

Determinação da concentração de canamicina na seleção de plantas transgênicas do clone 3336 de *Eucalyptus urograndis*

Laudiane Bruna Zanella

Acadêmica do curso de Biotecnologia, Universidade Tuiuti do Paraná

Alice Lichs Marssaro

Acadêmica do curso de Biotecnologia, Pontifícia Universidade Católica do Paraná

Juliana Degenhardt-Goldbach

Engenheira-agrônoma, Doutora, Pesquisadora da Embrapa Florestas

juliana@cnpf.embrapa.br

Transformação genética é uma técnica da biotecnologia que vem sendo estudada devido ao seu potencial de superexpressar ou silenciar genes de interesse em espécies cultivadas. O presente trabalho teve como objetivo otimizar o protocolo de transformação genética do clone 3336 de *Eucalyptus urograndis* visando determinar a concentração ideal de canamicina na seleção de plantas transformadas. A transformação genética foi realizada via *Agrobacterium tumefaciens*, plasmídeo pCAMBIA230, que contém o gene de seleção *nptII*, que confere resistência ao antibiótico canamicina. Após crescer por 16 h e atingir OD₆₀₀=0,6 nm, a bactéria foi ressuspensa em meio MS líquido, no qual foram adicionados os explantes. Em seguida, os explantes foram introduzidos em meio de regeneração WPM, contendo 20 gL⁻¹ de sacarose, 0,1 gL⁻¹ de mio-inositol, 250 mgL⁻¹ PVP, 0,1 µM de ANA, 0,25 µM de TDZ e 7gL⁻¹ de ágar para o cocultivo. Após quatro dias, os explantes foram lavados e transferidos para meio de regeneração acrescido de 150 mgL⁻¹ de cefotaxima, e diferentes concentrações de canamicina, 12,5 mgL⁻¹ (T1), 25 mgL⁻¹ e 50 mgL⁻¹, e cultivados no escuro à temperatura de 23±2 °C, transferindo-os para meio fresco a cada 15 dias. Cada tratamento constou de 10 placas com 20 explantes. Trinta dias após o início do experimento, os explantes foram repicados para meio de regeneração (WPM suplementado com 5,0 µM de BAP e 0,5 µM ANA) e transferidos para sala de cultivo sob fotoperíodo de 16 h de luz e mesma temperatura. Após 35 dias foi avaliada a porcentagem de explantes com calos, regeneração e oxidação e os resultados foram comparados pelo teste t-student (p<0,05). Houve diferença estatística para a formação de calos entre T1 e T3, com 72% e 52%, respectivamente. O T2 não diferiu estatisticamente dos demais. Não houve diferença estatística com relação à oxidação, que variou entre 21% e 37%. Houve regeneração apenas nos tratamentos T1 (3%) e T2 (1%), sugerindo que a dose de 50 mgL⁻¹ de canamicina foi muito tóxica, não permitindo a regeneração de explantes transformados. No entanto, os brotos regenerados terão que ser avaliados por PCR para confirmação da transformação.

Palavras-chave: transformação genética; melhoramento genético; regeneração.

Apoio/financiamento: CNPq; Embrapa.