

**MICROPROPAGAÇÃO E
TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE
*Eucalyptus camaldulensis***

EVÂNIA GALVÃO MENDONÇA



2009

EVÂNIA GALVÃO MENDONÇA

MICROPROPAGAÇÃO E TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE
Eucalyptus camaldulensis

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

Orientador
Prof. Dr. Luciano Vilela Paiva

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2009

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

Mendonça, Evânia Galvão.

Micropropagação e transformação genética de *Eucalyptus
Camaldulensis* / Evânia Galvão Mendonça. – Lavras : UFLA,
2009.

61 p. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2009.

Orientador: Luciano Vilela Paiva.

Bibliografia.

1. Cultivo *in vitro*. 2. Eucalipto. 3. Produção de mudas. 4.
Expressão transiente. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 583.420416

EVÂNIA GALVÃO MENDONÇA

MICROPROPAGAÇÃO E TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE
Eucalyptus camaldulensis

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

APROVADA em 27 de fevereiro de 2009.

Profa. Dra. Gracielle T. da Costa Pinto Coelho

Faculdade São Camilo

Prof. Dr. Breno Régis Santos

UNIFAL



Prof. Dr. Luciano Vilela Paiva
UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL

**Ao meu amor, Gilson, por todo o apoio,
OFEREÇO**

**Aos meus pais, pois sem eles nunca chegaria até aqui,
DEDICO**

AGRADECIMENTO

A Deus pela força, luz e conforto que me fizeram superar todos os momentos difíceis.

Aos meus pais e meu irmão Evaldo, por todo apoio, ensinamentos, formação e por toda confiança que depositaram em mim. Ao meu noivo Gilson, pelo companheirismo, carinho, amor, paciência e pela ajuda em todos os momentos.

Ao professor Luciano pela orientação e pela confiança em mim depositada. Ao professor Breno pela acolhida, orientação, amizade e por todo aprendizado. Ao professor Luiz Beijo, pela grande ajuda nas análises estatísticas e pela atenção.

A Gracielle e Rosângela, pelo ensinamento e confiança. As amigas de república, em especial a Carol, pelo prazeroso convívio. A todos os amigos do LCBM, Guilherme, Elizângela, Fabiana, Michelle, Kalyinka, Marlúcia, Danielle, Suzana, Geraldo, Lilian, Eula, Luis Gustavo e a Ana, pelo convívio e preciosa ajuda. Em especial ao Humberto, Carolina, Anderson Ramos e Anderson Tadeu. As amigas Cristiane e Kátia pelo apoio e carinho. Aos laboratoristas Tina e Evaldo, sempre tão prestativos.

A Universidade Federal de Lavras e ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, pela oportunidade e formação acadêmica.

A Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	iii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 MICROPROPAGAÇÃO DE <i>Eucalyptus camaldulensis</i> POR MEIO DE TECIDO MERISTEMÁTICO.....	5
3 OBTENÇÃO E TRANSFORMAÇÃO DE CALOS DE <i>Eucalyptus camaldulensis</i>	32
4 CONCLUSÕES GERAIS.....	58
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59

RESUMO

MENDONÇA, Evânia Galvão. **Micropropagação e transformação genética de *Eucalyptus camaldulensis***. 2009. 61 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG*.

O *Eucalyptus camaldulensis* é uma espécie nativa da Austrália, pertencente à família Myrtaceae. Devido às suas características, como boa adaptabilidade e densidade da madeira, pode ser utilizado para plantios em áreas críticas e sua madeira destinada a diversos fins industriais. Com a finalidade de propor um método alternativo na propagação da espécie e na produção de mudas, agregando características de interesse, o presente trabalho foi dividido em duas etapas. Na primeira, o objetivo foi propor metodologias para micropropagação *in vitro* e, na segunda, desenvolver calos a partir de explantes foliares e determinar um protocolo de transformação genética de *E. camaldulensis*. Para a micropropagação, foi utilizado como explante meristema apical de plantas estabelecidas *in vitro*, sendo o meristema com tecido adjacente considerado ideal por proporcionar um maior número de brotações/explante (6,49). As brotações originadas dos meristemas foram excisadas em segmentos de 1 cm e propagadas em sistemas de biorreatores pelo método de imersão contínua na ausência de luz. Após 15 dias de cultivo, foi possível observar uma taxa de multiplicação de 6 gemas/explante. As brotações originadas do sistema de biorreator foram inoculadas em meio de cultura, com a finalidade de promover o enraizamento. O meio de cultivo controle, no qual os explantes permaneceram em sala de crescimento na ausência de luz, proporcionou o enraizamento de 100% das plântulas, apresentando raízes com tamanho médio de 2,7 cm. As plântulas que enraizaram foram levadas para aclimatização e, após 15 dias, o índice de sobrevivência foi de 76%. O meio de cultura LCBM 4, suplementado com auxina, citocinina e água de coco e com concentração de nitrogênio reduzida, apresentou os melhores resultados para calogênese. Foi determinada a curva de crescimento dos calos por meio de explantes foliares, tendo a curva apresentado aspecto sigmoide com cinco fases distintas. De acordo com o crescimento dos calos, sugere-se que a repicagem para um novo meio de cultura deve ser realizada entre o 72^a e 81^a dia de cultivo. Foi realizada a transformação genética de explantes foliares utilizando a técnica de agrobiobalística, em que se observou a expressão transiente do gene repórter *gus*, não havendo diferenças

* Comitê Orientador: Luciano Vilela Paiva (orientador), Breno Régis Santos (coorientador).

entre os tempos de infecção analisados. Os calos infectados com *Agrobacterium tumefaciens* apresentaram expressão transiente do gene *gus* e, após 30 dias, houve regeneração dos mesmos, formando plântulas possivelmente transformadas que se encontram em processo de seleção. Com base nos resultados apresentados, concluiu-se que foi possível micropropagar a espécie *E. camaldulensis*, utilizando, como explante, tecido meristemático e foi observada expressão transiente do gene repórter *gus* em folhas e calos infectados com *A. tumefaciens*.

ABSTRACT

MENDONÇA, Evânia Galvão. **Micropropagation and genetic transformation of *Eucalyptus camaldulensis***. 2009. 61 p. Dissertation (Master in Plant Biotechnology – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG*.

The *Eucalyptus camaldulensis* is a native species from Australia, belonging to the Myrtaceae family. Due your characteristics as good adaptability and wood density it can be used for plantings in critical areas, being the wood destined to several industrial ends. With the objective of proposing an alternative method in the propagation of the species and in the production of seedlings, joining characteristics of interest, the present study was divided in two stages, where the first one had as objective to propose methodologies for *in vitro* micropropagation and the second one was to develop calluses starting from foliar explants and to determine a protocol of genetic transformation of *E. camaldulensis*. For the micropropagation, it was used for apical meristem, explants established *in vitro*, being the meristem with adjacent tissue considered ideal for providing a higher number of sproutings/explant (6,49). The sprouting originated from the meristems, were cut in segments of 1 cm and spread in bioreactor systems through the method of continuous immersion in light absence. After 15 days of cultivation it was possible to observe a multiplication rate of 6 buds / explant. The sproutings originated from the bioreactor system were inoculated in culture media with a rooting purpose. The culture media control where the explants stayed in growth room in light absence provided a rooting of 100% of the seedlings presenting roots with a medium size of 2,7 cm. The seedlings that rooted were carried out to acclimatization where, after 15 days the survival index was 76%. The growth media LCBM 4, supplemented with auxin, cytokinin, coconut water and with the nitrogen concentration reduced, presented the best results for callogenesis. It was determined the growth curve of the calluses through the foliar explants, where the curve presented a sigmoid aspect with five different phases. In agreement with the calluses growth it is suggested that the replicate for a new culture media should be accomplished between the 72° and 81° day of cultivation. The genetic transformation of the foliar explants was carried out using the “agro biobalistic” technique, where the transient expression of the reporter gene *gus* was observed not having differences among the time of infection analyzed. The calluses infected with

* Guidance Committee: Luciano Vilela Paiva (Advisor), Breno Régis Santos (Co-advisor).

Agrobacterium tumefaciens presented transient expression of the gene *gus* and after 30 days there was regeneration of the same ones, forming seedlings possibly transformed, that were found in selection process. Based in the presented results we conclude that it was possible to micropropagate the species *E. camaldulensis* using as explant meristematic tissue and a transient expression of the reporter gene *gus* was observed in leaves and calluses infected with *A. tumefaciens*.

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Eucalyptus* L'Hér. pertence à família Myrtaceae e possui mais de 600 espécies (Goor & Barley, 1968). Apesar de ser uma espécie nativa do continente australiano, é encontrado em diferentes condições ambientais, sendo muitas espécies e híbridos cultivados em larga escala em várias regiões de clima tropical e subtropical em todo o mundo, incluindo Argentina, Austrália, Brasil, Marrocos, Portugal, África do Sul, Espanha, Estados Unidos e Uruguai (Eldridge et al., 1994).

Devido à grande adaptação da espécie *Eucalyptus* em regiões de clima tropical, a eucaliptocultura representa a maior área plantada para fins comerciais. O Brasil é considerado o maior produtor mundial da espécie, com uma área de cultivo estimada em 3,5 milhões de hectares (Sociedade Brasileira de Silvicultura, SBS, 2008).

A grande diversidade existente entre as espécies faz com que o eucalipto apresente características físico-mecânicas que permitam inúmeras utilizações como matéria-prima. Sua madeira é utilizada para a construção, a biomassa para a produção de polpa de celulose e papel (o Brasil se destaca como maior produtor mundial, com cerca de 6,3 milhões de toneladas por ano) na indústria siderúrgica, onde o carvão vegetal é o mais importante combustível e redutor do minério de ferro (Instituto de Desenvolvimento Integrado de Minas Gerais, Indi, 2006). Há, ainda, uma série de subprodutos destinados à indústria de cosméticos, farmacêutica, etc. (Bandyopadhyay et al., 1999). Essas características tornam o eucalipto, uma espécie tropical de grande importância econômica em âmbito mundial (Sartoretto et al., 2002).

As indústrias brasileiras que utilizam o eucalipto como matéria-prima para a produção de papel, celulose e demais derivados representam 4% do

Produto Interno Bruto, 8% das exportações e geram, aproximadamente, 150 mil empregos (Associação Mineira de Silvicultura, AMS, 2006).

Dentre as várias espécies do gênero, o *Eucalyptus camaldulensis* é considerado a espécie de maior distribuição geográfica, sendo encontrado em condições climáticas variadas, desde quente a subúmida e semiárida, com temperatura média, no mês mais frio, variando de 3° a 15°C (Souza, 1996).

Devido às características físicas, boa durabilidade e densidade da madeira (500-600 kg.m³), o *E. camaldulensis* tem ampla aplicação, principalmente para usos que requerem madeiras mais duras, como serraria, dormentes, postes, mourões e., principalmente, carvão. Também é utilizado como cerca quebra-ventos, planta ornamental e produção de mel de excelente qualidade (Eldridge et al., 1993; Soerianegara & Lemmens, 1994).

Em função de sua rusticidade, o *E. camaldulensis* é uma das espécies mais adequadas para reflorestamento em zonas críticas, sendo introduzido com relativo sucesso em vários países, principalmente em áreas onde ocorrem deficiências hídricas e edáficas, situações consideradas extremamente limitadas para o desenvolvimento de outras espécies (Higa, 2003).

No Brasil, a introdução do *E. camaldulensis* ocorreu no início do século passado, assumindo maior importância quando os programas de florestamento moveram-se do sul para as regiões centro-oeste e nordeste, visto que as espécies como *E. grandis*, *E. saligna* e *E. urophylla* eram inadequadas para as condições de alta temperatura e longo período seco, característicos dessas regiões (Golfari et al., 1978).

Apesar das várias espécies de eucalipto existentes, as mais comercializadas atualmente, para fins industriais, são os híbridos. A produção de mudas se destaca por meio da técnica de miniestaquia, ocorrendo a clonagem de indivíduos superiores. Somente em 2007 a demanda, no país, por mudas clonadas foi de, aproximadamente, 535 milhões.

Devido à grande demanda por produtos florestais, o cultivo *in vitro* apresenta-se como um método viável para propagação clonal em larga escala de diversas espécies florestais. A otimização do processo de micropropagação leva ao incremento acelerado do número de plantas derivadas de determinado genótipo, o que ocasiona uma redução do tempo de multiplicação, possibilitando clonar grande quantidade de plantas em uma área reduzida e com maior controle sobre a sanidade do material que se propaga (Mroginski & Roca, 1996). Além disso, por ser um método de propagação vegetativa, permite manter as características da planta matriz, possibilitando a clonagem de espécies que não se propagam facilmente por métodos convencionais de propagação vegetativa.

A micropropagação de espécies lenhosas vem sendo estudada há várias décadas e tem como objetivo básico o estabelecimento de uma metodologia de multiplicação clonal de indivíduos superiores ou conservação genética por meio de criação de bancos de germoplasmas, a qual tem sido realizada, principalmente, por cultivo de gemas pré-existentes ou cultura de calos derivados de diferentes tecidos (Nascimento, 2006).

Segundo Mullins et al. (1997), os procedimentos convencionais de micropropagação em eucalipto se dão pela ativação de gemas axilares em cultura. Entretanto, a propagação *in vitro* por organogênese de explantes foliares e por meio da cultura de meristemas também tem a capacidade de regenerar grande número de plantas, e com potencial para ser automatizada.

Nesse sentido, os biorreatores são utilizados na micropropagação de plantas, podendo ser uma alternativa viável para a otimização do processo e a redução dos custos de produção. Esse sistema permite a renovação do ar no ambiente *in vitro*, aumentando a produção de biomassa vegetal propagada com redução do tempo requerido para a propagação *in vitro*.

Aliada à micropropagação, nos últimos anos, a transformação genética em plantas lenhosas tem despertado atenção no setor florestal. A biotecnologia

florestal, aliada ao melhoramento convencional, pode contribuir significativamente para um aumento do desenvolvimento vegetativo e da biomassa das plantas. Os avanços genéticos obtidos na produção de árvores vêm ampliando os campos de desenvolvimento da biologia de plantas, com novas metodologias, como a transformação genética e a descoberta de genes associados a características multigênicas complexas, como densidade, volume, teores de celulose e lignina da parede celular, resistência a pragas e doenças, entre outras. Estudos neste sentido vêm sendo realizados, a exemplo do Projeto Genolyptus no Brasil.

A aplicação da biotecnologia, aliada à propagação de clones altamente produtivos, em associação ao melhoramento do *Eucalyptus*, pode levar a um aumento de produtividade, atendendo a uma demanda crescente por produtos florestais de qualidade, com baixo custo de produção.

Neste contexto, o presente trabalho foi realizado com os objetivos de micropropagar a espécie *Eucalyptus camaldulensis* de forma eficiente, utilizando o sistema de biorreator e obter plantas transgênicas mediante o sistema *Agrobacterium tumefaciens*.

2 MICROPROPAGAÇÃO DE *Eucalyptus camaldulensis* POR MEIO DE TECIDO MERISTEMÁTICO

(Preparado para ser submetido à revista "In Vitro Plant")

Mendonça, E.G^{1*}; Paiva, L.V.¹; Santos, B.R²; Beijo, L.A³; Carvalho, H.H¹;
Coelho, G.T.C.P⁴.

- 1- Laboratório Central de Biologia Molecular, Universidade Federal de Lavras, MG 37200-000, Brasil.
- 2- Departamento de Ciências Biológicas e da Terra, Universidade Federal de Alfenas, MG 37130-000, Brasil.
- 3- Departamento de Ciências Exatas, Universidade Federal de Alfenas, MG 37130-000, Brasil.
- 4- Departamento de Biotecnologia, Faculdade São Caetano, Belo Horizonte, MG 30150-050, Brasil.

*Correspondência do autor: Tel.: +55-35-38291172

E-mail: evaniafloresta@hotmail.com

RESUMO

Espécies do gênero *Eucalyptus* vêm sendo muito utilizadas por empresas de reflorestamento no Brasil, sendo sua madeira destinada a diversas finalidades industriais. Sendo assim, para atender ao mercado crescente, o que se busca é aumentar a relação custo/benefício com a produção de mudas de qualidade ao menor custo possível. Nesse sentido, a micropropagação *in vitro* se torna uma alternativa por apresentar vantagens sobre a forma convencional de produção de mudas de eucalipto. O presente trabalho foi realizado com o objetivo de obter um procedimento eficiente para micropropagar a espécie *Eucalyptus camaldulensis*. O explante utilizado foi o meristema apical isolado e com tecido adjacente, que foram cultivados em meio de cultura LCBM-1. O meristema com tecido adjacente apresentou melhor resultado, com 6,49 brotos/explantes, em 60 dias de cultivo. Estes brotos foram multiplicados em sistemas de biorreatores de imersão temporária e contínua, na ausência ou na presença de luz e o biorreator de imersão contínua no escuro foi o sistema que proporcionou a maior taxa de multiplicação. Os explantes micropropagados foram enraizados em meio de cultura LCBM-3 suplementado com 0, 2x, 4x, 8x e 20x de auxina, em diferentes condições de luminosidade. Os melhores resultados foram encontrados quando as microestacas enraizaram na ausência de luz sem AIB ou na presença de luz em baixa concentração de AIB no meio de cultura. As plântulas foram aclimatizadas em câmara de nebulização, apresentando 76% de sobrevivência. Os métodos utilizados para micropropagar *E. camaldulensis* foram eficientes, proporcionando alta porcentagem de sobrevivência, mostrando que é possível produzir mudas em larga escala, tendo como fonte de explantes meristema caulinar.

Palavras-chave: cultura *in vitro*, espécies florestais, meios de cultura, produção de mudas

INTRODUÇÃO

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

Para a propagação vegetativa de *Eucalyptus* spp., utilizam-se métodos clássicos, como a estaquia. A estaquia tem apresentado alguns problemas relativos ao baixo índice de enraizamento, quando se utiliza, principalmente, material mais adulto, em razão do acúmulo de inibidores de enraizamento. Porém, mesmo a partir de material jovem, o enraizamento pode ser baixo para algumas espécies de *Eucalyptus* (Xavier & Comércio, 1996).

No processo de enraizamento de estacas de *Eucalyptus*, as técnicas de microestaquia (Xavier & Comércio, 1996) e, mais recentemente, de miniestaquia (Xavier & Wendling, 1998) têm sido utilizadas com êxito na propagação de clones selecionados, possibilitando consideráveis ganhos decorrentes, principalmente, do aumento dos índices de enraizamento e da redução do tempo para a formação da muda, pela utilização de propágulos com maior grau de juvenildade. Apesar dos ganhos obtidos com esta técnica de propagação, a cultura de tecidos apresenta-se como um método alternativo, por oferecer vantagens sobre a miniestaquia, tais como taxa mais elevada de multiplicação, menor necessidade de espaço físico e ausência de pragas e doenças durante o cultivo *in vitro*, além de ser mais seguro, graças ao maior controle dos fatores envolvidos (Andrade et al., 2006).

Atualmente, a modalidade de maior interesse e aplicação na propagação de plantas é a micropropagação, que reúne características, tais como multiplicação rápida de plantas selecionadas, obtenção de mudas livres de patógenos, conservação e transporte de germoplasma. A propagação *in vitro* do eucalipto por meio da tecnologia de micropropagação tem o objetivo de obter mudas geneticamente idênticas. Para isso, pode fazer uso de meristemas, ápices caulinares, segmentos nodais e gemas laterais.

A cultura de meristema tem sido extensivamente utilizada na propagação agâmica, em função da rapidez com que se consegue a multiplicação de diversas espécies e da estabilidade genética intrínseca às células do meristema (Passos et al., 1985).

Com a finalidade de permitir a micropropagação em larga escala, o cultivo de explantes em meio líquido por meio de biorreatores tem sido relatado como potencial para algumas espécies vegetais, tais como banana, abacaxizeiro e café (Lemos et al., 2001; Silva et al., 2007; Gatia et al., 2008). O emprego de biorreatores em cultivo líquido permite a micropropagação em larga escala, a prevenção de distúrbios fisiológicos dos brotos e a hiperidricidade. Ainda existe a possibilidade de computadores serem utilizados no controle de sistemas de biorreatores, apresentando, dessa forma, vantagens sobre a micropropagação convencional, em termos de automação e redução de trabalho (Silva et al., 2007). Este sistema permite a renovação do ar no ambiente *in vitro*, aumentando a produção de biomassa vegetal propagada com redução do tempo requerido para a propagação *in vitro*.

Os sistemas de cultivo em biorreatores podem ser divididos em contínuos ou temporários. No sistema contínuo, os explantes ficam sempre em contato com o meio de cultura, enquanto que, no sistema temporário, o material vegetal entra em contato com o meio de cultura de forma intermitente, de acordo com programação predefinida (Alvard et al., 1993; George, 1996).

Após a propagação das plantas, estas devem ser enraizadas e aclimatizadas, para que as mudas adquiram condições de serem levadas ao campo (George, 1996). Em alguns casos, o enraizamento pode ocorrer com a transferência para um meio de cultivo isento de reguladores ou resultante apenas de uma lesão na base da microestaca.

Segundo Tantos et al. (2001), tratamentos severos com altas concentrações de auxina durante reduzido período e a transferência das plântulas para um meio livre de regulador de crescimento podem promover de forma mais eficiente o enraizamento. Entretanto, a eliminação da etapa de enraizamento *in vitro* é extremamente desejável, sob o aspecto econômico (Debergh & Maene, 1981) e da qualidade, pois a regeneração de raízes durante a fase de aclimatização tende a produzir um sistema radicular mais desenvolvido e funcional (Grattapaglia & Machado 1990; Carvalho et al., 1999). Em alguns casos, o gasto extra com o enraizamento *in vitro* pode ser justificado se este resultar em mudas de melhor qualidade ou se perdas durante a aclimatização puderem ser reduzidas (George, 1996). Durante o período de aclimatização, a planta passa da condição heterotrófica para a autotrófica. Sem esta etapa de adaptação pode ocorrer uma rápida desidratação das plântulas quando transferidas para o ambiente normal, comprometendo, assim, o estabelecimento *ex vitro*.

Pouco se conhece sobre a propagação *in vitro* de *Eucalyptus* tendo como fonte de explantes tecidos meristemáticos e a propagação em sistemas biorreatores, não sendo diferente para *E. camaldulensis*. Nesse sentido, o presente trabalho teve como objetivos induzir a formação de brotações em explantes meristemáticos, proporcionar o desenvolvimento das brotações em meio líquido, promover o enraizamento das plântulas *in vitro* e aclimatizá-las.

MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo foi conduzido no Laboratório Central de Biologia Molecular (LCBM) da Universidade Federal de Lavras, em Lavras, MG. Os experimentos foram instalados em sala de crescimento sob fotoperíodo de 16 horas, com irradiância de $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fornecida por luz branca fria e temperatura de $27 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$.

Experimento 1: Cultivo *in vitro* de meristemas. A partir de plantas de *Eucalyptus camaldulensis* cultivadas *in vitro*, 35 dias após repicagem, foram retirados os explantes. As plantas tiveram o ápice excisado e os meristemas, constituídos pelos primórdios foliares e gemas laterais, foram isolados com o auxílio de estereoscópio. Foram excisados meristemas com $\pm 1 \text{ mm}$ (meristema isolado) e $\pm 2,5 \text{ mm}$ (meristema com tecido adjacente) de comprimento.

Para induzir a multiplicação dos meristemas, estes foram inoculados em meio de cultura LCBM-1, suplementado com auxina e citocinina. Após a inoculação, os explantes foram mantidos em sala de crescimento, de acordo com as condições mencionadas anteriormente.

Dados de número médio de brotações por explante e número de explantes que sobreviveram foram coletados em 15, 30 e 60 dias de cultivo, sendo considerado como broto quando observado o surgimento de um par de folhas.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado em parcelas subdivididas no tempo, com 4 repetições por tratamento, sendo cada repetição constituída por 6 explantes, totalizando 24 explantes por tratamento. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey, a 5% de significância, para comparação das médias dos tratamentos.

Experimento 2: Multiplicação das brotações em sistema de biorreatores.

Foram utilizados biorreatores de imersão contínua e temporária, constituídos a partir de frascos de 500 mL. O biorreator de imersão contínua apresenta dois orifícios, dos quais um é utilizado para a entrada de ar esterilizado por uma membrana de 0,22 μm , enquanto o outro é utilizado para a saída do excesso de pressão. A oxigenação foi efetuada por meio da injeção de ar, utilizando-se um compressor com capacidade de 4 L min^{-1} , que promove a renovação da atmosfera e o borbulhamento do meio de cultura. No sistema de imersão temporária foram utilizados dois frascos interligados por tubos de silicone, dos quais um continha o meio de cultura e o outro, os explantes a serem micropropagados. Neste sistema, a oxigenação foi efetuada por meio da injeção de ar nos dois biorreatores, em que cada um continha uma membrana millipore de 0,22 μm ligada a um compressor. A oxigenação, a frequência e o tempo de imersão foram regulados por “timers” analógicos.

Os experimentos utilizando biorreatores tiveram como explantes segmentos caulinares excisados de brotações originadas dos meristemas, apresentando 1 cm de comprimento e duas gemas cada. Os explantes foram introduzidos em 300 mL de meio de cultura líquido LCBM-2, autoclavado por 20 minutos, a 121°C.

Com a finalidade de avaliar os diferentes sistemas de biorreatores, submetidos a diferentes condições de luminosidade, três experimentos foram realizados.

-Influência da luminosidade na propagação de segmentos caulinares utilizando biorreator. O sistema de biorreator utilizado foi de imersão e aeração contínua. Um sistema foi mantido na presença de luz (imersão contínua luz - ICL) e o segundo na condição de escuro (imersão contínua escuro - ICE), promovido por meio da utilização de papel alumínio. Foram inoculados 21

explantes em cada biorreator. O experimento foi conduzido em sala de crescimento onde, após 15 dias, os resultados foram avaliados.

-Imersão contínua e temporária. De acordo com os resultados do experimento anterior, em que a ausência de luz foi a melhor condição de propagação dos explantes, os experimentos subsequentes foram realizados utilizando-se esta condição.

Com a finalidade de avaliar a eficiência entre os métodos de imersão contínua e temporária, 21 explantes foram inoculados em cada biorreator. O biorreator de imersão contínua (imersão contínua – IC) foi instalado como no experimento anterior. Já no biorreator de imersão temporária (imersão temporária – IT), o tempo de imersão foi a cada 2 horas, permanecendo 15 minutos em contato com o meio de cultura, ocorrendo também o borbulhamento do líquido neste período. O tempo de imersão neste experimento foi adaptado de Silva et al. (2007).

-Comparação entre tipos de explantes. O experimento foi composto por dois biorreatores, contendo 21 explantes cada. No primeiro biorreator, foram inoculados explantes oriundos do cultivo realizado com base nos melhores resultados dos experimentos anteriores (ICE), sendo o sistema denominado (imersão contínua repique – ICR). No segundo biorreator, os explantes utilizados foram segmentos caulinares provenientes das brotações dos meristemas (imersão contínua brotações - ICB). Os experimentos foram avaliados 15 dias após inoculação.

As variáveis avaliadas nos experimentos foram o número de brotos, o número de gemas e o tamanho do maior broto. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado e os valores utilizados para análise

estatística foram as médias obtidas para os três experimentos. Os efeitos dos tratamentos para as variáveis número de brotos e de gemas foram analisados pelo teste de Mann-Whitney (Ferreira, 2005) e a variável tamanho dos brotos foi analisada por teste de Tukey, ambos a 5% de significância.

Experimento 3: Efeito de diferentes concentrações de auxina no enraizamento *in vitro*. Após a escolha do melhor sistema de biorreatores para o processo de multiplicação *in vitro*, os brotos de tamanho $\pm 4,0$ cm foram individualizados e transferidos para o meio de cultura LCBM-3, contendo auxina nas concentrações de 0, 2x, 4x e 8x. Foi realizado um tratamento em que as microestacas permaneceram por 12 horas em solução de 20x de auxina. Após este período, os explantes foram transferidos para meio de cultura sem hormônio.

Com a finalidade de observar a influência da luz na formação de raízes, dois tratamentos foram implementados. No primeiro, os frascos contendo os explantes permaneceram por 15 dias em sala de crescimento, na ausência de luz e depois foram mantidos sob luminosidade por mais 15 dias; no segundo, os explantes permaneceram em sala de crescimento na presença de luz, durante todo o experimento. Os tratamentos foram distribuídos da seguinte forma: de t1 a t5 permaneceram em sala de crescimento na ausência de luz por 15 dias e os tratamentos de t6 a t9 permaneceram sob luminosidade (fotoperíodo 16 horas). As concentrações de auxina foram 0, 2x, 4x, 8x e 20x, respectivamente. Os tratamentos t1 e t6 correspondem aos tratamentos controle, em que não há regulador de crescimento no meio de cultura. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 9 tratamentos e 2 repetições, sendo cada repetição constituída por 5 plântulas. No final de 30 dias, foram avaliados, para cada plântula, o número de raízes e o tamanho da maior raiz, o tamanho da plântula e o número de folhas. O programa Sisvar 4.3 (Ferreira, 2000) foi utilizado para a

realização das análises de variâncias (ANAVA), sendo as médias comparadas pelo Teste de Scott & Knott, a 5% de probabilidade.

Experimento 4: Aclimatização das plantas. Foi testada, para a aclimatização das plantas, uma câmara de nebulização, a qual é formada por um suporte metálico para cobertura plástica (plástico transparente de 150 micras), possuindo nebulização interna efetuada por um vaporizador de compressão, com o tempo de nebulização ajustado por *timer* analógico. As plântulas foram introduzidas em tubos de polietileno de 56 cm³, contendo substrato de enraizamento Topstrato[®] autoclavado. Após o plantio, os tubetes foram transferidos para câmara de nebulização que apresentou, durante o experimento, 90% de umidade relativa do ar, temperatura média de 31°C, sistema de nebulização automático a cada 30 minutos, fotoperíodo de 12 horas e intensidade de luz 120 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. No final de 15 dias, as plantas foram consideradas aclimatizadas e os parâmetros avaliados após o enraizamento foram novamente analisados, conforme experimento anterior.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Experimento 1: Cultivo *in vitro* de meristemas. A análise de variância revelou a existência de diferença significativa ($P < 0,05$) entre os tempos de cultivo e o tipo de meristema utilizado, para a variável número de brotos (Tabela 1). O meristema com tecido adjacente produziu, em média, um número maior de brotos/explante (6,49) que o meristema isolado (3,18), 60 dias após inoculado. Isso sugere que a maior quantidade de tecido existente no explante pode apresentar níveis mais altos de citocinina endógeno, já que as citocininas atuam na divisão celular, o que favorece o desenvolvimento de brotações laterais, por

serem estimuladoras da iniciação de gemas caulinares. Outra hipótese é a de que o meristema com tecido adjacente pode apresentar um maior número de primórdios foliares e gemas laterais, justificando assim o melhor resultado. A diferença entre os meristemas pôde ser observada a partir da primeira avaliação aos 15 dias de cultivo (Figura 1).

TABELA 1 Média do número de brotos dos meristemas isolados e com tecido adjacente, após 60 dias de cultivo.

Meristema	Média do número de brotos
Isolado	3,18 a
Tecido adjacente	6,49 b

*Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem estatisticamente entre si, pelo Teste de Tukey ($p > 0,05$).

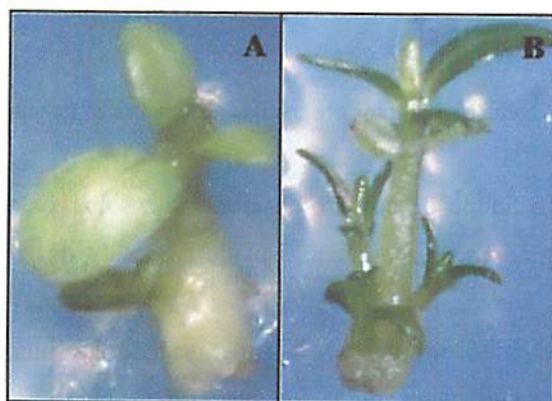


FIGURA 1 Regeneração e multiplicação de *E. camaldulensis* a partir de tecidos meristemáticos, após 15 dias de cultivo. A - meristema isolado; B - meristema com tecido adjacente.

Como o tempo foi significativo, realizou-se a análise de regressão entre os tempos de cultivo e o número total de brotos obtidos para os tratamentos (Figura 2). Observou-se o comportamento linear dos dias de avaliação dos meristemas para a variável número de brotos, obtendo-se, em média, 8,25 brotos/explante, quando estes foram avaliados aos 60 dias.

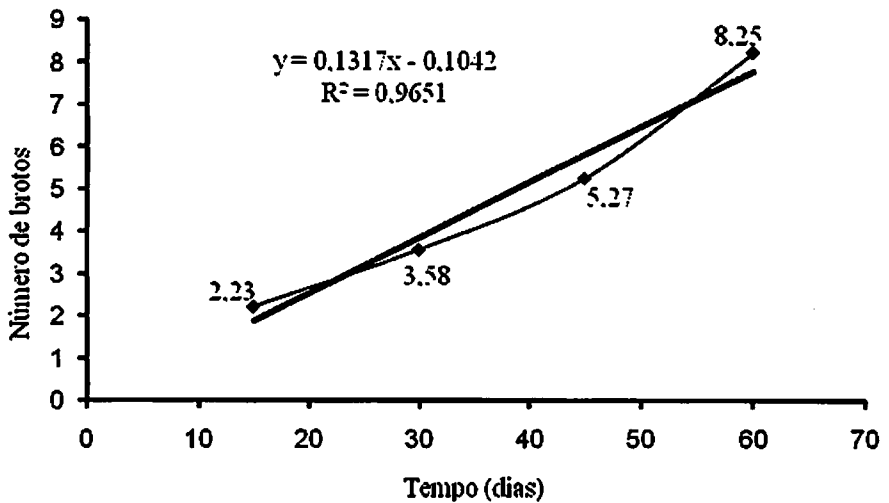


FIGURA 2 Número de brotos observados nos intervalos de tempo.

Após o tempo de cultivo, observou-se a sobrevivência de 91,66% dos explantes originados do meristema isolado e 83,33% dos explantes originados do meristema com tecido adjacente. Estes resultados são, de forma geral, não expressivos quando se observa a superioridade no número das brotações originadas pelo meristema com tecido adjacente (Tabela 1).

Experimento 2: Multiplicação das brotações em sistemas de biorreatores.

Os resultados do experimento com base na influência da luminosidade na

propagação de *E. camaldulensis* utilizando o sistema de biorreator estão expressos na Tabela 2. Foi possível observar que o número de brotos não foi afetado pela luminosidade, não havendo diferença significativa, a 5%, pelo Teste de Mann-Whitney. Já o número médio de gemas e o comprimento médio dos brotos apresentaram diferença significativa, tendo o sistema ICE apresentado resultados superiores ao sistema ICL, com número médio de 6 gemas/explante e comprimento médio de 4,38 cm. No final do experimento, foi possível observar que, no sistema ICE, o meio de cultura foi totalmente consumido, onde os caules estavam alongados e com múltiplas brotações de coloração verde-claro, os quais não se encontravam vitrificados (Figura 3B). Com relação ao sistema ICL, os explantes estavam oxidados, vitrificados e com tamanho dos entrenós reduzido. O meio de cultura foi parcialmente consumido e apresentava coloração marrom acinzentada. Alterações na coloração do meio de cultivo possivelmente ocorreram devido à liberação de compostos fenólicos dos explantes oxidados, que leva a alterações no pH do meio de cultivo, afetando a absorção de nutrientes. Estas condições podem ter influenciado na menor eficiência desse sistema quando comparado com o ICE, já que a morfogênese é totalmente dependente do pH.

TABELA 2 Número médio de brotos maiores que 1 cm, número médio de gemas e comprimento médio dos brotos de *E. camaldulensis*, em diferentes condições luminosa.

Tratamento	Número médio de brotos	Número médio de gemas	Comprimento médio dos brotos (cm)
ICE ¹	3,52 a	6,00 b	4,38 b
ICL ²	2,76 a	2,52 a	1,76 a

*Médias seguidas das mesmas letras na coluna não diferem estatisticamente entre si, pelo Teste de Mann-Whitney ($p > 0,05$).

¹Imersão contínua no escuro, ²Imersão contínua luz

Quando se comparam os sistemas de IT e IC, é possível observar que as variáveis analisadas não foram influenciadas pelo método, não havendo diferença estatística entre elas (Tabela 3). O sistema de IC apresentou tendência para o maior número médio de brotos (2,38), enquanto o biorreator de IT apresentou tendência para maiores valores médios de número de gemas (2,57) e comprimento dos brotos (3,52). No biorreator de IT houve um consumo mínimo do meio de cultura durante o experimento, provavelmente pelo pouco tempo em que os explantes permaneciam em contato com o meio. Não foi observada oxidação dos explantes e do meio de cultura.

TABELA 3 Número médio de brotos maiores que 1 cm, número médio de gemas, comprimento médio dos brotos e taxa de multiplicação de *E. camaldulensis*, em diferentes métodos de cultivo.

Tratamento	Número médio de brotos	Número médio de gemas	Comprimento médio dos brotos (cm)
IT ¹	1,76 a	2,57 a	3,52 a
IC ²	2,38 a	1,85 a	3,51 a

*Médias seguidas das mesmas letras na coluna, não diferem estatisticamente entre si, pelo Teste de Mann-Whitney ($p > 0,05$).

¹Imersão temporária

²Imersão contínua

Com base nos resultados apresentados para comparação entre tipos de explante, observa-se que não houve diferença significativa para a variável número de brotos entre os sistemas ICR e ICB (Tabela 4). Já o número médio de gemas e o comprimento médio dos brotos foram influenciados pelo tipo de explante inoculado. O sistema ICB apresentou os melhores resultados, com número de gemas e comprimento dos brotos cerca de 2 vezes (2,57) e 5 vezes (3,52) superiores ao ICR, respectivamente. Não houve diferença de consumo entre os meios de cultura e não foi observada oxidação dos explantes. Após os

15 dias de cultivo, os explantes do sistema de ICR apresentavam aspecto de hiperidricidade, o que pode ter sido proporcionado pelo contato contínuo dos explantes com o meio de cultura após o segundo subcultivo, levando à maior absorção de água, ocasionando este distúrbio fisiológico.

TABELA 4 Número médio de brotos maiores que 1 cm, número médio de gemas e comprimento médio dos brotos de *E. camaldulensis*, em diferentes métodos de cultivo.

Tratamento	Número médio de brotos	Número médio de gemas	Comprimento médio dos brotos (cm)
ICR ¹	2,00 a	1,19 a	0,74 a
ICB ²	1,76 a	2,57 b	3,52 b

*Médias seguidas das mesmas letras na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Mann-Whitney ($p > 0,05$).

¹Imersão contínua-repique

²Imersão contínua-brotações

Os dados da Tabela 5 mostram o efeito do sistema de cultivo no número total de gemas e na taxa de multiplicação, tendo sido inoculados 21 segmentos caulinares em cada biorreator. Observa-se que o sistema ICE apresentou o maior número total de gemas (126) e uma taxa de multiplicação de 6 gemas/explante em 15 dias, sendo estes valores 5 vezes superiores aos encontrados para o sistema ICR, que obteve os piores resultados. O sistema de biorreator ICE foi superior por proporcionar maior número de brotos e maior taxa de multiplicação, o qual ainda pode dobrar a capacidade por utilizar somente um frasco de cultivo, quando comparado aos sistemas de imersão temporária, no qual utilizam-se dois frascos para um mesmo número de explantes.

TABELA 5 Número inicial de explantes, número total de gemas/tratamento e taxa de multiplicação, entre sistemas de biorreatores para explantes de *E. camaldulensis*, após 15 dias de inoculação.

Tratamento	Número de explante inicial	Número total de gemas/tratamento	Taxa de multiplicação
Imersão contínua-escuro (ICE)	21	126	6,00
Imersão contínua-luz (ICL)	21	53	2,52
Imersão temporária(IT)	21	54	2,57
Imersão contínua (IC)	21	39	1,86
Imersão contínua-repique (ICR)	21	25	1,19
Imersão contínua-brotações (ICB)	21	54	2,57

Partindo do melhor sistema de cultivo (ICE), é possível observar que há um aumento potencial do número de explantes, que passam de 21, no início do experimento, para 126 no final dos 15 dias, quando cada explante gera, em média, 6 novos explantes. Estes resultados mostram o potencial do sistema de cultivo em biorreatores, principalmente quando se comparam esses resultados com os do experimento I, no qual os explantes foram inoculados em meio de cultura sólido, acrescido de reguladores de crescimento, obtendo-se, em média, 6,49 brotos, no final de 60 dias.

O sistema de ICE apresentou uma taxa de multiplicação proporcional à do experimento I (60 dias), em menor tempo de cultivo (15 dias). Para a produção de mudas *in vitro* em escala comercial, os acréscimos obtidos na taxa de multiplicação e no rendimento em brotos são fatores de grande importância para uma tomada de decisão. Além disso, a redução nos custos pode ser notada no menor emprego de frascos, na redução na manipulação do material, na redução dos trabalhos de repicagem, na ausência de ágar no meio de cultura e no aumento nas taxas de multiplicação sem adição, neste experimento, de reguladores de crescimento.

Nesse sentido, os biorreatores apresentam potencial para aumento significativo no crescimento do material vegetal *in vitro*, por promoverem maior disponibilidade de ar no sistema, podendo ser utilizados na micropropagação de diversas espécies de interesse comercial, como o *E. camaldulensis*.

Experimento 3: Efeito de diferentes concentrações de auxina no enraizamento *in vitro*. O início da emissão de raízes foi observado no 10º dia de cultivo e, no 30º dia, as plântulas apresentaram raízes alongadas, com comprimento variando de 0,5 a 7,0 cm (Figura 3). Com relação ao enraizamento, do total de 100 microestacas inoculadas em todos os tratamentos, 67 apresentaram raiz e as porcentagens entre estes variaram de 50% a 100% (Tabela 5). Quando se compararam os tratamentos com as mesmas concentrações de regulador na presença e na ausência de luz, foi possível observar que, com exceção do t7, os melhores resultados foram encontrados para os tratamentos na ausência de luz.

O resultado encontrado está de acordo com Assis & Teixeira (1998) que relatam a importância, para algumas espécies, de exposição das brotações a um período de escuro, por ter efeito direto ou indireto sobre a produção de açúcar, auxinas, fenóis e enzimas endógenas. Para algumas espécies, a redução da luz pode favorecer o estiolamento do caule, o que estimula a indução de raízes adventícias (Brian & Bassul, 1998). Tentativas para viabilizar o enraizamento de microestacas também foram realizadas para as espécies *E. botryoides*, *E. camaldulensis*, *E. deglupta* e *E. grandis*, por Ito et al. (1996). Segundo esses autores, as microestacas podem ser enraizadas em meio de cultura B5 (Gamborg et al., 1968), com a concentração de sais reduzida quatro vezes, concentrações de ANA variando de 0 a 0,002 mg L⁻¹. Em outro trabalho, Bennett & McComb (1982) observaram que o meio de cultura MS/2, acrescido com 1,16 mg L⁻¹ de AIB, induziu o enraizamento de 35% das microestacas de *E. marginata*.

Entretanto, Bunn (2005), utilizando combinações de ANA e AIB para o enraizamento de microestacas de *E. impensa*, observou o enraizamento de 73% das plântulas, quando submetidas à combinação de 0,45 de ANA e 0,058 mg L⁻¹ de AIB. Segundo Souza et al. (2007), as auxinas mais comuns empregadas nos meios de enraizamento são ANA, AIB e AIA. A principal diferença entre elas, além da parte estrutural da molécula, é a estabilidade que decresce, onde a auxina ANA é mais estável que a auxina AIA, sendo assim, parte dos trabalhos de enraizamento *in vitro* utiliza as auxinas ANA e AIB.



FIGURA 3 Aspecto de uma brotação enraizada *in vitro* de *E. camaldulensis*, após 30 dias de cultivo (Barra 0,5 cm).

TABELA 5 Percentagem de enraizamento, número médio de raízes em brotações, número de folhas, comprimento médio da raiz principal (cm) e comprimento médio das plântulas (cm) de *Eucalyptus camaldulensis* obtido utilizando-se diferentes concentrações de auxina (0, 2x, 4x, 8x e 20x). Tratamentos (t1-t5) submetidos a 15 dias de escuro. Tratamentos (t6-t9) submetidos a fotoperíodo de 16 horas, durante os 30 dias de experimento.

	Ausência de luz					Presença de luz			
	t1	t2	t3	t4	t5	t6	t7	t8	t9
% enraizamento	100	70	70	90	80	50	100	50	60
Número médio de raízes	2,4 a	2,7 a	4,5 a	5,6 a	5,6 a	5,6 a	4,7 a	2,8 a	5,1 a
Número médio de folhas	13,3 a	12,1 a	11,8 a	13,0 a	17,2 a	15,0 a	15,4 a	13,0 a	14,1 a
Comprimento médio da raiz	2,7 a	1,5 a	2,8 a	3,5 a	1,3 a	1,4 a	3,5 a	3,5 a	2,7 a
Comprimento médio das plântulas	3,3 a	3,7 a	3,9 a	4,7 a	4,0 a	6 b	4,5 a	4,1 a	5,9 b

*Médias seguidas das mesmas letras na linha não diferem estatisticamente entre si, pelo Teste de Scott & Knott ($p>0,05$).

Para as concentrações de auxina utilizadas nos tratamentos, não foram observados calos na base das microestacas. Segundo Grattapaglia & Machado (1998), independente da fórmula estrutural da auxina, a excessiva concentração no meio de cultura pode ser tóxica e também favorecer a formação de calos na base das microestacas, comprometendo tanto a rizogênese como o crescimento da parte aérea.

Com relação ao número médio de raízes por planta, não houve diferença significativa para o fator concentração de auxina. Os maiores números de raízes por explante ocorreram quando as microestacas permaneceram na concentração de 8x e 20x de auxina por 12 horas em período de escuro e quando submetidas a fotoperíodo no tratamento controle, apresentando 5,6 raízes/microestaca (Tabela 5). O resultado mostra que, possivelmente, esta espécie apresenta concentrações suficientes de auxinas endógenas para a formação de raízes, provavelmente em virtude do acúmulo de auxinas provenientes das folhas ou gemas. Tal acúmulo resulta no aumento da atividade metabólica do tecido e, conseqüentemente, na formação de raízes (Wareing & Phillips, 1981).

O número médio de folhas e o comprimento médio da raiz principal não apresentaram diferenças significativas entre as médias dos tratamentos comparados. Portanto, as diferentes concentrações de auxina, bem como o período de escuro, não foram significativos para esta variável (Tabela 5). Quando se compararam os tratamentos controle, foi possível observar que houve uma tendência do tratamento submetido ao período de escuro formar raízes mais longas (Tabela 5), evidenciando que, na ausência de regulador de crescimento, é necessário um período de ausência de luz para o alongamento das raízes.

Nas diferentes concentrações de AIB testadas, a resposta do regulador só teve diferença significativa para a variável comprimento da plântula, em que os melhores resultados foram encontrados para os tratamentos 6 e 9, com comprimento médio de 6 cm e 5,9 cm, respectivamente (Tabela 5). Os melhores

resultados para esta variável foram encontrados quando o experimento foi conduzido em sala de crescimento sob fotoperíodo, mostrando que o crescimento da planta é totalmente dependente de luz. Esta resposta poderia estar relacionada com um melhor aproveitamento da radiação fotossinteticamente ativa, fazendo com que ocorresse uma melhor absorção de nutrientes do meio de cultura, após a formação das raízes. Além do mais, o aumento da intensidade luminosa durante os últimos estágios da fase de enraizamento pode facilitar a aclimatização e aumentar a sobrevivência das plântulas, uma vez que estimula a fotossíntese, o aumento da cera epicuticular e a melhoria da relação hídrica (Leite et al., 2000). Estes resultados também podem ser explicados pelo número médio de raízes encontrados para estes tratamentos, 5,6 e 5,16, respectivamente (Tabela 5), já que as raízes parecem ser os principais locais de biossíntese natural de citocininas, reguladores vegetais que estimulam o crescimento, o alongamento e a multiplicação da parte aérea.

Quando os explantes foram submetidos a um período de escuro, o tratamento 5, com concentração de 8x de auxina, apresentou o melhor resultado, com crescimento médio de 4,7 cm, para esta condição de cultivo.

Diante dos resultados obtidos, pode-se observar que, entre os tratamentos avaliados, t1 e t7 foram considerados os mais indicados para o enraizamento *in vitro* de *E. camaldulensis*, por proporcionarem o enraizamento de 100% das plântulas sem regulador de crescimento ou com uma concentração baixa no meio de cultura, levando, assim, a uma redução dos custos no processo.

Experimento 4: Aclimação das plantas. Todas as plântulas que apresentaram raiz no experimento anterior passaram para fase de aclimatização. As 67 plantas foram aclimatizadas por 15 dias em câmara de nebulização, sendo observado, após este período, 76% de sobrevivência (Figura 4). Resultados inferiores foram encontrados por Bennett & McComb (1982), que aclimatizaram

plântulas de *E. marginata* em sala de crescimento com uma mistura de areia e turfa estéreis, na proporção de 3:1. A umidade foi reduzida gradativamente e, após quatro semanas, a sobrevivência foi avaliada sendo encontrado um valor médio de 50%. Já resultado superior foi encontrado por Bandeira et al. (2007) que, avaliando a aclimatização em casa de vegetação de clones de *Eucalyptus urophylla* x *E. grandis* enxertados *in vitro*, observaram a sobrevivência de 87% das plantas.

O sistema radicular, bem como o comprimento da parte aérea e o número de folhas, foi observado após a aclimatização, tendo sido encontrados números médios de 4,2 raízes/planta e comprimento de 2,6 cm. As plantas que apresentavam, antes da aclimatização, uma única raiz, sendo esta longa, não foram capazes de sobreviver, quando transferidas para o substrato em condição *ex vitro*. O resultado indica que a espécie não possui grande capacidade de enraizamento de estacas, pois, após a morte da raiz, outras não foram originadas, levando as plantas à morte. Provavelmente, isso se deve ao longo comprimento das raízes na ocasião do transplântio, ocasionando maiores danos quando as plântulas foram removidas do meio de cultura e transplântadas para substrato.

Segundo Debergh & Maene (1981), apenas em algumas espécies as raízes produzidas *in vitro* são funcionais e não morrem após transferidas para a condição *ex vitro*. Para Grattapaglia & Machado (1990), o sucesso do transplântio é determinado pelo tipo do sistema de raízes obtido no enraizamento *in vitro*. As raízes mais curtas são as mais adequadas, uma vez que se apresentam em fase de crescimento ativo, facilitando a sobrevivência da planta, conforme demonstrado neste trabalho.



FIGURA 4 Processo de aclimatização em câmara de nebulização de plântulas de *E. camaldulensis* enraizadas *in vitro*, após 15 dias de aclimatização (Barra 0,5 cm).

O tamanho médio da parte aérea foi de 5 cm e não foram observadas alterações fenotípicas. As plantas aclimatizadas apresentaram um número médio de 9,7 folhas, com coloração verde intenso. Não foi observada murcha das folhas, indicando que as plantas sofreram menor estresse no processo de aclimatização. Essa ocorrência pode estar relacionada com a alta umidade dentro da câmara de nebulização, o que faz com que as folhas permaneçam úmidas, levando à redução da taxa de transpiração e evitando-se, dessa forma, a desidratação das plantas.

Antes da transferência das plantas para aclimatização, estas apresentavam tamanho médio de 4,2 cm, com média de 13,8 folhas/plântula. Possivelmente, após a aclimatização, o número de folhas se apresentou menor devido à ciclagem natural dos elementos, os quais podem ter sido utilizados durante o crescimento, quando as plantas aclimatizadas estavam 0,8 cm maiores do que no início da

aclimatização. Estes resultados demonstram que a aclimatização de plântulas em câmara de nebulização é eficiente, por apresentar um índice elevado de sobrevivência e proporcionar o metabolismo efetivo ao se obter as plantas aclimatizadas, o que pode ser comprovado pela sobrevivência das plântulas após 45 dias da aclimatização (Figura 5).



FIGURA 5 Plantas de *E. camaldulensis*, após 45 dias de aclimatização.

CONCLUSÕES

O meristema com tecido adjacente favoreceu um maior número de brotos/explante, no final dos 60 dias de avaliação.

Entre os biorreatores avaliados, o sistema de imersão contínua no escuro proporcionou maior número de brotações e maior taxa de multiplicação, o que indica ser este o mais apropriado para propagação de *E. camaldulensis*.

Para o enraizamento *in vitro* de *E. camaldulensis*, o meio de cultura sem auxina, submetido a escuro por 15 dias e meio de cultura suplementado com 2x de auxina, permanecendo na presença de luz, proporcionaram o enraizamento de 100% das plântulas.

A aclimatização de plântulas de *E. camaldulensis* é eficiente por apresentar alta taxa de sobrevivência (76%).

Foi possível micropropagar a espécie *E. camaldulensis* utilizando-se, como explante, tecido meristemático.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVARD, D.; COTE, F.; TEISSON, C. Comparison of methods of liquid médium culture for banana micropropagation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Oxford, v. 32, p. 55-60, 1993.

ANDRADE, W.F.; ALMEIDA, M.; GONÇALVES, A.N. Multiplicação *in vitro* de *Eucalyptus grandis* sob estímulo com benzilaminopurina. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 12, p. 1715-1719, 2006.

ASSIS, T.F. de; TEIXEIRA, S.L. Enraizamento de plantas lenhosas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI / EMBRAPA-CNPq, 1998. p. 261-296.

BANDEIRA, F.S.; XAVIER, A.; OTONI, W.C.; LANI, E.R.G. Aclimatização *ex vitro* de plantas pela enxertia *in vitro* de clones de *Eucalyptus urophylla* x *E. grandis*. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 31, n. 5, p. 773-781, 2007.

BENNETT, I. J.; MCCOMB, J.A. Propagation of Jarrah (*Eucalyptus marginata*) by organ and tissue culture. **Australian Forestry Research**, Austrália, v. 12, p. 121-127, 1982.

BRIAN, K.M.; BASSUK, N.L. Etiolation and banding effects on adventitious root formation. In: DAVIS, T.D.; HAISSIG, B.E.; SANKHLA, N. **Adventitious root formation in cuttings**. New York: Dioscorides, 1988. v. 2, p. 30-46.

BUNN, E. Development of *in vitro* methods for *ex situ* conservation of *Eucalyptus impensa*, an endangered mallee from southwest Western Australia. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Oxford, v. 83, p. 97-102, 2005.

CARVALHO, G.R.; PASQUAL, M.; RESENDE, E.; SCARANDE, E.; CARVALHO, G.R. Aclimatização de plântulas de cafeeiro (*Coffea arabica* L.) propagadas in vitro. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 223, n. 3, p. 483-490, 1999.

DEBERGH, P.C.; MAENE, L.J. A scheme for the commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 14, p. 335-334, 1981.

FERREIRA, D.F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. **Anais...** São Carlos: UFSCar, 2000. p. 225-258.

FERREIRA, D.F. **Estatística básica**. Lavras: UFLA, 2005. 664 p.

GAMBORG, O.L.; MILLER, R.A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**, New York, v. 50, n. 1, p. 151-158, 1968.

GATICA, A.A.M.; ARRIETA-ESPINOZA, G.; ESQUIEVEL, A.M.E. Plant regeneration via indirect somatic embryogenesis and optimisation of genetic transformation in *Coffea arabic* L. cvs. Caturra and Catuaí. **Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaíso, v. 11, n. 1, p. 1-12, 2008.

GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture: part 2: in practice**. 2.ed. Edington: Exejetics, 1996. 1361 p.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPH, 1998. v. 1, p. 43-76.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPH, 1990. p. 99-170.

- ITO, K.; DOI, K.; TATEMACHI, Y.; SHIBATA, M. Plant regeneration of *Eucalyptus* from rotating nodules cultures. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 16, p. 42-45, 1996.
- LEITE, G.B.; FINARDI, N.; FORTES, G.R.L. Efeitos de concentrações de sacarose no meio de cultura e da intensidade luminosa no enraizamento *in vitro* do portaenxerto de pereira OH X F97. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 24, n. 2, p. 353-357, 2000.
- LEMO, E.E.P.; FERREIRA, M.S.; ALENCAR, L.M.C.; OLIVEIRA, J.G.L.; MAGALHÃES, V.S. Micropropagação de clones de banana cv. Terra em biorreatore de imersão temporária. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, n. 3, p. 482-487, 2001.
- PASSOS, I.R.S.; SONDAHL, M.R.I.; RIBEIRO, I.J.A.; TERRA, M.M.; PIRES, E.J.P. Cultura *in vitro* de meristemas de videira: I. concentrações do hormônio 6-BA em meio primário. **Bragantia**, Campinas, v. 44, n. 1, p. 473-479, 1985.
- SILVA, A.B.; PASQUAL, M.; TEIXEIRA, J.B.; ARAÚJO, A.G. Métodos de micropropagação de abacaxizeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 9, p. 1257-1260, 2007.
- SOUZA, A.V.; PEREIRA, A.M.S. Enraizamento de plantas cultivadas *in vitro*. **Revista Brasileira PI Med**, Botucatu, v. 9, n. 4, p. 103-117, 2007.
- TANTOS, Á.; MÉSZÁROS, A.; FARKAS, T.; SZALAI, J.; HOVÁRTH, G. Triacontanol-sipported micropropagation of woody plans. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 20, p. 16-21, 2001.
- XAVIER, A.; COMÉRCIO, J. Microestaquia: uma maximização da micropropagação de *Eucalyptus*. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 20, p. 9-16, 1996.
- XAVIER, A.; WENDLING, I. Miniestaquia na clonagem de *Eucalyptus*. Viçosa: SIF, 1998. 10 p.
- WAREING, P.F.; PHILLIPS, I.D.J. **Growth and differentiation in plants**. 3.ed. Oxford, England: Pergamon, 1981. 343 p.

3 OBTENÇÃO DE CALOS E TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE *Eucalyptus camaldulensis*

(Preparado para ser submetido à revista “In Vitro Plant”)

Mendonça, E.G¹.; Paiva, L.V¹.; Santos, B.R².; Beijo, L.A³.; Lima, C.D.F¹.

- 1- Laboratório Central de Biologia Molecular, Universidade Federal de Lavras, MG 37200-000, Brasil.
- 2- Departamento de Ciências Biológicas e da Terra, Universidade Federal de Alfenas, MG 37130-000, Brasil.
- 3- Departamento de Ciências Exatas, Universidade Federal de Alfenas, MG 37130-000, Brasil.

*Correspondência do autor: Tel.: +55-35-38291172

E-mail: evaniafloresta@hotmail.com

RESUMO

O *Eucalyptus* se destaca no cenário da silvicultura no Brasil e no mundo, devido à sua adaptabilidade e à rapidez no crescimento, aliadas à produção de fibras e polpa de madeira de alta qualidade a um baixo custo. Devido à sua grande importância, a implementação de técnicas de melhoramento baseadas em métodos de transformação genética permitirá reduzir os longos ciclos de melhoramento e evitar a manipulação de árvores adultas. Os sistemas de transformação genética requerem protocolos de regeneração que permitam obter plantas transgênicas a partir de grupos de células transformadas. Nesse sentido, a otimização de um protocolo eficiente de regeneração pode fornecer subsídios ao processo de estabelecimento *in vitro*. No presente trabalho, foram utilizados fragmentos foliares com a finalidade de avaliar a indução de calogênese, determinar a curva de crescimento de calos e otimizar o protocolo de transformação genética de folhas e calos via cocultivo com *A. tumefaciens*. Foram avaliados dois diferentes meios de calogênese. O meio de cultivo LCBM-4, suplementado com auxina, citocinina, água de coco e com concentração de nitrogênio reduzida, proporcionou os melhores valores para massa fresca, seca e volume. Observou-se um aspecto sigmoide da curva de crescimento de matéria fresca dos calos, com cinco fases distintas. A transformação genética das folhas proporcionou a observação de expressão transiente do gene *gus*, utilizando a técnica de agrobiobalística, não havendo diferenças significativas entre os tempos de infecção. Os calos infectados por *A. tumefaciens* apresentaram expressão transiente nos tempos analisados. Com base nos resultados encontrados, foi possível estabelecer um protocolo de regeneração por meio de explantes foliares de *E. camaldulensis* inoculados com *A. tumefaciens*.

Palavras-chave: calogênese, curva de crescimento, eucalipto, transformação genética

INTRODUÇÃO

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

As indústrias brasileiras que utilizam o eucalipto como matéria-prima para a produção de papel, celulose e demais derivados representam 4% do Produto Interno Bruto, 8% das exportações e geram, aproximadamente, 150 mil empregos. A produção brasileira concentra-se em Minas Gerais e em São Paulo, os quais lideram a produção nacional; em seguida, com menor produção, estão os estados do Paraná e Santa Catarina, devido às restrições climáticas para o gênero (Sociedade Brasileira de Silvicultura, SBS, 2007).

O melhoramento genético e as práticas silviculturais contribuíram significativamente para o aumento da produtividade em plantios florestais e para o ganho genético em espécies de grande valor econômico. A aplicação de métodos de melhoramento genético convencional, por sua vez, apresenta limitações, devido ao longo ciclo reprodutivo das espécies arbóreas e à dificuldade em conseguir melhorias significativas em caracteres complexos, tais como propriedades da madeira, tolerância a pragas e doenças e estresses abióticos (Nehra et al., 2005).

Neste aspecto, os sistemas de cultura *in vitro* e engenharia genética oferecem oportunidades de produzir novos genótipos de interesse para a indústria florestal por meio de processos como mutagênese e variação somaclonal (Confalonieri et al., 2003). Para estes estudos, torna-se necessário o conhecimento do comportamento das espécies nas condições *in vitro*.

Nesse sentido, as espécies de eucalipto têm sido amplamente pesquisadas, com resultados significativos, sendo a organogênese indireta uma das técnicas

mais utilizadas na micropropagação, por proporcionar uma alta taxa de brotos a partir de calos (Lainé & David, 1994; Moralejo et al., 1998).

Os eventos organogênicos ocorrem mediante a desdiferenciação e a rediferenciação celular, dependendo da retomada da atividade meristemática em células maduras diferenciadas ou em um tecido calogênico desorganizado. O processo de organogênese *in vitro* é complexo, com atuação de múltiplos fatores externos e internos, envolvendo interação entre fonte de explante, meio de cultura e fatores do ambiente (Joy IV & Thorpe, 1999).

Este processo depende, também, da ação de reguladores de crescimento exógenos, em particular auxinas e citocininas, e da habilidade do tecido em responder a essas mudanças hormonais, durante o período de cultivo (Alves et al., 2004). A maior vantagem de se utilizar a organogênese indireta como ferramenta para a produção de massa clonal e regeneração de plantas é o seu potencial de desenvolver altas taxas de multiplicação, reproduzindo grandes quantidades de plantas uniformes (Arenhart & Zaffari, 2008).

Diversas espécies de *Eucalyptus* têm sido regeneradas por meio da organogênese indireta, dentre elas *Eucalyptus gunnii* (Hervé et al., 2001), *E. grandis* x *E. urophylla* (Alves et al., 2004), *E. camaldulensis* (Rahim et al., 2003, Dibax et al., 2005), *E. erythronema* e *E. stricklandii* (Glocke et al., 2006).

Aliada as técnicas de micropropagação *in vitro* e com a finalidade de atender à demanda do setor florestal, a transformação genética em plantas lenhosas tem despertado atenção. A transformação genética utiliza duas estratégias para realizar a transferência de genes em plantas: forma direta e indireta. Na transferência direta, o principal método é o da biobalística e, na transferência indireta, utiliza-se um vetor para promover a transferência do gene, e o principal vetor utilizado atualmente é a *Agrobacterium tumefaciens*. Uma variação da tecnologia de biobalística é a utilização dessa técnica em associação com a transformação via *Agrobacterium*. A técnica tem a vantagem de aumentar

a frequência de transformantes, uma vez que os microferimentos não prejudicam a célula vegetal e são suficientes para a indução da transferência do T-DNA. Atualmente, este novo método de transformação é conhecido como agrobiobalística (Bidney et al., 1992; Brasileiro et al., 1996).

Considerando a transformação genética entre as espécies do gênero *Eucalyptus*, o *E. camaldulensis* foi a primeira espécie utilizada para estudos de transformação genética via *Agrobacterium tumefaciens* e, atualmente, é a mais pesquisada devido à sua relevância econômica e à facilidade de regeneração (Ho et al., 1998; Chen et al., 2003).

Dessa forma, métodos eficientes para a regeneração de clones selecionados pela via organogênica, utilizando como explante folha de material rejuvenescido, podem constituir uma alternativa de multiplicação vegetativa, além de atender a programas de transformação genética. Assim, os objetivos para a realização do presente estudo foram desenvolver um sistema de transformação genética utilizando a técnica de agrobiobalística, via cocultivo com *Agrobacterium tumefaciens*; avaliar os efeitos da água de coco e da redução do nitrogênio na indução de calos organogênico de *E. camaldulensis* e determinar a curva de crescimento dos calos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Os estudos propostos foram conduzidos no Laboratório Central de Biologia Molecular (LCBM) da Universidade Federal de Lavras, em Lavras, MG. Os experimentos foram instalados em sala de crescimento, sob fotoperíodo de 16 horas, com irradiância de $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fornecida por luz branca fria, à temperatura de $27 \pm 2^\circ\text{C}$.

Experimento 1: Efeito da água de coco e da redução do nitrogênio na calogênese de explantes foliares de *E. camaldulensis*. Para a indução de calos foram utilizados segmentos de folhas de *Eucalyptus camaldulensis*, com tamanho médio de 1 cm², provenientes de partes aéreas de plântulas estabelecidas *in vitro*. Os segmentos foliares foram inoculados com a parte abaxial em contato com o meio de cultura em placas de Petri contendo 50 mL de meio de cultura e vedadas com filme PVC. Foram efetuados cortes nas superfícies laterais do explante, favorecendo o contato com o meio nutritivo.

Com a finalidade de avaliar o efeito da redução do nitrogênio e da água de coco na calogênese, dois tratamentos foram realizados. Estes foram mantidos na ausência de luz, por 30 dias (Fase 1) e, posteriormente, transferidos para condição de luz, por outros 30 dias (Fase 2).

No tratamento 1, os explantes foram inoculados em meio de cultura LCBM-4 suplementado com auxina e citocinina. O tratamento 2 foi composto pelo meio de cultura LCBM-4 suplementado com citocinina, auxina, água de coco e com a concentração de nitrogênio reduzida. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com cinco repetições de dez explantes cada. Foram avaliadas as variáveis massa fresca e seca, volume do calo e porcentagem de área do explante, com formação de calo (score), conferindo as seguintes notas: 0 – ausência de calo, 1 – 25% de calogênese, 2 – 50% de calogênese, 3 – 75% de calogênese e 4 – 100% de calogênese. As variáveis massa fresca e seca foram analisadas pelo teste de Tukey e o score foi analisado pelo teste de Mann-Whitney (Ferreira, 2005), ambos a 5% de significância.

Experimento 2: Estabelecimento da curva de crescimento de calos de *E. camaldulensis*. Para a obtenção da curva de crescimento, segmentos de folhas jovens de plantas cultivadas *in vitro* em sala de crescimento foram utilizados como explantes. Os segmentos foliares com, aproximadamente, 1,0 cm² foram

inoculados em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio de cultura LCBM-4 suplementado com citocinina, auxina, água de coco e com a concentração de nitrogênio reduzida. O experimento foi conduzido em sala de crescimento, a $27\pm 2^{\circ}\text{C}$, na ausência de luz.

As avaliações para fins de obtenção da curva de crescimento foram realizadas a partir do primeiro dia da inoculação (tempo 0), até o 99^o dia, com intervalos entre as pesagens de 9 dias, gerando 12 pontos de análise. Foram inoculados 50 tubos de ensaio e, destes, 10 foram selecionados para acompanhamento do peso fresco. Os calos foram cuidadosamente colocados em placa de Petri estéril, vedada com filme PVC, mantendo-se, assim, a condição asséptica para que eles pudessem retornar ao meio de cultura. Os calos foram pesados com auxílio de uma balança de precisão, tendo as análises sido realizadas a partir do peso fresco dos 10 mesmos calos.

O percentual de crescimento dos calos foi determinado segundo a equação determinada por Lameira et al. (1996):

$$\% \text{ crescimento} = \frac{P_f - P_i}{P_f} \times 100$$

sendo P_i = peso inicial e P_f = peso final de calos

A taxa de crescimento foi calculada de acordo com Teixeira et al. (2004), pela seguinte fórmula:

$$\text{TCM} = \frac{\ln P_f - \ln P_i}{t}$$

sendo TCM = taxa de crescimento médio; ln = logaritmo neperiano; P_f = peso final da matéria fresca; P_i = peso inicial da matéria fresca e t = o período de cultivo, em dias.

Experimento 3: Transformação genética. Foram realizados dois experimentos de transformação, utilizando como vetor *Agrobacterium tumefaciens*. No primeiro experimento, foi realizada a técnica de agrobiobalística, utilizando tecidos foliares e, no segundo, procedeu-se à inoculação direta em calos com agrobactéria. Nos experimentos, utilizou-se a linhagem de *Agrobacterium tumefaciens* EHA 105 contendo o vetor *pCambia 3301*, com a construção 35S::GUS::NOS, contendo o gene repórter *gus* e o gene marcador de seleção *bar*, cujo agente seletivo é a fosfonitrocina. Para o experimento de transformação, a agrobactéria foi inoculada em meio LB líquido (NaCl 10 mg L⁻¹, extrato de levedura 5 mg L⁻¹, triptona ou peptonas 10 mg L⁻¹), na presença do antibiótico kanamicina (50 mg L⁻¹), a 28°C “overnight”, sob agitação constante (200 RPM).

- Transformação por agrobactéria. A técnica utilizada foi a transformação por agrobiobalística, na qual o bombardeamento com micropartículas foi utilizado como método auxiliar para causar macro e microferimentos nos tecidos, com o objetivo de aumentar a eficiência da transformação via *Agrobacterium*. O bombardeamento foi realizado por meio do acelerador de partículas descrito por Sanford et al. (1991), sendo utilizadas micropartículas de tungstênio M10 (GTE Sylvania Chemicals/Metals), cujo preparo baseou-se no sistema desenvolvido no Laboratório de Biobalística do Cenargen-Embrapa (Aragão et al., 1996). A pressão de gás hélio utilizada no experimento foi de 1200 PSI e a distância de vôo das micropartículas foi de 9,5 cm, sendo realizado 1 tiro por repetição. Os explantes foliares foram cortados em, aproximadamente, 1,0 cm², bombardeados com partícula nula e colocados em contato com a cultura bacteriana em 0, 4, 6 e 8 minutos, sob agitação. A densidade óptica utilizada (D.O. A_{600nm}) foi de 0,95. Após o contato com a bactéria, os explantes foram levemente secos em papel toalha estéril. Os explantes foram cocultivados com a bactéria por 5 dias e, após este período, a eficiência do protocolo foi avaliada por meio da expressão do gene

gus por reação catalisada pela β -glucuronidase, na presença de X-gluc (Jefferson, 1987). Para a análise, foram retirados dois explantes, aleatoriamente, de cada placa de Petri, totalizando 10 explantes por tratamento, sendo estes imersos em solução composta por 10 mM Na₂EDTA.H₂O, 0,1% Triton X-100, 0,1 mM NaH₂PO₄, 0,5 mM K₄Fe(CN)₆, e 250 μ g mL⁻¹ de X-gluc e incubados, a 37°C, por um período de, aproximadamente, 16 horas. Após o período de reação, os explantes foram transferidos para etanol, com a finalidade de se retirar a clorofila de tecidos verdes e permitir uma melhor visualização da coloração azul. A avaliação da expressão *gus* foi feita com o auxílio do estereoscópio Olympus SZH10, com máquina fotográfica Canon Power Shot A620 acoplada. Os pontos azuis, referentes aos ferimentos realizados pelo bombardeamento com partícula de tungstênio, foram contados e as imagens foram registradas digitalmente.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 5 repetições contendo 10 explantes cada, totalizando 50 explantes por tratamento. A análise do experimento realizada pelo Teste de Scott-Knott, a 5% (Ferreira, 2005).

-Transformação de calos. Com a finalidade de se obter os calos para transformação, explantes foliares de 1 cm² foram inoculados em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio de cultura LCBM-4 suplementado com citocinina, auxina, água de coco e com a concentração de nitrogênio reduzida. Os explantes foram cultivados na ausência de luz até a formação de calos (aproximadamente 30 dias). O cultivo da *A. tumefaciens* e a metodologia de transformação foram realizados segundo protocolo desenvolvido por Cruz et al. (2004). A densidade óptica utilizada para transformação dos calos foi de 0,2, sendo este valor obtido após centrifugação do inóculo e diluição do pellet em meio líquido LB. Os tempos de inoculação dos calos com *A. tumefaciens* foram de 0, 15 e 30 minutos; após a inoculação, os calos foram secos em papel toalha estéril e colocados em

placa de Petri contendo meio de regeneração LCBM-4 suplementado com citocinina, auxina, água de coco e com a concentração de nitrogênio reduzida, permanecendo por 5 dias na ausência de luz para cocultivo. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 3 repetições por tratamento e cada repetição foi composta por 20 calos de 150 mg cada.

Após o cocultivo, uma repetição foi utilizada para verificar a expressão do gene *gus* (ensaio realizado como experimento anterior). As demais repetições foram transferidos para meio de regeneração na presença de 500 mg L⁻¹ do antibiótico Timentin[®], permanecendo até a regeneração das brotações. As brotações que apresentaram ±0,5 cm de comprimento foram transferidas para meio de cultura LCBM-1 suplementado com 500 mg L⁻¹ do antibiótico Timentin[®] + 0,006 mg mL⁻¹ (6PPT) do herbicida Finale[®]. Após 15 dias, os explantes foram transferidos para um novo meio LCBM-1 na presença de 500 mg L⁻¹ de Timentin[®] + 0,009 mg mL⁻¹ do herbicida Finale[®] (9PPT), onde permaneceram até o momento da avaliação. Foram avaliados o número de brotos/calos e o número de explantes que sobreviveram à seleção, até o momento da avaliação, após 30 dias de cultivo em meio seletivo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Experimento 1: Efeito da água de coco e do nitrogênio na calogênese. A presença de calos foi detectada 20 dias após a inoculação, tanto para os explantes do tratamento 1 quanto do tratamento 2. A partir do 30^a dia, quando os explantes foram levados para sala de cultivo na presença de luz, o experimento 1 apresentou desenvolvimento inferior em relação aos explantes do experimento 2, mantendo esta característica até a avaliação final, aos 60 dias. Considerando a proporção de recobrimento da área do explante, não foram observadas diferenças

estatísticas na formação de calos, a 5% pelo Teste de Mann-Whitney; para os experimentos 1 e 2, a média da formação de calos foi 3, correspondendo a 75% da área dos explantes coberta por calos (Tabela 1).

TABELA 1 Valores médios das características: score, massa fresca, massa seca e volume de calos de *E. camaldulensis*, em função da calogênese.

Tratamento	Formação de calos (score)	Massa fresca média (g)	Massa seca média (g)	Volume médio (mm ³)
Tratamento 1	3,40 a	1,56 a	0,32 a	2,22 a
Tratamento 2	3,18 a	2,50 b	0,49 b	3,20 b

*Médias seguidas de letras diferentes na coluna, diferem estatisticamente entre si, pelo Teste de Mann-Whitney (score) e Tukey ($p > 0,05$).

As características massa fresca, massa seca e volume dos calos foram influenciadas pela redução do nitrogênio e pela adição de água de coco no meio de cultura, sendo observadas diferenças significativas entre os tratamentos pelo Teste de Tukey ($p > 0,05$). Os melhores resultados foram encontrados para o tratamento 2, que apresentou melhores médias, indicando que a inoculação dos explantes no meio de cultura com metade da concentração original de nitrogênio e suplementado com água de coco proporcionou maior absorção de água e melhor desenvolvimento dos calos durante esse período. Ao final de 60 dias, os calos apresentavam um teor de umidade de 80% no tratamento 1, contra 66% no tratamento 2. O efeito estimulatório da água de coco no tratamento 2 pode ser explicado pelo fato de este aditivo ser rico em glicose e frutose, sais minerais, mioinositol, citocininas, bem como nucleotídeos e outros compostos orgânicos (Ferreira et al., 1998), os quais são necessários para o processo de formação e desenvolvimento dos calos.

Com relação à influência do nitrogênio, sabe-se que tanto a morfogênese quanto o crescimento em culturas *in vitro* são sensivelmente influenciados pela disponibilidade de N e pela forma como é fornecido (NH_4^+ ; NO_3^-) e, apesar de os mecanismos não estarem perfeitamente elucidados, um suprimento de N parece ser benéfico para a formação da parede celular e a atividade dos reguladores de crescimento. Portanto, a redução das concentrações de N fornecidas no meio de cultura pode ter favorecido uma maior assimilação dos reguladores de crescimento, proporcionando os melhores resultados de calogênese observados no tratamento 2.

O tratamento 2 proporcionou a produção de calos mais volumosos, sendo estes os mais indicados para um subcultivo, por apresentarem maiores massas fresca e seca. O valor para massa seca observado no tratamento 2 (0,49 g) foi 35% maior que no tratamento 1 (0,32 g), indicando que, no tratamento 2, os calos possuem mais carbono e outras partículas sólidas armazenadas. Presume-se que a maior parte do carbono seja acumulada nas células na forma de amido, que funciona como uma reserva de energia requerida para a morfogênese, uma vez que desaparece rapidamente quando os meristemoides ou os primórdios foliares são formados. Consequentemente o processo de calogênese observado no tratamento 2 tem maiores possibilidades de proporcionar a propagação em massa de *E. camaldulensis*, visto que a cultura de calos é um pré-requisito para a transformação genética de plantas.

Experimento 2: Curva de crescimento de calos de *Eucalyptus camaldulensis*.

O aspecto geral da formação de calos induzidos *in vitro* com base em segmentos foliares de *E. camaldulensis* inoculados em meio de cultura LCBM-4 suplementado com citocinina, auxina, água de coco e com a concentração de nitrogênio reduzida, está exemplificado na Figura 1, desde a inoculação até 99 dias de cultivo.

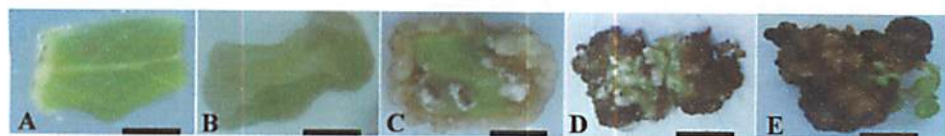


FIGURA 1 Aspecto geral de calos de *E.camaldulensis* formados a partir de segmentos foliares inoculados *in vitro* em meio de cultura LCBM-4 suplementado com citocinina, auxina, água de coco e com a concentração de nitrogênio reduzida. A-após inoculação, B-9 dias, C-36 dias, D-72 dias, E-99 dias (Barra 5 mm).

Os resultados referentes às avaliações de crescimento podem ser observados no Figura 2. Os gráficos referentes a peso médio dos calos (Figura 2A), percentual de crescimento (Figura 2B) e taxa de crescimento médio (Figura 2C) se referem a dados de crescimento real, já que os mesmos calos foram pesados em todos os 12 pontos, durante o experimento. A curva de crescimento dos calos apresentou um padrão tipo sigmoide, com tendência de ganho de matéria fresca em função do aumento do tempo de cultivo. No período analisado (99 dias de cultivo), foi observada a presença de cinco fases de crescimento distintas (lag, exponencial, linear, desaceleração e declínio), não sendo detectada a fase estacionária. Esse tipo de curva de crescimento sigmoide já foi observado em outras espécies de plantas lenhosas, como castanha-do-brasil (Serra, 2000), cafeeiro (Santos et al., 2003) e sangra-d'água (Lima et al., 2007).

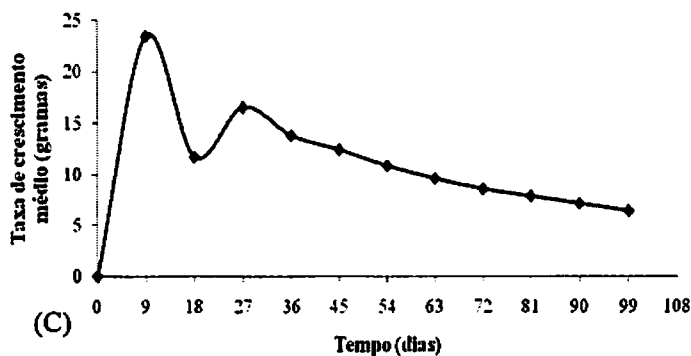
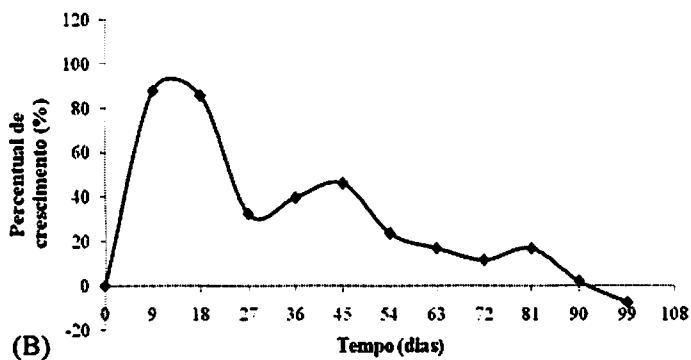
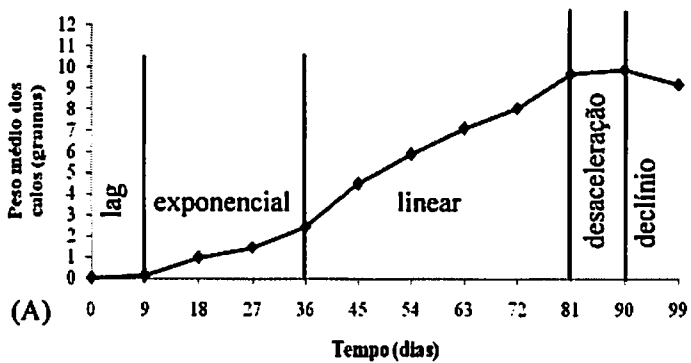


FIGURA 2 Curvas de crescimento indicando o crescimento e o desenvolvimento de calos de *Eucalyptus camaldulensis*. A – Peso médio (gramas/dia); B – Percentual de crescimento; C – Taxa de crescimento médio (gramas/dia).

A fase lag, na qual as células do explante preparam-se para a divisão celular, acumulando biomassa, ocorreu até o 9^o dia de inoculação, período em que foram observados a maior taxa de crescimento 0,23 gramas/dia e o maior percentual de crescimento de 87% (Figura 2). Vários estudos têm demonstrado que o período da fase lag varia de acordo com a espécie estudada. Em estudos da curva de crescimento de calos obtidos por meio de segmentos foliares de pequiheiro (*Caryocar brasiliense* Camb), Landa et al. (2000) verificaram a ocorrência da fase lag até o 7^o dia de cultivo. Serra et al. (2000), no entanto, observaram a ocorrência desta fase até o 30^o dia após a inoculação de segmentos foliares de castanheira-do-brasil (*Bertholletia excelsa*).

A fase de crescimento exponencial, período em que ocorre a máxima divisão celular, ocorreu entre o 9^o e o 36^o dias após inoculação, com taxa de crescimento médio de 0,14 gramas/dia e percentual de crescimento de 40%. O resultado está de acordo com o encontrado por Landa et al. (2000), que observaram essa fase entre o 7^o e o 35^o dia de cultivo, em calos de segmentos foliares de pequiheiro. Segundo Shimizu et al. (1977), a fase lag pode ser considerada como a fase produtora de energia e a fase exponencial como fase biossintética. Dessa forma, sugere-se que a repicagem dos calos destinados à transformação genética seja realizada nesta fase, estando as células em máxima atividade metabólica, tornando-se, assim, mais aptas à transformação via *A. tumefaciens*.

O período de crescimento linear, em que ocorre diminuição da divisão e aumento da área celular, foi observado entre o 36^o e o 81^o dia de cultivo, apresentando taxa de crescimento de apenas 0,08 gramas/dia, correspondendo a 17%. Entretanto, Lima et al. (2007) observaram que a fase linear da curva de crescimento para explantes foliares de sangra-d'água (*Croton urucurana*) ocorreu somente entre o 70^o e o 98^o dia de cultivo. Resultado semelhante foi observado

por Santos et al. (2003) que obtiveram essa fase entre o 77^a e o 88^a dia de cultivo de explantes foliares de *Coffea arabica*.

O intervalo de desaceleração do crescimento foi observado entre o 81^a e o 90^a dia de inoculação, com uma taxa de crescimento de apenas 0,07 gramas/dia, representando 2% do crescimento. Segundo Smith (1992), é nessa fase que os calos devem ser repicados, em razão, principalmente, da redução de nutrientes, da secagem do ágar ou, mesmo, do acúmulo de substâncias tóxicas no meio de cultura, que ocorre como consequência da redução do oxigênio no interior das células. Nesse contexto, os resultados indicam que a repicagem de calos provenientes de folhas de *E. camaldulensis* deve ser efetuada antes do início da fase de desaceleração, ou seja, aos 72 dias de cultivo, a fim de que não haja comprometimento da multiplicação e da divisão celular. Resultado semelhante foi encontrado por Lima et al. (2007) que estudaram a curva de crescimento de calos de sangra-d'água (*Croton urucurana*) e também recomendam que a repicagem seja feita próximo aos 70 dias após inoculação. O crescimento dos calos para a espécie chegou à fase estacionária entre o 75^a e 90^a dia de inoculação, com apenas 3% de crescimento neste período.

Observou-se a fase de declínio a partir do 90^a dia até a última avaliação, aos 99 dias de cultivo dos calos obtidos a partir de segmentos foliares de *E. camaldulensis*, havendo, neste período, perda de massa, ocasionando uma queda de 7,4% no crescimento.

Os resultados apresentados pela curva de crescimento de calos de *E. camaldulensis* formados com base em segmentos foliares indicam que o alto percentual de crescimento alcançado da fase lag ao 9^a dia de cultivo está associado ao rápido crescimento da espécie, o qual, possivelmente, se deve à ocorrência de um ciclo celular também rápido.

Experimento 3: Transformação genética. A influência de diferentes tempos de inoculação na transformação genética de *E. camaldulensis* utilizando a técnica de agrobiobalística no tecido foliar foi avaliada por meio de expressão transiente da enzima β -glucuronidase em explantes foliares, em que foi considerado resultado positivo o surgimento de pintas com coloração azul (Figura 3).

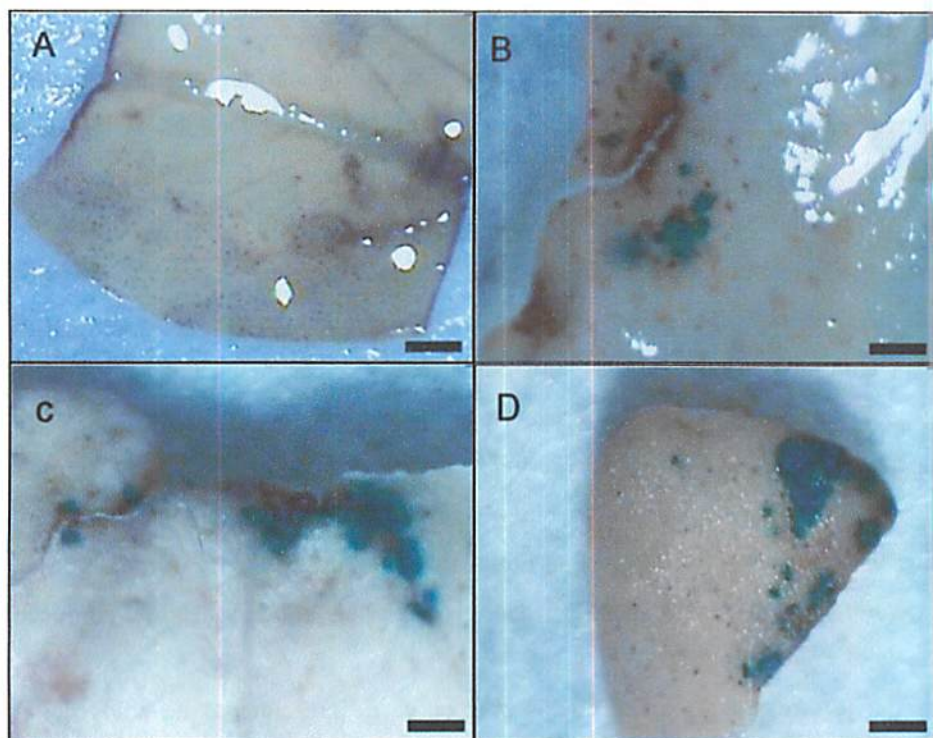


FIGURA 3 Expressão transiente do gene *gus* em folhas de *E. camaldulensis*, após cocultura em $OD_{600nm} = 0,95$. (A) Folha não inoculada; (B) Folha exibindo expressão do gene *gus* – inoculação 4 minutos; (C) Folha exibindo expressão do gene *gus* – inoculação 6 minutos; (D) Folha exibindo expressão do gene *gus* – inoculação 8 minutos (Barra 1mm).

Os resultados com base na expressão transiente da β -glucuronidase em relação aos tempos de infecção estão representados na Figura 4. Foi possível observar que a expressão do gene *gus* não foi afetada pelo tempo de inoculação, não havendo diferença significativa, a 5%, pelo Teste de Skott-Knott. Considerando-se a eficiência do protocolo, em que a pressão de disparo utilizada foi de 1200 PSI, os resultados indicam maior expressão transiente do gene *gus* quando os explantes foram submetidos à infecção por 8 minutos, com média de 45 pontos de expressão por explante. Como a expressão do gene foi observada após 5 dias de inoculação, os resultados encontrados correspondem a uma expressão transiente do gene, havendo uma tendência de redução da expressão até que o gene seja inserido de forma estável no genoma. Na literatura existe uma série de relatos sobre taxas da conversão de expressão transitória para expressão estável. Finer & McMullen (1990) observaram conversão menor, de 1%, enquanto Klein et al. (1998) constataram 5% de expressão estável.

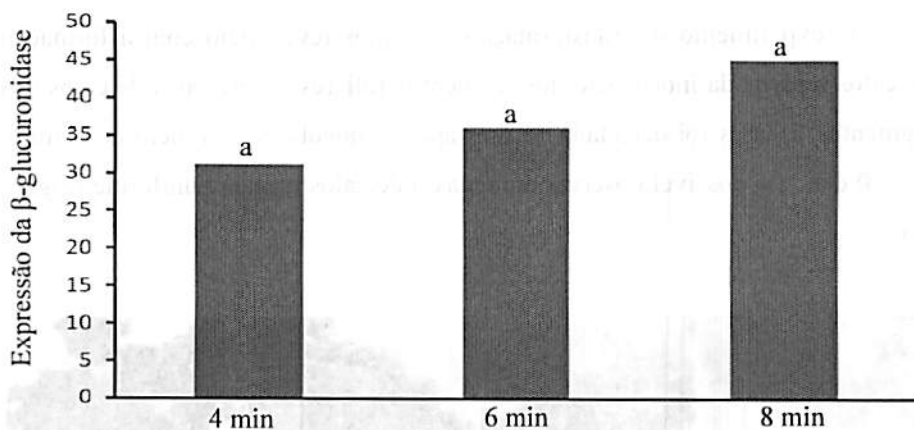


FIGURA 4 Avaliação de tempo de infecção. Explantes foliares submetidos a diferentes tempos de infecção, bombardeados com uma pressão de disparo de 1200 PSI a uma distância de 9,5 cm do alvo. Avaliações realizadas 5 dias após a inoculação. Médias com a mesma letra não diferem significativamente, a 5%, pelo Teste de Scott-Knott.

A pressão de gás hélio e a distância do alvo utilizadas neste estudo foram baseadas nas informações descritas por Sanford et al. (1993). Este autores relatam que pressões de gás hélio próximas a 1000 PSI são consideradas ótimas para a maioria das aplicações e pressões menores não provocam aceleração suficiente para que as micropartículas penetrem nas células e pressões maiores causam danos irreversíveis no tecido a ser transformado. Os autores relatam também que as menores distâncias provocam maiores acelerações, podendo danificar o tecido, comprometendo sua regeneração ou, mesmo, causando a morte.

Visto que a *Agrobacterium tumefaciens* é uma espécie altamente virulenta e que as espécies vegetais diferem grandemente em sua susceptibilidade à infecção, quanto maior o tempo de contato da bactéria com o explante, maiores são os danos causados no tecido, dificultando a regeneração da planta transformada. Sendo assim, sugere-se o tempo de infecção de 4 minutos como o tratamento capaz de promover uma transformação eficiente com menores danos ao explante.

O experimento de transformação dos calos teve início com a formação dos calos a partir da inoculação dos segmentos foliares. A presença de calos nos fragmentos foliares foi detectada 15 dias após a inoculação em meio de cultura; após 30 dias, foi possível observar uma massa de calos bastante uniforme (Figura 5A).

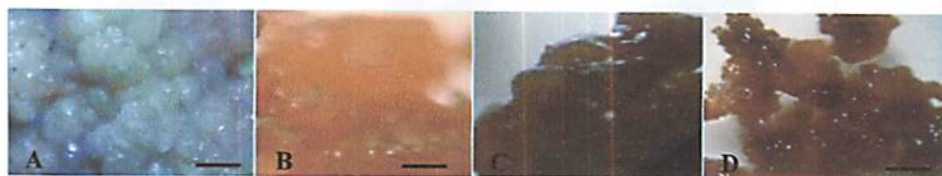


FIGURA 5 Calos de *E. camaldulensis*. A-Massa de calos formada após 30 dias em meio de cultura; B-controle negativo; C-calos infectados por 15 minutos; E-calos infectados por 30 minutos. C, D e E-calos submetidos à reação da enzima β -glucoronidase na presença do substrato de X-gluc (Barra 1mm).

Os calos foram infectados com *A. tumefaciens* e cocultivados por 5 dias, conforme exposto na metodologia; após este período, a maior parte dos calos apresentou a expressão transiente do gene repórter *gus*. Na Figura 5, é possível observar o tratamento controle (Figura 5B) e os tratamentos 15 minutos (Figura 5C) e 30 minutos (Figura 5D) de inoculação dos explantes com *A. tumefaciens*; nessas figuras, os pontos mais escuros nos calos correspondem a áreas com expressão transiente do gene *gus*. A inferência sobre a expressão do gene *gus* neste trabalho foi realizada comparando-se os calos obtidos com os resultados observados por Serrano et al. (1996). Os autores bombardearam cotilédones de *Eucalyptus globulus* e, após dois meses de cultivo, a expressão estável do gene *gus* foi avaliada por meio de análise histoquímica, sendo o aspecto de coloração dos calos semelhante ao observado neste estudo.

Após 30 dias de cultivo dos calos em meio de regeneração, plântulas foram observadas e as que apresentavam aproximadamente 0,5 cm de comprimento foram excisadas e transferidas para um meio novo contendo 6PPT de herbicida Finale[®], onde permaneceram por 15 dias. Independente do tempo de infecção, foram observados 4,5 brotos/calos, em média, dos quais 38 e 36 passaram para o meio seletivo, quando infectadas por 15 minutos e 30 minutos, respectivamente (Tabela 2). Durante o período de 15 dias subsequentes, não foi observada morte das plântulas potencialmente transformadas, nem das plântulas controle. Dessa forma, as plântulas foram transferidas para um meio novo, em que a concentração do herbicida passou para 9PPT e, após 15 dias, foram realizadas as avaliações.

Após as avaliações, constatou-se que, das 38 plântulas infectadas por 15 minutos, 23 continuavam vivas e, das 36 plântulas infectadas por 30 minutos, 24 estavam sobrevivendo ao meio seletivo suplementado com 9PPT do herbicida Finale[®]. Nesta avaliação, metade das plântulas controle já apresentava necrose.

TABELA 2 Número de calos infectados, número de brotos/calos, número de plântulas no meio seletivo (9PPT) e número de plântulas vivas de *E. camaldulensis*, em diferentes tempos de infecção com *A. tumefaciens*.

Tratamento	Número de calos infectados	Número de brotos/calos	Número de plântulas (9PPT)	Número de plântulas vivas
Infecção 15 min	40	4,57	38	23
Infecção 30 min	40	4,5	36	24

Os resultados observados para o experimento de transformação genética de calos *E. camaldulensis*, via cocultivo com *A. tumefaciens*, indicam que não há diferença entre os tempos de infecção para as variáveis número de brotos e que o número de plântulas que sobrevivem até o momento no meio de cultura contendo agente seletivo é muito próximo.

O experimento está em andamento e a concentração máxima de herbicida no meio de capax de selecionar as possíveis plântulas transgênicas é aquela que causar a morte de todas as plântulas controle, o que já foi observado para concentração de 9PPT do herbicida Finale®.

As plântulas que sobreviverem à seleção em meio de cultivo terão o DNA e o RNA extraídos para testes moleculares, visando à confirmação da inserção e expressão do gene *gus*. Para detectar a presença do transgene, será realizada reação em cadeia da polimerase (PCR), com os *primers* específicos para o gene *gus*. A confirmação da integração e da expressão do transgene *gus* no genoma de *E. camaldulensis* será realizada pelo teste de Southern blot e PCR em tempo real.

CONCLUSÕES

O meio de cultura contendo água de coco e a concentração de nitrogênio reduzido a metade são os mais indicados para calogênese em explantes foliares de *E. camaldulensis*.

Pode-se observar, na curva de crescimento de matéria fresca dos calos formados a partir de explantes foliares de *E. camaldulensis*, um crescimento sigmoide, com cinco fases distintas. Sugere-se que a repicagem dos calos para um novo meio de cultura deve ser realizada entre os 72^º e 81^º dias de cultivo, no final da fase de crescimento linear.

Observou-se expressão transiente do gene *gus* nos tempos de infecção 4, 6 e 8 minutos de infecção, não havendo diferenças significativas entre os tempos analisados. Foi observada expressão transiente do gene *gus* nos calos de *E. camaldulensis* cultivados com *A. tumefaciens*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, E.C.S.; XAVIER, A.; OTONI, W.C. Organogênese de explante foliar de clones de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 39, n. 5, p. 421-430, 2004.

ARAGÃO, F.J.L.; BARROS, L.M.G.; BRASILEIRO, A.C.M.; RIBEIRO, S.G.; SMITH, F.D.; SANFORD, J.C.; FARIA, J.C.; RECH, E.L. Inheritance of foreign genes in transgenic bean (*Phaseolus vulgaris* L) co-transformed via particle bombardment. *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, v. 93, n. 1, p. 142-150, 1996.

ARENHART, R.A.; ZAFFARI, G.R. Otimização do protocolo de micropropagação por organogênese indireta de *Eucalyptus grandis*. *Revista de Ciências Agroveterinárias*, Lages, v. 7, n. 1, p. 16-22, 2008.

BIDNEY, D.; SCHELONGE, C.; MARTICH, J.; BURRUS, M.; SIMS, L.; HUFFMAN, G. Microprojectile bombardment of plant-tissues increases

transformation frequency by *Agrobacterium-tumefaciens*. **Plant Molecular Biology**, Belgium, v. 18, n. 2, p. 301-313, 1992.

BRASILEIRO, A.C.M.; ARAGÃO, F.J.L.; ROSSI, S.; DUSI, D.M.A.; BARROS, L.M.G.; RECH, E.L. Susceptibility of common and tepary beans to *Agrobacterium*-mediated transformation using microprojectile bombardment. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 121, n. 5, p. 810-815, 1996.

CHEN, Z.Z.; CHANG, S.H.; HO, C.K.; CHEN, Y.C.; TSAI, J.B.; CHIANG, V.L. Plant production of transgenic *Eucalyptus camaldulensis* carrying the *Populus tremuloides* cinnamate 4-hydroxylase gene. **Journal Forestry Science**, República Tcheca, v. 16, n. 4, p. 249-258, 2003.

CONFALONIERI, M.; BALESTRAZZI, A.; BISOFFI, S.; CARBONERA, D. In vitro culture and genetic engineering of *Populus* spp.: synergy for forestry tree improvement. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 72, p. 109-138, 2003.

CRUZ, A.R.R.; PAIXÃO, A.L.D.; MACHADO, F.R.; BARBOSA, M.F. de F.; JUNQUEIRA, C.S.; CABRAL, G.B.; TEIXEIRA, J.B.; KOBAYASHI, A.K.; BRASILEIRO, A.C.M.; BARROS, É.V.S. Metodologias para obtenção de plantas transformadas de *Coffea canephora* por co-cultivo de calos embriogênicos com *Agrobacterium tumefaciens*. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2004. 15 p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento).

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

FERREIRA, D.F. **Estatística básica**. Lavras: UFLA, 2005. 664 p.

FERREIRA, M.E.; CALDAS, L.S.; PEREIRA, E.A. Aplicações da cultura de tecidos no melhoramento genético de plantas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPq, 1998. v. 1, p. 21-43.

FINER, J.J.; MCMULLEN, M.D. Transformation of cotton (*Gossypium-hirsutum*-L) via particle bombardment. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 8, n. 10, p. 586-589, 1990.

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

HERVÉ, P.; JAUNEAU, A.; PÂNQUES, M.; MARIEN, J.N.; BOUDET, A.M.; TEULIÈRES, C.A. Procedure for shoot organogenesis in vitro from leaves and nodes of an elite *Eucalyptus gunnii* clone: comparative histology. **Plant Science**, Philadelphia, v. 161, p. 645-653, 2001.

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

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

JOY IV, R.W.; THORPE, T.A. Shoot morphogenesis: structure, physiology, biotechnology and biology. In: SOH, W.Y.; BHOJWANI, S.S. (Ed.). **Morphogenesis in plant tissue cultures**. London: Kluwer Academic, 1999. p. 171-214.

KLEIN, T.M.; GRADZIEL, T.; FROMM, M.E.; SANFORD, J.C. Factors influencing gene delivery into *Zea mays* cells by high-velocity microprojectiles. **Bio/Tecnology**, New York, v. 6, n. 1, p. 559-563, 1998.

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

LAMEIRA, O.A.; PINTO, J.E.B.P.; ARRIGONII-BLANK, M.F.; PEREIRA, F.D. Estabelecimento da curva de crescimento em calos de Erva-baleeira (*Cordia Verbenacea* L.). **Horticultura Brasileira**, Campinas, v. 4, n. 1, p. 92-93, 1996.

LANDA, F.S.L.; PAIVA, R.; PAIVA, P.D.O.; BUENO FILHO, J.S.S. Indução *in vitro* de calos em explantes foliares de pequiheiro (*Caryocar brasiliense* Camb.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 24, p. 56-63, 2000.

LIMA, E.C.; PAIVA, R.; SOARES, F.P.; NOGUEIRA, R.C.; EMIRCH, E.B.; NICIOLI, P.M. Avaliação bioquímica do desenvolvimento de calos *in vitro* a partir de segmentos foliares de Sangra d'água (*Croton urucurana* Baill.). *Magistra*, Cruz das Almas, v. 19, n. 3, p. 1055-1065, 2007.

MORALEJO, M.; ROCHANGE, F.; BOUDET, A.M.; TEULIERES, C. Generation of transgenic *Eucalyptus globulus* plantlets through *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation. *Australian Journal of Plant Physiology*, Melbourne, v. 25, n. 2, p. 207-212, 1998.

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

RAHIM, F.; JABEEN, M.; ILAHI, I. Mass propagation in *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. *Asian Journal of Plant Sciences*, Copenhagen, v. 2, n. 2, p. 184-187, 2003.

SANFORD, J.C.; DEVIT, M.J.; RUSSELL, J.A.; SMITH, F.D.; HARPENDING, P.R.; ROY, M.K.; JOHNSTON, S.A. An improved, helium-driven biolistic device. *Tecniq*, New York, v. 3, n. 1, p. 3-16, 1991.

SANFORD, J.C.; SMITH, F.D.; RUSSELL, J.A. Optimizing the biolistic process for different biological applications. *Methods in Enzymology*, New York, v. 217, n. 1, p. 483-509, 1993.

SANTOS, C.G.; PAIVA, R.; PAIVA, P.D.O.; PAIVA, E. Indução e análise bioquímica de calos obtidos de segmentos foliares de *Coffea arabica* L., cultivar rubi. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v. 27, n. 3, p. 571-577, 2003.

SERRA, A.G.P.; PAIVA, R.; PAIVA, P.D.O. Análises bioquímicas de calos formados de explantes foliares de castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.). *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v. 24, n. 4, p. 833-840, 2000.

SERRANO, L.; ROCHANGE, F.; SEMBLAT, J.P.; MARQUE, C.; TEULIÈRES, C.; BOUDET, A-M. Genetic transformation of *Eucalyptus globulus* through biolistics: complementary development of procedures for organogenesis from zygotic embryos and stable transformation of corresponding proliferating tissue. *Journal of Experimental Botany*, Oxford, v. 47, n. 295, p. 285-290, 1996.

SHIMIZU, T.; CLITTO, A.; KOMAMINE, A.; FOWLER, M.W. Changes in metabolite levels during growth of *Acer pseudoplatanus* (sycamore) cells in batch suspension culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 40, n. 2, p. 125-129, 1977.

SMITH, R.M. **Plant tissue culture: techniques and experiments**. San Diego: Academic, 1992. 171 p.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE SILVICULTURA. **Fatos e números do Brasil Florestal**. 2007. Disponível em: <<http://www.sbs.org.br/FatoseNumerosdoBrasilFlorestal.pdf>>. Acesso em: 10 maio 2007.

TEIXEIRA, J.B.; JUNQUEIRA, C.S.; PEREIRA, A.J. da C.; MELLO, R.I.S.; SILVA, A.P.D.; MUNDIM, D.A. **Multiplicação clonal de café (*Coffea arabica* L.) via embriogênese somática**. Brasília: EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2004. 39 p. (EMBRAPA. Documentos, 121).

3 CONCLUSÕES GERAIS

Foi possível micropropagar a espécie *Eucalyptus camaldulensis* por meio do sistema de biorreatores, tendo como fonte de explante tecido meristemático.

O processo de aclimatização em câmara de nebulização proporcionou uma taxa de sobrevivência de 76%.

O meio de cultura composto por metade da concentração de nitrogênio do meio MS e suplementado com água de coco proporcionou maior calogênese dos explantes foliares.

Foi observada expressão transiente do gene repórter *gus* em folhas de *E. camaldulensis*, utilizando a técnica de agrobiobalística. Os calos infectados por *Agrobacterium tumefaciens* apresentaram expressão transiente e regeneraram plântulas que se encontram em processo de seleção.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASSOCIAÇÃO MINEIRA DE SILVICULTURA. **Negócio florestal**. 2006. Disponível em: <<http://www.silviminas.com.br>>. Acesso em: 01 fev. 2006.
- BANDYOPADHYAY, S.; CANE, K.; RASMUSSEN, G.; HAMILL, J.D. Efficient plant regeneration from seedling explants of two commercially important temperate eucalypt species *Eucalyptus nitens* and *Eucalyptus globulus*. **Plant Science**, Philadelphia, v. 140, n. 2, p. 189-198, 1999.
- ELDRIDGE, K.; DAVIDSON, J.; HARDWIID, C.; WYK, G. van. ***Eucalyptus* domestication and breeding**. New York: Oxford University, 1994. 228 p.
- ELDRIDGE, K.; DAVIDSON, J.; HARDWIID, C.; WYK, G. van. ***Eucalyptus* domestication and breeding**. Oxford: Clarendon, 1993. 312 p.
- GOLFARI, L.; CASER, R.L.; MOURA, V.P.G. **Zoneamento ecológico esquemático para reflorestamento no Brasil – 2ª aproximação**. Belo Horizonte: Centro de Pesquisa Florestal da Região do Cerrado, 1978. 66 p. (PRODEPEF. Série Técnica, 11).
- GOOR, A.Y.; BARNEY, C.W. **Special plantations**. New York: The Ronald Company, 1968. cap. 5, p. 213-271.
- HIGA, R.C.V. Descrição de algumas espécies de eucalipto. **Revista da Madeira**, Curitiba, v. 13, n. 75, p. 8-17, 2003.
- INSTITUTO DE DESENVOLVIMENTO INTEGRADO DE MINAS GERAIS. **Investindo em Minas Gerais: principais setores: metalurgia**. 2006. Disponível em: <<http://www.indi.mg.gov.br/perfil/setores/metalurgia.html>>. Acesso em: 30 set. 2006.
- MROGINSKI, L.A.; ROCA, W.M. Micropropagación de la yerba mate (*Ilex paraguariensis* St.Hil): efecto del origen del explante en el establecimiento *in vitro* de los cultivos. **Phyton**, Buenos Aires, v. 59, n. 1/2, p. 161-170, 1996.
- MULLINS, K.V.; LLEWELLYNN, D.J.; HARTNEY, V.J.; STRAUSS, S.; DENNIS, E.S. Regeneration and transformation of *Eucalyptus camaldulensis*. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 16, n. 11, p. 787-791, 1997.

NASCIMENTO, A.C. **Micropropagação de uvaieira**. 2006. 110 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

SARTORETTO, L.M.; BARRUETO, C.L.P.; BRASILEIRO, A.C.M. Biolistic transformation of *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* callus. **Functional Plant Biology**, Australia, v. 29, n. 8, p. 917-924, 2002.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE SILVICULTURA. **Atualidades**. 2008. Disponível em: <<http://www.sbs.org.br/atualidades.php>>. Acesso em: 05 nov. 2008.

SOERIANEGARA, I.; LEMMENS, R.H.M.J. (Ed.). **Timber trees: mayor commercial timbers**. Bogor: PROSEA, 1994. 610 p. (Plant Resources of South-East Asia Prosea 5, n. 1).

SOUZA, I.C.G. de. **Caracterização de procedências para a formação de populações de *Eucalyptus camaldulensis* Dehn**. 1996. 119 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, SP.