenamento em longo prazo de materiais biológicos. No caso das plantas obtidas via transformação genética, a criopreservação se torna vantajosa, devido ao grande número de transformantes que podem ser gerados durante os ensaios de engenharia genética, uma vez que é necessário tempo para as avaliações de biossegurança dos eventos obtidos (PADAYACHEE et al., 2009).

Nesta técnica podem ser utilizados diferentes tipos de explantes para a conservação, dentre eles: protoplastos, suspensões celulares, calos, gemas apicais e laterais, meristemas, sementes, embriões zigóticos e somáticos (SANTOS, 2000). A maioria dos explantes utilizados na criopreservação contêm quantidades elevadas de água intracelular e são, portanto, extremamente sensíveis a lesões de congelamento causadas pela formação de cristais de gelo, quando expostos a baixas temperaturas (REED, 2008). As técnicas empregadas são diferenciadas em metodologia clássica e metodologias contemporâneas (ENGELMANN, 2011).

Na metodologia clássica, as células vegetais são desidratadas a partir de um resfriamento lento, no qual as amostras são pré-tratadas com crioprotetores e resfriadas a uma temperatura intermediária (-35°C a -40°C) e a uma velocidade controlada ($0,5 - 2^{\circ}\text{C min}^{-1}$). À medida que a temperatura decresce e aproxima-se de 0°C , a célula e seu meio externo inicialmente atingem um estado de super-resfriamento e posteriormente ocorre a formação de gelo no meio extracelular. Este estado gera um potencial osmótico que faz com que a água saia de dentro da célula, deixando o espaço intracelular com alta concentração de solutos, fase esta ideal para imersão rápida de amostras em nitrogênio líquido. Quando as amostras entram em contato com o nitrogênio líquido, ocorre a solidificação dos líquidos remanescentes sem sua cristalização (ENGELMANN, 2011; REED, 2008). Essa

metodologia é operacionalmente complexa, uma vez que requer a utilização de freezer programáveis, sofisticados e dispendiosos (ENGELMANN, 2011).

Por outro lado, as metodologias contemporâneas baseiam-se na técnica de vitrificação, que envolve a desidratação celular antes do congelamento, colocando as amostras em meio altamente concentrado com soluções crioprotetoras. A utilização desta técnica, permite que a taxa de congelamento seja rápida ou ultrarrápida, dependendo da forma como as amostras são imersas em nitrogênio líquido. O processo de vitrificação é definido como a transição da fase líquida para sólido vítreo amorfo, ou seja, a solidificação dos líquidos ocorre sem passar pela fase de cristalização, devido às altas concentrações de crioprotetores, nas quais as amostras são expostas (REED, 2008). Após serem colocadas em meio com altas concentrações de substâncias crioprotetoras, as amostras são diretamente imersas em nitrogênio líquido e, para diminuir a recristalização durante o descongelamento, o material deve ser rapidamente descongelado (BENSON, 2008).

Substâncias crioprotetoras são requeridas para muitas técnicas de criopreservação, desempenhando o papel de protegerem as células de alcançarem um volume mínimo letal, além de diminuir a temperatura em que ocorre o congelamento. Dentre as substâncias empregadas normalmente para este fim estão o glicerol, o dimetilsulfóxido e o metanol (BENSON, 2008). Os crioprotetores são classificados em três categorias: penetrantes à parede celular e membrana plasmática (glicerol, etilenoglicol e DMSO), penetrantes à parede celular (aminoácidos como prolina, oligossacarídeos como sacarose e manitol, e polímeros com baixo peso molecular como PEG1000), e não penetrantes (proteínas solúveis, polissacarídeos, mucilagem) (TAO; LI, 1986). As soluções de vitrificação, empregadas são as de glicerol como a “Plant Vitrification Solution” -PVS2 [30% glicerol (p/v), 15% etilenoglicol (p/v), 15%

DMSO (p/v), 0,4M sacarose no meio basal de cultura) e PVS3 (40% glicerol, 40% sacarose no meio basal de cultura] (SAKAI; ENGELMANN, 2007).

As técnicas de *encapsulation-dehydration*, a *vitrification*, *encapsulation-vitrification* e *droplet vitrification* são as mais utilizadas para uma ampla variedade de tecidos vegetais (ENGLEMANN, 2011).

A técnica de *encapsulation-dehydration* é baseada na tecnologia desenvolvida para a produção de sementes sintéticas em que os embriões somáticos são encapsulados em alginato, parcialmente dessecados, e em seguida mergulhados em nitrogênio líquido (LAMBARDI; BENELLI, 2007).

O processo de *vitrification* envolve a desidratação de amostras com uma solução altamente concentrada de vitrificação (PVS), tal como PVS2 e PVS3, seguida da imersão em nitrogênio líquido. Este procedimento pode ser aplicado em ápices caulinares, suspensões de células e de embriões somáticos de numerosas espécies (SAKAI; HIRAI; NIINO, 2008).

A *Droplet-vitrification* é uma das técnicas desenvolvidas recentemente, e que utiliza PVS2 (30% de glicerol, 15% de etileno glicol, 15% de dimetilsulfóxido, e 0,4 M de sacarose no meio MS). Consiste no pré-cultivo dos meristemas em meios com altas concentrações de sacarose (0,3 – 0,7 M), seguido de pré-tratamento em solução de carregamento [2 M de glicerol + 0,4 M de sacarose dissolvido em meio Murashige e Skoog (1962)] e imersão em solução PVS2 a 0°C. Após esse processo, os meristemas são dispostos em folha de papel alumínio com uma gota de PVS2 e rapidamente congelados em nitrogênio líquido. O descongelamento é realizado à temperatura ambiente e emprega-se uma solução de diluição rica em sacarose (CHEN et al., 2011; ENGELMANN, 2011). Após o descongelamento, os meristemas são inoculados em meio específico e a retomada do crescimento avaliada após três ou quatro semanas.

Essa é uma técnica que apresenta vantagens, pois fornece taxas de resfriamento e aquecimento mais elevados em comparação com outros

procedimentos baseados no processo de vitrificação. A utilização de um pequeno volume de solução de vitrificação, em que o material biológico é colocado, aumenta a probabilidade de se obter um estado de vitrificação durante o resfriamento e evita a cristalização durante o resfriamento (GONZALEZ-ARNAO et al., 2008; PANIS; SWENNEN, 2005; SAKAI; ENGLEMAN, 2007).

A técnica de criopreservação tem sido utilizada com sucesso para armazenamento de uma vasta gama de espécies lenhosas comercialmente importantes (GERMANA et al., 2011; IKHLAQ et al. 2013). Vários métodos de criopreservação já foram testados em algumas espécies de eucaliptos, tais como *E. grandis*, *E. grandis* x *E. camaldulensis*, *urophylla* x *E. grandis*, *E. grandis*, *E. grandis* x *E. urophylla*, *E. camaldulensis* (KAYA et al., 2013; PADAYACHEE et al., 2009). Porém, a baixa taxa de sobrevivência tem sido verificada para algumas espécies de eucaliptos, principalmente devido à falta de tolerância ao processo de desidratação dos ápices caulinares, sendo um desafio para a obtenção de uma criopreservação bem sucedida (PADAYACHEE et al., 2009).

2.4 Análises histocitológicas e ultraestruturais

O componente chave para a obtenção de uma criopreservação bem sucedida de células vegetais é a ausência de lesão na microestrutura celular. Entender e minimizar o dano à célula durante a criopreservação pode viabilizar a técnica (YIL et al. 2012). Análises histocitológicas e ultraestruturais tem sido utilizadas para avaliar a eficiência do processo de criopreservação, uma vez que este pode proporcionar efeitos deletérios aos materiais biológicos, principalmente na membrana celular e parede celular, conhecido como criodano (HUBÁLEK, 2003). Este dano pode estar relacionado à formação de cristais de gelo intracelular, ao fluxo de água para fora da célula (desidratação) e ao aumento da concentração intracelular de solutos (AGUIAR et al., 2012).

A análise ultraestrutural por meio do microscópio eletrônico de varredura (MEV) e microscópio eletrônico de transmissão (MET), contribui para um melhor entendimento das alterações celulares, que podem ocorrer durante a criopreservação. É possível avaliar imagens no formato tridimensional, detalhando a integridade celular, bem como revelar alterações das organelas celulares e mudanças ultraestruturais, inclusive aquelas que ocorrem na membrana nuclear (SALEHNIA; MOGHADAM; VELOJERDI, 2002).

Alguns estudos utilizam-se de análises histocitológicas com intuito de observar as modificações celulares induzidas em ápices caulinares durante o processo de criopreservação, auxiliando no entendimento das alterações ocorridas durante cada passo do processo das técnicas de *Encapsulation-dehydration e Droplet-vitrification* (BARRACO et al., 2013; GALLARD, 2008; GONZALEZ-ARNAO et al., 1993; GRAPIN et al., 2006; MARI et al., 1995).

Estudos de criopreservação com ápices caulinares de inhame demonstram algumas alterações visíveis durante o processo, como aumento de amido, redução do teor de proteínas em algumas células da região meristemática, núcleos condensados sem a presença de nucléolos e citoplasma recolhido em várias extensões da célula. Embora a integridade estrutural dos ápices tenha sido preservada após osmoproteção, verificaram-se danos irreversíveis após a desidratação física e após criopreservação nas regiões de células mais diferenciadas (BARRACO et al., 2013).

O detalhamento das alterações ocorridas no processo de criopreservação pode ser realizado utilizando-se análise de imagens (image- Pro Plus), desenvolvidas recentemente para a quantificação de microfotografias (MCMULLEN et al., 2010). Este permite avaliar quantitativamente as observações histocitológicas, para uma maior compreensão das alterações durante o processo (MANKESSI et al., 2010).

REFERÊNCIAS

AGGARWAL, D.; KUMAR, A.; REDDY, M. S. Shoot organogenesis in elite clones of *Eucalyptus tereticornis*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 102, n. 1, p. 45-52, 2010.

AGGARWAL, D.; KUMAR, A.; REDDY, M. S. *Agrobacterium tumefaciens* mediated genetic transformation of selected elite clone(s) of *Eucalyptus tereticornis*. **Acta Physiologiae Plantarum**, Verlag, v.33, n.5, p.1603–1611, 2011.

AGUIAR, T. D.A. F. et al. Basic principles of criomicrobiologia: focus in kind of microorganisms and principals cryoprotectants agents. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.6, p.80-93, 2012.

ALCANTARA, G.B. **Transformação genética de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* com o gene *gfp* sob controle de promotores CBFS induzidos pelo frio**. 2008. 141p. Tese (Doutorado em Agronomia/Produção Vegetal) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

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

ALMEIDA, R. R. **Pontecial da madeira de clones do híbrido *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* para a produção de lâminas e manufatura de painéis compensados**. 2002. 80p. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

AMOAHA, B. K. et al. Factors influencing *Agrobacterium*-mediated transient expression of *uidA* in wheat inflorescence tissue. **Journal of Experimental Botany**, v. 52, n. 358, p. 1135-1142, 2001.

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 - ABRAF. **Anuário estatístico**: Ano base 2012. Brasília, 2013. 148p. disponível em:<<http://www.abraflor.org.br/estatisticas.asp>>. Acesso em: 10 nov. 2014.

BALIEIRO, F. P. **Transformação genética de híbridos de *urograndis***. 2013. 87p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.

BARRACO, G. et al. Histocytological analysis of yam (*Dioscorea alata*) shoot tips cryopreserved by encapsulation–dehydration. **Protoplasma**, v. 251, n. 1, p. 177-189, 2013.

BLAKESLEY, D.; KIERNAN, R.J. Cryopreservation of axillary buds of a *Eucalyptus grandis* × *Eucalyptus camaldulensis* hybrid. **CryoLetters**, v.22, p. 13–18, 2001.

BRASILEIRO, A. C. M. et al. Transformação genética de plantas. In: **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**, Brasília: Embrapa, v. 2, p. 679-735, 1999, 864 p.

BENSON, E. E. Criopreservation theory. In: REED, B. M. **Plant Cryopreservation: a practical guide**. Corvalis: Springer, p. 15-32, 2008.

CACHE-MOO, R. L. R., et al. Genetic transformation of *Coffea canephora* by vacuum infiltration. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 84, p.373–377, 2006.

CARRERA, H.; BARBOSA, A. L.; RAMIRO, D. A. **Biotecnologia na agricultura**, v. 24, n.70, p. 149-164, 2010.

CHAKRABARTY, R. et al. *Agrobacterium*-mediated transformation of cauliflower: optimization of protocol and development of Bt-transgenic cauliflower. **Journal of biosciences**, v. 27, n. 5, p. 495-502, 2002.

CHALFIE, M. et al. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. **Science**, v. 263, n. 5148, p. 802-805, 1994.

CONSELHO DE INFORMAÇÕES SOBRE BIOTECNOLOGIA - CIB. **Guia do eucalipto: oportunidades para um desenvolvimento sustentável.**

Disponível em:

<http://cib.org.br/wpcontent/uploads/2011/10/Guia_do_Eucalipto_junho_2008.pdf>. Acesso em: 10 dez. 2015.

CHEN, X. L. et al. Cryopreservation of in vitro-grown apical meristems of *Lilium* by droplet-vitrification. **South African Journal of Botany**, v. 77, p. 397-403, 2011.

COSTA, M.; OTONI, W.; MOORE, G. An evaluation of factors affecting the efficiency of *Agrobacterium*-mediated transformation of *Citrus paradisi* (Macf.) and production of transgenic plants containing carotenoid biosynthetic genes. **Plant Cell Reports**, v. 21, n. 4, p. 365-373, 2002.

CLERCQ, J de. et al. An optimized *Agrobacterium*-mediated transformation procedure for *Phaseolus acutifolius* A. Gray. **Plant Cell Reports**, v. 21, n. 4, p. 333-340, 2002.

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

DILLEN, W. et al. The effect of temperature on *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer to plants. **The Plant Journal**, v. 12, n. 6, p. 1459-1463, 1997.

ENGELMANN, F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. **In vitro & Developmental Biology**, San Diego, v. 47, n. 4, p. 5-16, 2011.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA ALIMENTAÇÃO E AGRICULTURA – FAO. **FAOSTAT: production-crops**. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/browse/E/EW/E2011>> Acesso em: 12 dez. 2015.

FURTADO, E. L.; SANTOS, C. A. G.; MASSON, M. V. Impacto potencial das mudanças climáticas sobre a ferrugem do eucalipto no Estado de São Paulo. In: GHINI, R.; HAMADA, E. **Mudanças climáticas: impactos sobre doenças de plantas no Brasil**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, p. 273-286, 2008.

GALLARD, A. **Etude de la cryoconservation d'apex en vue d'une conservation à long terme de collections de ressources génétiques végétales: compréhension des phénomènes mis en jeu et évaluation de la qualité du matériel régénéré sur le modèle *Pelargonium***. 2008. p. Tese (Doutorado em Biologie Cellulaire) - Université d'Angers, Français, 2008.

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

GERMANÀ, M. A. et al. Organogenesis and encapsulation of in vitro-derived propagules of Carrizo citrange [*Citrus sinensis* (L.) Osb. × *Poncirus trifoliata* (L.) Raf]. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 106, n. 2, p. 299-307, 2011.

GIRJASHANKAR, V. Genetic transformation of *Eucalyptus*. **Physiology Molecular Biology Plants**, v. 17, n. 1, p. 9-2, 2011.

GOLLE, D. P. et al. Forestry improvement: emphasis on biotechnology application. **Ciência Rural**, v. 39, n. 5, p.1606-1613, 2009.

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

GONZALEZ-ARNAO, M. T. et al. Cryopreservation of encapsulated apices of sugarcane: effect of freezing procedure and histology. **Cryo-letters**, 1993.

GONZALEZ-ARNAO, M. T. et al. Development and large scale application of cryopreservation techniques for shoot and somatic embryo cultures of tropical crops. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 92, n. 1, p. 1-13, jan. 2008.

GRAPIN, A. et al. Histo-cytological changes in *Pelargonium* apices during the cryopreservation process: effect of the osmotic agent chosen for the preculture step. In: XXVII International Horticultural Congress-IHC2006: II International Symposium on Plant Genetic Resources of Horticultural 760. **Anais...**2006, p. 195-202.

HÄGGMAN, H.M.; RYYNÄNEN, L.A.; ARONEN, T.S. Cryopreservation of forest tree germplasm. **Acta Horticulturae**, v. 560, p. 121–124, 2001.

HENZI, M. X; CHRISTEY, M.C; MCNEIL, D.L. Factors that influence *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation of broccoli (*Brassica oleracea* L. var. italica). **Plant Cell Rep.**, v. 19, p.994-999, 2000.

HUBÁLEK, Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. **Cryobiol.**, v.46 p.205-229, 2003.

HUSSAIN, S. S.; HUSNAIN, T.; RIAZUDDIN, S. Sonication assisted *Agrobacterium* mediated transformation (SAAT): an alternative method for

cotton transformation, **Pakistan Journal of Botany**, Karachi, v. 39, n. 1, p. 223-230, 2007.

INDÚSTRIA BRASILEIRA DE ÁRVORES - IBÁ. **Indicadores de desempenho do setor nacional de árvores plantadas em 2015**. Disponível em: <http://www.bracelpa.org.br/shared/iba_2015_pt.pdf> Acesso em: 6 jan. 2016.

IKHLAQ, M. et al. In vitro storage of synthetic seeds: effect of different storage conditions and intervals on their conversion ability. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 35, 2013.

JEFFERSON, R. A.; KAVANAGH, T. A.; BEVAN, M. W. GUS fusions beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. **EMBO Journal, Oxford**, v. 6, n. 13, p. 3901-3907, 1987.

JONES, N. B. Somatic embryogenesis as a tool to capture genetic gains from tree breeding strategies: risks and benefits. **Southern African Forestry Journal**, v. 195, p. 93-101, 2002.

JUNIOR, D. L.; COLODETTE, J. L. Importância e versatilidade da madeira de eucalipto para a indústria de base florestal. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 33, n. 76, p. 429-428, 2013.

KAYA, E. et al. Cryopreservation of *Eucalyptus* Genetic Resources. **CryoLetters**, v.34, p 608-618, 2013.

LAMBARDI, M.; BENELLI, C. La crioconservazione per la tutela del germoplasma delle specie arboree. **Frutticoltura**, p. 34-39, 2007.

LE, V.Q. et al. An improved procedure for production of white spruce (*Picea glauca*) transgenic plants using *Agrobacterium tumefaciens*. **J. Exp. Bot.**, v. 52 p.2089-2095, 2001.

LOPES, J. L.W. et al. Estresse hídrico em plantio de *Eucalyptus grandis* VS *Eucalyptus urophylla* em função do solo, substrato e manejo hídrico de viveiro. **Revista Árvore**, Visoça, MG, v.35, n.1, p.31-39, 2011.

LOPEZ, S. J. et al. *Agrobacterium tumefaciens* mediated genetic transformation in tea (*Camellia sinensis* [L.] O. Kuntze). **Plant Mol. Biol. Rep.**, v. 22 p. 201-202, 2004.

MARI, S. et al. Histo-cytological study of apices of coffee (*Coffea racemosa* and *C. sessiliflora*) in vitro plantlets during their cryopreservation using the encapsulation-dehydration technique. **Cryo-Letters**, v. 16, p. 289-298, 1995.

MANTIS, J. et al. Comparing the utility of β -glucuronidase and green fluorescent protein for detection of weak promoter activity in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 18, n. 4, p. 319-330, 2000.

MANKESSI, F. et al. Phase change-related variations of dome shape in *Eucalyptus urophylla* \times *Eucalyptus grandis* shoot apical meristems. **Trees**, v. 24, n. 4, p. 743-752, 2010.

MCMULLEN, R. L. et al. Image analysis to quantify histological and immunofluorescent staining of ex vivo skin and skin cell cultures. **International journal of cosmetic science**, v. 32, n. 2, p. 143-154, 2010.

MENDONÇA, E. G., et al. Genetic transformation of *Eucalyptus camaldulensis* by agrolistic method. **Revista Árvore**, v.37, n.3, p.419-429, 2013.

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

MONDAL, T.K et al. Transgenic tea (*Camellia sinensis* [L.] O. Kuntze cv. Kangra Jat) plants obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation of somatic embryos. **Plant Cell Rep.**v. 20 p.712-720, 2001.

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

MOURA, J. C. M. S., et al. Validation of reference genes from *Eucalyptus* spp. under different stress conditions. **BMC research notes**, 5(1):634, 2012.

NONOHAY, J. S. de. **Transformação genética em cevada por bombardeamento de partículas**. 2002. 63p. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.

PADAYACHEE, K. et al. Cryopreservation as a tool for the conservation of *Eucalyptus* genetic variability: concepts and challenges. **Southern Forests**, v. 71, p. 165–170, 2009.

PARK, B. S. **Agrobacterium tumefaciens-Mediated transformation of Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) leaf disks: Evaluation of the co-cultivation conditions to increase β -glucuronidase gene Activity**. 2006. 72p. Tese (Doutorado) - Universidade Korea, 2006.

PANIS, B.; SWENNEN, B. P. *Droplet vitrification* of apical meristems: a cryopreservation protocol applicable to all *Musaceae*. **Plant Science**, v. 168, p. 45-55, 2005.

PENCHEL, R. M.; OTONI, W.C.; XAVIER, A. Tecnologia de biorreatores de propagação fotoautrótica in vitro. In: BORÉM, A (Ed.) **Biotecnologia florestal**. Viçosa. MG: UFV, p. 75-92. 2007.

PINTO, D. S. et al. Seleção precoce para características de crescimento em testes clonais de *Eucalyptus urophylla*. **Scientia Florestalis** v. 42, n. 102, p. 251-257, 2014.

PRAKASH, G.; GURUMURTHI. Genetic transformation and regeneration of transgenic plants from precultured cotyledon and hypotyl explants of *Eucalyptus*

tereticornis Sm. using *Agrobacterium tumefaciens*. **In vitro cellular & developmental biology-plant**, v. 45 p. 429-434, 2009.

PRINSEN, P.; et al. Morphological characteristics and composition of lipophilic extractives and lignina in Brazilian woods from diferente *eucalyptus* hybrids. **Industrial Crops and Products**, v.36, p. 572-583, 2012.

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

REED, B.M. Implementing cryogenic storage of clonally propagated plants. **CryoLetters**, v. 22 p. 97–104, 2001.

REED, B. M. **Plant Cryopreservation: A Practical Guide**. OR, USA: Springer, 2008.

RIBEIRO, S. R. **Regeneração e transformação em *Eucalyptus grandis***. 2012. 46 p. Dissertação (Mestrado em biologia celular e biotecnologia) - Universidade de Lisboa Faculdade de ciências, Lisboa, 2012.

SAKAI, A.; HIRAI, D.; NIINO, T. Development of PVS-Based vitrification and encapsulation-vitrification protocols. In: REED, B. M. **Plant Cryopreservation: a practical guide**. Corvalis: Springer, p. 33-58, 2008.

SALEHNIA, M.; MOGHADAM, E.A.; VELOJERDI M.R. Ultrastructure of follicles after vitrification of mouse ovarian tissue. **Fertil Steril**, v.78, p.644-645, 2002.

SANTOS, I.R.I. Criopreservação: potencial e perspectivas para a conservação de germoplasma vegetal. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**. v.12, p.70-84, 2000.

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

SINCLAIR, T. R. et al. Sugarcane leaf area development under field conditions in Florida, USA. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 88, n. 02/03, p.171-178, 2004.

STAFFORD, H.A. Crown gall disease and *Agrobacterium tumefaciens*: a study of the history, present knowledge, missing information, and impact on molecular genetics. **The Botanical Review**. v.66, p.99-118, 2000.

SILVA, A. L. L. et al. Shoot tip and cotyledon explants of *Eucalyptus saligna* Sm. cultivated on different kanamycin levels. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 1, p. 1-5, 2010.

SILVA, A. L. L. et al. Preliminary results for genetic transformation of shoot tip of *Eucalyptus saligna* sm. via *Agrobacterium tumefaciens*. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 2, p. 1-6, 2011.

SOARES, N. S.; MARCIO, L. S.; SIDNEY, A. C.; Produto Interno Bruto do setor florestal brasileiro, 1994 a 2008. **Revista Árvore**, v. 38, n .4, p.725-732, 2014.

SOMLEVA, M. N. et al. *Agrobacterium*-mediated transformation of switchgrass. **Crop Sci**. v. 42 p. 2080-2087, 2002.

TAZEEN, S.; MIRZA, B. Factors affecting *Agrobacterium tumefaciens* mediated genetic transformation of *Vigna radiata* (L.) Wilczek. **Pakistan Journal of Botany**, Karachi, v. 36, n. 4, p. 887-896, 2004.

TERAKAMI, Shingo et al. *Agrobacterium*-mediated transformation of the dwarf pomegranate (*Punica granatum* L. var. nana). **Plant cell reports**, v. 26, n. 8, p. 1243-1251, 2007.

TORRE, F., et al. Genetic transformation of *Eucalyptus globulus* using the vascular-specific EgCCR as an alternative to the constitutive CaMV35S promoter. **Plant Cell Tiss Organ Cult** v. 84, n.117, p.77–84, 2014.

TZFIRA, T.; CITOVSKEY, V. Agrobacterium-mediated genetic transformation of plants: biology and biotechnology. **Current opinion in biotechnology**, v. 17, n. 2, p. 147-154, 2006.

UN WATER: **Water and energy**. Disponível em:
<<http://www.unwater.org/publications/publications-detail/en/c/218614/2014>>
Acesso em: 02 jan. 2016.

VALDETARO, 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.

WATT, M. P.; MYCOCK, D. J.; BLAKEWAY, F. C.; BERJAK P. Applications of *in vitro* methods to *Eucalyptus* germplasm conservation. **Southern African Forestry Journal**, v.187p. 3–10, 2000.

WATT M.P. et al. Micropropagation of *Eucalyptus*. In: Jain SM, Ishii K (eds), Micropropagation of woody trees and fruits. **Kluwer Academic Publishers**. p. 217–244, 2003.

YIL, J.Y. et al. Improved cryopreservation using *droplet-vitrification* and histological changes associated with cryopreservation of madder (*Rubia akane* Nakai). **Kor J Hort Sci Technol.**, v. 30 p. 79–84, 2012.

ZIA, M. et al. Agrobacterium mediated transformation of soybean (*Glycine max* L.): Some conditions standardization. **Pakistan Journal of Botany**, Karachi, v. 42, n. 3, p. 2269-2279, 2010.

SEGUNDA PARTE

Artigos

**ARTIGO 1 Otimização dos parâmetros de transformação genética de
Eucalyptus grandis X *Eucalyptus urophylla***

Chaiane Fernandes Vaz ¹

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

¹Autor para correspondência: Cha.fvaz@hotmail.com

Universidade Federal de Lavras

RESUMO

A biotecnologia através das técnicas de transformação genética pode contribuir na aceleração do processo. O sucesso da transformação genética via *Agrobacterium tumefaciens* depende de alguns parâmetros que influenciam a transferência do T-DNA para o genoma da planta. O objetivo deste trabalho foi otimizar alguns parâmetros que possam auxiliar na eficiência de transformação genética de um híbrido *E.grandis* X *E.urophylla*. Os calos organogênicos deste híbrido foram submetidos a diferentes processos de transformação: infiltração a vácuo (4 e 8 minutos com pressão de 400 mmHg), sonicação (15 e 30 segundos a uma frequência de 40 kHz), de forma combinada e isolada. Paralelamente, foram avaliados três concentrações de acetoseringona (100 µM, 200 µM e 300 µM) e três temperaturas de co-cultivo (19 ° C, 22° C e 25° C) no período de co-cultivo por 5 dias. Dentre os parâmetros estudados, a maior média da expressão transiente foi obtida quando se utilizou o método de infecção por infiltração a vácuo por 4 minutos com média de expressão transiente da atividade do GUS (4,4), a adição de 100µM de acetoseringona com média de expressão transiente (0,76), e o co-cultivo sob temperatura de 19 °C com maior média de expressão transiente (2,6). Estes parâmetros proporcionaram uma melhor eficácia no processo de transformação para o híbrido *E. grandis* X *E. urophylla*.

Palavras-chave: *Eucalyptus*, Expressão transiente, GUS.

ABSTRACT

Biotechnology through genetic transformation techniques can contribute to the acceleration of the process. The success of genetic transformation by *Agrobacterium tumefaciens* depends on some parameters which influence the transfer of T-DNA to the plant genome. The aim of this study was to optimize some parameters that can aid in genetic transformation efficiency of a hybrid *E.grandis* X *E.urophylla*. The organogenic calluses of this hybrid were subjected to different process transformation, vacuum infiltration (4 and 8 minutes to 400 mmHg), sonication (15 and 30 seconds at a frequency of 40 kHz), combined and isolation. At the same time, were evaluated three concentrations of acetosyringone (100 μ M, 200 μ M and 300 μ M) and three temperatures of co-cultivation (19° C, 22° C and 25° C) in the period of co-cultivation for 5 days. Among the studied parameters, the mean value of the transient expression was obtained when using the infection method by vacuum infiltration for 4 minutes with mean transient expression of GUS activity (4,4), the addition of 100 μ M of acetosyringone mean transient expression (0.76), and co-cultivation at a temperature of 19 ° C with higher average transient expression (2.6). These parameters provided better efficiency in the process of transformation to the hybrid *E. grandis* X *E. urophylla*.

Keywords: *Eucalyptus*, Transient expression, GUS.

1 INTRODUÇÃO

O *Eucalyptus* é um gênero de grande importância econômica, sendo uma das principais fontes de biomassa lenhosa em todo mundo devido à sua rápida taxa de crescimento, ampla adaptação a diversas condições edafoclimáticas e propriedades multiuso da sua madeira (MYBURG et al., 2007; PAIVA et al., 2011). Representa uma das principais culturas do agronegócio brasileiro, sendo o país um dos maiores produtores de madeira, apresentando uma média de produtividade de 39 m³/ha.ano (IBÁ, 2015). Apesar desta eficiência, fatores adversos, tais como, estresses abióticos e bióticos, limitam a produtividade do gênero tanto no Brasil, como em outras regiões do mundo, tornando necessária a obtenção de genótipos mais produtivos e com alta qualidade (CARON et al., 2011; SILVA et al., 2009).

Porém, a melhoria das espécies florestais pelo melhoramento convencional não é tão rápida para atender a crescente demanda por materiais de boa qualidade, devido às suas limitações, tais como ciclos de vida relativamente longos, altos níveis de heterozigose e a possibilidade de transferência de caracteres indesejados durante os cruzamentos (AGGARWA et al., 2011; GIRIJASHANKAR, 2011; PRAKASH et al., 2009).

A transformação genética de plantas oferece uma alternativa atraente para o melhoramento convencional, fornecendo o potencial de incorporar gene(s) de interesse com características específicas em genótipos selecionados, tornando-se um instrumento importante no desenvolvimento de novos genótipos (AGGARWA et al., 2011).

Nos últimos anos, tentativas de gerar plantas transgênicas via *Agrobacterium tumefaciens* para algumas espécies de *Eucalyptus* foram realizadas (GIRIJASHANKAR, 2011; HO et al., 1998; PRAKASH; GURUMURTHI, 2009; TOURNIER et al., 2003). Porém, existe uma grande

dificuldade para regenerar plantas transgênicas de *Eucalyptus*, alcançando-se baixos índices de plantas transformadas.

O sucesso da transformação genética quando se utiliza o sistema *A. tumefaciens* reside na eficiência da bactéria em infectar o tecido alvo. Existem vários parâmetros que estão relacionados a este processo, dentre os quais se destacam a presença de compostos fenólicos, como a acetoseringona, tipo de explante, tipos de infecção, genótipo, tempo de infecção e co-cultura, temperatura, dentre outros (HUSSAIN; HUSNAIN; RIAZUDDIN, 2007; SILVA et al., 2011; TANZEEN; MIRZA, 2004; ZIA et al., 2010). A otimização destes parâmetros pode ser realizada utilizando gene repórter GUS, que auxilia nas observações visuais, e permite uma evidência de transformação e determinações importantes associadas à eficiência do método de transformação genética (JEFFERSON; KAVANAGH; BEVAN, 1987).

Deste modo, este trabalho teve como objetivo otimizar alguns parâmetros, que influenciam a transformação genética via *Agrobacterium tumefaciens*, através de expressão transiente do gene GUS em calos organogênicos de um híbrido comercial de *Eucalyptus grandis* X *Eucalyptus urophylla*.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Obtenção de calos

Para obtenção de calos, foram utilizados ápices meristemáticos provenientes das plantas estabelecidas *in vitro*. Para a formação de calos organogênicos, os meristemas foram inoculados em meio de cultura MS modificado, 20 g L⁻¹ de sacarose, auxina, citocinina (valores não citados por confidencialidade) e 4,9 g L⁻¹ de ágar (BATISTA, 2012). Os explantes permaneceram 10 dias no escuro, até o momento da infecção.

2.2 Vetor binário e cepa de *Agrobacterium tumefaciens*

O vetor binário utilizado para a transformação genética foi o pCAMBIA3301 (Figura 1), que contém um cassete gênico representado por um promotor CaMV 35S, o gene GUS, um terminador Nos poly-A, e o gene de marcador o qual confere resistência ao herbicida fosfonotricina (PPT), flanqueado pelo promotor CaMV35S e o terminador CaMV35S poly-A. Através do método de eletroporação, o plasmídeo foi inserido na cepa competente LBA4404 de *Agrobacterium tumefaciens*.

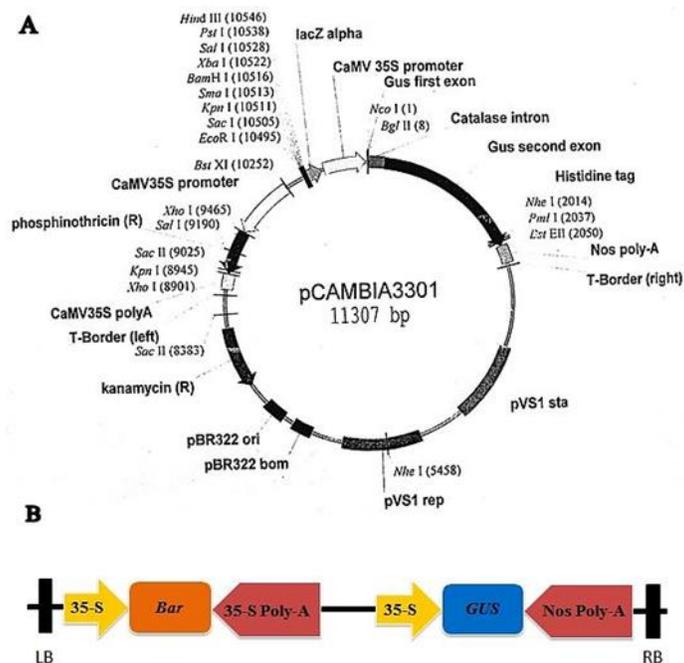


Figura 1 (A) Esquema do vetor binário pCAMBIA3301 utilizado para a transformação. (B) Cassete gênico inserido no vetor binário, contendo o gene marcador de seleção e o gene GUS.

2.3 Processo de Transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens*

2.3.1 Método de infecção

Para o teste do método de infecção via *A. tumefaciens* (LBA4404) foram utilizados calos com 10 dias de idade, e testados dois diferentes métodos de infecção: infiltração a vácuo e sonicação, combinados ou não em diferentes tempos, conforme descrito na tabela 1.

Tabela 1 Métodos de infecção dos calos organogênicos de *Eucalyptus grandis* X *Eucalyptus urophylla*.

Tratamentos	Método de infecção
T1	Infiltração a vácuo por 4 min.
T2	Infiltração a vácuo por 8 min.
T3	sonicação por 15 seg + Infiltração a vácuo por 4 min.
T4	sonicação por 30 seg + Infiltração a vácuo por 4 min.
T5	sonicação por 15 seg + Infiltração a vácuo por 8 min.
T6	sonicação por 30 seg + Infiltração a vácuo por 8 min.
T7	Sonicação 15 seg.
T8	Sonicação 30 seg.

Para obtenção das células bacterianas, a cultura foi centrifugada a 5000 g por 15 minutos, sendo o pellet ressuscitado em meio de indução MS líquido suplementado com 20 g L⁻¹ de sacarose e 100µM de acetoseringona até atingir a OD₆₀₀ de 0,45 (BALIEIRO, 2013). Para os tratamentos de infiltração a vácuo, os calos foram transferidos para elermeyers, contendo 10 ml de cultura bacteriana, realizando a infiltração através de uma câmara estéril a vácuo (400mmHg) por 4 ou 8 minutos. Para os tratamentos de sonicação, os calos foram colocados dentro de um tubo falcon com solução bacteriana e transferidos para sonicador tipo banho-maria por 15 ou 30 segundos a uma frequência de 40kHz.

Os calos controle foram submetidos aos respectivos processos em meio de cultura MS, no entanto, não passaram pela infecção da bactéria. Em seguida, foi realizada a secagem dos calos em papel filtro, inoculados em um novo meio de indução, acrescido de 100 µM de acetoseringona para a fase de co-cultivo, que ocorreu durante 5 dias no escuro à temperatura de 25±2°C. Posteriormente, foi realizado um subcultivo dos calos em outro meio de indução, contendo 500 mg/L do antibiótico Tioxin® com intuito de eliminar as bactérias, permanecendo por 15 dias em salas de cultivo com temperatura de 25±2°C na ausência de luz.

2.3.2 Concentração de Acetoseríngona

Após a determinação do melhor método de infecção mediada pela *A. tumefaciens*, foram avaliadas três concentrações de acetoseríngona: 100 μM ; 200 μM e 300 μM .

Para obtenção das células bacterianas, a cultura foi centrifugada a 5000 g por 15 minutos o pellet ressuspendido em meio de cultura MS líquido suplementado com 20 g L⁻¹ de sacarose e com 100 μM , 200 μM e 300 μM de acetoseríngona até atingir a OD₆₀₀ de 0,45. Posteriormente, os calos passaram pelo método de infecção pré-determinado e foram inoculados em um novo meio de indução, acrescidos com diferentes concentrações de acetoseríngona 100 μM , 200 μM e 300 μM respectivamente, durante 5 dias no escuro à temperatura de 25±2°C. Os calos controle foram submetidos aos respectivos processos em meio de cultura MS, no entanto, na ausência de bactéria. Posteriormente, foi realizado um subcultivo dos calos em outro meio de indução, contendo 500 mg/L do antibiótico Tioxin[®], com intuito de eliminar as bactérias, permanecendo por 15 dias em salas de cultivo com temperatura de 25±2°C na ausência de luz.

2.3.3 Temperatura de co-cultivo

Para o teste de temperatura do co-cultivo utilizou-se o melhor método de infecção e a melhor concentração de acetoseríngona, previamente estabelecidos. Foram testadas três diferentes temperaturas: 19° C, 22° C e 25° C, e o processo para obtenção das células bacterianas foi semelhante aos utilizados anteriormente.

2.4 Ensaio Histoquímico da B-glucuronidase

A avaliação da expressão transiente da atividade da β -glucuronidase (GUS) para todos os parâmetros testados ocorreu após os 15 dias de subcultivos dos calos organogênicos, em meio de cultura contendo o antibiótico tioxin. A atividade foi avaliada por ensaio histoquímico de acordo com JEFERSON et al. (1987). Os calos organogênicos foram transferidos para ependorfs estéreis de 2 ml, contendo 50 mM de tampão fosfato de sódio pH 6,86, 20% de metanol, 1% de triton-X e 1mM de X-Gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronic acid). Posteriormente, foram transferidos para estufa por 6 horas à temperatura de 37°C. Após 6 horas os calos foram analisados com auxílio de uma lupa estereomicroscópica (marca - ZEISS, modelo - STEMI 2000), para contabilização dos pontos azuis.

2.5 Análise de dados

Para avaliação de todos os parâmetros de transformação, descritos anteriormente foram utilizados 60 calos organogênicos, sendo que 30 calos foram submetidos ao processo de infecção com a bactéria (*A. tumefaciens*), 15 calos foram utilizados como controle infiltração, ou seja, os calos passaram pelo processo de transformação, mas não foram submetidos ao contato com a bactéria, e 15 calos foram utilizados como controle total. Para o controle positivo utilizou-se calos de Milho (*Zea mays*), transformados com o gene GUS. Em cada parâmetro analisado foram utilizados seis repetições com cinco explante cada. Devido a não normalidade dos dados obtidos, os resultados foram expressos através de análise descritiva, calculando-se a média dos tratamentos, e aplicando o erro padrão das médias.

3 RESULTADOS

3.1 Métodos de infecção

Para avaliação dos diferentes métodos de infecção via *A. tumefaciens*, utilizou-se a análise de médias da expressão transiente da atividade do GUS (pontos azuis). Verificou-se que quando os explantes foram submetidos ao método de infiltração a vácuo, seja por 4 minutos ou por 8 minutos estes apresentaram maiores médias de expressão da atividade transiente do GUS (4,4 e 2,2 respectivamente). Uma menor eficiência foi verificada quando se utilizou o processo de infecção por sonicação por 15 ou 30 segundos com médias de expressão de 1,6 e 1,8, respectivamente. A combinação dos métodos de sonicação por 15 ou 30 segundos seguidos de infecção infiltração a vácuo por 4 ou 8 minutos, e, proporcionaram menores médias de expressão da atividade do GUS (1,4; 1,4; 1 e 0,4 respectivamente) (Figura 2).

Na figura 3 pode-se observar a expressão transiente da atividade do GUS, nos calos que foram submetidos ao processo de infecção por infiltração a vácuo por 4 minutos.

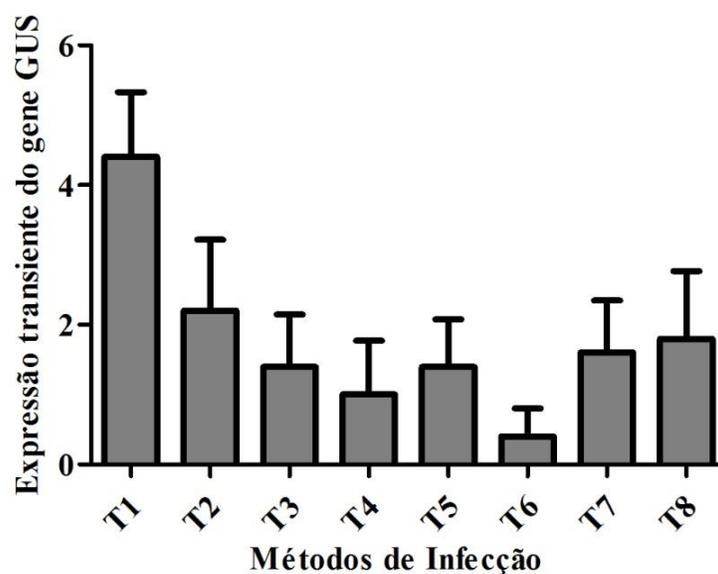


Figura 2 Média de expressão transitante da atividade do GUS (número de pontos azuis), em calos organogênicos de *Eucalyptus grandis* X *Eucalyptus urophylla* submetidos a diferentes métodos e tempos de infecção bacteriana. T1 infiltração a vácuo 4 min; T2 infiltração a vácuo 8 min; T3 sonicação 15 seg + infiltração a vácuo 4 min; T4 sonicação 30 seg + infiltração a vácuo 4 min; T5 sonicação 15 seg + ifiltração a vácuo 8 min; T6 sonicação 30 seg + infiltração a vácuo 8 min; T7 sonicação 15 seg; T8 sonicação 30 seg. – Barra: erro padrão.

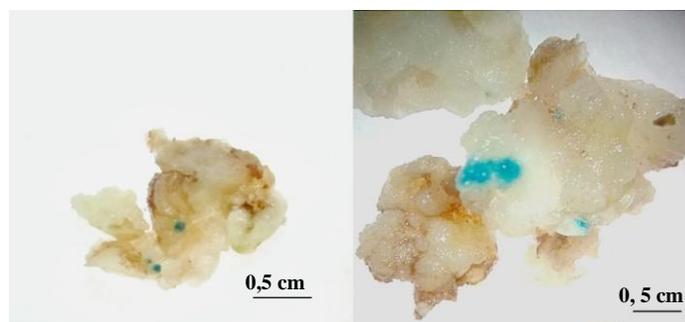


Figura 3 Ensaio histoquímico da expressão transiente da atividade do GUS em calos organogênicos de *Eucalyptus grandis* X *Eucalyptus urophylla*, após a infiltração a vácuo por 4 minutos.

3.2 Concentração de Acetoseríngona

No experimento realizado para avaliação das diferentes concentrações de acetoseríngona 100 μM , 200 μM e 300 μM no co-cultivo verificou-se, por análise de médias da expressão transiente da atividade do GUS (pontos azuis) que, quando os calos foram submetidos ao co-cultivo com acetoseríngona na concentração de 100 μM , este proporcionou uma maior média de expressão transiente (0,76). Quando submetidos ao co-cultivo com concentrações maiores de acetoseríngona 200 μM e 300 μM as médias de expressão transiente da atividade do GUS decresceram respectivamente (0,6 e 0,43) (Figura 4).

Pode-se observar na Figura 5, a expressão transiente da atividade do GUS em diferentes concentrações de acetoseríngona avaliados (100 μM , 200 μM e 300 μM).

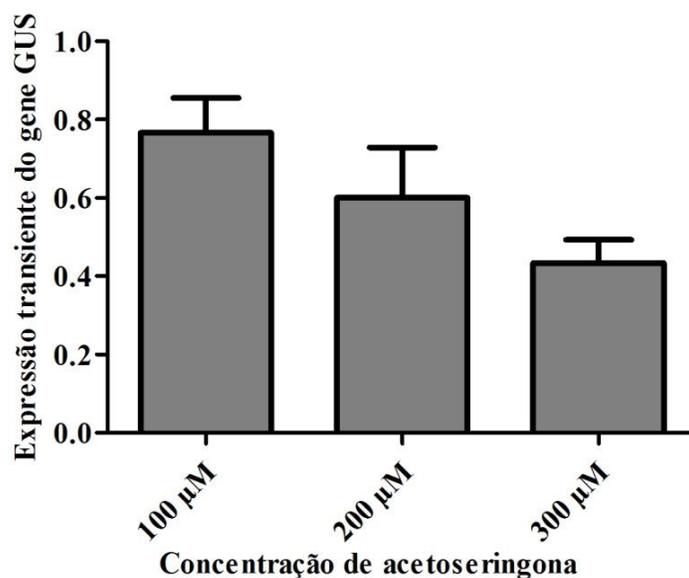


Figura 4 Média de expressão transiente da atividade do GUS (número de pontos azuis), em calos organogênicos de *Eucalyptus grandis* X *Eucalyptus urophylla*, submetidos a diferentes concentrações de acetoseringona no co-cultivo. – Barra: erro padrão da média.

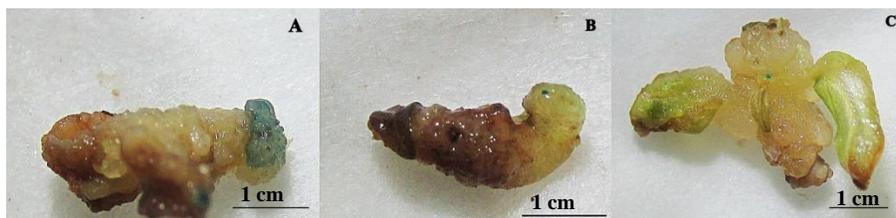


Figura 5 Ensaio histoquímico da expressão transiente da atividade do GUS em calos organogênicos de *Eucalyptus grandis* X *Eucalyptus urophylla*. A) expressão transiente da atividade do GUS em calos organogênicos submetidos à concentração de 100µM de acetoseringona; B) Expressão transiente da atividade do GUS em calos submetidos à concentração de 200µM; C) Expressão transiente da atividade do GUS em calos organogênicos submetidos à concentração de 300µM.

3.3 Temperatura de co-cultivo

No experimento realizado para avaliação das diferentes temperaturas 19 °C, 22 °C e 25 °C durante o co-cultivo, verificou-se por análise de médias da expressão transiente da atividade do GUS (pontos azuis), que os calos submetidos à temperatura de 19°C obtiveram uma maior média de expressão transiente (2,6). Quando os calos foram submetidos ao co-cultivo a temperaturas de 22°C e 25°C observou-se uma redução nas médias da expressão transiente (0,45 e 1,12) (Figura 6).

Pode-se observar na Figura 7, a expressão transiente da atividade do GUS em diferentes temperaturas de co-cultivo testados (19 °C, 22 °C e 25 °C).

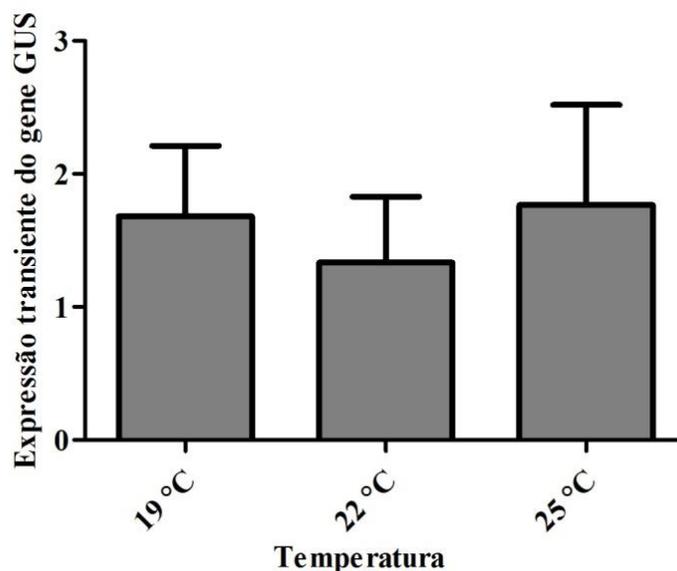


Figura 6 Média de expressão transiente da atividade do GUS (número de pontos azuis), em calos organogênicos de *Eucalyptus grandis* X *Eucalyptus urophylla*, submetidos a diferentes temperaturas de co-cultivo. – Barra: erro padrão da média.

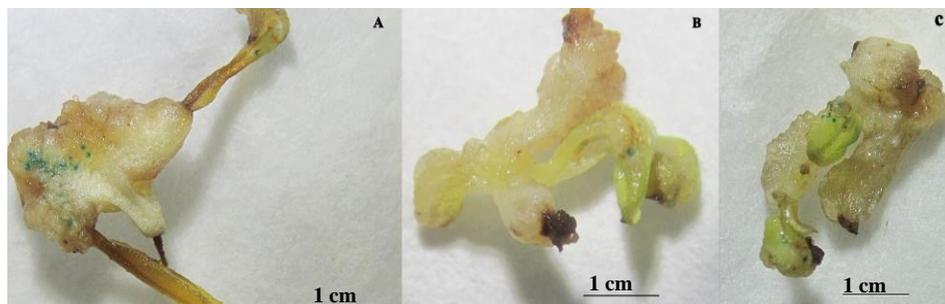


Figura 7 Ensaio histoquímico da expressão transiente da atividade do GUS em calos organogênicos de *Eucalyptus grandis* X *Eucalyptus urophylla*. A) calos transformados mantidos no co-cultivo à 19°C B) calos transformados mantidos no co-cultivo à 22°C C) calos transformados mantidos no co-cultivo à 25°C.

4 DISCUSSÃO

A transformação genética de plantas envolve a integração e interação de muitos fatores que são determinantes na eficiência do processo. Ao longo desses últimos anos, muitas pesquisas foram realizadas com o objetivo de se obter um processo eficiente para a transformação genética de eucalipto via *Agrobacterium tumefaciens*, porém, isso ainda se constitui em um desafio (GIRIJASHANKAR, 2011; HO et al., 1998; PRAKASH; GURUMURTHI, 2009; TOURNIER et al., 2003).

Questões como a baixa amplitude de aplicação dos protocolos desenvolvidos aos vários híbridos disponíveis, e a performance dos materiais sob condições de cultivo *in vitro*, são sempre alvos de pesquisas intensas. Assim, atuando nesta linha de pesquisa, este trabalho mostra como alguns fatores envolvidos no processo de transformação do híbrido *E. grandis* X *E. urophylla* podem influenciar no processo da transferência do T-DNA de maneira estável e permanente, refletindo em um processo mais eficiente.

Um fator importante que tem sido relatado para o aumento da eficiência da transformação é o estabelecimento do método de infecção ideal. Durante essa etapa, o contato entre a *Agrobacterium tumefaciens* e o explante vegetal deve ser estabelecido para favorecer um parasitismo eficiente. Métodos de infiltração a vácuo e/ou sonicação, promovem um ambiente propício a esta “associação”, facilitando a aderência e a colonização da bactéria, além da possibilidade de promoverem microferimentos aos tecidos vegetais, o que leva a produção de sinalizadores biológicos essenciais no processo de infecção (LIU et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2009; PARK et al., 2005; SUBRAMANYAM et al., 2011).

Assim, calos organogênicos do híbrido *E. grandis* x *E. urophylla* foram submetidos a estas diferentes condições, de forma isolada e/ou associativa, durante o processo de transformação. O processo conduzido somente com a infiltração a vácuo, por 4 ou 8 minutos, promoveu as maiores médias de expressão transiente do gene GUS. O método de infiltração a vácuo também se mostrou como mais eficiente (1,46%) em outro trabalho para o mesmo híbrido *E. grandis* X *E. urophylla* (BALIEIRO, 2013). No entanto, no presente trabalho a infiltração a vácuo não proporcionou mortalidade dos calos, diferindo do trabalho de Balieiro (2013) que observou uma alta taxa de mortalidade.

Importante ressaltar que no presente trabalho a cepa LBA4404 foi utilizada para infectar os calos do híbrido *E. grandis* X *E. urophylla*, enquanto Balieiro (2013) utilizou a cepa EHA105, a qual é considerada altamente virulenta (TERAKAMI et al., 2007). Motivo que pode justificar a diferença de mortalidade observada em ambos os trabalhos.

Na literatura não foram encontrados mais relatos da utilização da infiltração a vácuo para o gênero *Eucalyptus*, porém o método tem sido relatado com sucesso para outras espécies, como na cereja do inverno, (*Withania somnifera*) pertencente à família Solanaceae (SIVANANDHAN et al., 2015). Os autores testaram infiltração a vácuo durante dois tempos 10 e 15 minutos, com

intuito de estabelecer o melhor protocolo de transformação para segmentos nodais de *Withania somnifera*. Verificaram que infiltração a vácuo por 10 minutos proporcionou o aumento da atividade do gene GUS, com 83% dos explantes com expressão transiente.

Segundo alguns autores, o método de sonicação gera microferimentos na superfície dos tecidos, facilitando a penetração bacteriana em tecidos internos da planta (ALCANTARA; FILHO; QUOIRIN, 2011; BAKSHI et al., 2011; GOZALEZ et al., 2002; SUBRAMANYAM et al., 2011; TRUQUE; FINER, 1997). Estes microferimentos liberam compostos fenólicos que estimulam os genes *vir* do plasmídeo *Ti*, auxiliando a transferência do T-DNA no momento da infecção (OLIVEIRA et al., 2009).

Neste trabalho ao testar o método de sonicação por 15 e 30 segundos, verificou-se que esses tempos não foram satisfatórios para o aumento da expressão transiente da atividade do GUS, quando comparados com o método de infiltração a vácuo, proporcionando baixas médias de expressão transiente da atividade do GUS.

Os diferentes tecidos são sensíveis e apresentam respostas distintas ao tempo de exposição ao tratamento de sonicação (WANG; PIJUT, 2014). Portanto, a menor eficiência do método de sonicação verificada no presente estudo pode estar relacionada ao tipo de explante utilizado e ao tempo de exposição ao processo

Uma hipótese a ser considerada é que os tempos de sonicação por 15 e 30 segundos nos calos organogênicos tenham sido excessivos, promovendo danos celulares ou mesmo ruptura do tecido, o que dificulta o processo de infecção e a posterior regeneração das plantas (JOERSBO; BRUNSTEDT, 1992; WANG; PIJUT, 2014). Da mesma forma, esses tempos podem ter sido insuficientes para favorecer microferimentos celulares e uma penetração mais profunda da *A. tumefaciens* nos calos organogênicos (LIU et al., 2005; TRICK; FINER, 1998).

Resultados contraditórios também foram observados em outros trabalhos ao utilizarem o método de sonicação para transformar eucalipto. Em estudos com calos do híbrido *E. grandis* X *E. urophylla* submetidos ao método de sonicação por 15 segundos, foram verificadas baixas taxas de sobrevivência (15%), e as plantas que regeneraram não foram infectadas pela *A. tumefaciens* (BALIEIRO, 2013). No entanto, quando o método de sonicação por 120 segundos foi utilizado para transformar sementes de *E. grandis* x *E. urophylla*, obtiveram-se altas médias de expressão transiente da atividade do GUS (3,8), e viabilidade do explante com uma taxa de regeneração de 17,64% (GONZÁLEZ et al., 2002).

Mesmo que o método de infiltração a vácuo tenha se mostrado eficiente para transformação de calos organogênicos para o híbrido *E. grandis* X *E. urophylla*, o presente estudo propôs combinar os métodos de sonicação seguidos de infiltração a vácuo por diferentes tempos (Tabela 1). Independente do tempo de exposição, a combinação dos métodos não favoreceu a infecção bacteriana, com tendência de redução da expressão transiente da atividade do GUS. Isso porque o método de infiltração a vácuo seguido por sonicação podem ter proporcionado estresse severo ao explante. Uma vez que o sucesso da transferência do T-DNA depende de respostas das células vegetais ao processo de infecção. A ativação da defesa da planta promove a hipersensibilidade a respostas necróticas, levando a danos no tecido e diminuindo a eficiência da transferência do T-DNA (KUTA; TRIPATHI, 2005; RICHTER; RONALD, 2000; SHARMA et al., 2005).

Resultados contraditórios foram obtidos por Charity et al. (2002) que, ao transformarem embriões zigóticos de *Pinus radiata*, utilizando o método de sonificação por 25 segundos e infiltração a vácuo por 5 minutos, obtendo-se 55% de explantes com expressão transiente do GUS.

Segundo alguns autores, a adição da acetoseringona durante co-cultivo, para algumas espécies de plantas, pode ser um fator crucial para proporcionar a

ativação dos genes *vir* e promover um aumento da transferência do T-DNA, melhorando a eficiência do processo de transformação genética (BARBOSA, 2002; ORTEGA et al., 2010; SUNILKUMAR; VIJAYACHANDRA; VELUTHAMBI, 1999).

Neste estudo, a adição de acetoseringona na concentração de 100 μM proporcionou a melhor média de expressão do gene GUS de 0,76 nos calos organogênicos.

Alguns resultados semelhantes foram observados em transformação genética em ápices caulinares de *Eucalyptus saligna* e explantes foliares *Eucalyptus tereticornis*, demonstrando que a adição de 100 μM de acetoseringona durante o co-cultivo aumentou a expressão transiente da atividade do GUS. Para ápices caulinares de *Eucalyptus saligna* e para explantes foliares *Eucalyptus tereticornis* o aumento da expressão transiente da atividade do GUS foi de 20% (AGGARWA et al., 2011; SILVA et al., 2011).

No presente estudo, comprovou-se que, concentrações acima de 100 μM de acetoseringona resultam em uma redução significativa da expressão transiente da atividade do GUS. Nas concentrações de 200 μM e 300 μM as médias de expressão transiente da atividade do GUS decresceram (0,6 e 0,43).

Estudos com explantes foliares *Eucalyptus tereticornis* mostraram-se semelhantes ao presente trabalho. A adição de 200 μM de acetoseringona no co-cultivo proporcionou uma redução da expressão transiente da atividade do GUS de 23% com relação à concentração de 100 μM de acetoseringona (AGGARWA et al., 2011).

Segundo alguns autores, as baixas concentrações de acetoseringona favorecem o aumento da virulência da bactéria, porém, concentrações mais elevadas deste indutor podem até mesmo serem letais para o crescimento das bactérias e para diferentes tipos de explantes (LIU et al., 2005; SIVANANDHAN et al., 2015). O efeito de altas concentrações de acetoseringona (300 μM) foi

verificado em duas estirpes de *Agrobacterium tumefaciens*, sendo uma contendo o plasmídeo *Ti* (estirpe C58F) e outra ausente (estirpe C58C1). A dosagem utilizada do indutor afetou apenas o crescimento da bactéria que continha o vetor, demonstrando que o plasmídeo *Ti* está intimamente ligado ao crescimento da bactéria, e que é sensível a determinadas concentrações de acetoseringona (FORTIN; NESTER; DION, 1992).

A determinação da concentração de acetoseringona também pode estar relacionada com a competência do explante e do tipo de espécies de plantas (AGGARWA et al., 2011).

Estudos relatam respostas favoráveis ao co-cultivo de explantes foliares de tabaco em altas concentrações de acetoseringona, entorno de 200 μM e 400 μM . Essas concentrações proporcionaram o aumento da expressão transiente da atividade do GUS, entorno de 20% em relação à concentração de 100 μM deste indutor (PARK, 2006).

A temperatura tem sido reportada como outro fator capaz de influenciar *Agrobacterium tumefaciens* e o seu mecanismo de transferência de T-DNA (SALAS et al., 2001).

No presente estudo calos organogênicos de *E. grandis* X *E.urophylla* quando submetidos ao co-cultivo sob temperatura de 19 °C, apresentaram maior média de expressão transiente da atividade do GUS (2,6). As médias de expressão transiente do gene GUS foram reduzidas, quando o co-cultivo ocorreu nas temperaturas de 22 ° e 25 °C.

Resultados contraditórios foram verificados por Andrade (2002) que testou três diferentes temperaturas (20 °C, 26 °C e 28 °C) do co-cultivo de meristemas axilares de *Eucalyptus grandis*, e após 30 dias verificou uma percentagem de 30% dos explantes com expressão transiente do GUS na temperatura de 26°C.

No entanto, para a espécie de tabaco, a transformação de 19°C permitiu transferência de genes com sucesso, com uma percentagem de explantes com expressão transiente da atividade do GUS igual a 83% (SALAS et al., 2001).

A termo-sensibilidade da montagem de pilus da *A. tumefaciens* foi observada por Fullner et al. (1996). A montagem do pilus da bactéria em folhas de *Kalanchoe daigremontiana* a temperatura de 19°C e 28°C foi analisada por microscópio eletrônico, verificando que em 19°C, as células do pilus eram dez vezes mais abundantes que na temperatura de 28°C. Este resultado demonstra que a temperatura é importante para ativação dos genes *vir*, e que a proteína VirE2 codificada pelo operon *virE*, promove a produção de pilus da bactéria para o explante, e a formação desta estrutura auxilia na transferência do T-DNA para célula vegetal.

Braun (1958) relata que a alta temperatura pode ser prejudicial para o desenvolvimento do tumor, naturalmente induzido pela *A. tumefaciens* em espécies vegetais, e que a supressão do desenvolvimento do tumor pode estar correlacionada a alteração conformacional na proteína sensorial VirA, responsável pela ativação dos genes *vir*.

5 CONCLUSÕES

Dentre os fatores estudados relacionados com o aumento da eficiência da transformação genética, mediado por *Agrobacterium tumefaciens*, o método de infecção por infiltração a vácuo por 4 minutos, adição de 100 µM de acetoseringona e temperatura de 19 °C no co-cultivo, foram os mais eficientes, aumentando a expressão transiente da atividade do GUS, proporcionando uma melhor eficácia no processo de transformação para o híbrido *E. grandis* X *E. urophylla*.

REFERÊNCIAS

- ALCANTARA, G. B.; FILHO, L. C. B.; QUOIRIN, M. Organogenesis and transient genetic transformation of the hybrid *Eucalyptus grandis* × *Eucalyptus urophylla*. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.68, n.2, p. 246-251, 2011.
- ANDRADE, A. **Avaliação de parâmetros que influenciam a transformação genética de *E. grandis* via *Agrobacterium***. 2002. 123 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2002.
- BALIEIRO, F. P. **Transformação genética de híbridos de *E. urograndis***. 2013. 87p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.
- BARBOSA, J. M. **Estudos de fatores que influenciam o processo de transformação genética em Citros via *Agrobacterium tumefaciens***. 2002. 64p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Biotecnologia de Plantas) - Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.
- BRAUN, A. C.; STONIER, T. **Morphology and physiology of plant tumors: Pathologie des Protoplasmas**, Springer Vienna, 1958, 93 p.
- BAKSHI, S. et al. Improved *Agrobacterium*-mediated transformation of cowpea via sonication and vacuum infiltration. **Plant cell reports**, v. 30, n. 12, p. 2281-2292, 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.
- CARON, B. O. et al. Resistência inicial de quatro espécies arbóreas em diferentes espaçamentos após ocorrência de geada. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 5, p.817-822, 2011.
- CHARITY, J. A. et al. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Pinus radiata* organogenic tissue using vacuum-infiltration. **Plant cell, tissue and organ culture**, v. 70, n. 1, p. 51-60, 2002.

OLIVEIRA, M. L. P. de et al. High-efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation of citrus via sonication and vacuum infiltration. **Plant Cell Reports**, v. 28, n. 3, p. 387-395, 2009.

FORTIN, C.; NESTER, E. W.; DION, P. Growth inhibition and loss of virulence in cultures of *Agrobacterium tumefaciens* treated with acetosyringone. **Journal of bacteriology**, v. 174, n. 17, p. 5676-5685, 1992.

FULLNER, K. J. ; LARA, J. C.; NESTER, E. W. Pilus assembly by *Agrobacterium* T-DNA transfer genes. **Science**, v. 273, n. 5278, p. 1107-1109, 1996.

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

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

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.

HUSSAIN, S. S.; HUSNAIN, T.; RIAZUDDIN, S. Sonication assisted *Agrobacterium* mediated transformation (SAAT): an alternative method for cotton transformation, **Pakistan Journal of Botany**, Karachi, v. 39, n. 1, p. 223-230, 2007.

INDUSTRIA BRASILEIRA DE ÁRVORES - IBÁ. Indicadores de desempenho do setor nacional de árvores plantadas em 2015, disponível em: <http://www.bracelpa.org.br/shared/iba_2015_pt.pdf> Acesso em: 6 jan. 2016.

JEFFERSON, R. A.; KAVANAGH, T. A.; BEVAN, M. W. GUS fusions beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. **EMBO Journal**, Oxford, v. 6, n. 13, p. 3901-3907, 1987.

JOERSBO, M.; BRUNSTEDT, J. Sonication: a new method for gene transfer to plants. **Physiol. Plant**, v. 85, p. 230-234, 1992.

KUTA, D. D.; TRIPATHI, L. *Agrobacterium*-induced hypersensitive necrotic reaction in plant cells: a resistance response against *Agrobacterium*-mediated DNA transfer. **African Journal of Biotechnology**, v. 4, n. 8, p. 752-757, 2005.

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**, v. 16, n. 3, p. 189-197, 2005.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. a Revised medium for rapid growth and biossays whith tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, p. 473-497, 1962.

MYBURG, A. A. et al. *Eucalypts*. In **Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants** (Kole, C., ed.), p. 115–160. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2007.

ORTEGA et al. *Agrobacterium tumefaciens*-transient genetic transformation of Habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.) leaf explants. **Journal of Biotechnology**., v 13, p. 663, 2010.

PAIVA, J. A. et al. Building up resources and knowledge to unravel transcriptomics dynamics underlying *Eucalyptus globulus* xylogenesis. **BMC Proc**, v.5, p. 1753-6561, 2011.

PARK, B.S. *Agrobacterium tumefaciens*-Mediated transformation of Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) leaf disks: Evaluation of the co-cultivation conditions to increase β -glucuronidase gene Activity. 2006. 72p. Tese (Doutorado) - Universidade Korea, 2006.

PRAKASH, G.; GURUMURTHI. “Genetic transformation and regeneration of transgenic plants from precultured cotyledon and hypotyl explants of *Eucalyptus tereticornis* Sm. using *Agrobacterium tumefaciens*”. **In vitro cellular & developmental biology-plant**, v. 45 p. 429-434, 2009.

RICHTER, T.E.; RONALD, P.C. The evolution of disease resistance genes. In: **Plant Molecular Evolution**. Springer Netherlands, p. 195-204, 2000.

SALAS, M.C. et al. Temperature influence on stable T-DNA integration in plant cells. **Plant Cell Rep.**, v.20, p. 701-705, 2001.

SHARMA, K.K. et al. Genetic transformation technology: status and problems. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 41, n. 2, p. 102-112, 2005.

SILVA, A. L. L. et al. Preliminary results for genetic transformation of shoot tip of *Eucalyptus saligna* sm. via *Agrobacterium tumefaciens*. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 2, p. 1-6, 2011.

SILVA, A. L. L. et al. Tolerância ao resfriamento e congelamento de folhas de eucalipto. **Biociências**, Porto Alegre, v. 17, n. 1, p. 86-90, 2009.

SIVANANDHAN, G. et al. An efficient hairy root culture system for *Withania somnifera* (L.) Dunal. **African Journal of Biotechnology**, v. 13, n. 43, 2015.

SUBRAMANYAM, K. et al. Ectopic expression of an osmotin gene leads to enhanced salt tolerance in transgenic chilli pepper (*Capsicum annum* L.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 105, n. 2, p. 181-192, 2011.

SUNILKUMAR, G.; VIJAYACHANDRA, K.; VELUTHAMBI, K.
Preincubation of cut tobacco leaf explants promotes *Agrobacterium*-mediated transformation by increasing *vir* gene induction. **Plant Science**. v. 141, n. 1, p. 51-58, 1999.

TERAKAMI, S. et al. *Agrobacterium*-mediated transformation of the dwarf pomegranate (*Punica granatum* L. var. nana). **Plant cell reports**, v. 26, n. 8, p. 1243-1251, 2007.

TRICK, H. N.; FINER, J. J. Sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] embryogenic suspension culture tissue. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 17, p. 482-488, 1998.

TOURNIER, V. et al. An eficiente procedure to stably introduce genes into an economically importante pulp tree (*Eucalyptus grandis* X *Eucalyptus urophylla*) **Transgenic Research**, v. 12, p. 403-411, 2003.

WANG, Y.; PIJUT, P.M. *Agrobacterium*-mediated transformation of black cherry for flowering control and insect resistance. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 119, n. 1, p. 107-116, 2014.

ZIA, M. et al. *Agrobacterium* mediated transformation of soybean (*Glycine max* L.): Some conditions standardization. **Pakistan Journal of Botany**, Karachi, v. 42, n. 3, p. 2269-2279, 2010.

**ARTIGO 2 Criopreservação de ápices caulinares de *E.grandis* X
*E.urophylla***

Chaiane Fernandes Vaz¹

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

¹Autor para correspondência: Cha.fvaz@hotmail.com

Universidade Federal de Lavras

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi realizar a criopreservação através da técnica de *droplet-vitrification*, para ápices caulinares de *E. grandis* X *E. urophylla*, e avaliar as alterações histocitológicas e análises ultraestruturais ocorridas durante o processo. Foi pré-determinado o meio de regeneração dos ápices, utilizando-se de diferentes concentrações de BAP (0,14 μ M; 1,42 μ M) e BAP (0,14 μ M) em combinação com AIA (5,70 μ M). Após 30 dias avaliou-se a percentagem de regeneração de plantas, formação de calos e plantas hiperídricas. Para a criopreservação realizou-se o pré-cultivo dos ápices em meio MS suplementado com sacarose a 0,2 M e 0,5 M por 24 horas. Foram avaliados seis tempos de exposição ao crioprotetor PVS2 (20, 40, 60, 80, 100 e 120 minutos) e posterior imersão em nitrogênio líquido. Depois de 30 dias avaliou-se a percentagem de regeneração, e aos 60 dias percentagem de brotações. As observações histológicas e ultraestruturais dos ápices foram realizadas em diferentes fases do processo de criopreservação e após uma semana de recuperação e para as medições de plasmólise utilizou-se o software image-Pro Plus. A concentração de 0,14 μ M de BAP promoveu melhores taxas de regeneração (80%) sem presença de plantas hiperídricas. A criopreservação foi bem sucedida quando os ápices caulinares foram expostos ao crioprotetor por 60 minutos e imersos em nitrogênio líquido não promovendo danos irreversíveis às células, proporcionando maiores taxas de sobrevivência (66%) e maior integridade celular, sem a presença de núcleos pinóticos, com baixas taxas de plasmólise.

Palavras-chave: *Droplet Vitrification*, Microscopia fotônica, Microscopia de varredura.

ABSTRACT

The aims of this study was performed cryopreservation through the technique of *droplet-vitrification* for shoot tips of *E. grandis* x *E. urophylla* and evaluate histocytological changes and ultrastructural analysis occurred during the process. Was pre-determined the regeneration medium of shoot tips using different concentrations of BAP (0,14 μM ; 1,42 μM) BAP (0,14 μM) in combination with IAA (5,10 μM) after 30 days was evaluated percentage of plant regeneration, calluses formation and vitrified plants. For cryopreservation was performed pre-cultivation of shoot tips on MS medium supplemented with 0.2M sucrose for 24 hours and 0.5 M sucrose for 24 hours and were evaluated six times of exposure to PVS2 (20, 40, 60, 80, 100 and 120 minutes) and subsequent immersion in liquid nitrogen, after 30 days it was evaluated percent survival and after 60 days the percentage of shoots was evaluated. Histological and ultrastructural observations of shoot tips was performed in different stages of the cryopreservation process, and after one week of recovery, and to measurements were made using plasmolysis image-Pro Plus software. The concentration of BAP 0,14 μM promoted better regeneration rates (80%) without the presence of vitrified plants. Cryopreservation was successful when the shoot tips were exposed to the cryoprotectant for 60 minutes and immersed in liquid nitrogen does not promote irreversible damage to the cells, resulting in higher survival rates (66%) and increased cellular integrity without the presence of picnotics nucleus, with low plasmolysis rates.

Keywords: *Droplet Vitrification*, Light microscopy, Scanning microscopy.

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Eucalyptus* é a principal espécie do setor florestal, o qual apresenta grande importância no mercado brasileiro e mundial, sendo largamente plantado para produção de papel e celulose, carvão vegetal, lenha e óleos essenciais. Globalmente, a sua área de cultivo é estimada em cerca de 17,8 milhões de hectares, com contínuo crescimento das áreas plantadas, devido às suas diversas aplicações (PRINSEN et al., 2012; TOURNIER et al., 2003).

Em razão da alta demanda por produtos oriundos do eucalipto, principalmente por papel e celulose de alta qualidade, tem-se verificado a necessidade do aumento de produtividade das plantações, exigindo genótipos que possuem um rápido crescimento, alto rendimento e resistência a estresses bióticos e abióticos (PADAYACHEE et al., 2009). Para atender esta crescente demanda, estratégias de melhoramento e propagação têm sido desenvolvidas, incluindo o melhoramento genético convencional associado às técnicas biotecnológicas como micropropagação e transformação genética (BHALERAO; NILSSON; SANDBERG, 2003; GRATAPAGLIA, 2004; WATT et al., 2003).

A manutenção de espécies e genótipos potencialmente importantes é um critério essencial para as plantas geradas durante os métodos de transformação genética, enquanto os testes de biossegurança são realizados em campo (ELDRIDGE et al., 1993; PADAYACHEE et al., 2009). Estes genótipos atualmente são mantidos em estandes de conservação, jardim clonal e estufas e sistemas hidropônicos. Porém, estes métodos são caros e trabalhosos, além de serem favoráveis ao ataque de fungos, bactérias e patógenos, bem como as alterações ambientais repentinas, resultando em perdas dos genótipos (WATT et al., 2000; WATT et al., 2003).

A criopreservação é uma técnica que pode auxiliar na manutenção de genótipos potencialmente importantes, minimizando tais riscos e garantindo a

viabilidade do material biológico, sem que sofram modificações ou alterações genéticas por um período indeterminado (ENGELMANN, 2011; RAO, 2004; WATT et al., 1997; WATT et al., 2000).

Esta técnica consiste na conservação do material biológico em nitrogênio na sua forma líquida à -196°C ou vapor a -150°C , condições que diminuem ou até mesmo paralisam o metabolismo celular (ENGELMANN, 2011; REED, 2008). É uma alternativa de baixo custo e benefícios significativos na conservação e manutenção do material vegetal, com vantagens de economia de espaço e baixa exigência de manutenção, evitando a necessidade de repetidas subculturas, que estão sujeitas a diferentes fontes de contaminação (KACZMARCZYK et al., 2011; MELETTI et al., 2007; PADAYACHEE et al., 2009; REED, 2008).

Dentre as várias técnicas de criopreservação disponíveis, a *droplet-vitrification*, tem sido amplamente aplicada a um grande número de espécies, incluindo batata, espargos, maçã, eucaliptos e cana-de-açúcar (KAYA et al., 2013; NOGUEIRA et al., 2013; SAKAI; ENGLEMAN, 2007). Esta técnica consiste no pré-tratamento dos explantes com solução crioprotetora, antes que eles sejam dispostos em tiras de papel alumínio com uma gota de PVS2 e posterior imersão em nitrogênio líquido (ENGELMANN, 2011). A principal vantagem da criopreservação é a possibilidade de atingir elevadas taxas de resfriamento/aquecimento, em razão do volume pequeno de solução de vitrificação em que os ápices são colocados, aumentando a probabilidade de se obter um estado vitrificado e evitar a recristalização (PANIS; SWENNEN, 2005; SAKAI; ENGLEMAN, 2007).

Muitos são os explantes utilizados no processo, portanto, para maioria de espécies de plantas, os ápices caulinares representam o material de escolha para a criopreservação, uma vez que compreendem numerosas células meristemáticas, cujas características citológicas tornam-as mais tolerantes à desidratação e

exposição ao nitrogênio líquido, em comparação com as células mais diferenciadas (BARRACO et al., 2013).

O grau de lesão durante o processo de criopreservação é um componente chave para a conservação bem sucedida de células vegetais, no entanto, entender e minimizar os danos celulares durante a criopreservação podem melhorar as técnicas de criopreservação (YIL et al., 2012). As lesões induzidas por protocolos de criopreservação podem predispor tecidos, promovendo danos e perda de viabilidade com a progressão de cada etapa do protocolo (BENSON; BREMNER, 2004; WEN et al., 2012).

Diante do exposto, teve como objetivo realizar a criopreservação através da técnica de *doprllet-vitrification* para ápices caulinares de *E. grandis* X *E. urophylla*, e avaliar as alterações histocitológicas e análises ultraestruturais ocorridas durante o processo.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Material Vegetal

Para a obtenção do material vegetal, segmentos nodais e gemas apicais *in vivo*, provenientes de mudas de um híbrido comercial de *Eucalyptus grandis* X *Eucalyptus urophylla*, foram desinfestados utilizando pastilhas de paraformoladeído durante 50 minutos. Após esse intervalo, os explantes foram imersos em água destilada autoclavada contendo 5 ml de ácido cítrico para evitar a oxidação. Em seguida, os ápices caulinares foram excisados e inoculados em placas de petri contendo o meio MS basal. Os explantes permaneceram em contato com o meio durante 5 dias no escuro. Em seguida, foram transferidos para o meio de multiplicação composto pelo meio basal MS, suplementado com 20 g L⁻¹ de sacarose, 5,70 µM de ácido indol acético (AIA) e 0,14 µM de 6-benzilaminopurina (BAP) e 1,7g L⁻¹ de phytigel, com o pH aferido em 5,8 antes de autoclavagem a 121°C por 20 minutos. O material foi mantido na temperatura de 25±2°C, fotoperíodo de 16/8 horas (luz/escuro) e irradiância de 20 µmol. m².s⁻¹, para a micropropagação de plantas *in vitro*.

2.2 Regeneração de ápices caulinares *in vitro*

Para estudos iniciais de sobrevivência dos ápices meristemáticos foram avaliados a influência da presença dos reguladores de crescimento 6-benzilaminopurina (BAP) e ácido indol-3-acético (AIA). As concentrações dos reguladores foram determinadas a partir do meio estabelecido no laboratório.

Os meristemas foram excisados com tamanho aproximadamente de 1,5mm², obtidos de plantas estabelecidas *in vitro* e foram inoculados em placa de petri (60 x 15 mm), contendo meio de multiplicação, constituído do meio basal

MS acrescido com 20 g L⁻¹ de sacarose, 10 mg L⁻¹ de ácido ascórbico, 1,7g L⁻¹ de phytigel, e suplementados com BAP (0,14 µM; 1,42 µM) e BAP (0,14 µM) em combinação com AIA (5,70 µM). Os explantes foram mantidos na ausência de luz por uma semana e após esse período as placas foram mantidas na temperatura de 25±2°C, fotoperíodo de 16/8 horas (luz/escuro) e irradiância de 20 µmol. m⁻².s⁻¹. As variáveis analisadas após 30 dias de cultivo foram: percentagem de sobrevivência, presença e ausência de calo na base do explante e formação de plantas hiperídricas.

2.3 Droplet-Vitrification

A técnica de *Droplet-vitrification* foi realizada conforme Kaya et al. (2013) com adaptações. Os ápices caulinares (1-1,5mm²) foram pré-cultivados, por 24h em meio MS sólido suplementado com 0,2 M de sacarose, seguido por 24h em meio MS suplementado com 0,5M de sacarose, na ausência de luz. Em seguida foram adicionados em 3µL de PVS2 (30% glicerol (w/v), 15% de etileno glicol (w / v), 15% de dimetilsulfóxido (w / v), e 0,4 M de sacarose em meio de manutenção MS) dispostas em tiras de papel de alumínio esterilizado (5 x 15 mm). Os explantes foram às gotas de PVS2 em temperatura de 0 °C, durante 20, 40, 60, 80, 100 e 120 minutos. Após a exposição de PVS2, as tiras de papel alumínio, contendo os ápices caulinares foram inseridas em criotubos de 1,5 ml, contendo nitrogênio líquido, posteriormente foram transferidos para o criobox e mantidos dentro do galão de nitrogênio líquido. O descongelamento foi realizado depois de, no mínimo, uma hora de exposição ao nitrogênio líquido. As tiras de folha de alumínio, contendo os ápices caulinares foram retiradas dos criotubos e imediatamente imersas em solução de recovery solution (Meio MS líquido, contendo 1,2 M de sacarose), em temperatura ambiente durante 10 minutos, e

depois transferidas para o meio de regeneração (MS suplementado com 0,14 μM de BAP).

Para os controles, os ápices caulinares foram expostos ao PVS2 nos mesmos intervalos de tempo, porém não foram submetidos ao nitrogênio líquido. Posteriormente, os ápices também foram colocados em solução de descarregamento durante 10 minutos, e em seguida transferidos para o meio de regeneração (MS suplementado com 0,14 μM de BAP).

Os explantes foram mantidos no escuro por três dias, para evitar a oxidação e posteriormente transferidos para fotoperíodo de 16/8 horas (luz/escuro) com temperatura de $25\pm 2^\circ\text{C}$ e irradiância de $20 \mu\text{mol. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Foram utilizados dez ápices para cada tempo de tratamento PVS2 (20 a 120 min), e cada tratamento foi repetido pelo menos três vezes. As variáveis avaliadas após 30 dias de cultivo foram percentagens de regeneração, e após 60 dias número de brotos.

2.4 Análises histológicas

As observações dos ápices caulinares em diferentes fases do protocolo de criopreservação foram realizadas em lâminas histológicas, e foram selecionados apenas os tratamentos de PVS2, que apresentaram as maiores e menores taxas de sobrevivência.

As seguintes amostras foram preparadas para o estudo de microscopia de luz:

- Ápices caulinares excisados;
- Ápices caulinares excisados após uma semana no meio de regeneração;
- Ápices caulinares após pré-cultura, durante 24h em meio MS suplementado com 0,2 M de sacarose e 24h em meio MS com 0,5 M de sacarose (controles pré-cultura);

- Ápices após pré-cultura durante 24h em meio MS suplementado com 0,2 M de sacarose e 24h em meio MS suplementado com 0,5 M de sacarose após uma semana no meio de regeneração (controles pré-cultura uma semana);
 - Ápices caulinares após pré-cultura e expostos ao PVS2 nos tempos de 60, 80 e 120 minutos (controles desidratação);
 - Ápices caulinares após pré-cultura e expostos ao PVS2 nos tempos de 60, 80 e 120 minutos após uma semana no meio de regeneração;
 - Ápices caulinares após pré-cultura, exposição ao PVS2 nos tempos de 60, 80 e 120 minutos e imersos em nitrogênio líquido (NL) por no mínimo 1 hora.
 - Ápices caulinares após pré-cultura, exposição ao PVS2 nos tempos de 60, 80 e 120 minutos e imersos em nitrogênio líquido (NL) por no mínimo 1 hora, após uma semana no meio de regeneração.

As amostras foram fixadas em FAA 50% (solução de formaldeído, ácido acético glacial e álcool etílico) por três dias, e posteriormente foram conservados em álcool 70% até o momento da desidratação. A desidratação foi realizada em série etílica (70%, 80%, 90% e 100%) por uma hora em cada percentagem e na de 100% duas vezes por uma hora. Em seguida, as amostras foram deixadas durante a noite em quantidades iguais de resina com álcool 100%, e após foram infiltradas em resina pura durante 24 h. Posteriormente os ápices foram emblocados em historesina Leica®, de acordo com o protocolo do fabricante. As amostras foram cortadas com espessura de 3µm em micrótomo rotativo e dispostas em lâminas de vidro e, em seguida, foram duplamente coradas com o reagente de ácido periódico de Schiff (PAS) e azul de toluidina na concentração de 0,1% e foram visualizadas em microscópio óptico Leica®. As variáveis avaliadas foram: danos celulares, plasmólise, núcleos pinóticos e ruptura de membrana.

2.4.1 Análises histológicas quantitativas

As análises histológicas quantitativas foram realizadas conforme Barraco et al. (2014), com adaptações. As amostras utilizadas para análise foram às do item 2.4.

Por condições experimentais as observações foram realizadas em três ápices vegetativos e nove células de três camadas da região meristemática (Fig. 1). As imagens foram digitalizadas e analisadas mediante o software Image Pro-Plus (Version 4.5, Media Cybernetics, Silver Spring, EUA), para avaliação de plasmólise. Esta foi expressa em porcentagem da superfície das células, medindo a proporção da superfície do citoplasma sobre a superfície da célula delimitada pela parede celular, calculada usando a fórmula: $\frac{\text{superfície do citoplasma} - 100}{\text{superfície da célula}} \times 100$.

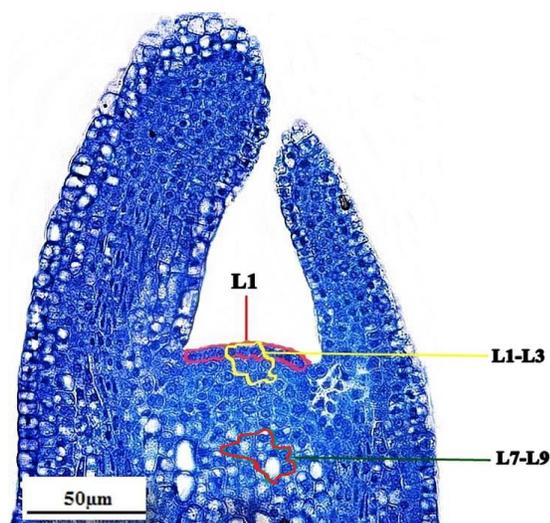


Figura 1 Corte histológico de ápices caulinares de Eucalipto mostrando as três zonas L1 constituído de nove células localizadas na camada externa do meristema; L1-3 constituído de nove células divididos igualmente entre as camadas 1, 2 e 3 do meristema; L7-9 constituído por nove células dividido igualmente entre as camadas 7, 8 e 9 abaixo da superfície do meristema, onde foram realizadas as medições da superfície das células, para verificação de plasmólise.

2.4 Microscopia eletrônica de Varredura

Para microscopia eletrônica de varredura, avaliaram-se os ápices excisados (controle total), ápices expostos ao PVS2 nos tempos de 60, 80 e 120 minutos imersos em nitrogênio líquido e após uma semana de recuperação. Os ápices foram coletados e imersos em solução fixadora (Karnovisk) pH 7,2 por um período mínimo de 24 horas, lavados em tampão cacodilato de sódio por três vezes e pós-fixados em tetróxido de ósmio 1% por 1 hora, à temperatura ambiente. Após esse período, foram lavadas por três vezes em água destilada e, em seguida, desidratadas em gradientes crescentes de acetona por 10 minutos cada (25%, 50%, 75%, 90% e 100% por três vezes). Posteriormente, o material foi levado ao aparelho de ponto crítico para completar a secagem, montado em *stubs* e coberto com ouro. Os espécimes foram observados no Microscópio Eletrônico de Varredura LEO Evo 40, segundo metodologia descrita por Alves (2004).

2.5.1 Análise estatística

O experimento foi conduzido em delineamento experimental de blocos ao acaso com três repetições, para as variáveis de percentagem de sobrevivência e brotação na criopreservação. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey à 5% de probabilidade, utilizando o software assistat (SILVA; AZEVEDO, 2002).

3 RESULTADOS

3.1 Regeneração dos ápices caulinares *in vitro*

Os ápices inoculados no meio acrescido com 0,14 μM e 1,42 μM de BAP não diferiram significativamente entre si para as taxas de regeneração (80%, 84% respectivamente), sendo os tratamentos que propiciaram as maiores taxas de regeneração. Já os ápices inoculados em meio de cultura acrescido 0,14 μM de BAP em combinação com 5,70 μM de AIA, tiveram menores taxas de regeneração (68%) e maiores taxas de formação de calos (64%), quando comparado com os demais tratamentos. Apesar da concentração de 1,42 μM de BAP ter promovido taxas de regeneração semelhante à concentração de 0,14 μM , esta maior dosagem promoveu a formação de plantas hiperidricas (58%) (Tabela 1).

Tabela 1 Percentagem de regeneração de ápices, formação de calos e plantas hiperidricas de *E. grandis* x *E. urophylla*, submetidas a tratamentos com BAP de forma isolada ou em combinação com AIA, avaliado aos 30 dias.

Reguladores	Regeneração (%)	Calos (%)	Hiperidricas (%)
BAP 0,14 μM + AIA 5,70 μM	68 \pm 4,9b	64 \pm 6,3 a	0,0 \pm 0,0 b
BAP 0,14 μM	80 \pm 8,9 a	18 \pm 9,1 b	0 \pm 0,0 b
BAP 1,42 μM	84 \pm 7,5 a	0,0 \pm 0,0 c	58 \pm 9,2 a

Médias seguidas de letra não diferem entre si nas colunas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Os ápices inoculados em todos os tratamentos regeneraram após 30 dias, porém o tratamento com 0,14 μM de BAP proporcionou brotações visualmente mais vigorosas, com baixa formação de calos na base do explante e sem presença de plantas com sintomas de hiperidricidade (Figura 1).

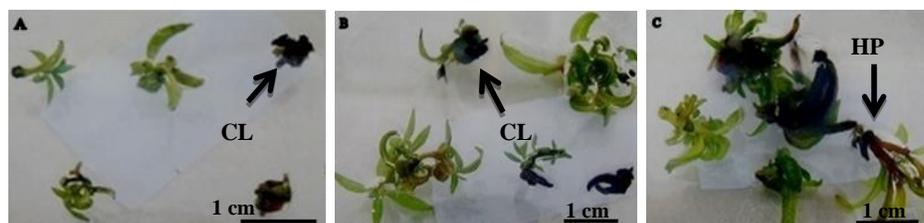


Figura 1 Aspecto visual dos ápices após 30 dias, submetidos aos tratamentos (A) 0,14 μM de BAP +5,70 μM de AIA; (B) 0,14 μM de BAP; (C) 1,42 μM de BAP. CL corresponde a calo e HP a plantas hiperídricas.

3.2 Droplet-Vitrification

Os ápices submetidos à exposição de PVS2 por 60 minutos e subsequente imersão em nitrogênio líquido por, no mínimo, uma hora tiveram maiores taxas de regeneração (66%), quando comparados com os tempos de 20, 40, 80, 100 e 120 minutos que tiveram taxas de regeneração de 18%, 39%, 6%, 16% e 5% respectivamente (Figura 2).

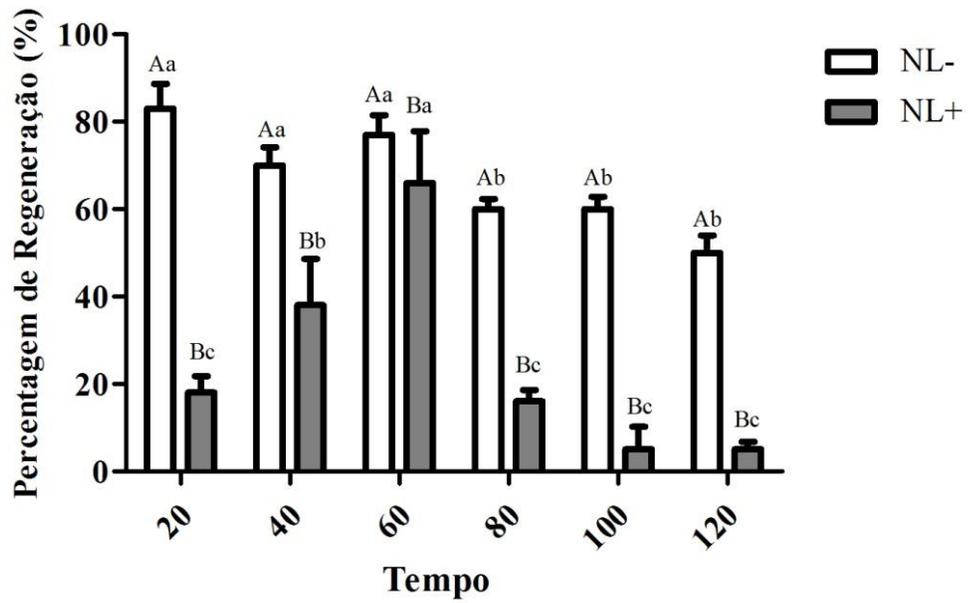


Figura 2 Percentagem de regeneração de ápices caulinares de *E. grandis* X *E. urophylla*, expostos em PVS2 em diferentes tempos sem imersão em nitrogênio líquido (NL-) e expostos em PVS2 em diferentes tempos e imersos em nitrogênio Líquido (NL+).

Podem ser observadas (Figura 3) as diferenças visuais dos tratamentos expostos ao PVS2 por diferentes tempos 20, 40, 60, 80 e 120 minutos, antes e depois da imersão em nitrogênio líquido (NL).

Verifica-se a taxa de regeneração e vigor das plantas quando, expostos aos tempos de 20, 40, 60 80 e 100 minutos de PVS2 (sem imersão em NL) (Figura 3A; C; E; G). Os ápices expostos ao tempo de 120 minutos de PVS2 apresentaram-se menos desenvolvidos (Figura 3L).

Os ápices expostos por 60 minutos em PVS2, seguidos de imersão em nitrogênio líquido apresentam-se mais desenvolvidos e vigorosos, após 30 dias em meio de regeneração (Figura 3F), quando comparados com os demais tratamentos (Figura 3B; D; H; J; M).

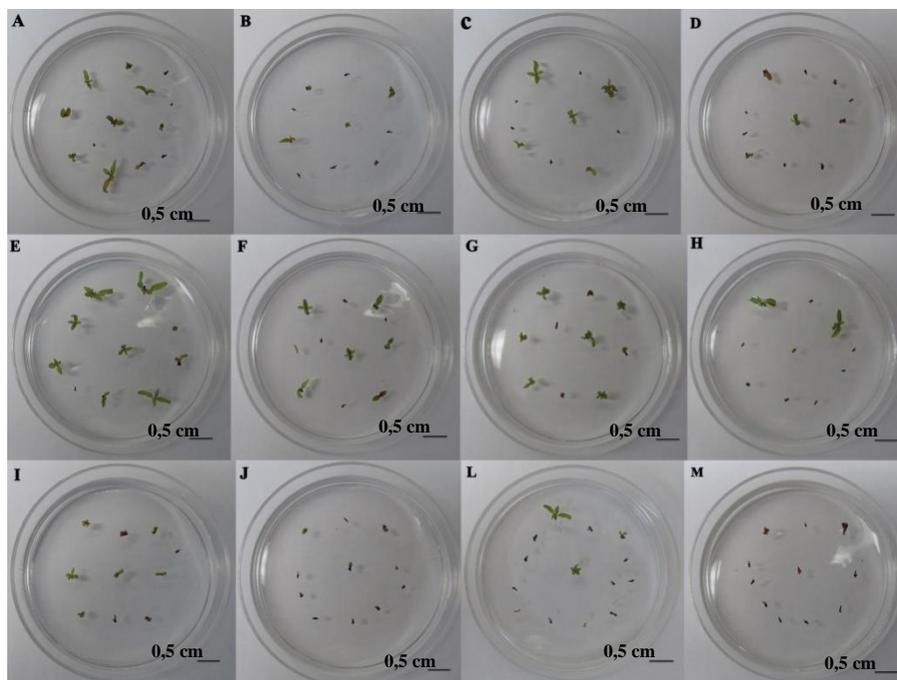


Figura 3 Aspectos visuais dos ápices exposto ao PVS2 por diferentes tempos (controle) e expostos ao PVS2, e posterior imersão em nitrogênio líquido (1 hora). (A) PVS2 por 20 min.; (B) PVS2 por 20 min. + NL (C) PVS2 por 40 min.; (D) PVS2 por 40 min. + NL; (E) PVS2 por 60 min.; (F) PVS2 por 60 min. + NL; (G) PVS2 por 80 min.; (H) PVS2 por 80 min. + NL; (I) PVS2 por 100 min.; (J) PVS2 por 100 min. + NL; (K) PVS2 por 120 min.; (L) PVS2 por 120 min. + NL; (M) PVS2 por 120 min. + NL.

min. + NL; (I) PVS2 por 100 min; (J) PVS2 por 100 min. + NL; (L) PVS2 por 120 min; (M) PVS2 por 120 min. + NL.

Os ápices expostos ao PVS2 por 60 minutos (sem imersão em NL) e os ápices expostos ao PVS2 por 60 minutos e subsequente imersos em NL, não diferiram significativamente do tratamento controle, com percentagens de brotações iguais a 6,0% e 5,7% respectivamente (Tabela 2).

Tabela 2 Número de brotações de *E.grandis* X *E. urophylla* em diferentes tratamentos do protocolo de criopreservação, após 60 dias.

Tratamentos	Número de brotações
Controle Total	6,7 a
Pré-cultivo sacarose	3,0 ab
PVS2 20 minutos	1,1 cde
PVS2 20 minutos +NL	1,4 cd
PVS2 40 minutos	1,8 bc
PVS2 40 minutos +NL	1,1cde
PVS2 60 minutos	6,0 a
PVS2 60 minutos +NL	5,7 a
PVS2 80 minutos	0,6 de
PVS2 80 minutos +NL	0,9 cde
PVS2 100 minutos	1,1 cde
PVS2 100 minutos +NL	0,3 e
PVS2 120 minutos	0,7 de
PVS2 120 minutos +NL	0,1 e

Médias seguidas de letra diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Pode ser observado na figura 4 o aspecto visual das plantas que foram expostas ao PVS2 por 60 minutos (sem imersão em NL) e expostas ao PVS2 por 60 minutos e imersas em NL, após 60 dias de cultivo. Visualmente as plantas apresentavam-se desenvolvidas e vigorosas.

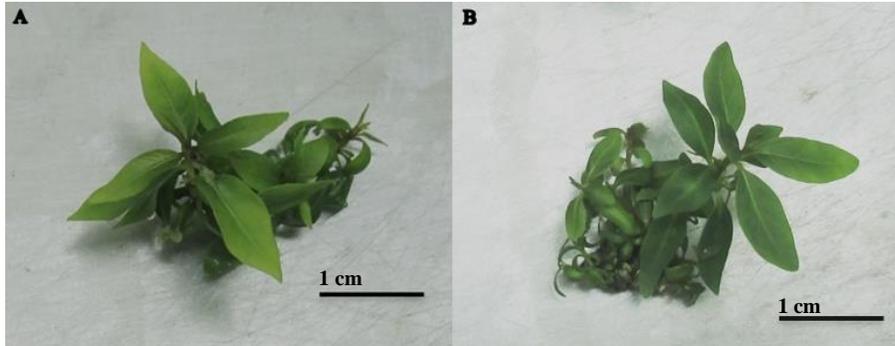


Figura 4 Aspecto visual das plantas criopreservadas após 60 dias. (A) Plantas expostas a 60 minutos de PVS2; (B) Plantas expostas a 60 minutos de PVS2 seguidas de imersão NL por, no mínimo, uma hora.

3.3 Análises histocitológicas qualitativas

Observou-se na zona meristemática dos ápices controles, células pequenas com formato isodiamétrico, núcleos circulares e nucléolos visíveis. O meristema apresentou algumas células vacuolizadas e plasmolisadas, devido ao estresse após a excisão (Figura 5).

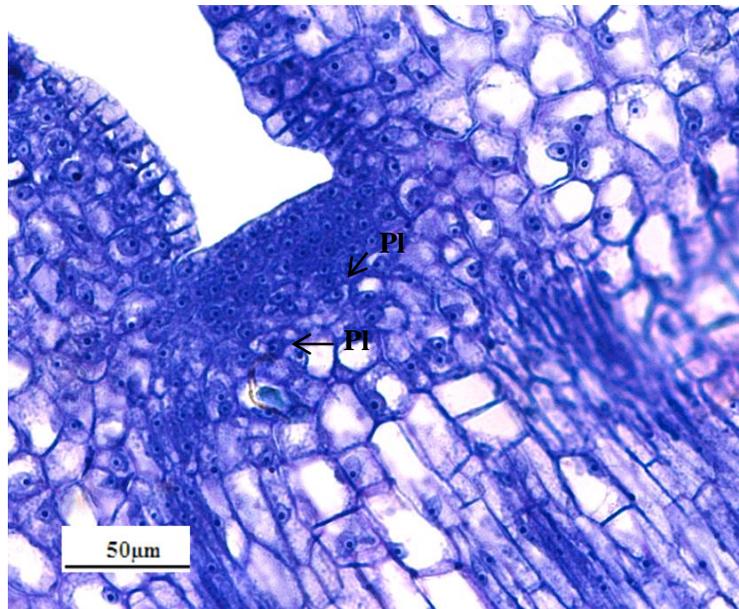


Figura 5 Histologia de ápices excisados (controle total) de *E. grandis* X *urophyla*, que não passaram por nenhum tratamento. Observa-se plasmólise (PI) na região meristemática.

Os ápices que foram pré-cultivados em sacarose a 0,2 M por 24 horas e a 0,5 M de sacarose por mais 24 horas, apresentaram plasmólise na zona meristemática e algumas células vacuolizadas. Pode-se observar acúmulo de amido em células adjacentes ao procâmbio (Figura 6).

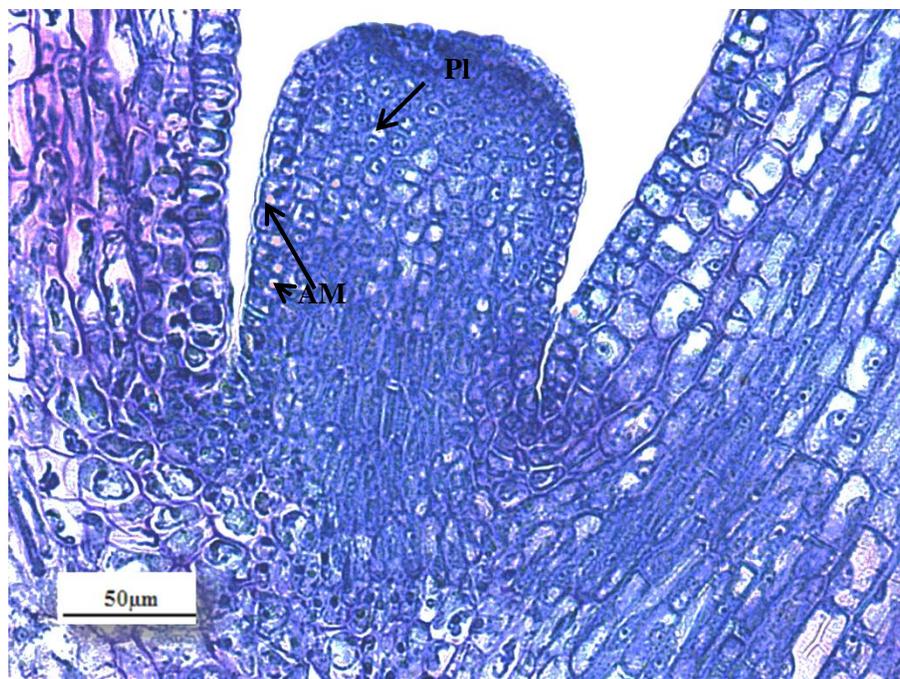


Figura 6 Histologia de ápices de *E. grandis* X *E. urophylla* depois da pré-cultura de sacarose a 0,2 M por 24 horas e 0,5 M por 24 horas. Observa-se plasmólise (PI) na região meristemática, e acúmulo de amido (Am) em células adjacentes do procâmbio.

Observara-se nos ápices que foram expostos ao PVS2 por 60 minutos (sem imersão em NL), células com núcleos circulares e com nucléolos claramente visíveis. Algumas células da zona meristemática foram plasmolisadas e com alta vacuolização (Figura 7A).

Os ápices expostos ao PVS2 por 80 minutos (sem imersão em NL) apresentaram na zona meristemática, núcleos pinóticos indicando possível necrose do tecido e os nucléolos deixaram de ser visíveis (Figura 7B). Os ápices expostos ao PVS2 por 120 minutos (sem imersão em NL) apresentaram a mesma característica celular que os ápices expostos em PVS2 por 80 minutos, porém algumas células na zona meristemática foram rompidas (extravasamento do conteúdo citoplasmático) (Figura 7C).

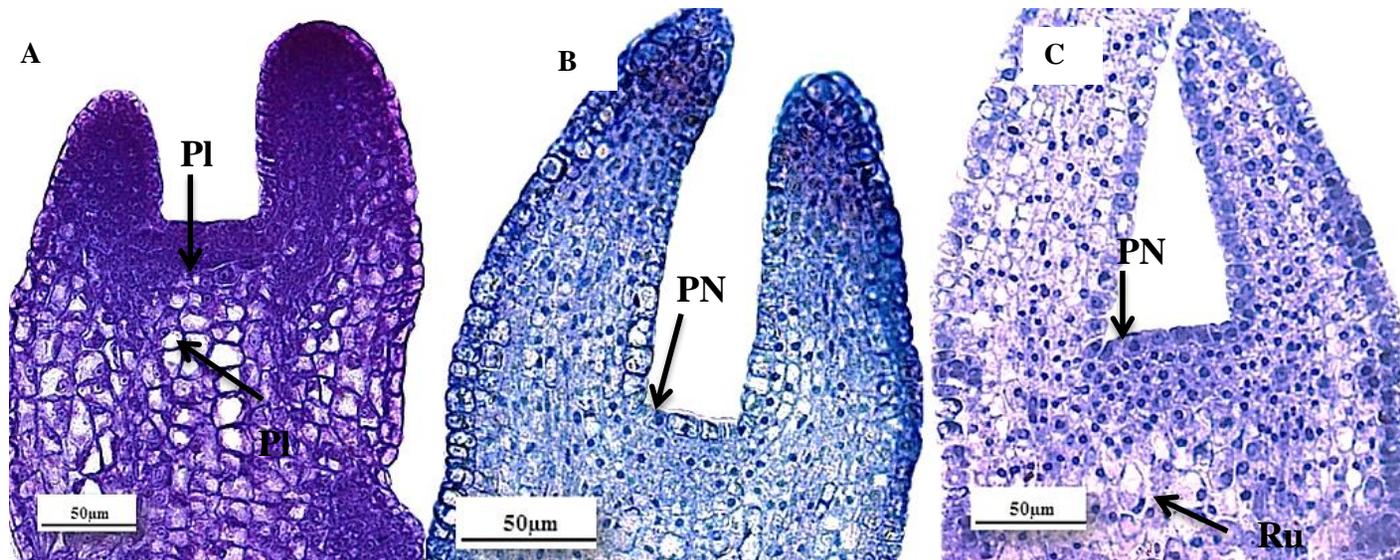


Figura 7 Histologia de ápices de *E. grandis X urophylla* depois da exposição ao PVS2 por diferentes tempos. (A) 60 minutos de exposição ao PVS2, observa-se plasmólise (Pl) na região meristemática; (B) 80 minutos de exposição ao PVS2, observa-se núcleos pinóticos (PN); (C) 120 minutos de exposição ao PVS2, observa-se núcleos pinóticos (PN) e ruptura da membrana plasmática (Ru).

Os ápices que foram expostos ao PVS2 por 60 minutos imersos em nitrogênio líquido, apresentaram células com núcleos e nucléolos visíveis porém, próximo aos primórdios foliares e zona meristemática observou-se danos à parede celular (Figura 8A).

Na zona meristemática dos ápices expostos ao PVS2 por 80 minutos imersos em nitrogênio líquido, núcleos pinóticos, danos na parede celular e em algumas regiões dos primórdios foliares, ocorrendo morte celular. Houve em algumas células desprendimento da membrana citoplasmática e estas demonstraram-se altamente plasmolisadas (Figura 8B).

Os ápices que foram expostos ao PVS2 por 120 minutos imersos em nitrogênio líquido apresentaram algumas células com núcleos e nucléolos visíveis. Em algumas regiões foram visíveis na zona meristemática núcleos pinóticos e células plasmolisadas (Figura 8C).

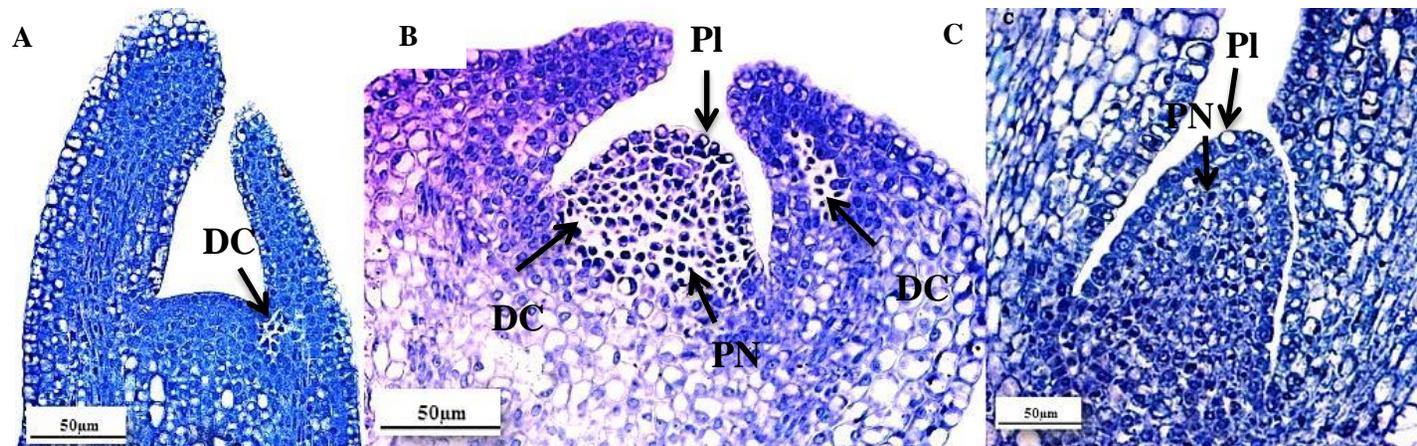


Figura 8 Histologia de ápices de *E. grandis* X *urophylla* depois da exposição ao PVS2 e imersão em NL por diferentes tempos. (A) 60 minutos de exposição ao PVS2 + NL; (B) 80 minutos de exposição ao PVS2 + NL; (C) 120 minutos de exposição ao PVS2 + NL. PI = Plasmólise; DC= Dano celular; PN= núcleos pinóticos.

Observou-se nos ápices excisados (controle total) recuperados após uma semana em meio de regeneração, núcleos e nucléolos visíveis, com todas as células intactas, incluindo os da zona meristemática e da parte basal (Figura 9A).

Os ápices submetidos ao pré-cultivo com sacarose 0,2 M por 24 horas e 0,5 M por mais 24 horas após uma semana de recuperação apresentaram núcleos e nucléolos visíveis e algumas células vacuolizadas (Figura 9B).

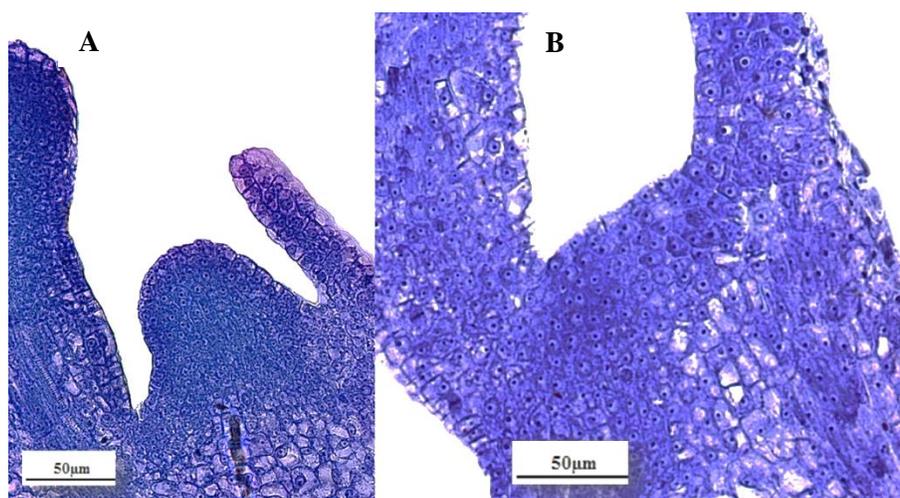


Figura 9 Histologia de ápices excisados de *E. grandis* X *urophyla* (A) Ápices submetidos à pré-cultura de sacarose a 0,2M por 24 horas e a 0,5M por mais 24 horas (B) Ápices submetidos à pré-cultura de sacarose a 0,2M por 24 horas e a 0,5M por mais 24 horas e após uma semana de recuperação.

Para os ápices submetidos à exposição ao PVS2 por 60 minutos, após uma semana de recuperação pode se observar células na zona meristemática em ativa divisão celular com núcleos e nucléolos bem visíveis (Figura 10A e B). Já para os ápices submetidos à exposição de PVS2 por 120 minutos apresentaram células com núcleos pinóticos sem nucléolos visíveis e com células plasmolisadas (Figura 10 C).

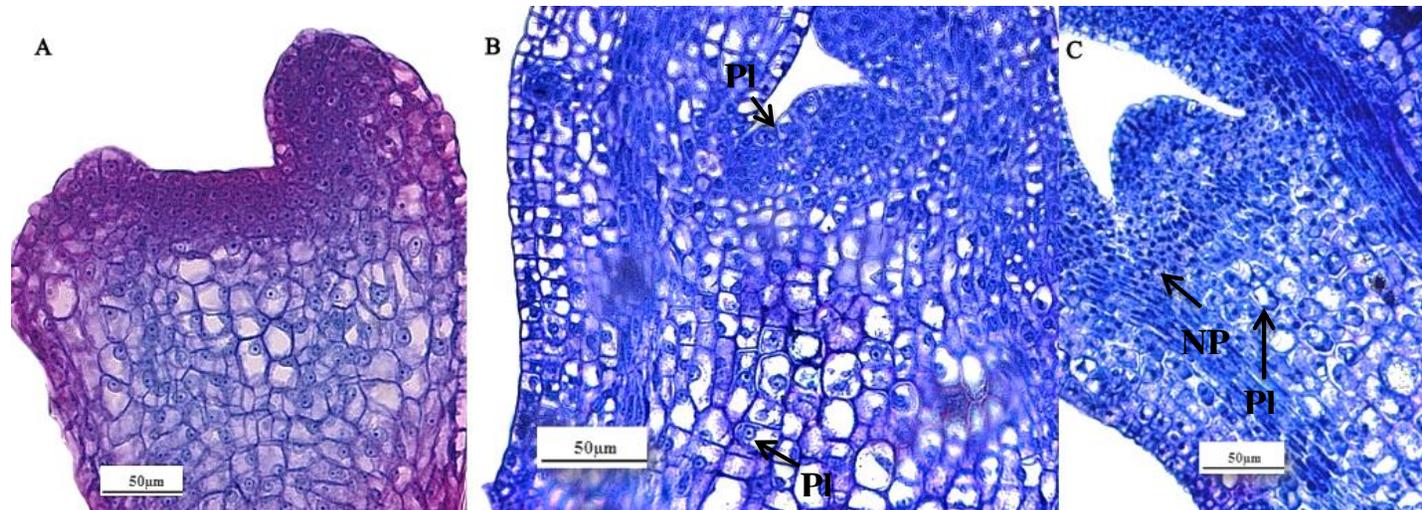


Figura 10 Histologia de ápices de *E. grandis* X *urophylla* depois da exposição ao PVS2, após recuperação uma semana. (A) 60 minutos de exposição ao PVS2 uma semana de recuperação; (B) 80 minutos de exposição ao PVS2 uma semana de recuperação; (C) 120 minutos de exposição ao PVS2 uma semana de recuperação. Pl = Plasmólise; PN= núcleos pinóticos.

Ápices expostos ao PVS2 por 60 minutos e imersos em nitrogênio líquido recuperado após uma semana, mostraram sinais claros de regeneração, apresentando na zona meristemática divisão celular ativa, com algumas células plasmolisadas núcleos e nucléolos visíveis (Figura 11A). Já para os ápices expostos ao PVS2 por 80 e 120 minutos e imersos em nitrogênio líquido, após uma semana de regeneração apresentaram núcleos pinóticos. No tratamento de 120 minutos observou-se células altamente plasmolisadas (Figura 11B e C).

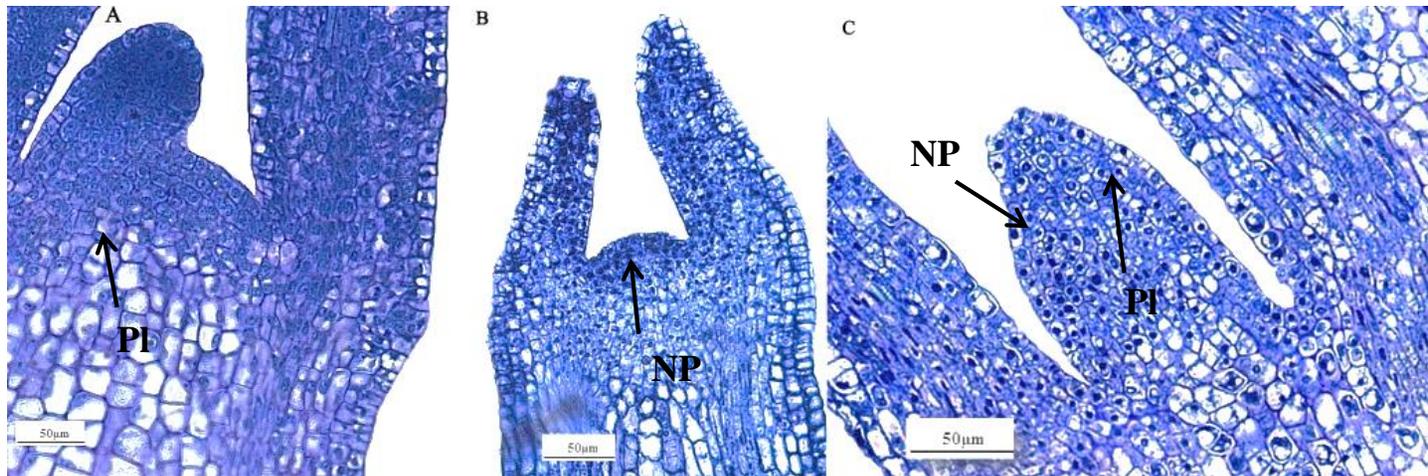


Figura 11 Histologia de ápices de *E.grandis X urophylla* depois da exposição ao PVS2 e imersão em NL, após recuperação uma semana. (A) 60 minutos de exposição ao PVS2 + NL uma semana de recuperação; (B) 80 minutos de exposição ao PVS2 + NL uma semana de recuperação; (C) 120 minutos de exposição ao PVS2 + NL uma semana de recuperação. PI = Plasmólise; PN= núcleos pinóticos.

3.4 Análises quantitativas

Os ápices que foram submetidos ao tratamento de PVS2 no tempo de 120 minutos tiveram percentagens significativas de plasmólise nas camadas analisadas, L1, L1-L3, L7-L9 (6%, 7,9% e 10,3 % respectivamente), quando comparado aos tempos de 60 e 80 minutos. Para o tratamento de 60 minutos as células não apresentaram plasmólise nas camadas L1-L3 e L7-L9 (Tabela 3).

Tabela 3 Avaliação de plasmólise (Percentagem total da área das células) em diferentes camadas de células na zona meristemática dos ápices de *E.grandis* X *urophylla*, quando expostos ao PVS2 em três tempos (60, 80 e 120 minutos).

PVS2	Plasmólise (%)		
	L1	L1-L3	L7-L9
60 Minutos	2,7 b	0 b	0 b
80 Minutos	1,5 b	7,9 a	8,5 a
120 Minutos	6,0 a	2,5 b	10,33 a

Médias seguidas de letra não diferem entre si nas linhas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Os ápices submetidos ao PVS2 nos tempos de 60, 80 e 120 minutos após uma semana não apresentaram plasmólise na camada L1 e apresentaram baixas percentagens de plasmólise nas camadas L1-L3 de 0,9%, 1,2% e 2,2% respectivamente. Enquanto as camadas L7-L9 apresentaram maiores taxa de plasmólise (17,6%) no tempo de 80 minutos. O tratamento de 60 minutos foi o que apresentou a menor percentagem de plasmólise para as três camadas analisadas (Tabela 4).

Tabela 4 Avaliação de plasmólise (Porcentagem total da área das células) em diferentes camadas de células na zona meristemática dos ápices de *E.grandis* X *urophylla*, quando expostos ao PVS2 em três tempos (60, 80 e 120 minutos), após uma semana.

PVS2 1 Semana	Plasmólise (%)		
	L1	L1-L3	L7-L9
60 Minutos	0,0 a	0,9 b	0,8 b
80 Minutos	0,0 a	1,2 a	17,6 a
120 Minutos	0,0 a	2,2 a	0,0 b

Médias seguidas de letra não diferem entre si nas linhas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Os ápices expostos ao PVS2 por 60 minutos imersos em nitrogênio líquido apresentaram as menores taxas de plasmólise em todas as camadas analisadas (2,2%, 3,13% e 2,1 % respectivamente), quando comparado com os demais tratamentos. Os ápices expostos ao PVS2 por 120 minutos imersão em nitrogênio líquido apresentaram maiores percentagens de plasmólise em ambas as camadas (14,7%, 18,1% e 18% respectivamente) (Tabela 5).

Tabela 5 Avaliação de plasmólise (Porcentagem total da área das células) em diferentes camadas de células na zona meristemática dos ápices de *E.grandis* X *urophylla*, quando expostos ao PVS2 em três tempos (60, 80 e 120 minutos) e imersos em nitrogênio líquido (NL⁺).

NL ⁺	Plasmólise (%)		
	L1	L1-L3	L7-L9
60 Minutos	2,2 c	3,13 b	2,1 c
80 Minutos	7,9 b	7,9 b	12,6 a
120 Minutos	14,7 a	18,1 a	18,0 a

Médias seguidas de letra não diferem entre si nas linhas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Os ápices expostos em PVS2 por 60 minutos e imersos em nitrogênio líquido, após uma semana de recuperação não apresentaram células plasmolisadas em nenhuma das camadas analisadas, quando comparado com os demais tratamentos, sendo o tratamento de 120 minutos o que maior apresentou plasmólise em todas as camadas analisadas (20,3%, 12,83% e 9,8% respectivamente) (Tabela 6).

Tabela 6 Avaliação de plasmólise (Porcentagem total da área das células) em diferentes camadas de células na zona meristemática dos ápices de *E.grandis X urophylla*, quando expostos ao PVS2 em três tempos (60, 80 e 120 minutos) e imersos em nitrogênio líquido (NL⁺), após uma semana de recuperação.

NL ⁺ 1 Semana	Plasmólise (%)		
	L1	L1-L3	L7-L9
60 Minutos	0,0 c	0 b	0 b
80 Minutos	5,17 b	5,17 ab	5,6 a
120 Minutos	20,3 a	12,8 a	9,8 a

Médias seguidas de letra não diferem entre si nas linhas pelo teste de Tukey (p<0,05).

3.5 Microscopia eletrônica de varredura

Análises ultraestruturais em ápices caulinares excisados, que não foram submetidos à criopreservação, demonstraram células túrgidas (Figura12 A). Os ápices excisados, após uma semana de recuperação em meio de regeneração, apresentaram-se intactos com presença de células túrgidas sem nenhum tipo de fissura em sua estrutura (Figura 12B). Já os ápices caulinares expostos ao PVS2 por 60 minutos imersos em nitrogênio líquido, mostraram uma menor turgidez celular do que os ápices controle, apresentando pequenas fissuras em sua estrutura (Figura 12C). Para os ápices expostos ao PVS2 por 60 minutos, seguidos de imersão em nitrogênio líquido, após uma semana de recuperação, observaram-se

algumas células com menor turgidez em sua estrutura (Figura 12 D). Porém uma maior quantidade de células intactas e túrgidas indicam recuperação de tecidos e a possibilidade de regeneração. Já os ápices expostos ao PVS2 por 80 e 120 minutos seguidos de imersão em nitrogênio líquido e após uma semana de recuperação em meio de regeneração, apresentaram células murchas e danificadas em toda sua estrutura (Figura 12E; G; F; H).

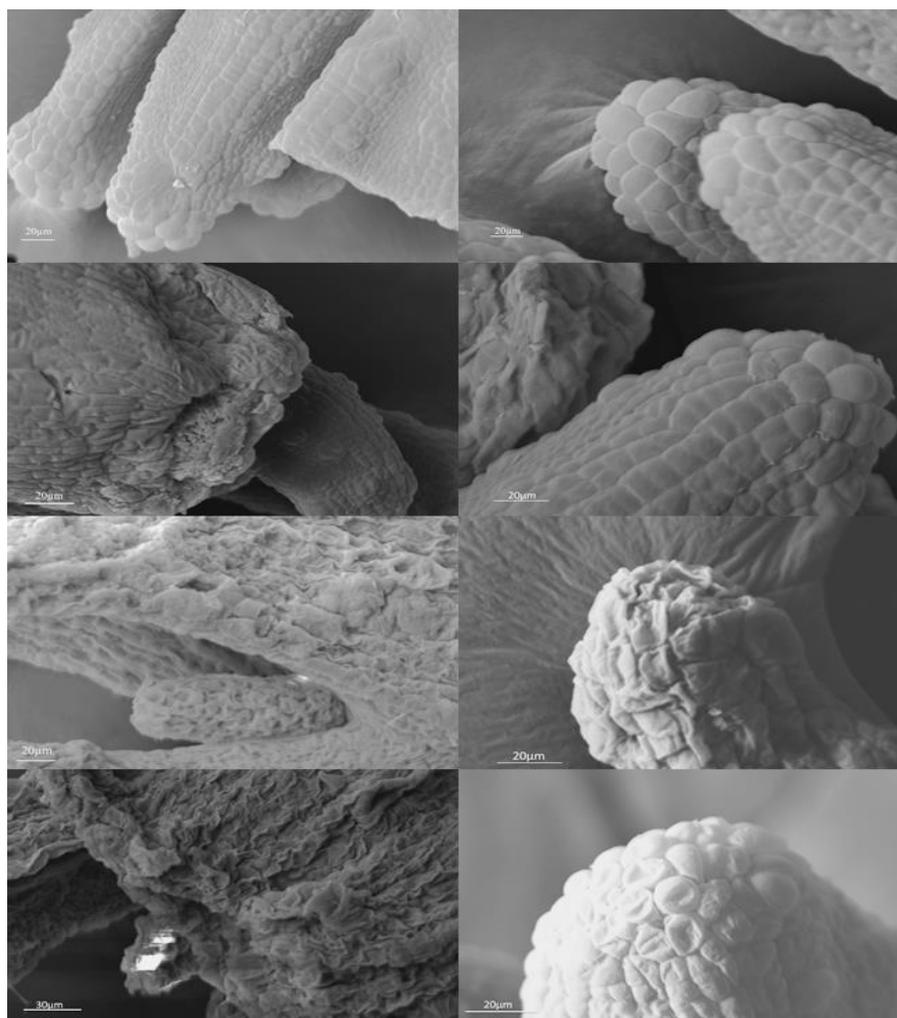


Figura 12 Microscopia eletrônica de varredura em ápices caulinares de *E. grandis* X *E. urophylla*. (A) ápice excisado (B) ápice excisado após uma semana

de recuperação (C) ápice exposto ao PVS2 por 60 minutos (D) ápice exposto ao PVS2 por 60 minutos e imerso em nitrogênio líquido, após uma semana de recuperação (E) ápice exposto ao PVS2 por 80 minutos e imersos em nitrogênio líquido (F) ápice exposto ao PVS2 por 80 minutos e imersos em nitrogênio líquido, após uma semana de recuperação (G) ápice exposto ao PVS2 por 120 minutos e imersos em nitrogênio líquido (H) ápice exposto ao PVS2 por 120 minutos e imersos em nitrogênio líquido, após uma semana de regeneração.

4 DISCUSSÃO

Estudos de micropropagação para o eucalipto, incluindo o crescimento dos meristemas apicais e a proliferação de gemas axilares, têm centrado em conseguir o equilíbrio correto dos reguladores de crescimento, mais precisamente de auxinas e citocinicas (ASSIS; FETT-NETO; ALFENAS, 2004; WATT et al., 2003). Diante desse pressuposto, o presente estudo avaliou o efeito da combinação de citocinina (BAP) com auxina (AIA) na regeneração dos ápices caulinares do híbrido *E. grandis* X *E. urophylla*, verificando que a adição destes reguladores de crescimento nas concentrações de 5,70 μM AIA e 0,14 μM BAP promoveu baixas taxas de regeneração, e alta formação de calos na base do explante.

A utilização de altas concentrações de auxinas podem inibir a regeneração dos explantes e favorecer o enraizamento ou a formação de calo (GRATTAPAGLIA et al., 1998; SOUZA; JUNGHANS, 2006). A formação de calos pode ser prejudicial ao cultivo *in vitro*, quando o objetivo é a propagação direta. Segundo Oliveira et al. (2011) a formação de calos na base do explante pode comprometer a proliferação de gemas axilares e o alongamento de brotações, afetando o desenvolvimento *in vitro*.

Compartimento similar ao presente trabalho foi verificado por Brondani et al. (2009), em que o emprego de 1,0 mg.L^{-1} (5,37 μM) de AIA resultou na indução de calos na base do explante, convertendo-se em efeitos negativos na

regeneração do explante, e posterior alongamento das brotações do híbrido *Eucalyptus benthamii* X *Eucalyptus dunnii*. A formação de calos é muito comum em espécies lenhosas no cultivo *in vitro*, quantidades excessivas de sacarose e auxina estão entre os principais fatores que influenciam a calogênese (GRATTAPAGLIA et al., 1998).

O uso de concentrações moderadas de citocinina, principalmente a base de adenina como BAP, pode promover o aumento da taxa de regeneração de ápices caulinares, e o aumento de formação de brotos para muitas espécies cultivadas *in vitro* (GÜBBÜK, 2004). Entre as citocininas utilizadas na cultura de tecidos de *Eucalyptus*, BAP tem sido muito eficiente em promover a regeneração de ápices caulinares, multiplicação e indução de gemas axilares *in vitro* (NAVROSK et al., 2014).

No presente estudo ao utilizar-se de concentrações de 0,14 μ M e 1,42 μ M de BAP no meio de cultura para obtenção da regenerações dos ápices *E. grandis* X *E. urophylla*, verificou-se que não houve diferença significativa para taxa de regeneração de plantas. No entanto a adição 1,42 μ M de BAP promoveu a formação de plantas hiperídricas.

Graça et al. (2001), ao compararem o efeito de BAP e Thidiazuron (TDZ) na multiplicação *in vitro* de brotações de *Eucalyptus dunnii*, relatam que a adição de 1,0 μ M de BAP no meio de cultura foi ideal, para promover taxas de brotações de 2,5%, sem a obtenção de plantas hiperídricas,

Sintomas de hiperidricidade em brotos de *Eucalyptus dunnii* e do híbrido *Eucalyptus dunnii* X *Eucalyptus benthamii*, foram igualmente observados por Brondani et al. (2009) e Navrosk et al. (2014), quando utilizaram de concentrações maiores de BAP, a partir de 0,5 mg. L⁻¹ (2,22 μ M), proporcionando 15% das plantas com sintomas de hiperidricidade. A hiperidricidade verificada pode estar relacionada à utilização de maiores concentrações de citocinina, podendo

promover a perda de capacidade regenerativa do tecido (JOYCE et al., 2003; PICCOLI et al., 2001).

Além da obtenção de um meio de cultura que auxilie em uma maior taxa de regeneração dos ápices caulinares, o sucesso do estabelecimento da técnica de criopreservação depende da tolerância do explante à desidratação, ao congelamento e da prevenção a lesões por toxicidade, durante a exposição à solução de PVS2, sendo cruciais para a obtenção de maiores percentuais de plantas regeneradas (TOSHIKAZU; AKIRA, 2003).

Para algumas espécies de eucaliptos, o processo de desidratação tem sido um desafio para o estabelecimento da técnica de criopreservação de forma bem sucedida, devido à falta de tolerância dos ápices caulinares ao processo (PADAYACHEE et al., 2009). O uso de sacarose no pré-cultivo pode aumentar a tolerância do explante à desidratação, através da produção endógena de vários compostos com propriedades crioprotetoras (frutose e sacarose, prolinas e betainas) (PADAYACHEE et al., 2009). Diante deste contexto, o presente trabalho determinou a exposição dos ápices caulinares do híbrido *E. grandis* X *E. urophylla*, em pré-cultivo por 24 horas em meio MS com 0,2M de sacarose, seguido de mais 24 horas em 0,5M de sacarose, verificando que estas concentrações proporcionaram taxas de sobrevivência de 100% dos explantes.

Resultados similares ao presente estudo foram obtidos por Kaya et al. (2013) ao testarem a técnica de *droplet- Vitrification*, utilizando concentrações de 0,25 M e 0,625 M de sacarose para dois clones (452 e 455) do híbrido *E. grandis* X *E. urophylla*, verificando taxas de sobrevivências de 96% e 93% respectivamente.

Padayachee et al. (2008) ao testarem diferentes concentrações de sacarose (0,4; 0,7 e 1 M) no pré-cultivo de gemas axilares de *Eucalyptus grandis*, com intuito de minimizar a perda excessiva de água por desidratação física, através de sílica gel, verificaram que o pré-cultivo a 0,4 M de sacarose foi o ideal para

promover taxas de sobrevivências dos explantes entorno de 78%, antes da desidratação física.

Visto que as concentrações de 0,2 M e 0,5M de sacarose promoveram 100% de regeneração dos ápices, estes foram expostos ao PVS2 por diferentes tempos (20, 40, 60, 80, 100 e 120 minutos). A exposição dos explantes na solução crioprotetora (PVS2) por 60 minutos e, após a imersão em nitrogênio líquido promoveu maiores taxas de sobrevivência dos explantes igual a 78% e 66%, respectivamente. Este resultado indica que à desidratação e osmoproteção foi ideal para promover viabilidade celular, após a imersão em nitrogênio líquido, e que este provavelmente, tenha prevenido danos irreversíveis às membranas, devido a possíveis efeitos de cristalização, que podem ocorrer durante o processo (SURANTHAN et al., 2012).

Para ápices caulinares de dois clones (452 e 455) do híbrido *E. grandis* X *E. urophylla* a exposição de 60 minutos de PVS2 e imersão em nitrogênio líquido, também proporcionou maiores taxas de sobrevivência entorno de 46% e 58% respectivamente (KAYA et al., 2013).

A maior taxa de sobrevivência verificada no presente estudo pode estar associada à utilização de menores concentrações de sacarose no pré-cultivo, antes da exposição ao PVS2 e subsequente imersão em nitrogênio líquido. O uso de sacarose no pré-cultivo é importante para, promover a redução do conteúdo de água dos explantes por desidratação, quanto à redução do ponto de congelamento da água presentes nos tecidos, promovendo a proteção das membranas celulares durante o resfriamento (BURRIT et al., 2008; PADAYACHEE et al., 2009; PANIS et al., 1996).

Embora Pârques et al.(2002) terem estabelecido a técnica de *encapsulation dehydration* para um clone de *Eucalyptus gunnii*, utilizando 1M de sacarose no pré-cultivo, e este ter proporcionado uma taxa de sobrevivência de 49%. O uso de concentrações mais elevadas de sacarose pode ser prejudicial para

algumas espécies e genótipos de plantas, pois o açúcar pode cristalizar ou precipitar durante o processo de desidratação, podendo ser prejudicial ao explante nas etapas de refrigeração e aquecimento, não proporcionando a estabilidade da membrana plasmática (KAYA et al., 2013; PÂRQUES et al., 2002). Além de que determinadas concentrações de sacarose podem promover o aumento da osmolaridade, resultando no choque osmótico e, conseqüentemente os ápices podem não retomarem seu crescimento. Existem relatos que altas concentrações de sacarose na pré-cultura promoveram a morte dos ápices caulinares de *Vitis* e *P. trifoliata*, após a imersão em nitrogênio líquido (PLESSIS et al., 1991; POISSENIER et al., 1992).

Kaya et al. (2013) relatam que testaram concentrações mais elevadas de sacarose no pré-cultivo entre 1M e 1,2M para os ápices caulinares do híbrido *E. grandis* X *E. urophylla*, e que estes demonstraram-se sensíveis a tais concentrações de sacarose não promovendo taxas de regeneração.

Importante ressaltar que a taxa de sobrevivência pode estar relacionada às diferenças significativas dos genótipos. Estudos de criopreservação para treze clones de eucaliptos foram realizados, ambos obtiveram maiores taxas de sobrevivência, quando os ápices foram expostos ao PVS2 por 60 minutos, porém a taxa de sobrevivência variou de 84% a 34 % entre os diferentes genótipos de eucaliptos estudados (KAYA et al., 2013).

Quando os ápices foram expostos em tempos maiores de 80, 100 e 120 minutos de PVS2 e imersos em nitrogênio líquido, apresentaram uma redução significativa na taxa de sobrevivência. Resultados semelhantes foram verificados por Shatnawi (2011), quando ápices caulinares de *Capparis spinosa* foram expostos em PVS2 por longos períodos, tais como 80, 100 e 120 minutos e imersos em nitrogênio líquido, observando-se um decréscimo significativo das taxas de regeneração de 70% em relação ao tratamento controle. A exposição em solução crioprotetora pode ter promovido o estresse osmótico, aumentando a

viscosidade celular, ocasionando danos por toxicidade química ou estresse osmótico severo (JUNG-YOON et al., 2012; REED, 2008; SAKAI; HIRAI; NIINO, 2008).

O período de duração, no qual os explantes são tratados com as soluções crioprotetoras (PVS2), é de extrema importância, uma vez que determina a extensão da desidratação celular e a quantidade de componentes que irão penetrar na célula (CHEN et al., 2011). O tempo de tratamento com PVS2 varia consideravelmente entre as espécies, mas normalmente, longos períodos de exposição acabam sendo letais para as células.

O diferencial do presente trabalho foi à verificação do número de brotação das plantas após 60 dias em meio de regeneração. O tempo de 60 minutos de exposição em PVS2 e subsequente imersão em nitrogênio líquido proporcionou maiores taxas de brotações, verificando que o processo de regeneração foi eficiente. O processo de regeneração ideal, após a criopreservação é aquele que propicia a recuperação de maior quantidade de células vivas, e que induz à formação de uma nova planta (LOPES, 2005).

Análises qualitativas e quantitativas histológicas, e análises ultraestruturais revelaram as alterações ocorridas durante o processo de criopreservação.

As observações histológicas de ápices caulinares de *E. grandis* X *E. urophylla*, pré-cultivados em meio de cultura com sacarose a 0,2 M por 24 horas seguidos em meio de cultura com sacarose 0,5 M por mais 24 horas, permitiram a verificação do acúmulo de amido em algumas células da região meristemática. Observações semelhantes foram verificadas em ápices caulinares de inhame, café, cana-de-açúcar (BARRACO et al., 2013; GRAPIN et al., 2006, 2011; MARI et al., 1995).

Utilizando microscopia de luz, Barraco et al. (2013) observaram em ápices caulinares de inhame, após o pré-cultivo a 0,3M de sacarose por 24 horas,

o acúmulo de amido em algumas células do córtex meristemático e de primórdios foliares, bem como em células localizadas próximo ao procâmbio. Este acúmulo de amido verificado pode ser explicado devido à absorção de sacarose pelas células e a sua metabolização parcial sob a forma de amido (armazenamento de glicose) (BACHIRI et al., 2000).

Uma hipótese tem sido proposta para possíveis mecanismos de acumulação intracelular de sacarose. Sagishima et al. (1989) sugerem que a sacarose presente no meio de cultura é hidrolisada em glicose e frutose, por uma invertase ligada à paredes celulares antes de ser absorvida pelas células. Os açúcares absorvidos pelas células aumentam a estabilidade das membranas, substituindo as moléculas de água normalmente associado à superfície da membrana, mantendo a integridade da bicamada lipídica, durante a desidratação e congelamento (CROWE et al., 1987).

Os ápices submetidos à exposição ao crioprotetor por diferentes tempos 60, 80 e 120 minutos (sem imersão em NL), e imersos em nitrogênio líquido e após uma semana em meio de regeneração, apresentaram diferenças histológicas.

O tempo de 60 minutos de exposição ao PVS2 (sem imersão em NL) e imersos em nitrogênio líquido mantiveram a sua integridade celular, sem danos severos, e apresentaram-se com baixas taxas de plasmólise nas três camadas da zona meristemática analisada. Entretanto, após uma semana em meio de regeneração, as células apresentaram ausência de plasmólise nas células analisadas, o que pode ser explicado devido ao equilíbrio progressivo entre os compartimentos extracelulares e intracelulares (BARRACO et al., 2013). Os ápices expostos aos tempos de exposição ao crioprotetor (PVS2) de 80 e 120 minutos (sem imersão em NL), e imersos em nitrogênio líquido, e após uma semana de recuperação não apresentaram ausência de células plasmolisadas, o que provavelmente tenha interferido na retomada da regeneração dos ápices caulinares. A tolerância à desidratação pode estar relacionada com capacidade de

retomada ao estado normal, devido à ausência de células plasmolisadas. (BACHIRI et al., 2000; VOLK; CASPERSEN, 2007).

As características histológicas foram semelhantes para os tempos de 80 e 120 minutos (sem imersão em NL), e imersão em nitrogênio líquido, e após uma semana em meio de regeneração, estes apresentaram núcleos pinóticos e altas taxas de plasmólise.

Núcleos pinóticos podem aparecer devido à condensação da cromatina, sendo comum essa reação em células sob condições de estresse. No entanto a cromatina é bloqueada em uma configuração inacessível, impedindo a transcrição da região genômica, não promovendo o crescimento celular (BERJAK et al., 2000; EBERHARTER; BECKER, 2002). Porém durante condições de estresse, a paralisação do crescimento celular pode ser vantajosa para os tecidos, permitindo que as plantas possam superar o estresse temporário (JARILLO et al., 2009).

O aparecimento de núcleos pinóticos durante o processo de criopreservação para espécies de inhame e orquídeas tem sido relatado (BARRACO et al., 2013; RAHMAH et al., 2015). Estes estudos demonstram após o tratamento de osmoproteção e imersões em nitrogênio líquido o aparecimento de núcleos pinóticos. Após uma semana em meio de regeneração os núcleos pinóticos não foram observados, sugerindo que a picnose pode ser um fenômeno reversível em células vegetais (BARRACO et al., 2013; RAHMAH et al., 2015). No presente estudo não se visualizou o desaparecimento de núcleos pinóticos, quando os ápices foram submetidos a altos tempos de exposição ao crioprotetor e posterior imersão em nitrogênios líquidos, e submetidos ao meio de regeneração por uma semana.

Para os ápices submetidos ao tempo de 120 minutos de exposição ao PVS2, sem imersão em nitrogênio líquido, observou-se ruptura da membrana plasmática, promovendo o extravasamento do conteúdo citoplasmático em algumas células na região meristemática. A velocidade e extensão do vazamento

citoplasmático podem estar correlacionadas positivamente ao grau de sensibilidade à desidratação. A desidratação ocasiona alterações na integridade estrutural e funcional da membrana, bem como alterações nas suas propriedades físico-químicas, ocasionando mudanças no comportamento e na composição relativa da membrana, com perda parcial da sua semi-permeabilidade (CROWE et al., 1997).

Análises ultraestruturais da superfície das amostras através de microscopia eletrônica de varredura se correlacionam com os resultados obtidos na histologia, demonstrando danos severos nas células do ápice, quando expostos a altos tempos de exposição ao PVS2 e posterior imersão em nitrogênio líquido. Estes proporcionaram fissuras e uma menor turgidez, quando comparado com o controle total e ao tempo de exposição ao PVS2 por 60 minutos. Este resultado pode ser explicado pelo aumento do estresse hídrico, que promove a perda de turgidez e posterior contração das células. A contração celular pode ser irreversível, comprometendo a integridade da membrana (VERTUCCI; FARRANT, 1995).

A morte das células pode ser causada por muitos fatores ao invés de um único mecanismo (SAKAI; LARCHER, 2012). Entretanto, a injúria pode ser decorrente do congelamento, promovendo alterações na semi-permeabilidade ou lise da membrana plasmática, resultando de desidratação induzida pelo congelamento (SANTOS, 2000; STEPONKUS, 1984). Porém, a injúria observada nos tratamentos de maior tempo de exposição ao crioprotetor, e posterior imersão em nitrogênio líquido, pode estar relacionada à formação de cristais de gelo intracelular, ao fluxo de água para fora da célula (desidratação), e ao aumento da concentração intracelular de solutos (AGUIAR et al., 2012).

5 CONCLUSÕES

O meio de cultura MS suplementado com 0,14 μ M, proporcionou maiores taxas de regeneração dos ápices caulinares *E.grandis* X *E.urophylla*.

A exposição ao crioprotetor (PVS2) por 60 minutos permitiu as maiores taxas de sobrevivência dos ápices caulinares de *E.grandis* X *E.urophylla* após a aplicação da técnica de *Droplet-vitrification*.

As análises histocitológicas e ultraestrutural auxiliaram na determinação de alterações ocorridas nos diferentes passos da técnica de *Droplet-vitrification*, verificando que os ápices expostos ao tempo de 60 minutos de PVS2 e imersos em nitrogênio líquido não sofreram danos irreversíveis, sem presença de núcleos pinótico, e baixas percentagens de plasmólise.

REFERÊNCIAS

AGUIAR, T. D. A. F. et al. Basic principles of criomicrobiologia: focus in kind of microorganisms and principals cryoprotectants agents. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.6, p.80-93, 2012.

ALVES, E. **Curso introdutório à microscopia eletrônica de varredura e de transmissão**. FAEPE: Universidade Federal de Lavras, 2004, 43 p. Apostila.

ASSIS, T. F.; FETT-NETO, A.G.; ALFENAS, A. C. Current techniques and prospects for the clonal propagation of hardwoods with emphasis on *Eucalyptus*. **Plantation Forest Biotechnology for the 21st Century**, Kerala, p. 303-333, 2004.

BACHIRI, Y. et al. Effect of osmotic stress on tolerance of air-drying and cryopreservation of *Arabidopsis thaliana* suspension cells. **Protoplasma**, v. 214, n. 3-4, p. 227-243, 2000.

BARRACO, G. et al. Histocytological analysis of yam (*Dioscorea alata*) shoot tips cryopreserved by encapsulation–dehydration. **Protoplasma**, v. 251, n. 1, p. 177-189, 2013.

BENSON, E. E.; BREMNER, D. Oxidative stress in the frozen plant: a free radical point of view. **Life in the frozen State**, Boca Raton, p. 205-241, 2004.

BERJAK, P. et al. Cryopreservation of recalcitrant zygotic embryos. In: Engelmann, F.; Takagi, H. (ed.). **Cryopreservation of tropical plant germplasm: Current research progress and application**. Tsukuba: Japan International Research Center for Agricultural Sciences, Japan/International. Rome: International Plant Genetic Resources Institute, 2000. p. 140-155.

BHALERAO, R.; NILSSON, O.; SANDBERG, G. Out of the woods: forest biotechnology enters the genomic era. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 14, n. 2, p. 206-213, 2003.

BRONDANI, G. E. et al. Establishment, multiplication and elongation *in vitro* of *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cambage x *Eucalyptus dunnii* Maiden. **Revista Árvore**, v. 33, n. 1, p. 11-19, 2009.

CHEN, X. L. et al. Cryopreservation of in vitro-grown apical meristems of *Lilium* by droplet-vitrification. **South African Journal of Botany**, v. 77, n. 2, p. 397-403, 2011.

CROWE, J. H. et al. Stabilization of dry phospholipid bilayers and proteins by sugars. **Biochemical Journal**, v. 242, n. 1, p. 1, 1987.

CROWE J. H. et al. Stabilization of dry membranes by mixtures of hydroxyethyl starch and glucose: the role of vitrification. **Cryobiology**, v. 35, n.1, p. 20-30, 1997.

EBERHARTER, A.; BECKER, P.B. Histone acetylation: a switch between repressive and permissive chromatin. **EMBO reports**, v. 3, n. 3, p. 224-229, 2002.

ELDRIDGE, K. G. et al. ***Eucalyptus* domestication and breeding**. Clarendon Press, 1993, 288 p.

ENGELMANN, F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. **In vitro & Developmental Biology**, San Diego, v. 47, n. 4, p. 5-16, 2011.

GRAÇA, M. E. C. et al. Efeitos das citocininas benzilamino purina e thidiazuron, na multiplicação “*in vitro*” de brotações de *Eucalyptus dunnii* MAID. **Boletim de Pesquisa Florestal**, n. 43, p. 107-112, 2001.

GRAPIN, A. et al. Histo-cytological changes in *Pelargonium* apices during the cryopreservation process: effect of the osmotic agent chosen for the preculture step. In: XXVII International Horticultural Congress-IHC2006: II International Symposium on Plant Genetic Resources of Horticultural 760. **Anais...**2006, p. 195-202.

GRATTAPAGLIA, D. et al. Micropropagação. In: **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**, Brasília: Embrapa, v. 1, p. 183-260, 1998, 509 p.

GRATTAPAGLIA, D. Integrating genomics into *Eucalyptus* breeding. **Genet Mol Res**, v. 3, n. 3, p. 369-379, 2004.

GÜBBÜK, H.; PEKMEZCI, M. In vitro propagation of some new banana types (*Musa* spp.). **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**, v. 28, n. 5, p. 355-361, 2004.

JARILLO, J. A. et al. Chromatin remodeling in plant development. **Int J Dev Biol**. V. 53 n. 10, p. 1581-1596, 2009.

JOYCE, S. M.; CASSELLS, A. C.; JAIN, S. M. Stress and aberrant phenotypes in vitro culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 74, n. 2, p. 103-121, 2003.

KACZMARCZYK, A. et al. Cryopreservation of threatened native Australian species-what have we learned and where to from here? **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, Columbia, v. 47, n. 1, p. 17-25, 2011.

KAYA, E. et al. Cryopreservation of *Eucalyptus* Genetic Resources. **CryoLetters**, v.34, p. 608-618, 2013.

LOPES, K. P. **Criopreservação de Germoplasma de oleaginosas de importância econômica para o Nordeste brasileiro**, 2005. 155 p. 2005. Tese (Doutorado na área de conservação de sementes) Universidade Federal da Paraíba, Areia, 2005.

MARI, S. et al. Histo-cytological study of apices of coffee (*Coffea racemosa* and *C. sessiliflora*) in vitro plantlets during their cryopreservation using the encapsulation-dehydration technique. **Cryo-Letters**, v. 16, p. 289-298, 1995.

MELETTI, L. M. M. et al. Crioconservação de sementes de seis acessos de maracujazeiro, **Revista Scientia Agraria Paranaensis**, v.6, p.13-20, 2007.

NOGUEIRA, G. F. et al. Sobrevivência de ápices caulinares de cana-de-açúcar após criopreservação por “droplet- vitrification”. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, n. 11, p. 1524-1527, 2013.

OLIVEIRA, L.S. et al. **Micropropagação, microestaquia e miniestaquia de clones híbridos de *Eucalyptus globulus***, 2011, 58 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2011.

PADAYACHEE, K. et al. Physiological responses of *Eucalyptus in vitro* axillary buds to cryopreparative desiccation and osmotic preculture: Effects of abscisic acid. **South African Journal of Botany**, v. 74, n. 4, p. 639-646, 2008.

PADAYACHEE K. et al. Cryopreservation as a tool for the conservation of *Eucalyptus* genetic variability: concepts and challenges. **Southern Forests**, v. 71, p. 165-170; 2009.

PANIS, B. et al. Cryopreservation of banana (*Musa spp.*) meristem cultures after preculture on sucrose. **Plant Science**, Clare, v. 121, n. 1 p. 95-106, 1996.

PANIS, B.; SWENNEN, B. P. Droplet vitrification of apical meristems: a cryopreservation protocol applicable to all *Musaceae*. **Plant Science**, v. 168, p. 45-55, aug. 2005.

PICCOLI, G.; AHMAD, R.; IVES, B. Web-based virtual learning environments: A research framework and a preliminary assessment of effectiveness in basic IT skills training. **MIS quarterly**, p. 401-426, 2001.

PLESSIS, P.L.C.; Dereuddre, J. Resistance to dehydration and freezing in liquid nitrogen of alginate-coated shoot tips of grape vine (*Vitis L'inifera* L. cv. *Chardonnay*). **C. R. Acad. Sci**, v.3, p. 373-381, 1991.

PRINSEN, P. et al. Morphological characteristics and composition of lipophilic extractives and lignina in Brazilian woods from different *Eucalyptus* hybrids. **Industrial Crops and Products**, v.36, p. 572-583, 2012.

RAHMAH, S. et al. Effects of Droplet-Vitrification Cryopreservation Based on Physiological and Antioxidant Enzyme Activities of *Brassidium* Shooting Star Orchid. **The Scientific World Journal**, v. 2015, 2015.

- RAO, N. Kameswara. Plant genetic resources: advancing conservation and use through biotechnology. **African Journal of biotechnology**, v. 3, n. 2, p. 136-145, 2004.
- REED, B. M. **Plant Cryopreservation: A Practical Guide**. OR, USA: Springer, 2008.
- SAKAI, A.; ENGELMANN, F. Vitrification, encapsulation-vitrification and droplet-vitrification. **Cryo-Letters**, London, v. 28, n. 3, p. 151-172, 2007.
- SAKAI, A.; HIRAI, D.; NIINO, T. Development of PVS-Based vitrification and encapsulation: vitrification protocols. In: REED, B. M. (Ed.). **Plant cryopreservation: a practical guide**. Corvallis: Springer, p. 33-58. 2008.
- SAKAI, A.; LARCHER, W. **Frost survival of plants: responses and adaptation to freezing stress**. Springer Science & Business Media, 2012.
- SANTOS, I. R. I. Criopreservação: potencial e perspectivas para a conservação de germoplasma vegetal. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**. v. 12, p.70-84, 2000.
- SHATNAWI, M. A. et al. Clonal propagation and cryogenic storage of the medicinal plant *Stevia rebaudiana*. **Spanish Journal of Agricultural Research**, v. 9, n. 1, p. 213-220, 2011.
- SILVA, F. de. S.; AZEVEDO, C. A. V. de. Versão do programa computacional ASSISTAT para o sistema operacional Windows. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.4, n.1, p.71-78, 2002.
- SOUZA, A.S.; JUNGHANS, T.G. **Introdução à micropropagação de plantas**. Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006.
- STEPONKUS, P.L. Role of the plasma membrane in freezing injury and cold acclimation. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 35, n. 1, p. 543-584, 1984.
- TOURNIER, V. et al. An eficiente procedure to stably introduce genes into an economically importante pulp tree (*Eucalyptus grandis* X *Eucalyptus urophylla*) **Transgenic Research**, v. 12, p. 403-411, 2003.
- VERTUCCI, C.W.; FARRANT, J.M. Acquisition and loss of desiccation tolerance. **Seed development and germination**, p. 237-271, 1995.

VOLK, G.M.; CASPERSEN, A.M. Plasmolysis and recovery of different cell types in cryoprotected shoot tips of *Mentha* × *piperita*. **Protoplasma**, v. 231, n. 3-4, p. 215-226, 2007.

WATT, M. P. et al. Biotechnology developments in tree improvement programmes in commercial forestry in South Africa. **South African journal of science**, v. 93, n. 3, p. 100-102, 1997.

WATT, M. P. et al. Applications of in vitro methods to *Eucalyptus* germplasm conservation. **Southern African Forestry Journal**, v. 187, n. 1, p. 3-10, 2000.

WATT, M. P. et al. Micropropagation of *Eucalyptus*. **Micropropagation of woody trees and fruits**, p. 217-244, 2003.

YIL, J. Y et al. Improved cryopreservation using *droplet-vitrification* and histological changes associated with cryopreservation of madder (*Rubia akane* Nakai). **Kor J Hort Sci Technol**. v. 30 p. 79–84, 2012.