

ROGÉRIO LUIZ DA SILVA

**EFEITO DE PLANTAS TRANSGÊNICAS DE *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* NA
PROPAGAÇÃO CLONAL, NO CRESCIMENTO, NA NUTRIÇÃO E NOS
INDICADORES DA QUALIDADE BIOLÓGICA DO SOLO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência Florestal, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2009

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV

T

S586e
2009

Silva, Rogério Luiz da, 1974-

Efeito de plantas transgênicas de *Eucalyptus grandis* x
E. urophylla na propagação clonal, no crescimento, na
nutrição e nos indicadores da qualidade biológica do solo /
Rogério Luiz da Silva. – Viçosa, MG, 2009.
viii, 60f.: il.; 29cm.

Orientador: Aloísio Xavier.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Eucalipto - Melhoramento genético. 2. Plantas
transgênicas. 3. Eucalipto - Nutrição. 4. Eucalipto - Efeito
do fósforo. 5. Clonagem. 6. Indicadores biológicos.
I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDO adapt. CDD 22.ed. 634.91653

ROGÉRIO LUIZ DA SILVA

**EFEITO DE PLANTAS TRANSGÊNICAS DE *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* NA
PROPAGAÇÃO CLONAL, NO CRESCIMENTO, NA NUTRIÇÃO E NOS
INDICADORES DA QUALIDADE BIOLÓGICA DO SOLO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência Florestal, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA EM: 06 de março de 2009.

Prof. Ismael Eleotério Pires
(Co-Orientador)

Prof. Júlio César Lima Neves
(Co-Orientador)

Prof. Haroldo Nogueira de Paiva

Pesq. Elizabete Keiko Takahashi

Prof. Aloisio Xavier
(Orientador)

A Deus,

Ao meu falecido pai Jesu Gomes da Silva,

À minha mãe Ledroneta Silva,

Ao povo brasileiro.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida.

Ao Departamento de Engenharia Florestal da Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de participar do Programa de Pós-Graduação em Ciência Florestal, de valor extraordinário para a minha formação científica.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro.

À Oji Paper, em especial ao pesq. Tetsu Kawazu pela viabilização desta pesquisa.

Ao professor Aloisio Xavier, pela orientação efetiva, pelos conselhos e, principalmente, pela confiança em mim depositada.

Aos professores Júlio César Lima Neves e Ismael Eleotério, pelas contribuições e pelo incentivo.

Ao professor Haroldo Nogueira de Paiva, pela amizade e sugestões.

À pesquisadora Elizabete Keiko Takahashi, pela participação efetiva neste trabalho de pesquisa.

Ao Laboratório de Biotecnologia e Biodiversidade para o Meio Ambiente, em especial ao Professor Marcos Rogério Tótola pela participação nesta pesquisa e análises microbiológicas realizadas.

Aos meus amigos Lúcio Mauro, Ana Raquel, Marcos Deon, Leandro, Mila, Silvano, Lucas, William, Ralph, Julimar e Isaac, pela amizade e pelo companheirismo.

À minha família, em especial à minha mãe D. Neta, pelo exemplo de vida.

À Víviam, minha namorada e companheira de todas as horas.

E finalmente, a todos aqueles que contribuíram para o sucesso deste trabalho, os meus sinceros agradecimentos.

BIOGRAFIA

Rogério Luiz da Silva, filho de Jesu Gomes da Silva e de Ledroneta Silva, nasceu em 1º de setembro de 1974, em Senhora de Oliveira, Estado de Minas Gerais.

Em março de 1999, diplomou-se em Engenharia Florestal pela Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, MG.

Em abril de 2001, obteve o título de “Magister Scientiae” em Ciência Florestal, na área de concentração em Silvicultura, na Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

Em janeiro de 2001, foi contratado pela International Paper do Brasil, Mogi Guaçu, SP.

Em março de 2005, iniciou o Programa de Pós-Graduação em Ciência Florestal, em nível de doutorado, na área de concentração em Silvicultura, na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa de tese em março 2009.

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	6
PROPAGAÇÃO CLONAL COM MINIESTACA DE <i>Eucalyptus grandis</i> x <i>E. urophylla</i> GENETICAMENTE MODIFICADAS PARA AQUISIÇÃO DE FÓSFORO	10
RESUMO	10
1. INTRODUÇÃO	11
2. MATERIAL E MÉTODOS	13
2.1. Material genético	13
2.2. Formação do minijardim	13
2.3. Experimento 1 - Tipo das miniestacas	14
2.4. Experimento 2 - Tamanho das miniestacas	14
2.5. Experimento 3 - Dosagem de AIB	15
2.6. Avaliação experimental	15
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	16
3.1. Tipo de miniestacas	16
3.2. Tamanho das miniestacas	18
3.3. Dosagem de AIB	20
4. CONCLUSÕES	22
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	22

CRESCIMENTO E EFICIÊNCIA NUTRICIONAL DE UM CLONE DE <i>Eucalyptus grandis</i> x <i>E. urophylla</i> MODIFICADO GENETICAMENTE EM RELAÇÃO À AQUISIÇÃO DE FÓSFORO	26
RESUMO	26
1. INTRODUÇÃO	27
2. MATERIAL E MÉTODOS	28
2.1. Material genético	28
2.2. Metodologia experimental	29
2.3. Avaliação experimental	30
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
3.1. Crescimento vegetativo	31
3.2. Eficiência nutricional	36
4. CONCLUSÕES	39
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39
INDICADORES DE QUALIDADE BIOLÓGICA DO SOLO, DE CRESCIMENTO E DE NUTRIÇÃO EM PLANTAS DE <i>Eucalyptus grandis</i> x <i>E. urophylla</i> TRANSFORMADAS GENETICAMENTE E INOCULADAS COM ECTOMICORRIZAS	43
RESUMO	43
1. INTRODUÇÃO	44
2. MATERIAL E MÉTODOS	45
2.1. Material genético	45
2.2. Metodologia experimental	46
2.3. Avaliação experimental	47
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
3.1. Indicadores biológicos	49
3.2. Crescimento vegetativo	51
3.3. Eficiência nutricional	53
4. CONCLUSÕES	55
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
3. CONCLUSÕES GERAIS	60

RESUMO

SILVA, Rogério Luiz da, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2009. **Efeito de plantas transgênicas de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* na propagação clonal, no crescimento, na nutrição e nos indicadores da qualidade biológica do solo.** Orientador: Aloisio Xavier. Co-orientadores: Ismael Eleotério Pires, Cosme Damião Cruz e Júlio César Lima Neves.

O presente trabalho teve o objetivo de avaliar o efeito de plantas transgênicas de um clone de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* na propagação clonal, no crescimento vegetativo, na nutrição e nos indicadores da qualidade biológica do solo inoculado com fungos ectomicorrízicos. No experimento, foram utilizadas plantas não transformadas (NT) e transformadas (T) para a superexpressão do gene que codifica a citrato sintase (CS). Para avaliar o efeito da transformação genética na propagação clonal das miniestacas de eucalipto, foi instalado um minijardim clonal de areia visando o fornecimento das miniestacas, que foram submetidas a várias dosagens de AIB (0, 1500, 3000 e 6000 mg L⁻¹), coletadas em diferentes partes do ramo [miniestaca intermediária de 8 cm (MI), miniestaca apical de 12 cm (MA1) e 10 cm (MA2)] e de diversos tamanhos (6, 9, 12 e 15 cm). Os resultados indicaram que a melhor estratégia foi a confecção de miniestacas apicais de aproximadamente 10 cm de comprimento sem o uso de AIB e que a transformação genética influencia a propagação vegetativa das miniestacas, prejudicando o enraizamento e beneficiando o crescimento das mudas. Visando analisar a transformação genética no crescimento e na eficiência nutricional do clone, foram cultivadas, até aos 150 dias de idade, plantas T e NT em Latossolo Amarelo com diferentes doses de fósforo (0, 45 e 90 mg dm⁻³), na presença e ausência de calagem. O material transformado apresentou maior incremento inicial em altura e em diâmetro do colo quando cultivado sem calagem e

na dose zero de P, tendo também aumentado o número de folhas e a área foliar. No entanto, foi observada a mesma eficiência de absorção e eficiência de utilização para P, Ca e Mg nesse material, bem como respostas à aplicação das doses de P ao solo e à calagem. A transformação genética proporcionou maior crescimento inicial das plantas em condições de maior acidez e baixa disponibilidade de fósforo no solo, não alterando, contudo, a eficiência nutricional do clone. Também foram avaliados os indicadores de qualidade biológica do solo, o crescimento e a eficiência nutricional das plantas, as quais foram inoculadas com fungos micorrízicos e cultivadas em vasos contendo solo adicionado de 45 e 90 mg dm⁻³ de P. Todas as plantas inoculadas apresentaram formação de ectomicorrizas aos 150 dias de idade, mas não apresentaram alterações para a maioria dos indicadores microbiológicos e bioquímicos do solo. As plantas transformadas e sem inoculação tiveram um incremento inicial no crescimento em altura, porém não houve grandes alterações para as demais variáveis analisadas. De modo geral, a transformação genética e a micorrização não alteram a eficiência nutricional, o crescimento final das plantas e os indicadores da qualidade biológica do solo, não demonstrando evidências de risco à biossegurança a nível do solo. No entanto, houve influência na propagação vegetativa das miniestacas, prejudicando o enraizamento e beneficiando o crescimento das mudas.

ABSTRACT

SILVA, Rogério Luiz da, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2009. **Effect of transgenic *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* on clonal propagation, growth, nutrition, and indicators of biological soil quality.** Adviser: Aloisio Xavier. Co-advisers: Ismael Eleotério Pires, Cosme Damião Cruz and Júlio César Lima Neves.

This study aimed to evaluate the effect of transgenic plants of one clone of *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* on clonal propagation, vegetative growth, nutrition and indicators of biological quality of soil inoculated with ectomycorrhizal fungi. In the experiment, non-transformed (NT) and transformed (T) plants were used for overexpression of the gene that encodes citrate synthase (CS). To evaluate the effect of genetic transformation on clonal propagation of the eucalyptus shoots, a clonal minigarden of sand was installed, in order to supply the cuttings, which were submitted to various dosages of IBA (0, 1500, 3000 and 6000 mg L⁻¹), collected from different parts of the branch [intermediate minicuttings of 8 cm (IM), apical minicuttings of 12 cm in length (AM1), 10 cm (AM2)] and various sizes in length (6, 9, 12 and 15 cm). The results indicated that the best strategy was the preparation of apical cuttings of approximately 10 cm in length without the use of IBA and that genetic transformation influences the vegetative propagation of cuttings, rooting harming and benefiting the growth of seedlings. In order to analyze the genetic transformation on growth and nutritional efficiency of the clone, T and NT plants in Oxisol with different levels of phosphorus (0, 45 and 90 mg dm⁻³) were grown up to 150 days of age, in presence and absence of liming. The processed material had a higher initial increase in height and stem diameter when grown without lime, the zero dose of P, and also increased the number of leaves and leaf area. However, it was observed the same absorption and utilization efficiency for P, Ca and Mg

in this material, as well as responses to P doses application to the soil and lime. Genetic transformation provided bigger initial growth of plants under conditions of high acidity and low availability of phosphorus in the soil, not changing, however, the nutritional efficiency of the clone. Biological indicators of soil quality, growth and nutritional efficiency of the plants, which were inoculated with mycorrhizal fungi and grown in pots containing soil with the addition of 45 and 90 mg dm⁻³ P were also evaluated. All inoculated plants had development of ectomycorrhizae at 150 days of age, but they did not show changes for most microbiological and biochemical indicators of soil. The transformed plants uninoculated had an initial gain in height growth, but no major changes for most analyzed variables. In general, genetic transformation and mycorrhization did not affect nutritional efficiency, final growth of plants, and indicators of biological soil quality, showing no evidence of risk to biosecurity at ground level. However, there was influence on the vegetative propagation of cuttings, rooting harming and benefiting the growth of seedlings

1. INTRODUÇÃO GERAL

As espécies florestais vêm sendo manipuladas ao longo do tempo pelos programas de melhoramento convencionais para a obtenção de genótipos mais produtivos, com melhores características florestais, mais bem adaptadas a diferentes condições edafoclimáticas e com resistência a estresses bióticos e abióticos. Entretanto, os programas de melhoramento genético de espécies florestais são complicados pela altura das árvores que implicam dificuldade de manter controle sobre os processos de polinização e fecundação, bem como pela complexidade da análise dos descendentes após os cruzamentos e retrocruzamentos e pela necessidade de uma grande área de plantio experimental (TZFIRA et al., 1998).

Embora esses programas tenham contribuído de forma expressiva para o aumento da produtividade no setor florestal, a transformação genética é uma ferramenta de grande potencial. A introdução controlada de genes exógenos nessas espécies, por meio de técnicas biotecnológicas, representa ferramenta valiosa ao melhoramento genético, garantindo incrementos expressivos na qualidade final dos produtos, em virtude de maior homogeneidade e direcionamento das propriedades da matéria-prima, fatores altamente desejáveis para as indústrias do setor florestal (SARTORETTO et al., 2008).

Há mais de duas décadas que a engenharia genética de plantas é uma alternativa viável e complementar ao melhoramento clássico, permitindo a transferência de genes entre espécies não relacionadas para obtenção de genótipos com características de interesse silvicultural (PAQUALI e ZANETTINI, 2007; STUDART-GUIMARÃES et al., 2003). Genes de fungos, bactérias, animais e de outras plantas não relacionadas filogenicamente podem ser transferidos para a planta de interesse. Desta forma, a transformação abre novas perspectivas aos programas de melhoramento, ampliando e disponibilizando novos genes

para determinadas características impostas pela incompatibilidade sexual ou pela variabilidade genética. Esses genes podem ser introduzidos em cultivares ou genótipos já melhorados, sem modificar a estrutura genética global da planta (STUDART-GUIMARÃES et al., 2003). A transferência genética entre organismos distintos foi possível em função do conhecimento das bases moleculares e dos mecanismos bioquímicos que regulam as características de importância agrônômica e também devido ao desenvolvimento de vários sistemas de transformação e regeneração de plantas (SILVA-FILHO e FALCO, 2001).

Segundo Studart-Guimarães et al. (2003), as pesquisas relacionadas ao gênero *Eucalyptus* incluem estudos referentes ao isolamento e inserção de genes que permitem modificação nas rotas metabólicas da biossíntese da celulose e hemicelulose, assim como o aumento da biomassa em menor espaço de tempo. Além de estudos visando à resistência a estresses abióticos e bióticos tais como tolerância à seca, frio, solos ácidos e salinidade, resistência a insetos, herbicidas e pragas, também são exemplos de pesquisas em engenharia genética com aplicações para as espécies plantadas de eucalipto. Pasquali e Zanettini (2007) resumiram as principais metas dos programas de melhoramento florestal em cinco classes de transgenes para o setor, em função da relevância e abrangência dos seus efeitos: alteração do ciclo reprodutivo das plantas, aumento na tolerância a herbicidas e estresses abióticos, modificação na arquitetura vegetal, manipulação dos teores de lignina e celulose e indução de resistência a doenças e pragas.

Grandes investimentos estão sendo realizados nos programas de melhoramento e nos estudos em campo de espécies e híbridos florestais transgênicos. De acordo com a FAO (2004), mais de 210 ensaios de campo estão sendo conduzidos em 16 países, envolvendo aproximadamente 15 espécies florestais. Destas, o gênero *Populus* é o mais estudado com 51% dos ensaios, seguido pelo *Pinus* com 23%, pelo *Liquidambar* com 11% e pelo *Eucalyptus* com 7% (SARTORETTO et al., 2008). No Brasil, testes no campo com eucalipto contendo gene para rápido crescimento, modificação e redução de lignina, melhoramento da qualidade da fibra para celulose e tolerância a herbicida foram aprovados e implementados nos estados de São Paulo, Minas Gerais e Rio Grande do Sul (WRM, 2008).

Até o momento, não existem espécies florestais transgênicas plantadas comercialmente no Brasil. Segundo Valenzuela et al. (2006), somente a China tem reportado a liberação de plantio em escala comercial de *Populus* transgênico, com 1,4 milhão de plantas estabelecidas a campo, no ano de 2003. A tendência mundial é que um

número crescente de espécies florestais transgênicas, contendo novas características, sejam plantadas.

O fósforo é um macronutriente essencial para as plantas e se encontra presente em baixas concentrações em solos intemperizados como os tropicais (BERBARA et al., 2006). A complementação deste nutriente por meio de adubações fosfatadas é necessária para suprir a deficiência de P, porém quando fontes solúveis de P são adicionados ao solo, este elemento pode ser adsorvido na superfície dos coloides ou convertido a compostos pouco solúveis de Fe e Al, o que contribui para o baixo nível de eficiência (10 % - 25 %) dos adubos fosfatados (BRADY e WEIL, 1996).

Mesmo com pequeno aproveitamento do fósforo na agricultura, observa-se nos últimos anos uma crescente demanda e elevação dos preços dos fertilizantes, o que tem intensificado a busca de clones adaptados a condições adversas, como forma de reduzir custos de produção, especialmente nas áreas dos plantios florestais, que geralmente apresentam baixa fertilidade, principalmente em relação a fósforo (MATIAS, 2006). Nesse aspecto, a busca de materiais com maior capacidade de absorção em condições de baixa fertilidade do solo pode ampliar o aproveitamento dos fertilizantes aplicados, aumentando assim a eficiência da adubação fosfatada (LUCA et al., 2002).

Atualmente, podem-se empregar ferramentas biotecnológicas para melhorar a eficiência na absorção de fósforo por meio da introdução de genes para a superprodução e exsudação pelas raízes de ácidos orgânicos como oxalato e citrato (SUZUKI et al., 2003). Esta estratégia pode ser considerada muito importante para melhorar a produção de culturas em solos ácidos, pois o citrato está relacionado com a fitodisponibilização do fósforo, uma vez que esse composto é capaz de dissociar os complexos P-Al e P-Fe, formando compostos estáveis com Al e Fe, liberando o P para a solução do solo e possibilitando sua aquisição pelas plantas (HARTWING et al., 2007).

A utilização de ferramentas de manipulação genética, visando a aprimorar a capacidade de absorção de nutrientes pelas plantas, é uma estratégia que já vem sendo trabalhada em diferentes espécies vegetais. Nesse contexto, o efeito da superexpressão do gene da citrato sintase (CS) na absorção de P foi observado em experimentos realizados com plantas de diferentes espécies, como feijão (MIYSAKA et al., 1991), mostarda (DINKELAKER et al., 1995), mamoeiro (FUENTES et al., 1997), tabaco (LÓPEZ-BUCIO et al., 2000; DELHAIZE et al., 2001) e eucalipto (SUZUKI et al., 2003).

Suzuki et al. (2003) desenvolveram um híbrido transgênico de *Eucalyptus* (*Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*) com superexpressão da síntese de citrato mitocondrial

(mtCS), gene isolado da cenoura, que desempenha papel fundamental no metabolismo do citrato. Esses mesmos autores analisaram as propriedades fisiológicas e bioquímicas desta transformação nas plantas obtidas, as quais apresentaram melhor crescimento e maior aquisição de P em solo ácido. Este fato foi atribuído à maior síntese e excreção de citrato nas raízes das plantas transgênicas, quando comparado ao controle.

A implementação desta nova tecnologia será, sem dúvida, um avanço para o estabelecimento das florestas clonais de alta produtividade. No entanto, Suzuki et al. (2003) afirmam que é necessário avaliar outras implicações da transformação na performance nas plantas transgênicas (eficiência de utilização de P e outros nutrientes, associação das raízes com fungos micorrízicos, entre outros) e no ambiente (efeito dos microorganismos no solo). Além disto, deve-se analisar o efeito da transformação genética sobre outras características dos clones, como a capacidade de propagação vegetativa do material genético, visto que uma alteração prejudicial neste aspecto terá sérias implicações nos programas clonais, dada a dependência do processo de enraizamento das miniestacas na produção de mudas clonais.

O desenvolvimento de materiais genéticos com maior eficiência nutricional, que fisiologicamente é a habilidade do genótipo em absorver o nutriente do solo, distribuí-lo e utilizá-lo internamente, tem despertado grande interesse do setor florestal (FURTINI NETO et al., 1996; SANTANA et al., 2002). Porém, a alta eficiência de utilização para um dado nutriente não está associada à alta eficiência para os demais nutrientes e poderá interferir na sustentabilidade do ecossistema florestal (BARROS et al., 1990).

Carneiro (1995) relata que alterações na planta ou no ambiente interferem na simbiose e podem comprometer os efeitos da atuação dos fungos micorrízicos. As micorrizas são associações ou simbioses mutualistas entre certos fungos e raízes finas e não lenhosas das plantas hospedeiras, em que os compostos de C produzidos pela fotossíntese são utilizados pelo hospedeiro e pelo fungo, este último fornecendo às plantas parte dos nutrientes absorvidos do solo (CARNEIRO, 1995; ARAÚJO e MACHADO, 2006). Segundo Mello (2006), os serviços prestados pelo fungo vão muito além da nutrição de plantas individualizadas, pois eles também contribuem para a captura de água e síntese de hormônios de crescimento, como ácido indol acético e precursores de giberilinas, além de substâncias antibióticas como polifenóis, que, por sua vez, conferem proteção ao sistema radicular contra patógenos. No entanto, uma das mais importantes propriedades das micorrizas, principalmente nas ectomicorrizas, em essências florestais, é a habilidade de estimular o crescimento de plantas, especialmente por meio do incremento na absorção

de nutriente no solo, como o fósforo (ZAMBOLIM, 1990; BERBARA et al., 2006).

As análises de segurança ambiental para investigar os efeitos adversos da utilização dos materiais transformados geneticamente no meio ambiente devem incluir avaliações na microbiota do solo (BORÉM, 2007). A atividade microbiana no solo pode ser considerada um dos mais sensíveis marcadores biológicos disponíveis e os mais úteis à classificação de distúrbios ou contaminação de sistemas, dada a capacidade de eles refletirem mudanças sutis no solo bem antes que alterações em outros indicadores possam ser observados (TÓTOLA e CHAER, 2002). Os indicadores de natureza microbiológica como a biomassa microbiana, evolução de CO₂ e atividades de populações microbianas específicas do solo, são priorizados na avaliação de impactos ambientais, porém ainda não existe uma padronização dos métodos utilizados na avaliação desses atributos (TÓTOLA e CHAER, 2002; GIL-STORES et al., 2005). Segundo Matsuoka et al. (2003), também podem ser utilizadas outras propriedades biológicas e bioquímicas relacionadas à atividade microbiana do solo para monitorar alterações ambientais, constituindo-se ferramentas importantes para orientar o planejamento e a avaliação de práticas de manejo do solo.

Quanto ao processo de transgenia, pouco ou quase nada se sabe sobre seu efeito na expressão das outras características, além daquelas alvo do processo de transformação nas plantas transgênicas obtidas. Mas se sabe que o processo de enraizamento adventício de miniestacas em casa de vegetação é influenciado por fatores intrínsecos e extrínsecos ao material vegetal, tais como fatores genéticos, presença de indutores e inibidores de enraizamento, presença de gemas e/ou folhas, estado nutricional e fisiológico das brotações (CUNHA, 2006).

Não se conhece bem o controle genético do enraizamento de estacas, mas há grande variação dentro das espécies e entre clones de *Eucalyptus* (WENDLING, 2002; FERREIRA et al., 2004; ALFENAS et al., 2004). As aplicações de reguladores de crescimento têm possibilitado o enraizamento de propágulos vegetativos, e o ácido indolbutírico (AIB) vem sendo o mais utilizado nos viveiros florestais (BRONDANI et al., 2008; XAVIER et al., 2009). A origem e a forma de confecção das miniestacas são fatores que afetam o enraizamento, pois há uma variação fisiológica e nutricional ao longo de um mesmo ramo (FACHINELLO et al., 2005).

Diante do exposto, a utilização da técnica de transgenia será justificada somente quando propiciar os incrementos esperados e estes não provocarem alterações no meio ambiente e na expressão de outras características do material genético transgênico. Sendo assim, o presente trabalho teve o objetivo de avaliar o efeito de plantas transgênicas de um

clone de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* na propagação clonal, no crescimento vegetativo, na nutrição e nos indicadores da qualidade biológica do solo inoculado com fungos ectomicorrízicos.

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFENAS, A. C.; ZAUZA, E. A. V.; MAFIA, R. G.; ASSIS, T. F. **Clonagem e doenças do eucalipto**. Viçosa, MG: UFV, 2004. 442p.

ARAÚJO, A. P.; MACHADO, C. T. T. Fósforo. In: FERNANDES, M. S. (Ed.). **Nutrição mineral de plantas**. Viçosa, MG: SBCS, 2006. p. 253-280.

BARROS, N. F.; NOVAIS, R. F.; NEVES, J. C. L. Fertilização e correção do solo para o plantio de eucalipto. In: BARROS, N. F. (Ed.). **Relação solo-eucalipto**. Viçosa, MG: Folha de Viçosa, 1990. p. 303-322.

BERBARA, R. L. L.; SOUZA, F. A.; FONSECA, H. M. A. C. Fungos micorrízicos arbusculares: muito além da nutrição. In: FERNANDES, M. S. (Ed.). **Nutrição mineral de plantas**. Viçosa, MG: SBCS, 2006. p. 53-88.

BORÉM, A. Biossegurança florestal. In: BORÉM, A. (Ed.). **Biotecnologia florestal**. Viçosa, MG: Suprema Gráfica e Editora, 2007. p.335-346.

BRANDY, N. C.; WEIL, R. R. **The nature and properties of soil**. 11.ed. New Jersey: Prentice hall, 1996. 740p.

BRONDANI, G. E.; WENDLING, I.; ARAÚJO, M. A.; PIRES, P. P. Ácido indolbutírico em gel para enraizamento de miniestacas de *Eucalyptus benthamii* Maiden e Cambage x *Eucalyptus dunnii* Maiden. **Scientia Agrária**, v. 9, p. 153-158, 2008.

CARNEIRO, J. G. A. **Produção e controle de qualidade de mudas florestais**. Curitiba: UFPR/FUPEF, 1995. 451p.

CUNHA, A. C. M. C. M. **Relações do estado nutricional de minicepas e condições meteorológicas com o número de enraizamento de miniestacas de eucalipto**. 2006, 99f.. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

DELHAIZE, E.; HEBB, D. M.; RYAN, P. R. Expression of a *Pseudomonas aeruginosa* citrate synthase gene in tabaco is not associated with either enhanced citrate accumulation or efflux. **Plant Physiology**, v. 125, n. 4, p. 2059-2067, 2001.

DINKELAKER, B.; HENGELER, B.; MARSHNER, H.; Distribution and function of proteoid roots and other root clusters. **Botany Acta**, v. 108, p. 183-200, 1995.

FACHINELLO, J. C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J. C. **Propagação de plantas frutíferas**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 221p, 2005.

FAO. Preliminary review of biotechnology in forestry including genetic modification. **Forest Genetic Resources Working Paper FGR/59E**. Rome, Italy: Forest Resources Development Service. Forest Resources Division. 2004. 124p.

FERREIRA E. M.; ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G.; LEITE, H. G.; SARTORIO, R. C.; PENCHEL FILHO, R. M. Determinação do tempo ótimo do enraizamento de miniestacas de clones de *Eucalyptus* spp. **Revista Árvore**, v. 28, n. 2, p. 183-187, 2004.

FUENTES, J. M. DE LA.; RAMÍREZ-RODRIGUES, V.; CABRERA-PONCE, J. L.; HERRERA-ESTRELLA, L. Aluminum tolerance in transgenic plants by alteration of citrate synthase. **Science**, v. 276, p. 1566-1568, 1997.

FURTINI NETO, A. E.; BARROS, N. F.; GODOY, M. F.; NOVAIS, R. F. Eficiência nutricional de mudas de *Eucalyptus* em relação a fósforo. **Revista Árvore**, v. 20, n. 1, p. 17-28, 1996.

GIL-STORES, F.; TRASAR-CEPEDA, C.; LEIRÓS, M. C.; SEOANE, S. Different approaches to evaluating soil quality using biochemical properties. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 37, p. 877-887, 2005.

HARTWING, I.; OLIVEIRA, A. C.; CARVALHO, F. I. F.; BERTAN, I.; SILVA, J. A. G.; SCHMIDT, D. A. M.; VALÉRIO, I. P.; MAIA, L. C.; FONSECA, D. A. R. F.; REIS, C. E. S. Mecanismos associados à tolerância ao alumínio em plantas. **Semina**, v. 28, n. 2, p. 219-228, 2007.

LÓPEZ-BUCIO, J.; MARTINEZ DE LA VEJA, O.; GUEVARA-GARCIA, A.; HERRERA-ESTRELLA, L. Enhanced phosphorus uptake in transgenic tobacco plants overproduce citrate. **Nature Biotechnology**, v. 18, p. 450-453, 2000.

LUCA, E. F.; BOARETTO, A. E.; MURAOKA, T.; CHITOLINA, J. C. Eficiência de absorção e utilização de fósforo (^{32}P) por mudas de eucalipto e arroz. **Scientia Agrícola**, v. 59, n. 3, p. 543-547, 2002.

MATIAS, G. C. S. **Eficiência nutricional de fontes de fósforo com solubilidade variável em água em cultivares de arroz (*Oryza sativa* L.)**. 2006. 93f. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Solos e Nutrição de Plantas) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP.

MATSUOKA, M.; MENDES, I. C.; LOUREIRO, M. F. Biomassa microbiana e atividade enzimática em solos sob vegetação nativa e sistemas agrícolas anuais e perenes na região de Primavera do Leste (MT). **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 27, p. 425-433, 2003.

MELLO, A. H. **Ocorrência, caracterização e eficiência de fungos micorrízicos em *Eucalyptus grandis* e *Acacia mearnsii***. 2006. 236 f.. Tese (Doutorado em Ciência do Solo – Biodinâmica e Manejo do Solo) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS.

- MIYASAKA, S. C.; BUTA, J. G.; HOWELL, R. K.; FOY, C. D. Mechanism of aluminum tolerance in snapbeans: root exudation of citric acid. **Plant Physiology**, v. 96, p. 737-743, 1991.
- PASQUALI, G. ZANETTINI, M. B. Transgênese florestal. In: BORÉM, A. (Ed.). **Biotecnologia florestal**. Viçosa, MG: Suprema Gráfica e Editora, 2007, p.315-334.
- SANTANA, R. C.; BARROS, N. F.; NEVES, J. C. L. Eficiência de utilização de nutrientes e sustentabilidade da produção em procedências de *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus saligna* em sítios florestais do estado de São Paulo. **Revista Árvore**, v. 26, n. 4, p. 447-457, 2002.
- SARTORETTO L. M.; SALDANHA, C. W.; CORDER M. P. M. Transformação genética: estratégias e aplicações para o melhoramento genético de espécies florestais. **Ciência Rural**, v. 38, n. 3, p. 861-871, 2008.
- SILVA-FILHO, M. C.; FALCO, M. C. Plantas Transgênicas no Melhoramento. In: NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C.; MELO, I. S.; VALADARES-INGLIS, M. C. (Eds.). **Recursos Genéticos e Melhoramento Plantas**. Rondonópolis: Fundação MT, v. 1, 2001. p. 1012-1056.
- STUDART-GUIMARÃES, C. S.; LACORTE, C.; BRASILEIRO, A. C. M. Transformação genética em espécies florestais. **Ciência Florestal**, v. 13, n. 1, p. 167-178, 2003.
- SUZUKI, Y.; KAWAZU, T.; KONDO, K.; TSUYAMA, M.; WADA, T.; HARA, T.; KOYAMA, H. Characteristics of transgenic *Eucalyptus* hybrids with an overexpression of plant mitochondrial citrate synthase. **Nippon Shokubutsu Seiri Gakkai Nenkai oyobi Shinpojiumo Koen Yoshishu**, v. 45, p. 107, 2003.
- TÓTOLA, M. R.; CHAER, G. M. Microrganismos e processos microbiológicos como indicadores da qualidade dos solos. In: VENEGAS, V. H. A.; SCHAEFER, C. E. G. R.; BARROS, N. F.; MELLO, J. W. V.; COSTA, L. M. (Eds.). **Tópicos em ciência do solo**. v.II (2002) – Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do solo, 2002. p. 195-276.
- TZFIRA, T.; ZUKER, A.; ALTMAN, A. Forest-tree biotechnology: genetic transformation and its application to future forests. **Trends in Biotechnology**, v. 16, p. 439-446, 1998.
- VALENZUELA, S.; BALOCCHI, C.; RODRIGUEZ, J. Transgenic trees and forestry biosafety. **Electronic Journal Biotechnology**, v. 9, n. 3, p. 335-339, 2006.
- WRM, Briefing. **GE tree research - A country by country overview**. Nov. 2008. 8p. Disponível em: <http://www.wrm.org.uy/subjects/GMTrees/GE_Trees_Briefing.html>. Acesso em: 13 jan. 2009.
- WENDLING, I. **Rejuvenecimento de clones de *Eucalyptus grandis* por miniestaquia seriada e micropropagação**. 2002, 98f.. Tese (Doutorado em Ciência Florestal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

XAVIER, A.; WENDLING, I.; SILVA, R. L. **Silvicultura clonal: princípios e técnicas**. Viçosa, MG: UFV, 2009. 276p.

ZAMBOLIM, L. Fungos micorrízicos de eucalipto In: BARROS, N. F. (Ed.). **Relação solo-eucalipto**. Viçosa, MG: Folha de Viçosa, 1990. p. 303-322.

PROPAGAÇÃO CLONAL COM MINIESTACAS DE *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* GENETICAMENTE MODIFICADAS PARA AQUISIÇÃO DE FÓSFORO

RESUMO – O presente estudo teve como objetivo avaliar a propagação clonal por miniestaquia de um clone de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*, transformado geneticamente para aumento na eficiência de aquisição de fósforo. Plantas transformadas (para a superexpressão do gene que codifica a citrato sintase) e não transformadas foram estabelecidas em minijardim clonal de areia, que forneceu as brotações para confecção das miniestacas visando à instalação de três experimentos. No primeiro, foram analisados três tipos de miniestacas [miniestaca apical de 12 cm (MA1) e 10 cm (MA2), obtidas da porção apical de uma brotação e miniestaca intermediária de 8 cm (MI)]. No segundo, analisou-se o tamanho das miniestacas (6, 9, 12 e 15 cm) e no terceiro, analisou-se a dosagem de AIB (0, 1500, 3000 e 6000 mg L⁻¹). De modo geral, os melhores resultados foram obtidos para as miniestacas apicais com tamanho aproximado de 10 cm e sem aplicação de AIB na base. A transformação genética influenciou a propagação vegetativa das miniestacas, prejudicando o enraizamento e beneficiando o crescimento das mudas.

Palavras-chave: Transgênico, miniestaquia e clonagem.

CLONAL PROPAGATION WITH MINICUTTINGS OF *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* MODIFIED GENETICALLY FOR ACQUISITION OF PHOSPHORUS

ABSTRACT - This study aimed to evaluate the clonal propagation by minicutting of a clone of *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*, modified genetically to increase the efficiency of phosphorus acquisition. Modified plants (for overexpression of the gene that encodes synthase citrate) and unprocessed were established in clonal minigarden of sand, which provided the buddings for preparation of cuttings, aiming installation of three experiments. At first time, three types of cuttings [apical minicuttings of 12 cm (AM1) and 10 cm (AM2) were analyzed, obtained from the apical portion of a budding and intermediate minicuttings of 8 cm (IM)]. In the second time, the size of the shoots (6, 9, 12 and 15 cm) was analyzed and finally the strength of IBA (0, 1500, 3000 and 6000 mg L⁻¹). In general, the best results were obtained for the apical cuttings with approximately 10 cm and without application of IBA at the base. Genetic modification influenced the vegetative propagation of cuttings, rooting harming and benefiting the growth of seedlings.

Keywords: Transgenic, minicutting and cloning.

1. INTRODUÇÃO

Uma das grandes vantagens da silvicultura clonal é a possibilidade de implementar com maior rapidez o plantio de clones melhorados geneticamente por meio de ferramentas da engenharia genética. Neste sentido, pesquisas relacionadas ao gênero *Eucalyptus* incluem estudos referentes ao isolamento e inserção de genes que permitem modificação na rotas metabólicas da biossíntese da celulose e hemicelulose, o aumento da biomassa em um menor espaço de tempo e resistência a estresses abióticos e bióticos, tais como tolerância à seca, frio, solos ácidos e salinidade, resistência a herbicidas e pragas (STUDART-GUIMARÃES et al., 2003).

Atualmente, também podem-se empregar ferramentas biotecnológicas para melhorar significativamente a eficiência na absorção de fósforo por meio da introdução de genes para a superprodução e exsudação de citrato pelas raízes. Experimentos com superexpressão do gene da citrato sintase (CS) para a absorção de P vêm sendo realizados em diferentes espécies, como feijão (MIYASAKA et al., 1991), mostarda (DINKELAKER et al., 1995); mamoeiro (FUENTES et al., 1997), tabaco (LÓPEZ-BUCIO et al., 2000; DELHAIZE et al., 2001) e eucalipto (SUZUKI et al., 2003).

Na propagação vegetativa das plantas por enraizamento de estacas, segundo Xavier et al. (2009), o estado nutricional da planta matriz mostra-se de grande importância, não apenas quanto ao aspecto do seu vigor vegetativo e da produção de brotações, mas também do próprio status nutricional do propágulo coletado, ambos com efeito altamente significativo nos índices de enraizamento e na velocidade de formação das raízes. Os mesmos autores relatam alguns nutrientes minerais importantes no processo de enraizamento, entre os quais o P.

Uma análise do fósforo no enraizamento de miniestacas de clones de *Eucalyptus* foi realizada por Higashi et al. (2000), que verificaram uma correlação negativa entre o teor de fósforo e a taxa de enraizamento das miniestacas. No entanto, Schwambach et al. (2005) constataram que a deficiência de P nas fases de indução e formação do sistema radicular reduziu significativamente o comprimento da maior raiz em microestacas de *Eucalyptus globulus*.

Dentre os processos de propagação vegetativa, a miniestaquia é uma técnica que vem sendo utilizada com sucesso na maximização do processo de propagação clonal em *Eucalyptus*, tendo surgido do aprimoramento da estaquia para contornar as dificuldades de enraizamento de alguns clones (XAVIER e WENDLING, 1998). No entanto, o

processo de enraizamento adventício de miniestacas em casa de vegetação é influenciado por fatores intrínsecos e extrínsecos ao material vegetal, tais como fatores genéticos, presença de indutores e inibidores de enraizamento, presença de gemas e/ou folhas, estado nutricional e fisiológico das brotações (CUNHA, 2006).

Não se conhece bem o controle genético do enraizamento de estacas, mas há grande variação dentro das espécies e entre clones de *Eucalyptus* (WENDLING, 2002; FERREIRA et al., 2004; ALFENAS et al., 2004). As aplicações de reguladores de crescimento têm possibilitado o enraizamento de propágulos vegetativos, e o ácido indolbutírico (AIB) vem sendo o mais utilizado nos viveiros florestais (BRONDANI et al., 2008; XAVIER et al., 2009). A origem e a forma de confecção das miniestacas são fatores que afetam o enraizamento, pois há uma variação fisiológica e nutricional ao longo de um mesmo ramo (FACHINELLO et al., 2005).

Quanto ao processo de transgenia, pouco ou quase nada se sabe sobre o efeito na expressão das outras características, além daquelas alvo do processo de transformação nas plantas transgênicas obtidas. Dibax (2007), avaliando um evento de transformação de *E. saligna* para a superprodução de prolina, visando a aumentar a tolerância ao estresse causado pelo frio, observou redução na massa fresca total da parte aérea e raiz em comparação com as plantas não transformadas obtidas com o mesmo protocolo de regeneração. Assim, analisar o efeito da transformação genética realizada sobre características importantes, como a capacidade de propagação vegetativa do material genético, mostra-se necessário, visto que uma alteração prejudicial neste aspecto terá sérias implicações nos programas clonais, dada a dependência do processo de enraizamento das miniestacas na produção de mudas clonais.

Diante do exposto, o conhecimento da performance do material transformado geneticamente no processo de miniestaquia torna-se uma etapa de avaliação importante para a produção de mudas clonais em um viveiro. Deste modo, o presente estudo teve como objetivo avaliar a propagação clonal de miniestacas de um clone de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* transformado geneticamente para aumentar a eficiência na aquisição de fósforo, quanto à aplicação do regulador de crescimento AIB, tipo e tamanho das miniestacas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material genético

No presente experimento foram avaliados dois materiais genéticos: clone não transformado geneticamente (NT) e clone transformado geneticamente (T), ambos originados de um mesmo clone de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*. No processo de transformação genético, o cDNA do gene de citrato sintase mitocondrial (GenBank número de acesso AB017159, Takita et al., 1999), isolado de cenoura (*Daucus carota*) e de função chave no metabolismo de citrato, foi introduzido nas plantas por meio da infecção com a estirpe EHA101 de *Agrobacterium tumefaciens*. O processo de transformação genética foi desenvolvido e executado no Japão, de acordo com Koyama et al. (2000) e Kihara et al. (2003). As plantas transformadas foram selecionadas inicialmente em meio de cultura e mantidas em condições *in vitro* para a regeneração dos meristemas. O material selecionado foi propagado vegetativamente por meio da técnica de micropropagação por gemas axilares, e os tufos de brotos foram subcultivados em meio de cultura B5 (GAMBORG et al., 1968), dando origem a novos explantes aptos à fase de alongamento e enraizamento.

As plantas transformadas e não transformadas foram mantidas em condições *in vitro* e enviadas para o Brasil na fase final de alongamento em meio de cultura. Na casa de vegetação climatizada (CV1) do Departamento de Engenharia Florestal no campus da Universidade Federal de Viçosa, os explantes foram transplantados para tubetes plásticos (55 cm³ de capacidade) contendo substrato composto por 50 % de casca de arroz e 50 % de vermiculita, permanecendo durante 30 dias sob condições controladas de umidade (>85 %) e temperatura (25 - 30 °C) para o enraizamento das microestacas. A seguir, as microestacas enraizadas foram transferidas para outra casa de vegetação (CV2), com cobertura plástica transparente e protegida lateralmente por tela clarite (malha = 2,0 mm), visando à aclimatação e formação do sistema radicular, para seu posterior plantio no minijardim clonal.

2.2. Formação do minijardim

Mudas com 60 dias de idade dos materiais genéticos (T1 e NT1) foram plantadas em minijardim clonal formado por caixas de areia (40 x 40 cm), com sistema de fertirrigação diária. A solução nutritiva utilizada na fertirrigação constituiu-se dos sais de: nitrato de cálcio (920 g 1000L⁻¹), cloreto de potássio (240 g 1000L⁻¹), nitrato de potássio (140 g 1000L⁻¹), monofosfato de amônio (96 g 1000L⁻¹), sulfato de magnésio (364 g

1000L⁻¹), tenso ferro (52 g 1000L⁻¹), ácido bórico (2,80 g 1000L⁻¹), sulfato de zinco (0,48 g 1000L⁻¹), sulfato de manganês (1,12 g 1000L⁻¹), sulfato de cobre (0,10 g 1000L⁻¹) e molibdato de sódio (0,04 g 1000L⁻¹). Após o estabelecimento das mudas no minijardim clonal, elas tiveram o ápice podado para a emissão de novas brotações, formando assim o minijardim para a produção de miniestacas. As coletas das miniestacas para os experimentos foram realizadas de forma seletiva e contínua, preservando o bom estado vegetativo da minicepa. O minijardim clonal foi instalado dentro de casa de vegetação (CV2) com cobertura plástica transparente e protegida lateralmente por tela clarite (malha = 2,0 mm).

2.3. Experimento 1 - Tipo das miniestacas

A partir das brotações dos materiais genéticos T1 e NT1 coletadas no minijardim clonal, foram confeccionados três tipos de miniestacas: miniestaca apical com tamanho de 12 cm (MA1) e com 10 cm (MA2), obtida da porção apical da brotação e miniestaca intermediária com tamanho de 8 cm (MI), obtida da parte intermediária da brotação, tendo as miniestacas suas folhas reduzidas à metade. Para o enraizamento, as miniestacas foram plantadas em tubetes plásticos (55 cm³ de capacidade) contendo substrato composto por 50 % de casca de arroz e 50 % vermiculita. As bandejas com os tubetes foram conduzidas para casa de vegetação climatizada (CV1), onde permaneceram por 35 dias sob condições controladas de umidade (>85 %) e temperatura (25-30 °C). Após este período, as miniestacas enraizadas foram transferidas para casa de vegetação (CV2) visando o crescimento e avaliação final aos 90 dias de idade.

Utilizou-se esquema fatorial 2 x 3, correspondente a dois materiais genéticos (T1 e NT1) e três tipos de miniestacas (MA1, MA2 e MI), no delineamento em blocos ao acaso, com cinco repetições e doze plantas por unidade experimental.

2.4. Experimento 2 - Tamanho das miniestacas

Brotações dos materiais genéticos T1 e NT1 foram coletadas no minijardim clonal para a confecção de miniestacas apicais de diferentes tamanhos - 6, 9, 12 e 15 cm de comprimento - tendo estas miniestacas suas folhas reduzidas à metade. Para o enraizamento, as miniestacas foram plantadas em tubetes plásticos (55 cm³ de capacidade) contendo substrato composto por 50 % de casca de arroz e 50 % de vermiculita. As bandejas com os tubetes foram conduzidas para casa de vegetação climatizada (CV1), onde permaneceram por 35 dias sob condições controladas de umidade (>85 %) e temperatura

(25-30 °C). Após este período, as miniestacas enraizadas foram transferidas para casa de vegetação (CV2) visando o crescimento e avaliação final aos 90 dias de idade.

O esquema utilizado foi o fatorial 2 x 4, correspondente a dois materiais genéticos (T1 e NT1) e quatro tamanhos de miniestacas (6, 9, 12 e 15 cm), no delineamento em blocos ao acaso, com cinco repetições e doze plantas por unidade experimental.

2.5. Experimento 3 - Dosagem de AIB

Miniestacas apicais (tamanho: 9 cm) dos materiais genéticos T1 e NT1 foram coletadas no minijardim clonal e tiveram suas bases mergulhadas durante 10 segundos nas dosagens de 0, 1500, 3000 e 6000 mg L⁻¹ de ácido indolbutírico (AIB). Posteriormente, as miniestacas foram estaqueadas em tubetes plásticos (55 cm³ de capacidade) contendo substrato composto por 50 % de casca de arroz e 50 % de vermiculita. As bandejas com os tubetes foram conduzidas para casa de vegetação climatizada (CV1), onde permaneceram por 35 dias sob condições controladas de umidade (>85 %) e temperatura (25-30 °C). Após este período, as miniestacas enraizadas foram transferidas para casa de vegetação (CV2) visando o crescimento e avaliação final aos 90 dias de idade.

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos ao acaso, no esquema fatorial 2 x 4, correspondente a dois materiais genéticos (T1 e NT1) e quatro doses de AIB (0, 1500, 3000 e 6000 mg L⁻¹), com quatro repetições e doze plantas por unidade experimental.

2.6. Avaliação experimental

Para os três experimentos, foram realizadas avaliações aos 35 dias de idade (saída da casa de vegetação), quando determinou-se o percentual de sobrevivência e de enraizamento das miniestacas, bem como medições relativas à altura da parte aérea (cm) e ao diâmetro do colo (mm). Na avaliação final, aos 90 dias de idade, foram mensurados novamente a altura e o diâmetro do colo, o que permitiu obter o incremento nessas características por meio da diferença entre o valor obtido avaliação final e saída da casa de vegetação. Em seguida, todas as plantas foram divididas em parte aérea e sistema radicular. O sistema radicular foi lavado em água corrente sobre peneiras de 1 mm de diâmetro e acondicionado em sacos de papel para determinar a massa seca da raiz. A parte aérea também foi acondicionada em sacos de papel para determinação da matéria seca. Todo material vegetal (parte aérea e sistema radicular) foi seco em estufa de ventilação forçada de ar à temperatura de 72°C, por 72 horas, e pesado.

As análises de variância foram realizadas pelo programa computacional Statistica.7 para sobrevivência, enraizamento, incremento em altura, incremento em diâmetro do colo, matéria seca da raiz e parte aérea no experimento 1. Os dados para sobrevivência, enraizamento, incremento em altura, incremento em diâmetro do colo, matéria seca da raiz e parte aérea obtidos no experimento 2 e 3 foram submetidos à análise de variância e a seguir à análise de regressão por polinômios ortogonais ($p < 0,05$). As equações de regressão para as características avaliadas foram comparadas duas a duas pelo teste de identidade de modelo a 5% de probabilidade, conforme Regazzi (1992).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Tipo de miniestacas

Os tipos de miniestacas não apresentaram diferenças significativas entre os materiais genéticos (T1 e NT1) a 5% de probabilidade pelo teste F, em relação às características avaliadas: sobrevivência (Figura 1A) e enraizamento (Figura 1B) aos 35 dias de idade; incremento em diâmetro do colo (Figura 1C), incremento em altura (Figura 1D), matéria seca de raiz (Figura 1E) e matéria seca da parte aérea (Figura 1F) aos 90 dias de idade. Estes resultados indicam que qualquer tipo de miniestaca pode ser empregado na propagação clonal destes materiais e que a transformação genética não alterou a performance das miniestacas transgênicas. Não se confirmou a expectativa de que maior teor inicial de fósforo nas miniestacas das plantas transgênicas iria interferir no processo de propagação. De acordo com Suzuki et al. (2003), este clone de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* apresentou superprodução e exsudação de citrato, o que aumentou sua aquisição de fósforo.

O experimento apresentou uma sobrevivência acima de 92% (Figura 1A) e enraizamento maior que 80% (Figura 1B), o que demonstra o potencial de enraizamento deste clone e a boa condução experimental conseguida na casa de vegetação. De modo geral, o incremento do diâmetro do colo (Figura 1C) e o incremento em altura (Figura 1D) apresentaram um comportamento oposto, principalmente nas miniestacas intermediárias (MI), ou seja, enquanto o incremento em altura aumentou com o uso de MI, o incremento em diâmetro do colo se reduziu para este mesmo tipo de miniestaca. Deve-se ressaltar que as miniestacas apicais apresentavam maior tamanho inicial e menor diâmetro de colo, o que reduziria o potencial de crescimento em altura e favoreceria o incremento em diâmetro do colo. Este fato pode ser mais bem compreendido analisando o peso da matéria seca da

parte aérea (Figura 1F), cujas miniestacas apicais apresentaram valores elevados, mesmo com pequeno incremento em altura, indicando que as mudas oriundas das miniestacas apicais já apresentavam um bom tamanho na avaliação inicial (na saída da casa de vegetação).

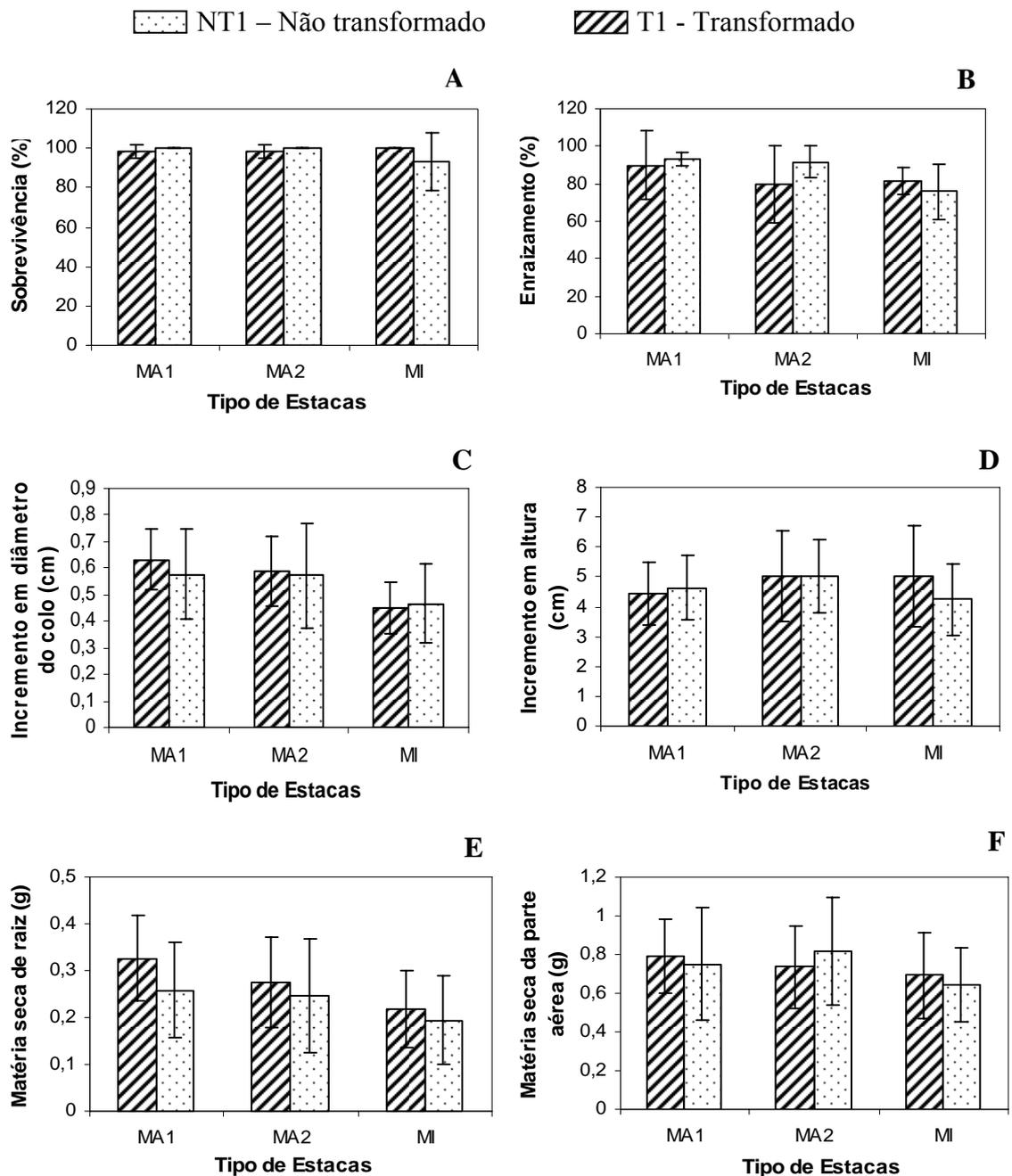


FIGURA 1 – Sobrevivência, enraizamento, incremento em diâmetro de colo, incremento em altura, peso da matéria seca da parte aérea e peso da matéria seca de raiz de miniestacas apicais MA1 (10 cm), MA2 (12 cm) e miniestaca intermediária MI (8 cm) em um clone de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* geneticamente transformado (T1) e não transformado (NT1). As barras indicam o desvio padrão da média.

Quanto ao peso da matéria seca de raiz (Figura 1E), o valor mais alto foi observado nas mudas originárias de MA1, especialmente para as plantas transformadas (T1). As miniestacas MI apresentaram um sistema radicular de qualidade inferior, com poucas raízes e sem uma boa agregação ao substrato, o que pode ser decorrente do menor número de gemas e de pares de folhas nestas miniestacas, ambos desejáveis no processo de enraizamento adventício, visto que são responsáveis pela síntese de auxina e fontes de carboidratos (ALFENAS et al., 2004; TAIS e ZEIGER, 2004). Além disto, Xavier et al. (2009) recomendam o preparo das miniestacas com o ápice, em razão do maior vigor fisiológico e de formar uma muda com dominância apical.

3.2. Tamanho das miniestacas

O tamanho das miniestacas afetou a propagação clonal do material genético transformado (T1) e não transformado (NT1) pelo teste de identidade de modelo a 5% de probabilidade, em relação às características avaliadas: sobrevivência (Figura 2A) e enraizamento (Figura 2B) aos 35 dias de idade; incremento em diâmetro do colo (Figura 2C), incremento em altura (Figura 2D), matéria seca de raiz (Figura 2E) e matéria seca da parte aérea (Figura 2F) aos 90 dias de idade. Em termos gerais, a porcentagem de sobrevivência (Figura 2A) das miniestacas variou mais nas miniestacas de 6 e 15 cm, indicando que as muito pequenas (6 cm) não suportaram bem as condições dentro da casa de vegetação, e as grandes (15 cm) apresentaram maior dificuldade em responder ao processo de enraizamento. Segundo Xavier et al. (2009), as estacas herbáceas possuem maior capacidade de enraizamento devido à sua maior juvenilidade fisiológica, no entanto, dada a sua consistência tenra, apresentam o inconveniente de ter baixa tolerância às variações ambientais durante o processo de enraizamento. Por outro lado, a estaca mais lenhosa apresenta maior capacidade de sobrevivência, porém, possui dificuldade em enraizar devido ao maior grau de maturação fisiológica e de lignificação.

O material transformado (T1) apresentou os menores percentuais de enraizamento (Figura 2B), independentemente do tamanho das miniestacas. Este fato pode ser decorrente do elevado teor de P inicialmente nas miniestacas, que afeta negativamente o enraizamento em miniestacas de eucalipto, como relatado por Higashi et al. (2000), visto que Suzuki et al. (2003), avaliando este mesmo material transformado, relatam o maior acúmulo de P nas folhas. No entanto, as miniestacas transgênicas de 15 cm evidenciaram maior incremento em altura (Figura 2D), matéria seca de raiz (Figura 2E) e da parte aérea (Figura 2F), o que também pode estar relacionado com a maior reserva de P nestas miniestacas.

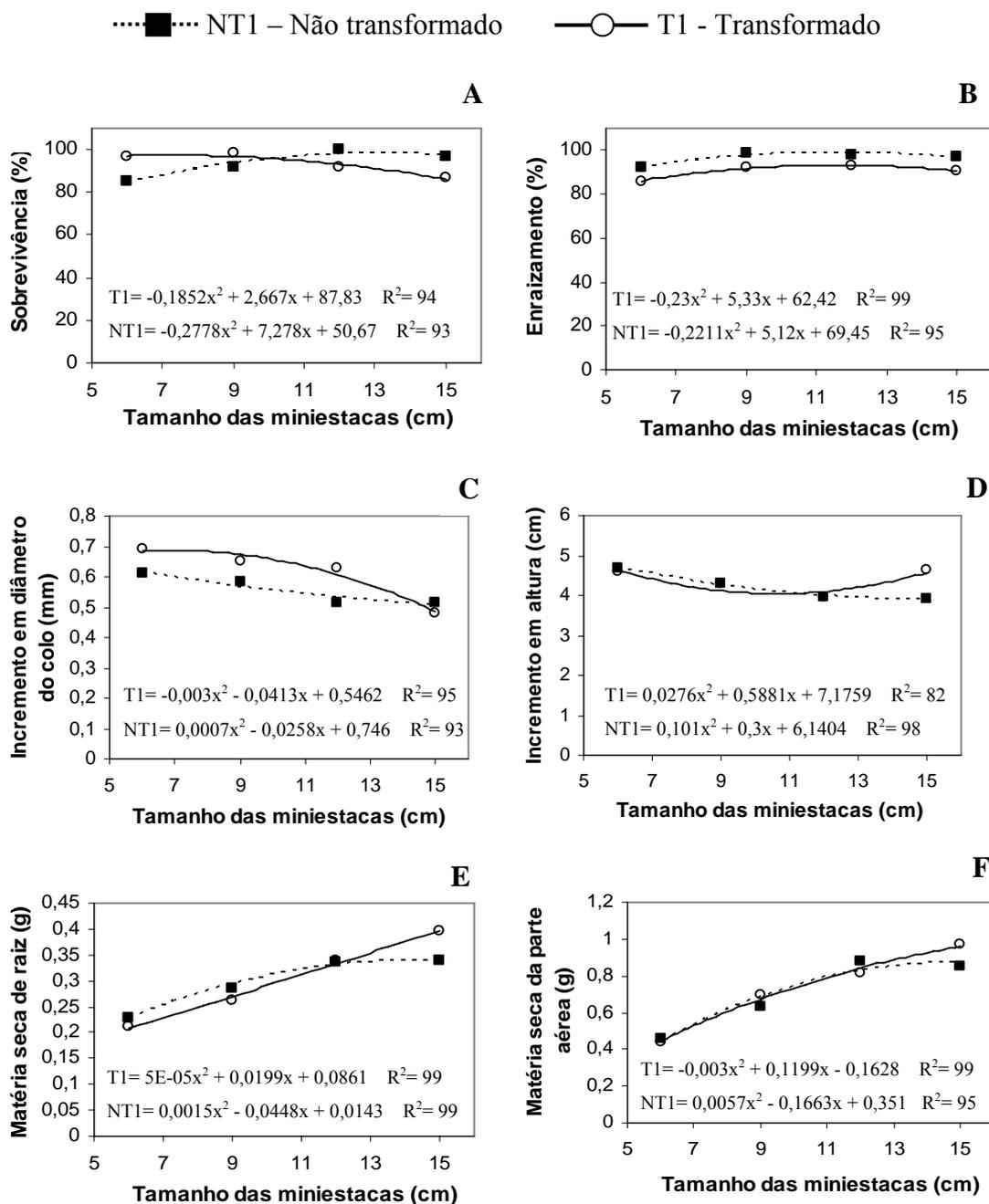


FIGURA 2 – Sobrevivência, enraizamento, incremento em diâmetro de colo, incremento em altura, peso da matéria seca da parte aérea e peso da matéria seca de raiz em função do tamanho das miniestacas de um clone de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* geneticamente transformado (T1) e não transformado (NT1).

Os materiais genéticos (T1 e NT1) apresentaram uma performance inversa para incremento em diâmetro do colo (Figura 2C). Porém, os maiores incrementos foram observados nas miniestacas de 6 cm, fato este provavelmente decorrente do menor

diâmetro inicial e da juvenilidade das miniestacas, o que permitiu melhor reposta quanto a esta característica.

De modo geral, as maiores interferências foram evidenciadas nas miniestacas de 6 e 15 cm, independentemente do material genético avaliado (T1 ou NT1), indicando que estas estacas não são as mais adequadas ao processo de propagação. Com base nas equações de regressão obtidas para as características analisadas na Figura 2, o tamanho ideal estimado das miniestacas está em torno de 10 cm para este clone, em ambos os materiais genéticos.

3.3. Dosagem de AIB

Os materiais genéticos (T1 e TN1) não apresentaram diferenças significativas para a porcentagem de sobrevivência (Figura 3A), pelo teste de identidade de modelo ($p < 0,05$ %), mas foram significativamente diferentes para o percentual de enraizamento (Figura 3B), incremento em diâmetro do colo (Figura 3C), incremento em altura (Figura 3D), matéria seca de raiz (Figura 3E) e matéria seca da parte aérea (Figura 3F). As plantas transgênicas apresentaram um menor valor de enraizamento, independentemente da dose de AIB utilizada. Esta diferença entre o T1 e NT1 indica que o provável aumento da absorção de fósforo nas plantas transformadas pode ter interferido na emissão dos primórdios radiculares nestas miniestacas, como comentado anteriormente para os diferentes tamanhos das miniestacas. Ademais, a maior aquisição de P implica aumento de absorção de outros nutrientes como N (NOVAIS e SMYTH, 1999). Teores elevados de N nas estacas estão correlacionados negativamente com o enraizamento (HARTMANN et al., 2002), o que pode ser confirmado pelos resultados obtidos por Rana e Chadha (1989) para espécies de *Prunus*.

Os maiores incrementos em diâmetro do colo (Figura 3C) foram obtidos no material transformado, independentemente das doses de AIB aplicadas. Quanto à matéria seca da parte aérea (Figura 3F), o material transformado (T1) foi o que apresentou menor valor na dosagem de 6000 mg L^{-1} , o que foi atribuído ao efeito tóxico do AIB nesta concentração. Wendling (2002) relata o efeito inibitório da aplicação de AIB a partir da dosagem de 1500 mg L^{-1} no peso da matéria seca da parte aérea de mudas enraizadas de eucalipto. Além disto, Dibax (2007) relata que o evento de transformação genética em *E. saligna* com o gene que superexpressa a síntese de prolina, apresentou redução da matéria fresca total em comparação com as plantas não transformadas obtidas com o mesmo protocolo de regeneração.

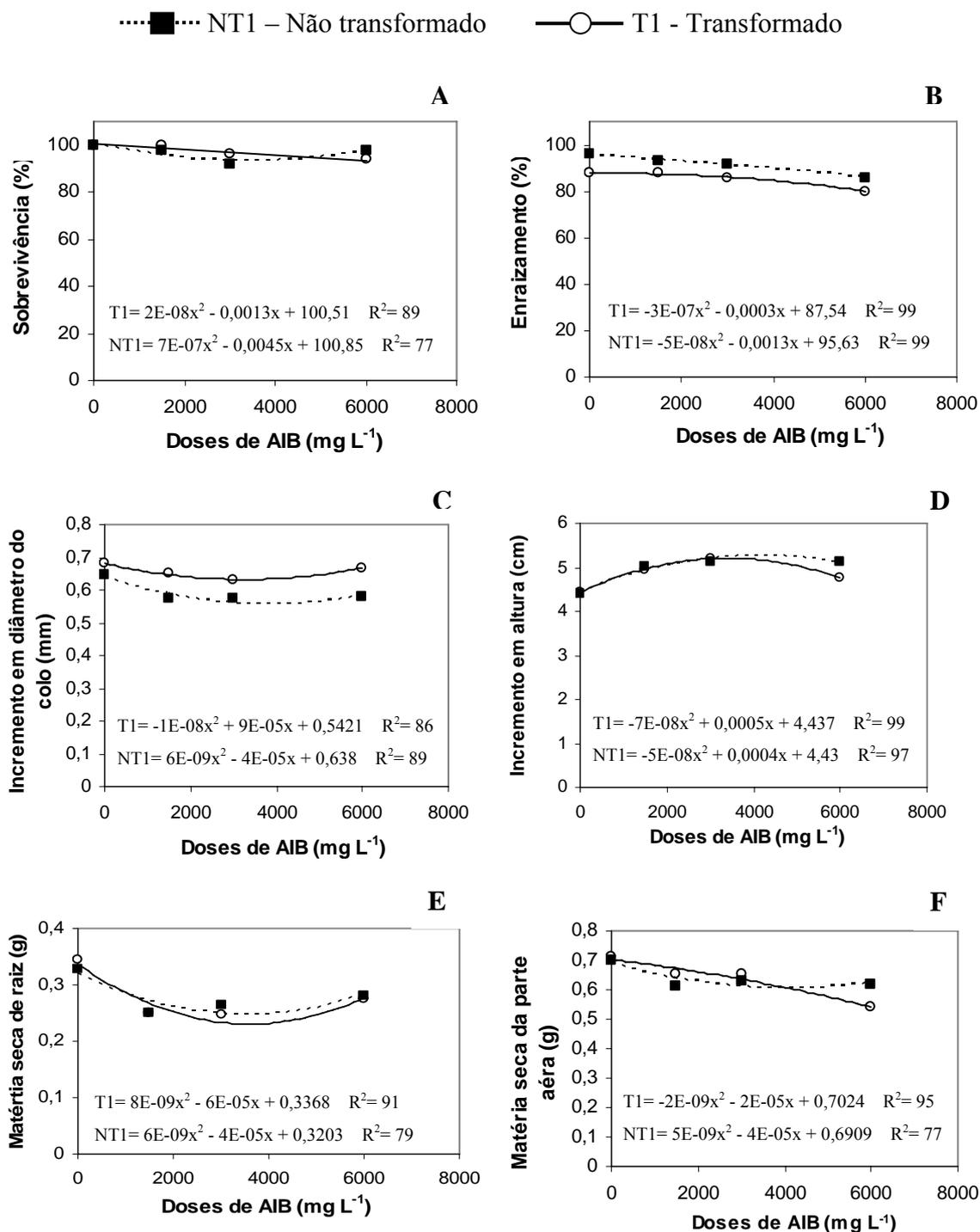


FIGURA 3 – Sobrevivência, enraizamento, incremento em diâmetro de colo, incremento em altura, peso da matéria seca da parte aérea e peso da matéria seca de raiz em função das doses de AIB (ácido indolbutírico) aplicadas nas miniestacas de um clone de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* geneticamente transformado (T1) e não transformado (NT1).

De modo geral, o aumento nas doses de AIB influenciou negativamente o comportamento das características analisadas, com exceção do incremento em altura, e com base nas equações de regressão para as características avaliadas nas miniestacas tratadas com AIB (Figura 3), a melhor dosagem ficou entre 0 a 2000 mg L⁻¹, sendo que para a maioria das características a não aplicação do hormônio foi o que propiciou os melhores resultados. Estes resultados estão de acordo com os relatados por Goulart (2007), Titon (2001) e Wendling (1999) para miniestacas de *Eucalyptus* spp.

De acordo com os resultados dos experimentos, pode-se concluir que as melhores respostas foram obtidas com as miniestacas apicais com tamanho aproximado de 10 cm e sem aplicação de AIB na base. No entanto, houve diferença entre o comportamento do material genético transformado e não transformado avaliado, especialmente considerando o enraizamento das miniestacas, o que requer técnicas silviculturais mais adequadas para a propagação do material transformado. Vale ressaltar que características como tempo de permanência na casa de vegetação, manejo nutricional, resistência a doenças, entre outras, devem ser analisadas antes da implementação deste material transgênico em um processo de produção comercial de mudas clonais.

4. CONCLUSÕES

Com base nos resultados encontrados, pode-se concluir que a transformação genética para aumentar a eficiência na aquisição de fósforo influenciou a propagação vegetativa das miniestacas do clone de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* avaliado. De modo geral, a transformação prejudicou o enraizamento das miniestacas, mas beneficiou o crescimento das mudas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFENAS, A. C.; ZAUZA, E. A. V.; MAFIA, R. G.; ASSIS, T. F. **Clonagem e doenças do eucalipto**. Viçosa, MG: UFV, 2004. 442p.
- BRONDANI, G. E.; WENDLING, I.; ARAUJO, M. A.; PIRES, P. P. Ácido indolbutírico em gel para enraizamento de miniestacas de *Eucalyptus benthamii* Maiden e Cambage x *Eucalyptus dunnii* Maiden. **Scientia Agrária**, v. 9, p. 153-158, 2008.
- CUNHA, A. C. M. C. M. **Relações do estado nutricional de minicepas e condições meteorológicas com o número de enraizamento de miniestacas de eucalipto**. 2006, 99f..

Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

DELHAIZE, E.; HEBB, D. M.; RYAN, P. R. Expression of a *Pseudomonas aeruginosa* citrate synthase gene in tabaco is not associated with either enhanced citrate accumulation or efflux. **Plant Physiology**, v. 125, n. 4, p. 2059-2067, 2001.

DIBAX, R. **Transformação genética de *Eucalyptus saligna* com o gene *p5csf129a* via *Agrobacterium tumefaciens***. 2007, 112f.. Tese (Doutorado em Agronomia – Produção Vegetal) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR.

DINKELAKER, B.; HENGELER, B.; MARSHNER, H.; Distribution and function of proteoid roots and other root clusters. **Botany Acta**, v. 108, p. 183-200, 1995.

FACHINELLO, J. C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J. C. **Propagação de plantas frutíferas**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 221p, 2005.

FERREIRA E. M.; ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G.; LEITE, H. G.; SARTORIO, R. C.; PENCHEL FILHO, R. M. Determinação do tempo ótimo do enraizamento de miniestacas de clones de *Eucalyptus* spp. **Revista Árvore**, v. 28, n. 2, p. 183-187, 2004.

FUENTES, J. M. DE LA.; RAMÍREZ-RODRIGUES, V.; CABRERA-PONCE, J. L.; HERRERA-ESTRELLA, L. Aluminum tolerance in transgenic plants by alteration of citrate synathesis. **Science**, v. 276, p. 1566-1568, 1997.

GAMBORG, O. L.; MILLER, R. A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**, Swedwn, v. 50, p. 148-151, 1968.

GOULART, P. B. **Influência do acodicionamento, antioxidants, auxinas e seus cofatores no enraizamento de miniestacas de clones de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla***. 2007, 115f.. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES JUNIOR, F. T.; GENEVE, R. L. **Plant propagation: principles and practices**. 7. ed. New Jersey: Prentice-Hall, 2002. 880 p.

HIGASHI, E. N.; SILVEIRA, R. L. V. de A.; FIRME, D. J.; LEITE, F. P.; GONÇALVES, A. N. Influência do estado nutricional da minitouça no enraizamento de miniestacas de *Eucalyptus* spp. In: Reunião brasileira de fertilidade do solo e nutrição de plantas, 25.; Reunião brasileira sobre micorrizas, 8.; Simpósio brasileiro de microbiologia do solo, 6.; Reunião brasileira de biologia do solo, 3.. 2000, Santa Maria. **Fertbio 2000**: biodinâmica do solo. Santa Maria: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 2000. 1 (CD-ROM).

KIHARA, T.; WADA, T.; SUZUKI, Y; HARA, T.; KOYAMA, H. Alteration of citrate metabolism in cluster roots of while lupin. **Plant Cell Physiology**, v. 44, n. 9, p. 901-908, 2003 .

- KOYAMA, H.; KAWAMURA, A.; KIHARA, T.; HARA, T. TAKITA, E.; SHIBATA, D. Overexpression of mitochondrial citrate synthase in *Arabidopsis thaliana* improved growth on a phosphorus-limited soil. **Plant Cell Physiology**, v. 41, n. 9, p. 1030-1037, 2000.
- LÓPEZ-BUCIO, J.; MARTINEZ DE LA VEJA, O.; GUEVARA-GARCIA, A.; HERRERA-ESTRELLA, L. Enhanced phosphorus uptake in transgenic tobacco plants overproduce citrate. **Nature Biotechnology**, v. 18, p. 450-453, 2000.
- MIYASAKA, S. C.; BUTA, J. G.; HOWELL, R. K.; FOY, C. D. Mechanism of aluminum tolerance in snapbeans: root exudation of citric acid. **Plant Physiology**, v. 96, p. 737-743, 1991.
- NOVAIS, R. F.; SMYTH, T. J. **Fósforo em solo e planta em condições tropicais**. Viçosa, MG: UFV/DPS, 1999. 399p.
- RANA, H. S.; CHADHA, T. R. Studies on the clonal propagation of *Prunus* species and their relationship with some biochemical characters. Progressive Horticulture, Chaubattia, v. 21, n. 3-4, p. 329-335, 1989. **CAB Abstracts**, Oxford, 1993-1994. Acession Number: 19930319383 Update Code: 199300. Abstract. 1 (CD-ROM).
- REGAZZI, A. J. Identity test for regression models and equality of parameters in orthogonal polynomial models. **Biometric Bulletin**, v. 9, n. 2, p. 6-22, 1992.
- SCHWAMBACH, J.; FADANELLI, C.; FETT-NETO, A. G. Mineral nutrition and adventitious rooting microcuttings of *Eucalyptus globulus*. **Tree Physiology**, v. 25, p.487-494, 2005.
- STUDART-GUIMARÃES, C. S.; LACORTE, C.; BRASILEIRO, A. C. M. Transformação genética em espécies florestais. **Ciência Florestal**, v. 13, n. 1, p. 167-178, 2003.
- SUZUKI, Y.; KAWAZU, T.; KONDO, K.; TSUYAMA, M.; WADA, T.; HARA, T.; KOYAMA, H. Characteristics of transgenic *Eucalyptus* hybrids with an overexpression of plant mitochondrial citrate synthase. **Nippon Shokubutsu Seiri Gakkai Nenkai oyobi Shinpojiumo Koen Yoshishu**, v. 45, p. 107, 2003.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719 p. (Tradução).
- TAKITA, E.; KOYAMA, H.; SHIRANO, Y.; SHIBATA, D.; HARA, T. Publicação da sequência e caracterização do gene que codifica a enzima citrato sintase. **Soil Science Plant Nutrition**, v. 45, p. 197-205, 1999.
- TITON, M. **Propagação clonal de *Eucalyptus grandis* por miniestaqueia e microestaqueia**. 2001, 65f. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

WENDLING, I. **Propagação clonal de híbridos de *Eucalyptus* spp. por miniestaquia.** 1999, 70f.. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

WENDLING, I. **Rejuvenecimento de clones de *Eucalyptus grandis* por miniestaquia seriada e micropropagação.** 2002, 98f.. Tese (Doutorado em Ciência Florestal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

XAVIER, A.; WENDLING, I. **Miniestaquia na clonagem de *Eucalyptus*.** Viçosa, MG: SIF, 1998. 10p. (Informativo Técnico SIF, 11).

XAVIER, A.; WENDLING, I.; SILVA, R. L. **Silvicultura clonal: princípios e técnicas.** Viçosa, MG: UFV, 2009. 276p.

CRESCIMENTO E EFICIÊNCIA NUTRICIONAL DE UM CLONE DE *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* MODIFICADO GENETICAMENTE EM RELAÇÃO À AQUISIÇÃO DE FÓSFORO

RESUMO - O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da transformação genética para aquisição de fósforo no crescimento e na eficiência nutricional de um clone de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*. Plantas transformadas e não transformadas para a superexpressão do gene que codifica a citrato sintase (CS) foram cultivadas em solo enriquecido com doses de P (0, 45 e 90 mg dm⁻³), com e sem calagem. As características de crescimento foram mensuradas até os 150 dias de idade, quando foi avaliada a eficiência nutricional. O material transformado apresentou maior incremento inicial em altura e em diâmetro do colo quando cultivado sem calagem e na dose zero de P, também aumentou o número de folhas e a área foliar. No entanto, foi observada a mesma eficiência de absorção e eficiência de utilização para P, Ca e Mg nesse material. A transformação genética proporcionou maior crescimento inicial das plantas em condições de maior acidez e baixa disponibilidade de fósforo no solo, não alterando, contudo, a eficiência nutricional do clone.

Palavras-chave: Transgênico, citrato, eficiência nutricional e melhoramento florestal.

GROWTH AND NUTRITIONAL EFFICIENCY OF A CLONE OF *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* GENETICALLY MODIFIED IN RELATION TO ACQUISITION OF PHOSPHORUS

ABSTRACT - The objective of this study was to evaluate the effect of genetic modification for phosphorus acquisition on growth and nutritional efficiency of a clone of *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*. Genetically modified and unmodified plants for overexpression of the gene encoding citrate synthase (CS) were grown in soil enriched with P levels (0, 45 and 90 mg dm⁻³), with and without lime. Growth characteristics were measured up to 150 days of age, when the nutritional efficiency were evaluated. The processed material had a higher initial increase in height and stem diameter, when grown without lime and the zero dose of P, and also had increased the number of leaves and leaf area. However, it was observed the same absorption and utilization efficiency for P, Ca and Mg in this material. Genetic modification provided bigger initial growth on plants in conditions of higher acidity and low availability of phosphorus in the soil, not changing, however, the nutritional efficiency of the clone.

Keywords: Transgenic, citrate, nutritional efficiency and forest improvement.

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, tem-se verificado constante aumento do interesse pela silvicultura clonal de eucalipto, visando principalmente à uniformização dos plantios, maior produtividade, qualidade da madeira e adaptação dos clones às áreas a serem implantadas, as quais geralmente apresentam baixa disponibilidade de nutrientes, principalmente fósforo (XAVIER et al., 2009). Além destes benefícios, os métodos atuais de clonagem permitem a multiplicação de indivíduos geneticamente modificados, viabilizando a transferência dos benefícios da engenharia genética para os sistemas operacionais de produção florestal (ASSIS e MAFIA, 2007).

A transformação genética de plantas é uma alternativa viável e complementar ao melhoramento clássico, permitindo a transferência de genes entre espécies não relacionadas para obter genótipos com características de interesse silvicultural (PAQUALI e ZANETTINI, 2007; STUDART-GUIMARÃES et al., 2003). A introdução controlada de genes exógenos nessas espécies, por meio de técnicas biotecnológicas, representa uma ferramenta valiosa, garantindo incrementos expressivos na qualidade final dos produtos, em virtude de maior homogeneidade e direcionamento das propriedades da matéria-prima, fatores altamente desejáveis para as indústrias do setor florestal (SARTORETTO et al., 2008). Genes específicos poderão ser introduzidos em genótipos já melhorados, sem modificar a estrutura genética global da planta, e o processo de clonagem tão bem estabelecido para algumas espécies florestais seria o responsável pela multiplicação massal dos indivíduos geneticamente modificados (STUDART-GUIMARÃES et al., 2003).

A utilização de ferramentas de manipulação genética vem sendo avaliada nos programas de melhoramento florestal em diferentes partes do mundo, com grandes investimentos em estudos de campo para várias espécies e híbridos florestais transgênicos. Em 2004, havia mais de 210 ensaios de campo sendo conduzidos em 16 países, envolvendo aproximadamente 15 espécies florestais (FAO, 2004). No Brasil, os testes estão resumidos às espécies de eucalipto, e os experimentos estão voltados para avaliação de gene visando à modificação e redução de lignina, para rápido crescimento, melhoramento da qualidade da fibra para celulose e tolerância a herbicida (WRM, 2009). Além dessas características, o setor florestal tem interesse no desenvolvimento de materiais genéticos com maior eficiência nutricional, que, fisiologicamente, é a habilidade do genótipo em absorver o nutriente do solo, distribuí-lo e utilizá-lo internamente (FURTINI NETO et al., 1996; SANTANA et al., 2002).

A busca de materiais mais eficientes na absorção de P por meio de ferramentas de manipulação genética tem sido almejada para várias culturas, sendo que uma das estratégias é o aumento da exsudação do citrato. A superprodução de citrato é um mecanismo para aumentar a assimilação de fósforo em solos ácidos (LÓPEZ-BUCIO et al., 2000). O citrato atua como agente quelante do Al presente nos solos e por sua vez pode disponibilizar fósforo de complexos insolúveis, aumentando a absorção deste nutriente pela planta (SILVA et al., 2002). Neste contexto, Suzuki et al. (2003) empregaram ferramentas biotecnológicas para aumentar significativamente a exsudação de ácidos orgânicos em plantas de *Eucalyptus* que superexpressam o gene da citrato sintase (CS) em condições de alta acidez do solo e baixa disponibilidade de P, o que contribui para uma maior eficiência na absorção deste elemento.

A presença de grande quantidade de citrato no solo influenciará a nutrição das plantas, visto que o citrato é capaz de dissociar os complexos P-Al e P-Fe, formando compostos estáveis com Al e Fe, liberando o P e outros nutrientes para a solução do solo (HARTWING et al., 2007). Nesse aspecto, a exsudação de citrato trará implicações diretas e indiretas na nutrição e no desenvolvimento das plantas. Assim, o presente trabalho teve o objetivo de avaliar o efeito da transformação genética para aquisição de fósforo no crescimento e na eficiência nutricional de um clone de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*, cultivado em solo com diferentes doses de fósforo, na presença e ausência de calagem.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material genético

No presente experimento, foram avaliados dois materiais genéticos: clone não transformado geneticamente (NT) e clone transformado geneticamente (T), ambos originados de um mesmo clone de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*. No processo de transformação genético, o cDNA do gene de citrato sintase mitocondrial (GenBank número de acesso AB017159, TAKITA et al., 1999), isolado de cenoura (*Daucus carota*) e de função chave no metabolismo de citrato, foi introduzido nas plantas por meio da infecção com a estirpe EHA101 de *Agrobacterium tumefaciens*. O processo de transformação genética foi desenvolvido e executado no Japão de acordo com Koyama et al. (2000) e Kihara et al. (2003). As plantas transformadas e não transformadas foram mantidas em condições *in vitro* e enviadas para o Brasil na fase final de alongamento em meio de cultura. Na casa de vegetação climatizada (CV1) do Departamento de Engenharia Florestal

no campus da Universidade Federal de Viçosa, os explantes foram transplantados para tubetes plásticos (55 cm³ de capacidade) contendo substrato composto por 50 % de casca de arroz e 50 % vermiculita, visando ao enraizamento das microestacas. A seguir, as microestacas enraizadas foram transferidas para outra casa de vegetação (CV2), com cobertura plástica transparente e protegida lateralmente por tela clarite (malha = 2,0 mm), visando à aclimatação e formação do sistema radicular, para seu posterior plantio em vasos com solo.

2.2. Metodologia experimental

O solo utilizado foi Latossolo Amarelo, que foi coletado, secado, peneirado (2 mm), uniformizado e caracterizado (Quadro 1). Em seguida, fez-se a adição de uma mistura de CaCO₃:MgCO₃ na relação de 4:1 em moles, obtendo-se, após um período de incubação de 90 dias com o solo na capacidade de campo, duas condições de acidez no solo: baixa (presença de calagem) e alta (ausência de calagem). O cálculo da dose do corretivo foi feito pelo método da saturação por bases (para V = 50 %), como utilizado por Furtini Neto et al. (1999). Paralelamente, foram aplicadas as doses de 0, 45 e 90 mg dm⁻³ de fósforo (P), tendo como fonte NaH₂PO₄, de modo a obter três níveis de P disponíveis no solo. Além disto, foi realizada uma adubação de base com 100 mg dm⁻³ de N; 100 mg dm⁻³ de K, 45 mg dm⁻³ de S; 4 mg dm⁻³ de Zn; 0,81 mg dm⁻³ de B; 1,33 mg dm⁻³ de Cu; 3,66 mg dm⁻³ de Mn; 0,15 mg dm⁻³ de Mo. Estas doses foram misturadas manualmente no solo, e as fontes de nutrientes foram: nitrogênio (NH₂)₂CO, potássio (KCl), enxofre (K₂SO₄), zinco (ZnSO₄.7H₂O), boro (H₃BO₃), cobre (CuSO₄.5H₂O), manganês (MnSO₄.H₂O) e molibdênio ((NH₄)₆Mo₇O₂₄.4H₂O).

QUADRO 1 – Análise química da amostra do Latossolo Amarelo utilizado no experimento

pH H ₂ O	M.O. dag kg ⁻¹	P -- mg dm ⁻³ --	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Al ³⁺	H+Al	SB	(T)
-----cmol _c dm ⁻³ -----									
4,4	0,9	0,0	9,0	0,0	0,0	0,9	5,45	0,02	5,47
Zn	Fe	Mn	Cu	B	m	V	P-rem,		
----- mg dm ⁻³ ----- % ----- mg L ⁻¹									
0,1	106,9	1,2	0	0,87	98	0	14,9		

pH em água, relação 1:25

Ca²⁺, Mg²⁺, Al³⁺: Extrator: KCl – 1 mol L⁻¹

P, K²⁺, Fe, Mn, Cu: Extrator Mehlich 1

H + Al: Extrator Acetato de Cálcio 0,5 mol L⁻¹ – pH 7,0

B: Extrator água quente

P-rem: Concentração de P em solução após agitação, por 60 minutos, com 60 mg L⁻¹ de P em CaCl₂ 0,01 mol L⁻¹ com o solo.

Após a adição ao solo das diferentes doses de P, da calagem e da adubação de base, porções de 0,4 dm³ foram colocadas em vasos plásticos de 0,5 dm³ de capacidade, com furos na base e contendo uma camada de brita no fundo para favorecer a drenagem de água. Os vasos, espaçados entre si por um metro, receberam uma planta cada e permaneceram em casa de vegetação por 150 dias, sob sistema de irrigação por gotejamento.

Utilizou-se o esquema fatorial (2 x 2 x 3), correspondente a dois materiais genéticos (T - transformado e NT - não transformado), duas condições de acidez no solo (sem e com calagem) e três doses de fósforo (0, 45 e 90 mg dm⁻³ de P), no delineamento em blocos ao acaso, com três repetições e uma planta por unidade experimental.

Durante a condução do experimento, foram realizadas quatro adubações complementares aos 30, 60, 90 e 120 dias após o plantio das plantas, mediante solução de macronutrientes e micronutrientes: N (25 mg dm⁻³), K (50 mg dm⁻³), B (0,81 mg dm⁻³), Zn (2,00 mg dm⁻³), Mn (1,83 mg dm⁻³) e Cu (0,66 mg dm⁻³). Além destas adubações, foi aplicada, aos 15 dias, uma solução obtida pelo balanceamento das fontes de Nitrato de Cálcio, Nitrato de Magnésio, Cloreto de Cálcio e Cloreto de Magnésio, visando a fornecer 0,25 cmol_c dm⁻³ de Ca e 0,06 cmol_c dm⁻³ de Mg, valores propostos por Neves (1983) como os níveis críticos de Ca²⁺ e Mg²⁺ para eucalipto na fase de produção de mudas.

2.3. Avaliação experimental

As medições de altura (A) em cm e diâmetro do colo (D) em mm foram realizadas no dia de plantio e aos 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120, 135 e 150 dias após a instalação do experimento. Determinou-se o incremento dessas características durante o período analisado por meio da diferença entre o valor obtido em cada avaliação e o valor no início do experimento.

Aos 150 dias após o plantio, todas as plantas foram cortadas e divididas em sistema radicular e parte aérea. O sistema radicular foi separado do solo e lavado em água corrente, acondicionado em sacos de papel, seco e pesado, para determinar a massa seca da raiz. Na parte aérea, houve contagem do número de folhas de todas as plantas e foi retirada da planta média de cada tratamento uma amostra de 20 folhas expandidas para determinação da área foliar, a qual foi mensurada por um medidor de área foliar Licor, modelo LI-3100. Posteriormente, os galhos e as folhas foram acondicionados em sacos de papel para a determinação da matéria seca. Todo material vegetal (parte aérea e sistema radicular) foi seco em estufa de ventilação forçada de ar a 72 °C, por 72 horas e pesado. Após a secagem

e a pesagem, o material foi moído e mineralizado, determinando-se, nos extratos, os teores de P, Ca e Mg.

A partir da matéria seca, dos teores de P, Ca e Mg na parte aérea e no sistema radicular, foram estimadas a eficiência de absorção (EA), conforme Furtini-Neto (1994), e a eficiência de utilização (EU), conforme Siddiqi e Glass (1981), dadas por:

$$EA = \frac{\text{Conteúdo do nutriente na planta}}{\text{Matéria seca da raiz}} \quad EU = \frac{[\text{Matéria Seca Total}]^2}{\text{Conteúdo do nutriente na planta}}$$

Foram realizadas análise de variância e a análise de regressão por polinômios ortogonais ($p < 0,05$) para incremento na altura e em diâmetro do colo em função da idade de avaliação. As equações foram comparadas duas a duas pelo teste de identidade de modelo a 5% de probabilidade, conforme Regazzi (1992). Os dados de matéria seca da parte aérea e da raiz, número de folhas, área foliar, eficiência de absorção e eficiência de utilização para P, Ca e Mg foram submetidos à análise de variância e a seguir à análise de regressão em função das doses de P adicionadas ao solo, tanto na ausência como na presença da calagem.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados de P recuperado na análise química aos 10 dias após adição dos tratamentos com calagem e doses de P indicam que o teor de fósforo disponível pelo extrator Mehlich 1 aumentou linearmente em resposta à aplicação de P ao solo: na ausência de calagem, foi de 1,0 para 5,1 mg dm⁻³ e, na presença de calagem, de 1,4 para 5,3 mg dm⁻³, obtendo-se, assim, três níveis de disponibilidade de P no solo em cada condições de acidez.

3.1. Crescimento vegetativo

Não houve efeito significativo entre os tratamentos ($p < 0,05$) para incremento em altura e em diâmetro do colo aos 150 dias. No entanto, quando foram analisadas as curvas de crescimento dos materiais em função da idade de avaliação, foi possível detectar diferenças significativas pelo teste de identidade de modelo ($p < 0,05$). Para incremento em altura, as diferenças ocorreram entre os materiais cultivados com 0 e 45 mg dm⁻³ de fósforo adicionado ao solo (Figura 1A e 1B). Em ambas as doses, o material transformado, sem a calagem (T0), foi o que apresentou melhor desempenho, principalmente a partir dos 60

—■— NT0 (não transformado sem calagem) △..... T0 (transformado sem calagem)
 - - -○- - - NT1 (não transformado com calagem) ◇..... T1 (transformado com calagem)

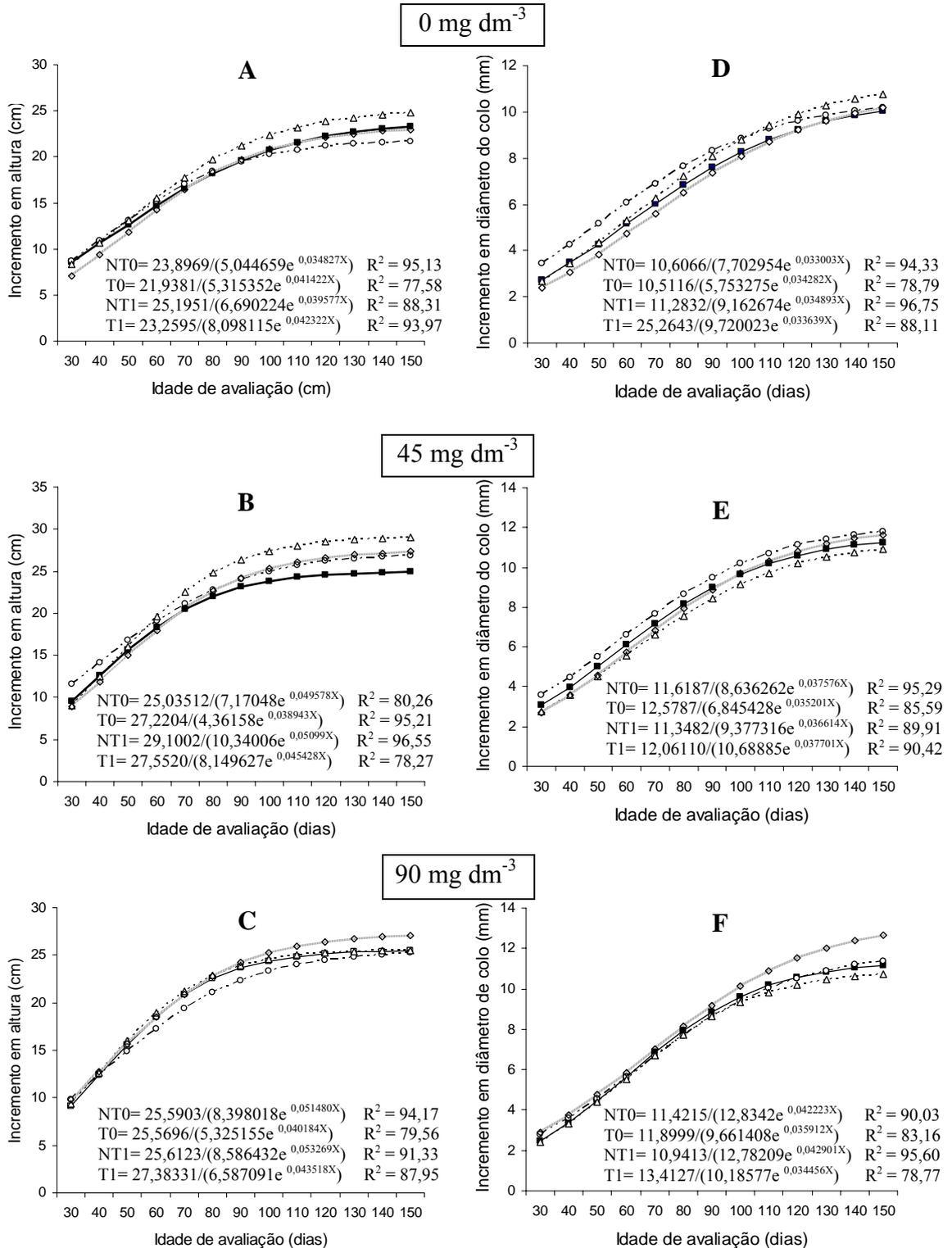


FIGURA 1 – Incremento em altura e em diâmetro do colo de plantas de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* [transformado (T) e não transformado (NT)] cultivadas em Latossolo Amarelo com três níveis de fósforo (0, 45 e 90 mg dm⁻³), com e sem calagem, em função da idade de avaliação.

dias de plantio nos vasos. Acredita-se que as condições de maior acidez e baixa disponibilidade de fósforo no solo induziram maior produção e exsudação de citrato no material transgênico, o que contribuiu para o aumento da absorção de fósforo e, conseqüentemente, no maior incremento em altura das plantas ao longo do tempo de avaliação. De acordo com Suzuki et al. (2003), este clone transgênico de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* apresentou melhor crescimento e maior aquisição de P quando cultivado em solos ácidos com pequena disponibilidade de P. As curvas de incremento em altura das plantas cultivadas com 90 mg dm⁻³ de P adicionado ao solo (Figura 1C) não apresentaram diferenças significativas, indicando que em solos com maior disponibilidade de fósforo o material transformado, sem calagem (T0), não é superior, pois nestas condições o fósforo não foi mais limitante ao crescimento em altura das plantas.

As curvas do incremento em diâmetro do colo diferiram significativamente ($p < 0,05$) apenas na condição de não adição de P (Figura 1D) ao solo, já nas dosagens de 45 e 90 mg dm⁻³ não houve diferenças entre os tratamentos (Figura 1E e 1F). Foi observada na condição de menor disponibilidade de P (dose zero) a performance superior do material transformado, sem calagem (T0), em relação ao material transformado, com calagem (T1), principalmente na fase inicial de plantio (Figura 1D). Atribui-se este fato à maior capacidade de produção e exsudação de citrato nas raízes das plantas transgênicas, conforme relatado por Suzuki et al. (2003), o que permitiu neutralizar o Al do solo e aumentar a disponibilidade de P na solução do solo para a absorção pelas plantas transformadas, favorecendo o incremento no diâmetro do colo deste material, principalmente nas avaliações iniciais após o plantio nos vasos. Segundo Hartwig et al. (2007), o citrato é formado por compostos estáveis com Al e Fe, liberando o P para a solução do solo, possibilitando sua aquisição pelas plantas.

As equações de regressão para matéria seca da parte aérea, matéria seca de raiz, número de folhas e área foliar em função das doses de P adicionadas ao solo são apresentadas no Quadro 2. A matéria seca da parte aérea e da raiz tendeu a se elevar com as doses crescentes de fósforo aplicado ao solo (Figura 2A e 2B), com exceção da matéria seca da parte aérea do material transformado, sem calagem (T0), a qual foi constante em todas as doses. Este fato pode ser atribuído ao bom desempenho do T0 nas menores doses de P, conforme discutido anteriormente para altura e diâmetro do colo. Vale ressaltar que o aumento da matéria seca da parte aérea e do sistema radicular em função da adição de doses de P ao solo foi relatado por Gonçalves et al. (1986), Furtini-Neto et al. (1996), Ribeiro (1999), Gonçalves e Passos (2000) e D'Ávila (2008).

QUADRO 2 – Equações de regressão para matéria seca da parte aérea, matéria seca da raiz, número de folhas e área foliar em plantas de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* [transformado (T) e não transformado (NT)] aos 150 dias de idade em função da dose de P adicionada à amostra de um Latossolo Amarelo, com (1) e sem calagem (0)

Características	Tratamento	Efeito		Equação de Regressão	R ² (%)
		Linear	Quadrático		
Matéria seca da parte aérea (g/planta)	NT0	9,315*	3,237 ^{ns}	$\hat{Y} = 54,51278 + 0,239148X$	74,2
	NT1	23,071*	11,366*	$\hat{Y} = 38,45667 + 10,4795X^{0,5} - 0,728266X$	100,0
	T0	2,833 ^{ns}	1,485 ^{ns}	$\hat{Y} = \bar{Y} = 60,59556$	-
	T1	23,221*	0,251 ^{ns}	$\hat{Y} = 44,52611 + 0,377593X$	98,9
Matéria seca da raiz (g/planta)	NT0	5,800*	2,021 ^{ns}	$\hat{Y} = 48,63889 + 0,202296X$	74,6
	NT1	19,538*	15,117*	$\hat{Y} = 22,53667 + 12,9573X^{0,5} - 0,994523X$	100,0
	T0	7,849*	3,009 ^{ns}	$\hat{Y} = 45,72222 + 0,235333X$	72,3
	T1	13,542*	2,451 ^{ns}	$\hat{Y} = 29,77667 + 0,309111X$	84,7
Número de folhas (unidade)	NT0	10,231*	3,559 ^{ns}	$\hat{Y} = 379,2778 + 0,47037X$	32,5
	NT1	29,348*	18,325*	$\hat{Y} = 316,3333 - 23,41220X^{0,5} - 1,79379X$	100,0
	T0	7,080*	3,054 ^{ns}	$\hat{Y} = 377 - 0,444444X$	99,9
	T1	24,757*	1,531 ^{ns}	$\hat{Y} = 313,7222 + 1,507407X$	98,8
Área foliar (cm ² /planta)	NT0	0,729 ^{ns}	2,244 ^{ns}	$\hat{Y} = \bar{Y} = 8949,93$	-
	NT1	1,498 ^{ns}	1,148 ^{ns}	$\hat{Y} = \bar{Y} = 8090,70$	-
	T0	0,651 ^{ns}	0,001 ^{ns}	$\hat{Y} = \bar{Y} = 7978,95$	-
	T1	7,491*	0,094 ^{ns}	$\hat{Y} = 7011,692 + 33,69056X$	98,8

Em que: * e ^{NS} = diferenças significativas e não significativas, respectivamente, pelo teste F (p < 0,05).

O material transformado, com calagem (T1), apresentou menor matéria seca de raiz em relação aos demais tratamentos, exceto na condição de não adição de P (0 mg dm⁻³), em que o material não transformado, com calagem (NT1), foi inferior (Figura 2B). De modo geral, pode-se concluir que o T1 não precisou de um grande sistema radicular para suportar seu crescimento, pois o material transformado para maior produção e exsudação de citrato adquiriu os nutrientes sem necessidade de ampliação das raízes. Reis et al. (1987), Gonçalves e Passos (2000) e Gomes (2001) verificaram que as plantas de eucalipto alocaram mais fotoassimilados no sistema radicular, em solo com menor disponibilidade de fósforo, aumentando consideravelmente a produção de matéria seca de raiz.

O número de folhas do material transformado, com calagem (T1), e não transformando, com e sem calagem (NT1 e NT1), aumentou com a adição de fósforo ao solo em razão do maior crescimento das plantas com adubação fosfatada (Figura 2C), conforme relatado por Gonçalves et al. (1986), Furtini-Neto (1996), Ribeiro (1999), Gutierrez-Boem e Thomas (2001). Para o material transformado, sem calagem (T0), verifica-se uma tendência de queda do número de folhas com o aumento da aplicação de P, no entanto, este tratamento apresentou a mesma área foliar em todas as doses de P (Figura 2D), o que leva a acreditar que as folhas tiveram o seu limbo expandido com o aumento da

disponibilidade de P no solo, já que o número de folhas se reduziu. A área foliar do material transformado, com calagem (T1), foi a única que aumentou com a elevação das doses de P, acompanhando o crescimento linear do número de folhas, enquanto nos materiais não transformados permaneceu constante. O comportamento diferenciado do material transformado também pode ser atribuído à maior síntese de citrato e, conseqüentemente, maior disponibilização do P, pois, segundo Gutierrez-Boem e Thomas (2001), a presença de fósforo disponível tem grande influência na expansão foliar.

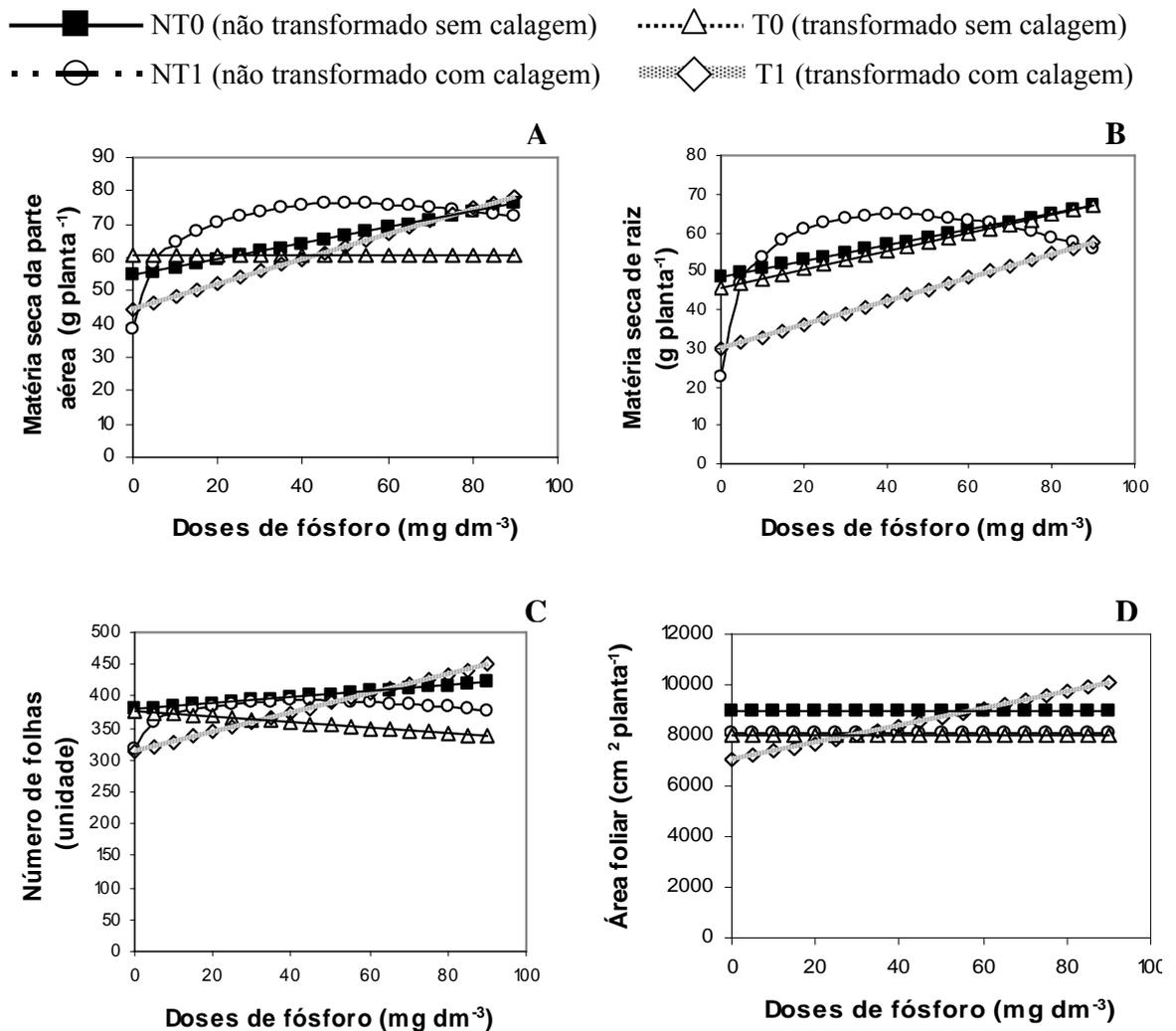


FIGURA 2 – Matéria seca da parte aérea, matéria seca de raiz, número de folhas e área foliar em plantas de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* [transformado (T) e não transformado (NT)] cultivadas em Latossolo Amarelo com três níveis de fósforo (0, 45 e 90 mg dm⁻³), com e sem calagem, em função da idade de avaliação.

As características de crescimento analisadas demonstram que a transformação genética para a superexpressão da citrato sintase em plantas de eucalipto pode trazer

incrementos significativos, principalmente em solos ácidos e deficientes em fósforo, como é o caso da maioria dos solos destinados à eucaliptocultura no Brasil. Esta técnica terá maior potencial de utilização para as espécies menos adaptadas às condições tropicais, além de permitir um crescimento mais acelerado na fase inicial do plantio.

3.2. Eficiência nutricional

As equações de regressão para eficiência de absorção e eficiência de utilização para P, Ca e Mg em função das doses de P adicionadas ao solo são apresentadas no Quadro 3.

QUADRO 3 – Equações de regressão para eficiência de absorção de P, Ca e Mg, eficiência de utilização de P, Ca e Mg em plantas de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* [transformado (T) e não transformado (NT)] aos 150 dias de idade em função da dose de P adicionada à amostra de um Latossolo Amarelo, com e sem calagem

	Nutriente	Tratamento	Efeito		Equação de Regressão	R ² (%)
			Linear	Quadrático		
Eficiência de Absorção (mg de P/g de raiz seca)	P	NT0	20,47 *	1,79 ^{ns}	$Y = 0,6597 + 0,007108X$	92,0
		NT1	25,37 *	11,34 *	$Y = 0,8882 - 0,209926 X^{0,5} + 0,030043X$	100,0
		T0	15,50 *	1,93 ^{ns}	$Y = 0,6296 + 0,006189X$	88,9
		T1	29,83 *	4,97 *	$Y = 0,8833 - 0,138744 X^{0,5} + 0,023208X$	100,0
	Ca	NT0	0,55 ^{ns}	0,07 ^{ns}	$\hat{Y} = \bar{Y} = 12,0469$	-
		NT1	4,66 *	17,25 *	$Y = 22,35988 - 3,357X^{0,5} + 0,309912X$	100,0
		T0	4,86 *	1,80 ^{ns}	$Y = 13,723 - 0,0449X$	72,9
		T1	1,99 ^{ns}	0,95 ^{ns}	$\hat{Y} = \bar{Y} = 18,5601$	-
	Mg	NT0	1,13 ^{ns}	0,00 ^{ns}	$\hat{Y} = \bar{Y} = 3,147805$	-
		NT1	20,15 *	21,98 *	$Y = 5,379552 - 0,8068X^{0,5} + 0,065579X$	100,0
		T0	2,15 ^{ns}	4,33 *	$Y = 3,741642 - 0,3581X^{0,5} + 0,031386X$	100,0
		T1	12,72 *	7,21 *	$Y = 5,343624 - 0,4621X^{0,5} + 0,033237X$	100,0
Eficiência de Utilização (g de planta/ mg de P)	P	NT0	2,35 ^{ns}	5,16 *	$Y = 294,29 + 40,133X^{0,5} - 4,91368X$	100,0
		NT1	0,01 ^{ns}	27,57 *	$Y = 186,82 + 92,80X^{0,5} - 9,79594X$	100,0
		T0	6,71 *	4,42 *	$Y = 309,76 + 37,1439X^{0,5} - 5,06952X$	100,0
		T1	0,15 ^{ns}	3,17 ^{ns}	$\hat{Y} = \bar{Y} = 223,1952$	-
	Ca	NT0	9,87 *	3,47 ^{ns}	$Y = 17,72 + 0,122X$	74,0
		NT1	6,10 *	12,70 *	$Y = 7,431235 + 5,3742^{0,5} - 0,470474X$	100,0
		T0	7,90 *	4,34 *	$Y = 14,974 + 3,2099^{0,5} - 0,229141X$	100,0
		T1	6,31 *	0,10 ^{ns}	$Y = 9,862 + 0,0976X$	98,4
	Mg	NT0	14,72 *	1,90 ^{ns}	$Y = 65,265 + 0,49213X$	88,5
		NT1	20,16 *	23,79 *	$Y = 30,73 - 24,81608X^{0,5} - 2,039X$	100,0
		T0	4,24 ^{ns}	7,20 *	$Y = 57,018 + 13,65037X^{0,5} - 1,174X$	100,0
		T1	15,57 *	1,42 ^{ns}	$Y = 40,49 + 0,50616X$	91,6

Em que: * e ^{NS} = diferenças significativas e não significativas, respectivamente, pelo teste F (p < 0,05).

A eficiência de absorção de fósforo aumentou com a adição das doses de P no solo e apresentou maior resposta nos tratamentos com calagem, principalmente nas maiores doses de fósforo (Figura 3A). Este resultado pode ser atribuído à relação direta da

■— NT0 (não transformado sem calagem) △..... T0 (transformado sem calagem)
 - - ○ - - NT1 (não transformado com calagem) ◇..... T1 (transformado com calagem)

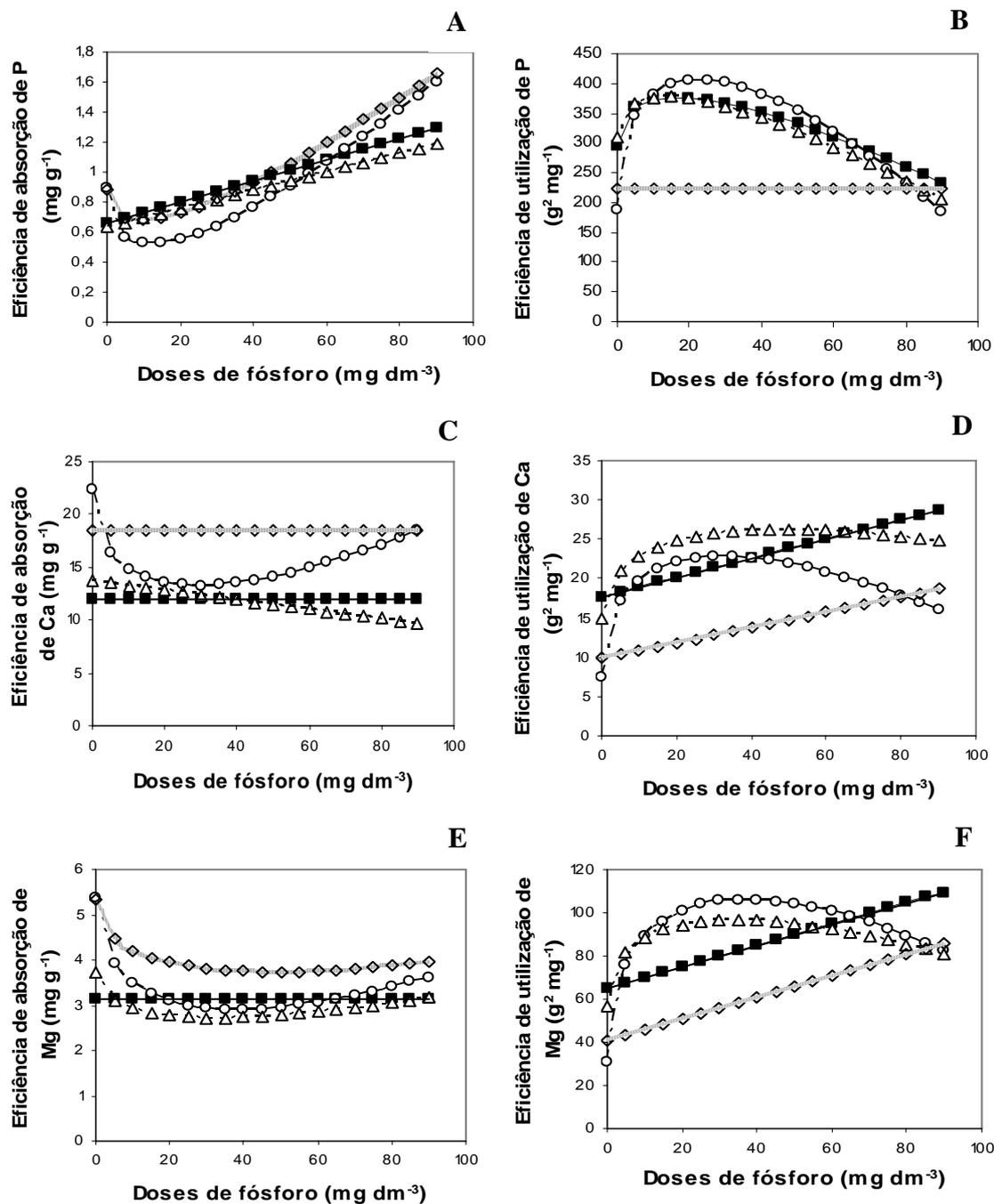


FIGURA 3 – Eficiência de absorção e eficiência de utilização de P, Ca e Mg em plantas de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* [transformado (T) e não transformado (NT)] aos 150 dias de idade em função da dose de P adicionada à amostra de um Latossolo Amarelo, com e sem calagem.

eficiência absorção com o conteúdo de P na planta, que aumenta em resposta à adubação fosfatada, conforme relatado por vários autores como Mello et al. (1970), Barros et al. (1981), Valeri et al. (1985), Ribeiro (1999) e Paula et al. (2003). Além disto, o material transformado e o não transformado apresentaram o mesmo comportamento, o que não está de acordo com Suzuki et al. (2003), que relatam um maior acúmulo de P nas raízes e nas folhas das plantas do clone transformado de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* para superprodução de citrato.

A eficiência de utilização para P (Figura 3B) apresentou comportamento oposto ao da eficiência de absorção, pois decresceu a partir de um determinado nível de P no solo, com exceção do material transformado sem calagem (T0), que se manteve constante em todos os níveis. Nos trabalhos realizados por Melo et al. (1995) e Paula et al. (2003), as doses superiores de P₂O₅ aplicadas ao solo proporcionaram maior absorção de P, porém não produziram maior quantidade de matéria seca total, resultando em menor eficiência de utilização de P nestas condições. Para Furtini Neto et al. (1996), a menor eficiência de utilização de P em condições de alta disponibilidade deste nutriente pode indicar um possível consumo de luxo pelas plantas.

A eficiência de absorção de Ca (Figura 3C) foi maior nas plantas cultivadas em solo com calagem. Este fato pode ser atribuído ao aumento de Ca na matéria seca de plantas de eucalipto em função da quantidade de calcário aplicada ao solo, como relatado por Valeri et al. (1985; 1993). De modo geral, eficiência de absorção de Ca foi semelhante nos materiais genéticos, indicando que a transformação não influenciou o acúmulo de Ca na parte aérea, sendo que as diferenças podem ser atribuídas ao efeito da dosagem de P aplicada ao solo e à presença e ausência da calagem. A eficiência de utilização de Ca (Figura 3D) também sofreu influência da calagem e das doses de P aplicadas, com respostas diferenciadas entre os materiais genéticos. A eficiência de utilização de Ca tendeu a aumentar de acordo com a fertilização fosfatada adicionada ao solo.

A eficiência nutricional de magnésio sofreu influência das doses de P e da calagem aplicada ao solo. De modo geral, a eficiência de absorção de Mg (Figura 3E) decresceu com a adição de P ao solo e foi influenciada pela correção do solo com calagem. Valeri et al. (1993) relatam o efeito favorável da aplicação de calcário dolomítico no teor de magnésio nas plantas de eucalipto, mas não observaram efeito da adição de fósforo no teor de Mg nas folhas. A eficiência de utilização de Mg (Figura 3F) aumentou com a adição de P ao solo, mas os materiais genéticos apresentaram respostas variáveis quando à calagem.

A semelhante eficiência nutricional entre o material transformado e o não transformado aos 150 dias indica que a inserção do gene para superexpressão da citrato sintase não proporcionou maior absorção e maior eficiência de utilização de P, Ca e Mg nas plantas. Este resultado pode ter sido em função da grande eficiência nutricional da maioria das espécies de *Eucalyptus*, caso dos híbridos de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*, ou mesmo pela complexidade dos processos envolvidos na utilização de fósforo pelas plantas. Novais e Smyth (1999) relatam a interação entre vários fatores do meio de crescimento e da planta.

4. CONCLUSÕES

A transformação genética para aumentar a aquisição de fósforo, por meio da superexpressão do gene que codifica a citrato sintase (CS), em um clone de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*, proporcionou maior crescimento das plantas na fase inicial de cultivo, na condições de maior acidez e baixa disponibilidade de fósforo no solo, não alterando, contudo, a eficiência nutricional do clone.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASSIS, T. F.; MAFIA, R. G. Hibridação e clonagem. In: BORÉM, A. (Ed.). **Biotecnologia florestal**. Viçosa, MG: Suprema Gráfica e Editora, 2007. p.93-121.
- BARROS, N. F.; BRAGA, J. M.; BRANDI, R. M.; DEFELIPO, B. B. Produção de eucalipto em solos de cerrado em reposta à aplicação de NPK e de B e Zn. **Revista Árvore**, v. 5, p. 90-103, 1981.
- FAO. Preliminary review of biotechnology in forestry including genetic modification. **Forest Genetic Resources Working Paper FGR/59E**. Rome, Italy: Forest Resources Development Service. Forest Resources Division. 2004. 124p.
- FERNANDES, A. R.; PAIVA, H. N.; CARVALHO, J. G.; MIRANDA, J. R. P. Crescimento e absorção de nutrientes por mudas de freijó (*Cordia goeldiana* Humber) em função de doses de fósforo e de zinco. **Revista Árvore**, v. 31, n. 4, p. 599-608, 2007.
- FURTINI NETO, A. E. **Eficiência nutricional, cinética de absorção e frações fosfatadas em *Eucalyptus***. 1994, 99f.. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

FURTINI NETO, A. E.; BARROS, N. F.; GODOY, M. F.; NOVAIS, R. F. Eficiência nutricional de mudas de *Eucalyptus* em relação a fósforo. **Revista Árvore**, v. 20, n. 1, p. 17-28, 1996.

GOMES, S. S. **Efeito do alumínio e mecanismo de tolerância à toxicidade em espécies de *Eucalyptus* e *Pinus***. 2001, 39f.. Dissertação (Mestrado em Agronomia - Solos e Nutrição de Plantas) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP.

GONÇALVES, J. L. M.; BARROS, F. N.; NEVES, J. C. L.; NOVAIS, R. F. Níveis críticos de fósforo no solo e na parte aérea de eucalipto na presença e ausência da calagem. **Revista Árvore**, v. 10, n.1, p. 91-104, 1986.

GONÇALVES, M. R.; PASSOS, C. A. M. Crescimento de cinco espécies de eucalipto submetidas a déficit hídrico em dois níveis de fósforo. **Ciência Florestal**, v. 10, n. 2, p. 145-161, 2000.

GUTIERREZ-BOEM, F. H.; THOMAS, G. W. Leaf area development in soybean as affected by phosphorus nutrition and water deficit. **Journal of Plant Nutrition**, v. 24, p. 1711-1729, 2001.

HARTWING, I.; OLIVEIRA, A. C.; CARVALHO, F. I. F.; BERTAN, I.; SILVA, J. A. G.; SCHIMIDT, D. A. M.; VALÉRIO, I. P.; MAIA, L. C.; FONSECA, D. A. R. F.; REIS, C. E. S. Mecanismos associados à tolerância ao alumínio em plantas. **Semina**, v. 28, n. 2, p. 219-228, 2007.

KIHARA, T.; WADA, T.; SUZUKI, Y.; HARA, T.; KOYAMA, H. Alteration of citrate metabolism in cluster roots of white lupin. **Plant Cell Physiology**, v. 44, n. 9, p. 901-908, 2003.

KOYAMA, H.; KAWAMURA, A.; KIHARA, T.; HARA, T. TAKITA, E.; SHIBATA, D. Overexpression of mitochondrial citrate synthase in *Arabidopsis thaliana* improved growth on a phosphorus-limited soil. **Plant Cell Physiology**, v. 41, n. 9, p. 1030-1037, 2000.

LÓPEZ-BUCIO, J.; MARTINEZ DE LA VEJA, O.; GUEVARA-GARCIA, A.; HERRERA-ESTRELLA, L. Enhanced phosphorus uptake in transgenic tobacco plants overproduce citrate. **Nature Biotechnology**, v. 18, p. 450-453, 2000.

MELLO, H. A.; MASCARENHAS, J.; SIMÕES, J. W.; COUTO, H. T. Z. Resultados da aplicação de fertilizantes minerais na produção de madeira de *Eucalyptus saligna* Sm em solos de cerrado do estado de São Paulo. **IPEF**, v. 1, p. 7-28, 1970.

MELO, V. F.; NOVAIS, R. F.; BARROS, N. F.; FONTES, M. P. F.; COSTA, L. M. Balanço nutricional, eficiência de utilização e avaliação da fertilidade do solo em P, K, Ca e Mg em plantios de eucalipto no Rio Grande do Sul. **IPEF**, v. 48/49, p. 8-127, 1995.

NEVES, J. C. L. **Aspectos nutricionais em mudas de *Eucalyptus* spp – tolerância ao alumínio e níveis críticos de fósforo no solo**. 1983, 87f.. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

NOVAIS, R. F.; SMYTH, T. J. **Fósforo em solo e planta em condições tropicais**. Viçosa, MG: UFV/DPS, 1999. 399p.

PASQUALI, G. ZANETTINI, M. B. Transgênese florestal. In: BORÉM, A. (Ed.). **Biotecnologia florestal**. Viçosa, MG: Suprema Gráfica e Editora, 2007, p.315-334.

PAULA, R. C.; PAULA, N. F.; VALERI, S. V.; CRUZ, M. C. P.; TOLFO, A. L. T. Controle genético da eficiência de utilização de fósforo em famílias de meios-irmãos de *Eucalyptus grandis*, em casa de vegetação. **Revista Árvore**, v. 27, n. 1, p. 25-34, 2003.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia vegetal**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. 727 p. (Tradução).

REGAZZI, A. J. Identity test for regression models and equality of parameters in orthogonal polynomial models. **Biometric Bulletin**, v. 9, n. 2, p. 6-22, 1992.

REIS, M.G.F.; BARROS, N.F. & KIMMINS, J.P. Acúmulo de nutrientes em uma seqüência de idade de *Eucalyptus grandis* W. Hill (ex-Maiden) plantado no cerrado, em duas áreas com diferentes produtividades, em Minas Gerais. **Revista Árvore**, v. 11, n. 1, p. 1-15, 1987.

RIBEIRO, M. A. V. **Resposta da soja e do eucalipto a fósforo em solos de diferentes texturas, níveis de densidade e de umidade**. 1999. 71f.. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

SANTANA, R. C.; BARROS, N. F.; NEVES, J. C. L. Eficiência de utilização de nutrientes e sustentabilidade da produção em procedências de *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus saligna* em sítios florestais do estado de São Paulo. **Revista Árvore**, v. 26, n. 4, p. 447-457, 2002.

SARTORETTO, L. M.; SALDANHA, C. W.; CORDER M. P. M. Transformação genética: estratégias e aplicações para o melhoramento genético de espécies florestais. **Ciência Rural**, v. 38, n. 3, p. 861-871, 2008.

SIDDIQI, M. Y.; GLASS, A. D. M. Utilization index: a modified approach to the estimation and comparison of nutrient utilization efficiency in plants. **Journal Plant Nutrition**, v. 4, p. 289-302, 1981.

SILVA, I. R.; SMYTH, T. J.; BASSOS, N. F.; NOVAIS, R. F.; Physiological aspects of aluminium toxicity and tolerance in plantas. In: ALVAREZ, V. V. H.; SCHAEFER, C. E. G. R.; BARROS, N. F.; MELLO, W. V.; COSTA, L. M. (Eds.). **Tópicos em ciência do solo**. Viçosa, MG: SBCS, 2002. p. 277-335.

STUDART-GUIMARÃES, C. S.; LACORTE, C.; BRASILEIRO, A. C. M. Transformação genética em espécies florestais. **Ciência Florestal**, v. 13, n. 1, p. 167-178, 2003.

SUZUKI, Y.; KAWAZU, T.; KONDO, K.; TSUYAMA, M.; WADA, T.; HARA, T.; KOYAMA, H. Characteristics of transgenic *Eucalyptus* hybrids with an overexpression of

plant mitochondrial citrate synthase. **Nippon Shokubutsu Seiri Gakkai Nenkai oyobi Shinpojiuno Koen Yoshishu**, v. 45, p. 107, 2003.

TAKITA, E.; KOYAMA, H.; SHIRANO, Y.; SHIBATA, D.; HARA, T. Publicação da sequência e caracterização do gene que codifica a enzima citrato sintase. **Soil Science Plant Nutrition**, v. 45, p. 197-205, 1999.

TZFIRA, T.; ZUKER, A.; ALTMAN, A. Forest-tree biotechnology: genetic transformation and its application to future forests. **Trends in Biotechnology**, v. 16, p. 439-446, 1998.

VALERI, S. V.; AGUIAR, I. B.; CORRADINI, L.; SOUZA, E. C. A.; BANZATTO, D. A. Efeito do fósforo e cálcio no desenvolvimento e na composição química foliar de *Eucalyptus grandis* Hill ex maiden em casa de vegetação. **IPEF**, n. 29, p. 47-54. 1985.

VALERI, S. V.; AGUIAR, I. B.; CORRADINI, L. Composição química foliar e crescimento volumétrico de *Eucalyptus grandis* Hill ex maiden cultivado em areia quartzosa, em resposta à aplicação de fósforo e calcário dolomítico. **IPEF**, n. 46, p. 63-64, 1993.

XAVIER, A.; WENDLING, I.; SILVA, R. L. **Silvicultura clonal: princípios e técnicas**. Viçosa, MG: UFV, 2009. 272p.

WRM Briefing. **GE tree research - A country by country overview**. Nov. 2008. 8p. Disponível em: <http://www.wrm.org.uy/subjects/GMTrees/GE_Trees_Briefing.html>. Acesso em: 13 jan. 2009.

**INDICADORES DE QUALIDADE BIOLÓGICA DO SOLO, DE CRESCIMENTO
E DE NUTRIÇÃO EM PLANTAS DE *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*
TRANSFORMADAS GENETICAMENTE E INOCULADAS COM
ECTOMICORRIZAS**

RESUMO – O objetivo deste trabalho foi avaliar os indicadores de qualidade biológica do solo, o crescimento e a eficiência nutricional de plantas de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* transformadas geneticamente e inoculadas com fungos ectomicorrízicos. Plantas transformadas e não transformadas para a superexpressão do gene que codifica a citrato sintase (CS) foram cultivadas em solo enriquecido de 45 e 90 mg dm⁻³ de fósforo, com e sem inoculação de *Pisolithus* sp. Aos 150 dias de idade, foram analisado o crescimento vegetativo, a eficiência nutricional e as características microbiológicas e bioquímicas do solo. As plantas transformadas e sem inoculação tiveram um ganho inicial no crescimento em altura, porém não houve grandes alterações para a maioria das variáveis analisadas. De modo geral, a transformação genética e a micorrização não alteraram os indicadores microbiológicos e bioquímicos do solo, a eficiência nutricional e o crescimento final das plantas.

Palavras-chave: Transgênico, citrato, ectomicorrizas, biossegurança.

**BIOLOGICAL INDICATORS OF SOIL QUALITY, GROWTH AND NUTRITION
IN PLANTS OF *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* GENETICALLY MODIFIED
AND INOCULATED WITH ECTOMYCORRHIZAE**

ABSTRACT - This study was to evaluate the biological quality indicators of soil, growth and nutritional efficiency of *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* genetically modified and inoculated with ectomycorrhizal fungi. Genetically modified and unmodified plants for overexpression of the gene encoding citrate synthase (CS) were grown on soil enriched with 45 and 90 mg dm⁻³ of phosphorus with and without inoculation with *Pisolithus* sp. At 150 days of age were analyzed vegetative growth, the nutritional efficiency and microbiological and biochemical traits of soil. Genetically modified plants uninoculated had an initial gain in height growth, but no major changes for most analyzed variables. In general, genetic modification and the mycorrhization did not alter the microbiological and biochemical indicators of soil, the nutritional efficiency and growth of final plants.

Keywords: Transgenic, citrate, ectomycorrhizae and biosafety.

1. INTRODUÇÃO

O programa de silvicultura clonal de eucalipto tem como ponto de partida a seleção de genótipos superiores para, posteriormente, proceder-se à sua clonagem em larga escala, o que permite a transferência da variância genética total, resultando na obtenção de incrementos máximos, sejam de produtividade volumétrica, sejam relacionados a propriedades tecnológicas da madeira ou mesmo à resistência a fatores bióticos ou abióticos (ASSIS e MAFIA, 2007). Assim, as ações de melhoramento genético são complementares e essenciais às estratégias do programa de silvicultura clonal, pois um apropriado programa de melhoramento genético florestal constitui suporte ao fornecimento de novos clones que atendam à necessidade desta silvicultura (XAVIER et al., 2009).

O gênero *Eucalyptus* é considerado de alta capacidade de adaptação, pois a maioria das espécies é originária dos solos intemperizados da Austrália e, em decorrência das peculiaridades dessa região, desenvolveu mecanismos adaptativos às condições adversas, especialmente a baixa fertilidade natural. Um desses mecanismos é a associação com fungos ectomicorrízicos e arbusculares, sendo que a associação com ectomicorrizas é a mais abundante nas raízes das espécies de eucalipto (ZAMBOLIM, 1990; MELLO, 2006).

As micorrizas são associações mutualistas entre certos fungos e raízes finas e não lenhosas das plantas hospedeiras, em que os compostos de C produzidos pela fotossíntese são utilizados pelo hospedeiro e pelo fungo, este último fornecendo às plantas parte dos nutrientes absorvidos do solo (CARNEIRO, 1995; ARAÚJO e MACHADO, 2006). Segundo Mello (2006), os serviços prestados pelo fungo vão muito além da nutrição de plantas individualizadas, pois eles também contribuem para a captura de água e síntese de hormônios de crescimento, como ácido indol acético e precursores de giberilinas, além de substâncias antibióticas como polifenóis, que, por sua vez, conferem proteção ao sistema radicular contra patógenos. No entanto, uma das mais importantes propriedades das micorrizas, principalmente nas ectomicorrizas, em essências florestais, é a habilidade de estimular o crescimento de plantas, especialmente por meio do incremento na absorção de nutriente no solo, como o fósforo (ZAMBOLIM, 1990; BERBARA et al., 2006).

Embora o P seja um macronutriente essencial para o crescimento e desenvolvimento das plantas, encontra-se presente no solo em baixas concentrações e é pouco móvel em solos intemperizados, como os tropicais (BERBARA et al., 2006). Desta forma, a aplicação de fósforo tem sido essencial para o aumento e manutenção da produtividade das florestas implantadas, porém, quando fontes solúveis de P são

adicionadas ao solo, este nutriente pode ser adsorvido na superfície dos coloides ou convertido a compostos muito pouco solúveis de Fe e Al, o que contribui para pequena eficiência (10%-25%) dos adubos fosfatados (BRADY e WEIL, 1996).

O baixo nível de eficiência e o alto custo dos adubos fosfatados têm despertado o interesse de pesquisas na área de biotecnologia. Segundo Suzuki et al. (2003), podem-se empregar ferramentas de manipulação genética para aumentar significativamente a exsudação de ácidos orgânicos pelas plantas de *Eucalyptus*. Os ácidos orgânicos podem deslocar fósforo de complexos insolúveis tornando-o mais disponível para absorção pela planta (LÓPEZ-BUCIO et al., 2000). Dentre os ácidos orgânicos, o citrato é o mais comum entre as espécies presentes em condições de alta acidez do solo e baixa presença de P, pois as plantas que apresentam maior síntese e exsudação de citrato são as mais eficientes na absorção do P disponível no solo (HARTWING et al., 2007).

A implementação desta nova tecnologia será sem dúvida um avanço para o estabelecimento das florestas clonais de alta produtividade. No entanto, Suzuki et. al. (2003) afirmam que é necessário avaliar outras implicações da transformação na performance das plantas transgênicas (eficiência de utilização de P e outros nutrientes, associação das raízes com fungos micorrizicos, cinética de absorção P, entre outros) e no ambiente (efeito dos microorganismos do solo). As análises de segurança ambiental devem envolver testes e avaliações para investigar os possíveis efeitos adversos do OGM (organismo geneticamente modificado) no meio ambiente, incluindo efeito na microbiota do solo, em organismo não-alvo e na biodiversidade como um todo (BORÉM, 2007). Deste modo, o presente trabalho teve como objetivo avaliar os indicadores de qualidade biológica do solo, o crescimento e a eficiência nutricional de plantas de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* transformadas geneticamente e inoculadas com fungos ectomicorrízicos, cultivadas em Latossolo Amarelo com dois níveis de fósforo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material genético

No presente experimento foram avaliados dois materiais genéticos: clone não transformado geneticamente (NT) e clone transformado geneticamente (T), ambos originados de um mesmo clone de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*. No processo de transformação genética, o cDNA do gene de citrato sintase mitocondrial (GenBank número de acesso AB017159, TAKITA et al., 1999) de função chave no metabolismo de citrato,

foi introduzido nas plantas por meio da infecção com a estirpe EHA101 de *Agrobacterium tumefaciens*. O processo de transformação genética foi desenvolvido e executado no Japão, de acordo com Koyama et al. (2000) e Kihara et al. (2003). As plantas transformadas e não transformadas foram mantidas em condições *in vitro* e enviadas para o Brasil na fase final de alongamento, em meio de cultura. Na casa de vegetação climatizada (CV1) do Departamento de Engenharia Florestal no campus da Universidade Federal de Viçosa, os explantes foram transplantados para tubetes plásticos (55 cm³ de capacidade) contendo substrato composto por 50 % de casca de arroz e 50 % vermiculita, visando ao enraizamento das microestacas. A seguir, as microestacas enraizadas foram transferidas para outra casa de vegetação (CV2), com cobertura plástica transparente e protegida lateralmente por tela clarite (malha = 2,0 mm), visando à aclimação e formação do sistema radicular, para seu posterior plantio em vasos com solo.

2.2. Metodologia experimental

O solo utilizado foi o Latossolo Amarelo, que foi coletado, secado, peneirado (2 mm), uniformizado e caracterizado (Quadro 1). Em seguida, foram adicionadas doses de 45 e 90 mg dm⁻³ de fósforo (P), tendo como fonte NaH₂PO₄, de modo a obter dois níveis de P disponíveis no solo. Além disto, foi realizada uma adubação de base com 100 mg dm⁻³ de N; 100 mg dm⁻³ de K, 45 mg dm⁻³ de S; 4 mg dm⁻³ de Zn; 0,81 mg dm⁻³ de B; 1,33 mg dm⁻³ de Cu; 3,66 mg dm⁻³ de Mn; 0,15 mg dm⁻³ de Mo. Estas doses foram misturadas manualmente no solo, e as fontes de nutrientes foram: nitrogênio (NH₂)₂CO, potássio (KCl), enxofre (K₂SO₄), zinco (ZnSO₄.7H₂O), boro (H₃BO₃), cobre (CuSO₄.5H₂O), manganês (MnSO₄.H₂O) e molibdênio ((NH₄)₆Mo₇O₂₄.4H₂O).

QUADRO 1 – Análise química da amostra do Latossolo Amarelo utilizado no experimento

pH H ₂ O	M.O. dag kg ⁻¹	P -- mg dm ⁻³ --	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Al ³⁺	H+Al	SB	(T)
				-----cmol _c dm ⁻³ -----					
4,4	0,9	0,0	9,0	0,0	0,0	0,9	5,45	0,02	5,47
Zn	Fe	Mn	Cu	B	m	V	P-rem,		
		----- mg dm ⁻³ -----		----- % -----					
0,1	106,9	1,2	0	0,87	98	0	14,9		

pH em água, relação 1:25

Ca²⁺, Mg²⁺, Al³⁺: Extrator: KCl – 1 mol L⁻¹

P, K²⁺, Fe, Mn, Cu: Extrator Mehlich 1

H + Al: Extrator Acetato de Cálcio 0,5 mol L⁻¹ – pH 7,0

B: Extrator água quente

P-rem: Concentração de P em solução após agitação, por 60 minutos, com 60 mg L⁻¹ de P em CaCl₂ 0,01 mol L⁻¹ com o solo.

Após a adição ao solo das diferentes doses de P e da adubação de base, porções de 0,4 dm³ foram colocadas em vasos plásticos de 0,5 dm³ de capacidade, com furos na base e contendo uma camada de brita no fundo para favorecer a drenagem de água. A inoculação com *Pisolithus* sp. foi imposta no momento de plantio das plantas nos vasos. Para isto, os discos de BDA (batata, dextrose e ágar) de 15 mm contendo micélio do fungo micorrízico foram colocados em contato com o sistema radicular das mudas para facilitar a associação. Os vasos, espaçados entre si por um metro, receberam uma planta cada, e permaneceram em casa de vegetação por 150 dias, sob sistema de irrigação por gotejamento.

Utilizou-se esquema fatorial (2 x 2 x 2), correspondente a dois materiais genéticos (T - transformado e NT - não transformado), dois regimes de inoculação (sem e com inoculação micorrizas) e duas doses de fósforo (45 mg dm⁻³ de P e 90 mg dm⁻³ de P), no delineamento em blocos ao acaso, com quatro repetições e uma planta por unidade experimental.

Durante a condução do experimento, foram realizadas quatro adubações complementares aos 30, 60, 90 e 120 dias após o plantio das plantas, mediante solução de macronutrientes e micronutrientes: N (25 mg dm⁻³), K (50 mg dm⁻³), B (0,81 mg dm⁻³), Zn (2,00 mg dm⁻³), Mn (1,83 mg dm⁻³) e Cu (0,66 mg dm⁻³). Além destas adubações, foi aplicada, aos 15 dias, uma solução obtida pelo balanceamento das fontes de Nitrato de Cálcio, Nitrato de Magnésio, Cloreto de Cálcio e Cloreto de Magnésio, visando a fornecer 0,25 cmol_c dm⁻³ de Ca e 0,06 cmol_c dm⁻³ de Mg, valores propostos por Neves (1983) como os níveis críticos de Ca²⁺ e Mg²⁺ para eucalipto na fase de produção de mudas.

2.3. Avaliação experimental

As medições de altura (A) em cm foram realizadas no dia de plantio e aos 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120, 135 e 150 dias após a instalação do experimento. Determinou-se o incremento dessa característica durante o período analisado por meio da diferença entre o valor obtido em cada avaliação e o valor no início do experimento. Além disto, foi mensurado o diâmetro do colo (D) em mm na primeira e na última avaliação de altura.

Aos 150 dias após o plantio, todas as plantas foram cortadas e divididas em sistema radicular e parte aérea. O sistema radicular foi separado do solo e lavado em água corrente, acondicionado em sacos de papel, seco e pesado, para determinar a massa seca da raiz. Na parte, aérea houve contagem do número de folhas de todas as plantas e foi retirada da planta média de cada tratamento uma amostra de 20 folhas expandidas para determinação da área foliar, mensurada por um medidor de área foliar Licor, modelo LI-3100.

Posteriormente, os galhos e as folhas foram acondicionados em sacos de papel para a determinação da matéria seca. Todo material vegetal (parte aérea e sistema radicular) foi seco em estufa de ventilação forçada de ar a 72 ° C, por 72 horas e pesado. Após a secagem e a pesagem, o material foi moído e mineralizado, determinando-se, nos extratos, os teores de N, P, K, Ca, Mg, S, Zn, Fe, Mn, Cu e B. Com as análises dos nutrientes, foi possível calcular os conteúdos dos elementos no sistema radicular e na parte aérea.

A partir da matéria seca, dos teores de P, Ca e Mg na parte aérea e no sistema radicular, foram estimada a eficiência de absorção (EA), conforme Furtini-Neto (1994), e a eficiência de utilização (EU), conforme Siddiqi e Glass (1981), dadas por:

$$EA = \frac{\text{Conteúdo do nutriente na planta}}{\text{Matéria seca da raiz}} \quad EU = \frac{[\text{Matéria Seca Total}]^2}{\text{Conteúdo do nutriente na planta}}$$

Para as análises microbiológicas e bioquímicas, foram retiradas, somente nos tratamentos em que houve a inoculação com *Pisolithus* sp., amostras de 300 gramas de solo no final do experimento (150 dias de idade). As amostras foram enviadas para o Laboratório de Biotecnologia e Biodiversidade para o Meio Ambiente, BIOAGRO-UFV, em Viçosa, MG, tendo sido determinados o carbono da biomassa microbiana (VANCE et al., 1987), nitrogênio da biomassa microbiana (JOERGENSEN e BROOKES, 1990), fosfomonoesterase ácida e alcalina (TABATABAI, 1994), β-glicosidade (EIVAZI e TABATABAI, 1988), taxas de nitrificação potencial e de mineralização do nitrogênio (HART et al., 1994). A atividade respiratória da biomassa microbiana do solo foi avaliada pela quantificação da produção de CO₂ em um respirômetro equipado com leitor infravermelho (Sable Systems, NE, EUA.). A partir desses dados, foi calculado o quociente metabólico (qCO₂) pelo método proposto por Anderson e Domsch (1985). Além dessas análises foram estimadas as populações cultiváveis de bactérias, fungos, actinomicetos e foi verificada visualmente a formação de ectomicorrizas no sistema radicular das plantas inoculadas. Os dados obtidos para os indicadores da qualidade biológica do solo foram submetidos à análise estatística descritiva.

Para as variáveis incremento em diâmetro do colo, incremento em altura, matéria seca da parte aérea, matéria seca de raiz, número de folhas, área foliar, conteúdo de P na parte aérea e na raiz, eficiência de absorção de P, eficiência de utilização de P e teores de N, P, K, Ca, Mg, S, Zn, Fe, Mn, Cu e B na parte aérea e na raiz, foram realizadas as análises de variância e o teste de Tukey (p < 0,05) com auxílio do programa computacional Statistica 7. O incremento na altura em função da idade de avaliação foi submetido à

análise de variância e a seguir à análise de regressão. As equações de regressão foram comparadas duas a duas pelo teste de identidade de modelo, a 5% de probabilidade, conforme Regazzi (1992).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Indicadores biológicos

Todas as plantas inoculadas apresentaram formação de ectomicorrizas no sistema radicular. Os valores encontrados para fosfomonoesterase ácida (Figura 1A), fosfomonoesterase alcalina (Figura 1B), β -glicosidade (Figura 1C), carbono da biomassa microbiana (Figura 1D), taxa de respiração (Figura 1E), quociente metabólico (Figura 1F), nitrogênio da biomassa microbiana (Figura 1G), taxa de nitrificação potencial (Figura 1H), teor de nitrogênio mineralizável (Figura 1I), populações de bactérias (Figura 1J), populações de fungos (Figura 1L) e populações de actinomicetos (Figura 1M) não foram influenciados pelo material genético avaliado. No entanto, o carbono da biomassa microbiana (Figura 1D), a taxa de respiração (Figura 1E), o quociente metabólico (Figura 1F) e a fosfomonoesterase alcalina (Figura 1B) apresentaram uma tendência de alteração em função da disponibilidade de P no solo.

O carbono da biomassa microbiana (CBM) apresentou uma tendência de aumento com a maior disponibilidade de P no solo (90 mg dm^{-3}), sobretudo no material genético não transformado (Figura 1D). Esse comportamento era esperado nos solos com maior disponibilidade de P, visto que a redução de um fator de estresse do solo (deficiência de um nutriente, acidez etc.) eleva a capacidade de utilização do C pelos microrganismos, melhorando a eficiência da conversão do carbono orgânico do solo para o carbono microbiano, conforme relatado por TÓTOLA e CHAER (2002).

A tendência de elevação da taxa de respiração (Figura 1E) do quociente metabólico (Figura 1F) e dos valores da fosfomonoesterase alcalina (Figura 1B) foi observada no solo com 45 mg dm^{-3} de P, comparativamente ao solo com 90 mg dm^{-3} de P. O aumento da respiração, indicativo de alta atividade biológica, pode ser atribuído a uma maior micorrização nas plantas cultivadas no solo com menor disponibilidade de P. Por outro lado, o quociente metabólico ($q\text{CO}_2$), no solo com menor teor de P disponível foi significativamente maior. Essa variável está diretamente relacionada com o estado fisiológico da comunidade microbiana. Valores elevados de $q\text{CO}_2$ indicam que a

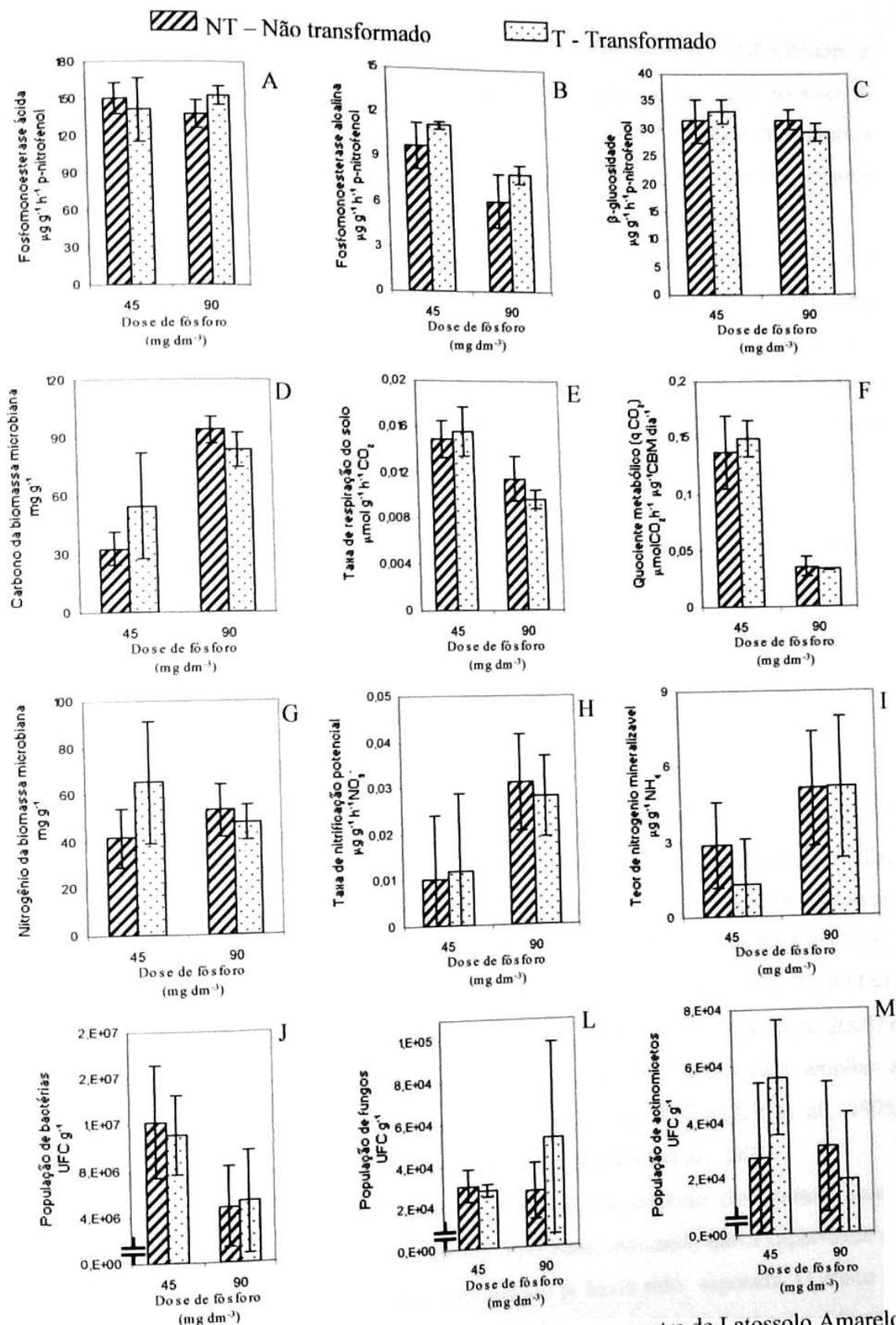


FIGURA 1 – Indicadores microbiológicos e bioquímicos na amostra de Latossolo Amarelo coletada de vasos com plantas de um clone de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* [geneticamente transformado (T) e não transformado (NT)] inoculados com *Pisolithus* sp. e cultivados padrão da média (45 e 90 mg dm⁻³ de P). As barras indicam o desvio padrão da média.

comunidade microbiana esta sob estresse (SAKAMOTO e OBO, 1994; ANDERSON e DOMSCH, 1993), neste caso relacionado possivelmente a uma escassez de P no solo. A maior atividade da fosfomonoesterase alcalina no solo com 45 mg dm⁻³ de P demonstra a importância das formas orgânicas de P no fornecimento do nutriente P às plantas, quando as mesmas são cultivadas em solos com baixa disponibilidade deste nutriente.

Vale destacar que os solos de todos os tratamentos caracterizaram-se pelas baixas populações dos três grupos de microrganismos avaliados (Figura 1J, 1L e 1M). Esse resultado é atribuído ao pequeno teor de matéria orgânica presente neste solo (0,9 dag kg⁻¹) e a seu intensivo manuseio durante o preparo do experimento. Berbara et al. (2006) relatam que as populações microbianas dependem do manejo do solo, da quantidade e da qualidade de resíduos orgânicos, do clima e de fatores edáficos. A atividade e a quantidade de microrganismos não sofreram influência do material genético utilizado (transformado ou não transformado), independentemente da dose de P aplicada ao solo (45 e 90 mg dm⁻³). Portanto, não há evidências de que a utilização do material transgênico estudado possa propiciar risco à biossegurança em relação a processos microbiológicos do solo.

3.2. Crescimento vegetativo

Não houve efeito significativo entre os tratamentos, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), independentemente da característica de desenvolvimento analisada nas plantas aos 150 dias de idade (Quadro 2). Este fato não era o esperado, visto que há vários relatos dos efeitos no crescimento das plantas em razão da micorrização (ZAMBOLIM, 1990; BERBARA et al., 2006; MELLO, 2006), da adubação fosfatada (GONÇALVES et al., 1986; FURTINI-NETO et al., 1996; RIBEIRO, 1999; GONÇALVES e PASSOS, 2000; D'ÁVILA, 2008) e da superprodução de citrato em plantas transformadas geneticamente para ampliar a eficiência na aquisição de P (MIYASAKA et al., 1991; DINKELAKER et al., 1995; LÓPEZ -BUCIO et al., 2000; DELHAIZE et al., 2001; SUZUKI et al., 2003).

Parece que aos 150 dias de idade o ritmo de crescimento das plantas estava estabilizado e os tratamentos já se encontravam nivelados, indicando que a capacidade do vaso de 0,5 dm³ de solo para suportar o crescimento já havia sido esgotada. O efeito de exaustão do substrato pode ser mais bem visualizado na Figura 2, em que houve diferença significativa no desempenho entre os tratamentos quando se analisou o crescimento ao longo do período de avaliação.

QUADRO 2 – Médias do Incremento em Diâmetro do colo (GDiam), Incremento em Altura (GAlt), Matéria Seca da Parte Aérea (MSPA), Matéria Seca de Raiz (MSR), Número de Folhas por Planta (Num Fol), Área Foliar (AFOL), obtidas aos 150 dias de idade em plantas de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* (T: transformado e NT: não transformado) tratadas com micorrizas (0: sem inoculação e 1: com inoculação) e cultivadas em Latossolo Amarelo com dois níveis de fósforo (45: 45 mg dm⁻³ de P e 90: 90 mg dm⁻³ de P)

Tratamento	GDIAM mm	GALT cm	MSPA ----- g/planta ----	MSR ----	NUMFOL unidade	AFOL cm ² /planta
T-0-45	11,73 a	26,25 a	68,12 a	61,43 a	374,0 a	8358,9 a
T-1-45	11,16 a	24,75 a	66,19 a	52,91 a	331,0 a	7397,9 a
NT-0-45	12,06 a	24,38 a	77,07 a	70,76 a	423,5 a	9465,2 a
NT-1-45	12,62 a	23,25 a	73,14 a	58,17 a	424,5 a	9487,6 a
T-0-90	12,56 a	26,63 a	76,18 a	61,52 a	404,5 a	9040,6 a
T-1-90	13,19 a	22,75 a	66,84 a	56,18 a	378,0 a	8448,3 a
NT-0-90	11,27 a	24,50 a	71,40 a	63,30 a	382,7 a	8554,5 a
NT-1-90	12,27 a	23,38 a	70,33 a	64,18 a	383,7 a	8576,8 a

Em que: Médias seguidas de mesma letra não diferem pelo teste de Tukey a 5 % de significância.

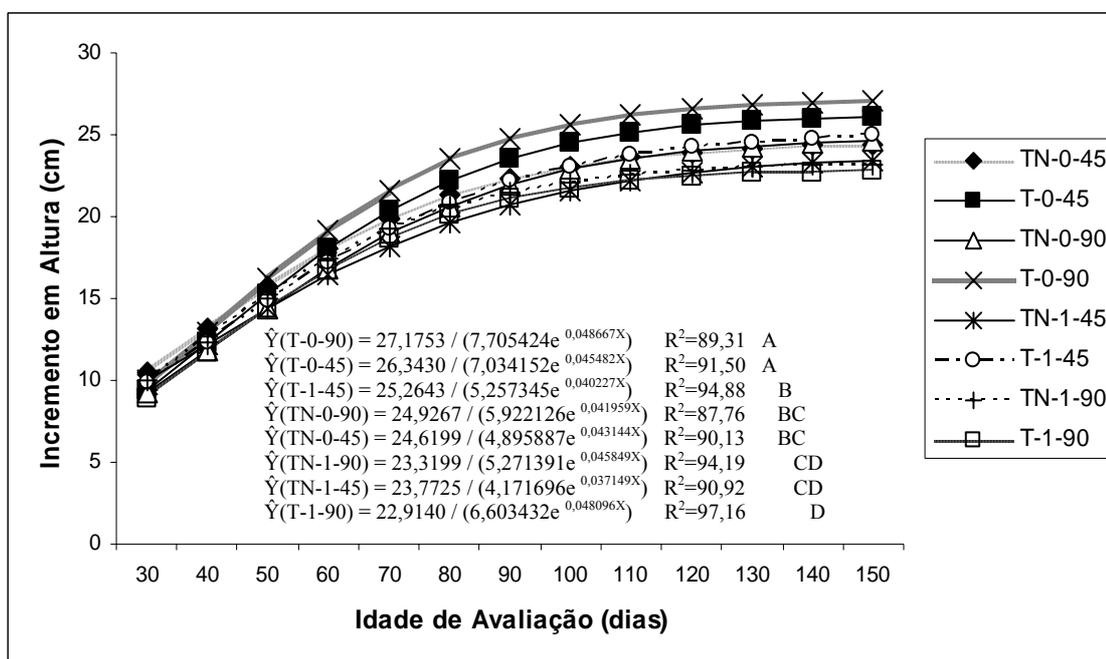


FIGURA 2 – Incremento em altura de plantas de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* (T: transformado e NT: não transformado) tratadas com micorrizas (0: sem inoculação e 1: com inoculação) e cultivadas em Latossolo Amarelo com dois níveis de fósforo (45: 45 mg dm⁻³ de P e 90: 90 mg dm⁻³ de P) em função da idade de avaliação.

Os tratamentos T-0-90 e T-0-45 diferiram dos demais pelo teste de identidade de modelo a 5% de probabilidade, evidenciando que a utilização do material transgênico favoreceu maior incremento em altura, principalmente nas fases iniciais de crescimento, o que pode ser vantajoso no estabelecimento do plantio clonal. Suzuki et al. (2003), avaliando este clone transformado de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*, relatam o seu melhor crescimento e atribuem este fato à maior produção e exsudação de citrato pelas raízes, o que permitiu disponibilizar mais P no solo. Pode-se destacar que a inoculação com o fungo micorrízico tendeu a reduzir o crescimento em altura, principalmente para T-1-90, onde há maior disponibilidade P em função dos 90 mg dm⁻³ de P aplicados e da atuação das plantas transformadas geneticamente para aumentar a eficiência de aquisição deste nutriente. Mello (2006) observou que quanto maior a dose de P menor foi a altura das plantas de eucalipto, independentemente da taxa de colonização das micorrizas.

3.3. Eficiência nutricional

O conteúdo de P na raiz (CPR) não apresentou diferença significativa entre os tratamentos e, de forma geral, o teor de P na parte aérea (TPPA), teor de P na raiz (TPR), conteúdo de P na parte aérea (CPPA) e eficiência de absorção de P (EAP) foram superiores nas plantas cultivadas com a dosagem de 90 mg dm⁻³ de P no solo (Quadro 3). No entanto, não houve efeito do material genético e da inoculação com o fungo ectomicorrízico. A maior presença de P em função do aumento da disponibilidade deste nutriente no solo é relatada por vários autores como Mello et al. (1970), Valeri et al. (1985), Ribeiro (1999) e Paula et al. (2003).

O solo contendo adubação de 45 mg dm⁻³ de P apresentou as maiores eficiências de utilização para P (EUP), sendo os tratamentos sem inoculação (NT-0-45 e T-0-45) os mais eficientes. O fato de os materiais não inoculados com micorriza serem mais eficientes, sobretudo no menor nível de P, pode ser atribuído à menor absorção de P pelas plantas sem associações micorrízicas. As micorrizas são reconhecidas por sua habilidade em estimular o crescimento de plantas, principalmente por meio do incremento na absorção de nutrientes, P em especial (BERBARA et al. 2006).

QUADRO 3 – Médias do teor de P na parte aérea (TPPA), teor de P na raiz (TPR), conteúdo de P na parte aérea (CPPA), conteúdo de P na raiz (CPR), eficiência de absorção de P (EAP) e eficiência de utilização de P (EUP), obtidas aos 150 dias de idade em plantas de plantas de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* (T: transformado e NT: não transformado) tratadas com micorrizas (0: sem inoculação e 1: com inoculação) e cultivadas em Latossolo Amarelo com dois níveis de fósforo (45: 45 mg dm⁻³ de P e 90: 90 mg dm⁻³ de P)

Tratamento	TPPA ----- g kg ⁻¹ -----	TPR -----	CPPA ----- mg/planta ----	CPR ----	EAP mg g ⁻¹	EUP g ² mg ⁻¹
T-0-45	0,493 c	0,333 bc	33,6 c	20,4	0,886 bc	312,1 ab
T-1-45	0,539 bc	0,407 ab	35,8 c	21,2	1,099 abc	252,1 bc
NT-0-45	0,487 c	0,298 c	37,5 bc	21,0	0,830 c	373,6 a
NT-1-45	0,592 abc	0,417 ab	43,0 bc	24,1	1,165 abc	258,7 bc
T-0-90	0,808 a	0,438 ab	61,6 a	27,0	1,452 a	215,2 bc
T-1-90	0,811 a	0,482 a	54,0 ab	27,2	1,442 a	187,9 c
NT-0-90	0,758 ab	0,444 a	53,3 ab	27,8	1,321 ab	227,5 bc
NT-1-90	0,690 abc	0,406 abc	48,5 abc	25,9	1,179 abc	246,3 bc

Em que: Médias seguidas de mesma letra não diferem pelo teste de Tukey a 5 % de significância.

Os teores dos nutrientes na parte aérea e no sistema radicular das plantas avaliadas (Quadro 4) não apresentaram diferenças significativas, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), com exceção do teor de boro na parte aérea e do teor de nitrogênio presente no sistema radicular. A diferença no teor de B foi verificada entre os tratamentos NT-1-45 e T-0-45, o que pode ser decorrente do efeito de diluição, proporcionado pelo maior incremento em altura de T-0-45, como constatado na Figura 1, observa-se que T-1-90 também evidenciou a mesma tendência, porém em menor magnitude. Quanto ao teor de N no sistema radicular, pode-se perceber o efeito da inoculação com fungo micorrízico, pois os tratamentos inoculados apresentam os maiores teores de N, independentemente do material genético e do nível de fósforo analisado. De acordo com Zambolim (1990), uma das mais importantes propriedades das micorrizas em essências florestais é a sua capacidade de ampliar a absorção de certos nutrientes no solo.

Os resultados observados para os indicadores microbiológicos e bioquímicos avaliados, os quais apresentaram tendência semelhante entre o material genético transformado e não transformado inoculado com ectomicorrizas, mostram um baixo risco do cultivo deste material transformado para a microbiota do solo, o que é altamente desejável para se adequar às exigências de biossegurança dos organismos transgênicos.

Além disso, os materiais transformados propiciaram importante incremento em altura nas etapas iniciais de plantio, o que pode trazer benefícios na fase de implantação da floresta, por meio do rápido estabelecimento e desenvolvimento das plantas no campo.

QUADRO 4 – Médias dos nutrientes presentes na parte aérea e no sistema radicular de plantas de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* (T: transformado e NT: não transformado) tratadas com micorrizas (0: sem inoculação e 1: com inoculação) e cultivadas em Latossolo Amarelo com dois níveis de fósforo (45: 45 mg dm⁻³ de P e 90: 90 mg dm⁻³ de P), aos 150 dias de idade

Tratamento	g kg ⁻¹					mg kg ⁻¹					
	N	K	S	Ca	Mg	Zn	Fe	Mn	Cu	B	
Parte aérea	T-0-45	8,31 a	4,69 a	7,30 a	2,00 a	0,30 a	10,1 a	172,1 a	86,88 a	0,80 a	19,55 b
	T-1-45	8,46 a	5,55 a	7,70 a	2,32 a	0,30 a	9,85 a	129,7 a	95,65 a	0,95 a	26,35 ab
	NT-0-45	7,85 a	4,35 a	7,12 a	2,06 a	0,34 a	10,85 a	197,4 a	103,95 a	0,78 a	22,75 ab
	NT-1-45	7,92 a	4,76 a	7,59 a	2,19 a	0,30 a	8,93 a	157,1 a	99,75 a	1,10 a	27,88 a
	T-0-90	7,38 a	4,99 a	7,53 a	2,16 a	0,31 a	10,35 a	162,6 a	97,83 a	0,75 a	20,68 ab
	T-1-90	8,15 a	5,14 a	8,14 a	2,41 a	0,31 a	9,18 a	152,8 a	91,73 a	1,13 a	25,73 ab
	NT-0-90	8,15 a	4,80 a	7,72 a	2,07 a	0,30 a	10,2 a	188,1 a	98,95 a	1,05 a	24,88 ab
	NT-1-90	7,77 a	4,99 a	7,45 a	2,24 a	0,31 a	8,43 a	177,1 a	95,53 a	0,68 a	24,50 ab
Sistema radicular	T-0-45	3,79 bc	3,53 a	4,71 a	0,76 a	0,38 a	9,58 a	1611,4 a	13,28 a	2,13 a	-
	T-1-45	4,21 ab	3,94 a	5,44 a	0,79 a	0,40 a	12,58 a	1626,6 a	18,03 a	5,15 a	-
	NT-0-45	3,55 c	3,34 a	3,78 a	0,59 a	0,43 a	11,65 a	1562,8 a	13,18 a	2,93 a	-
	NT-1-45	4,44 ab	3,75 a	6,27 a	0,90 a	0,48 a	9,85 a	1894,8 a	14,60 a	4,50 a	-
	T-0-90	3,48 c	3,11 a	4,35 a	0,85 a	0,53 a	13,78 a	1637,5 a	16,90 a	11,3 a	-
	T-1-90	4,02 abc	3,86 a	5,07 a	0,65 a	0,41 a	11,15 a	2035,3 a	16,58 a	4,30 a	-
	NT-0-90	3,79 bc	3,86 a	4,93 a	0,75 a	0,36 a	10,10 a	1259,8 a	14,88 a	1,50 a	-
	NT-1-90	4,33 ab	3,34 a	4,80 a	0,65 a	0,49 a	10,63 a	2171,2 a	16,13 a	3,63 a	-

Em que: Médias seguidas de mesma letra não diferem pelo teste de Tukey a 5 % de significância.

4. CONCLUSÕES

De modo geral, a transformação genética e a inoculação com fungo ectomicorrízico não alteraram a eficiência nutricional e o crescimento final das plantas de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*. Além disto, o material genético transformado não promoveu grandes alterações nos indicadores biológicos da qualidade do solo, não demonstrando evidências de risco à biossegurança em relação a processos microbiológicos do solo.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON, J. P. E.; DOMSCH, K. H. Determination of ecophysiological maintenance carbon requirements of soil microorganisms in a dormant state. **Biology and Fertility of Soil**, v. 1, p. 81-89, 1985.
- ANDERSON, J. P. E.; DOMSCH, K. H. The metabolic quotient for CO₂ (qCO₂) as a specific activity parameter to assess the effects of environmental conditions, such as pH, on the microbial biomass of forest soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 25, p. 393-395, 1993.
- ARAÚJO, A. P.; MACHADO, C. T. T. Fósforo. In: FERNANDES, M. S. (Ed.). **Nutrição mineral de plantas**. Viçosa, MG: SBCS, 2006. p. 253-280.
- ASSIS, T. F.; MAFIA, R. G. Hibridação e clonagem. In: BORÉM, A. (Ed.). **Biotecnologia florestal**. Viçosa, MG, Suprema Gráfica e Editora, 2007. p.93-121.
- BERBARA, R. L. L.; SOUZA, F. A.; FONSECA, H. M. A. C. Fungos micorrízicos arbusculares: muito além da nutrição. In: FERNANDES, M. S. (Ed.). **Nutrição mineral de plantas**. Viçosa, MG: SBCS, 2006. p. 53-88.
- BORÉM, A. Biossegurança florestal. In: BORÉM, A. (Ed.). **Biotecnologia florestal**. Viçosa, MG: Suprema Gráfica e Editora, 2007. p.335-346.
- BRADY, N. C.; WEIL, R. R. **The nature and properties of soil**. 11.ed. New Jersey: Prentice hall, 1996. 740p.
- CARNEIRO, J. G. A. **Produção e controle de qualidade de mudas florestais**. Curitiba: UFPR/FUPEF, 1995. 451p.
- D'AVILA, F. S. **Efeito do fósforo, nitrogênio e potássio na produção de mudas clonais de eucalipto**. 2008, 53f.. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.
- DELHAIZE, E.; HEBB, D. M.; RYAN, P. R. Expression of a *Pseudomonas aeruginosa* citrate synthase gene in tobacco is not associated with either enhanced citrate accumulation or efflux. **Plant Physiology**, v. 125, n. 4, p. 2059-2067, 2001.
- DINKELAKER, B.; HENGELER, B.; MARSHNER, H.; Distribution and function of proteoid roots and other root clusters. **Botany Acta**. v. 108, p. 183-200, 1995.
- EIVAZI, F.; TABATABAI, M. A. Glucosidade and galactosidades in soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v.20, p. 601-606, 1988.
- FURTINI NETO, A. E. **Eficiência nutricional, cinética de absorção e frações fosfatadas em *Eucalyptus***. 1994, 99f.. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

FURTINI NETO, A. E.; BARROS, N. F.; GODOY, M. F.; NOVAIS, R. F. Eficiência nutricional de mudas de *Eucalyptus* em relação a fósforo. **Revista Árvore**, v. 20, n. 1, p. 17-28, 1996.

GONÇALVES, J. L. M.; BARROS, F. N.; NEVES, J. C. L.; NOVAIS, R. F. Níveis críticos de fósforo no solo e na parte aérea de eucalipto na presença e ausência da calagem. **Revista Árvore**, v. 10, n.1, p. 91-104, 1986.

GONÇALVES, M. R.; PASSOS, C. A. M. Crescimento de cinco espécies de eucalipto submetidas a déficit hídrico em dois níveis de fósforo. **Ciência Florestal**, v. 10, n. 2, p. 145-161, 2000.

HART, S. C.; STARK, J. M.; DAVIDSON, E. A.; FIRESTONE, M. K. Nitrogen mineralization, immobilization and nitrification. In: WEAVER, R. W.; ANGLE, J. S.; BOTTOMLEY, P. S.; BEZDICEK, D.; SMITH, S.; TABATABAI, A.; WOLLUM, A. (Eds.). **Methods of soil analysis**, Part 2. Microbiological and biochemical properties. Madison: Soil Science Society of America, 1994. p. 985-1018.

HARTWING, I.; OLIVEIRA, A. C.; CARVALHO, F. I. F.; BERTAN, I.; SILVA, J. A. G.; SCHIMIDT, D. A. M.; VALÉRIO, I. P.; MAIA, L. C.; FONSECA, D. A. R. F.; REIS, C. E. S. Mecanismos associados à tolerância ao alumínio em plantas. **Semina**, v. 28, n. 2, p. 219-228, 2007.

JOERGENSEN, R. G.; BROOKES, P. C. Ninhydrin-reactive nitrogen measurements of microbial biomass in 0,5M K₂SO₄ soils extracts. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 22, p. 1129-1136, 1990.

KIHARA, T.; WADA, T.; SUZUKI, Y; HARA, T.; KOYAMA, H. Alteration of citrate metabolism in cluster roots of white lupin. **Plant Cell Physiology**, v. 44, n. 9, p. 901-908, 2003 .

KOYAMA, H.; KAWAMURA, A.; KIHARA, T.; HARA, T. TAKITA, E.; SHIBATA, D. Overexpression of mitochondrial citrate synthase in *Arabidopsis thaliana* improved growth on a phosphorus-limited soil. **Plant Cell Physiology**, v. 41, n. 9, p. 1030-1037, 2000.

LÓPEZ-BUCIO, J.; MARTINEZ DE LA VEJA, O.; GUEVARA-GARCIA, A.; HERRERA-ESTRELLA, L. Enhanced phosphorus uptake in transgenic tobacco plants overproduce citrate. **Nature Biotechnology**, v. 18, p. 450-453, 2000.

MELLO, A. H. **Ocorrência, caracterização e eficiência de fungos micorrízicos em *Eucalyptus grandis* e *Acacia mearnsii***. 2006. 236 f.. Tese (Doutorado em ciência do Solo – Biodinâmica e Manejo do Solo) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS.

MELLO, H. A.; MASCARENHAS, J.; SIMÕES, J. W.; COUTO, H. T. Z. Resultados da aplicação de fertilizantes minerais na produção de madeira de *Eucalyptus saligna* Sm em solos de cerrado do estado de São Paulo. **IPEF**, v. 1, p. 7-28, 1970.

MIYASAKA, S. C.; BUTA, J. G.; HOWELL, R. K.; FOY, C. D. Mechanism of aluminum tolerance in snapbeans: root exudation of citric acid. **Plant Physiology**, v. 96, p. 737-743, 1991.

NEVES, J. C. L. **Aspectos nutricionais em mudas de *Eucalyptus* spp – tolerância ao alumínio e níveis críticos de fósforo no solo.** 1983, 87f.. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

PAULA, R. C.; PAULA, N. F.; VALERI, S. V.; CRUZ, M. C. P.; TOLFO, A. L. T. Controle genético da eficiência de utilização de fósforo em famílias de meios-irmãos de *Eucalyptus grandis*, em casa de vegetação. **Revista Árvore**, v. 27, n. 1, p. 25-34, 2003.

REGAZZI, A. J. Identity test for regression models and equality of parameters in orthogonal polynomial models. **Biometric Bulletin**, v. 9, n. 2, p. 6-22, 1992.

RIBEIRO, M. A. V. **Resposta da soja e do eucalipto a fósforo em solos de diferentes texturas, níveis de densidade e de umidade.** 1999. 71f.. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

SAKAMOTO, K.; OBO, Y. Effects of fungal to bacterial ratio on the relationship between CO₂ evolution and total soil microbial biomass. **Biology and Fertility of Soil**, v. 17, p. 39-44, 1994.

SIDDIQI, M. Y.; GLASS, A. D. M. Utilization index: a modified approach to the estimation and comparison of nutrient utilization efficiency in plants. **Journal Plant Nutrition**, v. 4, p. 289-302, 1981.

SUZUKI, Y.; KAWAZU, T.; KONDO, K.; TSUYAMA, M.; WADA, T.; HARA, T.; KOYAMA, H. Characteristics of transgenic *Eucalyptus* hybrids with an overexpression of plant mitochondrial citrate synthase. **Nippon Shokubutsu Seiri Gakkai Nenkai oyobi Shinpojiumo Koen Yoshishu**, v. 45, p. 107, 2003.

TABATABAI, M. A. Soil enzymes. In: WEAVER, R. W.; ANGLE, J. S.; BOTTOMLEY, P. S.; BEZDICEK, D.; SMITH, S.; TABATABAI, A.; WOLLUM, A. (Eds.). **Methods of soil analysis**, Part 2. Microbiological and biochemical properties. Madison: Soil Science Society of America, 1994. p. 775-833.

TAKITA, E.; KOYAMA, H.; SHIRANO, Y.; SHIBATA, D.; HARA, T. Publicação da sequência e caracterização do gene que codifica a enzima citrato sintase. **Soil Science Plant Nutrition**, v. 45, p. 197-205, 1999.

TÓTOLA, M. R.; CHAER, G. M. Microrganismos e processos microbiológicos como indicadores da qualidade dos solos. In: VENEGAS, V. H. A.; SCHAEFER, C. E. G. R.; BARROS, N. F.; MELLO, J. W. V.; COSTA, L. M. (Eds.). **Tópicos em ciência do solo**, v.II (2002) – Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do solo, 2002. p. 195-276.

VALERI, S. V.; AGUIAR, I. B.; CORRADINI, L.; SOUZA, E. C. A.; BANZATTO, D. A. Efeito do fósforo e cálcio no desenvolvimento e na composição química foliar de *Eucalyptus grandis* Hill ex maiden em casa de vegetação. **IPEF**, n. 29, p. 47-54. 1985.

VANCE, E. D.; BROOKES, P. C. & JENKINSON, D. S. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 19, p. 703-707, 1987.

XAVIER, A.; WENDLING, I.; SILVA, R. L. **Silvicultura clonal: princípios e técnicas**. Viçosa, MG: UFV, 2009. 272p.

ZAMBOLIM, L. Fungos micorrízicos de eucalipto In: BARROS, N. F. (Ed.). **Relação solo-eucalipto**. Viçosa, MG: Folha de Viçosa, 1990. p. 303-322.

3. CONCLUSÕES GERAIS

De acordo com os resultados obtidos e nas condições em que foi realizado o presente trabalho, pode-se concluir que:

- A transformação genética nas plantas de um clone *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* influenciou a propagação vegetativa das miniestacas, prejudicando o enraizamento e beneficiando o crescimento vegetativos das mudas;
- A transformação genética para superprodução e exsudação de citrato pelas raízes do clone de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* não aumentou a eficiência nutricional das plantas transgênicas, inclusive para fósforo;
- A introdução do gene para a superexpressão da citrato sintase (CS) proporcionou maior crescimento inicial das plantas transformadas geneticamente, principalmente, quando cultivadas em solo com baixa disponibilidade de fósforo e na ausência de calagem; e
- As plantas transgênicas inoculadas com fungos micorrízicos não apresentaram grandes alterações na eficiência nutricional, no crescimento final das plantas e nos indicadores biológicos da qualidade do solo, não demonstrando evidências de risco à biossegurança em relação a processos microbiológicos do solo.