

Avaliação de diferentes dias de cocultivo na transformação genética do clone 3336 de *E. grandis* x *E. urophylla*

Gisela Manuela de França Bettencourt

Acadêmica do curso de Biotecnologia, Universidade Tuiuti do Paraná

Juliana Degenhardt-Goldbach

Engenheira-agrônoma, Doutora, Pesquisadora da Embrapa Florestas

juliana.degenhardt@embrapa.br

A transferência de genes de interesse em plantas pode ser realizada pelo método indireto, utilizando a *A.tumefaciens* como vetor biológico para a introdução do DNA na planta. O presente trabalho teve como objetivo transformar geneticamente o clone 3336 e testar diferentes dias de cocultivo. Foram utilizados explantes foliares do clone mantido *in vitro*, e colocados em contato com a bactéria (OD 600nm = 0,450) contendo plasmídeo com o gene de seleção para resistência a canamicina. Em seguida, os explantes foram transferidos para meio de regeneração WPM suplementado com 30 g/L de sacarose, 500 mgL⁻¹ de PVP, 0,5 µM de TDZ e 0,1 µM de ANA e 7 gmL⁻¹ de ágar, e colocados no escuro a 23 ± 2 °C. Foram testados 1, 2, 3 e 4 dias de cocultivo. Após o cocultivo, os explantes foram lavados com água destilada por três vezes, sendo na última adicionado 150 mgL⁻¹ de cefotaxima. Os explantes foram então transferidos para meio de regeneração acrescido de 12,5 mgL⁻¹ de canamicina e 250 mgL⁻¹ de Augmentina por 28 dias. Em seguida, seguiram para meio de indução de brotos (WPM suplementado com 5,0 µM de BAP e 0,5 µM ANA), sob fotoperíodo de 16 h de luz. A concentração da canamicina foi elevada para 25 mgL⁻¹ e 50 mgL⁻¹, após 60 e 90 dias do início do experimento, respectivamente. Para cada experimento, foram utilizadas quatro placas com 20 repetições. As brotações formadas foram transferidas para o meio de multiplicação MS contendo 50 mgL⁻¹ de canamicina. Não foi observada diferença entre os tratamentos quanto à formação de calos. Foram observadas brotações em menos de 10% dos explantes, demonstrando o efeito tóxico da canamicina sobre as células não transformadas (no controle, sem transformação a regeneração foi de 40%). Após 240 dias da transformação permanecem quatro eventos putativos, provindos do experimento com três dias de cocultivo em meio de multiplicação, sugerindo que este tempo seja mais eficiente na transformação deste clone. No entanto, são ainda necessárias análises moleculares para confirmar se as brotações contêm a integração do gene de resistência à canamicina, para seguir com os experimentos de enraizamento e aclimatização.

Palavras-chave: *Agrobacterium tumefaciens*; Engenharia genética; canamicina.

Apoio/financiamento: Embrapa Florestas.