



Modelo *in vitro* de perda de capacidade rizogênica em *Eucalyptus globulus* e expressão associada de genes relacionados à auxina.

Lucas Cafferati Beltrame¹ e Arthur Fett-Neto²

¹ Aluno do curso de Biotecnologia- UFRGS, bolsista PIBIC

² Professor Titular, Centro de Biotecnologia e Depto. de Botânica – UFRGS, CP 15005, Porto Alegre, RS, 91501-970.

INTRODUÇÃO

O gênero *Eucalyptus* sp. é originário da Austrália e é um dos mais plantados no mundo atualmente. *Eucalyptus globulus* possui enraizamento recalcitrante e difícil propagação, porém tem características interessantes à indústria, como o baixo teor de lignina. Sabe-se que o transporte, biossíntese, percepção e homeostase de auxinas são relevantes para o enraizamento adventício em estacas, embora exista carência de informações sobre os perfis de expressão gênica associados a estes aspectos fitormonais (Da Costa et al., 2013). O objetivo deste estudo foi contribuir para o conhecimento do perfil de expressão gênica associado à perda de capacidade rizogênica em *E. globulus*, com vistas a obter ferramentas que futuramente permitam reverter este processo.

MATERIAIS E MÉTODOS

Plântulas de *E. globulus* foram obtidas de sementes e cultivadas *in vitro* por 30, 45, 60, 75 e 105 dias. Após estes diferentes tempos de cultivo, microestacas apicais com cerca de 3 cm foram obtidas das plântulas e avaliadas quanto à porcentagem de enraizamento e número de raízes por estaca. Verificou-se que ocorreu perda significativa da capacidade de enraizamento adventício nas estacas oriundas de plântulas de 60 dias ou mais. Sendo assim, após 45, 75 e 105 dias de cultivo das plântulas, microestacas apicais foram obtidas e seu RNA extraído com o kit Nucleospin (Macherey-Nagel). A concentração total de RNA foi obtida espectrofotometricamente (Nanodrop).

A síntese da primeira fita de cDNA foi feita com 1 micrograma de RNA total, primers Oligo-DT e transcriptase reversa M-MLV (Invitrogen) em um volume final de 20 microlitros. Após síntese de cDNA, primers complementares para os genes de biossíntese de auxina (*TAA1*), receptor de auxina (*TIR1*) e transportador de efluxo de auxina (*PIN1*), obtidos com base nos dados genômicos e transcritômicos da data base Phytozome, foram usados para amplificar sequências correspondentes a estes genes em sistema de PCR quantitativo em tempo real (StepOne, Applied Biosystems) (De Almeida et al., 2015). Genes normalizadores de H2B (Histona) e Actina foram usados com base em estudos anteriores nas mesmas condições (De Almeida et al., 2010). As reações foram incubadas por 5 min a 95 graus centígrados para ativação da Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen) e 40 ciclos de 95 graus por 15s, 60 graus por 10s, 72 graus por 15s, usando SYBR Green dye. A especificidade da PCR foi avaliada por uma curva de melting (60-90 graus). Primers foram desenhados com o programa Primer 3. Os dados foram analisados pelo método do Ct comparativo. Os experimentos foram conduzidos em triplicatas biológicas e os dados de expressão obtidos foram analisados por ANOVA, seguida de teste de Duncan ($P \leq 0.05$).

CONCLUSÃO

Com base nos resultados parciais obtidos até o presente, a perda de capacidade rizogênica em *E. globulus* no modelo *in vitro* parece estar relacionada à redução na expressão do receptor de auxina *TIR1*, possivelmente causando menor capacidade das estacas de responder à auxina.

O aumento da expressão do transportador de auxina *PIN1* com o passar do tempo pode estar ligado ao maior tamanho da plântula e maior demanda de transporte de auxina, aparentemente não relacionado diretamente ao enraizamento de estacas, pois a expressão do gene de biossíntese *TAA1* permanece muito baixa e estável nos períodos analisados.

A avaliação de expressão de outros genes poderá revelar um cenário mais completo sobre a perda da rizogênese em *E. globulus*.

Apoio: CNPq, Fapergs e PROPESQ-UFRGS

RESULTADOS

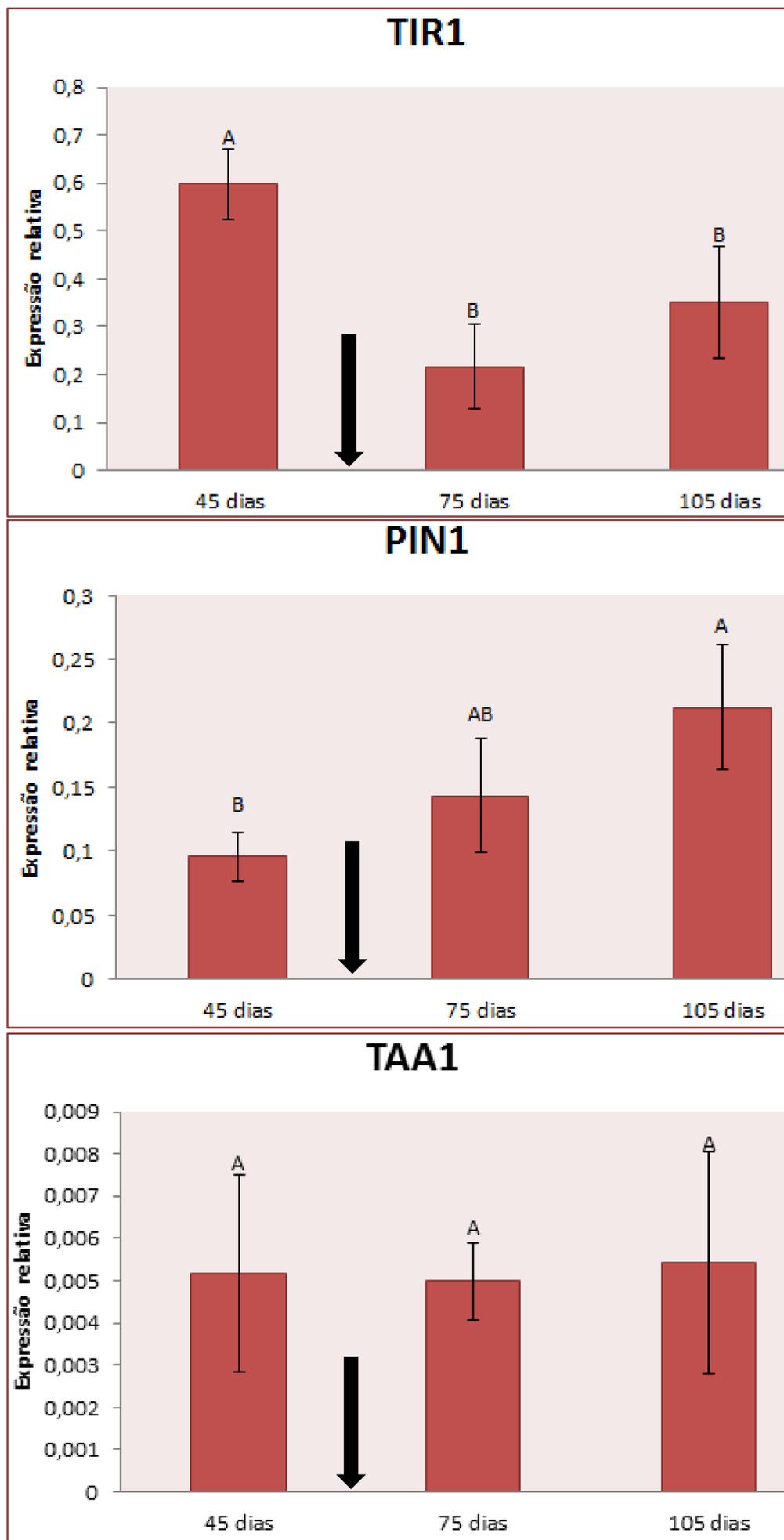


Figura 1: Gráficos referentes à expressão relativa dos genes TIR1, PIN1 e TAA1 aos 45, 75 e 105 dias após a extração de RNA. As barras verticais indicam o desvio padrão encontrado considerando as três replicatas biológicas de cada dia de coleta. Barras compartilhando uma ou mais letras não são diferentes entre si (ANOVA e Duncan, $P = 0.05$). A seta indica a perda da capacidade rizogênica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- DE ALMEIDA MR et al. Comparative transcriptional analysis provides new insights into the molecular basis of adventitious rooting recalcitrance in *Eucalyptus*. *Plant Science* 239: 155-165, 2015.
- DA COSTA CT et al. When stress and development go hand in hand: main hormonal controls of adventitious rooting in cuttings. *Frontiers in Plant Science* 4, article 133-19, 2013.
- DE ALMEIDA MR et al. Reference gene selection for quantitative reverse transcription polymerase-chain reaction normalization during *in vitro* adventitious rooting in *Eucalyptus globulus*. *BMC Molecular Biology* 11, p. 73, 2010.