

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E  
MOLECULAR

**Bases moleculares da perda de capacidade  
rizogênica em *Eucalyptus globulus* Labill.**

Márcio Luis Aumond Júnior

Orientador: Prof. Dr. Arthur Germano Fett-Neto

Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós- Graduação em Biologia  
Celular e Molecular como  
requisito parcial para obtenção  
do título de Mestre em Ciências.

Porto Alegre

2017

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente meus pais e irmão, por terem me apoiado durante toda a minha formação, sempre me incentivando e me passando boas energias durante todos os momentos que necessitei.

Agradeço Gabi, que sempre esteve ao meu lado me dando forças, carinho, me incentivando independente do desafio. Sem ti, tudo teria sido mais difícil, TE AMO.

Gostaria de agradecer especialmente a todos os colegas do laboratório de Fisiologia Vegetal, sem vocês seria difícil terminar este trabalho. Muito obrigado Fernanda pela ajuda com as auxinas, Márcia por toda a ajuda inicial neste projeto, Camila pelas inúmeras assistências com o a estatística, Artur pela mão com o qPCR, Hélio pela maior paciência da cidade, e aos demais colegas por fazerem os dias mais divertidos e estarem sempre dispostos a ajudar. Muito obrigado.

Agradeço também ao professor Arthur por ter aceitado me orientar. Obrigado por me ensinar como fazer ciência de ponta e estar sempre disponível para as minhas dúvidas, sem dúvida este projeto só foi realizado com sucesso graças a tua mente brilhante.

Ao Marcos e ao Fernando, os irmãos que Alicante me deu.

Muito obrigado Prof. Giancarlo e Profa. Janette por auxiliarem o trabalho com as ideias dadas durante o encontro do PPG.

Silvia e Luciano, obrigado por sempre estarem de bom humor, auxiliando em todas as questões que precisei.

Obrigado aos órgãos de fomento à pesquisa por viabilizarem tanto minha bolsa, quanto a logística necessária para os experimentos e a Celulose Rio-Grandense pelas sementes que utilizei em meus ensaios.

## Índice

<b>RESUMO</b> .....	5
<b>ABSTRACT</b> .....	6
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	7
Indústria de árvores plantadas.....	7
Propagação vegetativa- Enraizamento adventício.....	7
<i>Eucalyptus globulus</i> , uma espécie “padrão ouro” para a indústria de celulose.....	8
Raízes adventícias.....	10
Carboidratos.....	12
Flavonoides.....	13
Peroxidasas.....	13
Auxina e genes relacionados.....	14
Envelhecimento e o enraizamento adventício.....	18
<b>OBJETIVOS</b> .....	19
<b>Molecular aspects of adventitious rooting capacity loss in seedlings of <i>Eucalyptus globulus</i> Labill.</b> .....	20
ABSTRACT.....	20
INTRODUCTION.....	21
MATERIALS AND METHODS.....	23
RESULTS .....	28
DISCUSSION.....	33

CONCLUSION.....	36
CONTRIBUTION.....	37
ACKNOWLEDGMENTS.....	38
REFERENCES.....	38
SUPPLEMENTARY TABLE.....	43
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS.....</b>	<b>44</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>45</b>

## RESUMO

Os plantios florestais têm contribuído significativamente para o avanço da economia. A indústria de papel e celulose destaca-se na prática desta atividade. Para a produção de plantas-elite, a principal técnica empregada pela indústria é a propagação vegetativa por miniestaquia, processo que é dependente do desenvolvimento adequado de raízes adventícias. Esta técnica está baseada na seleção de fenótipos de interesse, a partir dos quais são produzidas minimatrizes (minicepas). Estas matrizes são mantidas em casa de vegetação e delas são retiradas miniestacas que originam novas plantas. A vantagem em utilizar este modo de produção está relacionada ao ambiente controlado que pode ser manipulado, aumentando o vigor das minicepas e, por conseguinte, a probabilidade de enraizamento de miniestacas. Entretanto, algumas plantas de interesse comercial, como *Eucalyptus globulus* vários de seus híbridos, são recalitrantes na emissão de raízes adventícias, dificultando a propagação vegetativa e podendo inviabilizar a mesma. A emissão de raízes adventícias é afetada por diversos fatores, incluindo a idade da planta matriz. O envelhecimento afeta negativamente a capacidade rizogênica. *E. globulus* perde de forma rápida a capacidade enraizamento adventício de microestacas (miniestacas cultivadas *in vitro*) com o envelhecimento da microcepa (minicepa cultivada *in vitro*). Existem alguns parâmetros fisiológicos que mudam conforme a idade da planta e podem afetar o enraizamento. As principais mudanças parecem estar associadas ao metabolismo e ação de auxinas e sua interação com o metabolismo de carboidratos. Visando melhor compreender a base da perda de competência rizogênica em *E. globulus*, foi determinado o tempo necessário para o declínio significativo da capacidade de enraizamento adventício na ausência de auxina exógena em microestacas oriundas de microcepas de diferentes idades após semeadura. A seguir, amostras de porções apicais de microcepas foram obtidas logo antes (mais jovens; entre 30 e 45 dias) e logo após (mais velhas; entre 60 e 75 dias) a perda de competência rizogênica de microestacas delas derivadas. Nestas amostras foram analisadas a concentração de flavonoides, proteínas, carboidratos solúveis, amido e auxina endógena (ácido indol acético), atividade de peroxidases e padrão de expressão de genes relacionados ao metabolismo de carboidratos e auxinas, bem como à ação destes e alguns outros fitormônios. Não foram observadas mudanças significativas nas concentrações de carboidratos, flavonoides e proteínas solúveis antes e após a perda de capacidade rizogênica. Entretanto, houve um aumento na atividade de peroxidases, enzimas capazes de degradar auxinas, bem como uma redução na concentração de auxina em plantas mais velhas, o que se pode associar à perda de competência rizogênica. De modo coerente com estas variações, o gene relacionado à biossíntese de auxina *TAA1* foi menos expresso em plantas mais velhas. O gene do receptor de auxina *TIR1* também apresentou menor expressão em plantas mais velhas, sugerindo perda da sensibilidade à auxina. Por sua vez, genes relacionados à repressão de resposta ao fitormônio (*TPL*, *IAA12*) ou de resposta a citocininas, fitormônios antagonistas à auxina na rizogênese, (*ARR1*) foram mais expressos nas plantas mais velhas. Em conjunto, estes dados sugerem que a idade afeta negativamente o enraizamento principalmente em função da diminuição de auxina endógena, (causada por menor biossíntese e, possivelmente, maior catabolismo), menor sensibilidade à auxina, maior expressão de genes inibidores da ação de auxina, e de genes relacionados à ação de citocininas. Estes dados podem contribuir para o desenvolvimento de estratégias que visem prolongar a competência rizogênica de genótipos de *E. globulus* de interesse industrial.

Palavras chave: Enraizamento adventício, *Eucalyptus*, juvenilidade, auxina, peroxidases, expressão gênica

## ABSTRACT

Planted forests have played a significant role in economic progress. The paper and cellulose industry is a major user of tree plantations. In order to obtain elite plants, the main strategy applied is vegetative propagation by minicutting, which is dependent on adequate adventitious root development. This technique is based on the selection of phenotypes of interest and on the production of ministumps, which are maintained in greenhouses to provide minicuttings for generating new identical plants. The controlled environment and its manipulation increase the vigor of ministumps and the probability of minicutting rooting. However, some species of commercial interest, such as *Eucalyptus globules* and several of its hybrids, are recalcitrant to developing adventitious roots, impairing vegetative propagation. The development of adventitious roots is affected by a number of factors, including the age of the cutting donor plant. Aging negatively affects rooting capacity. *E. globulus* quickly loses rooting capacity of microcuttings (*in vitro* cultivated minicutting) as the microstump (*in vitro* cultivated ministump) ages. Several physiological parameters change as the plant ages and may impact on rooting. The main differences seem to be associated with auxin metabolism and action and their interaction with carbohydrate metabolism. To better understand the bases of rooting competence loss in *E. globulus*, the time required for a significant decline in rhizogenic ability without exogenous auxin was determined in microcuttings derived from microstumps of different ages after sowing. Next, tip cuttings of microstumps were severed just before (younger, aged between 30 and 45 days) and right after (older, aged between 60 and 75 days) the loss of rooting competence of microcuttings derived from the microstumps. These samples were analyzed for the concentrations of flavonoids, proteins, soluble carbohydrates, starch, endogenous auxin (indole-3-acetic acid), peroxidase activity, and pattern of gene expression of genes involved in carbohydrate and auxin metabolism, as well as with action of these and other phytohormones. There were no significant changes in the concentration of carbohydrates, flavonoids, or proteins before and after the loss of rooting capacity. However, an increase in peroxidase activity, enzyme capable of auxin degradation, was observed. Auxins, on the other hand, had decreased content in older plants, what could be associated with loss of rooting competence. In agreement with these changes, the auxin biosynthesis gene *TAA1* was less expressed in older plants. The auxin receptor gene *TIR1* also had lower expression in older plants, suggesting reduced auxin sensitivity. On the other hand, genes associated with auxin response repression (*TPL*, *IAA12*) or with the action of cytokinins, auxin antagonist phytohormones in rhizogenesis (*ARR1*), were more expressed in older plants. Taken together, data suggest that age negatively affects rooting mainly as a function of decreasing endogenous auxin concentration (caused by less biosynthesis and higher degradation), lower auxin perception, higher expression of genes inhibiting auxin action, as well as of genes related to the action of cytokinins. These data may contribute to the development of strategies to extend rhizogenic competence in *E. globulus* genotypes of industrial interest.

Key words: Adventitious rooting, *Eucalyptus*, juvenility, auxin, peroxidases, gene expression

## **Introdução.**

### **A indústria de árvores plantadas**

A indústria de árvores plantadas tem grande importância para a economia brasileira. Em 2015, o PIB (produto interno bruto) do setor alcançou R\$ 69,1 bilhões, 3% a mais do que 2014, representando 1,2% do PIB geral brasileiro e 6% do PIB industrial. Este resultado destaca esta indústria em relação a setores importantes para o país no mesmo período, como é o caso da agropecuária, com crescimento de 1,8% e a indústria de um modo geral com retração de 6,2%. Foram plantados em 2015 no Brasil 7,8 milhões de hectares, sendo 34% pertencentes à indústria de celulose e papel. Cinco milhões e meio de hectares foram ocupados por eucalipto, destacando-se o estado de Minas Gerais (24%) e São Paulo (17%) (<http://iba.org/en/>, Indústria Brasileira de Árvores, acesso em dezembro de 2016).

### **Propagação vegetativa- enraizamento adventício**

Para preservação e multiplicação de genótipos desejáveis, a propagação clonal é uma ferramenta útil (Guanet al., 2015). Ela pode ser utilizada para aumentar a resistência a pragas, doenças, seca e para melhorar o potencial econômico das espécies de plantas. O enraizamento adventício (EA) é um passo-chave neste processo (De Klerk et al., 1999) e para produzir mudas de alta qualidade e uniformidade, tanto para a indústria de árvores plantadas, quanto para setores da horticultura e plantas ornamentais, que também utilizam técnicas de propagação vegetativa. Uma técnica amplamente utilizada pela indústria de árvores plantadas

para a produção de mudas é o minijardim clonal. Nos minijardins são mantidas matrizes (também chamadas plantas-mãe ou minicepas) que fornecem miniestacas para a produção de novas plantas. A vantagem desta técnica é que o ambiente em que são mantidas as matrizes pode ser controlado e manipulado, deixando as mesmas melhor nutridas e vigorosas, o que aumenta a chance de enraizamento das estacas. A desvantagem é que diversas espécies fornecem estacas hábeis ao enraizamento por um curto período de tempo, o que inviabiliza a técnica para alguns genótipos de interesse comercial (Schwambachet al., 2008; Da Costa et al., 2013).

Diferentes genótipos apresentam diferentes capacidades de se reproduzirem vegetativamente, tendo em vista que isto está diretamente relacionado com a habilidade da planta emitir raízes adventícias (RA). Tecidos jovens, pouco ou não lignificados, de espécies lenhosas ou tecidos de espécies herbáceas anuais são mais propensos à emissão deste tipo de raízes se comparados a tecidos mais velhos de espécies lenhosas. Os motivos para a recalcitrância, contudo, permanecem pouco compreendidos (Guanet al., 2015).

### ***Eucalyptus globulus*, uma espécie “padrão ouro” para a indústria de celulose**

Atualmente, a espécie lenhosa *Eucalyptus globulus* é considerada pela indústria do papel e celulose como uma das que apresenta o melhor fenótipo para a produção da polpa de celulose. A alta qualidade deste fenótipo é explicada principalmente pela composição de sua madeira, tida como padrão ouro pela indústria do papel. As características que destacam esta espécie das demais atualmente



utilizadas pelas indústrias do setor são sua baixa quantidade de lignina e lipídeos formadores de “PITCH” (subproduto coloidal viscoso), além de uma alta razão de resíduos fenólicos siringil/guaiacil (S/G) na lignina (Rencoret et al., 2007; Neiva et al., 2014).

Para que a madeira seja transformada em pasta de celulose, diversos processos são necessários. Um processo importante que define a qualidade da pasta que será produzida é o branqueamento da matéria-prima. Este processo é diretamente afetado pelas características anteriormente citadas da madeira. Quando plantas ricas em determinados tipos de lipídeos passam por esse processo, essas moléculas se depositam no maquinário formando “PITCH”. Assim, são necessárias diversas lavagens com solventes tóxicos, aumentando o custo de manutenção do equipamento, diminuindo a qualidade do produto e, com isso, afetando o valor final da pasta de celulose ou papel (Cruz et al., 2006). Assim como os lipídeos, a razão S/G afeta o processo de branqueamento. Uma etapa importante deste processo é a separação da lignina e da celulose. Siringil é um tipo de lignina que apresenta uma estrutura química mais reativa e por isso é mais fácil remoção por interagir melhor com químicos usados no processo. Já guaiacil é um tipo de molécula de lignina que apresenta estrutura muito mais inerte, dificultando sua separação da celulose e aumentando os custos de produção da pasta de celulose. Assim, quanto maior a razão S/G, mais fácil será a separação da lignina da celulose e melhor será a qualidade do produto final (Barbosa et al., 2008).

Neiva et al.(2014) descreve diversas características relacionadas com a produção de polpa de celulose em que a espécie destaca-se frente outras 11 espécies do gênero. Dentre estas características estão a composição química da madeira, a facilidade no processo de cozimento, a morfologia das fibras e a qualidade do produto final. Já Rencoret et al., (2007) classifica a espécie *E. globulus* como tendo a menor quantidade de lignina e a maior razão S/G dentre as espécies de *Eucalyptus* presentes em seu estudo, características que auxiliam a utilização da madeira pela indústria. Apesar de espécie apresentar ótimas características para produção de papel e celulose, ela também é classificada como recalcitrante ao enraizamento, apresentando resultados piores em análise morfológica de enraizamento quando comparada à *E. grandis*, outra espécie utilizada pela indústria (De Almeida et al., 2015). Este fato dificulta a propagação vegetativa da espécie, prejudicando a utilização de genótipos puros de *E. globulus*, sendo na maioria dos casos somente possível a utilização de híbridos, também em função de climas pouco adequados para seu crescimento como espécie pura, como é o caso de regiões subtropicais.

### **Raízes adventícias**

Raízes adventícias são raízes originadas de caules, folhas ou tecidos não-pericíclicos de raízes mais antigas. As células que originam raízes adventícias geralmente precisam ter sua nova identidade determinada para começar o processo de desenvolvimento (Druege et al., 2016). O enraizamento adventício (EA) é dividido em três etapas, tendo cada uma delas necessidades e características únicas. A fase de

indução caracteriza-se por mudanças bioquímicas e moleculares iniciais que propiciarão a formação de raízes adventícias. Dentre estas mudanças destacam-se o aumento da quantidade de auxina, bem como uma baixa atividade de peroxidases (EC 1.11.1.7), que podem levar à degradação de auxina em zonas de ferimento. Também é nesta fase que se forma um novo dreno de carboidratos no local do ferimento, importante para a formação do novo órgão. A segunda fase do EA é a fase de iniciação, em que ocorrem as primeiras divisões celulares assim como o desenvolvimento do primórdio radicular. Mudanças bioquímicas e moleculares continuam acontecendo, e a concentração de auxina deve diminuir, pois, caso contrário, o alongamento de raízes será inibido. Nesta fase, a atividade de peroxidases aumenta, o que pode auxiliar na diminuição da concentração de auxina. A última fase do enraizamento adventício é a expressão, em que o primórdio radicular cresce através do caule e rompe a epiderme, além de formar conexões vasculares com o órgão (Da Costa et al., 2013; Guan et al, 2015). Alguns autores, por motivo de simplificação, unem a fase de iniciação e de expressão. Essa fase é denominada formação (De Almeida et al., 2015).

O enraizamento adventício é um processo afetado por diferentes fatores, entre os quais podem ser citados fitormônios, estado nutricional de estaca e da matriz, bem como condições de estresse. Pode-se ainda destacar que a capacidade de emissão de raízes adventícias das estacas é diretamente influenciada pela idade da matriz, tendo em vista que as quantidades de auxina, carboidratos e compostos fenólicos variam com o envelhecimento da planta-mãe (Da Costa et al., 2013).

A formação de raízes adventícias, bem como divisão e alongamento celular são energeticamente custosos. Plantas durante esses processos necessitam de um aporte maior de carboidratos para o fornecimento de energia (Tombesiet al., 2015). Da Costa et al.(2013) relatam que uma alta concentração dessas moléculas durante a formação de novas raízes adventícias está relacionada à melhora no enraizamento, mesmo na ausência de auxina exógena. Entretanto, existem divergências sobre como mudam as concentrações de carboidratos durante o processo de enraizamento, dependendo da espécie utilizada no estudo.

## **Carboidratos**

Carboidratos armazenados na planta-mãe e passados para a estaca podem ser limitantes para o desenvolvimento de raízes adventícias (Da Costa et al., 2013). Porém, dependendo do estado nutricional e vigor da estaca, é possível que a mesma não precise usar suas reservas durante o enraizamento, utilizando seu aparato fotossintético para suprir necessidades energéticas. Entretanto, nem todas as estacas são capazes de produzir a energia necessária para o enraizamento, dependendo para tanto de suas reservas de carboidratos. Em plantas de avelã (*Corylus avellana* L.) e no jacarandá indiano (*Dalbergia sissoo* Roxb.) foi mostrada queda na concentração de açúcares solúveis durante o enraizamento adventício (Husen, 2008; Tombesiet al., 2015). Já em *Arabidopsis* e petúnia híbrida ocorre o contrário e é observado um aumento na concentração de carboidratos durante a formação das raízes (Ahkamiet al., 2009; Corrêa et al, 2012). Para *E. globulus*, Ruedell et al. (2013) observou que

diferentes qualidades de radiação em sistema autotrófico podem afetar positivamente o enraizamento, por meio do correto balanço interno de açúcares entre a parte aérea e zona basal de enraizamento, onde é importante que estas moléculas ocorram em maior concentração.

## **Flavonoides**

Flavonoides exercem diversas funções em organismos eucariotos devido à ampla distribuição e variedade de estruturas químicas. Por terem propriedades antioxidantes, flavonoides apresentam um grande potencial de ação frente a estresses nas plantas, auxiliando na eliminação de espécies reativas de oxigênio tóxicas (Brunetti et al., 2013). Outra função importante destas moléculas é regular movimento e catabolismo de auxina em uma ação concentração-dependente. Flavonoides afetam movimentos deste fitormônio por meio da interação com proteínas PIN (proteínas de efluxo de auxina), pois modulam sua localização celular (Da Costa et al., 2013). Quanto ao catabolismo, além de eliminar espécies reativas de oxigênio, flavonoides protegem auxina contra a ação de IAA-oxidase, um tipo de peroxidase responsável por degradar auxina (Peer e Murphy, 2007).

## **Peroxidases**

As peroxidases (POX) são uma classe de enzimas responsáveis por diversas funções em plantas. Estudos mostram que POXs desempenham papel na lignificação,

suberização, envelhecimento, degradação de auxinas, ligação entre proteínas estruturais, autodefesa contra patógenos, tolerância ao sal, entre outros estresses (Hiragaet al., 2001; Passardi et al. 2005). Sua atividade na lignificação da parede celular é utilizada como marcador de diferenciação de traqueídeos e elementos de vaso, além da síntese de radical fenoxil a partir de compostos aromáticos (Fukada and Komamine, 1982).

Um estudo realizado em videiras demonstrou que a incapacidade de elevar a atividade de POX durante o enraizamento foi associado à baixa taxa de rizogênese (Koseet al., 2011). Megreet al. (2010) propõem que variação na atividade da enzima poderia ser utilizada como um marcador bioquímico para as fases do EA. Quando bem regulada, a atividade destas enzimas auxilia o EA. Durante o início do enraizamento, na fase de indução, baixas atividades são necessárias, evitando a degradação de auxina, a qual é necessária em maiores doses nesta etapa. Entretanto, durante a fase de formação, é necessário um aumento na atividade de POXs, reduzindo a concentração de auxina, bem como auxiliando a resposta de defesa contra o ferimento. Assim, é crucial para o sucesso do EA que o balanço entre POXs e flavonoides esteja adequado na planta-mãe, tendo em vista que estes compostos terão atividade na estaca. Deste modo, há indicações que para uma melhor resposta rizogênicase tenha menor atividade de POX e maior concentração de flavonoides no início do processo e o inverso em fases mais avançadas do EA (Da Costa et al., 2013).

## **Auxina e genes relacionados**

Os fitormônios com maior efeito no EA são auxinas. Elas agem de forma sistêmica, atuando em tropismos, desenvolvimento de órgãos como raízes laterais e adventícias, desenvolvimento do sistema vascular, bem como influenciando o tamanho de meristemas (Abel and Theologis, 1996). Como já mencionado, para o desenvolvimento de raízes é necessária uma maior concentração de auxinas na fase de indução e uma menor na fase de formação (De Klerk et al., 1999). Auxinas são sintetizadas no meristema apical e transportadas para a base do caule pelo mecanismo de transporte polar de auxina (TPA). Esse transporte é facilitado principalmente por transportadores de influxo AUXIN1/LIKE-AUX1 (AUX/LAX) e transportadores de efluxo do hormônio P-GLYCOPROTEIN (PGP) e PIN-FORMED (PIN) (Guanet al, 2015). A polaridade do transporte depende da distribuição assimétrica de proteínas transportadoras de efluxo PIN; já transportadores de influxo localizam-se de formamais randômica na célula (Swarup and Péret, 2012).

Em seu local de ação, auxinas desencadeiam uma série de eventos que culminam em respostas fisiológicas e expressão de genes responsivos ao fitormônio. Na percepção atuam principalmente dois receptores de auxina, TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1 (TIR1) e AUXIN BINDING PROTEIN 1 (ABP1). ABP1 é considerado por alguns autores como receptor extracelular de auxina, ligando-se com grande afinidade a ela e induzindo respostas rápidas, especialmente não transcricionais como a repolarização de transportadores PIN e o controle da endocitose (Groneset al., 2015). Dentro da célula, particularmente no núcleo, o

principal receptor de auxina é TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1 (TIR1), uma proteína com domínio F-BOX que atua na interação proteína-proteína, domínio este que é crucial para a ação de TIR1. A principal função desta proteína é a degradação de Aux/IAA através do recrutamento da proteína Ubiquitinaligase SCF<sup>TIR1</sup> (Dharmasiri et al., 2005). Aux/IAA atua na repressão de genes responsivos à auxina por meio da interação com fatores de transcrição AUXIN RESPONSE FACTOR (ARF), impedindo sua ligação com o DNA em elementos Aux<sup>RE</sup> em regiões promotoras de genes-alvo. Ao ser degradado, Aux/IAA libera ARF, que então interage com o DNA e ativa ou reprime genes responsivos ao hormônio, dependendo de domínios específicos na proteína (Li et al., 2016).

Dois repressores importantes da ação de auxina no enraizamento são o corepressor TOPLESS (TPL) e um membro da família AUXIN/INDOLE-3-ACETIC ACID (Aux/IAA), o repressor transcricional IAA12 (De Almeida et al., 2015). Estes repressores atuam em conjunto. Embora TPL não tenha interação direta com o DNA, facilita a interação entre IAA12 e ARFs, impedindo a ação dos últimos (Szemenyei et al., 2008).

O ácido indol-acético tem a principal rota biosintética mediada por duas famílias gênicas em arabidopsis. *TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASE OF ARABIDOPSIS (TAA)* é uma família gênica que codifica amino transferases. Essas enzimas atuam no início da síntese de auxinas usando triptofano (Trp) como substrato para conversão a indol-3-piruvato (IPA). Na segunda etapa da síntese, atua outra família gênica, *YUCCA (YUC)*, que codifica flavina monooxigenases



responsáveis por converter o IPA a ácido indol-acético (AIA). Foi mostrado que em mutantes com defeitos em *TAA* existe deficiência parcial de IPA; entretanto, quando ocorre o defeito em *YUC*, IPA se acumula na célula (Wonet al., 2011).

Além de auxinas, outros fitormônios podem afetar o enraizamento adventício (Da Costa et al., 2013). Citocininas são consideradas reguladoras negativas do enraizamento. Em *E. globulus* o tratamento com auxina regulou negativamente o gene *RESPONSE REGULATOR (ARR) ARR1*, enquanto que na ausência do hormônio ocorreu regulação positiva deste gene (De Almeida et al., 2015). Sendo *ARRs* 1, 10 e 12 reguladores transcricionais do tipo B, que respondem positivamente à presença de citocinina, é possível que haja um “crosstalk” negativo entre auxinas e citocininas. Corroborando esse fato, foi observado que *ARR1* e *ARR12* estão envolvidos na inibição do crescimento de raízes em plantas, levando a uma diminuição na quantidade de auxina nas mesmas após serem expostas ao frio (Zhu et al., 2015).

Atuando de maneira fase e genótipo-dependente, o etileno pode afetar de maneira diferente o enraizamento. Em macieira, inibidores de ação de etileno promoveram o enraizamento adventício (De Klerk et al., 1999). Em *Populus*, o fator de transcrição *PtaERF003* pertencente à família gênica *APETALA2/ETHYLENE RESPONSE FACTOR (AP2/ERF)* foi identificado como regulador positivo do enraizamento adventício e lateral, tendo sua expressão aumentada com a presença de auxina. Entretanto, sua função ainda permanece desconhecida, sua ação estando provavelmente ligada a rotas de sinalização de auxina (Trupianoet al, 2013).

## **Envelhecimento e o enraizamento adventício**

É bem conhecido o efeito negativo que o envelhecimento tem sobre a capacidade de emissão de raízes adventícias. Plantas pouco lignificadas têm maior capacidade de desenvolvimento de raízes adventícias se comparadas com plantas mais velhas. Já foi sugerido que este efeito pode estar relacionado tanto com a percepção, quanto com a biossíntese de auxina (Guanet al., 2015). Em um estudo em uma espécie recalcitrante e outra de fácil enraizamento (*E. globulus* e *E. grandis* respectivamente), foi mostrado que genes de repressão à ação de auxina (*TPL* e *IAA12*) estavam mais expressos na espécie recalcitrante. Por sua vez, esta espécie recuperava sua habilidade de enraizar ao ser exposta ao tratamento com auxina, bem como o padrão de expressão gênica dos genes anteriormente citados era alterado (De Almeida et al., 2015). Parâmetros bioquímicos também mudam conforme o envelhecimento e em *Tectona grandis*, estas mudanças foram observadas na atividade de peroxidases, bem como na quantidade de carboidratos (Husen e Pal, 2007). Apesar dos dados anteriormente citados, pouco se sabe sobre mudanças bioquímicas e moleculares que ocorrem ao longo do tempo em microcepas de *E. globulus*, principalmente, como estas mudanças podem afetar negativamente a capacidade de enraizamento desta espécie.

## **Objetivo Geral**

Contribuir para a compreensão das bases bioquímicas e moleculares responsáveis pelo declínio na capacidade de enraizamento adventício ao longo do tempo em microcepas de *Eucalyptus globulus*

## **Objetivos específicos**

Caracterizar temporal e morfológicamente o processo de perda de capacidade rizogênica de microestacas oriundas de microcepas de *E. globulus* de diferentes idades;

Analisar a correlação de parâmetros bioquímicos (concentração de carboidratos, flavonoides e auxina, atividade de peroxidases) ao longo do tempo em microcepas, antes e depois da perda de competência rizogênica de suas microestacas.

Analisar o padrão de expressão de genes envolvidos com biossíntese, transporte, sinalização e regulação de auxina bem como genes envolvidos no metabolismo de carboidratos ao longo do tempo em microcepas, antes e depois da perda de competência rizogênica de suas microestacas;

# Molecular aspects of adventitious rooting capacity loss in seedlings of *Eucalyptus globulus* Labill.

Márcio Luis Aumond Júnior<sup>b</sup>, Artur Teixeira de Araujo Junior<sup>b</sup>, Camila Fernanda de Oliveira Junkes<sup>a</sup>, Márcia Rodrigues de Almeida<sup>a</sup>, Hélio Nitta Matsuura<sup>b</sup>, Fernanda de Costa<sup>ab</sup> and Arthur Germano Fett-Neto<sup>ab</sup>

<sup>a</sup>

Center for Biotechnology, Federal University of Rio Grande do Sul, P.O. Box 15005, 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>b</sup>

Department of Botany, Federal University of Rio Grande do Sul, P.O. Box 15005, 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil

## ABSTRACT

The development of adventitious roots is affected by a number of factors, including the age of the cutting donor plant, which negatively affects rooting capacity. *E. globulus* quickly loses rooting capacity of cuttings as the donor plant ages. To better understand the bases of rooting competence loss in *E. globulus*, the time required for a significant decline in rhizogenic ability without exogenous auxin was determined in microcuttings derived from donor plants of different ages after sowing. Tip cuttings of donor plants were severed just before (younger, aged between 30 and 45 days) and right after (older, aged between 60 and 75 days) the loss of rooting competence of microcuttings. There were no significant changes in the concentration of carbohydrates, flavonoids, or proteins before and after the loss of rooting capacity. Higher peroxidase (EC 1.11.1.7) activity was associated with the loss of competence. Auxin concentration showed the opposite pattern. A key gene in auxin biosynthesis (*TAA1*) had lower expression in older plants.

The same applied to the auxin receptor gene *TIR1*, suggesting reduced auxin sensitivity. On the other hand, genes associated with auxin response repression (*TPL*, *IAA12*) or with the action of cytokinins, the rhizogenesis inhibitor *ARR1*, were more expressed in older plants. Taken together, data suggest that age negatively affects rooting mainly as a function of decreasing endogenous auxin concentration, caused by less biosynthesis and, perhaps, higher degradation, lower auxin perception, higher expression of genes inhibiting auxin action, as well as of genes related to the action of cytokinins.

*Key words: Adventitious rooting, Eucalyptus, juvenility, auxin, peroxidases, gene expression*

## 1. INTRODUCTION

*Eucalyptus globulus* Labill. is considered one of the top species for the paper industry due to its high quality cellulose pulp, low lignin and lipid content, and high syringyl / guaiacyl (S/G) ratio [1,2,3,4]. However, this is a rooting recalcitrant species [5], sometimes making adventitious root (AR) development and vegetative propagation difficult. AR development is a multifactorial process affected by phytohormones, mineral nutrition, stress conditions, genetic traits, environmental factors, and plant age [6].

Adventitious roots (AR) are formed from stems, leaves, or non-pericycle tissues of older roots in response to several stimuli [7]. AR induction is characterized by initial biochemical and molecular changes, including high auxin concentration and establishment of a sink for carbohydrates at the wound zone. AR initiation starts with the first visible cell divisions. AR expression involves the growth of root primordia through the stem tissues and establishment of vascular connections. Sometimes initiation and expression are regarded as a single phase, named formation [6, 8]

Auxin is a key phytohormone in AR, required in high concentration before root meristemoid formation, and at relatively low concentration for root elongation. *YUCCA* (*YUC*), encoding for

flavin-containing monooxygenases, and *TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASE OF ARABIDOPSIS* (*TAA*), encoding for aminotransferases, work together to synthesize indole-3-acetic acid (*IAA*) from tryptophan. *TAA* converts tryptophan to indole-3-pyruvate (*IPA*), whereas *YUC* forms *IAA* from *IPA* [9]. Auxin degradation can be carried out by peroxidases and reduced by antioxidants such as flavonoids, which may also inhibit auxin transport [6]. Shoot tip-produced auxin is transported basipetally in the stem by a set of transporters, which include auxin influx *AUXIN1/LIKE-AUX1* (*AUX/LAX*) and asymmetrically distributed efflux *PIN-FORMED* (*PIN*) proteins [8]. Inside the cell, auxin induces expression of auxin-regulated genes by selective proteolysis of its repressors *AUXIN/INDOLE-3-ACETIC ACID* (*Aux/IAA*), which act together with the co-repressor *TOPELESS(TPL)*. This releases *AUXIN RESPONSE FACTORs* (*ARFs*), which regulate auxin responsive genes [10]. The degradation of *Aux/IAA* is mediated by the *F-BOX* protein *TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1* (*TIR1*) which is an auxin receptor protein [11]. Another putative auxin receptor is *AUXIN BINDING PROTEIN 1* (*ABP1*), an extracellular receptor inducing fast responses, especially non-transcriptional [12].

Other phytohormones interact with auxin in AR development. Members of the transcription factor family *APETALA2/ETHYLENERESPONSEFACTORS* (*AP2/ERF*) had a positive effect on lateral and adventitious rooting [13]. On the other hand, cytokinin negatively affects adventitious rooting through *TYPE B ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATORS* (*ARR*) [14].

In *Eucalyptus*, hard-to-root condition has been shown to be associated with low auxin concentration in microcuttings and higher expression of repressors of auxin-responsive genes *TPL*, *IAA12*, and *ARR1*. Exogenous auxin treatment reduced the expression of *TPL* and *ARR1* in *E. globulus*, improving AR development [15]. Far-red enrichment of donor plants grown in sugar free medium significantly improved rooting of derived microcuttings, which was correlated with increased allocation of carbohydrates to the basal portion [16], as well as higher expression of

carbohydrate-related metabolism genes (*SS3*, *SUS1*, *SUC5*) and positive auxin response factors (*ARF6*, *ARF8*) in both donor plant and microcuttings[17].

However, little is known about the changes associated with donor plant aging that result in lower rooting capacity, particularly in trees. Guan et al. [8] suggest that differential auxin biosynthesis and perception could be responsible for easier rooting of greenwood cuttings versus hardwood ones. This may also be the case of age-related loss of rooting competence. The present work combined biochemical and molecular tools to address the underlying features of age-related loss of rooting capacity in donor plants of *E. globulus*.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1. Plant material

*E. globulus*. Labill seeds (gently provided by CMPC Celulose Riograndense S.A., Barra do Ribeiro, RS, Brazil) were first surface-sterilized in 70% ethanol (1 min) and then 1.5% NaClO (20 min) with three drops of neutral detergent with constant stirring, followed by four washes in sterile distilled water. Fifteen seeds were planted on 300 ml glass jars containing 55 ml of solid culture medium (half-strength modified MS salts) [18], plus 2% sucrose and 0.6% agar with pH adjusted to 5.8 [5], capped with a double layer of aluminum foil. Medium was autoclaved at 121°C for 20 min. The jars were maintained under controlled conditions of temperature and light, with temperature of  $24 \pm 2$  °C and photoperiod of 16h,  $40.7 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  light intensity (provided by white fluorescent lamps). After 30, 45, 60, 75, 90 and 105 days, apical microcuttings were obtained, which were used in all analyses. Samples for molecular and biochemical analyses were quick frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C.

### 2.2. Morphological analysis

Microcuttings were transferred and maintained for 20 days in *in vitro* rooting culture medium

containing MS salts 0.3X, 0.4 mg l<sup>-1</sup> thiamine, 100 mg l<sup>-1</sup> inositol, 3% sucrose, 0.6% agar and pH 5.8. Morphological rooting parameters were analyzed as previously described [15]. The experiments were carried out in 20 ml vials containing 6 ml of medium at a density of one explant per vial, capped with a double layer of aluminum foil. Two to four independent experiments with 20 explants each were used for determining rooting percentage, length of the longest root per rooted cutting, root number per rooted cutting and mean rooting time.

### 2.3. Total soluble sugars concentration

The extraction of soluble sugars was performed according to Dubois et al. [19], with minor modifications. Frozen samples (15-30 mg of fresh weight) were homogenized in liquid nitrogen, extracted with 750 µl of 80 % (v/v) ethanol and incubated in a water bath at 75 °C for 15 min. The extracts were centrifuged at 13,000g for 15 min and the supernatant was recovered. The pellets were re-extracted with 750 µl of 80 % (v/v) ethanol. The quantification of soluble sugars was done according to McCready et al. [20], with minor modifications. One hundred µl of the extract was mixed with 600 µl of freshly prepared anthrone reagent (1g of anthrone in 500 mL of 72% (v/v) sulfuric acid). The resulting solution was mixed and kept in a boiling water bath for exactly 11 min. After cooling, the absorbance at 630 nm was determined in an M2 Spectramax automated spectrophotometer (Molecular Devices, USA). The standard curve was established with *D*-glucose.

### 2.4. Starch content

To quantify starch content, pellets obtained from the soluble sugars extraction were used [20]. Pellets were resuspended with 250 µl of distilled water and 320 µl of 52 % (v/v) perchloric acid, submitted to sonication in a water bath for 15 min and centrifuged at 13,000g for 15 min. Extraction was done twice. Quantification of starch was done as described above for soluble sugar. The standard curve was established with *D*-glucose in perchloric acid 36.5% (v/v).



### 2.5. Flavonoid content

Flavonoid content was determined by the aluminum chloride spectrophotometric method Zhishen et al.[21]. Approximately 40 mg of frozen plant tissues were ground in liquid nitrogen, extracted in 300  $\mu$ l EtOH 95 % (v/v), and submitted to sonication in a water bath for 30 min in the dark at 4 °C. All of the following procedures were carried out under indirect light. The extracts were centrifuged at 12,000g for 10 min at 4 °C and the supernatants were collected. For quantification, 100  $\mu$ l of extract was added to 400  $\mu$ l of H<sub>2</sub>O and 30  $\mu$ l of NaNO<sub>2</sub> 5 % (v/v), mixed and then kept at 25 °C for 5 min. Next, 30  $\mu$ l of AlCl<sub>3</sub> 1 % (v/v) was added, mixed and then incubated at 25 °C for 6 min. Then, 200  $\mu$ l of NaOH 1M and 240  $\mu$ l of H<sub>2</sub>O were added and mixed. Measurements were done at 510 nm in spectrophotometer. The standard curve was established with quercetin (Sigma, USA).

### 2.6. Gene expression

Total RNA was isolated from tip cuttings of 30, 45, 60 and 75 and 105-day-old donor plants using NucleoSpin RNA Plant Kit (Macherey-Nagel), including DNase I treatment, following the manufacturer recommendations. *ERF*, *ARR*, *TPL*, *IAA12*, *ABP1*, *TIR1*, *AUX1* and *PIN1* were examined at 45, 75 and 105 days after sowing, whereas *TAA1*, *YUC3*, *SS3* and *SUS1*, at 30, 45, 60 and 75 days. Nanodrop<sup>TM</sup> Spectrophotometer (Thermo Scientific) was used to determine total RNA concentration, whereas RNA quality was monitored by electrophoresis in 1% agarose gel. One independent cDNA synthesis was done for each sample and first strand cDNA synthesis was carried out using 100 ng of total RNA, oligo-dTprimers and reverse transcriptase M-MLV (Invitrogen) in a final volume of 20  $\mu$ l. The final cDNA products were diluted 100 fold in RNase free Milli-q water prior to use in qPCR.

The qPCR analyses were done in fast optical 48 well reaction Plates 0.1ml

(MicroAmp<sup>TM</sup>Applied Biosystems) in a StepOne<sup>TM</sup>Real-Time PCR System (Applied Biosystems), according to the manufacturer instructions and sealed with adhesives (Microseal<sup>B</sup>Film - BioRad). Reactions and primers used in this work were the same as described in De Almeida et al. [15] and Ruedell et al.[17]. Reference genes were *HISTONE H2B* and *ALPHA TUBULIN*, with expression evaluated using primers described by De Almeida et al.[22]. Most of these genes had their function established in *Arabidopsis* or other plant species, so for *E. globulus* they are in fact 'like' genes. For the sake of easy format of the text, however, they will be referred to by gene names as found in the data bases. Data were analyzed by the Comparative Ct method [23] and relative expression was calculated using each reference gene separately, followed by the determination of the respective mean relative expression.

### 2.7. Peroxidase activity

Approximately 50 mg of frozen plant tissue were ground in liquid nitrogen and total protein content was extracted in 998,75  $\mu$ l of 0.2 M pH 7.0 phosphate buffer plus 1,25  $\mu$ l of Protease Inhibitor Cocktail (Sigma, USA) and 5 mg of PVP (added to buffer at least ten hours before extraction), mixed, centrifuged at 13,000g for 20 min at 4 °C and supernatant was collected. Peroxidase specific activity was quantified according to Fett-Neto et al. [24], with some modifications. Enzyme activity was assayed in a mixture containing: 1,5 mL of phosphate buffer 0.2 M, pH 7.0; 250  $\mu$ l of 1 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (in water), 250 $\mu$ l of 1 % guaiacol (in water) and 75  $\mu$ l of enzyme extract. Phosphate buffer replaced the extract in the blank. Reaction was measured by the change in absorbance at 420nm. Measurements were taken with a spectrophotometer every 30 s for 9 min. The initial linear part of the curve was used to determine peroxidase specific activity, which was expressed by change in absorbance at 420nm.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> (protein), at 25 $\pm$ 2 °C under diffuse light. Crude protein extracts in 0.2 M pH 7.0 phosphate buffer were used to determine protein concentration. Protein was quantified by the method of Bradford [25] and the standard

curve was established with BSA.

### 2.8. Endogenous auxin quantification by HPLC

Endogenous auxin content extraction and quantification from tip cuttings of plants with 30 and 60 days after sowing was performed according to Kim et al. [26], with modifications as described by De Almeida et al. [15]. Briefly, chromatography was carried out on a Shimadzu C18 reverse-phase column (250 × 4.6 mm), with corresponding guard column, in a Shimadzu SPD-20A HPLC equipment using a gradient system of three mobile phases: Solvent A: 10% methanol, 0.3% acetic acid; Solvent B: 90% methanol, 0.3% acetic acid; Solvent C: 100% acetonitrile. All solutions were previously filtered through 0.45 µm Millipore membranes and degassed. Flow rate was 1.0 ml min<sup>-1</sup> and detection was done with a Shimadzu RF-10A XL fluorescence detector (Emission at 360 nm, Excitation at 282 nm). To quantify IAA, 20 µl of each sample was injected, and an external standard curve was generated using IAA (Acros Organics). The identification of IAA content from samples of *E. globulus* was based on retention time and co-chromatography with authentic IAA standard. The contents of IAA in samples were expressed as nmol of IAA per gram of extracted fresh weight.

### 2.9. Experimental layout and statistics

All assays herein described were performed in totally randomized layout, with biological triplicates or quadruplicates. The results were analyzed by ANOVA followed by Tukey test or t-test, depending on the experiment,  $P \leq 0.05$ , using the statistic packages GraphPad Prism 6 and Graph Pad Quick Calcs: t test calculator.

### 3. RESULTS

#### *3.1. Donor plant aging negatively affects morphological rooting parameters*

The morphological parameters rooting percentage, length of the longest root per rooted cutting, mean rooting time and root number per rooted cutting were monitored in a time course experiment. The first three parameters were negatively affected by age of donor plant. AR development capacity declined with time. Rooting percentage is 35 fold higher on day 30 compared with day 90 (Fig.1A). Aging also negatively affected the mean rooting time; by day 60, more than thirteen days were necessary for microcuttings produce the first visible root, three more than younger ones (Fig. 1B). Length of the longest root also decreased significantly in microcuttings derived from 60 day old donor plants. Longest root length decreased from 5.2 (day 30 plants) to 3.1 cm (day 60 plants) (Fig. 1C). On the other hand, no significant effect on root number was observed (Fig.1D).

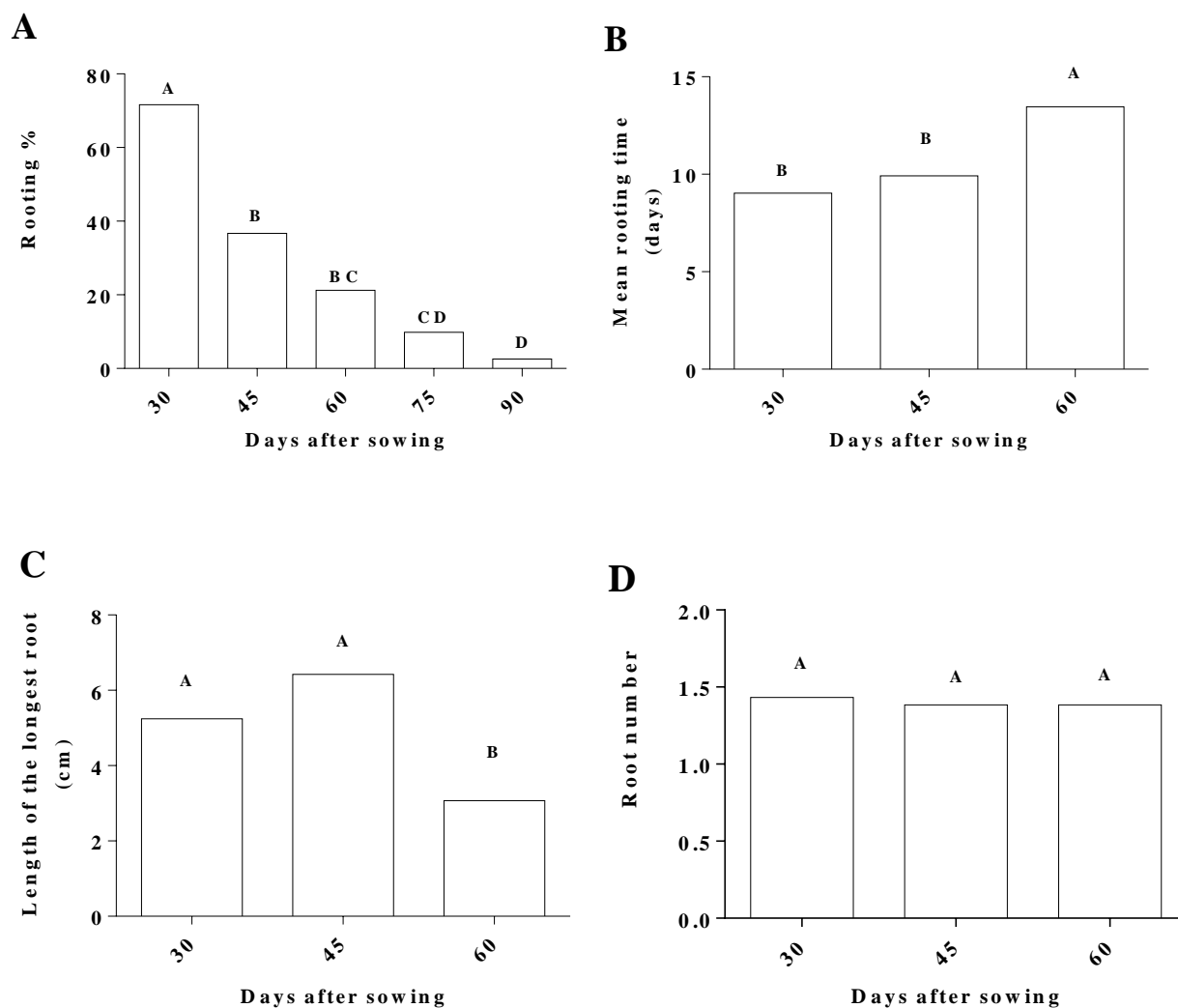


Fig.1. Rooting performance in *Eucalyptus globulus* microcuttings derived from donor plants of different ages after sowing. Bars not sharing a letter are significantly different by Tukey test ( $P \leq 0.05$ ). Values are the means of 2 to 4 independent experiments. Data on graphs C and D considered only the rooted cuttings.

### 3.2. Age-related changes in carbohydrate, flavonoids and protein concentrations

The concentrations of soluble carbohydrates, starch, total flavonoids and soluble protein in tip cuttings of donor plants with different ages did not show significant changes (Supplementary Table S1). A slight increase in starch concentration over time could be observed.

### 3.3. Gene expression

Auxin receptor genes had differential expression over time. Expression of *TIR1* was higher on day 45 and diminished on subsequent times. *ABPI* showed lower expression compared to *TIR1* and also had its lowest expression level on day 105 (Fig. 2C). The auxin action repressor genes *TPL* and *IAA12* had increased expression on day 75, going back to the levels observed on day 45 after 105 days. Cytokinin-related *ARR1* had increased expression on day 75 but, unlike *TPL* and *IAA12*, on day 105 expression remained high (Fig. 2A and 2B). The decreased expression of the auxin receptor *TIR1* and the concomitant increased expression of the auxin repressors *TPL*, *IAA12* and *ARR1* coincided with the loss of rooting capacity in microcuttings derived from the donor plants, which occurred between days 45 and 75 (Fig. 1A). However, the expression of the root promoting ethylene-related transcription factor ERF increased as rooting capacity reduced (Fig. 2A). Expression of auxin transporters was not well correlated to the loss of rooting capacity. *AUX1* showed stable expression, while *PIN1* had a significant increase in expression only at day 105 (Fig. 2D).

Biosynthetic related genes had variable expression as donor plants aged. The auxin biosynthetic gene *TAA1* had higher expression in younger plants (high rooting competence). *YUC3* showed a similar trend, albeit not statistically significant (Fig. 3A). The presence of messengers of carbohydrate biosynthesis genes was not clearly correlated to rooting ability. *STARCH SYNTHASE* (*SS3*) had stable levels of expression, while *SUCROSE SYNTHASE* (*SUS1*) showed lower expression at day 30, stabilizing at higher levels after 45 days (Fig. 3B).

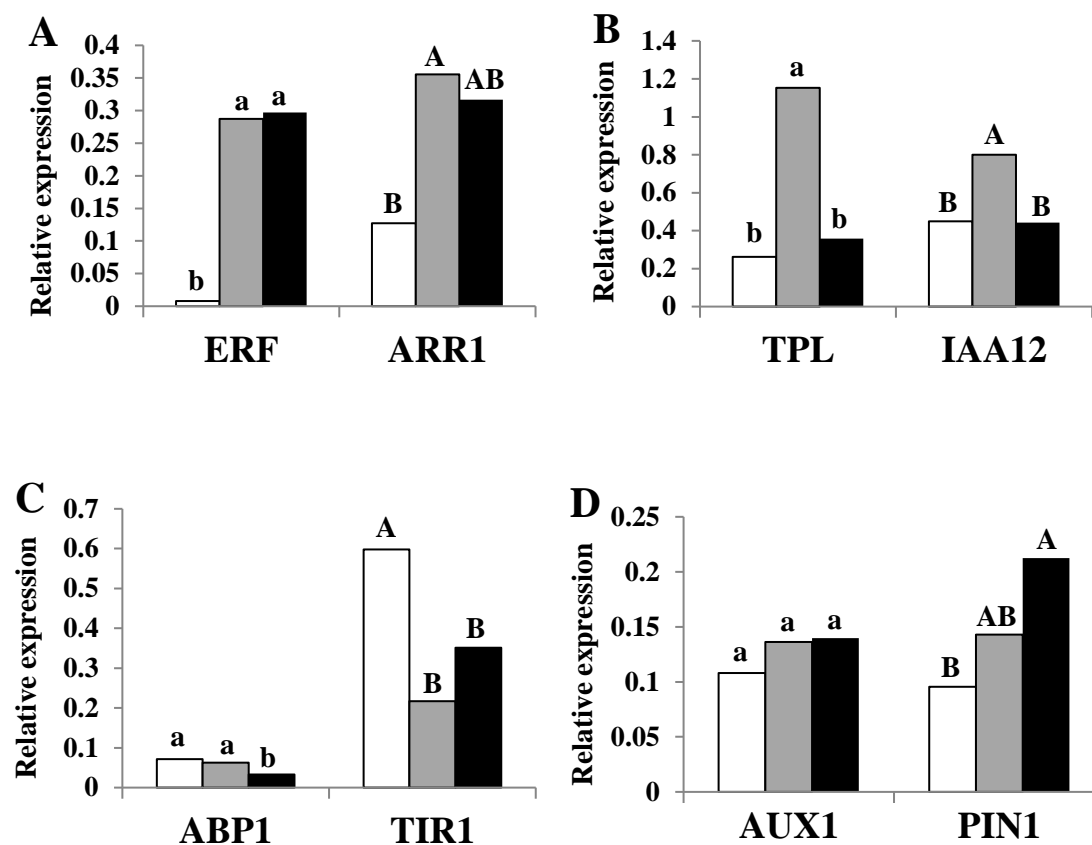


Fig.2. Gene expression of auxin action mechanism-related genes in *Eucalyptus globulus* tip cuttings as a function of donor plant age (rooting competence diminishes between 45 and 75 days). White bars – 45d; grey bars – 75d; black bars – 105d. A- Ethylene and cytokinin-auxin crosstalk-related genes *ETHYLENE RESPONSE FACTOR* (*ERF*) and *ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR* (*ARR*). B- Inhibitors of auxin responsive genes *TOPLESS* (*TPL*) and *IAA12*. C- Auxin receptors *ENDOPLASMATIC RETICULUM AUXIN BINDING PROTEIN1* (*ABP1*) and *TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1* (*TIR1*). D- Auxin transporter genes *PIN-FORMED 1* (*PIN1*) and *AUXIN RESISTANT* (*AUX1*). The expression levels of genes were evaluated using qPCR and were normalized using *HISTONE H2B* and *ALPHA TUBULIN*. Values represent the average of biological triplicates with technical quadruplicates. Bars sharing a letter are not different according to Tukey test with  $P \leq 0.05$ .

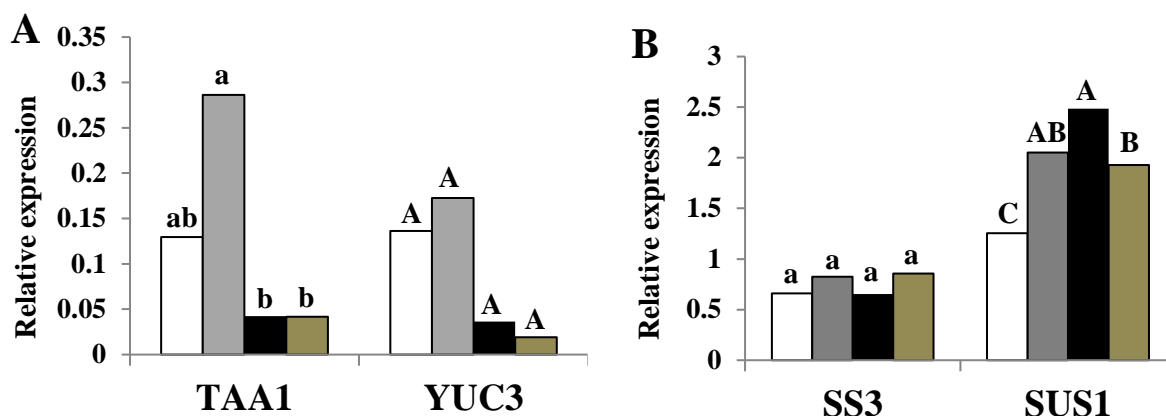


Fig.3. Gene expression of biosynthesis-related genes in *Eucalyptus globulus* tip cuttings as a function of donor plant age (rooting competence diminishes between 30 and 60 days). White bars – 30d; grey bars – 45d; black bars – 60d; brown bars – 75d. A - Auxin biosynthesis genes *TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASE OF ARABIDOPSIS 1* (TAA1) and *YUCCA3* (YUC3). B- Carbohydrate biosynthesis genes *STARCH SYNTHASE* (SS3) and *SUCROSE SYNTHASE* (SUS1). The expression levels of genes were evaluated using qPCR and were normalized using Histone H2B and ALPHA TUBULIN as endogenous controls. The values represent average of biological triplicates using technical quadruplicates. Bars sharing the same letters are not different according to Tukey test with  $P \leq 0.05$ .

### 3.4. Peroxidase activity and auxin concentration

Peroxidase activity increased by approximately 2 fold from 30 to 60 days of age, a time window within which rooting competence reduced significantly (Fig. 4A; Fig. 1A). The profile observed for IAA concentration was exactly the opposite. Auxin concentration decreased by a factor of 4 between 30 and 60 days (Fig. 4B).

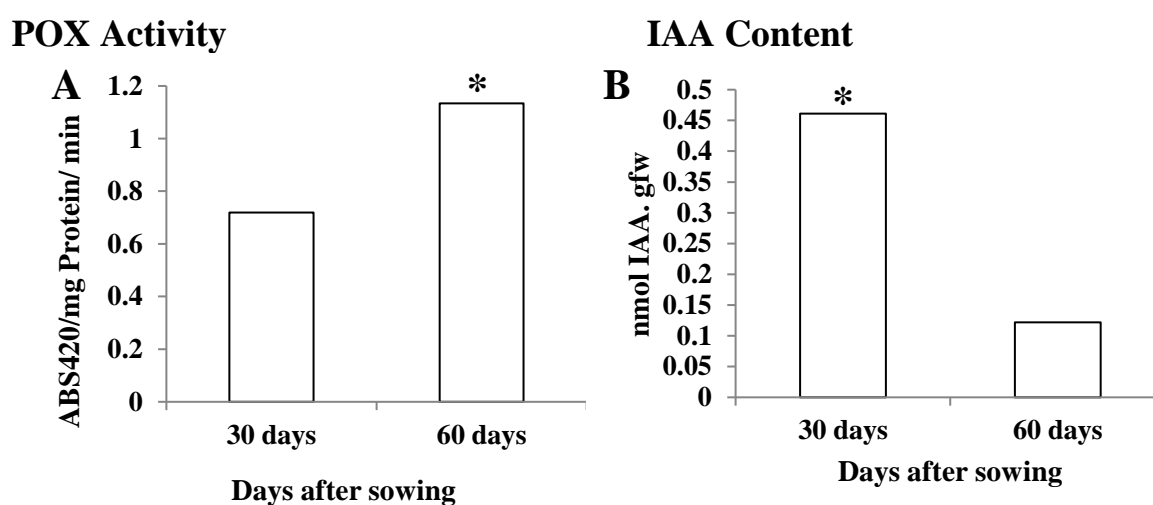


Fig.4. Peroxidase activity and auxin concentration in *Eucalyptus globulus* tip cuttings as a function of donor plant age (rooting competence diminishes between 30 and 60 days). A- Peroxidase activity. B- Endogenous IAA concentration. Asterisks indicate significant difference according to Student's t-test ( $P \leq 0.005$ ).



#### 4. DISCUSSION

The aseptic cultivation system used in this work provides a means to accelerate the progress of decline in rooting capacity of microcuttings from donor plants still at a very young age. The entire process takes place in approximately 2 months, facilitating physiological investigation on the mechanisms involved in root competence. De Almeida et al. [15] reported that *E. globulushad* hard-to-root phenotype at 98 days after sowing, in agreement with our findings. Progressive loss of adventitious rooting capacity of microcuttings derived from ageing donor plants was evident in the present work. Significant reduction in rooting ability took place at some point between 45 and 60 days after sowing. This can be inferred by taking together several rooting parameters, such as percent rooting, mean rooting time and longest root length (Fig. 1). By comparing profiles before and after the decline of adventitious rooting ability, biochemical and gene expression analyses provided clues about the underlying mechanisms.

The absence of differences in the concentration of proteins, flavonoids, starch and soluble carbohydrates suggests that these parameters were not major drivers of the changes in rooting competence of explants from donor plants as they age (Table S1). Flavonoids may affect AR development as auxin transport inhibitors or as antioxidants that may protect auxin pools from degradation [27], whereas carbohydrates are essential for energy metabolism and as biosynthetic units, thereby playing a central role in AR development [6]. A study with *Eucalyptus* has also shown a regulatory role for carbohydrates in AR development [28]. It is possible that flavonoids, as well as carbohydrate metabolic changes, may contribute to the different rooting outcomes after cutting severance, depending on the age of the donor plant. Gene expression data showed no changes in *SS3* and an increase in *SUS1* as rooting competence decreased (Fig. 3B). Since plant *SUS1* is mostly a sucrose degrading enzyme [29], this may suggest an increase in sink strength or carbon relocation [17], although total carbohydrate concentrations were not significantly changed (Table S1). In spite of the fact that this profile could presumably be beneficial to

rooting, several other factors could override it resulting in the recalcitrant phenotype of aged donor plants. Protein content is relevant for both structural and regulatory/metabolic processes, and it is closely dependent on the availability of nitrogen sources. The constant concentration of proteins indicates that nitrogen supply was adequate throughout the experiments.

Auxin sensitivity loss may occur as a result of lower expression of the main auxin receptor TIR1 as donor plants age. After microcuttings are severed, basipetally transported auxin from shoot tips and young leaves accumulates at the cutting base, creating a local concentration gradient that drives the induction of AR [6]. In older donor plants, reduced expression of the auxin receptor may increase the response threshold, partially impairing rooting. Based on expression data, however, auxin transport was maintained relatively stable during the rooting loss transition, even with a significant increase in PIN1 transcript level at a much later time point (105d) (Fig.2D). Apparently, the putative increased transport did not overcome sensitivity decrease, which was also coupled with lower auxin concentration in cuttings (Fig. 4B) and increased peroxidase activity, an enzyme capable of oxidizing this phytohormone [30](Fig. 4A).

The amount of auxin found in the present work was similar to De Almeida et al. [15] in *E. globulus*. Negishi et al. [31] also showed similar differences in auxin content in two genotypes of *E. globulus*, one easy-to-root and other hard-to-root.

The drop in IAA steady-state concentration coincident with lower rooting capacity may result from a combination of reduced biosynthesis and the observed increased degradation by peroxidases. Indeed, expression of the biosynthetic gene *TAA1* suggests that there is a diminished synthesis of auxin at time points when rooting competence is significantly lower, a trend that is also followed by *YUC3*, which acts in the same pathway [32] (Fig. 3A).

Auxin signaling-related genes with major functional roles showed expression profiles that varied as donor plants aged and lost rooting competence. The auxin action repressor genes *TPL* and *IAA12* displayed higher expression at the transition from full root competence to reduced

competence, later returning to initial levels (Fig. 2B). The peak of expression of these repressor genes is consistent with a decrease in auxin action, thereby compromising AR development. The similar expression pattern makes functional sense, since TPL directly interacts with the EAR domain on IAA12/BDL for repressing auxin response genes [33]. The subsequent return of *TPL* and *IAA12* to initial levels of expression could be a response to the reduced auxin concentration and sensitivity (based on *TIR1* expression) (Figs.4B and 2C).

AR development depends on the input of several hormones besides auxin. Among these, cytokinins and ethylene play significant roles primarily as rooting inhibitors and stimulators, respectively [7]. In *Arabidopsis*, cytokinin caused upregulation of *AUX/IAA* as well as reduction in auxin flow by restriction in *PIN1* and *LAX3* expression domains, increasing rooting recalcitrance [34]. The poplar *PtRR13* cytokinin type B response regulator inhibits AR development [35]. Rooting of *E. globulus* microcuttings was also inhibited by cytokinin exposure [28]. In the cambium region of *E. globulus* microcuttings, the cytokinin regulator type B *ARR1* is more expressed compared to the same tissues of the easy-to-root *Eucalyptus grandis*. Besides, the same gene is downregulated by auxin treatment, leading to improved AR development [15]. In good agreement, the expression of *ARR1* increased as rooting competence decreased (Fig. 2A and Fig. 1A), suggesting a change in the balance of root promoting auxins versus root inhibiting cytokinins.

In contrast, *ERF*, member of a family of transcription factors known as positive regulators of lateral and adventitious root development [7;13], showed increased expression associated with loss of rooting ability (Fig. 2A and Fig. 1A). Since ERFs are responsive to ethylene, this may be a function of ethylene accumulation as donor plants age in the culture vessels. Adventitious rooting in microcuttings of *E. globulus* and *Eucalyptus saligna* was not strongly influenced by the ethylene inhibitor silver nitrate [36], whereas, in hybrid *Eucalyptus*, ethylene has been shown to inhibit adventitious rooting cuttings, since the use of two different ethylene inhibitors

improved rooting [37]. On the other hand, AP2/ERFs transcription factors form a large family, involved in regulating plant responses to various types of stresses, not necessarily related to AR development [38].

## 5. CONCLUSION

Taken together results point to a multifactorial mechanism leading to significant loss of rooting competence of microcuttings derived from donor plants of *E. globulus* of different age. A putative summarizing model is shown in Fig. 5. As rooting competence decreases, the main factors at play appear to be a reduced content and biosynthesis of IAA (*TAAI*), increased catabolism of this phytohormone (peroxidase activity), reduced sensitivity to auxin (*TIRI*), and increased activity of auxin action inhibitors (*TPL*, *IAA12*), including transcription factors involved in cytokinin-auxin crosstalk (*ARR1*). These data may provide insights on how to overcome or delay loss of rooting competence in order to rescue propagation effectiveness of industrially relevant *E. globulus* genotypes.

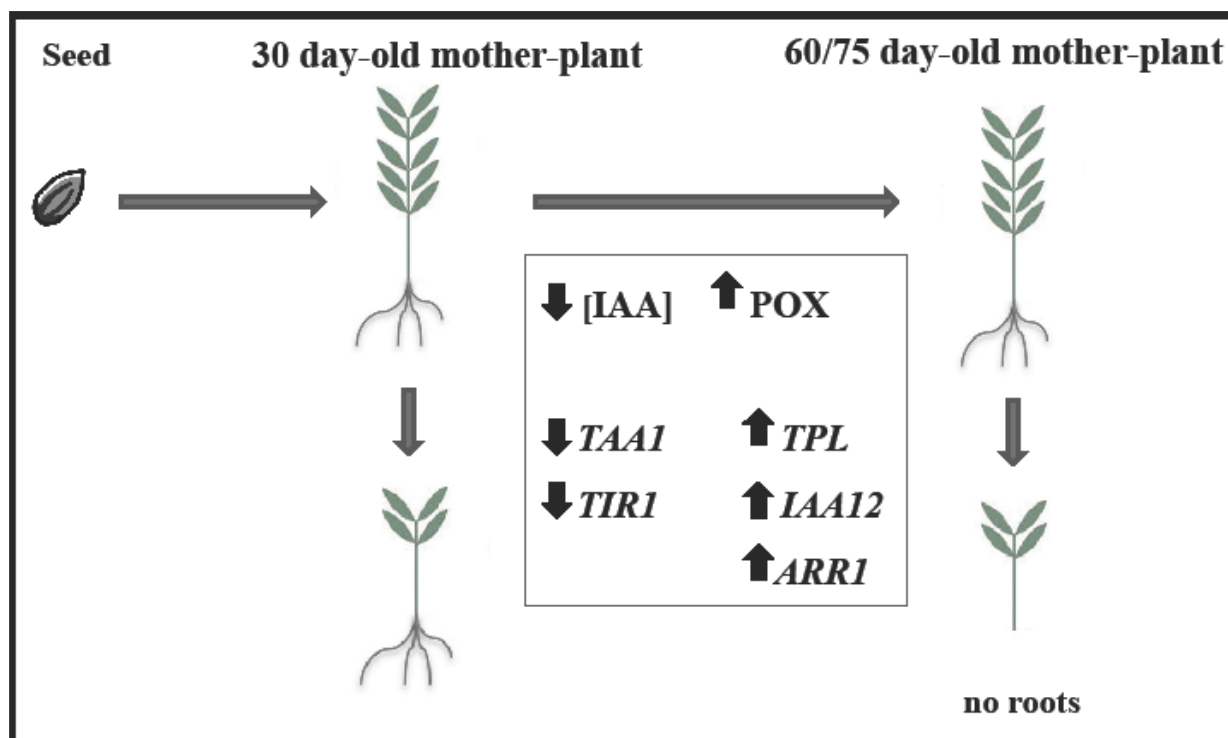


Fig. 5. Working model of biochemical and molecular bases of adventitious rooting capacity loss in *Eucalyptus globulus* Labill. along mother-plant aging. Decrease in level of endogenous IAA concentration as well *TAA1* and *TIR1* expression associated with increase in POX activity and expression of *TPL*, *IAA12* and *ARR1* lead to loss of rooting capacity. Upward arrows represent increased gene expression or POX activity; downward arrows represent decreased gene expression or IAA concentration.

### Contribution

MLAJ was involved in experimental design and overall execution, as well as drafting the manuscript. MRA helped in tissue culture assays and gene expression experiments. ATAJ worked in q-PCR experiments, HNM performed biochemical assays, COJ assisted in data analyses, and FDC in HPLC analyses for IAA quantification. AGFN conceived and supervised the work and finalized the manuscript.

## Acknowledgments

This research was funded by grants of Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq-Brazil) to AGFN.

## References

- [1] M. P. Cruz, C.A. Barbosa, R.A. Maltha, Caracterização química do “pitch” em indústria de celulose e papel de *Eucalyptus*. *Quim.Nova*. 29 (2006) 459-466.
- [2] J. Rencoret, A. Gutierrez, J.C. Del Río, Lipid and lignin composition of woods from different eucalypt species. *Holzforschung* 61 (2007) 165-174.
- [3] L. C. A. Barbosa, C.R.A.Maltha, V.L.S. Jorge, L. Colodette, Determinação da relação siringila/guaiacila da lignina em madeiras de eucalipto por pirólise acoplada à cromatografia gasosa e espectrometria de massas (PI-CG/EM). *Quim. Nova*. 31(2008), 2035-2041.
- [4] D.M. Neiva, A. Araujo, A. Lourenço, J. Gominho, H. Pereira, Kraft pulping and wood chemical composition for 12 *Eucalyptus* species. Conference EWLP, 13th European workshop on lignocellulosics and pulp. Sevilha, Espanha. (2014) 599-602
- [5] A. G. Fett-Neto, J.P. Fett, L.W.V. Goulart, G. Pasquali, R.R. Termignoni, A.G. Ferreira, Distinct effects of auxin and light on adventitious root development in *Eucalyptus saligna* and *Eucalyptus globulus*. *Tree Physiol*. 21(2001) 457–464.
- [6] C.T. da Costa, M.R. de Almeida, C.M. Ruedell, J. Schwambach, F.S. Maraschin, A.G. Fett-Neto, When stress and development go hand in hand: main hormonal controls of adventitious rooting in cuttings, *Front. Plant Sci*. 4(2013), <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2013.00133>
- [7] U. Druege, P. Franken, M.R. Hajirezaei, Plant hormone homeostasis, signaling, and function during adventitious root formation in cuttings. *Front Plant Sci*. 7 (2016) 1-14.

- [8] L. Guan, A.S. Murphy, W.A. Peer, L. Gan, Y. Li, Z.M. Cheng., Physiological and molecular regulation of adventitious root formation. *Crit. Rev. Plant Sci.* 34 (2015) 506–521.
- [9] C. Won, X. Shen, K. Mashiguchi, Z. Zheng, X. Dai, Y. Cheng, H. Kasahara, Y. Kamiya, J. Chory, Y. Zhao, Conversion of tryptophan to indole-3-acetic acid by TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASES OF ARABIDOPSIS and YUCCAs in Arabidopsis. *P. Natl. Acad. Sci.-Biol.* 108 (2011) 18518-18523.
- [10] S.B. Li, Z.Z. Xie, C.G. Hu, J.Z. Zhang, A review of auxin response factors (ARFs) in plants. *Front.Plant Sci.* 7(2016) 1-7.
- [11] N. Dharmasiri, S. Dharmasiri, M. Estelle, The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* 435(2005) 441-445.
- [12] P. Grones, X. Chen, S. Simon, W.A. Kaufmann, R. De Rycke, T. Nodzyński, E. Zažímalová, J. Friml, Auxin-binding pocket of ABP1 is crucial for its gain-of-function cellular and developmental roles. *J. Exp. Bot.* 66 (2015), 5055-5065.
- [13] D. Trupiano, Y. Yordanov, S. Regan, R. Meilan, T. Tschaplinski, G.S. Scippa, V. Busov, Identification, characterization of an AP2/ERF transcription factor that promotes adventitious, lateral root formation in *Populus*. *Planta* 238(2013) 271–282.
- [14] R.D. Argyros, D.E. Mathews, Y.H. Chiang, C.M. Palmer, D.M. Thibault, N. Etheridge, D.A. Argyros, M.G. Mason, J.J. Kieber, G.E. Schaller, Type B response regulators of Arabidopsis play key roles in cytokinin signaling and plant development. *Plant Cell.* 20(2008) 2102–2116.
- [15] De Almeida, M.R., De Bastiani, D., Gaeta, M.L., de Araújo Mariath, J.E., de Costa, F., Retallick, J., Nolan, L., Tai, H.H., Strömvik M.V., Fett-Neto, A.G., 2015. Comparative transcriptional analysis provides new insights into the molecular basis of adventitious rooting

- recalcitrance in *Eucalyptus*. *Plant Sci.* 239, 155–165.
- [16] C.M. Ruedell, M.R. De Almeida, J. Schwambach, C.F. Posenato, A.G. Fett-Neto, Pre and post-severance effects of light quality on carbohydrate dynamics and microcutting adventitious rooting of two *Eucalyptus* species of contrasting recalcitrance. *Plant Growth Regul.* 69 (2013) 235–245.
- [17] C.M. Ruedell, M.R. De Almeida, A.G. Fett-Neto. Concerted transcription of auxin and carbohydrate homeostasis-related genes underlies improved adventitious rooting of microcuttings derived from far-red treated *Eucalyptus globulus* Labill mother plants. *Plant Physiol. Biochem.* 97(2015) 11-19.
- [18] T. Murashigue, F. Skoog, A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15(1962) 473–497.
- [19] M. Dubois, K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers, F. Smith, F., Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28 (1956), 350.
- [20] R.M. McCready, J. Guggolz, V. Silveira, H.S. Owens, Determination of starch and amylose in vegetables. *Anal Chem.* 22,(1950) 1156–1158.
- [21] J. Zhishen, T. Mengcheng, W. Jianming, The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem.* 64 (1999), 555-559.
- [22] M.R. De Almeida, C.M. Ruedell, F.K. Ricachenevsky, R.A. Sperotto, G. Pasquali, A.G. Fett-Neto, A.G., 2010. Reference gene selection for quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction normalization during in vitro adventitious rooting in *Eucalyptus globulus* Labill. *BMC Mol. Biol.* 11(2010) 73.
- [23] M.W. Pfaffl, A new mathematical model for relative quantification real time RT-



PCR. *Nucleic Acids Res.* 29 (2001), e45.

- [24] A.G. Fett-Neto, S.L. Teixeira E.A.M. Da Silva, R. Sant'Anna, Biochemical and morphological changes during in vitro rhizogenesis in cuttings of *Sequoia sempervirens* (D. Don) Endl. *J. Plant Physiol.* 140 (1992) 720–728.
- [25] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principles of protein dye binding. *Anal Biochem.* 72(1976) 245–248.
- [26] Y.J. Kim, Y.J. Oh, W.J. Park, HPLC-based quantification of indole-3-acetic acid in the primary root tip of maize. *JNBT* 3 (2006), 40–45.
- [27] W.A. Peer, A. Bandyopadhyay, J.J. Blakeslee, S.N. Makam, R.J. Chen, P.H. Masson, A. S. Murphy, Variation in Expression and Protein Localization of the PIN Family of Auxin Efflux Facilitator Proteins in Flavonoid Mutants with Altered Auxin Transport in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell*, 16(2004) 1898–1911.
- [28] L.R. Corrêa, D.C. Paim, J. Schwambach, A.G. Fett-Neto, Carbohydrates as regulatory factors on the rooting of *Eucalyptus saligna* Smith and *Eucalyptus globulus* Labill. *Plant Growth Regul.* 45(2005) 63-73.
- [29] Y.L. Ruan, 2014. Sucrose metabolism: gateway to diverse carbon use and sugar signaling. *Annu. Rev. Plant Biol.* 65, 33-67.
- [30] W.A. Peer, Y. Cheng, A.S. Murphy, Evidence of oxidative attenuation of auxin signaling. *J. Exp. Bot.* 64(2013) 2629-2639
- [31] N. Negishi, K. Nakahama, N. Urata, M. Kojima, H. Sakakibara, A. Kawaoka, Hormone level analysis on adventitious root formation in *Eucalyptus globulus*. *New Forests*, 45(2013), 577-587.

- [32] C. Won, X. Shen, K. Mashiguchi, Z. Zheng, X. Dai, Y. Cheng, H. Kasahara, Y. Kamiya, J. Chory, Y. Zhao, Conversion of tryptophan to indole-3-acetic acid by TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASES OF ARABIDOPSIS and YUCCAs in Arabidopsis. P. Natl. Acad. Sci.-Biol. 108 (2011), 18518-18523.
- [33] H. Szemenyei, M. Hannon, A.J. Long, TOPLESS mediates auxin-dependent transcriptional repression during *Arabidopsis* embryogenesis. Science 319 (2008), 1384-1386.
- [34] F.D. Rovere, L. Fattorini, S. D'Angeli, A. Veloccia, G. Falasca, M.M. Altamura, Auxin and cytokinin control formation of the quiescent centre in the adventitious root apex of *Arabidopsis*. Ann. Bot. 112(2013) 1395–1407.
- [35] G.A. Ramírez-Carvajal, A.M. Morse, C. Dervinis, J.M. Davis, The CYTOKININ TYPE-B RESPONSE REGULATOR PtRR13 is a negative regulator of adventitious root development in *Populus*. Plant Physiol. 150 (2009) 759–771.
- [36] C.M. Fogaça, A.G. Fett-Neto, Role of auxin and its modulators in the adventitious rooting of *Eucalyptus* species differing in recalcitrance. Plant Growth Regul. 45(2005) 1-10, 2005.
- [37] A.J. Kilkenny, H.M. Wallace, D.A. Walton, M.F. Adkins, S.J. Trueman, Improved root formation in eucalypt cuttings following combined auxin and anti-ethylene treatments. J. Plant Sci. 7(2012) 138-153.
- [38] U.J. Phukan, G.S. Jeena, V. Tripathi, R.K. Shukla, Regulation of APETALA2/ETHYLENE RESPONSE FACTORS in plants. Front Plant Sci. 8 (2017), 1-18.

## Supplementary material

**Supplementary Table S1.** Concentrations of starch, soluble sugars, flavonoids, and proteins (means  $\pm$  standard errors). Data are the means of two to three independent experiments with biological triplicates. There is no significant difference among data derived from microcuttings (Turkey test,  $P \leq 0.05$ ).

	Starch (mg.mg <sup>-1</sup> DW)	Soluble sugars (mg.mg <sup>-1</sup> DW)	Flavonoids	Protein mg.mg <sup>-1</sup> FW
			Quercitine equivalent s ( $\mu$ g.mg <sup>-1</sup> DW)	
Days after sowing				
30	31.83 $\pm$ 2.911	81.13 $\pm$ 7.777	7.569 $\pm$ 0.479	13.53 $\pm$ 0.597
45	34.41 $\pm$ 3.877	85.98 $\pm$ 9.585	7.345 $\pm$ 0.496	13.41 $\pm$ 0.515
60	37.36 $\pm$ 3.822	92.72 $\pm$ 10.430	6.156 $\pm$ 0.457	13.82 $\pm$ 0.382
75	41.47 $\pm$ 2.979	91.02 $\pm$ 9.156	6.931 $\pm$ 0.509	13.00 $\pm$ 0.357

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com os experimentos realizados foi possível identificar prováveis fatores responsáveis pela perda da capacidade de enraizamento adventício de estacas de *Eucalyptus globulus* com o envelhecimento da planta matriz. Nossos dados sugerem que a dinâmica de auxina é um dos principais responsáveis por esta mudança, sendo sua concentração e percepção afetadas negativamente pela idade.

Com o passar do tempo, genes responsáveis pela biossíntese de auxina (*TAA1* e, em menor extensão, *YUC3*) são menos expressos, coincidindo com uma menor concentração do fitormônio. Conjuntamente, parece ocorrer maior degradação de auxinas com aumento da atividade de peroxidase e menor percepção do hormônio em função de reduzida expressão de seu principal receptor (*TIR1*). A ação de auxina também é reduzida com o aumento da expressão de repressores *TPL*, *IAA12* e *ARR1*. Este último é regulado por citocininas, indicando a relevância do crosstalk entre estes fitormônios e possivelmente de uma mudança no balanço auxina-citocinina das plantas matrizes.

A partir destas informações, um rol de potenciais alvos para modulação da competência rizogênica de estacas oriundas de plantas matrizes de *Eucalyptus globulus* tornou-se disponível. Poderão ser conduzidos experimentos visando retardar ou mesmo evitar a perda de competência rizogênica, enfocando principalmente no metabolismo e ação de auxinas, com vistas à melhor eficiência de propagação clonal de genótipos elite para indústria florestal.

Para isto, desde procedimentos simples como alterações na nutrição mineral de plantas matrizes com impacto no steady state de auxinas (p.ex.: zinco para aumento do precursor auxínicotriptofano, ferro e manganês para síntese e atividade de peroxidases) até mais complexos, envolvendo transgenia ou edição de genes alvo relevantes para competência rizogênica, podem ser considerados.

### **Bibliografia**

Abel S., Theologis, A., 1996. Early genes and auxin action. *PLANT PHYSIOL.* 111, 9-17

Ahkami, A. H., Lischewski, S., Haensch, K., Porfirova, S., Hofmann, J., Rolletschek, H., Melzer, M., Philipp, F., Bettina, H., Druege, U., Hajirezaei, M., 2008. Molecular physiology of adventitious root formation in *Petunia hybrida* cuttings: involvement of wound response and primary metabolism. *NEW PHYTOL.* 181: 613–625.

Barbosa, L. C. A., Maltha C. R. A., Jorge V. L. S., Colodette, L., 2008. Determinação da relação siringila/guaiacila da lignina em madeiras de eucalipto por pirólise acoplada à cromatografia gasosa e espectrometria de massas (Pi-Cg/Em). *QUIM. NOVA* 31 (8), 2035-2041.

Brunetti, C., Di Ferdinando, M., Fini, A., Pollastri, S., Tattini, M., 2013. Flavonoids as antioxidants and developmental regulators: relative significance in plants and humans. *INT. J. MOL. SCI.* 14, 3540-3555.

Cruz, M. P., Barbosa, C.A., Maltha, R.A., 2006. Caracterização química do “pitch” em indústria de celulose e papel de eucalyptus. *QUIM. NOVA* 29 (3), 459-466.

Corrêa, L.R., Stein, R.J., Fett-Neto, A.G., 2012. Adventitious rooting of detached *Arabidopsis thaliana* leaves. *BIOLOGIA PLANTARUM.* 56 (1), 25-30.

- Da Costa, C. T., de Almeida, M. R., Ruedell, C. M., Schawmbach, J., Maraschin, F. S., Fett-Neto, A. G., 2013. When stress and development go hand in hand: main hormonal controls of adventitious rooting in cuttings. *FRONT PLANT SCI.* 4 (133), 1-19.
- De Almeida, M.R., Ruedell, C.M., Ricachenevsky, F.K., Sperotto, R.A., Pasquali, G., Fett-Neto, A.G., 2010. Reference gene selection for quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction normalization during in vitro adventitious rooting in *Eucalyptus globulus* Labill. *BMC MOL. BIOL.* 11, 73.
- De Almeida, M.R., De Bastiani, D., Gaeta, M.L., de Araújo Mariath, J.E., de Costa, F., Retallick, J., Nolan, L., Tai, H.H., Strömvik M.V., Fett-Neto, A.G., 2015. Comparative transcriptional analysis provides new insights into the molecular basis of adventitious rooting recalcitrance in *Eucalyptus*. *PLANT SCI.* 239, 155–165.
- De Klerk, G.J., Krieken, W.V., De Jong, A.C., 1999. The formation of adventitious roots: New concepts, new possibilities. *IN VITRO CELL DEV. BIOL.-PLANT.* 35, 189-199.
- Dharmasiri, N., Dharmasiri, S., Estelle, M., 2005. The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *NATURE* 435, 441-445.
- Druege, U., Franken P., Hajirezaei M. R., 2016. Plant hormone homeostasis, signaling, and function during adventitious root formation in cuttings. *FRONT PLANT SCI.* 7 (381), 1-14.
- Fukuda, H., and Komamine, A., 1982. Lignin synthesis and its related enzymes as markers of tracheary-element differentiation in single cells isolated from mesophyll of *Zinnia elegans*. *PLANTA* 155(5), 423-430.
- Grones, P., Chen, X., Simon, S., Kaufmann, W.A., De Rycke, R., Nodzyński, T., Zažímalová, E., Friml, J., 2015. Auxin-binding pocket of ABP1 is crucial for its gain-of-function cellular and

- developmental roles. J EXP BOT. 66 (16), 5055-5065.
- Guan, L., Murphy, A. S., Peer, W.A., Gan, L., Li, Y., Cheng, Z.M., 2015. Physiological and molecular regulation of adventitious root formation. CRIT REV PLANT SCI. 34, 506–521.
- Husen, A., 2008. Clonal propagation of *Dalbergiasissoo* Roxb. and associated metabolic changes during adventitious root primordium development. NEW FOREST. 36, 13–27.
- Husen, A. and Pal, M., 2007. Metabolic changes during adventitious root primordium development in *Tectonagrandis* Linn. f. (teak) cuttings as affected by age of donor plants and auxin (IBA and NAA) treatment. NEW FOREST. 33, 309–323.
- Hiraga, S., Sasaki, K., Ito, H., Ohashi, Y., Matsui, H., 2001. A Large Family of Class III Plant Peroxidases. PLANT CELL PHYSIOL. 42 (5), 462-468.
- Indústria brasileira de árvores, 2016. Relatório da Indústria Brasileira de Árvores (IBÁ). Brasil
- Kose, C., Erdal, S., Kayaa, O., Okkes, A., 2011. Comparative evaluation of oxidative enzyme activities during adventitious rooting in the cuttings of grapevine rootstocks. J. SCI. FOOD AGR. 91, 738–741.
- Li, S.B., Xie, Z.Z., Hu, C.G., Zhang, J.Z., 2016. A review of auxin response factors (ARFs) in plants. FRONT PLANT SCI. 7(47), 1-7.
- Megre, D., Dokane, K., Kondratovics, U., 2011. Can changes in starch content and peroxidase activity be used as rooting phase markers for rhododendron leaf bud cuttings? ACTA BIOL. CRACOV. BOT. 53 (1), 74–79.
- Neiva, D.M., Araujo, A., Lourenço, A., Gominho, J., Pereira, H., 2014. Kraft pulping and wood chemical composition for 12 eucalyptus species. Conference EWLP, 13th European workshop

on lignocellulosics and pulp. Sevilha, Espanha. 599-602

Passardi, F., Cosio, C., Penel, C., Dunand, C., 2005. Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. *PLANT CELL REP.* 24, 255–265

Peer, W.A., Murphy, A. S., 2007. Flavonoids and auxin transport: modulators or regulators? *TRENDS PLANT SCI.* 12 (12), 556-563

Rencoret, J., Gutierrez, A., Del Río, J.C., 2007. Lipid and lignin composition of woods from different eucalypt species. *HOLZFORSCHUNG.* 61 (2), 165-174.

Ruedell, C. M., De Almeida, M.R., Schwambach, J., Posenato, C.F., Fett-Neto, A.G., 2013. Pre and post-severance effects of light quality on carbohydrate dynamics and microcutting adventitious rooting of two *Eucalyptus* species of contrasting recalcitrance. *PLANT GROWTH REGUL.* 69, 235–245.

Schwambach, J., Ruedell, C.M., De Almeida, M.R., Penchel R.M., de Araujo, E.F., Fett-Neto, A.G., 2008. Adventitious rooting of *Eucalyptus globulus x maidenii* mini-cuttings derived from mini-stumps grown in sand bed and intermittent flooding trays: a comparative study. *NEW FOREST.* 36, 261–271.

Swarup, R., Péret, B., 2012. AUX/LAX family of auxin influx carriers— an overview. *Frontiers in PLANT SCI.* 3 (225), 1-11.

Szemenyei, H., Hannon, M., Long A.J., 2008. TOPLESS mediates auxin-dependent transcriptional repression during *Arabidopsis* embryogenesis. *SCIENCE* 319 (5868), 1384-1386.

Tombesi, S., Palliotti, A., Poni, S., Farinelli, D., 2015. Influence of light and shoot development stage on leaf photosynthesis and carbohydrate status during the adventitious root formation in



cuttings of *Corylusavellana* L. FRONT PLANT SCI.6 (973), 1- 13.

Trupiano, D., Yordanov, Y., Regan, S., Meilan, R., Tschaplinski, T., Scippa, G.S., Busov, V., 2013. Identification, characterization of an AP2/ERF transcription factor that promotes adventitious, lateral root formation in *Populus*. PLANTA 238, 271–282.

Won, C., Shen, X., Mashiguchi, K., Zheng, Z., Dai, X., Cheng, Y., Kasahara, H., Kamiya, Y., Chory, J., Zhao, Y., 2011. Conversion of tryptophan to indole-3-acetic acid by TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASES OF ARABIDOPSIS and YUCCAs in Arabidopsis. P. Natl. Acad. Sci.-Biol. 108 (45), 18518-18523.

Zhu, J., Zhang, K. X., Wang, W. S., Gong, W., Liu, W. C., Chen, H. C., Xu, H. H., Lu, Y- T., 2015. Low temperature inhibits root growth by reducing auxin accumulation via ARR1/12. PLANT CELL PHYSIOL. 56 (4), 727-736.