

EXPRESSÃO TRANSIENTE DO GENE *uidA* EM EXPLANTES FOLIARES DE *Eucalyptus saligna* Sm. TRANSFORMADO VIA *Agrobacterium tumefaciens*

TRANSIENT EXPRESSION OF *uidA* GENE IN LEAF EXPLANTS OF *Eucalyptus saligna* Sm. TRANSFORMED VIA *Agrobacterium tumefaciens*

André Luís Lopes da SILVA¹; Yohana de OLIVEIRA²; Marcia PROCOPIUK²;
Clarissa de Souza MUDRY²; Gilvano Ebling BRONDANI²; Jefferson da Luz COSTA³;
Gessiel Newton SCHEIDT³

1. Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia; Universidade Federal do Paraná; 81531-970; Curitiba, PR, Brasil. clonageinvitro@yahoo.com.br; 2. Departamento de Fitotecnia e Fitosanitarismo; Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brasil.
3. Departamento de Ciências Agrárias e Tecnológicas; Universidade Federal do Tocantins, Gurupi, TO, Brasil.

RESUMO: O objetivo desse trabalho foi avaliar a influência do pré-cultivo de explantes foliares e do meio de cultura na ressuspensão de *Agrobacterium tumefaciens* para infecção dos explantes. Os meios MS/2 (50% da concentração de sais) e MS N/2 (50% da concentração de NH_4NO_3 e KNO_3) + PGR (1,0 μM de TDZ (thidiazuron) + 0,1 μM de ANA (ácido naftalenoacético)) foram testados na ressuspensão da bactéria para infecção dos explantes. O pré-cultivo consistiu da manutenção dos explantes em meio de cultura para formação de calos (MS N/2 + PGR) durante um dia, sendo o tratamento sem pré-cultivo substituído dos explantes após a excisão dos mesmos. Os explantes foram mantidos no escuro a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ mediante a utilização de plástico preto. O delineamento usado foi o inteiramente casualizado com 20 explantes. Os experimentos foram repetidos duas vezes. O meio MS/2 promoveu resultados superiores (22,4%) comparado ao meio MS N/2 + PGR (14,5%) para a percentagem de área com expressão do gene *uidA*. Aos 7 dias de cultivo em meio seletivo, a percentagem de área expressando o gene *uidA* foi 1,6 no MS/2 e 0% para o MS N/2 + PGR. O pré-cultivo produziu resultados superiores aos encontrados sem pré-cultivo, atingindo 31,4% de expressão transiente e no tratamento sem pré-cultivo 2,1%. Após 7 dias de cultivo em meio seletivo, a percentagem de área de expressão dos explantes do tratamento com pré-cultivo permaneceu 4,8% e 0% para o tratamento sem pré-cultivo. Os resultados indicam que o pré-cultivo e ressuspensão da bactéria em meio MS/2 aumentaram a eficiência da expressão transiente do gene *uidA* em explantes foliares de *E. saligna*.

PALAVRAS-CHAVE: Espécie lenhosa. Transformação genética. EHA105. Gene *GUS*. β -glucuronidase.

INTRODUÇÃO

As primeiras espécies de *Eucalyptus* geneticamente transformadas foram provenientes de *E. globulus*, através de biobalística (SERRANO et al., 1996) e *E. camaldulensis* via *Agrobacterium tumefaciens* (MULLINS et al., 1997). Posteriormente vários estudos foram realizados, entretanto poucos trabalhos relatam a obtenção de plantas transgênicas das principais espécies de interesse econômico. Além disso, existe uma grande dificuldade para regenerar plantas transgênicas de *Eucalyptus*, alcançando-se baixos índices de plantas transformadas. O protocolo estabelecido para *E. saligna* apresentou uma eficiência de 0,5% (1:200 explante transformado:explantes inoculados) (DIBAX et al., 2010), carecendo de mais pesquisas para otimizá-lo. Muitos fatores estão relacionados com o processo de transformação genética via *Agrobacterium*, tais como a adição de acetosiringona (SILVA et al., 2011), tipo de explante (TAZEEN; MIRZA, 2004), sonificação (HUSSAIN et al., 2007) genótipo, tempo de

infecção e co-cultura (ZIA et al., 2010), dentre outros.

A eficiência de transformação de uma determinada espécie está relacionada ao sistema de seleção dos transformantes (SILVA et al., 2010; SILVA et al., 2011), meio de cultura, temperatura e duração da co-cultura, genótipo, linhagem de *Agrobacterium*, além de muitos outros que normalmente não são considerados.

Diante do exposto, os objetivos desse trabalho foram avaliar a influência de dois meios de cultura para a ressuspensão do *Agrobacterium tumefaciens* e tempo de pré-cultivo dos explantes na expressão transiente do gene *uidA* em explantes foliares de *Eucalyptus saligna*.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

Brotações múltiplas (várias brotações unidas em um único explante) de *Eucalyptus saligna* originados a partir de explantes cotiledonares e multiplicados conforme o protocolo estabelecido

por DIBAX et al. (2010) foram utilizadas como fontes de explantes foliares (décimo segundo subcultivo). Esses explantes foram cultivados em sala de crescimento com a temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 2$ e fotoperíodo de 16 horas, sob uma intensidade luminosa de $30 \mu\text{M m}^{-2} \text{s}^{-1}$ obtida de lâmpadas fluorescentes brancas. Os frascos de cultivo tinham as seguintes dimensões, 6,5 cm de diâmetro de largura e 8,5 cm de altura e foram vedados com tampa de polipropileno rígido. Para a realização dos experimentos os explantes foliares foram retirados das brotações (terceira a sexta folha distal do broto) contido em brotações múltiplas e cortados longitudinalmente (porção distal e proximal). Os explantes utilizados no experimento avaliando o meio de ressuspensão da bactéria foram seccionados e mantidos em solução antioxidante (250 mg.L^{-1} de ácido ascórbico, 25 mg.L^{-1} de ácido cítrico e 1 g.L^{-1} de PVP40 (polivilpirrolidona), pH 5,0) durante a retirada dos explantes dos brotos doadores (TOURNIER et al., 2003). Essa solução antioxidante não foi usada para o preparo dos explantes utilizados no experimento com o pré-cultivo. O pré-cultivo consistiu da manutenção dos explantes em meio de cultura MS para formação de calos (MURASHIGE; SKOOG, 1962) e MS N/2 ($10,3 \text{ mM}$ de NH_4NO_3 e $9,4 \text{ mM}$ KNO_3) + $1,0 \mu\text{M}$ de TDZ (tidiazuron) e $0,1 \mu\text{M}$ de ANA (ácido naftalenoacético), sendo o tratamento sem pré-cultivo constituído de explantes após o preparo dos mesmos. Os meios foram suplementados com 30 g.L^{-1} de sacarose e solidificados com 7 g.L^{-1} de ágar. O pH foi ajustado para 5,8. Todos os meios de cultura foram autoclavados por 15 min a 121°C e 103 KPa.

Linhagem, plasmídeo e condições de cultura e co-cultura de *Agrobacterium tumefaciens*

A linhagem EHA105 (HOOD et al., 1993) de *A. tumefaciens*, e o plasmídeo pBI121 (ZHANG et al., 1995) foram utilizados. O plasmídeo pBI121 carrega o gene de interesse, P5CSF129A, que é uma forma mutante do gene P5CS de *Vigna aconitiflora* (HONG et al., 2000). Este gene está sob o controle do promotor 35S-CaMV (do vírus do mosaico da couve-flor). Este gene está situado entre o promotor e a região NOS-3', esta construção foi inserida no sítio EcoRI do vetor pBI121. Este vetor contém também os genes nptII e uidA (GUS), controlados pelos promotores, NOS-P (nopalina sintetase) e 35S, respectivamente, ambos contendo o terminador NOS-3' (Figura 1).

A linhagem EHA105 foi mantida em meio YEB sólido (7 g.L^{-1} de ágar) (VERVLIET et al.,

1975) e suplementado com 50 mg.L^{-1} de canamicina e 25 mg.L^{-1} de rifampicina a 28°C durante 48h (no escuro) para a obtenção de colônias isoladas. Colônias isoladas (2 a 4 colônias) de EHA105 foram coletadas com o uso de palitos estéreis e cultivadas em 5 mL de meio YEB líquido adicionado de 50 mg.L^{-1} de canamicina e 25 mg.L^{-1} de rifampicina a 28°C no escuro por 24h em agitador orbital (150 rpm). A absorbância (densidade ótica) da suspensão bacteriana foi determinada por leitura em espectrofotômetro, a cultura foi ajustada por diluição com meio YEB suplementado como descrito acima, diluições foram realizadas até a obtenção do valor da $\text{DO}_{600\text{nm}} = 0,85$. A suspensão bacteriana (1 mL) foi transferida para um tubo de microcentrífuga estéril. Esta suspensão celular foi centrifugada a 5.000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 1 mL de meio de cultura líquido, sendo o MS/2 (50% da concentração de sais) ou MS N/2 ($10,3 \text{ mM}$ de NH_4NO_3 e $9,4 \text{ mM}$ KNO_3) + $1,0 \mu\text{M}$ de TDZ (thidiazuron) e $0,1 \mu\text{M}$ de ANA (ácido naftalenoacético), conforme o experimento realizado, esses meios foram suplementados com 30 g.L^{-1} de sacarose e pH ajustado para 5,8. Todos os antibióticos usados nesse trabalho foram esterilizados por microfiltração ($0,22 \mu\text{m}$).

Condições gerais de inoculação

Os explantes foliares cortados transversalmente foram inoculados em solução bacteriana e incubados por um período de 30 minutos sob agitação de 150 rpm à 25°C (no escuro). Em seguida, foram secos em papel filtro estéril e co-cultivados em meio de cultura MS N/2 contendo 30 g.L^{-1} de sacarose, $0,1 \mu\text{M}$ de ANA e $1,0 \mu\text{M}$ de TDZ. Ao final do período de co-cultura (5 dias), os explantes foram transferidos para o mesmo meio acrescido de 250 mg.L^{-1} de Cefotaxima® e 15 mg.L^{-1} de canamicina para a eliminação da *Agrobacterium tumefaciens* e seleção das células transformadas. As placas de Petri contendo os explantes foram mantidas no escuro em sala de crescimento a $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ mediante a utilização de um plástico preto. As placas de Petri utilizadas tinham 10 cm de diâmetro e 25 mL de volume. Foram vedadas com filme de PVC (polivinilcloro).

Ensaio histoquímico da β -glucuronidase (GUS)

A expressão transiente do gene uidA nos explantes foliares foi avaliada após o final da co-cultura (quinto dia) e após sete dias em meio seletivo pela expressão do gene uidA, através de detecção histoquímica da atividade da β -glucuronidase, conforme JEFFERSON et al. (1987). Os explantes

foram colocados em tubos eppendorfs de 1 mL e cobertos por X-Gluc (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucoronídeo). Após 16 h em temperatura de 37 °C, foi realizada a remoção do reagente e as amostras foram lavadas três vezes em álcool etílico 70% para a remoção da clorofila, para melhorar a

visualização da coloração azul expressa pela reação histoquímica. Após a remoção da clorofila as amostras foram mantidas em álcool etílico 70%, para posteriormente serem analisadas em estereomicroscópio (40X).

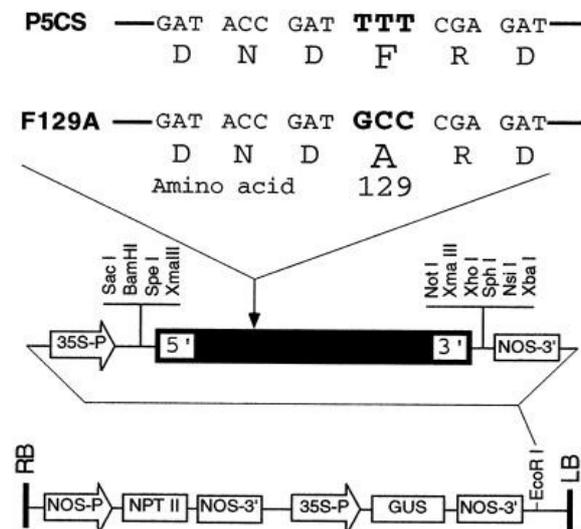


Figura 1. Região de transferência do plasmídeo pBI121 (T-DNA), onde: *P5CS* é o gene de *Vigna aconitifolia* (Δ^1 - Pirrolina – 5 – Carboxilato Sintase); *nptII*, gene que codifica a neomicina fosfotransferase II; *gus*, gene que codifica β -glucuronidase; NOS-P, promotor do gene da nopalina sintetase de *A. tumefaciens*; 35S-P, promotor constitutivo do CaMV; NOS-3', NOS 3', terminador do gene da nopalina sintetase de *A. tumefaciens*; RD, borda direita do T-DNA; LB, borda esquerda do T-DNA (HONG et al., 2000).

Os explantes foram fotografados e as imagens analisadas pelo Software Scion Image (Scion Corp., Fredrick, Maryland, USA) para determinação da percentagem da área azul. Todos os experimentos foram repetidos duas vezes, com resultados consistentes.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Primeiro experimento

Foi observado que no final da co-cultura, o meio MS/2 promoveu resultados superiores ao MS N/2+PGR, sendo que a percentagem de área que apresentou expressão do gene *uidA* foi de 22,4% e no segundo 14,5% (Tabela 1). Após 7 dias de cultivo em meio seletivo, a percentagem de área expressando o gene *uidA* foi 1,6% quando foi usado o MS/2 e 0% quando usado MS N/2 + PGR (Tabela 1). Esses resultados sugerem que um maior potencial osmótico é benéfico para o aumento da expressão transiente, considerando que o meio MS com 50% da concentração dos sais e isento de reguladores de crescimento apresenta menor concentração de sais do que o MS N/2 suplementado com reguladores de crescimento. Contudo, outros fatores como a composição do meio

de cultura e a presença ou ausência de reguladores de crescimento também podem influenciar nas respostas dos cultivos *in vitro*, sendo que novos estudos poderão elucidar tais observações.

Na transformação genética do híbrido de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*, os explantes foram inoculados numa suspensão de *Agrobacterium tumefaciens* (meio C, meio desenvolvimento para co-cultura de explantes foliares e *A. tumefaciens*) com suplementação de 1 mM de prolina (TOURNIER et al., 2003). A prolina é um osmoprotetor, que funciona como um osmólito, o qual age no ajuste osmótico da célula, auxiliando a manter o balanço hídrico da planta, sem que haja decréscimo do turgor ou volume celular (TAIZ; ZEIGER, 2004).

Ambos os meios, MS/2 e MS N/2 + PGR (“Plant Growth Regulators”) apresentaram 100% dos explantes com alguma área expressando o gene *GUS* no final da co-cultura, entretanto, apenas os explantes cultivados no meio MS/2 continuaram apresentando expressão transiente do gene *GUS* ao sétimo dia de cultivo em meio com canamicina (10%) (Tabela 1). Esses resultados são discordantes com os observados durante a transformação genética de *E. saligna*, onde 100% e 50% dos explantes

foliares apresentaram expressão transiente do gene *GUS* ao final de cinco dias de co-cultura e após sete dias de cultivo em meio com 50 mg.L⁻¹ de canamicina e 500 mg.L⁻¹ de cefotaxima® (DO₆₀₀=1,0) (DIBAX et al., 2010). Entretanto, essas

diferenças podem ter ocorrido pela densidade ótica utilizada ter sido maior do que a usada nesse trabalho (DO₆₀₀=0,85), além de que o meio de ressuspensão das bactérias também ter sido diferente.

Table 1. Expressão do gene *uidA* em explantes foliares de *Eucalyptus saligna* cultivados em dois meios de cultura usados para ressuspensão da solução bacteriana. Explantes tratados com solução antioxidante (TOURNIER et al., 2003) e sem pré-cultivo. Curitiba, 2008.

Meio de cultura	DCC	EET %	DEET % ³				MG %
			1-25	26-50	51-75	76-100	
MS/2*	0	100	60	30	0	10	22,4 ± 24,8
	7	10	10	0	0	0	1,6 ± 0,0
MS N/2** + PGR ²	0	100	40	30	0	0	14,5 ± 16,4
	7	0	0	0	0	0	0,0 ± 0,0

* MS/2 = meio MS com 50% da concentração de sais; ** MS N/2 = Meio MS (10,3 mM de NH₄NO₃ e 9,4 mM KNO₃); ² 1,0 µM de TDZ e 0,1 µM de ANA; ³ Explantes que apresentaram área azul abaixo de 1% não consta na distribuição de frequência; DCC = Dias após co-cultura, EET % = Explantes apresentando expressão do gene *uidA* (%), DEET % = Distribuição dos explantes com expressão transiente com base na porcentagem de área, MG % = Média geral da porcentagem de área com expressão transiente.

A presença de reguladores de crescimento no meio MS N/2 não favoreceram a expressão transiente do gene *uidA*, porém a expressão foi maior no meio MS/2 que não apresentava reguladores de crescimento, esses resultados contradizem os resultados encontrados na transformação genética de *Arabidopsis thaliana* em que os reguladores de crescimento demonstraram efeitos positivos (AKAMA et al., 1992). Entretanto, é possível que esses explantes foliares de *E. saligna* cultivados na ausência de reguladores de crescimento apresentem uma elevada taxa de divisão celular, o que resultou numa maior suscetibilidade à infecção pela *Agrobacterium tumefaciens* (VILLEMONT et al., 1997).

Segundo experimento:

No experimento com o pré-cultivo dos explantes, foi observado que no final da co-cultura, o pré-cultivo produziu resultados superiores aos encontrados sem pré-cultivo, atingindo 31,4% de porcentagem de área que apresentou expressão do gene *uidA* e no tratamento sem pré-cultivo 2,1% (Tabela 2, Figura 2). Após 7 dias de cultivo em meio seletivo, a porcentagem de área de expressão dos explantes do tratamento com pré-cultivo permaneceu 4,8% e 0% do tratamento que não foi pré-cultivado (Tabela 2).

Na transformação genética do híbrido de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*, o pré-cultivo de explantes foliares favoreceu o aumento da

expressão transiente proporcionalmente ao aumento de dias, sendo observados 70, 80 e 90% para ausência de pré-cultura, um e dois dias de pré-cultivo, respectivamente (ALCANTARA et al., 2011). Foi sugerido que a causa do aumento da expressão transiente dos explantes pré-cultivados seja devido ao favorecimento da ligação do *Agrobacterium* ao explante, possivelmente pela síntese de novas células (divisão celular) no local do ferimento e a produção de compostos indutores de genes *vir*, pelo metabolismo ativo dessas células (SUNILKUMAR et al., 1999).

O preparo dos explantes com o uso da solução antioxidante proporcionou maiores taxas de expressão transiente do gene *GUS*, como observado nos dois experimentos em que foi usado o meio MS/2 para ressuspensão da bactéria e sem a realização do pré-cultivo (Tabelas 1 e 2). Os explantes preparados na solução antioxidante apresentaram uma área com expressão transiente de 22,4% comparado com 2,1% dos explantes que foram cortados sem o uso da solução antioxidante no final da co-cultura. No final do sétimo dia de cultivo em meio com canamicina, os explantes cortados no antioxidante obtiveram 2,1% e 0% de expressão nos explantes sem o uso da solução. O aumento da expressão transiente nos explantes tratados com solução antioxidante pode ter sido causada devido a diminuição da oxidação dos explantes.

Tabela 2. Expressão do gene *gus* em explantes foliares de *Eucalyptus saligna* inoculados com *A. tumefaciens* após um dia de pré-cultivo* e sem pré-cultivo. Explantes não tratados com antioxidante. Curitiba, 2008.

Tempo de pré-cultivo (dias)	DCC	EET %	DEET % ¹				MG %
			1-25	26-50	51-75	76-100	
0	0	100	60	0	0	0	2,1 ± 2,3
	7	0	0	0	0	0	0,0 ± 0,0
1	0	100	40	30	30	0	31,4 ± 21,5
	7	60	50	0	0	0	4,8 ± 4,2

¹ Explantes que apresentaram área azul abaixo de 1% não constam na distribuição de frequência;* Meio de indução de calos (Meio MS com 10,3 mM de NH₄NO₃ e 9,4 mM KNO₃ + 1,0 μM de TDZ e 0,1 μM de ANA). DCC = Dias após co-cultura, EET% = Explantes apresentando expressão do gene *uidA* (%), DEET% = Distribuição dos explantes com expressão transiente com base na percentagem da área azul (%), MG% = Média geral da percentagem de área com expressão transiente.

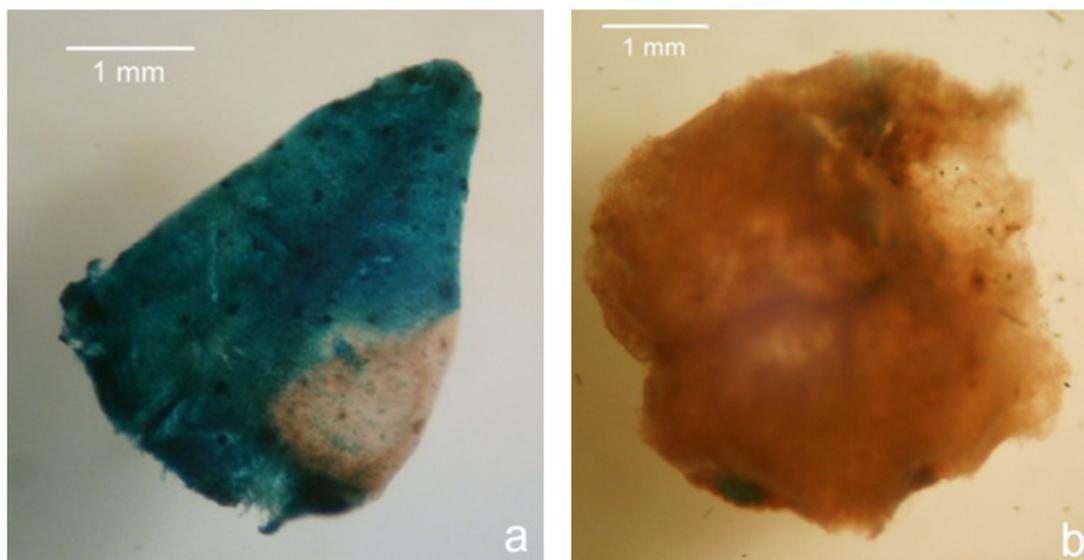


Figura 2. Expressão transiente do gene *uidA* em explantes foliares de *Eucalyptus saligna*. (a) Após 5 dias de co-cultura. (b) Após 7 dias de cultivo em meio com canamicina.

Os resultados obtidos nesse estudo podem ser utilizados para otimização do protocolo de transformação genética de *E. saligna*, porém diversos outros fatores ainda não elucidados também podem ter uma influência positiva para o processo de transformação genética.

CONCLUSÃO

O uso da solução antioxidante, pré-cultivo e ressuspensão da bactéria em meio MS/2 aumentam

eficiência da expressão transiente do gene *uidA* em explantes foliares de *E. saligna*.

AGRADECIMENTOS

À Professora Marguerite Quoirin por ter permitido a realização dessa pesquisa.

ABSTRACT: The aim of this research was to evaluate the effect of the pre-culture of leaf explants and the effect of the culture medium for the *Agrobacterium tumefaciens* resuspension to the explant infection. The media, MS/2 (half strength) and MS N/2 (10.3 mM NH₄NO₃ and 9.4 mM KNO₃) + PGR (1.0 μM TDZ (thidiazuron) and 0.1 μM NAA (1-Naphthaleneacetic acid)) were tested for the bacteria resuspension. The pre-culture consisted of the maintenance of the explants on culture medium for callus formation (MS N/2+PGR) during one day and the treatment without pre-culture consisted of the use of the explants after the excision of the same ones. At the end of the co-culture, the MS/2 promoted results superior to the MS N/2+PGR, and the area percentage that presented expression of the gene *uidA* was of 22.4% compared at 14.5%. To the 7 days of culture on a medium with kanamycin, the area percentage expressing the gene *uidA* was 1.6 in MS/2 and 0% for the MS N/2+PGR. At the end of the co-culture, the pre-culture produced results superior to the found in the treatment without pre-culture, reaching 31.4% of expression and in the treatment without pre-culture 2.1%. After 7 days of culture on a medium with kanamycin, the area percentage of explant expression of the treatment with pre-culture stayed 4.8% and 0% for the treatment without pre-culture. The results indicate that the pre-culture and the bacteria resuspension in MS/2 increase the efficiency of the transient expression of the gene *uidA* in leaf explants of *E. saligna*.

KEYWORDS: Woody Plant. Genetic transformation. EHA105. *GUS* gene. β-glucuronidase.

REFERENCES

- AKAMA, K.; SHIRAIISHI, H.; OHTA, S.; NAKAMURA, K.; OKADA, K.; SHIMURA, Y. Efficient transformation of *Arabidopsis thaliana*: comparison of the efficiencies with various organs, plant ecotypes and *Agrobacterium* strains. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 12, p. 7–11, 1992.
- ALCANTARA, G. B.; BESPALHOK FILHO, J. C.; QUOIRIN, M. Organogenesis and transient genetic transformation of the hybrid *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 68, p. 246-251, 2011.
- DIBAX, R.; DESCHAMPS, C.; BESPALHOK FILHO, J.C.; VIEIRA, L.G.E.; MOLINARI, H.B.C.; CAMPOS, M.K.F.; QUOIRIN, M. Organogenesis and *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Eucalyptus saligna* with *P5CS* gene. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 54, n. 1, p. 6-12, 2010.
- HONG, Z.; LAKKINENI, K.; ZHANG, Z.; VERMA, D. P. S. Removal of feedback inhibition of Δ¹-Pyrroline-5-Carboxylate Synthetase results in increased Proline accumulation and protection of plants from osmotic stress. **Plant Physiology**, Washington, v. 122, p. 1129-1136, 2000.
- HOOD, E. E.; GELVIN, S. B.; MELCHERS, L. S.; HOEKEMA, A. New *Agrobacterium* helper plasmids for gene transfer to plants. **Transgenic Resource**, v. 2, p. 208-218, 1993.
- HUSSAIN, S. S.; HUSNAIN, T.; RIAZUDDIN, S. Sonication assisted *Agrobacterium* mediated transformation (SAAT): an alternative method for cotton transformation, **Pakistan Journal of Botany**, Karachi, v. 39, n. 1, p. 223-230, 2007.
- JEFFERSON, R. A.; KAVANAGH, T. A.; BEVAN, M. W. *GUS* fusions beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. **EMBO Journal**, Oxford, v. 6, n. 13, p. 3901-3907, 1987.
- MULLINS, K. V.; LLEWELLYN, D. J.; HARTNEY, V. J.; STRAUSS, S.; DENNIS, E. S. Regeneration and transformation of *Eucalyptus camaldulensis*. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 16, n. 11, p. 787-791, 1997.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 473-497, 1962.
- SERRANO, L.; ROCHANGE, F.; SEMBLAT, J. P.; MARQUE, C.; TEULIÈRES, C.; BOUDET, A. M. Genetic transformation of *Eucalyptus globulus* through biolistics: complementary development of procedures

for organogenesis from zygotic embryos and stable transformation of corresponding proliferation tissue. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 47, n. 295, p. 285-290, 1996.

SILVA, A. L. L.; OLIVEIRA, Y.; COSTA, J. L.; MASETTO, E.; MUDRY, C. S.; LEMUS ERASMO, E. A.; SCHEIDT, G. N. Shoot tip and cotyledon explants of *Eucalyptus saligna* Sm. cultivated on different kanamycin levels. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 1, p. 1-5, 2010.

SILVA, A. L. L.; OLIVEIRA, Y.; COSTA, J. L.; MUDRY, C. S.; PROCOPIUK, M.; SCHEIDT, G. N.; BRONDANI, G. E. Preliminary results for genetic transformation of shoot tip of *Eucalyptus saligna* sm. via *Agrobacterium tumefaciens*. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 2, p. 1-6, 2011.

SUNILKUMAR, G.; VIJAYACHANDRA, K.; VELUTHAMBI, K. Pre-incubation of cut tobacco leaf explants promotes *Agrobacterium*-mediated transformation by increasing *vir* genes induction. **Plant Science**, Limerick, v. 141, p. 51-58, 1999.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3 Ed. Porto Alegre: Artmed, 2004, 719p.

TAZEEN, S.; MIRZA, B. Factors affecting *Agrobacterium tumefaciens* mediated genetic transformation of *Vigna radiata* (L.) Wilczek. **Pakistan Journal of Botany**, Karachi, v. 36, n. 4, p. 887-896, 2004.

TOURNIER, V.; GRAT, S.; MARQUE, C.; EL KAYAL, W.; PENCHEL, R.; ANDRADE, G. DE, BOUDET, A.-M., TEULIÈRES, C. An efficient procedure to stably introduce genes into an economically important pulp tree (*Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*). **Transgenic Research**, London, v.12, p.403-411, 2003.

VERVLIET, G.; HOLSTERS, M.; TEUCHY, H.; VAN MONTAGU, M.; SCHELL, J. Characterization of different plaque-forming and defective temperate phages in *Agrobacterium* strains. **Journal of General Virology**, London, v. 23, p. 33-48, 1975.

VILLEMONT, E.; DUBOIS, F.; SANGWAN, R. S.; VASSEUR, G.; BOURGEOIS, Y.; SANGWAN-NORREEL, B. S. Role of the host cell cycle in the *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of *Petunia*: Evidence of an S-phase control mechanism for T-DNA transfer. **Planta**, v. 201, p. 160-172, 1997.

ZHANG, C-S.; LU, Q.; VERMA, D. P. S. Removal of feedback inhibition of Δ^1 -Pyrroline-5-Carboxylate Synthetase, a bifunctional enzyme catalyzing the first two steps of proline biosynthesis in plants. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 270, p. 20491-20496, 1995.

ZIA, M.; RIZVI, Z. F.; RIAZ-UR-REHMAN, CHAUDHARY, M. F. *Agrobacterium* mediated transformation of soybean (*Glycine max* L.): Some conditions standardization. **Pakistan Journal of Botany**, Karachi, v. 42, n. 3, p. 2269-2279, 2010.