



Transformação genética do EUCALIPTO

Inoculação de cotilédones e folhas com *Agrobacterium tumefaciens*

Introdução

A utilização do eucalipto na produção de celulose e papel, a partir dos anos 40, transformou essa árvore na principal matéria-prima das indústrias do setor. O eucalipto representa 69 % da área reflorestada do Brasil, cerca de 1,5 milhão de hectares. Atualmente, o Brasil situa-se entre os três maiores fornecedores mundiais de papel para impressão. É o segundo maior exportador de celulose de fibra curta e o primeiro no caso de fibras produzidas a partir do eucalipto, detendo 45 % das vendas desse produto.

Grande parte do sucesso desse setor florestal resulta dos investimentos realizados pela indústria nacional

em busca de ganhos de produtividade e qualidade, o que possibilita a entrada do produto brasileiro no mercado externo. O mercado internacional é bastante competitivo, principalmente com relação aos países asiáticos, que também produzem fibra curta. A principal vantagem competitiva do Brasil é a sua tecnologia florestal, baseada em programas de melhoramento genético e de multiplicação clonal do eucalipto, desenvolvidos ao longo dos últimos 30 anos. Todo esse ganho de conhecimento científico e tecnológico gerou um ganho na produtividade; de 20 m³/ha/ano (8 árvores/m³), no início da década de 70, para 50 m³/ha/ano (3,1 árvores/m³), em 1999. Apesar desse aumento fantástico em produtividade, essa vantagem competitiva pode ser superada por outros países competi-

Esteban Roberto González

Doutorando, Departamento de Genética
ESALQ-USP
ergonzal@carpa.ciagri.usp.br

Alexander de Andrade

Mestrando, Departamento de Genética
ESALQ-USP
andrade@carpa.ciagri.usp.br

Ana Letícia Bertolo

IC-FAPESP, Departamento de Genética
ESALQ-USP
alfberto@carpa.ciagri.usp.br

Raphael Tozelli Carneiro

IC-FAPESP, Departamento de Genética
ESALQ-USP
rncamei@carpa.ciagri.usp.br

Gisele Coelho Lacerda

Técnica de Nível Superior,
Departamento de Genética ESALQ-USP
glacerda@esalq.usp.br

Valéria A. Prado Defávani

Técnica de Nível Superior,
Departamento de Genética ESALQ-USP
vafranco@esalq.usp.br

Mônica T. Veneziano Labate

Pós-doutora, Departamento de Genética
ESALQ-USP
mtvlabat@carpa.ciagri.usp.br

Carlos Alberto Labate

Professor Dr., Departamento de Genética
ESALQ-USP
calabate@carpa.ciagri.usp.br

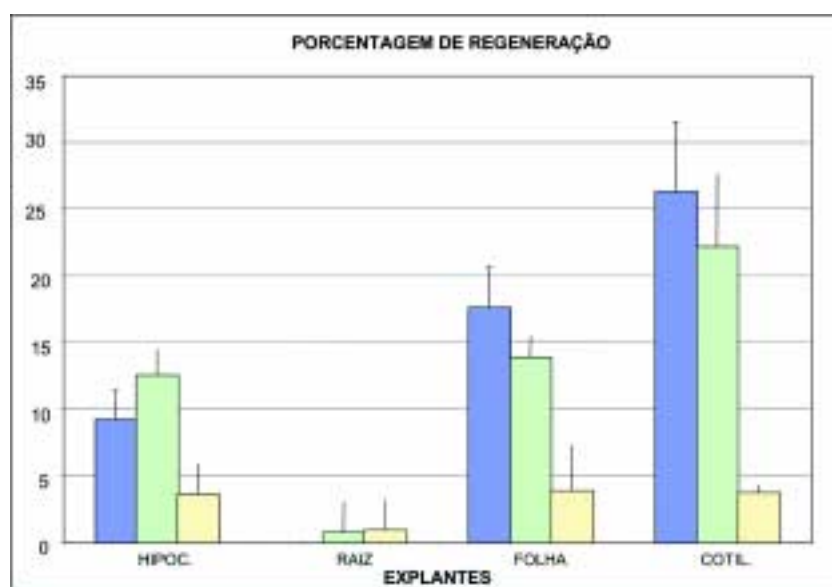


Figura 1 - Avaliação da eficiência do sistema de regeneração de diferentes explantes de *E. grandis* (azul), *E. grandis x E. urophylla* (verde) e *E. urophylla* (amarelo)

Tabela 1. Meios de cultivo utilizados nos experimentos de regeneração de *Eucalyptus*. MM: meio de multiplicação; MA meio de alongamento; ME: meio de enraizamento. O meio M1 foi utilizado para a formação de cali e o meio M2 como indutor de gemas. O meio básico utilizado (MB) contém a metade da concentração dos macronutrientes do meio MS (Murashige & Skoog, 1962), micronutrientes de MS, 3 % (p/v) de sacarose e 0,6 % de ágar, pH 5,8 e vitaminas MS-B (Barrueto Cid et al., 1994). 6-benziladenina (BA), ácido indol butírico (IBA), ácido α -naftaleno acético (ANA), 1-fenil-3-(1,2,3-tiazol-5-yl) uréia (TDZ)

Meios de cultura	Reguladores de crescimento (μ M)			
	BA	IBA	ANA	TDZ
MM	0,006	-	0,88	-
MA	0,44	1	-	-
ME	-	4,9	-	-
M1	-	-	2,5	1
M2	-	-	2,5	2

dores com ganhos em economia de escala, equipamentos atualizados e acesso a capitais de longo prazo. Daí a necessidade de investimentos em novas tecnologias que permitam a manutenção dessa vantagem competitiva, com o oferecimento de produtos de melhor qualidade, com baixo custo de produção.

A aplicação dos métodos convencionais de melhoramento na área flores-

tal, embora eficiente, é relativamente lenta, principalmente devido ao tempo necessário para se completar cada geração de cruzamentos e a obtenção de progênes segregantes; na maioria dos casos, alguns anos. A introdução de genes de interesse em progênes e clones comerciais de eucalipto, por meio da transformação genética, oferece uma excelente oportunidade para acelerar-se o processo de obtenção de

genótipos superiores. Entretanto, a transformação de espécies arbóreas ainda é bastante difícil, principalmente para o gênero *Eucalyptus*. Até pouco tempo, a literatura registrava a transformação genética de apenas duas espécies, *E. globulus* e *E. camaldulensis* (Mullins et al., 1997; Ho et al., 1998; Moralejo et al., 1998; Harcourt et al., 2000), mas, recentemente, González et al. (2002) descreveram a transformação de *E. grandis* x *E. urophylla*, que é o principal híbrido comercial utilizado no Brasil.

A dificuldade em se obter plantas transgênicas de eucalipto está associada à baixa capacidade de regeneração de algumas espécies e ao sistema de seleção dos transformantes. Nos trabalhos acima citados, com exceção de Harcourt et al. (2000), que utilizaram o gene de resistência ao herbicida fosfotricina (PPT) para a seleção dos transformantes, os demais empregaram o gene *nptII*, que confere resistência aos antibióticos aminoglicosídicos, como, por exemplo, a canamicina e a geneticina G-418. A seleção com antibióticos apresenta sérias dificuldades para o eucalipto, em razão da existência de variabilidade genética para tolerância a esses compostos químicos, como discutido mais adiante.

De maneira geral, a obtenção de plantas transgênicas depende de três condições:

I) Regeneração de plantas a partir de células ou tecidos transformados;

II) Seleção que permita diferenciar as células transformadas;

III) Transferência do gene de interesse e sua integração no genoma do eucalipto; expressão e herança do DNA exógeno.

Regeneração de *Eucalyptus* por organogênese indireta

A obtenção de plantas transgênicas de eucalipto requer uma metodologia eficiente de regeneração, seja por organogênese indireta de certos tecidos, ou por meio da embriogênese somática. A embriogênese somática já foi descrita para algumas espécies comerciais importantes de eucalipto, onde, na maioria dos casos, as plantas foram regeneradas a partir de plântulas (Muralidharan e Mascarenhas, 1989; Watt

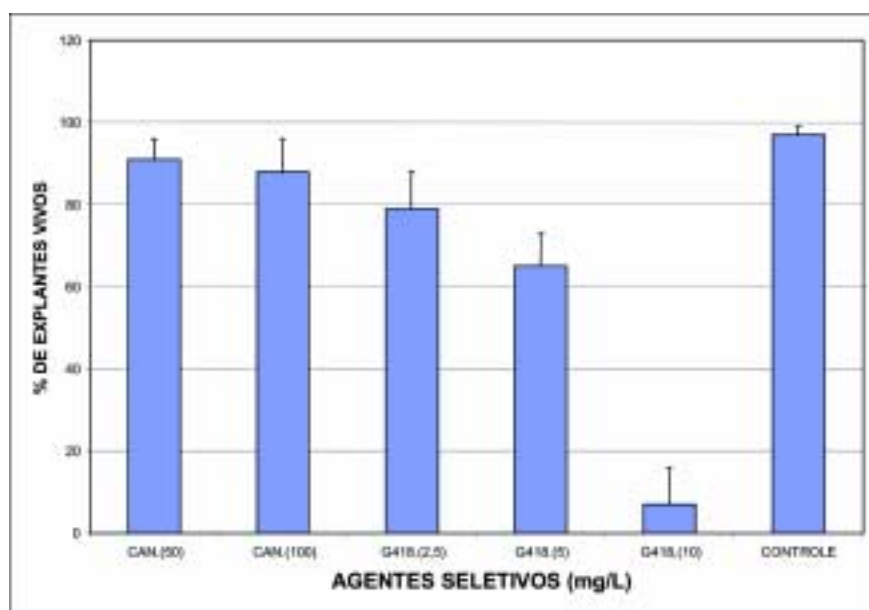


Figura 2 - Taxa de explantes vivos (%) de *E. grandis* após 30 dias de exposição aos agentes seletivos CAN (Canamicina) e G-418 (Geneticina)

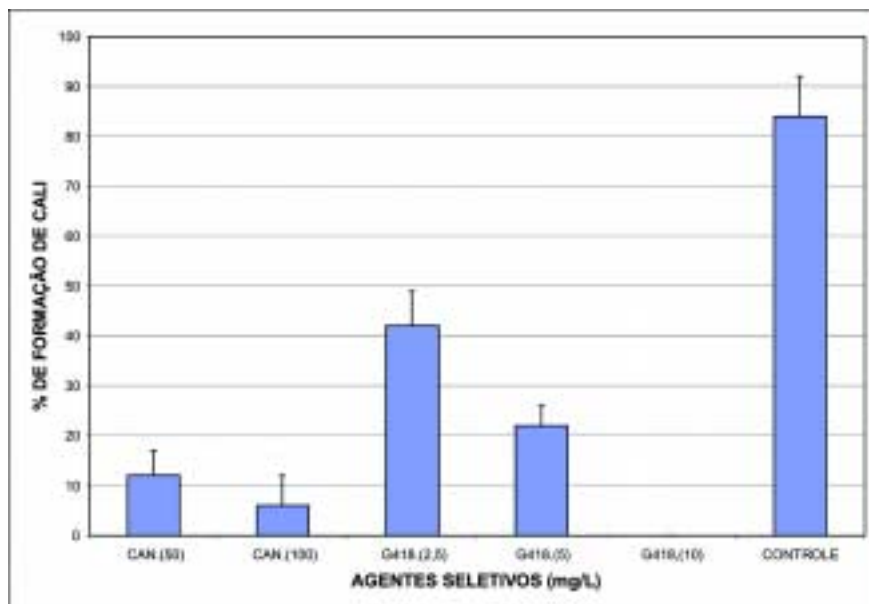


Figura 3 - Taxa de formação de cali (%) de *E. grandis* após 45 dias de exposição aos agentes seletivos

et al., 1991). Os melhores resultados com organogênese indireta foram obtidos com tecidos jovens, como cotilédones e hipocótilos (Tibok et al., 1995; Barrueto Cid et al. 1999). A regeneração de plantas a partir de órgãos maduros também já foi relatada para algumas espécies, como por exemplo, a partir de folhas de *E. citriodora* (Muralidharan e Mascarenhas, 1987), *E. tere-*

ticornis (Subbaiah e Minocha, 1990) e de *E. grandis* (Laine e David, 1994).

De maneira geral, esses trabalhos relatam o uso de tidiazuron (TDZ) para a indução de organogênese indireta de diferentes tecidos vegetais. Com o objetivo de ajustar e de conhecer os efeitos dessa citocinina às nossas condições, realizamos uma avaliação mais detalhada da regeneração de *E. gran-*

dis, *E. urophylla* e do híbrido *E. grandis* x *E. urophylla*. Sementes desses genótipos foram germinadas por 20 dias em meio MS (Murashige e Skoog, 1962), até a formação de plântulas, que foram então excisadas. Os três tipos de explantes utilizados: cotilédones, primeiro par de folhas, hipocótilo e raiz foram individualizados e transferidos para meio de cultura M1 (Tabela 1), por 60 dias, renovando-se esse meio a cada 15 dias. Após esse período, foram mantidos em meio de multiplicação (MM, Tabela 1) por 30 dias e, finalmente, os cali, contendo as brotações, foram transferidos para meio de alongamento (MA, Tabela 1). O delineamento estatístico foi inteiramente casualizado, com seis repetições por tratamento, contendo 23 explantes por parcela. O experimento fatorial foi organizado considerando-se como fator 1 as espécies de eucalipto e como fator 2 o tipo de explante. Os tratamentos resultaram das combinações entre os genótipos de eucalipto e o tipo de explante. Quatro tipos de explantes foram considerados: raízes, cotilédones, folhas e hipocótilos, totalizando doze tratamentos. Os valores estão expressos em porcentagem de cali que emitiram brotações após 120 dias (Figura 1).

A eficiência de regeneração depende do tipo de explante e da espécie, como podemos observar na figura 1. As taxas de regeneração, a partir de cotilédones, do híbrido *E. grandis* x *E. urophylla*, e de *E. grandis* apresentaram os melhores resultados, ao redor de 22% a 25%, respectivamente; embora as folhas e hipocótilos também tenham produzido boas taxas de regeneração. As raízes mostraram uma baixa eficiência de regeneração. No caso particular de *E. urophylla*, os valores de regeneração observados para todos os tipos de explantes foram os mais baixos, inclusive não se conseguindo regenerar plantas a partir das raízes. O mesmo foi observado nos trabalhos de Bennet e McComb (1982) e Laine e David (1994), para o caso de *E. marginata* e *E. grandis*, respectivamente.

Nesse protocolo, o TDZ foi incorporado aos meios de formação de cali e de desenvolvimento de gemas, conseguindo-se, dessa forma, uma alta frequência de indução de gemas, além

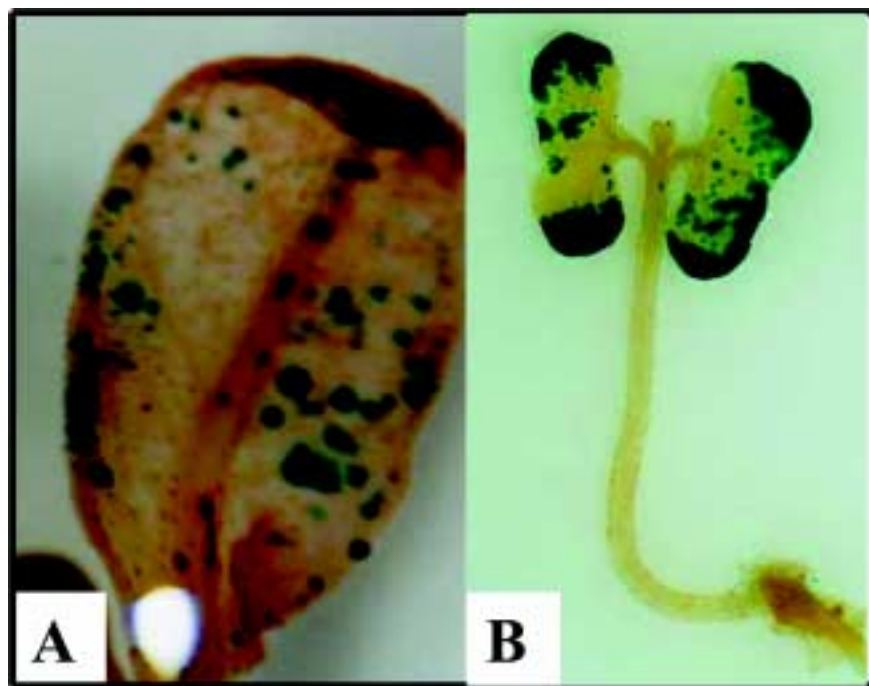


Figura 4. Expressão do gene da β -glucuronidase em folhas de clones (A) e cotilédones de plântulas (B)

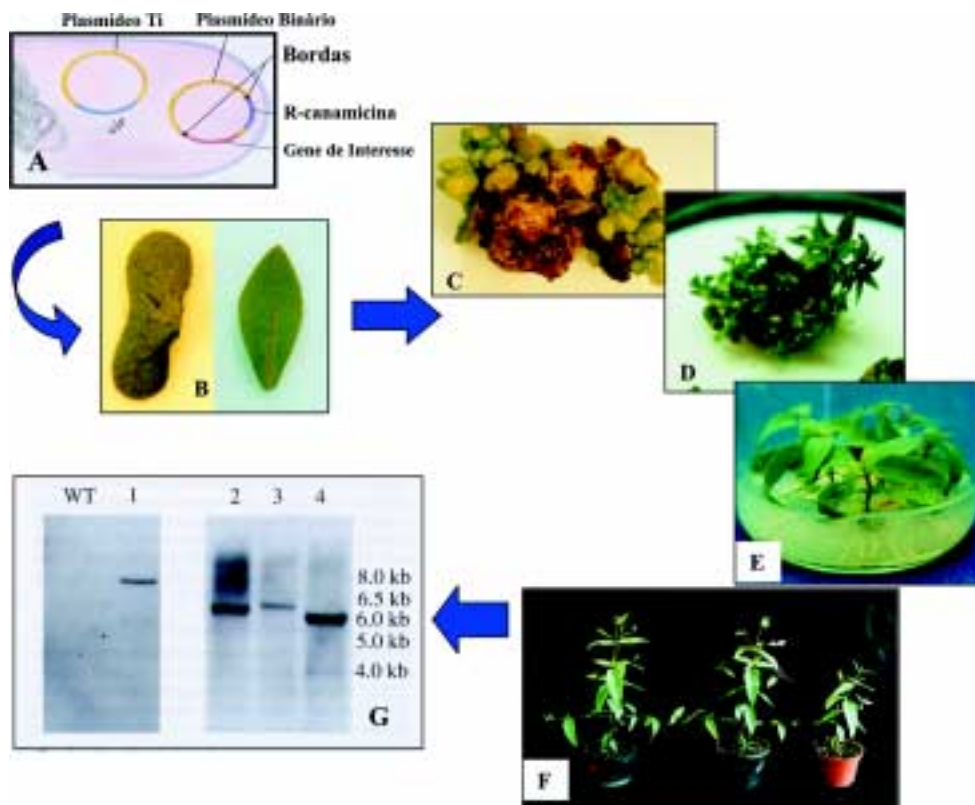


Figura 5. Seqüência do protocolo de transformação genética do eucalipto: (A) Inoculação com *Agrobacterium tumefaciens* contendo o gene de interesse, (B) Cotilédone (esquerda) ou folha (direita), (C) calo induzido a partir de cotilédone ou folhas na presença de TDZ, (D) formação de brotações, (E) plântulas em fase de alongamento e enrizamento, (F) plantas regeneradas e cultivadas em câmara de crescimento, (G) Southern blot dos transformantes primários

de uma maior capacidade de formação de brotos e de plantas regeneradas. Os derivados da uréia, como o TDZ, possuem efeito similar às citocininas, sendo capazes de estimular diferentes respostas morfogênicas, inclusive a formação de brotos em diferentes espécies vegetais (Huetteman & Preece, 1993). O efeito indutor da formação de brotações destes compostos é mais pronunciado do que o observado com BAP, para a maioria das espécies vegetais testadas e, particularmente, em espécies arbóreas (Lu, 1993). Embora o modo de ação desses compostos não seja totalmente conhecido (Hare & Van Staden, 1994), parece estar envolvido com a ativação e a diferenciação de células específicas durante o processo de regeneração de hipocótilos de *E. globulus* (Azmi et al., 1997).

Efeito dos antibióticos na seleção de transformantes

Um fator importante na obtenção

de plantas transgênicas é a existência de um bom sistema de seleção de transformantes. Os antibióticos são amplamente utilizados para essa finalidade, entretanto, apresentam desvantagens, como, por exemplo, a existência de variabilidade genética no eucalipto para tolerância a determinados antibióticos, possibilitando a ocorrência de escapes, ou seja, falsos transformantes positivos. Tanto a canamicina, como a geneticina G-418 são antibióticos que inibem a síntese de proteínas nas células pela associação à subunidade menor dos ribossomos.

A resposta às diferentes concentrações desses dois antibióticos, foi avaliada em cotilédones cortados de plântulas com 20 dias. O experimento baseou-se no sistema de regeneração descrito anteriormente. Cotilédones de *E. grandis* foram cortados e submetidos aos seguintes tratamentos: controle positivo, com o explante em meio de cultivo, na ausência de agente seletivo; canamicina nas concentrações de

50 e 100 mg/L e geneticina, nas concentrações de 2,5, 5 e 10 mg/L. Dois parâmetros foram utilizados nas avaliações e estão expressos em porcentagens: número de explantes vivos após 30 dias de exposição aos agentes seletivos, e número de cali formados após 45 dias (Figuras 2 e 3, respectivamente).

Pela análise comparativa entre os agentes seletivos utilizados, pode-se observar que a geneticina foi mais eficiente, se considerarmos a porcentagem de morte dos explantes. Entretanto, os explantes que não morreram, apresentaram formação de cali, o que dificulta o uso desse antibiótico como agente seletivo. Um dos possíveis problemas do uso da geneticina é sua baixa difusão nos tecidos, permitindo o aparecimento de escapes. Já, a canamicina inibiu drasticamente a regeneração de cali (Figura 3). No entanto, os explantes não apresentaram alta taxa de mortalidade (Figura 2).

Esses resultados confirmam a baixa eficiência dos antibióticos aminoglicosídicos para a seleção de transformantes em *Eucalyptus* que apresentam tolerância natural a esses compostos químicos, embora tenham inibido a regeneração de cali transgênicos. A geneticina G418 induziu necroses severas dos explantes, ocasionando a morte rápida dos mesmos, mas, em baixas concentrações, levou ao aparecimento de escapes.

Transformação genética de *Eucalyptus* por meio de *Agrobacterium*

A metodologia utiliza a transformação genética por meio de *Agrobacterium*, e pode ser empregada para cotilédones ou folhas de clones micropropagados de *Eucalyptus grandis*, *Eucalyptus urophylla* e do híbrido *E. grandis* x *E. urophylla*. No caso de cotilédones, as sementes são esterilizadas e semeadas em placas de Petri contendo meio de cultivo MS (Mu-

rashige e Skoog, 1962), e mantidas, por dois dias, em câmara de crescimento, sob condições controladas de fotoperíodo (16h de luz e 8h de escuro) e temperatura de 26°C. Após esse período, as sementes que germinaram, ou se for o caso, as folhas de clones micropropagados, são inoculadas em meio líquido MS contendo *Agrobacterium tumefaciens* (na densidade de 10⁷-10⁹ células/mL) e mantidas em co-cultivo por 24h, na presença de acetoseringona (20 mg/L), sob agitação constante (100 rpm). Em seguida, as sementes ou as folhas são transferidas para placas de Petri contendo meio MS sólido para o co-cultivo em meio sólido por mais 48h. O material é posteriormente lavado em água estéril contendo 200 mg/L de cefotaxima, submetido à secagem em papel de filtro estéril, antes de ser transferido para meio MS sólido contendo 100 mg/L de cefotaxima. A figura 4A mostra a expressão transitória do gene *uidA* que codifica a enzima β-glucuronidase (GUS), sob o controle do promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor (CaMV), em folhas cotiledonares, após 15 dias do co-cultivo. Pode-se observar que a transformação dos cotilédones ocorre preferencialmente nas regiões periféricas (Figura 4B). A figura 5 mostra a sequência completa do processo de transformação de *E. grandis* x *E. urophylla* de cotilédones ou folhas de clones micropropagados. Após a inoculação dos tecidos com a *Agrobacterium*, o material é transferido para o meio de formação de calo M1 (Tabela 1) contendo 5 mg/L de genética G-418 (Figura 5C). Posteriormente, os cali são transferidos para o meio de indução de brotações M2 (Tabela 1) na presença do agente seletivo (Figura 5D), até a formação de brotações, que são, então, mantidas em meio de alongamento (MA, Tabela 1) por 30 dias, sendo, em seguida, transferidas para meio de enraizamento (ME, Tabela 1) (Figura 5E). Uma vez formadas as raízes, as plântulas são transferidas para vaso e mantidas em câmara de crescimento sob condições controladas (Figura 5F). A análise molecular para a confirmação da integração do gene de interesse no genoma da planta é feita com o auxílio da técnica de Southern blot, como ilustra-

do na figura 5G, para quatro plantas transgênicas de *E. grandis* x *E. urophylla* que expressam o gene *Lhcb1*2* de ervilha (González et al., 2002).

Agradecimentos

Esse projeto foi financiado pela FAPESP (Inovação Tecnológica 98/01394-0), Cia. Suzano de Papel e Celulose, CNPq/Rhae e CAPES.

Referências Bibliográficas

Azmi A Dewitte W, Drevet C, Vanonckelen H, Landre P, Boudet AM, Jouanin L, Chriqui D (1997) Bud regeneration from *Eucalyptus globulus* clones and seedlings through hormonal imbalances induced by *Agrobacterium tumefaciens* strain 82.139. *Plant Science*, 127:81-90

Barrueto Cid LP, Illg RD, Piedrabuena AE (1994) Regeneration of garlic plants (*Allium sativum* L., cv. 'chonan') via cell culture in liquid medium. *In Vitro Cell Dev. Biol.* 30:150-155

Barrueto Cid LP, Gomes ACM, Costa SBR, Brasileiro ACM (1999). Plant regeneration from seedling explants of *Eucalyptus grandis* X *E. urophylla*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 56:17-23

Bennett IJ, McComb JA (1982) Propagation of Jarrah (*Eucalyptus-Marginata*) by organ and tissue-culture. *Australian Forest Research*, 12:121-127

Gonzalez ER, Andrade A, Bertolo AL, Lacerda GC, Carneiro RT, Defávare VAP, Labate CA (2002) Production of transgenic *Eucalyptus grandis* X *E. urophylla* using sonication assisted *Agrobacterium* transformation (SAAT) system. *Func. Plant Biol.*, 29:97-102

Harcourt RL, Kyojuka J, Floyd RB, Bateman KS, Tanaka H, Decroocq V, Llewellyn DJ, Zhu X, Peacock WJ, Dennis ES (2000) Insect and herbicide-resistant transgenic eucalypts. *Molecular Breeding*, 6: 307-315

Hare PD, Van Staden J (1994) Inhibitory effect thidiazuron on the activity of cytokinin oxidase isolated from soybean callus. *Plant Cell Physiol.* 35:1121-1125

Ho CK, Chang SH, Tsay JY, Tsai CJ, Chiang VL, Chen ZZ (1998) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Eucalyptus camaldulensis* and production of transgenic plants. *Plant Cell Reports*, 17:675-680

Huetteman CA, Preece JE (1993) Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 33:105-119

Laine E, David A (1994) Regeneration of plants from leaf explants of micropropagated clonal *eucalyptus-grandis*. *Plant Cell Reports*, 13:473-476

Lu CY (1993) The use of thidiazuron in tissue culture. *In Vitro Cell Dev. Biol.* 29: 92-96

Moralejo M, Rochange F, Boudet AM, Teulière C (1998) Generation of transgenic *Eucalyptus globulus* plantlets through *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation. *Australian Journal Plant Physiology*. 25: 207-212

Mullins KV, Llewellyn DJ, Hartney VJ, Strauss S, Dennis ES (1997) Regeneration and transformation of *Eucalyptus camaldulensis*. *Plant Cell Reports* 16: 787-791

Muralidharan EM, Mascarenhas AF (1987) In vitro plantlet formation by organogenesis in *Eucalyptus camaldulensis* and by somatic embryogenesis in *Eucalyptus citriodora*. *Plant Cell Rep.* 6:256-259

Muralidharan EM, Gupta PK, Mascarenhas AF (1989) Plantlet production through high frequency somatic embryogenesis in long term cultures of *Eucalyptus citriodora*. *Plant Cell Rep.* 8:41-43

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

Subbaiah MM, Minocha SC (1990) Shoot regeneration from stem and leaf callus of *eucalyptus-tereticornis*. *Plant Cell Reports*, 9:370-373

Tibok A, Blackhall NW, Power JB, Davey MR (1995) Optimized plant-regeneration from callus derived from seedling hypocotyls of *eucalyptus-urophylla*. *Plant Science*, 110:139-145

Watt MP, Blakeway F, Cresswell CF, Herman B (1991) Somatic embryogenesis in *Eucalyptus grandis*. *South African For. J.* 157:59-65