



<b>Evento</b>	Salão UFRGS 2013: SIC - XXV SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFRGS
<b>Ano</b>	2013
<b>Local</b>	Porto Alegre - RS
<b>Título</b>	Transformação genética e regeneração de plantas transgênicas de espécies de Eucalyptus usando Agrobacterium tumefaciens
<b>Autor</b>	KLEITON LIMA DE GODOY MACHADO
<b>Orientador</b>	ELIANE ROMANATO SANTAREM
<b>Instituição</b>	Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

O gênero *Eucalyptus* é exótico no Brasil. Foi introduzido no final do século XIX no Rio Grande do Sul, mas sua cultura massificou-se somente no final da década de 1960 devido à ascensão industrial do Estado. Por não ser endêmico de regiões tropicais e subtropicais o eucalipto é 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. A transformação genética tem sido apontada como ferramenta para a obtenção de variedades mais tolerantes aos estresses ambientais. O objetivo deste trabalho foi obter um protocolo eficiente de regeneração de plantas transgênicas de *E. globulus* e *E. saligna*.

Para obtenção de plântulas doadoras de explantes, sementes de eucalipto foram semeadas em substrato preparado com terra e areia (70: 30 v/v). O substrato foi dispensado em copos plásticos de 200 mL, os quais foram mantidos em casa de vegetação e irrigados diariamente. Plântulas de 3-4 semanas de idade foram aspergidas com fungicida Ridomil® (3 g/L) 14 dias antes do estabelecimento da cultura *in vitro*. As plantas foram desinfestadas por imersão em etanol 70% por 60 segundos, seguido de desinfestação em hipoclorito de sódio (0,5%) por 10 minutos, e Ridomil® (1,5 g/L) por 20 minutos. Após desinfestação, as plântulas foram lavadas três vezes com água destilada estéril. Hipocótilo, cotilédone, segmento nodal e segmento foliar foram utilizados como explantes iniciais para a micropropagação e inoculados em meio de cultivo MS (Murashige e Skoog) com ½ concentração de sais e vitaminas, polivinilpirolidona (1 g/L), suplementado com diferentes concentrações dos reguladores de crescimento: ácido naftalenoacético (ANA; 1 e 3 mg/L) e benzilaminopurina (BAP; 1 e 3 mg/L). A mesma plântula foi utilizada como fonte de explante para uma repetição de cada tratamento. Os explantes foram mantidos em ausência de luz por 30 dias. Para a indução de brotos, os calos obtidos foram transferidos para meio MS suplementado com ANA (0,1 e 0,5 mg/L) e BAP (1 e 2 mg/L com adição de 5 g/L de PVP. Calos organogênicos (com brotos adventícios) foram transferidos para condições de luz (fotoperíodo de 16h com intensidade luminosa de  $30 \mu\text{Em}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Todos os meios de cultivo foram solidificados com 6,5 g/L de ágar. Os parâmetros analisados para a micropropagação foram frequência de calogênese, intensidade de formação de calos, consistência dos calos e frequência de indução e número de brotos aos 30 dias de cultivo. A intensidade de calogênese foi determinada como (1) pouca, (2) média e (3) intensa.

Para a transformação genética, *Agrobacterium tumefaciens*, LBA4404, contendo plasmídeo pCAMBIA, foi cultivada em meio líquido LB (Luria-Bertani) com adição de canamicina (40 mg/L) e rifampicina (40 mg/L) por 48 h a 28 °C sob agitação constante de 100 rpm. Em seguida, a suspensão bacteriana foi centrifugada e ressuspensa em meio MS por três vezes. Posteriormente, suspensões bacterianas com  $\text{DO}_{600\text{nm}}$  0,2 e 0,4 foram usadas para infecção dos explantes. O co-cultivo explante – bactéria foi mantido por 2 dias em presença de acetoseringona (100uM).

Os resultados indicam que a calogênese em *E. globulus* foi mais eficiente quando induzida em cotilédones utilizando 1 mg/L ANA + 3 mg/L BAP, com formação de calos compactos e pouco oxidados. O mesmo aspecto foi observado nos demais tipos de explantes no mesmo meio de cultivo. Os calos obtidos em presença de 3 mg/L ANA + 1mg/L BAP, mesmo apresentando mesma intensidade e porcentagem de oxidação, mostraram-se friáveis e mais propensos a oxidação. Calos organogênicos (66,6%) foram observados em segmentos nodais de *E. globulus*, com média de 3 brotos por explante. Os explantes derivados de *E. saligna* apresentaram pouca diferença na intensidade de calos aos 30 dias de cultivo. Nenhum broto adventício foi obtido nos calos desta espécie. Os experimentos de transformação genética estão em desenvolvimento.