

Transformação genética e regeneração de plantas transgênicas de espécies de *Eucalyptus* usando *Agrobacterium tumefaciens*

Kleiton L. G. Machado¹, Eliane R. Santarém².

¹ Autor, Ciências Biológicas, PUCRS.

² Orientador.

INTRODUÇÃO:

O gênero *Eucalyptus* é exótico no Brasil e sensível a diversos fatores bióticos e abióticos. Sendo de grande valor comercial, por prover celulose e madeira, o melhoramento genético pode trazer maior adaptabilidade de mudas desta espécie, tornando-as menos suscetíveis a fungos, bactérias e baixas temperaturas.

METODOLOGIA:

- Germinação de sementes em substrato 70% terra e 30% areia.
- Desinfestação de plântulas de três semanas com hipoclorito de sódio 1%, fungicida (Ridomil®) 1,5 g/L e etanol 70%.
- Inoculação dos explantes hipocótilo, cotilédone, folha e segmento nodal em meio de cultura ½ MS (Murashige & Skoog, 1962) suplementado com reguladores de crescimento (ANA: 1 ou 3 mg/L e BAP: 1 ou 3 mg/L).
- Indução de brotos meio ½ MS suplementado com 0,1 mg/L ANA e 1 mg/L BAP.
- Curva de sobrevivência de explantes em canamicina (0, 20, 40 e 60 mg/L).
- Transformação genética: *Agrobacterium tumefaciens* DO_{600nm}: 0,2 e 0,4, co-cultivo (dois dias) com acetoseringona (100µm).

RESULTADOS:

Calogênese foi obtida em todos os meios e explantes testados, com exceção de folhas (Tabela 1). Foram obtidas brotações adventícias (Figura 1) em meio suplementado com 3 mg/L de ANA e 1 mg/L de BAP.

Concentrações de canamicina (entre 20 e 60 mg/L) não foram eficientes em promover a morte dos explantes, sendo o percentual mais elevado obtido em 60 mg/L (Tabela 2 e Figura 2).

PERSPECTIVAS:

Testes com concentrações ticarcilina, que impedirá o crescimento bacteriano, serão realizados. Da mesma forma, a concentração ótima de canamicina deverá ser estabelecida. Diferentes densidades óticas, tempo de co-cultivo (bactéria e tecido vegetal), pré-cultivos de explantes e virulência de cepas serão testados.

REFERÊNCIAS:

- Murashige, T; Skoog, F.A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(1962):473-497.

Tabela 1 - Porcentagem de calogênese e organogênese nos explantes testados através das amostras três grupos de genótipos nos diferentes meios de cultura.

Explante	Calogênese (%)		Explantes organogênicos (%)		N° de brotos por explante	
	Meio A	Meio B	Meio A	Meio B	Meio A	Meio B
Cotilédone	77,8 aA	58,3 aA	0,0	0,0	0,0	0,0
Hipocótilo	55,6 aA	66,7 aA	0,0	0,0	0,0	0,0
Segmento nodal	61,1 aA	75,0 aA	40,0	20,0	3,0	2,0
Segmento foliar	0,0 bA	0,0 bA	0,0	0,0	0,0	0,0

Letras minúsculas na coluna – diferenças significativas segundo teste de Duncan; letras maiúsculas na linha – diferenças conforme Teste T Student. $p < 0,05$

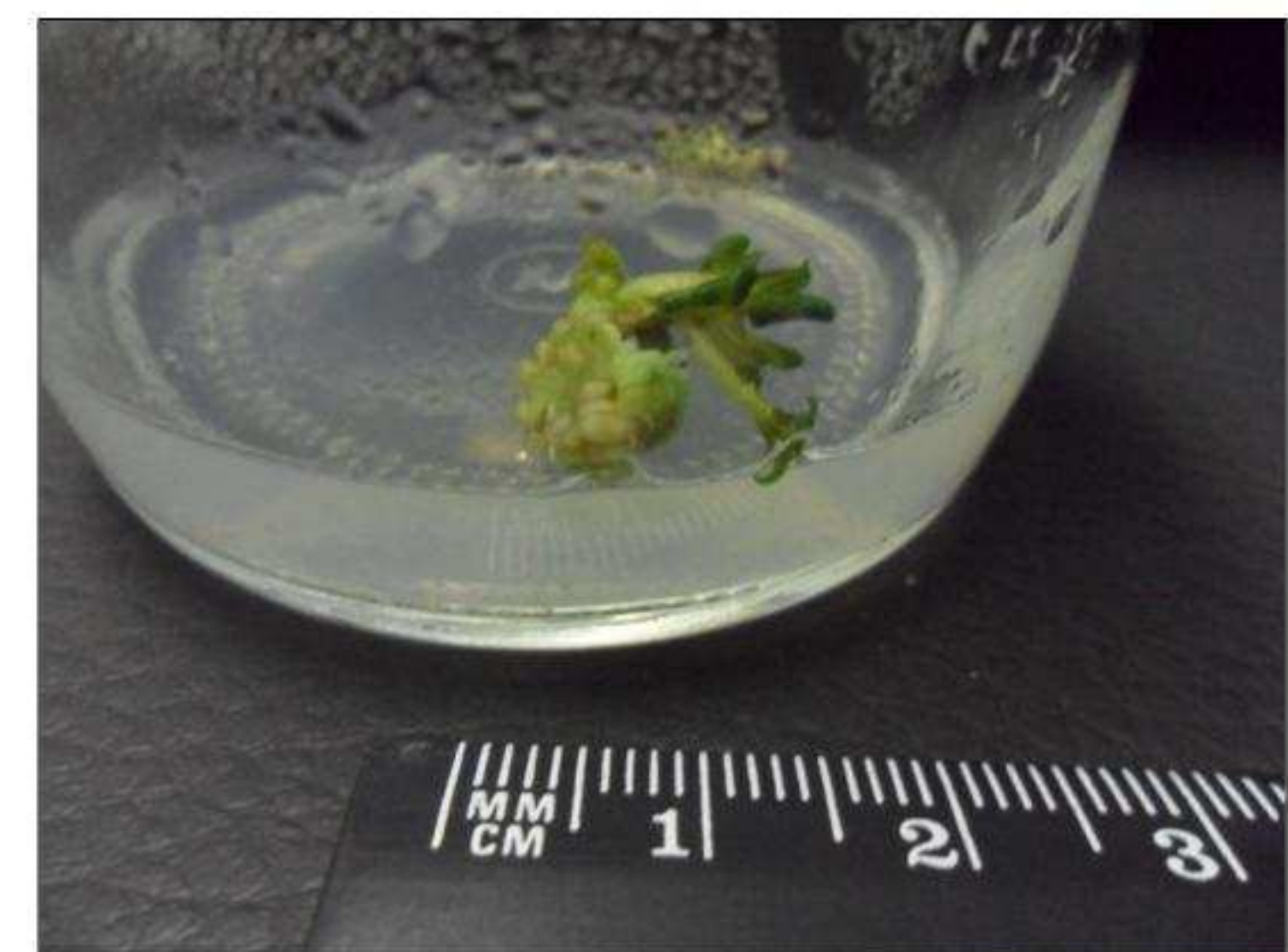


Figura 1 - Organogênese proveniente de meio ½ MS suplementado com ANA: 3 mg/L e BAP 1 mg/L 30 dias após a inoculação.

Tabela 2 - Porcentagens de explantes necrosados por cultivo em diferentes concentrações de canamicina.

Concentração de Canamicina (mg/L)	Morte de explantes %
0	0
20	41
40	45
60	54

Médias de porcentagens provenientes de médias de triplicatas.



Figura 2 - Segmentos nodais inoculados em meio ½ MS suplementados com 60 mg/L Canamicina