UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

MAYRA CAMARGO ANDRADE COSTA

Desenvolvimento de *Setaria viridis* com ênfase no estabelecimento do meristema radicular

Piracicaba 2018

MAYRA CAMARGO ANDRADE COSTA

Desenvolvimento de *Setaria viridis* com ênfase no estabelecimento do meristema radicular

Versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011

Dissertação apresentada ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente

Orientador: Prof^a. Dr^a Adriana Pinheiro Martinelli

Piracicaba 2018 AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Costa, Mayra Camargo Andrade

Desenvolvimento de Setaria viridis com ênfase no estabelecimento do meristema radicular / Mayra Camargo Andrade Costa; orientador Adriana Pinheiro Martinelli. - versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2018. 114 p. : il.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, 2018.

1. Biotecnologia vegetal 2. Cultura de tecidos vegetais 3. Flores 4. Germinação de sementes 5. Gramíneas 6. Modelos vegetais 7. Sistema radicular I. Título.

CDU 581.14 : 582.542.11

Aos meus pais, que são a maior razão de eu ter persistido nos meus objetivos. E também a todos que já tiveram um momento de fraqueza: Não vai doer para sempre, então não deixe isso afetar o que há de melhor em você.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela minha vida, e por ter me dado saúde e força nos momentos que eu mais precisei.

Aos meus pais, por serem desde sempre os meus maiores apoiadores e exemplos de trabalho e honestidade. Tudo que eu já fiz e faço é por vocês.

À Universidade de São Paulo e ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura por serem responsáveis pela minha formação acadêmica.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela concessão da bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

À minha orientadora Adriana Pinheiro Martinelli pela oportunidade de realização do mestrado e por ter compartilhado comigo o seu conhecimento durante todos esses anos todos de convivência.

Ao professor colaborador Francisco Scaglia Linhares por ter sugerido o tema abordado no projeto, me ensinado e auxiliado nas técnicas moleculares.

Aos técnicos do Laboratório de Biotecnologia Vegetal (CENA – USP) e de Desenvolvimento e Estrutura de Plantas (LabDEV – CENA), Marcelo Favaretto Correa e Monica Lanzoni Rossi, respectivamente, por todo o conhecimento compartilhado e suporte nas análises realizadas. Agradeço especialmente a Monica por ter se comprometido com a minha pesquisa desde o início, me ensinando e acompanhando na realização de todas as técnicas de microscopia. Além disso, pela sua participação efetiva na realização de cortes e imagens que foram essenciais para a finalização deste trabalho. Serei eternamente grata pela sua paciência e por ter compartilhado comigo um pouco do seu vasto conhecimento e experiência em microscopia. Aproveito para agradecer também sua amizade, os conselhos e todos os momentos de alegria que foram compartilhados desde a minha iniciação científica até os anos que convivemos ao longo do meu mestrado.

Agradeço à Prof^a. Dr^a. Siu Mui Tsai por ter gentilmente cedido o equipamento LMD que foi utilizado para a obtenção de parte das imagens de microscopia de luz presentes no meu trabalho. Agradeço o Centro de Microscopia e Imagem da
Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP – UNICAMP) coordenado pelo Prof. Dr. Pedro Duarte Novaes por ter cedido o equipamento para as análises de microscopia confocal. Ressalto ainda o excelente apoio técnico realizado por Adriano Luis Martins e Flávia Sammartino Mariano Rodrigues que contribuíram no manuseio do equipamento. Além disso, agradeço ao Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica Aplicada a Agricultura (NAP/MEPA – ESALQ)

sob coordenação do Prof. Dr. Elliot Watanabe Kitajima que disponibilizou tanto o microscópio eletrônico de varredura como o microscópio estereoscópico de alta resolução. Agradeço também ao técnico Renato Salaroli por ter sempre se colocado à disposição para ajudar na manipulação e preparo dos equipamentos.

Aos colegas de equipe que contribuíram comigo cientificamente e me apoiaram em momentos diversos: Sandra, Carol, Tati, Aline, Sylvia, Murilo, Elcio, Taty, Mateus, Gabriele, Ana Laura, Vivian, Leonardo, Andreia, Suzy.

Aos meus amigos da ESALQ, em especial Danilo, Jaqueline, Juliani e Kelly. Obrigada por acreditarem em mim mesmo quando eu mesma não acreditava e por serem sido o meu ponto de apoio.

Ao Colom-Pira, por ter trazido pra minha vida amizades, intercâmbio científico e bons momentos compartilhados. Um agradecimento especial ao Andres que contribuiu efetivamente com as análises de raios-X.

E a todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente com a realização deste trabalho, e que participaram da minha vida durante o período do mestrado. Obrigada por terem feito parte dessa conquista.

RESUMO

COSTA, M. C. A. **Desenvolvimento de Setaria viridis com ênfase no estabelecimento do meristema radicular**. 2018. 114 p. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2018.

Setaria viridis é uma espécie de gramínea muito relevante em estudos de desenvolvimento vegetal, por determinadas características que a fazem uma excelente proposta de organismo modelo para plantas monocotiledôneas de metabolismo C4. Para que a espécie seja utilizada amplamente em estudos que visem compreender o funcionamento e desenvolvimento vegetal, bem como os mecanismos moleculares que o modulam, é essencial que aspectos de seu desenvolvimento sejam desvendados. Nesse contexto, a caracterização do meristema radicular e das estruturas presentes nos estágios iniciais da germinação é importante para se compreender como ocorre, em gramíneas, o surgimento de tipos de raízes diferentes, além de correlacionar quais fatores ambientais e endógenos estão envolvidos na escolha de diferentes arquiteturas de sistemas radiculares em gramíneas. Além disso, a caracterização do desenvolvimento de estruturas florais em Setaria viridis é importante, uma vez que traz informações que podem contribuir com um aumento na eficiência de metodologias de transformação genética para a espécie, via "spike dip". O presente trabalho caracterizou morfoanatomicamente o desenvolvimento radicular desde os estágios iniciais da germinação e o desenvolvimento floral em Setaria viridis. Além disso, buscou estabelecer relação entre o surgimento de diferentes tipos de raízes (primárias e as adventícias) com diferentes condições de luminosidade em cultivos in vitro.

Palavras-chave: Desenvolvimento floral. Desenvolvimento radicular. Germinação. Raiz primária. Raízes adventícias. *Setaria*.

ABSTRACT

COSTA, M. C. A. **Development of Setaria viridis with emphasis on the establishment of the root meristem**. 2018. 114 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2018.

Setaria viridis is a very important grass in studies of plant development, due to some characteristics that make it an excellent proposed model organism for monocotyledonous plants with C4 metabolism. To be widely used in studies that aim to understand plant functioning and development, as well as the molecular mechanisms that modulate it, it is essential that aspects of its development be unraveled. In this context, the characterization of the root meristem and structures present in the early stages of germination is also important to understand how the emergence of different root types occurs in grasses. Moreover, to correlate the environmental and endogenous factors involved in the choice of different architectures of root systems in grasses. Furthermore, the characterization of the development of floral structures in Setaria viridis is important, since it brings information that can contribute to the efficiency of methodologies of genetic transformation for the species. The present work characterized morphologically the root development during the initial stages of germination and the floral development of Setaria. In addition, it sought to establish a relationship between the emergences of different types of roots (primary and adventitious) with different light conditions in in vitro cultures.

Keywords: Floral development. Root development. Germination. Primary root. Adventitious roots. *Setaria*.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVOS	15
3. REVISÃO DE LITERATURA	16
3.1 Setaria viridis	16
3.2 Estrutura morfológica da família Poaceae e do gênero Setaria	17
3.3 Importância das gramíneas e metabolismo C4	18
3.4 Germinação de sementes de gramíneas e Setaria viridis	19
3.5 Importância e desenvolvimento da raiz em monocotiledôneas	20
3.6 Auxina no desenvolvimento vegetal	21
3.7 Genes relacionados ao estabelecimento da identidade da raiz e técnicas moleculares para estudo de expressão gênica	22
3.8 Transformação genética de plantas mediada por Agrobacterium tumefaciens	24
4 MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1 Condições de crescimento e assepsia de Setaria viridis	26
4.2 Técnicas microscópicas	27
4.2.1 Microscopia de luz	27
4.2.2 Microscopia eletrônica de varredura	28
4.2.3 Microscopia confocal	29
4.2.4 Análises no microscópio estereoscópico de alta resolução	30
4.3 Acompanhamento do crescimento de raízes in vitro	30
4.4 Transformação genética de Setaria viridis	30
4.4.1 Testes de concentração letal de glufosinato de amônio (BASTA®) para	
sementes selvagens	34

4.4.2 Seleção das plantas transformadas com glufosinato de amônio (BASTA®)
4.4.3 Seleção dos transformantes por extração de DNA e PCR
4.5 Análise de raios X de sementes de <i>Setaria viridis</i>
4.6 Teste de viabilidade com tetrazólio em sementes de Setaria viridis
5. RESULTADOS
5.1 Desenvolvimento floral
5.2 Germinação e desenvolvimento radicular45
5.3 Crescimento de diferentes tipos de raízes60
5.4 Transformação genética e análise dos transformantes
5.5 Análise de raios X e viabilidade de sementes82
6. DISCUSSÃO
7. CONCLUSÕES
REFERÊNCIAS107

1. INTRODUÇÃO

Considerando as notáveis mudanças no clima em todo o mundo, e a crescente necessidade por recursos como alimento e energia, as gramíneas têm papel fundamental na agricultura, uma vez que elas correspondem a grande parte das espécies destinadas à produção de biomassa para tais finalidades. Entre as características que deram às gramíneas vantagem seletiva na produção de biomassa está a utilização de um metabolismo fotossintético mais eficiente em condições de clima quente, denominado de metabolismo C4. O estudo de sistemas modelos tais como *Arabidopsis thaliana*, que não possuem metabolismo C4 permitiu o esclarecimento de muitos mecanismos moleculares, mas não do metabolismo C4.

A partir do momento em que espécies de gramíneas começaram a ser cogitadas como modelos, algumas características como a poliploidia e o tamanho do genoma que, muitas vezes inviabilizavam o estabelecimento destas como modelos que pudessem ser reproduzidos em larga escala, necessitavam ser superadas. Contudo, a espécie de gramínea C4 denominada Setaria viridis, com seu genoma compacto e diploide, surgiu atendendo a todas as outras condições desejáveis para uma espécie vegetal modelo. Assim, a espécie vem ganhando espaço em estudos que busquem compreender como ocorre o desenvolvimento vegetal e quais os mecanismos moleculares que modulam a formação de padrão em espécies monocotiledôneas. A compreensão de aspectos ligados à biologia floral de Setaria viridis são essenciais, visto que há uma escassez de dados para a espécie e que tais informações podem ser importantes na otimização de técnicas de transformação genética e nos cruzamentos de mutantes obtidos a partir desta técnica. Outro aspecto importante é o entendimento do desenvolvimento radicular da espécie S. viridis. Há relatos de que, em algumas espécies de monocotiledôneas a raiz primária se degenera poucos dias após sua formação, quando a planta inicia o desenvolvimento de raízes adventícias num processo que pode ser modulado por um fluxo polar de auxina e conjuntos gênicos específicos que respondem à concentração desse hormônio.

Assim, o intuito desse trabalho é o de caracterizar morfoanatomicamente o meristema radicular e o desenvolvimento reprodutivo de *Setaria viridis*, bem como entender qual o papel da auxina nesse processo. Essa compreensão é importante uma vez que pode indicar quais os mecanismos que geram diferentes fenótipos de sistemas radiculares em plantas. A utilização de *Setaria viridis* como organismo modelo em estudos de estresse abiótico podem contribuir quanto ao conhecimento, e também no avanço de técnicas de manejo relacionadas à produtividade de plantas monocotiledôneas.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral é a caracterização do desenvolvimento das raízes primária e adventícias e a obtenção de um sistema para estudo dos fluxos de auxina no desenvolvimento da espécie modelo *Setaria viridis*.

Os objetivos específicos compreendem a:

- Caracterização da germinação e do crescimento da raiz primária e adventícias em Setaria viridis sob diferentes condições de luz;
- II. Caracterização morfoanatômica do desenvolvimento reprodutivo e do meristema radicular em Setaria viridis;
- III. Transformação genética de Setaria viridis para obtenção de plantas expressando o promotor sintético responsivo à auxina (DR5-RFP), para avaliação dos fluxos polares de auxina durante o desenvolvimento do meristema radicular.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Setaria viridis

O gênero Setaria, pertencente à família Poaceae (Subfamília Panicoideae), contém aproximadamente 125 espécies distribuídas em ambientes tropicais, subtropicais e zonas temperadas no mundo todo (DIAO et al., 2014; DOUST et al., 2009). Esse gênero contém representantes bem diversos, incluindo espécies comuns a ambientes naturais, e também plantas invasoras de ambientes agrícolas. Dentre essas espécies, *Setaria viridis* e sua forma domesticada (*S. italica*) são consideradas importantes no gênero, pois apresentam características que as tornam excelentes organismos modelos para estudos genômicos envolvendo plantas com metabolismo C4 (HUANG et al., 2014).

Dentro da família Poaceae são encontradas outras gramíneas de importância econômica como milho, sorgo, capins forrageiros e a cana-de-açúcar, que são utilizadas tanto na alimentação quanto na produção de energia (LI; BRUTNELL, 2011). No cenário agrícola atual há a necessidade de se estabelecer organismos vegetais que sirvam de modelo para o entendimento dos processos biológicos básicos que acontecem nas plantas (BRUTNELL et al., 2010).

Nesse contexto, a espécie *Setaria viridis* vem sendo considerada uma planta modelo para gramíneas. O tamanho relativamente pequeno do genoma e da planta, a grande produção de sementes e o ciclo de vida curto (6 a 8 semanas), aliados às condições não muito exigentes de crescimento, são apenas alguns dos fatores importantes para o estabelecimento de *Setaria viridis* como planta modelo (HUANG et al., 2014; MARTINS et al., 2015a).

No entanto, o que difere *S. viridis* de outros modelos vegetais já bem estabelecidos, como é o caso de *Arabidopsis thaliana* e também das espécies de gramíneas *Brachypodium distachyon e Oryza sativa* (BRUTNELL et al., 2010; BRUTNELL; BENNETZEN; VOGEL, 2015), é o fato de que *Setaria viridis* tem metabolismo C4, além de apresentar genoma compacto e diplóide. Assim, *S. viridis* foi determinante para o estabelecimento de um modelo menos problemático para plantas com metabolismo C4 (ERMAWAR et al., 2015).

Outros modelos anteriormente usados para plantas C4, como o sorgo e outras gramíneas forrageiras, foram logo considerados inviáveis quando comparados a *Setaria viridis*, principalmente devido ao tamanho elevado da planta adulta e frequente ocorrência de poliploida (DIAO et al., 2014).

3.2 Estrutura morfológica da família Poaceae e do gênero Setaria

O estudo da morfologia da família Poaceae é importante, pois, neste grupo estão localizadas algumas das principais espécies de gramíneas relevantes no cenário agronômico. Do ponto de vista da biologia do desenvolvimento, compreender quais são e como se desenvolvem as estruturas nessas espécies pode ampliar o conhecimento e, portanto, promover uma futura aplicação dele em diversas técnicas genômicas. Além disso, características como a morfologia e arquitetura das inflorescências são muito utilizadas em gramíneas como caracteres classificatórios e que distinguem espécies dentro dos diferentes gêneros, o que ocorre também com o próprio gênero *Setaria*. Sendo, portanto, importantes para promover a melhor compreensão de como esse grupo foi se modificando ao longo da evolução (DOUST; KELLOGG, 2002).

As plantas pertencentes à família Poaceae podem ser anuais ou perenes, herbáceas ou de característica sublenhosa a lenhosa. Os colmos têm nós sólidos e entrenós que podem ser sólidos ou ocos, dependendo da espécie. As folhas são alternas, dísticas, formadas por bainha fundida, lâmina e lígula. No que se refere às estruturas florais do gênero, as inflorescências são formadas por conjuntos de flores caracterizados como espiguetas. Tais estruturas por sua vez estão reunidas em panículas de formato típico ou, menos comumente, em espigas. As espiguetas podem ou não ser pediceladas, podendo apresentar estruturas como as glumas (internas e/ou externas), o lema e a pálea que, juntamente com as flores, compõem os antécios. Os antécios são compostos geralmente por flor bissexuada. podem ter também flores exclusivamente uma mas femininas/masculinas ou estéreis/neutras, além dos casos nos quais não há flor no antécio e o mesmo é frequentemente reduzido ao lema. A flor apresenta frequentemente 1 a 3 estames; ovário com 2 a 3 carpelos, 1 lóculo, 2 a 3 estigmas plumosos e frutos geralmente do tipo cariopse (WANDERLEY; SHEPPERD; GIULIETTI, 2001). Os tipos de reprodução das gramíneas variam entre fecundação cruzada, autofecundação e apomixia, esta última já relatada inclusive em algumas espécies do gênero Setaria (EMERY, 1957).

No gênero Setaria, as inflorescências são dispostas em panículas eretas, com formato cilíndrico, ramos curtos e com número elevado de espiguetas. As panículas são compostas então por unidades menores que recebem o nome de espiguetas, nestas pode ser observada a presença de cerdas. Cada espigueta possui um par de glumas desiguais, e é composta por 2 antécios envoltos por lema e pálea, sendo o antécio inferior estéril e o antécio superior portador de uma flor bissexual. Essa flor tem 3 estames e o fruto produzido a partir dela é uma cariopse elíptica (ROMINGER, 1962; WANDERLEY; SHEPPER; GIULIETTI, 2001).

3.3 Importância das gramíneas e metabolismo C4

O metabolismo C4 é muito representativo e importante para lavouras típicas de climas tropicais, como milho, sorgo, cana de açúcar e os capins, pois o mesmo se adapta melhor a climas quentes. Conforme o aumento da temperatura as plantas C3 perdem eficiência fotossintética, pelo processo de fotorespiração, que reduz a fixação de CO₂ porque o O₂ toma o sítio reativo da RuBisCO (ribulose -1,5-bifosfato carboxilase oxigenasse). Já as C4 têm um metabolismo particular no qual as trocas gasosas que ocorrem no mesófilo resultam na fixação e acúmulo de moléculas contendo 4 átomos de carbono nas células da bainha. A compartimentalização desses compostos contendo carbono resulta em um microambiente rico em CO₂ nas células da bainha que é favorável à fotossíntese e desfavorável à fotorespiração, principalmente em ambientes de temperatura mais elevada. Tal fato confere maior eficiência fotossintética às plantas C4 e se caracteriza como uma vantagem seletiva destas em ambientes e climas comuns à região brasileira, explicando o relativo destaque que elas apresentam na produção de biomassa do país.

Uma das maiores preocupações atuais da agricultura é a capacidade de produzir alimento e energia suficientes para manter a crescente população global.

Com a utilização de biomassa vegetal para obtenção de energia e uso na alimentação, um recente desafio é o de aumentar a produção de grãos destinados a tais finalidades, principalmente em um cenário de mudanças climáticas (BRUTNELL et al., 2010).

Muitas gramíneas e cereais são importantes para alimentação humana e animal, além de serem fontes energéticas eficientes. Dentro da família das gramíneas existem muitos representantes que apresentam metabolismo C4, como é o caso do milho, sorgo e da cana-de-açúcar. Tais espécies, bem como Setaria *viridis*, além de terem metabolismo de plantas C4, sendo, portanto, mais eficientes, são ainda mais tolerantes a patógenos, a deficiências minerais, salinidade e seca (MUTHAMILARASAN et al., 2015). O ideótipo de raiz presente na planta, que tem características completamente distintas em mono e dicotiledôneas, pode indicar diferenças adaptativas potencialmente relacionadas a um fenótipo radicular melhor adaptado em condições de estresse nutricional. Essas características tornam as plantas C4 muito interessantes do ponto de vista agronômico, sendo relevantes em estudos que visem melhorias na produção vegetal (HUANG et al., 2014) e em muitos processos que envolvem resposta a estresses abióticos (LI; BRUTNELL, 2011). Considerando todas essas características, o genoma de Setaria viridis foi sequenciado com o intuito de explorar todo o seu potencial em estudos genômicos voltados para o desenvolvimento de vias metabólicas e melhoramento de grãos, principalmente em plantas C4 importantes para alimentação e biocombustíveis (MUTHAMILARASAN; PRASAD, 2015).

3.4 Germinação de sementes de gramíneas e Setaria viridis

A germinação é essencial para a semente e na ativação de seus processos metabólicos (BARBERO et al., 2011). Alguns fatores externos influenciam na germinação de sementes, como a disponibilidade de luz, nutrientes, água, oxigênio e a temperatura ambiente, além de fatores endógenos que podem gerar algum tipo de inibição à germinação, como os que ocorrem em sementes que apresentam dormência. A germinação de sementes se inicia pela protrusão da radícula (FERREIRA; BORGHETTI, 2004), e pode ser observada em gramíneas a olho nu, sendo caracterizada principalmente pela emergência da coleorriza através do pericarpo. A presença de dormência em *Setaria viridis* foi relatada inicialmente por

Heise (HEISE, 1941) e pode ser relacionada a uma provável adaptação evolutiva que garantiria que as sementes de gramíneas germinassem apenas em períodos e condições ambientais favoráveis à sobrevivência da espécie.

3.5 Importância e desenvolvimento da raiz em monocotiledôneas

O sistema radicular em plantas terrestres tem como principais funções a fixação do vegetal ao substrato, bem como a absorção de água e de minerais necessários à germinação da semente e ao desenvolvimento da planta (LAVENUS et al., 2013). As raízes se originam a partir do desenvolvimento do eixo hipocótiloradícula na embriogênese. Acontece assim a formação da raiz primária, que por sua vez dá origem às raízes secundárias. No entanto, existem raízes denominadas adventícias que não se originam da raiz primária. Em algumas monocotiledôneas a raiz primária atrofia poucos dias após o início do seu desenvolvimento (ESAU, 1976), portanto as raízes presentes em plantas maduras desse grupo de plantas são caracterizadas como adventícias e têm origem na base caulinar (SOUZA; FLORES; LORENZI, 2013) ou acima do local de origem da raiz primária (ESAU, 1962). As raízes adventícias têm sido alvo de estudos biotecnológicos (ATKINSON et al., 2014), pois conferem às monocotiledôneas maior eficiência na absorção de água e nutrientes presentes em camadas mais profundas do solo, gerando, consequentemente, maior resistência em condições de estresse hídrico. Sendo assim, o sistema radicular vegetal influencia na sobrevivência da planta, podendo inclusive se manifestar como um diferencial em condições de mudanças ambientais.

Nas últimas décadas, trabalhos com *A. thaliana* têm demonstrado que poucos sinais hormonais desencadeiam a formação de padrão organizado no desenvolvimento vegetal, em especial àqueles exigidos na formação da raiz (SENA et al., 2009). No entanto, pouco se sabe sobre esse mecanismo em espécies de monocotiledôneas que possuem estruturas radiculares diversificadas e melhor adaptadas às condições de aquecimento global. Modelagens matemáticas (LYNCH; WOJCIECHOWSKI, 2015) relatam uma direta correlação entre condição limitante de crescimento e o ideótipo específico da raiz, postulando assim a existência de um fenótipo radicular melhor adaptado a diferentes condições ambientais. Neste sentido, o ideótipo de raiz adventícia da coroa, presente em

monocotiledôneas, se mostra mais adequado a solucionar problemas como estresse hídrico e carência de nitrogênio enquanto possui um sistema radicular tubular profundo que lhe permite alcançar mais facilmente água e nutrientes hidrossolúveis, como o nitrogênio. Já o sistema radicular ramificado e raso, típico de raízes primárias, parece ser o ideótipo melhor adaptado a solos carentes em fosfato, posto que este nutriente se posiciona nas camadas superiores do solo, ricas em matéria orgânica. Nesse contexto, entender como determinado sistema se monocotiledôneas desenvolve em é muito relevante em estudos de desenvolvimento, tendo aplicabilidade no aumento da produção vegetal via otimização dos recursos utilizados na agricultura em condição de estresse nutricional (TIAN; DE SMET; DING, 2014).

3.6 Auxina no desenvolvimento vegetal

A plasticidade observada no desenvolvimento de plantas e sua capacidade em responder ao ambiente indicam que provavelmente os mecanismos bioquímicos que levam a tais processos são bem complexos. Apesar de existir uma série de hormônios vegetais atuantes no desenvolvimento, a auxina tem se mostrado como o hormônio vegetal mais significante no estabelecimento de sinais morfogenéticos à planta adulta (DE SMET et al., 2010), pois através de seus fluxos polares de transporte faz com que a molécula se acumule em determinados locais da planta, desencadeando por meio de gradientes de concentração uma resposta gênica primária diferencial (BENKOVÁ et al., 2009). Portanto, o transporte polar de auxina é crucial na expressão diferencial dos genes que vão modular processos específicos no desenvolvimento de diversos tipos de tecidos vegetais (KEIFFER; NEVE; KEPINSKI, 2010; SMIT; WEIJERS, 2015).

Estudos com gramíneas, como o arroz e o milho, indicam que a auxina é essencial na formação da raiz, tanto no posicionamento e manutenção da raiz da coroa, como na formação embrionária da raiz primária (KITOMI et al., 2012; WANG et al., 2014). Com o uso de um bloqueador de transporte auxínico foi demonstrado que o mesmo é muito importante na regeneração dos tecidos da raiz, sendo indispensável na organogênese vegetal, principalmente naquela observada na região meristemática da raiz (OVERVOORDE; FUKAKI; BEECKMAN, 2010; SENA et al., 2009). Devido a essa importância nos estudos de desenvolvimento, muitas

técnicas moleculares foram desenvolvidas para que a concentração e disposição de auxina nas plantas fossem de alguma forma mensuradas, dentre elas o uso de sistemas que reportam a presença de auxina. Um promotor sintético responsivo à auxina muito utilizado em plantas modelo como Arabidopsis thaliana (SENA et al., 2009), e também em gramíneas de interesse econômico como o milho e soja, é o DR5. Tal promotor sinaliza eficientemente a distribuição de auxina em nível celular, sendo frequentemente associado a técnicas de microscopia (REYES-OLALDE; MARSCH-MARTÍNEZ; DE FOLTER, 2015), com a utilização de marcadores moleculares como GUS e/ou GFP, na avaliação do efeito da auxina em diferentes processos no desenvolvimento vegetal (LI et al., 2015). Posto que a auxina tem um papel já reconhecido na manutenção do sistema primário e na insurgência de raízes adventícias, com esse trabalho busca-se entender se a perda da raiz primária leva a alguma modificação nos fluxos auxínicos que desencadeiam o desenvolvimento de raízes adventícias em Setaria viridis. A compreensão desse mecanismo poderá contribuir para o entendimento da modulação que origina diferentes tipos de raízes em plantas, e também para entender o papel evolutivo desse mecanismo aparentemente modulado pela auxina.

3.7 Genes relacionados ao estabelecimento da identidade da raiz e técnicas moleculares para estudo de expressão gênica

Avanços nas técnicas moleculares e na caracterização transcritômica e proteômica de plantas, especialmente as gramíneas de interesse comercial, permitiram a identificação de genes envolvidos na embriogênese (ZHAO et al., 2014). Em trabalhos onde o enfoque é o desenvolvimento de plantas, busca-se a identificação de genes relacionados ao estabelecimento de determinado padrão celular que resultará no desenvolvimento de estruturas vegetais de interesse (DE OLIVEIRA et al., 2014). Desse modo, alguns genes podem atuar como marcadores moleculares de determinada região ou tipo celular, e quando avaliada essa expressão gênica e os locais onde esta atua, há a possibilidade de se traçar modelos para o desenvolvimento embrionário e/ou pós embrionário e compará-los entre espécies vegetais. O estabelecimento da identidade do meristema radicular é modulado por uma série de fatores de transcrição e genes já bem conhecidos, dentre eles os genes *WOX 5, PLETHORA* e *SCARECROW.* O gene *WOX5* é

membro de uma família gênica com domínio conservado de fatores de transcrição que são importantes em plantas porque têm atuação na regulação e manutenção de regiões meristemáticas, incluindo o meristema radicular (PI et al., 2015). Em monocotiledôneas como o arroz, milho e o trigo, a expressão de genes da família *WOX* já foi caracterizada (ZHANG et al., 2010; ZHAO et al., 2014).

Duas vias principais atuam na especificação do meristema radicular, sendo elas a via *PLETHORA* e a via *SHORTROOT/SCARECROW*. O gene *SCR* codifica um fator de transcrição pertencente à família *GRAS* de genes vegetais e seu produto é requerido na manutenção das células meristemáticas da raiz, funcionando como reguladores do padrão radial da raiz de *Arabidopsis thaliana* (CUI et al., 2014). Os genes responsivos à auxina *PLT 1-4* que codificam fatores de transcrição da família *AP2* são também essenciais para o meristema radicular (YANG et al., 2015). Genes da família *PLT* são também muito relevantes na regeneração de órgãos, estabelecendo essa competência por meio da ativação de reguladores da região meristemática da raiz e do caule (GALINHA et al., 2007). O aumento em número e viabilidade de ferramentas moleculares para o estudo de desenvolvimento do meristema radicular em espécies modelo (PAULUZZI et al., 2012), geram resultados que podem colaborar para o entendimento de redes gênicas que atuam no mesmo processo em espécies como *Setaria viridis*.

A hibridização *in situ* é uma metodologia comumente utilizada no estudo do desenvolvimento de diversos tipos de estruturas vegetais (SARKAR et al., 2007; SEGATTO et al., 2013), pois permite a avaliação dos padrões de expressão gênica em cortes histológicos e, portanto, tal expressão pode ser avaliada no local onde ela ocorre na planta. Outra técnica relevante para estudos genômicos de plantas é a transformação genética. Neste trabalho, a escolha do método floral dip (que produz sementes modificadas geneticamente sem a exigência do cultivo "in vitro" das plantas) como o mais eficiente foi baseada nos estudos de MARTINS et al. (2015b) que demonstrou que tal método de transformação foi muito relevante no estabelecimento de *Arabidopsis thaliana* como planta modelo, e, portanto, poderia também ser aplicado de forma simples e eficaz em estudos com a planta modelo *Setaria viridis*.

3.8 Transformação genética de plantas mediada por Agrobacterium tumefaciens

A transformação genética de plantas, além de seu uso no melhoramento genético, é uma ferramenta importante no estudo do desenvolvimento vegetal. Consiste na transferência de determinada sequência de nucleotídeos para um genoma receptor, ocasionando a partir daí uma mudança no genoma do mesmo que pode vir a representar novas características fenotípicas. Existem técnicas que compreendem abordagens físicas e biológicas para a realização desse processo (HANSEN; WRIGHT, 1999), no entanto, a utilização da transformação genética de plantas mediada pela bactéria *Agrobacterium tumafaciens* vem sendo utilizada há muitos anos, principalmente em plantas modelos importantes em estudos de desenvolvimento vegetal (VALVEKENS; MONTAGU; LIJSEBETTENS, 1988).

A utilização de A. tumefaciens como mediadora do processo de transformação genética tem suas origens em um mecanismo já presente naturalmente na infecção de algumas plantas susceptíveis a essa bactéria. Esta bactéria é encontrada no solo e é considerada um patógeno, pois, causa em muitas plantas dicotiledôneas a doença conhecida como galha da coroa (CARVALHO et al., 2011). Na infecção, a bactéria transfere para as plantas uma porção do plasmídeo Ti (tumor inducing), que ao ser introduzido no núcleo da célula da planta hospedeira, faz com que a mesma produza nutrientes específicos que contribuem para o crescimento e manutenção da bactéria, o que pode ser visto pelo aparecimento de tumores geralmente presentes no caule ou na raiz. Na aplicação desse mecanismo na transformação genética, as linhagens de A. tumefaciens empregadas tiveram os genes responsáveis pela produção de compostos e formação da galha deletados, e em seu lugar foram inseridas sequências de DNA que codificam para características de interesse (TORRES; DUSI; SANTOS, 2007). Diante disso, a técnica de transformação genética de plantas é muito importante, pois possibilita inovação, não somente para a agricultura, alimentação e indústria farmacêutica, mas também porque plantas transgênicas são ferramentas para estudos que visam desvendar mecanismos básicos em desenvolvimento vegetal (HANSEN; WRIGHT, 1999).

Apesar de ser um mecanismo muito importante para plantas dicotiledôneas, inclusive para espécies florestais (DIBAX et al., 2010) e para *Arabidopsis thaliana* (VALVEKENS; MONTAGU; LIJSEBETTENS, 1988), a transformação por *A. tumefaciens* já vem sendo utilizada há algumas décadas também em espécies monocotiledôneas, especialmente aquelas relevantes do ponto de vista agronômico, como é o caso de arroz (RAINERI et al., 1990), trigo (HU et al., 2003), milho (CHO et al., 2014) e cana de açúcar (MAYAVAN et al., 2015).

No procedimento clássico há a necessidade de cultivo e regeneração *in vitro* do material submetido à transformação genética, o que muitas vezes pode representar uma dificuldade para espécies nas quais os protocolos de cultura de tecidos ainda não estão muito bem estudados, e também consumindo não só tempo, como também recursos. Sendo assim, em estudos de desenvolvimento de plantas têm se buscado uma facilitação desse processo de transformação genética por meio de uma introdução direta *in planta*, ou seja, infiltrando o tecido vegetal adulto com *A. tumefaciens* e eliminando a necessidade do posterior cultivo in vitro (BECHTOLD; ELLIS; PELLETIER, 1993). Quando são utilizadas as inflorescências da planta no processo de transformação a essa técnica se dá o nome de "floral dip", e esta vem sendo muito buscada por pesquisadores como substituta aos métodos clássicos de transformação, principalmente por ser considerada fácil e de alta confiabilidade (CLOUGH; BENT, 1998).

Nesse contexto, a utilização de *A. tumefaciens* é uma alternativa à transformação genética também de monocotiledôneas do gênero *Setaria* (BRUTNELL et al., 2010), incluindo tanto técnicas clássicas (MARTINS et al., 2015a) como também protocolos para transformação via "floral/spike-dip" para *Setaria italica* (WANG et al., 2011) e para *Setaria viridis*, como proposto por alguns grupos de pesquisa (MARTINS et al., 2015b).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Condições de crescimento e assepsia de Setaria viridis

No presente experimento foram utilizadas sementes de *Setaria viridis* da variedade selvagem A10, provenientes inicialmente do laboratório do Prof. Marcio Alves Ferreira (Departamento de Genética – Universidade Federal do Rio de Janeiro/UFRJ). Tais sementes foram germinadas no Laboratório de Biotecnologia Vegetal (CENA/USP) nas condições descritas abaixo.

Para os experimentos com plantas em substrato (Figura 1A) as plantas foram crescidas em câmera de crescimento, em substrato com adição de vermiculita (3:1), sob regime de 16/8 h de luz/escuro, a temperaturas de 31/22°C, respectivamente. A umidade relativa do ar foi mantida constante (50%) e a intensidade luminosa era de 550 µmol/m²/sec.

Figura 1 - Cultivo de *Setaria viridis* em substrato (A) e *in vitro* em placa (B) e tubo de ensaio (C)



Para os experimentos *in vitro*, as sementes de Setaria viridis foram escarificadas manualmente para a remoção de glumas, páleas e lemas. Em seguida, foram desinfestadas com vapores de cloro A esterilização foi realizada em dessecador de vidro, dentro do qual foram colocados um becker contendo 100 ml de cloro gel e 3 ml de ácido clorídrico (12 M) e, separadamente, foram colocadas as sementes já escarificadas dentro de um tubo Falcon aberto. O dessecador era mantido selado por 1h30 e depois as sementes eram ventiladas em fluxo laminar por 4 horas. Para todos os experimentos *in vitro*, em meio de cultura.

Em alguns experimentos do presente trabalho as sementes já desinfestadas ficaram embebidas em uma solução aquosa contendo GA₃ (2,89 mM) e KNO₃ (30 mM), por 12 horas e, posteriormente, foram lavadas em água destilada autoclavada por 3 vezes. Tal processo visa uma maior uniformização da germinação e perda de dormência (SEBASTIAN et al., 2014). Assim, após esses procedimentos descritos acima, as sementes foram germinadas e crescidas em placas verticais (Figura 1B), tubos de ensaio (Figura 1C), frascos magenta ou placas horizontais – dependendo do experimento - contendo meio de cultura ½ MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), contendo metade da concentração de nutrientes, 8g/L de ágar ou phytagel e 30g/L de sacarose em sala de crescimento e nas condições já descritas.

Para as análises de desenvolvimento floral foram utilizadas panículas provenientes de plantas cultivadas em substrato, em diferentes estágios do desenvolvimento. As amostras foram coletadas e preparadas para diferentes análises microscópicas como descrito no item 4.2.1 e 4.2.2.

4.2 Técnicas microscópicas

4.2.1 Microscopia de Luz

As amostras foram fixadas em solução de Karnovsky (KARNOVSKY, 1965) modificado (glutaraldeido (2 %), paraformaldeido (2 %) e cloreto de cálcio (5 mM) em tampão cacodilato de sódio (0,05 M); pH 7,2), por 48 horas, desidratadas em série etílica crescente (35, 50, 60 e 70, 85, 95% uma vez e 100% três vezes, 30 min cada), seguido de propanol (100%) e butanol (100%), duas trocas de 2 horas cada.

Foram infiltradas lentamente em butanol:meio de infiltração (3:1, 1:1, 1:3 e meio de infiltração puro) e emblocadas em historesina, seguindo as instruções do fabricante (hidroxietilmetacrilato, Leica Heldelberg).

A polimerização foi realizada à temperatura ambiente por 48 horas. Cortes histológicos seriados (4-5 µm) foram obtidos em micrótomo rotativo (Leica RM2155, Alemanha), dispostos em água e coletados em lâminas histológicas, secos em placa aquecedora a 40°C e corados com fucsina básica (1 % p/v), seguido de azul de toluidina (0,05 % p/v) (FEDER; OBRIEN, 1968). Os cortes histológicos foram analisados em microscópio de luz (Carl Zeiss, Axioskop 40, Alemanha) e imagens digitais foram obtidas.

Foi realizado também o processamento em resina Spurr que se deu da seguinte forma: As amostras foram fixadas em solução de Karnovsky (KARNOVSKY, 1965) modificada conforme acima, por 24 horas. Posteriormente, foram lavadas em tampão cacodilato de sódio (0,1 M), seguido de pós-fixação em tetróxido de ósmio (1 %) no mesmo tampão, lavagens em solução salina (0,9% de cloreto de sódio) e pré-coloração em acetato de uranila (2,5 %), overnight. Em seguida, as amostras foram desidratadas em séries crescentes de acetona (25-100 %), infiltradas lentamente em resina Spurr nas proporções 1:3 por 4 h, 1:1 por 4 h, 2:1 por 12h e resina pura por 8 h. As amostras foram emblocadas em Spurr, por 48 h, a 70 °C. Cortes semi-finos foram obtidos em ultra-micrótomo (Sorval MT1-Porter-Blum). As secções foram analisadas e imagens digitais obtidas ao microscópio de luz (Carl Zeiss, Axioskop 40, Alemanha).

Nas análises de desenvolvimento floral foram utilizadas panículas provenientes de plantas crescidas em substrato, em diferentes estágios do desenvolvimento. As panículas e espiguetas foram submetidas ao mesmo processo de fixação utilizado para as sementes e raízes de *Setaria viridis*, e posteriormente emblocadas em historesina como sugerido acima.

4.2.2 Microscopia eletrônica de varredura

Foram utilizadas sementes de *Setaria viridis* que passaram por tratamento prévio com GA₃/KNO₃ e foram germinadas em placa vertical contendo meio de cultura ½ MS (item 4.1), por até 12 dias. O comportamento das sementes foi

observado em lupa (Leica EZ4E) e estas foram divididas em 5 grupos (Tabela 1), correspondentes ao estágio de germinação e do desenvolvimento da raiz primária.

As amostras de material já divididas nos grupos foram fixadas em solução de Karnovsky modificada, como descrito para microscopia de luz (item 5.2.1). A desidratação foi realizada em série etílica crescente nas seguintes concentrações: 20%; 30%; 40%; 50%; 60%, 70%; 80%, 90% 1 vez de 30 minutos cada e 100%, 3 vezes de 1 hora. Posteriormente as amostras foram secas ao ponto crítico (Leica EM CPD 300) utilizando CO₂ líquido e a seguir montadas em suportes metálicos ("stubs"), sendo metalizadas com ouro durante 180 segundos ao metalizador (Sputter Coater, Leica EM ACE 600). As imagens foram obtidas ao microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM-IT300 LV (Tokyo Japão) a 20 kV do NAP-MEPA-ESALQ/USP sendo as imagens digitalizadas.

Para as análises referentes ao desenvolvimento floral em microscopia de varredura foram utilizadas panículas provenientes de plantas crescidas em substrato em diferentes estágios do desenvolvimento, e o processamento do material foi idêntico ao realizado para as sementes e raízes.

4.2.3 Microscopia confocal

Como amostras foram utilizadas raízes de *S. viridis* cultivadas *in vitro*, no início do processo de germinação (4 a 10 dias após a germinação - dpg). As plântulas contendo as raízes foram retiradas do meio de cultura, lavadas em água destilada esterilizada e as raízes individualizadas com auxílio de bisturi. Após a separação das raízes, as mesmas foram imersas em iodeto de propídio (10 ug/ml) por 15 minutos, lavadas em água destilada, montadas em lâminas e observadas em microscópio confocal (Leica TCS SP5) no Centro de Microscopia e Imagens (CMI) da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP/UNICAMP). As amostras foram montadas em lâminas com água e excitadas com laser de argônio a 488 nm e o sinal detectado no comprimento de onda 670-800 nm. Imagens digitais foram obtidas para observações de cortes óticos e imagens em três dimensões.

4.2.4 Análises ao microscópio estereoscópico de alta resolução

Foram utilizadas sementes de *Setaria viridis* previamente tratadas com GA₃, provenientes de cultivo *in vitro*. As amostras foram coletadas no início do processo de germinação (de 12 horas a 10 dias após a germinação), retiradas das placas verticais e lavadas em água destilada. Após isso, foram observadas ao microscópio estereoscópico de alta resolução Hirox (NAP-MEPA-ESALQ/USP) e imagens digitais foram obtidas.

4.3 Acompanhamento do crescimento das raízes

Um total de 452 sementes escarificadas e desinfestadas de *S. viridis*, sem terem passado por tratamento prévio com GA₃/KNO₃, foram colocadas para germinar em meio de cultura ½ MS em tubos de ensaio contendo 50 mL de meio cada um. Foram colocadas duas sementes por cada tudo de ensaio, estando as mesmas adjacentes à parede do tubo e com o máximo de distância entre elas possível (180°). As mesmas foram cultivadas em sala de crescimento nas condições já descritas no item 5.1 e avaliadas dia-a-dia quanto a germinação e crescimento da raiz primária e da primeira raiz adventícia, por um período de 13 e 25 dias. Para avaliação do efeito de diferentes condições de luz no início da germinação e a consequência disso na relação entre raiz primária e adventícia, das 452 sementes analisadas, metade delas foram submetidas a 5 dias no escuro, e só depois foram regularmente medidas quanto às variáveis avaliadas (crescimento e germinação de raízes).

4.4 Transformação genética de Setaria viridis

Para as etapas de transformação genética do presente trabalho foi utilizada uma construção do sensor sintético da auxina DR5-RFP em um vetor compatível com a transformação de monocotiledôneas que foi generosamente cedido pelo Prof. David Jackson (CSHL – USA). O vetor cedido é o vetor molde pTF101.1 com modificações (Figura 2), segundo Galavarotti e colaboradores (GALLAVOTTI et al., 2008). Posteriormente, a presença do vetor foi confirmada por reação de PCR.

Figura 2 - Vetor Gateway pTF101.1 utilizado no presente trabalho com a adição de um cassete contendo a construção DR5-RFP. Imagem retirada do site: http://www.agron.iastate.edu/ptf/procedures/pTF101.1gw1%20map%20new.pdf



Para a transferência do vetor para uma linhagem desarmada de *Agrobacterium tumefaciens* foram preparadas células competentes da linhagem AGL1 e, posteriormente, foi realizada a transformação para a bactéria. Ambos os procedimentos foram feitos conforme o protocolo de Lacorte e Romano (2015), por meio de eletroporação. Na eletroporação foi utilizado o eletroporador MicroPulser Eletroporator Apparatus (Bio Rad, USA) seguindo as intruções do fabricante para uma cubeta de 0,1 cm. Os antibióticos utilizados nessa etapa foram Ampicilina (100 mg/L), Rifampicina (50 mg/L) e Spectinomicina (100 mg/L), em meio de cultura YEP. As culturas foram crescidas a 28°C por 2 dias.

Após o crescimento das colônias de *Agrobacterium tumefaciens* potencialmente transformadas por seleção com o antibiótico spectinomicina, foi feita uma reação de PCR de colônia para confirmar a presença do inserto com utilização do conjunto de oligonucleotídeos (primers) DR5 P1+RFP P4 e DR5 P1+RFP Rev 3 (Tabela 1).

	Primer	Sequência (5'-3')	Tm (°C)	N⁰ de bases			
	DR5 P1	GTCGACGGTATCGCAGCCCAG	63,4	21			
	RFP P4	GCATGCCTGCAGGTCAC	57	17			
	RFPRev 3	GCACGAATTCGGGCGCCGGTGGAGTGGCGGCC	75	32			
Prir	Primer forward: DR5 P1; primers reverse RFP P4 e RFPREV3						

Tabela 1 - Oligonucleotídeos (primers) utilizados nas reações de PCR

Na reação de PCR foram utilizadas, além do DNA, os seguintes componentes: primers (10µM), DNTP (5mM), Buffer 10x, MgCl2 (2,5mM), enzima Taq (5U/µL), DMSO (2%) e água miliQ. A reação de PCR ocorreu a temperatura de anelamento de 54°C para o conjunto DR5 P1/RFP P4, e 59°C para o conjunto DR5 P1/RFP Rev 3. Para a confirmação do êxito da transferência da construção DR5-RFP para Agrobacterium tumefaciens submetida ao processo de transformação foram utilizadas reações de PCR de colônia com os dois conjuntos de primers disponíveis (DR5- RFP REv4 e DR5- RFP P4 - Tabela 1). Como havia a necessidade de se estabelecer quais os parâmetros a serem utilizados nas reações de PCR foram testados composições de mix contendo diferentes concentrações de MgCl2 e com adição de DMSO (dimetilsulfóxido). As reações foram submetidas à confirmação por gel de eletroforese contendo solução TAE, no gel foi utilizada agarose a 1% e um marcador de 1kb.Considerando o tamanho do fragmento de interesse inserido no plasmídeo pTF101.1, a banda esperada no gel teria entre 600 a 700 pares de bases. Para conferir o tamanho das bandas foi utilizado o marcador de 1 kb .

A introdução de DNA exógeno mediada por *A. tumefaciens* em plantas de *Setaria viridis* ocorreu seguindo o protocolo de transformação dos ovários florais (método também conhecido como "floral dip" ou "spike dip") descrito por Martins et al. (2015b) e Saha e Blumwald (2016), com algumas modificações. O crescimento das plantas de *Setaria viridis* foi realizado em vasos, em substrato Basaplant® e vermiculita (3:1), em câmara climatizada, nas condições já descritas,

por aproximadamente 28-30 dias após a germinação. Após esse período verificouse o surgimento da panícula ou a ocorrência da última folha antes de seu surgimento (7^a ou 8^a folha). Fez-se a identificação manual do posicionamento da panícula no interior das bainhas foliares – nos casos onde ela não havia sido exposta. A posição da panícula era marcada com caneta indelével na parte externa da planta.

O meio de cultura SvSD foi escolhido para o cultivo da *Agrobacterium* transformada com DR5-RFP e posterior mediação no processo de transformação genética via método spike-dip (SAHA; BLUMWALD, 2016). A composição do meio de cultura SvSD é: K₂HPO₄ 10,5 g/L; KH₂PO₄ 4,5 g/L; (NH₄)₂SO₄ 1 g/L; citrato de sódio 0,5 g/L; glicerol 4 g/L, MgSO₄ 1mM; ácido ascórbico 15 g/L; MES 10 mM; sacarose 68,5 g/L e glucose 36 g/L, pH 5,8. Uma colônia única de *Agrobacterium tumefaciens* transformada foi cultivada em meio YEP líquido sob agitação de 200 rpm com os mesmos antibióticos já citados e, após atingir OD 800 a cultura foi ressuspendida no meio de cultura SvSD suplementado com acetoseringona 200 µM. Tal procedimento foi seguido de uma indução da cultura sob agitação a 180 rpm, por 1h.

Plantas de *Setaria viridis* que já apresentavam as panículas/espiguetas externamente à bainha foliar foram umedecidas por uma solução de infiltração contendo 10 mM MgSO₄, 10mM MES e 0,1% de Silwet-L77 (Lehle Seeds, USA) nos 15 minutos anteriores ao processo de transformação. As espiguetas foram então mergulhadas no meio de cultura SvSD já induzido contendo *Agrobacterium* transformada, por 30 a 40 minutos, sob agitação manual a cada 5 min, como proposto por Saha e Blumwald (2016).

Nos casos em que plantas com aproximadamente 32 dias de germinação ainda apresentavam as panículas no interior da bainha foliar, foram efetuadas microinjeções de aproximadamente 100 µl do meio de transformação induzido na bainha foliar à altura da panícula/espiguetas (previamente marcada com caneta). As microinjeções eram realizadas até que o meio SvSD estivesse por todo o interior da bainha foliar As plantas foram mantidas embaladas por 2 dias a 25°C em sacos plásticos e após isso, o protocolo de produção de sementes clássico (BRUTNELL et al., 2010) foi seguido. Após alguns dias da realização do procedimento de transformação, as panículas provenientes dessas plantas foram embaladas em sacos de papel até que tivessem o seu desenvolvimento completo. Cerca de 30 dias após a transformação as panículas já estavam secas, e suas sementes eram então coletadas e armazenadas em tubos falcon.

4.4.1 Testes de concentração letal de glufosinato de amônio para sementes selvagens

Baseado no mapa do vetor PFT101.1 inserido, contendo o gene *bar*, que confere resistência ao glufosinato de amônio (D'HALLUIN et al., 1992), comercialmente denominado BASTA® ou Liberty®, este herbicida foi utilizado na seleção das plantas obtidas a partir do processo de transformação via spike-dip no presente trabalho. Para isto testes de concentração do herbicida foram realizados para a definição da concentração letal mínima para as plantas de *Setaria viridis*, para a posterior seleção de plantas transformadas. Os testes de concentração do glufosinato foram realizados em cultivo *in vitro*.

Nos testes realizados em cultivo *in vitro*, sementes de plantas selvagens de *S. viridis* esterilizadas e previamente tratadas com GA₃/KNO₃ foram introduzidas para germinar em placas de Petri contendo meio de cultura ½ MS e concentrações de BASTA® que variavam de 0 mg/L; 2 mg/L; 20 mg/L; 50 mg/L; 75 mg/L; 100 mg/L; 150 mg/L; 175 mg/L; 200 mg/L; 400 mg/L; 1 g/L; 2 g/L, 5 g/L; 10 g/L e 20 g/L. As sementes eram dispostas no meio de cultura com aproximadamente a mesma distância entre elas e foram utilizadas em média 57 sementes por placa de petri. Como o glufosinato é um herbicida e seu efeito pode ser gradual conforme a resposta da espécie e concentração utilizadas, as plantas selvagens submetidas a ele foram então avaliadas após 12 dias quanto à taxa de germinação e de sobrevivência das plântulas, sendo este último estado considerado quando a planta apresentava desenvolvimento tanto de parte aérea como de raiz aparentemente normais.
4.4.2 Seleção das plantas transformadas com glufosinato de amônio

Definida a concentração letal mínima de glufosinato (segundo experimento do item 4.4.1) para a análise dos transformantes, parte das sementes provenientes de espiguetas que passaram pelo processo de transformação via "spike-dip" (1000 sementes) foram cultivadas em placas de Petri contendo meio de cultura ½ MS meio de cultura padrão e o agente seletivo BASTA® a 75mg/L. Após 12 dias, as plântulas que tinham sobrevivido ao agente seletivo foram cuidadosamente reintroduzidas individualmente em tubos de ensaio contendo apenas o meio de cultura ½ MS sem o agente seletivo. Na sequência avaliou-se o crescimento dessas plântulas para posterior confirmação das transformadas por metodologia molecular.

4.4.3 Análise dos transformantes por extração de DNA e PCR

Sementes provenientes do processo de transformação genética spike-dip foram escarificadas, esterilizadas e pré tratadas com GA₃. As mesmas foram colocadas para germinar em frascos magenta contendo aproximadamente 150 mL de meio de cultura ½ MS. Foram colocadas 5 sementes por magenta. As plantas foram avaliadas por aproximadamente 60 dias quanto ao crescimento *in vitro*. Foram avaliadas 240 sementes de cada lote de sementes proveniente de processos de transformação. No total foram avaliados 3 lotes de sementes que passaram pelo procedimento de transformação e um lote de sementes selvagens (WT) coletado em 10/03/2017 foi utilizado como controle.

As sementes potencialmente transformadas e o lote utilizado como controle foram avaliados quanto à taxa de germinação e sobrevivência (correspondente a um crescimento moderado à normal).

4.5 Análise por raios X de sementes de Setaria viridis

Para avaliação da qualidade das sementes por análise de raios X foram utilizadas 223 sementes selvagens (controle – 10/03/2017) e sementes provenientes de dois lotes de transformação previamente testados quanto à

germinação no item 4.4.3, sendo 238 sementes do lote 2 (05/10/2016) e 240 sementes do lote 3 (14/01/2017).

Para cada lote foram selecionadas aleatoriamente parte das sementes, aproximadamente metade delas, para serem submetidas aos processos de escarificação e esterilização. Em relação aos lotes de sementes provenientes de plantas sujeitas à transformação, foram utilizados lotes com datas diferentes entre si, porém, ambos apresentaram dificuldade de germinação quando cultivadas *in vitro*.

As sementes de cada lote, já divididas nos grupos de escarificadas e/ou não escarificadas, foram dispostas em linha e coladas com fita adesiva dupla face (3M®) em uma folha de filme transparente de 2 cm x 2 cm. No total, foram montadas 4 folhas de filme transparente para cada lote de sementes, e as sementes escarificadas estavam separadas daquelas que não passaram por esse procedimento.

As chapas de filme transparente já contendo o material foram analisadas no aparelho de raios X (Faxitron X-ray MX20 DC12) do Laboratório de Análise de Imagens (Departamento de Produção Vegetal / ESALQ-USP), coordenado pelo Prof. Francisco Guilhen. O equipamento foi configurado no "automático" (dosagem de 23kV; 1,5mA de fator de magnificação; 1x de proximidade com a fonte e 3 pulsos de 15 segundos). Imagens digitalizadas foram obtidas no software acoplado ao aparelho de raios-X.

As sementes foram avaliadas posteriormente em relação à quantidade de danos físicos presentes, sendo eles classificados em danos físicos leves - que eram representados por trincas no endosperma, e que aparentemente não ocasionavam nenhum dano na região embrionária – ou danos físicos graves, nos quais havia uma redução drástica no tamanho da semente (região embrionária e endosperma), ou então nos casos onde as sementes não escarificadas estavam vazias, ou seja, não apresentavam a formação do embrião.

4.6 Teste de viabilidade com tetrazólio em sementes de Setaria viridis

O total de 130 sementes de *S. viridis* oriundas dos mesmos lotes utilizados no item 4.5, já escarificadas e esterilizadas, foram submetidas ao teste de viabilidade química com tetrazólio, seguindo o protocolo proposto por França Neto e colaboradores (FRANÇA NETO; KRZYZANOWSKI; DA COSTA, 1998). As sementes foram pré-condicionadas em placas de Petri (vedadas) contendo papel de germinação umedecido com água, durante o período de 16 horas à temperatura de 25 °C. Após esse condicionamento as sementes foram colocadas em Eppendorfs embalados em papel alumínio, adicionando-se solução de tetrazólio (0,075%), mantendo-se por 150 minutos a 37°C. Após esse período as sementes foram lavadas em água e mantidas submersas em água até a análise da reação com tetrazólio em lupa (Leica EZ4E) na qual imagens digitais foram obtidas.

A interpretação da reação com tetrazólio consiste na diferenciação das cores do tecido embrionário após o procedimento citado acima. Desse modo, quando percebida uma coloração vermelho carmim o tecido é considerado vivo; quando o vermelho está muito intenso ou tendendo ao marrom o embrião está se deteriorando; e por fim, quando não há reação a região correspondente ao embrião não apresenta coloração vermelha, indicando que o tecido está morto e, portanto, inviável. As sementes submetidas a esse tratamento com tetrazólio foram avaliadas quanto à viabilidade. Foram realizados testes preliminares de reação com o tetrazólio utilizando-se sementes selvagens escarificadas não provenientes de plantas submetidas ao processo de transformação. Os testes preliminares tinham o intuito de se estabelecer um parâmetro de coloração/reação esperados para a espécie nas condições do presente trabalho, possibilitando visualizar se as reações com tetrazólio aconteceriam, e se as respostas se apresentariam de modo gradual ou não, conforme a visualização da coloração.

Sementes provenientes de um dos lotes de sementes transformadas (14/01/2017) que não apresentaram germinação após 20 dias, ou aquelas que germinaram, mas não tinham continuidade no seu desenvolvimento, foram submetidas à análise de viabilidade com tetrazólio (acima), com o objetivo de entender os motivos pelos quais o desenvolvimento estava sendo interrompido.

5 **RESULTADOS**

5.1 Desenvolvimento floral

As inflorescências apresentam espiguetas densamente dispostas na raquis, hermafroditas, eretas e ligeiramente inclinadas quando atingem a maturidade. As espiguetas estão distribuídas em panículas que apresentam geralmente entre 3 a 8 cm de comprimento. As espiguetas têm formato elíptico, aproximadamente 2,5 mm de comprimento, e apresentam gluma externa e interna. A gluma externa tem 1/3 do tamanho total da espigueta, enquanto a interna tem tamanho semelhante ao do lema fértil. Na panícula há também entre 1 a 6 cerdas por espigueta (Figura 3A e 3B).

Figura 3 - Morfologia da planta madura de *Setaria viridis*. A) Plantas maduras de *Setaria viridis* com panículas completamente desenvolvidas; B) Detalhes das espiguetas, compactamente distribuídas na panícula. ig = gluma interna; og = gluma externa; le = lema; seta = cerdas. Barras: A = 4 cm; B = 0,5mm.



Figura 4 - Desenvolvimento do antécio fértil em *Setaria viridis* observado em microscopia eletrônica de varredura. A-C) Diferentes estágios do desenvolvimento floral; D-G) Desenvolvimento final dos estames e do pistilo, com dois estiletes e estigmas plumosos; nesses estágios observa-se, principalmente o alongamento dos estiletes e diferenciação dos estigmas plumosos; H-I) Detalhes do estigma plumoso (H) e das células papilares do estigma (I); J-K) Grão de pólen monossulcado (J) e detalhe da ornamentação da exina do grão de pólen, com espínulos densamente agrupados (K). Legenda: antera (ANT); filamento (FI); gineceu (GIN); gluma interna (GI); gluma externa(GE); ovário(OV); papila (PA); poro (PO); estigma plumoso (EP); estigma inicial (EI); primórdio de estame (PE), grão de pólen (GP). Barras: A, B=20 μm; C, H=50 μm; D=100 μm; E, F, G= 200 μm; I= 10 μm; J= 5 μm; K= 2 μm.



A formação de estruturas florais se desenvolvem com a gluma externa, seguida pela gluma interna, três primórdios de estames e ao centro o gineceu (Figuras 4A e 5A). As glumas, externas aos estames e pistilo, apresentam um crescimento mais lento, posteriormente envolvendo e recobrindo as estruturas

reprodutivas férteis, androceu e gineceu (Fig. 4B). Com o desenvolvimento do pistilo observa-se o desenvolvimento do ovário, a diferenciação do estigma, com o início da diferenciação dos dois estiletes. Cada primórdio de estame se diferencia em antera e filete, tendo a antera inserção basal no filete, enquanto a diferenciação do estigma é observada na parte distal do ovário, com o alongamento de dois estiletes (Figura 4C-G). Observam-se, portanto, 3 estames, um pistilo com ovário e dois estiletes e estigmas plumosos na fase final do desenvolvimento da flor (Figura 4F). Os grãos de pólen são monossulcados e a exina apresenta espínulos densamente arranjados (Figura 4J – 4K).

Figura 5 – Megasporogênese em *Setaria viridis*. A-F) Cortes longitudinais de espiguetas cariopses em sucessivos estágios do desenvolvimento (microscopia de luz); A-B) Estágios iniciais do desenvolvimento floral mostrando os primórdios de gineceu e estames (A); diferenciação dos estames em antera/filete e de dois estiletes (B); C) Primórdio de óvulo; D-E) Célula mãe do megásporo (D) e o início de diferenciação dos tegumentos externo e interno (E); F) parede celular do ovário e divisões celulares. Legenda: antera (ant); célula mãe do megásporo (cmm); megásporo funcional (mf); funículo (fu); gineceu (gin); tegumento interno (ti); nucelo (nu); tegumento externo (te); ovário (ov); parede do ovário (po); primórdio de estame (pe). Barras = 20µm.



Figura 6 - Megagametogênese e desenvolvimento do embrião em *Setaria viridis*. A-H) Cortes longitudinais de espiguetas e cariopses em sucessivos estágios do desenvolvimento (microscopia de luz); A) Saco embrionário monospórico octanucleado tipo Poligonum; B) Saco embrionário após a migração do núcleo polar, antípodas e célula ovo; C) Saco embrionário com antípodas e sinérgides (região micropilar), observando-se a formação do endosperma; D) Presença do endosperma; E) Embrião em desenvolvimento e endosperma multicelular; F-H) Cariopse com embrião em estágio inicial de desenvolvimento, observando-se o endosperma com acúmulo de amido (F-G) e embrião desenvolvido, podendo-se observar o meristema radicular e os primórdios foliares, bem como o endosperma persistente (H). Legenda: Antípodas (an); oosfera (oo); células arquesporiais (arq); saco embrionário (se); mesocótilo (me); proembrião (proe); sinérgides (si); escutelo (esc); raiz (ra); primórdio foliar (pf); endorperma (en); formação do saco embrionário com divisões (circulado). Barras: A-E= 20 μm; F-H = 100 μm



O primórdio do óvulo se origina na placenta, na parede do ovário. A região do nucelo apresenta células grandes, com núcleo denso, a partir do quala célula mãe do megásporo se diferencia (Figura 5C-D) Concomitantemente, observa-se a diferenciação dos tegumentos, inicialmente o tegumento interno e na sequência o externo (Figura 5D-E), e muito rapidamente o externo ultrapassa o interno em tamanho. Os dois tegumentos continuam a se desenvolver ao redor do nucelo

formando a micrópila (Figuras 5C-E e 6A). A célula mãe do megásporo, após divisões meióticas forma a tétrade de megásporos, linear (megasporogenesis). Três megásporos se degeneram e o megásporo funcional (Figura 5E), geralmente o mais próximo à calaza, irá formar o megagametófito, ou saco embrionário. O megásporo funcional passa por 3 divisões mitóticas sucessivas que originam o saco embrionário octanucleado, tipo Poligonum. Na região micropilar observa-se a célula ovo e duas sinérgides e na região da calaza encontram-se as três antípodas. Um núcleo de cada lado se move para o centro formando o núcleo polar que vai originar o endosperma após a dupla fertilização (Figura 6A-C). O proembrião e as células do suspensor podem ser observados após a fertilização (Figura 6D). O embrião se desenvolve inicialmente em formato globular, observando-se também o desenvolvimento do endosperma (Figura 6E), que apresenta acúmulo de amido (Figura 6F-G) e é persistente na cariopse madura (Figura 6H). No embrião maduro pode-se observar o meristema radicular, meristema apical vegetativo e vários primórdios foliares, bem como o escutelo (Figura 6H).

Figura 7 – Desenvolvimento do grão de pólen em *Setaria viridis*. Cortes longitudinais de anteras em sucessivos estágios de desenvolvimento (microscopia de luz). A) Células arquesporiais (ac) e camada pariental primária (pp); B) células esporogênicas (sc) derivadas das células arquesporiais rodeadas pelo tapete (tp), camada média e epiderme (ep); C) célula mãe do micrósporo (mmc) em meiose e início de deposição de calose; D) célula mãe do micrósporo em meiose, presença de díades, tétrades e tapete; E) micrósporos livres no lóculo; F) Micrósporo se torna vacuolado; G-H) grão de pólen maduro; é possível observar a degeneração do tapete e expansão da camada do endotécio e epiderme. Legenda: células arquesporiais (arq); calose (ca); díades (di); endotécio (ed); epiderme (ep); exina (ex); camada média (cm); célula mãe do micrósporo (cmm); micrósporo (mp); núcleo (nu); camada pariental primária (pp); células esporogênicas (esp); tapetum (ta); tétrades (te); grão de pólen (gp); *= desintegração das células do tapetum e deposição de exina. Barras = 20 μm.



Em estágios iniciais, a antera é formada por tecidos meristemáticos que estão cercados por tecido pariental primário e por células epidérmicas, com presença de células arquesporiais. As células do tecido pariental primário se dividem periclinalmente resultando, na formação de outras duas camadas parientais secundárias. A primeira camada é o endotécio, e a partir de uma segunda divisão posterior são formados os tecidos da camada média e do tapete. As células arquesporiais aumentam de tamanho, se dividem formando as células esporogênicas (Figura 7A e 7B). Após sucessivas divisões mitóticas as células esporogênicas se diferenciam em células-mãe do micrósporo, secretando uma camada de calose ao seu redor. As células mãe do micrósporo entram em meiose, e nesse estágio é possível observar claramente as quatro camadas que compõem a antera, sendo elas epiderme, endotécio, camada média e tapete (Figura 7C). As células do tapete são uninucleadas e têm citoplasma denso. Os microsporócitos se dividem formando díades, e após a segunda meiose, a tétrade, com quatro células haplóides. Também ao final desse processo as células do tapete apresentam-se alongadas, os micrósporos estão livres (Figura 7C a 7E). Os micrósporos aumentam de tamanho, apresentando um grande vacúolo e seu núcleo migra em direção à periferia. Nesse ponto as células do tapete começam a se degenerar e a camada média se torna quase imperceptível (Figura 7F). Ao final do desenvolvimento da antera apenas a camada epidérmica e o endotécio são evidentes (Figura 7G e 7H).

Ao observar a gametogênese feminina e masculina de *S. viridis* nas condições ambientais do presente trabalho, notou-se que, quando utilizadas amostras de panículas que já haviam ultrapassado a bainha foliar, ou seja, já haviam sido emitidas, muitas espiguetas já apresentavam formação de semente. Utilizando-se de amostras de espiguetas retiradas de panículas ainda dentro da bainha foliar notou-se que as estruturas florais das mesmas ainda se encontravam em estágios de desenvolvimento prévio. A partir dessa caracterização foi possível estabelecer que após a germinação, a planta de *S. viridis* nas condições consideradas demorava em torno de 30 a 32 dias para emitir a panícula da bainha foliar, período geralmente concomitante à emissão da 8ª folha. Essa observação foi importante para correlacionar estágios de desenvolvimento floral com diferentes eventos morfológicos, servindo, portanto, para delinear coletas mais precisas.

5.2 Germinação e desenvolvimento radicular

Baseando-se em informações preliminares obtidas com outros grupos que já trabalhavam com a mesma espécie deste trabalho (comunicação pessoal com Prof. Francisco Scaglia Linhares), acreditava-se que o desenvolvimento do sistema radicular de *S. viridis* em meio de cultura acontecia da seguinte forma: logo após a germinação havia o surgimento da raiz primária (de origem embrionária) que em poucos dias era degenerada ou cessava seu crescimento, dando origem então às raízes adventícias que eram abundantes e acompanhavam a planta ao longo do seu desenvolvimento.

No entanto, quando o presente trabalho teve início, nos primeiros ensaios de germinação *in vitro* foi percebido que aparentemente esse mecanismo de senescência observado por outros grupos não estava se repetindo nas condições de crescimento utilizadas no nosso laboratório. Paralelamente a isso, foi observado nas fases iniciais da germinação a presença e o crescimento de uma estrutura que rompia o tegumento da semente e tinha como característica principal a presença de tricomas muito semelhantes a pelos radiculares. Havia então a possibilidade de que essa estrutura tivesse alguma relação com a hipótese inicial de senescência da raiz primária. Sendo assim, observações mais detalhadas dessa estrutura foram necessárias para que se buscasse o melhor entendimento de aspectos relacionados à germinação e ao estabelecimento e manutenção do meristema radicular em *Setaria viridis* em condições de crescimento *in vitro*.

As análises ao microscópio estereoscópico de alta resolução corroboraram para a criação de divisões em fases nos estágios iniciais de germinação de *Setaria viridis*, contribuindo para o estabelecimento de relação entre diferentes eventos morfológicos com estágios do desenvolvimento distintos (Tabela 2).

Fases do desenvolvimento	Características / Eventos observados que distinguem as fases da germinação em <i>S. viridis</i>		
Fase 1	Não aconteceu a germinação ainda ou há pequena protuberância na		
	região embrionária indicando futuro rompimento do tegumento da semente		
Fase 2	Se rompe o tegumento da semente e ocorre a extrusão de uma		
	estrutura chamada coleorriza. A coleorriza pode ter nenhum, pouco		
	ou muitos tricomas parecidos com pelos radiculares, conforme o		
	grau de desenvolvimento da germinação		
Fase 3	De dentro ou lateralmente à coleorriza surge uma raiz		
Fase 4	Essa raiz que surgiu de dentro da estrutura com tricomas se		
	desenvolve, surgem pelos radiculares em diversas quantidades		
Fase 5	Há o aparecimento de outras raízes que têm origem em locais		
	diferentes do embrião, aparentando ser raízes secundárias com		
	origem na base da parte aérea da planta		

Tabela 2 - Fases relativas ao desenvolvimento pós-seminal em Setaria viridis quando observadas em microscópio eletrônico de varredura

Análises em microscópio estereoscópico de alta resolução contribuíram para uma melhor caracterização da semente. Em imagens com um aumento de 100x foi observada na região posterior, ou seja, naquela oposta à região embrionária, a presença do hilo, uma mancha de coloração mais escura (Figura 8A e 8C). Além disso, acompanhando o primeiro dia de germinação pode-se perceber que nas 12 primeiras horas a região embrionária se mostra já bem delimitada e umedecida (Figura 7B), no entanto, apenas com aproximadamente 24 horas de germinação é que ocorre, de fato, o rompimento do tegumento da semente (Figura 8C e 8D). Figura 8 - Sementes de Setaria viridis provenientes de cultivo in vitro nas primeiras horas de germinação. Semente (região posterior) após 12 horas de germinação (A); Semente (região anterior) após 12 horas de germinação (B); Semente (região posterior) após aproximadamente 24 horas de germinação (C); Semente (região anterior) após aproximadamente 24 horas de germinação (D). Barras = 0,5 cm



Após 48 horas de germinação, o tegumento da semente tem seu rompimento finalizado pela emergência de uma estrutura arredondada, com tricomas semelhantes a pelos radiculares em toda a sua borda (Figura 9A). Segundo a literatura essa estrutura poderia ser uma coleorriza, estrutura que rompe o tegumento da semente e protege a raiz embrionária de possíveis danos físicos no contato com o solo. Passadas 72h do início do processo de germinação surge de dentro da coleorriza uma raiz que se desenvolve conjuntamente à parte aérea da planta (Figura 9B-D). Com 12 dias de germinação, além da raiz primária que já estava bem desenvolvida, já pode ser observada a presença de raízes adventícias com origem na coroa (Figura 9E). Quanto ao desenvolvimento da provável coleorriza, observa-se que o seu crescimento desta é contínuo apenas até a

emergência da raiz primária. Após esse período, e com o aparecimento das raízes adventícias, essa estrutura exibe uma coloração mais escura, indicando muito possivelmente o início de um processo de degradação da mesma após 12 dias de germinação (Figura 9F).

Figura 9 - Sementes de *Setaria viridis* provenientes de cultivo in vitro nos 10 primeiros dias de germinação. Semente após aproximadamente 48h de germinação exibindo coleorriza já com tricomas (A); Raiz primária rompendo a coleorriza no início do desenvolvimento radicular em aproximadamente 72 horas (B e C); Desenvolvimento da raiz primária e da parte aérea do embrião após 4 dias em meio de cultura (D); Desenvolvimento de raízes adventícias com origem na coroa (parte aérea) após 12 dias em meio de cultura(E); Tecido da coleorriza apresentando sinais de senescência após 12 dias em meio de cultura(F). Barras: A, B, F = 0,5 cm; C = 2,5 cm; D, E = 1 cm.



Em busca de uma descrição mais detalhada dessa fase inicial do desenvolvimento radicular de *S. viridis*, e também de respostas quanto ao mecanismo observado por outros grupos de estudo, análises de microscopia eletrônica de varredura foram realizadas também nos primeiros dias de germinação.

As diferentes fases da germinação observadas nas análises de microscopia eletrônica de varredura foram classificadas conforme o acontecimento ou aparecimento de determinados eventos biológicos indicados anteriormente (Tabela 1). A fase 1 compreende a semente que ainda não iniciou o processo de germinação, ou aquelas nas quais o embrião já se apresenta protuberante, porém, não se desenvolveu ainda o suficiente para que haja o rompimento do tegumento da semente ou então está na emergência desse evento (Figura 10A e 10B). A segunda fase é caracterizada primeiramente pelo rompimento do tegumento por tecidos de origem embrionária (Figura 10C). Ainda na fase 2 observa-se a emergência da coleorriza para a parte externa da semente (Figura 10D) e o seu desenvolvimento, no qual ela é totalmente exposta, ficando disposta de modo perpendicular à semente (Figura 10E e 10F).

Figura 10 - Imagens de sementes de *Setaria viridis* em microscópio eletrônico de varredura durante os estágios iniciais da germinação *in vitro*. Os eventos no desenvolvimento foram caracterizados em 5 fases (Tabela 1). 9A: Não há indício da germinação ou rompimento do tegumento da semente pelo embrião ou outra estrutura (Fase 1); 9B: O embrião se torna mais visível e inicia-se o processo de rompimento do tegumento da semente (Fase 1); 9C: Há o rompimento do tegumento da semente e liberação da coleorriza para o exterior da semente (Fase 2); 9D, 9E, 9F: A coleorriza é totalmente exposta para fora da semente e nas laterais dela surgem pelos radiculares. Na Figura 9F percebe-se o posicionamento perpendicular final da coleorriza em relação à semente (Fase 2)



Na fase seguinte (Fase 3), um evento marcante observado é o surgimento da raiz primária de dentro da coleorriza (Figura 11A), coincidindo com o que foi observado nas imagens do microscópio estereoscópico de alta resolução (Figura 9B e C).

A fase 4 é caracterizada pelo desenvolvimento da raiz primária, de modo que ela aumenta de tamanho e passa a apresentar pelos radiculares. Os pelos radiculares das raízes primárias podem variar em quantidade (pouco ou muitos) e distribuição, como pode ser visto na figura 11B e C. Na última fase dos eventos iniciais da germinação (Fase 5) é percebido o aparecimento de raízes secundárias com origem em locais diferentes da raiz primária. Nota-se que a origem delas se dá na base da parte aérea da planta, indicando, portanto que são raízes de origem adventícia (Figura 11D).

Figura 11 - Imagens de sementes de *Setaria viridis* em microscópio eletrônico de varredura durante os estágios iniciais da germinação *in vitro*. Os eventos no desenvolvimento foram caracterizados em 5 fases (Tabela 1). A) Da região interna da coleorriza surge a raiz primária (seta) (Fase 3); B-C) Raiz primária em desenvolvimento passa a apresentar pelos radiculares em pequena (Figura B) ou grande quantidade (Figura C) (Fase 4); D) Aparecimento de raízes secundárias com origem na base da parte aérea da planta (Fase 5)



Sendo assim, as análises microscópicas de alta resolução e eletrônica de varredura demonstraram que a estrutura que dá início ao processo de germinação em *S. viridis* é a coleorriza. Com o objetivo de melhor caracterização da coleorriza e raiz primária cortes histológicos foram realizados, possibilitando o acompanhamento do desenvolvimento da raiz e coleorriza durante os estágios iniciais da germinação (Figura 12).

Nas 3 primeiras horas de germinação já é possível notar uma definição clara entre o tecido embrionário e o endosperma, porém, não é visível o rompimento do tegumento da semente, nem o crescimento de nenhuma estrutura com essa finalidade (Figura 12A). A partir de 5 horas em meio de cultura torna-se visível uma diferenciação na porção inferior do embrião, inclusive com padrões de divisão distintos e uma separação física entre duas áreas. Ao centro nota-se um padrão de divisão mais organizado, semelhante aqueles encontrados em formação de raiz. Enquanto que ao seu redor, já separado por um espaço não preenchido por células, existe um tecido com células mais arredondadas e com pouca ou nenhuma padronização (Figura 12B).

No embrião, após 18 horas em meio de cultura, apesar de não haver nenhum rompimento da semente, no interior da semente já se visualiza uma separação completa entre o tecido referente à raiz primária e a coleorriza (Figura 12C). Com 22 horas de exposição ao meio de cultura a coleorriza rompe o tegumento da semente, e nela começam a se desenvolver tricomas, que nas fases anteriores não podiam ser vistos (Figura 12D). No entanto, tais apêndices só aparecem em regiões onde há o contato direto da coleorriza com o meio de cultura (Figura 12D – setas pretas). A partir do rompimento da semente, a coleorriza vai se desenvolvendo, concomitantemente à raiz no seu interior, e exibindo uma área maior exposta exteriormente à semente. Conforme essa emergência da coleorriza aumenta, cresce também a área correspondente aos seus tricomas (Figura 12E). Estes aumentam em número e se distribuem em toda a lateral da coleorriza que está em contato com o meio de cultura (Figura 12F). Um aumento na região correspondente à borda da coleorriza permite a visualização da origem epidérmica alternada dos tricomas, muito semelhante à encontrada em pelos provenientes da raiz (Figura 12H).

Após 22 horas de cultivo in vitro é possível visualizar a conexão entre os tecidos do embrião. Nela nota-se que de fato a raiz central tem sua origem embrionária, pois apresenta conexão com o meristema apical caulinar. Já a coleorriza se apresenta como um apêndice radicular, pois não exibe conexão direta com o desenvolvimento da parte aérea da planta, não tendo em nenhum momento sequer algum tipo de organização celular que conferisse a ele identidade semelhante a um tecido radicular clássico (Figura 12G).

53

Figura 12 - Cortes longitudinais de sementes de *Setaria viridis* emblocadas em historesina durante as fases iniciais da germinação. A) Embrião 3 horas após colocação em meio de cultura, não há ainda rompimento do tegumento da semente, nem crescimento de nenhuma estrutura com essa finalidade; B) Embrião após 5 horas, percebe-se uma delimitação e separação (setas brancas) de duas regiões do embrião; C)Embrião 18 horas, há uma separação completa entre duas regiões na parte inferior do embrião e ainda não aconteceu o rompimento do tegumento da semente; D) Embrião após 22 horas, o tegumento da semente é rompido pela coleorriza e ela começa a exibir a formação de tricomas parecidos com pêlos radiculares (seta preta); E) Embrião após 26 horas de cultivo, a coleorriza apresenta maior número de tricomas e se desenvolve no sentido exterior à semente conjuntamente com o crescimento da raiz primária; F) Embrião após 38 horas, a coleorriza já apresenta tricomas em todo o seu entorno que está em contato com o meio de cultura e a raiz primária já atingiu o meio exterior à semente; G) Embrião completo após 22 horas mostrando a conexão entre a raiz primária e as regiões referentes ao meristema caulinar; H): Tricomas presentes na coleorriza.



Buscando uma melhor caracterização anatômica de outros aspectos relacionados à raiz primária de S. viridis, cortes longitudinais em historesina permitiram a visualização de diferentes zonas de crescimento da raiz primária (Figura 13A). Dentre elas constam a coifa, que efetivamente protege a ponta da raiz durante seu crescimento. Nessa região nota-se a presença de uma descamação das camadas celulares superficiais, resultante do contato direto com o meio de cultura. Outra região importante é a zona meristemática (ZM), situada acima da região da columela, onde se encontram as células responsáveis pela manutenção do meristema radicular. Nessa região podem ser vistas células menores, com citoplasma denso, em constante divisão.

Outra região destacada é a zona de diferenciação (ZD), acima da região meristemática. Nela observa-se a diferenciação de pelos radiculares, indicando assim que os tecidos dessa região já estão diferenciados. Logo, da zona meristemática até a zona de diferenciação há uma gradação na capacidade de divisão e diferenciação dos tecidos. Uma aproximação na zona meristemática da raiz e coifa mostra uma clara organização celular do meristema radicular, indicando a presença de células centrais (centro quiescente) e iniciais ao redor destas que dão origem a diferentes tipos de camadas celulares (Figura 13D).

Tanto os pelos radiculares presentes na raiz primária (Figura 13C) como os tricomas da coleorriza (Figura 12H) têm origem na camada epidérmica.

Figura 13 - Cortes longitudinais de raiz primária de *Setaria viridis* emblocadas em historesina. A) Raiz primária e suas regiões: zona meristemática (ZM) e zona de diferenciação (ZD) já com pelos radiculares diferenciados; B) Iniciação de raiz lateral à raiz primária com origem nas células do periciclo; C) Detalhe do pelo radicular da raiz primária com origem na epiderme; D) Região da coifa e centro meristemático da raiz



Cortes longitudinais de raiz primária de *S. viridis* permitiram também a visualização do início do desenvolvimento de raízes laterais. Como era o esperado, as raízes laterais em *S. viridis* se originam a partir de células do periciclo, exibindo um padrão de divisão organizado que se desenvolve como uma protuberância com origem no cilindro vascular em direção à superfície da raiz primária, de modo relativamente perpendicular (Figura 13B).

Como os cortes em historesina têm aproximadamente 3µm de espessura, e muitas vezes o crescimento das raízes não era totalmente reto, existia uma dificuldade em conseguir cortes longitudinais centrais na raiz e que permitissem uma visualização mais precisa de como era a organização ao centro do nicho meristemático, incluindo as células do centro quiescente. Dessa forma, foram preparadas amostras de raízes primárias previamente emblocadas em resina Spurr que permitiram cortes mais finos, utilizando-se um ultramicrótomo.

A observação do meristema radicular em cortes semifinos permitiu definir com maior nitidez as regiões correspondentes à coifa (cf), centro quiescente (cq), área meristemática (ma); cilindro vascular (cv), células do córtex (co) e epiderme (ep) na raiz primária de *S. viridis* (Figura 14A). Assim como analisado nos cortes em historesina, nos cortes em resina Spurr também foram notadas zonas com diferentes características e tamanhos celulares. Estes geraram uma melhor caracterização das camadas celulares e das zonas radiculares (Figura 14B). Um detalhe no cilindro vascular (Figura 14C) demonstra o padrão celular alongado e completamente distinto dessa região quando comparada às células do córtex - que aparentemente compreendem 3 camadas.

Diferentes planos de corte na região meristemática e da coifa demonstram a dificuldade, mesmo em cortes semifinos, de se conseguir um plano longitudinal central (Figura 14 D-E). No entanto, em aumento de 1000X nota-se a presença de 2 células centrais, referentes às células do centro quiescente, que se dividem para formaras diferentes camadas celulares da raiz, ao mesmo tempo que se mantém (Figura 14F). Outra confirmação de que essas duas células correspondem ao centro quiescente é a presença de células laterais que exibem um padrão de divisão celular diferente da maioria das células. Essas células laterais exibem divisões periclinais que dão origem a duas camadas diferentes de células (Figura 14G).

Figura 14 - Cortes semifinos longitudinais de raiz primária de Setaria viridis após 4 dias de germinação emblocadas em resina Spurr. A) Diferentes regiões e tipos celulares presentes na ponta da raiz, foram destacadas as regiões da coifa (cf), centro quiescente (cq), área meristemática (circulada), cilindro vascular (cv), córtex (co) e epiderme (ep); B) diferentes zonas de crescimento celular, nas setas estão a zona meristemática (ZM), zona de transição (ZT) e zona de diferenciação (ZD); C) cilindro vascular; D-E) coifa e região meristemática; F-G) Detalhe da região meristemática. No círculo estão as células do centro quiescente e as iniciais que se dividem periclinalmente para dar origem a córtex e endoderme.



Avaliações em microscopia confocal foram feitas buscando avaliar se em algum momento a estrutura ou a própria manutenção do meristema radicular eram alteradas. Quando submetidas ao iodeto de propídeo, raízes primárias de plântulas que já haviam emitido a primeira raiz adventícia demonstraram uma organização muito semelhante aquelas observadas em microscopia de luz (Figura 13D, Figura 14F, Figura 15A). Ou seja, mesmo após o surgimento das raízes adventícias nenhuma alteração drástica pôde ser observada na região meristemática ou na coifa da raiz primária.

Figura 15 - Imagens de raiz primária de *Setaria viridis* coradas com iodeto de propídeo, obtidas em microscopia confocal. A: Região meristemática de raiz após 7 dias de germinação quando já havia surgido a primeira raiz adventícia; B: camada epidérmica da raiz primária; C: fluorescência exibida na coifa e epiderme; D: Raiz primária após 10 dias de germinação; E: Cilindro vascular de raiz primária com 7 dias de germinação, em uma zona acima da região meristemática



Através de análises por microscopia confocal, pode ser percebido que a infiltração do fluoróforo foi mais eficiente na epiderme e nos tecidos da coifa (Figura 15B e C), indicando uma melhor penetração em regiões mais expostas ou células da superfície do material. A penetração do iodeto de propídeo não foi suficiente para permitir a visualização de estruturas mais internas, próximas à região do periciclo (Figura 15E). O mesmo aconteceu quando a região meristemática de uma raiz com 10 dias de germinação foi avaliada, na qual apenas epiderme apresentou fluorescência (Figura 15D). Assim, dependendo do estágio de desenvolvimento da raiz primária e da espessura da amostra, pode haver dificuldades na penetração do iodeto de propídeo.

5.3 Crescimento de diferentes tipos de raízes

Considerando-se não haver sido observada a degeneração do meristema radicular da raiz primária, procurou-se caracterizar em maior detalhe a germinação. No total, 452 sementes de *S. viridis* foram germinadas em meio de cultura e observadas diariamente em relação à germinação e ao surgimento dos diferentes tipos de raízes por 13 e 25 dias. Foi caracterizada a presença da raiz primária, e quando presente, da primeira raiz adventícia, bem como a relação entre elas. As sementes foram germinadas em tubo de ensaio e posteriormente classificadas em quatro grupos (Tabela 3) conforme os tipos de raízes presentes e a relação de crescimento entre elas (Figura 16).

Foram observadas três situações: sementes não germinadas (G1); sementes germinadas com presença apenas de raiz primária (G2) e presença de raiz primária e adventícias (G3). Nos grupos onde havia a presença de raízes adventícias houve uma subdivisão: o grupo G3.1 correspondia àquele no qual a raiz primária cessava seu crescimento após o surgimento da adventícia; já o grupo G3.2 representava aquelas plântulas nos quais a raiz primária continuava seu crescimento simultaneamente ao desenvolvimento das raízes adventícias.

Tabela 3 - Classificação dos grupos de sementes baseada nos tipos de raízes em desenvolvimento e na relação entre elas durante o período de avaliação (13 ou 25 dias). Foi considerada a relação entre a raiz primária e a primeira raiz adventícia (quando presente)

Classificação dos grupos	Tipos de raízes presentes	Relação de crescimento primária/adventícia
G1	Nenhuma (sem germinação)	-
G2	Somente raiz primária	-
G3.1	Raiz primária e adventícia	Raiz primária parou de crescer após surgimento da adventícia
G3.2	Raiz primária e adventícia	Raiz primária continuou a crescer após surgimento da adventícia

Figura 16 - Sistema radicular em *Setaria viridis*. Exemplos de ocorrências observadas em experimentos *in vitro* de comparação entre o crescimento da raiz primária e da primeira raiz adventícia, segundo classificação (Tabela 3). Em amarelo está indicado o desenvolvimento da raiz primária, enquanto que em vermelho, o da raiz adventícia ao longo do tempo. As setas brancas nos grupos G3.1 e G3.2 indicam o comprimento da raiz primária quando surgiu a raiz adventícia. Grupo G1 – não houve germinação; Grupo G2 – germinou apenas a raiz primária; Grupo G3.1 – raiz primária parou de crescer após o surgimento da adventícia; Grupo G3.2 – raiz primária continuou a crescer após o surgimento da adventícia



Era esperado que houvesse uma predominância de plântulas com desenvolvimento da raiz primária seguido do desenvolvimento de raízes adventícias, ou seja, que os grupos G3.1 e G3.2 tivessem maior número de plântulas quando comparado ao grupo G2. Tendo em vista essa expectativa e em busca de caracterizar o desenvolvimento das raízes nos estágios iniciais do desenvolvimento da planta, foi montado um experimento no qual se variavam as condições iniciais de germinação e o tempo de avaliação até a classificação (de uma mesma amostra). Neste experimento as sementes foram submetidas à germinação com tratamentos expostos (luz) e não expostos à luminosidade (escuro) durante os 5 primeiros dias de germinação. Após esse período ambos os tratamentos eram deixados em sala de crescimento nas mesmas condições de luminosidade (item 4.1).

A existência desses tratamentos visava compreender se, em algum momento, as condições ambientais referentes à luminosidade interferiam na escolha dos tipos de raízes em *S. viridis*. Além disso, era importante a observação de como aconteceria a germinação em diferentes condições, pois isso poderia explicar comportamentos diferentes quanto à manutenção ou não da raiz primária, em relação à hipótese anterior de senescência da raiz primária. Sendo assim, com base em experimentos prévios de caráter inicial julgou-se necessária uma avaliação diferenciada também em relação ao número de dias de acompanhamento dessas raízes, afinal, durante mais dias era possível que a distribuição nesses grupos fosse alterada. Sendo assim, foi avaliada a germinação e crescimento das raízes de *S. viridis* durante 13 dias. O crescimento das raízes foi avaliado continuamente até o 25º dia, no qual os mesmos tubos foram reclassificados.

Figura 17 - Desenvolvimento de raízes após germinação em sementes de *Setaria viridis* cultivadas in vitro em luz e escuro, avaliadas após 13 e 25 dias. Legenda: não houve germinação (G1); presença somente da raiz primária (G2); raiz primária cessou seu crescimento após o surgimento da adventícia (G3.1); raiz primária continuou o crescimento após surgir a raiz adventícia (G3.2).



Ao final do 13º dia de avaliação, a classificação referente aos tratamentos expostos ao escuro (Figura 17A) e à luz (Figura 17C) foi muito semelhante. O grupo G2 se mostrou mais numeroso, representando 39% do total de 226 sementes cultivadas *in vitro* em ambos os tratamentos analisados (Figura 17A e C). A porcentagem referente ao grupo no qual os dois tipos de raízes tinham crescimento contínuo foi idêntico para os dois tratamentos, representando 18% da amostra (Grupo G3.2 – Figura 17A e C). No tratamento de escuro a porcentagem de sementes que não germinou (G1) foi ligeiramente maior do que aquelas expostas à luz, representando 29% e 28% do total de amostras, respectivamente. Com 13 dias de avaliação o grupo G3.1 foi o menos abundante, sendo correspondente a 14% no tratamento de escuro (Figura 17 A) e 15% no tratamento de luz (Figura 17C).

Gráfico 1 - Desenvolvimento radicular após a germinação de sementes de Setaria viridis em luz e escuro durante 13 dias: acompanhamento do crescimento médio (cm) da raiz primária (RP) referente ao grupo G2 (crescimento apenas da raiz primária). Média de 88 sementes analisadas para cada tratamento. dpg = dias pós-germinação.



Gráfico 2 - Desenvolvimento radicular após a germinação de sementes de Setaria viridis em luz e escuro durante 13 dias: acompanhamento do crescimento médio (cm) da raiz primária (RP) e da raiz adventícia (RA) referente ao grupo G3.1 (raiz primária cessa o crescimento após o surgimento da adventícia). Média de 33 sementes analisadas para cada tratamento. dpg = dias pós-germinação.



Gráfico 3 - Desenvolvimento radicular após a germinação de sementes de *Setaria viridis* em luz e escuro durante 13 dias: acompanhamento do crescimento médio (cm) da raiz primária (RP) e da raiz adventícia (RA) referente ao grupo G3.2 (raiz primária continua o crescimento após o surgimento da adventícia). Média de 40 sementes analisadas para cada tratamento. dpg = dias pós-germinação.



Quanto ao crescimento médio da raiz, no grupo G2 ao final do 13º dia de avaliação o tratamento de escuro exibia um comprimento maior da raiz primária em relação à luz, com 0,97 cm contra 0,77 cm respectivamente (Gráfico 1). Tanto no grupo G3.1 quando no G3.2 essa tendência de um maior crescimento das raízes no tratamento de luz se manteve, o que pode ser percebido para os dois tipos de raízes que foram analisadas (Gráficos 2 e 3).

No Gráfico 2 nota-se que entre o sexto e sétimo dia de avaliação, para os tratamentos de luz e escuro respectivamente, o crescimento médio da raiz primária praticamente se estabiliza; enquanto que a raiz adventícia apresenta crescimento contínuo até 13º dia, nos dois tratamentos. No grupo G3.1 as raízes adventícias dos dois tratamentos na média saem a partir do 5º dia (Gráfico 2). O crescimento médio das raízes primárias do grupo G3.2 é maior nos dois tratamentos, quando comparados ao crescimento obtido no grupo G3.1 (Gráficos 2 e 3). Se mantém ligeiramente inferior o crescimento da raiz adventícia do grupo G3.2 tratamento escuro (Gráfico 3) com 1,47 cm quando comparado com o que acontece no seu representante no grupo G3.1 que apresenta 1,52 cm (Gráfico 2) ao final de 13 dias de avaliação. No grupo G3.2, nos dois tratamentos, percebe-se que apesar da raiz

primária apresentar um comprimento maior, existe uma tendência da raiz adventícia se igualar ou mesmo superar esse comprimento após 13 dias de germinação (Gráfico 3).

Quando comparados os tratamentos de luz e escuro nas avaliações realizadas após o 25º dia (Figura 17B e 17D), a distribuição dos grupos nesses tratamentos não apresentou alterações muito drásticas. No tratamento escuro temse que o grupo G2 apresentou superioridade em número, com 37% de distribuição na amostra; seguido pelo grupo G1 (27%), G3.2 (23%) e G3.1 (13%), respectivamente (Figura 17B). No que se refere ao tratamento submetido à luz desde o início da germinação (Figura 17D), o grupo G2 também foi superior (33%), seguido novamente pelos grupos G1 e G3.2 (27%) e G3.1 (13%). Nota-se que nos dois tratamentos avaliados, ao final do 25º dia, tanto o grupo G1 como o grupo G3.1 tiveram a mesma porcentagem de ocorrência na amostra.

Após o 25º dia de avaliação, a raiz primária presente no grupo G2 tem crescimento superior nos tratamentos germinados no escuro com uma diferença média de 0,3 cm quando comparado ao tratamento de luz. Essa superioridade no comprimento da raiz primária é notada já entre o 6º e 7º dia de avaliação (Gráfico 4).

Gráfico 4 - Desenvolvimento radicular após a germinação de sementes de *Setaria viridis* em luz e escuro durante 25 dias: acompanhamento do crescimento médio (cm) da raiz primária (RP) referente ao grupo G2 (crescimento apenas da raiz primária). Média de 71 sementes analisadas para cada tratamento. dpg = dias pós-germinação.



No que se refere ao tratamento G3.1, ao final de 25 dias de avaliação é possível perceber duas coisas em relação à raiz primária: uma superioridade da raiz primária do tratamento escuro e a estabilização da mesma após um determinado tempo, nos dois tratamentos. Após esse período a raiz primária do tratamento escuro tem comprimento médio de 1,13 cm contra 0,933 cm de comprimento das raízes primárias do tratamento de luz. O início da estabilização do comprimento da raiz primária se dá após o surgimento das raízes adventícias, ponto no qual o crescimento médio da raiz primária é drasticamente diminuído até que ao 13º dia de avaliação os valores médios já se estabilizaram nos dois tratamentos (Gráfico 5). Em relação às raízes adventícias do grupo G3.1, tem-se uma superioridade no comprimento médio daquelas presentes nos tratamentos de luz. Sendo que em 25 dias o comprimento médio destas é de 2,36 cm para aquelas do tratamento escuro e 2,56 cm para as do tratamento de luz (Gráfico 5).

O grupo G3.2, após os 25 dias de avaliação, apresenta uma média elevada de comprimento dos dois tipos de raízes, especialmente no tratamento de luz. Ao contrário do que acontece com o grupo G3.1, no grupo G3.2 ao 25º dia de avaliação a raiz primária do tratamento de luz tem maior comprimento médio (2,23 cm) contra 1,60 cm do tratamento de escuro (Gráfico 6). O aparecimento das raízes adventícias acontece entre o quinto e sétimo dia de avaliação, nos tratamentos de luz e escuro, respectivamente. A raiz adventícia do tratamento de luz também tem comprimento médio superior a aquela do tratamento de escuro, obtendo ao final do experimento um comprimento médio 2,72 cm contra 1,91 cm do tratamento de escuro. Na avaliação após 25 dias nota-se que mesmo no grupo G3.2 há uma tendência da raiz primária diminuir a sua taxa de crescimento após o aparecimento da raiz adventícia (Gráfico 6), porém, essa diminuição do crescimento é mais rápida e se mantém apenas no grupo G3.1 (Gráfico 5).

Gráfico 5 - Desenvolvimento radicular após a germinação de sementes de Setaria viridis em luz e escuro durante 25 dias: acompanhamento do crescimento médio (cm) da raiz primária (RP) e da raiz adventícia (RA) referente ao grupo G3.1 (raiz primária cessa o crescimento após o surgimento da adventícia). Média de 27 sementes analisadas para cada tratamento. dpg = dias pós-germinação.



Gráfico 6 - Desenvolvimento radicular após a germinação de sementes de Setaria viridis em luz e escuro durante 25 dias: acompanhamento do crescimento médio (cm) da raiz primária (RP) e da raiz adventícia (RA) referente ao grupo G3.2 (raiz primária continua o crescimento após o surgimento da adventícia). Média de 51 sementes analisadas para cada tratamento. dpg = dias pós-germinação.



Quanto aos aspectos morfológicos observados nas plântulas dos diferentes tratamentos utilizados, naquelas submetidas ao escuro (nos primeiros 5 dias de germinação) observou-se um aumento na região entre o cotilédone e o coleóptilo, chamada de epicótilo (Figura 18B). Enquanto que nas plantas provenientes dos tratamentos de luz, a distância entre essas regiões é praticamente inexistente (Figura 18A). Sendo assim, as plantas de escuro apresentaram crescimento estiolado.

Figura 18 - Crescimento de plântulas de *Setaria viridis in vitro* em diferentes condições de luminosidade no início da germinação. Plântula que foi germinada desde o início com luz (A). Plântula submetida ao escuro nos 5 primeiros dias da germinação (B). Em roxo a distância entre o cotilédone e as primeiras folhas, setas brancas indicam o ponto no qual surgiu o coleóptilo



Quando comparadas as avaliações dos tratamentos ao longo do tempo, é possível perceber que tanto no tratamento de luz (Figura 17C e D) como no de escuro (Figura 17A e B) houve alguma alteração na distribuição dos grupos. No tratamento escuro nota-se que, apesar do grupo G2 ainda ser o mais significativo isoladamente, houve uma diminuição na porcentagem referente aos grupos G1 e G2 que foi correspondente a um aumento no número de sementes que apresentavam raiz adventícia.
Enquanto ao 13º dia cerca de 32% das sementes analisadas geravam raízes adventícias, ao final do 25º dia essa porcentagem aumentou para 36% (Figura 17A e B). Tal tendência também foi observada no tratamento de luz, porém, mais acentuada, já que a porcentagem das plântulas que continham raízes adventícias foi de 33% para 40% ao final do 25º dia de avaliação (Figura 17C e D). Vale ressaltar que no tratamento de luz a porcentagem que mais aumentou até o último dia de avaliação foi aquela referente ao grupo G3.2, saltando de 18% para 27% (Figura 17C e D). Esse fato, associado a uma diminuição na porcentagem do grupo G2, indica que o tempo para a formação de raízes adventícias é variável, podendo ocorrer mais tardiamente.

No que se refere às médias de comprimento das raízes nos grupos, isoladamente, notou-se que no grupo G2 (Gráficos 1 e 4) a raiz primária do tratamento submetido ao escuro tem valores superiores aos obtidos no tratamento de luz. No grupo G3.2 (Gráficos 3 e 6) os maiores valores de comprimento de raiz, tanto da primária como da adventícia, foram observados nos tratamentos de luz. No grupo G3.1 (Gráficos 2 e 5) as raízes adventícias apresentaram maiores comprimentos nos tratamentos de luz. A respeito das raízes primárias do grupo G3.1, nas avaliações até o 13º dia havia uma superioridade no comprimento de raízes do tratamento de luz (Gráfico 2). Contudo, com o passar dos dias, a raiz primária proveniente do tratamento de escuro apresentou maior média de crescimento (Gráfico 5).

Sendo assim, quando avaliadas por um período de tempo maior, as raízes primárias que são germinadas no escuro (Gráficos 4 a 6) tendem a apresentar um comprimento maior, mesmo quando há o aparecimento da raiz adventícia. Essa afirmação só não é válida nos casos onde os dois tipos de raízes crescem conjuntamente (Grupo G3.2 – Gráfico 6), pois neles os tratamentos de luz promoveram maior crescimento de todas as raízes. No entanto, quanto à raiz adventícia, nos casos nos quais elas surgem as mesmas tendem a apresentar um crescimento médio maior em condições de luz na germinação (Gráficos 2, 3, 5 e 6).

5.4 Transformação genética e análise dos transformantes

Nos experimentos de transformação genética de *S. viridis*, a construção contendo o DR5-RFP foi transferida para uma linhagem desarmada AGL1 de *Agrobacterium tumefaciens* por meio de transformação genética via eletroporação segundo o protocolo citado no item 4.4 do presente trabalho. As mesmas foram mantidas a 28°C por 2 dias. Em seguida algumas das colônias que cresceram foram submetidas à reação de PCR para confirmação da transformação, em 3 replicatas biológicas.

O resultado da PCR foi positivo para o conjunto de primers DR5 – RFP P4 (Tabela 1) na concentração 2,5 µM de MgCl₂ com adição de DMSO (Figura 19) para duas das replicatas biológicas utilizadas com a presença de bandas entre 500 e 1000 pb. Como o esperado para o conjunto de primers DR5 – RFP P4 era entre 600 e 700 pares de bases, a confirmação foi feita positivamente. Em uma das replicatas a banda presente no gel era claramente mais forte e clara, portanto, esta foi a colônia selecionada para ser utilizada nas etapas posteriores de transformação de *S. viridis*. Para o início do processo de transformação de *S. viridis* foi utilizado o meio SvSD. Bactérias previamente transformadas e crescidas em meio YEP líquido foram ressuspendidas no meio de cultura SvSD que foi também suplementado com acetoseringona. Foram utilizadas plantas crescidas em substrato para o procedimento de transformação genética de *Setaria viridis*.

No total foram realizados 5 procedimentos de transformação de planta de *S. viridis*. Contudo, nos experimentos de confirmação dos transformantes foram utilizados três lotes de sementes possivelmente transformadas (sementes provenientes de plantas que foram submetidas à transformação genética), sendo estes lotes referentes à 02/09/2016 (lote 1), 05/10/2016 (lote 2) e 14/01/2017 (lote 3).

Figura 19 - Eletroforese em gel de agarose para a confirmação da transformação genética de *Agrobacterium tumefaciens* contendo a construção de interesse (DR5-RFP). Foram testadas duas concentrações de MgCl₂ com ou sem a adição de DMSO; para dois conjuntos de primers (Tabela 1). Foi utilizado um marcador de 1kb. O círculo pontilhado indica a banda utilizada.



Nota-se no Gráfico 7 que a utilização do glufosinato conciliado ao meio de cultura só afeta drasticamente o processo de germinação em concentrações de BASTA ® acima de 10 g/L. No entanto, no que se refere ao desenvolvimento e sobrevivência de plântulas selvagens de *S. viridis*, a concentração realmente letal equivale a 200 mg/L. Mas, em uma concentração de glufosinato à 75mg/L já é perceptível uma diminuição significativa na taxa de sobrevivência. Baseado nesse resultado, no presente trabalho a concentração de BASTA ® a 75mg/L foi selecionada como uma margem segura para a seleção das sementes provenientes do processo de transformação via "spike-dip".

Gráfico 13 - Valores médios de germinação e sobrevivência de sementes selvagens (WT) de *Setaria viridis* expostas *in vitro* a diferentes concentrações de glufosinato de amônio (BASTA®). No eixo x estão os tratamentos utilizados e no eixo y o número de sementes por placa.



Dessa forma, sementes provenientes da transformação via "spike-dip" (lote 1) foram submetidas à germinação em meio de cultura contendo BASTA ® a 75mg/L (Figura 20A). Após 12 dias de contato com o glufosinato apenas as sementes que haviam germinado e que apresentaram crescimento de parte aérea e raiz normais (Figuras 20B - C) foram transferidas isoladamente para tubos de ensaio contendo meio de cultura sem a ação do agente seletivo. De 1000 sementes potencialmente transformadas submetidas ao meio com agente seletivo apenas 43 apresentaram desenvolvimento considerado normal. Figura 20 - Sementes de Setaria viridis provenientes do processo de transformação genética "spike dip" sendo expostas ao meio de cultura ½ MS contendo o agente seletivo BASTA® a 75mg/L (A). Nas figuras B e C exemplos de plântulas que após 12 dias tiveram seu desenvolvimento considerado normal e foram transferidas para meio de cultura sem o agente seletivo



Sobre as plântulas transferidas para tubos isolados, acreditava-se que uma parcela delas pudesse ter sido efetivamente transformada, o que seria confirmado posteriormente também por reação de PCR. Tais plântulas foram acompanhadas quanto à continuidade do seu desenvolvimento por até 60 dias. Após 30 dias de avaliação notava-se ainda uma coloração verde nas folhas, porém, alguns indivíduos já tinham indícios de clorose na ponta das folhas. Além disso, o desenvolvimento delas não demonstrou continuidade e elas não cresciam em comprimento, tanto da parte aérea, quanto de raiz (Figura 21A). Na avaliação após 60 dias todas as plântulas em questão haviam morrido ou iniciado tal processo, exibido sinais muito significativos de fitotoxicidade ocasionados pela resposta ao herbicida, perdendo a coloração verde por completo e exibindo clorose e morte (Figura 21B - C).

Figura 21 - Plantas provenientes do processo de transformação genética "spike-dip" que foram selecionadas positivamente ao BASTA® e transferidas para tubos de ensaio individualizados contendo meio de cultura sem o agente seletivo após 30 dias (A) e 60 dias (B e C) em sala de crescimento



Uma vez que houve a morte de 100% das plantas provenientes da transformação expostas ao BASTA ®, inferiu-se que ou a seleção dos transformantes havia sido negativa, e nenhuma das 1000 plantas havia sido transformada, ou então poderia estar acontecendo algum problema no agente seletivo. Para evitar perdas de possíveis transformantes, foi estabelecido então que a partir daí as sementes provenientes do processo de transformação seriam germinadas em magentas contendo meio de cultura sem o glufosinato de amônio e todas elas seriam submetidas à confirmação do inserto por meio de reação de PCR individualizada.

Tanto sementes selvagens como sementes provenientes da transformação spike-dip foram germinadas em magentas, em grupos de 5. As sementes selvagens (WT) não expostas à transformação foram utilizadas como um grupo controle, uma vez que todos os experimentos de crescimento anteriores não haviam sido realizados em magentas e, já se sabia previamente que esse lote de sementes WT não apresentava dificuldade em relação à sua germinação. No que se refere às sementes oriundas do processo de transformação, utilizaram-se 3 lotes com datas diferentes. Dentre os resultados observados nesses experimentos, notou-se que em muitos casos a germinação das sementes estava comprometida desde o início (Figura 22A), ou então, nos casos onde ela acontecia (Figura 22B e D), o desenvolvimento das plântulas não estava exibindo continuidade (Figura 22B). Havia ainda uma pequena taxa de contaminação (Figura 22C), mas esta é comum a experimentos realizados *in vitro* e não foi muito diferente entre os lotes de sementes utilizados, uma vez que todos eles tiveram cerca de 2% de contaminação (Gráficos 8 a 11).

Figura 22 - Caracterização dos acontecimentos referentes à germinação de sementes provenientes do processo de transformação genética e de sementes selvagens (WT – grupo controle) germinadas em magentas contendo meio de cultura ½ MS. Há casos onde não houve germinação (A); houve germinação, porém o desenvolvimento da plântula foi interrompido (B); houve contaminação (C); e plantas que sobreviveram demonstrando crescimento aparentemente normal de parte aérea e raiz (D)



A ausência de germinação chegou a representar mais da metade das sementes em dois lotes de sementes oriundas da transformação, variando de 38% a 68% quando considerados todos os lotes (Gráficos 8 a 10). No tratamento controle essa porcentagem foi de 11% (Gráfico 11).

Gráfico 8 - Germinação média de sementes de *Setaria viridis* provenientes do processo de transformação genética "spike-dip" (lote 1) em meio ½ MS (n= 240)



Gráfico 9 - Germinação média de sementes de *Setaria viridis* provenientes do processo de transformação genética "spike-dip" (lote 2) em meio ½ MS (n= 240)



Gráfico 10 - Germinação média de sementes de *Setaria viridis* provenientes do processo de transformação genética "spike-dip" (lote 3) em meio ½ MS (n= 240)



Gráfico 11 - Germinação média de sementes de Setaria viridis provenientes do processo de transformação genética "spike-dip" (grupo controle – sementes selvagens WT) em meio ½ MS (n= 240)



Um evento que também chamou a atenção foi o de plantas que germinavam mas que, por algum motivo, não exibiam continuidade no seu desenvolvimento, muitas com uma parte aérea pequena e com indícios de morte celular (Figura 22B). No lote 2 a maioria das sementes germinava e não se desenvolvia propriamente, representando cerca de 52% da amostra (Gráfico 9). Nos outros lotes de sementes potencialmente transformadas essa porcentagem foi de 32% no lote 3 (Gráfico 10) e 25% no lote 1 (Gráfico 8), sendo elevada também no tratamento de sementes selvagens (controle) (Gráfico 11).

Para facilitar a compreensão dos eventos observados na germinação desses lotes, nas avaliações da germinação e/ou desenvolvimento desse experimento considerou-se as sementes que haviam sobrevivido como aquelas que apresentaram crescimento normalizado. Aquelas cuja germinação não ocorreu ou quando o desenvolvimento foi interrompido foram consideradas como casos nos quais não houve crescimento normal da plântula.

Dessa forma, os resultados obtidos indicam uma diferença considerável entre a germinação de sementes selvagens e daquelas submetidas ao processo de transformação via "spike-dip". Nas sementes selvagens a taxa de sobrevivência média foi de 50%, enquanto que considerando todos os lotes de sementes submetidas à transformação esses valores eram de 4,58% para o lote 1 (02/09/2016); 7,92% para o lote 2 (05/10/2016) e 8,75% para o lote 3 (14/01/2017) (Gráfico 12). Com base no Gráfico 12 foi possível também estabelecer uma relação entre a porcentagem média de plântulas com crescimento normal e o tempo passado desde o processo de transformação, uma vez que nos lotes de sementes resultantes desse processo quanto mais velha eram as sementes, menor a porcentagem de plântulas com desenvolvimento normal.

Ou seja, em todos os casos de sementes potencialmente transformadas a porcentagem de plântulas com desenvolvimento anormal era equivalente a mais de 90% da amostra (Gráfico 12). Tendo em vista que esse valor era muito baixo quando considerado o total de amostras de sementes que passaram pela transformação, e também que a maioria delas não alcançava um tamanho suficiente para que pudessem ser consideradas aptas para o procedimento de extração de DNA da folha, tanto a extração como a confirmação dos transformantes por PCR foi inviabilizada.

Gráfico 12 - Avaliação do crescimento de sementes provenientes do processo de transformação genética e de sementes selvagens (WT – grupo controle) germinadas em magentas contendo meio de cultura ½ MS



É possível perceber que nas magentas referentes às sementes selvagens não expostas à transformação genética via "spike-dip" houve um maior número de plântulas com desenvolvimento, tamanho e coloração de folhas normais (Figura 23A). Nas sementes WT pelo menos uma das 5 sementes dispostas nas magentas exibia crescimento normal (Figura 23A). Naquelas onde foram colocadas as sementes dos lotes oriundos das transformações poucas plântulas se desenvolveram normalmente, a maioria não germinou ou não apresentavam parte aérea desenvolvida e acabavam morrendo (Figura 23B).



Figura 23 - Germinação de sementes selvagens WT não expostas à transformação (A) e de lotes de sementes provenientes do processo de transformação genética (B)

Tendo em vista o resultado inesperado em relação à germinação de sementes potencialmente transformadas, buscou-se entender quais os possíveis motivos que ocasionaram essa inviabilidade nas sementes. Dentre eles estavam danos físicos nas sementes, que poderiam ser resultantes tanto da sua formação, como também do processo de escarificação. Mas também existia a possibilidade de ser uma inviabilidade biológica, na qual o desenvolvimento foi interrompido por causa de algum tipo de dormência que não foi superada, ou então por algum, ainda desconhecido, efeito negativo no desenvolvimento ocasionado pelo processo de transformação genética "spike-dip".

5.5 Análises de raios-X e viabilidade de sementes

Para avaliar a existência de danos físicos nas sementes foram feitas análises em raios-X de sementes de *S. viridis* escarificadas e não escarificadas do lote que não passou pela transformação (WT); e também de sementes provenientes dos lotes 2 e 3 da transformação genética via "spike-dip" (Figuras 24 e 25). Apesar dos experimentos *in vitro* utilizarem sempre as sementes escarificadas, tendo em vista que havia a possibilidade de que o próprio procedimento de transformação estivesse de alguma forma gerando distúrbios no desenvolvimento das sementes oriundas de plantas submetidas a ele, era importante analisar também as sementes não escarificadas para compreender o comportamento de germinação do lote de sementes como um todo. Nas imagens de raios-X das sementes não escarificadas (Figura 24) foram selecionadas aleatoriamente 112 sementes WT não submetidas à transformação; 106 sementes do lote 2 (05/10/2016) e 104 sementes do lote 3 (14/01/2017) (Gráfico 13 e Figura 24).

Em relação à avaliação de danos físicos das sementes, elas foram subdivididas em danos físicos leves que consistiam em pequenas trincas que aparentemente não compreendiam a região embrionária; e havia ainda os danos físicos graves que eram representados por sementes vazias ou de tamanho drasticamente reduzido. Os casos de sementes vazias eram observados somente nas sementes não escarificadas, uma vez que o próprio processo de escarificação acabava selecionando apenas aquelas onde de fato existe a formação de uma semente.

Figura 24: Sementes de *Setaria viridis* não escarificadas submetidas a análise de raios X. Os lotes de sementes indicados como DR5 são provenientes do processo de transformação "spike-dip" (lote 1 e 2, 05/10/2016 e 14/01/2017, respectivamente) e as sementes selvagens não expostas à transformação estão indicadas como WT. Nota-se a presença de danos físicos leves (trincas no endosperma) e graves (semente vazia ou de tamanho reduzido).



Na avaliação das imagens de raios-X feitas com sementes não escarificadas é possível constatar que nas sementes WT que não foram expostas à transformação cerca de 89% das sementes não apresenta nenhum tipo de dano físico, enquanto que nos lotes expostos à transformação esse valor cai para aproximadamente 88% no lote 2 (05/10/2016) e 38% no lote 3 (14/01/2017) (Gráfico 13). Nota-se que o lote 3 apresentou um aumento significativo da ocorrência de danos graves em relação aos outros lotes de sementes (Gráfico 13) que se deu principalmente pelo elevado número de sementes vazias e mal formadas (com tamanho reduzido) (Figura 24). Na avaliação das imagens de raios-X das sementes escarificadas foram avaliadas 111 sementes WT não expostas à transformação; 132 sementes do lote 2 e 136 sementes do lote 3, ambos compostos de sementes formadas após processo de transformação.

Gráfico 13 - Avaliação através de raios X da qualidade de sementes não escarificadas de *Setaria viridis* obtidas em três lotes: sementes selvagens (WT) e sementes obtidas após processo de transformação genética (DR5). Danos físicos leves correspondem a trincas no endosperma e danos graves a semente de tamanho reduzido ou sementes vazias. Total de sementes avaliadas de cada lote: WT = 112, DR5 5/10/16 = 106; DR5 14/1/17 = 104.



Figura 25 - Sementes de *Setaria viridis* escarificadas submetidas à análise de raios X. Os lotes de sementes indicados como DR5 são provenientes do processo de transformação "spike-dip" (lote 1 e 2, 05/10/2016 e 14/01/2017, respectivamente) e as sementes selvagens não expostas à transformação estão indicadas como WT. Nota-se a presença de danos físicos leves (trincas no endosperma) e graves (semente vazia ou de tamanho reduzido).



Visualmente pouca diferença é percebida entre os lotes de sementes escarificadas analisados, apenas sendo notável a existência de um número maior de sementes de tamanho reduzido no lote 3 (14/01/2017) quando comparado ao outro lote exposto à transformação (Figura 25 e Gráfico 14). Diferentemente do que aconteceu com as sementes não escarificadas, naquelas escarificadas todos os lotes observados apresentavam mais de 90% das sementes livres de danos físicos e com tamanho normal. Em relação aos lotes que passaram pela transformação, o lote 2 (05/10/2016) só apresentou danos físicos leves e o lote 3 (14/01/2017) teve danos leves/graves não muito discrepantes em relação aos vistos no lote WT (Gráfico 14).

Gráfico 14 - Avaliação através de raios X da qualidade de sementes escarificadas de *Setaria viridis* obtidas em três lotes: sementes selvagens (WT) e sementes obtidas após processo de transformação genética (DR5). Danos físicos leves correspondem a trincas no endosperma e danos graves a semente de tamanho reduzido ou sementes vazias. Total de sementes avaliadas de cada lote: WT = 111, DR5 5/10/16 = 132; DR5 14/1/17 = 136.



Nos testes preliminares houve a confirmação da reação com tetrazólio, indicativo de que para essa espécie e nas condições do presente trabalho, esse teste seria passível de ser realizado para comparar outros lotes de sementes (Figura 26). Além das sementes nas quais os embriões reagiam ao tetrazólio, era perceptível que em alguns casos não havia reação e as sementes não apresentavam nenhuma coloração (Figura 26A), excluindo, portanto, a possibilidade da existência de falsos positivos, uma vez que nem todas as sementes tiveram a mesma resposta ao tetrazólio. Contudo, além dos casos extremos nos quais a reação nitidamente poderia ser percebida ou não, foi constatada a presença de diferentes graus de reação, representadas por colorações que variavam do branco/transparente (não reagiu) ao vermelho fraco (desuniforme no embrião); até chegar aos casos onde o vermelho carmin era bem forte e uniforme por toda a região embrionária (reagiu completamente) (Figura 26B).

Figura 26 - Sementes de Setaria viridis submetidas ao teste de tetrazólio para avaliação da viabilidade da germinação. Semente na qual não ouve reação (sem coloração – à esquerda) e outra na qual a reação foi visualizada (à direita) (A); Diferentes tonalidades de coloração resultantes da reação com tetrazólio para as sementes de *S. viridis* submetidas ao teste indicam a presença de um gradiente na viabilidade das sementes



Com base nos resultados obtidos nos testes preliminares que indicavam um gradiente nos níveis de viabilidade das sementes de *S. viridis* foi possível se estabelecer a intensidade de coloração para que a viabilidade fosse considerada elevada.

Sendo assim, considerando os resultados dos testes de viabilidade de sementes com uso de tetrazólio correspondentes aos lotes de sementes submetidas ao processo de transformação (Figura 27) é possível perceber, inclusive visualmente que, no lote 05/10/2016 as sementes reagiram menos e com menor intensidade (Figura 27) quando comparado com o outro lote de sementes provenientes da transformação (lote 14/01/2017 – Figura 27). As sementes não expostas à transformação apresentaram nitidamente um maior número de reações positivas ao tetrazólio (Figura 27).

Figura 27 - Sementes selvagens (WT) e provenientes do processo de transformação genética (5/10/16 e 14/01/17) submetidas ao teste de viabilidade de sementes com tetrazólio



As sementes de todos os lotes utilizados no teste de tetrazólio foram avaliadas uma a uma conforme a sua coloração e aquelas que exibiam um vermelho intenso na região do embrião foram avaliadas como sendo viáveis. Dessa forma, obteve-se que de 130 sementes selvagens não expostas à transformação, 60 % delas se mostraram viáveis no teste com tetrazólio; enquanto que nos lotes de sementes obtidas após a transformação, dessa mesma quantidade de sementes analisadas 37 e 64 % eram viáveis, para os lotes de 05/10/2016 e 14/01/2017, respectivamente (Gráfico 15).

Gráfico 15 - Viabilidade de sementes selvagens (WT) e de sementes provenientes do processo de transformação (5/10/16 e 14/01/17) baseado na reação obtida com o teste de tetrazólio. Os números nas barras indicam o número total de sementes presentes em cada condição analisada (n=130)



Nos experimentos de germinação em magentas uma grande porcentagem de plântulas de *S. viridis* submetidas ao processo de transformação não germinavam ou tinham o seu desenvolvimento cessado em determinado momento. Assim, para melhor elucidar o que estava acontecendo com a viabilidade dessas plântulas, após 20 dias de cultivo em meio de cultura as sementes do lote 14/01/2017 que não germinaram e aquelas que não apresentavam crescimento normal foram coletadas e submetidas à reação com tetrazólio (Figura 28).

O resultado desse experimento foi o de que, as sementes que não germinaram como o esperado não apresentavam praticamente nenhum sinal de viabilidade, além de já exibir indícios degradação do material com colorações mais intensas do material vegetal (Figura 28A).

Figura 28 - Sementes de Setaria viridis submetidas ao processo de transformação genética (lote 14/01/2017) que não germinaram (A) e aquelas que germinaram, porém não apresentaram continuidade no seu desenvolvimento (B, C e D). Imagens feitas com sementes coletadas após 20 dias em meio de cultura ½ MS



Quando avaliada a viabilidade do material que não apresentava crescimento normal, nota-se que na maioria dos casos não há formação completa de parte aérea (Figura 28 B). No que se refere à viabilidade, em alguns casos há um sinal fraco indicando que em algum momento houve a viabilidade, no entanto, esse sinal está se desfazendo, uma vez que nas pontas do material já não é mais exibido (Figura 28B e C). Nota-se inclusive que, nos casos onde houve formação de raiz, todas elas apresentam após esses 20 dias em meio de cultura a presença de cores escuras que possivelmente indicam degeneração do material, uma vez que não existe nenhuma sinal da reação com tetrazólio em nenhuma raiz primária formada neste material que apresentou dificuldades de desenvolvimento (Figuras 28B-D). Em alguns casos puderam ser observadas plântulas oriundas do processo de transformação que não tiveram seu desenvolvimento continuado, porém, apresentaram formação tanto de raiz, como de parte aérea, indicando que em algum momento a semente encontrava-se viável. No entanto, após um período no meio de cultura a mesma deixou de apresentar viabilidade, indicando, portanto, morte celular (Figura 28D).

6 DISCUSSÃO

Apesar do desenvolvimento gametogênico em plantas já ter sido descrito em estruturas masculinas e femininas de Arabidopsis thaliana (CHANG et al., 2011; LI et al., 2015; REYES-OLALDE; MARSCH-MARTÍNEZ; DE FOLTER, 2015), e em monocotiledôneas como o arroz (ZHANG; LUO; ZHU, 2011) e o milho (MCCORMICK; MCCORMICK, 1993), as informações obtidas nos mesmos não eram completas em relação à correlação entre o desenvolvimento das estruturas masculinas e femininas. Ou então, tinham enfoque muito específico em aspectos moleculares de tais estruturas, e não contribuíam muito no sentido de entender a formação e desenvolvimento das panículas do ponto de vista morfológico. No que diz respeito às monocotiledôneas, alguns estudos sobre gametogênese e fertilização foram realizados com milho (ZHOU; JURANIĆ; DRESSELHAUS, 2017) e em outras espécies de gramíneas (FURNESS, 1999). Há também estudos sobre características do desenvolvimento de parte aérea (PERRETA et al., 2011) e sobre arquitetura de inflorescências em gramíneas (BOMMERT; WHIPPLE, 2017), mas tais trabalhos não associam essas informações com aspectos morfológicos práticos para a espécie Setaria viridis, ou mesmo para o gênero no qual ela está inserida. O trabalho de Furness (FURNESS, 1999) indicava que no grupo das Poaceae a gametogênese era sucessiva, concordando com os resultados do presente trabalho para Setaria viridis, no qual foi observado que a formação das anteras se dá primeiro e de modo mais acelerado quando comparado às estruturas femininas do antécio fértil. A insuficiência de informações específicas sobre o desenvolvimento da panícula da espécie S. viridis, ou mesmo para o gênero Setaria, explicavam a necessidade de um estudo prévio com a finalidade de se estabelecer fases de desenvolvimento das panículas e espiguetas para os futuros procedimentos de transformação genética via "spike-dip".

As informações obtidas durante o acompanhamento do desenvolvimento das espiguetas de *S. viridis* mostravam que quando eram observadas em microscopia, panículas que já haviam sido emitidas da bainha foliar, muitas espiguetas já apresentavam formação de sementes. No método de transformação genética "spike-dip", que foi utilizado neste trabalho, um dos princípios é o de que a transformação aconteceria inicialmente nos tecidos da planta-mãe que é submetida

à transformação, anteriormente à formação da semente (DESFEUX; CLOUGH; BENT, 2000). Dessa forma, permitindo então que as sementes obtidas após esse processo também carregassem as modificações genéticas referentes à inserção de novo material genético.

O processo de transformação genética "floral-dip" é bem otimizado para outras espécies consideradas modelos como Arabidopsis (CLOUGH; BENT, 1998) e Capsella bursa-pastoris (BARTHOLMES; NUTT; THEIBEN, 2008); além de ser utilizado em monocotiledôneas como cana (MAYAVAN et al., 2015), arroz (RATANASUT; ROD-IN; SUJIPULI, 2017) e em Setaria viridis (MARTINS et al., 2015b). No presente trabalho a metodologia utilizada na transformação genética "spike-dip" baseou-se naquela utilizada por Martins (2015b). No entanto, a observação de que muitas espiguetas de S. viridis já exibem formação da semente quando são liberadas da bainha foliar fez com que, no presente trabalho, o período de realização do processo de transformação fosse questionado e modificado, uma vez que a eficácia do processo, que já é baixa, poderia ser reduzida ainda mais com a utilização de panículas em estágio avançado de desenvolvimento. Dessa forma, foram utilizadas na transformação não somente panículas submersas em meio de cultura contendo Agrobacterium, mas também e principalmente, microinjeções do meio de transformação diretamente na bainha foliar, quando a panícula ainda não havia sido emitida. Logo, os estudos da formação das estruturas florais de S. viridis foram essenciais no presente trabalho, pois permitiram um delineamento mais preciso dos prováveis estágios adequados para a realização do processo de transformação genética, visando sempre um aumento em sua eficiência, e possível aumento no número de transformantes obtidos.

Sendo assim, apesar de Martins (2015b) ter obtido sucesso na transformação via "spike-dip", é muito provável que um maior conhecimento acerca do desenvolvimento das estruturas florais da espécie *S. viridis* contribua para a otimização deste protocolo de transformação genética, aumentando a eficiência do mesmo para a espécie. Ainda em relação à utilização de estruturas reprodutivas em procedimentos de transformação genética, já existe um estudo com *Setaria italica* que utiliza inflorescências imaturas na formação de calos (WANG et al., 2011). Apesar de ainda ser um método clássico e dependente de cultura de tecidos, o mesmo pode também ser uma alternativa de metodologia para a espécie *S. viridis*,

uma vez que obteve êxito para outra espécie muito próxima filogeneticamente. Para *Setaria viridis* já existe um protocolo de transformação clássica a partir da formação de calos (WANG, 2015). O protocolo de Wang (2015) vem como uma alternativa ao método utilizado no presente trabalho, pois apresenta uma porcentagem de obtenção de transformantes de 5%, maior do que o método proposto por Martins (2015b); também utiliza a cepa AGL1; e por fim, faz uso de uma construção na qual o agente seletivo é a higromicina. Tendo em vista que no presente trabalho houve problemas com a seleção utilizando BASTA®, algumas alternativas que poderiam ser diferenciais no sucesso da transformação genética seriam a utilização de uma concentração reduzida do agente seletivo BASTA® ou mesmo a troca de agente seletivo, além do uso de umaoutra construção já padronizada para a espécie.

Observações iniciais da germinação das plantas de Setaria viridis cultivadas in vitro demonstraram a presença de uma estrutura que era responsável por romper o tegumento da semente. Dias após esse evento tal estrutura perdia a coloração preliminar e exibia o que parecia ser um processo de senescência. Levando em consideração as informações relatadas por outros grupos que trabalhavam com a mesma espécie, era provável a existência de um mecanismo do desenvolvimento do meristema radicular da espécie S. viridis no qual havia degeneração da raiz primária ou uma perda de identidade meristemática do meristema. Tal mecanismo poderia ocasionar inclusive alterações morfológicas na estrutura da raiz primária. Sendo assim, no presente trabalho inicialmente não foi excluída a possibilidade de que essa estrutura que, inclusive apresenta tricomas semelhantes aos pelos radiculares, fosse uma raiz primária que perdeu sua identidade meristemática ou organização radial. No entanto, a partir dos resultados obtidos ao longo do trabalho, e principalmente das análises de microscopia de luz, foi possível perceber que tal estrutura, a coleorriza, não era uma raiz primária e não apresentava organização semelhante a qualquer estrutura radicular.

Para as análises da estrutura da raiz primária em microscopia de luz foram utilizadas raízes nos primeiros dias de germinação, provenientes de plantas nas quais frequentemente não haviam surgido ainda raízes adventícias. Baseando-se na hipótese inicial deste trabalho era possível que a região meristemática da raiz primária fosse drasticamente afetada somente após o surgimento de raízes adventícias. As análises em microscopia confocal refutaram tal possibilidade, uma vez que a organização do meristema radicular não se alterou mesmo após o aparecimento de raízes adventícias.

Não foram encontrados trabalhos que citem a presença ou mesmo que caracterizem a presença de coleorriza em *Setaria viridis*. No entanto, a presença dessa estrutura em monocotiledôneas é demonstrada de forma bem consolidada na literatura, inclusive na família Poaceae. Alguns autores sugerem inclusive que a existência de uma raiz com formação endógena que necessita romper algum tecido (no caso, a coleorriza) para se tornar visível é exclusividade do grupo das Poaceae (HOCHHOLDINGER et al., 2004a).

Apesar de não ser uma regra, já foi demonstrada a presença de coleorriza com pelos e uma fenda na região do escutelo em gramíneas (NAKAMURA; SCATENA, 2009), muito semelhante às estruturas observadas em microscopia para a espécie *Setaria viridis* no presente trabalho (Figuras 11 e 12).

Acredita-se que a coleorriza tem função de proteger a radícula de danos mecânicos conforme a raiz entra no solo, contribuindo também na prevenção da desidratação dos tecidos presentes na semente. Além disso, alguns trabalhos indicam que é provável que a coleorriza tenha um papel importante no controle da germinação. Observações realizadas em arroz, que também é uma monocotiledônea, sugerem modificações no tecido da coleorriza anteriores à emergência da radícula (NONOGAKI; BASSEL; BEWLEY, 2010). Concordando com tal informação, a espécie Setaria viridis também exibe modificações anteriores à emergência da raiz de origem embrionária. Tais modificações são representadas na espécie S. viridis pelo aumento do número e tamanho de células da coleorriza, além do surgimento de tricomas assim que a coleorriza rompe o tegumento da semente. Alterações celulares na coleorriza (ao longo do desenvolvimento e também espacialmente) também foram notadas em cevada (BARRERO et al., 2009) e demonstravam que o rompimento da raiz primária geralmente não acontecia na base da coleorriza, mas sim longitudinalmente, indicando possíveis diferenças de aderência entre as células da base e aquelas do centro/lateral da coleorriza. Aparentemente as células da coleorriza de S. viridis têm diferenças de formato e tamanho, mas não apresentam diferença significativa de espaço intercelular. Porém, nas análises microscópicas realizadas em Setaria viridis, a raiz frequentemente emerge do centro da coleorriza, podendo indicar algum tipo de resistência celular à emergência da raiz na base da coleorriza, assim como acontece com cevada.

Um estudo caracterizou o início da germinação, suas estruturas e qual a implicação desse processo na perda de água da semente de cevada, indicando que a coleorriza de cevada emerge da semente ainda nas primeiras 18h, enquanto que a raiz se torna visível ainda no primeiro dia após a semente ser embebida (MA; BYKOVA; IGAMBERDIEV, 2017), períodos muito semelhantes àqueles observados para *S. viridis*. Além disso, o mesmo trabalho com cevada indicou que, com a emergência da coleorriza, o processo de germinação efetivamente se inicia e a semente perde muita água, sendo submetida muitas vezes a um estresse hídrico. Notou-se, portanto que a emergência da coleorriza da coleorriza em cevada é caracterizada por mudanças morfológicas e fisiológicas importantes na continuidade da germinação.

Os trabalhos com espécies de monocotiledôneas citados (BARRERO et al., 2009; MA; BYKOVA; IGAMBERDIEV, 2017; NONOGAKI; BASSEL; BEWLEY, 2010) sugerem que possivelmente as modificações na coleorriza são importantes não somente para o rompimento do tegumento, como também para a manutenção e controle do processo de germinação. Tendo como base esses outros trabalhos, e também o trabalho de Nakamura e Scatena (2009), no que se refere à espécie *Setaria viridis*, na qual a coleorriza apresenta tricomas logo após a sua emergência, é provável que o surgimento desses pelos seja uma estratégia adaptativa de resistência ao estresse hídrico causado pelo início da germinação. Assim, os tricomas semelhantes à pelos radiculares poderiam ser estruturas importantes na manutenção do teor hídrico da semente, evitando que a plântula tenha o seu desenvolvimento interrompido.

Em virtude da carência de informações a respeito da estrutura e da organização do meristema radicular em *Setaria viridis* foram realizadas as análises em microscopia de luz. Na literatura as informações mais abundantes se referem às raízes de *Arabidopsis thaliana* (SCHERES et al., 1994; TIAN; DE SMET; DING, 2014), servindo como modelo para outros possíveis arranjos radiculares. No entanto, por ser uma dicotiledônea, o esquema molecular e anatômico observado em *A. thaliana* muitas vezes não se aplica às monocotiledôneas.

Trabalhos com milho indicam que nessa espécie existem 3 tipos de raízes que não sejam a primária: as raízes laterais, as raízes seminais e as adventícias com origem na coroa (HOCHHOLDINGER; YU; MARCON, 2017). Neste trabalho, nos experimentos de acompanhamento do crescimento de raiz in vitro foi possível notar com clareza a presença da raiz primária, além das raízes laterais e adventícias. No entanto, nas análises de microscopia de varredura foi percebida a presença de uma raiz com origem na parte aérea da planta (Figura 10J). Não foi possível concluir que essa raiz era originária da coroa, pois, a plântula ainda não havia crescido o suficiente para exibir tal estrutura. Experimentos de acompanhamento de crescimento de raízes em milho e sorgo diferem quanto à presença das raízes seminais, em sorgo tal categoria não existe nos estágios iniciais do desenvolvimento (SINGH et al., 2010). As informações obtidas nos experimentos de acompanhamento do crescimento de raízes em Setaria viridis concordam com tais dados. Sendo assim, apesar dos dados obtidos em microscopia eletrônica de varredura não serem suficientes para concluir qual a origem da raiz da figura 10J, ao se comparar as imagens obtidas com sorgo, e as análises feitas nos outros experimentos do presente trabalho, não existem raízes seminais na espécie S. viridis. Há ainda trabalhos que comparam a organização celular do meristema radicular em Arabidopsis e cereais como o milho e o arroz, abordando aspectos morfológicos e anatômicos (HOCHHOLDINGER et al., 2004b). Nos cereais a presença de raízes adventícias é comum e abundante e a formação de raízes laterais pode acontecer nas camadas de periciclo ou na endoderme, assim como ocorre em S. viridis. No entanto, a organização das células do centro quiescente em S. viridis aparenta ser centralizada em um número reduzido de células, assim como acontece com Arabidopsis thaliana, diferindo, portanto, de outras monocotiledôneas que têm entre 800 e 1200 células deste tipo (HOCHHOLDINGER et al., 2004b; HOCHHOLDINGER; ZIMMERMANN, 2008).

Um estudo de acompanhamento do desenvolvimento de raízes adventícias em batata foi equivalente ao realizado no presente trabalho, indicando que com o passar do tempo tanto o número, como o comprimento das raízes adventícias aumenta (JOSHI et al., 2016). Além disso, Joshi e colaboradores (2016) indicam que elevadas concentrações de nitrato aumentam o comprimento das raízes adventícias. A falta de trabalhos correlacionando crescimento de raiz com condições ambientais e nutricionais *em S. viridis* abre muitas possibilidades de estudos futuros para a espécie.

No que se refere aos dados de crescimento de raízes de Setaria viridis, notase uma superioridade do grupo G2 – onde não há emissão de raiz adventícia - nos dois tratamentos avaliados, ao longo dos dois períodos de avaliação e classificação. O número de plântulas pertencentes ao grupo G2 é seguido pelo grupo G1, G3.2 e G3.1, respectivamente. Tais dados demonstram que nas condições nas quais as sementes foram germinadas, no presente trabalho, e no tempo de avaliação analisado, existe uma preferência para não emitir raízes adventícias (nos primeiros 25 dias de análise). Porém, quando elas são emitidas, a maioria delas têm crescimento concomitante à raiz primária. O grupo G3.1, aquele no qual as raízes primárias paravam de crescer após o surgimento da adventícia, foi o menos abundante em todos os tratamentos e tempos de avaliação. Este dado é importante para refutar a hipótese inicial deste trabalho, que foi baseada em relatos para monocotiledôneas (ESAU, 1976) e em estudos prévios de outros grupos com a espécie S. viridis (Linhares, F.S., comunicação pessoal). Nessa hipótese inicial era previsto que a raiz primária deveria se degenerar e então existiria uma predominância de raízes adventícias. Contudo, para que esta fosse comprovada o grupo de plântulas classificadas como G3.1 deveria ser o mais abundante, o que não aconteceu em nenhum momento do período de avaliação em nenhuma das condições de luz. Já se sabe da existência de um miRNA responsável pela inibição do crescimento da raiz primária em Arabidopsis thaliana (XUE et al., 2017), no entanto, não há estudos que relatem nenhum mecanismo semelhante que pudesse explicar essa estagnação no desenvolvimento da raiz primária em S. viridis, observada no grupo G3.1 do presente trabalho.

Comparativamente, com um aumento no número de dias de avaliação a taxa de germinação total aumentava o número de plântulas que apresentavam apenas raiz primária (G2) diminuía e havia um aumento no número de casos nos quais as raízes adventícias cresciam juntamente com as primárias (Grupo G3.2). Ou seja, as sementes que germinavam tardiamente e aquelas que anteriormente exibiam estagnação do crescimento da raiz primária, continuaram a se desenvolver e a exibir emissão das raízes adventícias. Estudos com outra planta invasora de ambientes agrícolas, o capim-arroz, demonstraram que o tempo de germinação é

dependente da temperatura, e que uma temperatura muito baixa corrobora para que a germinação tardia ocorra (BASTIANI et al., 2015).

Na literatura há pouca informação correlacionando o desenvolvimento do meristema radicular de origem embrionária com o surgimento de raízes adventícias. Tal fato aliado à refutação da hipótese inicial proposta neste trabalho tornam muito difícil se estabelecer qualquer comparação entre esses eventos e trabalhos anteriores. No entanto, com as análises feitas nesse trabalho pôde ser percebido que existem várias possibilidades de arquiteturas de tipos de raízes a serem desenvolvidos para a espécie *S. viridis*, e que provavelmente essas escolhas a respeito dos tipos de raízes a serem emitidas são feitas graças a uma somatória de estímulos endógenos e ambientais, denotando uma percepção da planta acerca das condições totais na qual está submetida (BIRNBAUM, 2016). Corroborando com isso existe um trabalho com *Setaria italica* que sugere que fatores ambientais, como a temperatura do solo, afetam variáveis como o número, área ocupada, diâmetro e biomassa radiculares (AIDOO et al., 2016).

Alguns trabalhos sugerem que deficiências nutricionais e hídricas, ou mesmo o excesso dessas variáveis, modulam a arquitetura das raízes. Elevadas concentrações de nitrato e zinco podem inibir o crescimento da raiz primária (CELIS-ARÁMBURO et al., 2011; ZHANG et al., 2018), porém, em alguns casos essa inibição promove o desenvolvimento de raízes laterais (ZHANG et al., 2018). Em estudos com morfologia de raiz em milho observou-se que em um ambiente pobre em potássio, as raízes laterais se sobressaem às outras em número e tamanho, provavelmente em uma tentativa de espalhar o seu sistema radicular e aumentar a absorção deste nutriente, sendo essa capacidade de adaptação variável entre as diferentes variedades da planta (ZHAO et al., 2016). Já foram descritos em trigo mecanismos de adaptação que favorecem um aumento na profundidade das raízes para captação de água em camadas mais profundas (WASSON et al., 2012). Raízes adventícias geralmente apresentam um comprimento e profundidade maior do que as primárias, assim, seria lógico que em condições de falta de água a emissão desse tipo de raiz fosse promovida. No entanto, nos experimentos in vitro, nos quais a quantidade de água se mantém relativamente constante, a escolha deste tipo de raiz talvez não seja prioridade para a planta. Esse fato pode ser uma explicação pelo qual no presente trabalho o número de casos nos quais só existia raiz primária (G2) foi superior em todos os tratamentos.

Indícios levam a crer que a arquitetura das raízes de *S. viridis* é modulada por condições ambientais e interações hormonais. Correlacionando esse fato aos estudos de Penfield (2017) que sugerem mecanismos de controle genético oriundos da planta-mãe, é ainda possível que as condições ambientais e nutricionais anteriores à progênie avaliada influenciem os resultados acerca do crescimento dos diferentes tipos de raízes na espécie analisada.

Em um contexto que demonstrava a existência de diferentes tipos de raízes que tinham seu surgimento provavelmente modulado por fatores ambientais, dentre eles a concentração de hormônios como a auxina, era importante a avaliação dos locais nos quais haviam picos deste hormônio. A análise dessas regiões nas quais esses picos podiam ser observados na raiz e de possíveis rearranjos nos picos de auxina ao longo do desenvolvimento de *Setaria viridis* poderiam ser indicativos da relação entre o crescimento da raiz primária e o surgimento da raiz adventícia. Nesse contexto, a transformação genética com um promotor responsivo à auxina (DR5) associado a um gene repórter (RFP) era importante para permitir a visualização desses picos de auxina. Possibilitando então a correlação de alterações na organização do meristema radicular com mudanças nos níveis hormonais locais.

Para a seleção dos potenciais transformantes foi utilizado como agente seletivo o glufosinato de amônio (BASTA®), herbicida que já foi usado para essa finalidade na concentração de 50mg/L para *Arabidopsis thaliana* (WEIGEL; GLAZEBROOK, 2006; XU et al., 2017). Trabalhos prévios empregaram o mesmo agente na seleção de transformantes em *S. viridis* (MARTINS et al., 2015a), utilizando concentrações menores, mas com a adição concomitante de outro agente seletivo como a higromicina.

Como relatado nos resultados do presente trabalho, a utilização da seleção dos transformantes com BASTA® não teve êxito, indicando duas possibilidades: a necessidade de uma otimização do agente seletivo/vetor utilizado, visto que o mesmo tem como base estudos em milho (GALLAVOTTI et al., 2008); ou mesmo a ineficiência do processo de transformação via "spike-dip", uma vez que, notou-se

neste trabalho que a eficiência do procedimento pode ser muito alterada conforme o estágio de desenvolvimento das panículas, sendo importante a definição de fase do desenvolvimento no qual a fertilização não tenha ocorrido ainda em boa parte das espiguetas.

A baixa germinação das sementes provenientes do procedimento de transformação genética "spike-dip", mesmo em meio de cultura sem o agente seletivo, ainda permanece como uma questão em aberto no presente trabalho. Pode-se discutir algumas possibilidades acerca da inviabilização da germinação dessas sementes, dentre elas: a esterilização das sementes; a existência de dormência e o procedimento utilizado para superá-la; o tempo de vida dos lotes de sementes utilizados; além de um suposto efeito negativo do procedimento de transformação via "spike-dip" na viabilidade das sementes produzidas.

A esterilização utilizando vapor de cloro gel com ácido clorídrico foi proposta anteriormente para sementes de *Arabidopsis thaliana* (CLOUGH; BENT, 1998), que são sementes menores e mais frágeis do que aquelas de *S. viridis*. Esse fato, associado à ausência de indícios de danos às sementes nas análises de raios-X realizadas no presente trabalho, suportam a ideia de que é pouco provável que o procedimento de esterilização tenha sido o responsável por causar alguma inviabilidade. Além disso, nos outros experimentos *in vitro*, que utilizavam sementes selvagens da mesma linhagem A10 de *S. viridis*, o mesmo procedimento de esterilização foi aplicado e não houve redução drástica na germinação.

No que se refere à dormência em sementes, em especial naquelas de monocotiledôneas, há estudos que indicam que a mesma é modulada por uma série de fatores endógenos e ambientais, em um esquema de sinalização complexo que envolve hormônios ou até mesmo estruturas da semente, como por exemplo, a coleorriza (MA; BYKOVA; IGAMBERDIEV, 2017). Estudos sugerem que, apesar de ainda serem desconhecidos os mecanismos triviais para que a germinação aconteça, possivelmente os hormônios têm papel fundamental nesse processo e na superação da dormência (NONOGAKI; BASSEL; BEWLEY, 2010). A dormência é característica comum a outras espécies do gênero *Setaria*, como observado para *S. faberi*, sugerindo-se que o comportamento das plântulas ao longo do desenvolvimento, como na dispersão de sementes, é dependente do estado de dormência observado no momento da germinação, sendo essa dormência

modulada por fatores ambientais (JOVAAG; DEKKER; ATCHISON, 2012). Além disso, Jovaag e colaboradores (2012) sugerem que há uma possível "memória" correlacionada com uma série de fatores ambientais no mecanismo de dormência em Setaria. Outros estudos também indicam que as plantas apresentam mecanismos de controle da dormência e da germinação, baseando-se em informações passadas às sementes a partir do tecido materno. Ou seja, no que se refere à germinação e dormência, fatores hereditários podem deter parte do controle do comportamento de sementes da progênie. Assim, o comportamento delas pode ser modulado desde o início da maturação da semente, e não somente na germinação em si. Esse fato pode estar intimamente ligado também a estratégias de dispersão que favoreçam a sobrevivência das plântulas (PENFIELD, 2017). Neste trabalho não foi feito nenhum tipo de experimento correlacionando as condições de cultivo das plantas-mãe de S. viridis (submetidas à transformação genética "spike-dip") com a germinação da progênie, no entanto, é possível que condições ambientais no cultivo das plantas-mãe tenham influenciado na germinação desses lotes de sementes.

Estudos com gramíneas subtropicais indicaram que, para espécies anuais (assim como é o caso de S. viridis) há uma dormência inata e uma alta demanda de luz para que haja não só a germinação como o sucesso no estabelecimento das plântulas (KHAN et al., 2017). Contudo, estudos com cevada correlacionam o efeito da luz na dormência e o tempo no qual as sementes foram coletadas: nas sementes recém coletadas a luz branca induz dormência, sendo o escuro indutor da germinação (GUBLER et al., 2008); já nas sementes de cevada que foram semeadas tempos após a sua coleta, a germinação não é afetada por condições de luminosidade (BARRERO et al., 2009). Esse mecanismo apesar de observado, ainda não é suficientemente descrito na literatura. Neste trabalho foram utilizadas sementes com no mínimo 6 meses após a sua coleta, então, era esperado que a quantidade de luz não fosse fator limitante na germinação e no desenvolvimento da plântula. Nesse contexto. 0 experimento de acompanhamento de germinação/comprimento de raiz também trouxe informações importantes, demonstrando que as condições iniciais de luz na germinação não representaram para a espécie Setaria viridis uma diferença significativa nas sementes não germinadas (Grupo G1).

O pré-tratamento das sementes com GA₃/KNO₃ utilizado neste trabalho visava sobrepor o mecanismo de dormência em *Setaria viridis*. No entanto, nas sementes oriundas do processo de transformação genética via "spike-dip" esse efeito positivo na germinação de sementes pré tratadas não foi observado. Em outro trabalho realizado com sementes de *S. viridis* selvagens notou-se que, apesar do uso de GA₃/KNO₃ aumentar a germinação, a idade das sementes era fator limitante. Sementes mais velhas tinham sua germinação diminuída independentemente do pré-tratamento (SEBASTIAN et al., 2014).

Apesar desse estudo prévio de Sebastian e colaboradores (2014) ter sido realizado com sementes selvagens não submetidas à transformação genética, essa informação é muito importante para este trabalho porque indica que a germinação das sementes submetidas ao procedimento de transformação "spike-dip" pode ter sido drasticamente diminuída devido ao tempo decorrido desde a coleta até a introdução em meio de cultura. Já que as sementes selvagens utilizadas como controle na germinação (em magentas) tinham idade semelhante àquelas oriundas da transformação, é provável que, baseado também em fatores hereditários já citados, o próprio processo de transformação via "spike-dip", nas condições utilizadas no presente trabalho, tenha alterado a capacidade de germinação das sementes, de algum modo. Tais maneiras poderiam ser representadas por uma aceleração no envelhecimento natural dos lotes de sementes obtidos após a modificações físicas ou químicas transformação genética; na progênie potencialmente transformada; ou mesmo um aumento na taxa de dormência que não pôde ser superada com o uso do pré tratamento com GA₃. Tal fato é suportado no presente trabalho pelas análises de raios-X de sementes escarificadas que não indicaram danos físicos nas sementes obtidas após a transformação genética que explicassem tamanha redução da germinação.

Considerando os resultados obtidos com as análises de raios X, tanto para as sementes não escarificadas, como principalmente para aquelas escarificadas que seriam efetivamente utilizadas nos experimentos *in vitro*, não foi possível concluir que os danos físicos eram os responsáveis pela baixa germinação e crescimento anormal vistos nos experimentos com magentas (Gráfico 18). Desse modo, fez-se necessária a avaliação de sementes por algum teste indicativo da viabilidade química das sementes e a existência de possível dormência não superada. Levando em consideração que o teste de tetrazólio já é empregado com sucesso para outras monocotiledôneas de interesse comercial como o milho (CHAMMA; NOVEMBRE, 2007) e a soja (FRANÇA NETO; KRZYZANOWSKI; DA COSTA, 1998), ele foi escolhido como um método confiável para indicar a viabilidade bioquímica das sementes de Setaria viridis, gerando dados complementares aos obtidos com as análises de raios-X. Os resultados do teste de tetrazólio, em sementes escarificadas não expostas ao meio de cultura, indicaram que os lotes provenientes da transformação genética "spike-dip" tinham sua viabilidade química extremamente reduzida quando comparados com o tratamento controle (sementes selvagens - WT). A realização do teste de tetrazólio em sementes resultantes da transformação já introduzidas em meio de cultura demonstrou que, aquelas que germinaram, mas não deram continuidade no desenvolvimento da plântula, por vezes exibiam algum sinal de viabilidade que era perdido ao longo do crescimento da plântula. Levando em consideração que estudos prévios indicam que a decisão sobre a dormência é estabelecida em estágios muito iniciais do contato da semente com o meio (NÉE; XIANG; SOPPE, 2017), é possível que a baixa germinação observada nos lotes provenientes da transformação seja explicada por dormência inata, mas também devido a condições ambientais que favoreceram a perda da viabilidade da plântula, е consequentemente a morte da mesma.

O aparente aumento da dormência inata nas sementes provenientes da transformação, quando comparado com sementes selvagens controle, pode ser explicado por alguma condição na qual as plantas-mãe foram submetidas. Tais condições podem ser tanto as condições de crescimento, como também as condições nas quais estiveram sujeitas durante o processo de transformação. Sobretudo, ainda não existem estudos que avaliem potenciais efeitos negativos deste procedimento em relação à germinação ou a viabilidade da progênie obtida após a transformação genética via "spike-dip". Desse modo, não é possível concluir que a drástica queda na germinação nesses lotes de sementes foi devido a algum componente utilizado nas reações de transformação genética.

Por fim, no presente trabalho não foi possível a obtenção de plantas de *Setaria viridis* transgênicas (DR5-RFP), inviabilizando a visualização dos picos de auxina ao longo do desenvolvimento da raiz.

7 CONCLUSÕES

O estudo do desenvolvimento floral de Setaria viridis indicou que o desenvolvimento de estruturas reprodutivas masculinas acontece de modo mais acelerado do que aquele observado em estruturas florais femininas. Além disso, com essas análises foi possível sugerir uma possível existência de estratégias reprodutivas como autogamia ou apomixia para a espécie. Assim, o estudo do desenvolvimento floral de Setaria viridis foi conclusivo para se estabelecer fases mais adequadas para o método de transformação genética "spike-dip".

Assim como acontece com outras espécies pertencentes à família Poaceae, em *S. viridis* há a presença da estrutura da coleorriza. Porém, nessa espécie a mesma apresenta tricomas muito semelhantes aos pelos observados na raiz embrionária, indicando um possível mecanismo adaptativo para obtenção de melhor sucesso em estágios iniciais da germinação.

A hipótese inicial que previa a degeneração da raiz primária após o surgimento das raízes adventícias foi refutada. No entanto, os experimentos comparando os dois tipos de raízes foram importantes para demonstrar as diferentes possibilidades quanto à arquitetura das raízes de *Setaria viridis*. As diferentes condições de luminosidade no início da germinação não alteraram a distribuição da arquitetura radicular. Mas, ainda há a necessidade de mais estudos correlacionando outras condições ambientais/hormonais tanto na progênie avaliada como nas plantas cujas quais elas se originam.

A transformação genética via "spike-dip" com um promotor sintético responsivo à auxina (DR5-RFP) não teve êxito no presente trabalho, muito provavelmente devido à baixa taxa de eficiência do procedimento e à existência de dormência das sementes. Quanto à transformação genética via "spike-dip", os dados obtidos no presente trabalho acerca da biologia do desenvolvimento da inflorescência de *Setaria viridis* podem contribuir para uma otimização desse processo. Ainda existem lacunas a respeito da dormência e a escolha da idade das sementes adequada para cada procedimento podem ser úteis para experimentos futuros.
REFERÊNCIAS

AIDOO, M. K. et al. Tolerance to high soil temperature in foxtail millet (*Setaria italica* L.) is related to shoot and root growth and metabolism. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 106, p. 73–81, 2016.

ATKINSON, J. A. et al. Branching Out in Roots: Uncovering Form, Function, and Regulation. **Plant Physiology**, Rockville, v. 166, n. 2, p. 538–550, 2014.

BARBERO, A. P. P. et al. Influência do déficit hídrico na germinação de sementes e no desenvolvimento inicial de três espécies de Pleurothallidinae (Orchidaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 34, n. 4, p. 593–601, 2011.

BARRERO, J. M. et al. Anatomical and Transcriptomic Studies of the Coleorhiza Reveal the Importance of This Tissue in Regulating Dormancy in Barley. **Plant Physiology**, Rockville, v. 150, n. 2, p. 1006–1021, 2009.

BARTHOLMES, C.; NUTT, P.; THEISSEN, G. Germline transformation of Shepherd's purse (Capsella bursa-pastoris) by the "floral dip" method as a tool for evolutionary and developmental biology. **Gene**, Amsterdam, v. 409, n. 1–2, p. 11–19, 2008.

BASTIANI, M. O. et al. Germinação de sementes de capim-arroz submetidas a condições de luz e temperatura. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 33, n. 3, p. 395–404, 2015.

BECHTOLD, N., ELLIS, J., PELLETIER, G. In planta Agrobacterium mediated gene transfer by infiltration of adult Arabidopsis thaliana plants. **Comptes Rendus de la Academie de Science**, Paris, v. 316, p. 1194–1199, 1993.

BENKOVÁ, E. et al. A morphogenetic trigger: is there an emerging concept in plant developmental biology? **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 14, n. 4, p. 189–193, 2009.

BIRNBAUM, K. D. How many ways are there to make a root? **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 34, p. 61–67, 2016.

BOMMERT, P.; WHIPPLE, C. Grass inflorescence architecture and meristem determinacy. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, Amsterdam, 2017. https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.10.004.

BRUTNELL, T. P. et al. Setaria viridis: A Model for C4 Photosynthesis. **The Plant Cell**, Rockville, v. 22, n. 8, p. 2537–2544, 2010.

BRUTNELL, T. P.; BENNETZEN, J. L.; VOGEL, J. P. *Brachypodium distachyon* and *Setaria viridis*: Model Genetic Systems for the Grasses. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 66, n. 1, p. 465–485, 2015.

CARVALHO, A. C. P. P. et al. Glossário de cultura de tecidos de plantas. **Plant Cell Culture and Micropropagation**, Lavras, v. 7, p. 30–60, 2011.

108

CELIS-ARÁMBURO, T. DE J. et al. Exogenous nitrate induces root branching and inhibits primary root growth in Capsicum chinense Jacq. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 49, n. 12, p. 1456–1464, 2011.

CHAMMA, H. M. C. P.; NOVEMBRE, A. D. D. L. C. Teste de tetrazólio para as sementes de milho : períodos de hidratação e de coloração das sementes. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 29, n. 2, p. 125–129, 2007.

CHANG, F. et al. Molecular control of microsporogenesis in Arabidopsis. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 14, n. 1, p. 66–73, 2011.

CHO, M. J. et al. Agrobacterium-mediated high-frequency transformation of an elite commercial maize (*Zea mays* L.) inbred line. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 33, n. 10, p. 1767–1777, 2014.

CLOUGH, S. J.; BENT, A. F. Floral dip: A simplified method for Agrobacteriummediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. **Plant Journal**, Oxford, v. 16, n. 6, p. 735–743, 1998.

CUI, H. et al. SCARECROW, SCR-LIKE 23 and SHORT-ROOT control bundle sheath cell fate and function in Arabidopsis thaliana. **Plant Journal**, Oxford, v. 78, n. 2, p. 319–327, 2014.

D'HALLUIN, K. et al. The BAR gene as a selectalde marker in plant engineeering. **Methods in Enzymology**, New York, v. 216, p. 414–441, 1992.

DE OLIVEIRA, R. R. et al. Flower development in *Coffea arabica* L.: New insights into MADS-box genes. **Plant Reproduction**, Berlin, v. 27, n. 2, p. 79–94, 2014.

DE SMET, I. et al. Bimodular auxin response controls organogenesis in Arabidopsis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 107, n. 6, p. 2705–2710, 2010.

DESFEUX, C.; CLOUGH, S. J.; BENT, A. F. Female reproductive tissues are the primary target of Agrobacterium-mediated transformation by the Arabidopsis floraldip method. **Plant Physiology**, Rockville, v. 123, n. 3, p. 895–904, 2000.

DIAO, X. et al. Initiation of Setaria as a model plant. **Frontiers in Agricultural Science and Engineering**, Beijing, v. 1, n. 1, p. 16–20, 2014.

DIBAX, R. et al. Organogenesis and Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of Eucalyptus saligna with P5CS gene. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 54, n. 1, p. 6–12, 2010.

DOUST, A. N. et al. Foxtail Millet: A Sequence-Driven Grass Model System. **Plant Physiology**, Rockville, v. 149, n. 1, p. 137–141, 2009.

DOUST, A. N.; KELLOGG, E. A. Inflorescence diversification in the panicoid "bristle grass" clade (Paniceae, Poaceae): Evidence from molecular phylogenies and developmental morphology. **American Journal of Botany**, Baltimore, v. 89, n. 8, p. 1203–1222, 2002.

EMERY, W. H. P. A study of reproduction in Setaria macrostachya and its relatives in the Southwestern United States and Northern Mexico. **Bulletin Torrey Botanical Club**, Lawrence, v. 84, p. 106–121, 1957.

ERMAWAR, R. A. et al. Genetics and physiology of cell wall polysaccharides in the model C4 grass, Setaria viridis spp. **BMC Plant Biology**, London, v. 15, n. 1, p. 236, 2015.

ESAU, K. Plant anatomy. 2. ed. New York: John Wiley & Sons, 1962.

ESAU, K. Anatomia de plantas com sementes. São Paulo: Edgard Blücher, 1974.

FEDER, N.; OBRIEN, T. P. Plant microtechnique: some principles and new methods. **American Journal of Botany**, Baltimore, v. 55, n. 42, p. 123–129, 1968.

FERREIRA, A.G.; BORGHETTI, F. **Germinação**: do básico ao aplicado. Porto Alegre: Artmed, 2004.

FRANÇA NETO, J.; KRZYZANOWSKI, F.; DA COSTA, N. **O teste de tetrazólio em sementes de soja**. Londrina: Embrapa Soja, 1998. 72 p. (Documentos, 116).

FURNESS, C. Microsporogenesis in Monocotyledons. **Annals of Botany**, Oxford, v. 84, n. 4, p. 475–499, 1999.

GALINHA, C. et al. PLETHORA proteins as dose-dependent master regulators of Arabidopsis root development. **Nature**, London, v. 449, n. 7165, p. 1053–1057, 2007.

GALLAVOTTI, A. et al. The Relationship between Auxin Transport and Maize Branching. **Plant Physiology**, Rockville, v. 147, n. 4, p. 1913–1923, 2008.

GUBLER, F. et al. Regulation of Dormancy in Barley by Blue Light and After-Ripening: Effects on Abscisic Acid and Gibberellin Metabolism. **Plant Physiology**, Rockville, v. 147, n. 2, p. 886–896, 2008.

HANSEN, G.; WRIGHT, M. S. Recent advances in the transformation of plants. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 4, n. 6, p. 226–231, 1999.

HEISE, A. C. Germination of green foxtail seeds. **Proceedings of the Association** of Official Seed Analysts, Moline, v. 33, p. 43–44, 1941.

HOCHHOLDINGER, F. et al. Genetic dissection of root formation in maize (Zea mays) reveals root-type specific developmental programmes. **Annals of Botany**, Oxford, v. 93, n. 4, p. 359–368, 2004a.

HOCHHOLDINGER, F. et al. From weeds to crops: Genetic analysis of root development in cereals. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 9, n. 1, p. 42–48, 2004b.

HOCHHOLDINGER, F.; YU, P.; MARCON, C. Genetic control of root system development in maize. **Trends in Plant Science**, Oxford, 2017. doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2017.10.004.

HOCHHOLDINGER, F.; ZIMMERMANN, R. Conserved and diverse mechanisms in root development. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 11, n. 1, p. 70–74, 2008.

HU, T. et al. Agrobacterium-mediated large-scale transformation of wheat (*Triticum aestivum* L.) using glyphosate selection. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 21, n. 10, p. 1010–1019, 2003.

HUANG, P. et al. Population genetics of Setaria viridis, a new model system. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 23, n. 20, p. 4912–4925, 2014.

JOSHI, M. et al. Potato root system development and factors that determine its architecture. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 205, p. 113–123, 2016.

JOVAAG, K.; DEKKER, J.; ATCHISON, B. Setaria faberi Seed Heteroblasty Blueprints Seedling Recruitment: III. Seedling Recruitment Behavior. **International Journal of Plant Research**, Rosemead, CA, v. 2, n. 6, p. 165–180, 2012.

KARNOVSKY, M. J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of righ osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 27, n. 15, p. 137, 1965.

KEIFFER, M.; NEVE, J.; KEPINSKI, S. Defining auxin response contexts in plant development. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 13, p. 12–20, 2010.

KHAN, M. A. et al. Role of chemicals in alleviating salinity and light related seed dormancy in sub-tropical grasses. **Flora: Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants**, Jena, v. 233, p. 150–155, 2017.

KITOMI, Y. et al. OsIAA13-mediated auxin signaling is involved in lateral root initiation in rice. **Plant Science**, Shannon, v. 190, p. 116–122, 2012.

LACORTE, C.; ROMANO, E. Manual de transformação genética de plantas. In: BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. C. (Ed.). **Manual de transformação genética de plantas**. 2. ed. Brasília, DF: Embrapa, 2015. p. 62–66.

LAVENUS, J. et al. Lateral root development in Arabidopsis: Fifty shades of auxin. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 18, n. 8, p. 1360–1385, 2013.

LI, L. et al. Arabidopsis PLC2 is involved in auxin-modulated reproductive development. **Plant Journal**, Oxford, v. 84, n. 3, p. 504–515, 2015.

LI, P.; BRUTNELL, T. P. Setaria viridis and Setaria italica, model genetic systems for the Panicoid grasses. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 62, n. 9, p. 3031–3037, 2011.

LYNCH, J. P.; WOJCIECHOWSKI, T. Opportunities and challenges in the subsoil: Pathways to deeper rooted crops. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 66, n. 8, p. 2199–2210, 2015.

MA, Z.; BYKOVA, N. V; IGAMBERDIEV, A. U. Cell signaling mechanisms and metabolic regulation of germination and dormancy in barley seeds. **The Crop Journal**, Amsterdam, v. 5, n. 6, p. 459–477, 2017.

MARTINS, P. K. et al. A simple and highly efficient Agrobacterium-mediated transformation protocol for Setaria viridis. **Biotechnology Reports**, Amsterdam, v. 6, p. 41–44, 2015a.

MARTINS, P. K. et al. Setaria viridis floral-dip: A simple and rapid Agrobacteriummediated transformation method. **Biotechnology Reports**, Amsterdam, v. 6, p. 61– 63, 2015b.

MAYAVAN, S. et al. Agrobacterium-mediated in planta genetic transformation of sugarcane setts. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 34, n. 10, p. 1835–1848, 2015.

MCCORMICK, S.; MCCORMICK, S. Male Gametophyte Development. **The Plant Cell**, Rockville, v. 5, p. 1265–1275, 1993.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F.A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobaco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 473-497, 1962.

MUTHAMILARASAN, M. et al. Exploration of millet models for developing nutrient rich graminaceous crops. **Plant Science**, Shannon, v. 242, p. 89–97, 2015.

MUTHAMILARASAN, M.; PRASAD, M. Advances in Setaria genomics for genetic improvement of cereals and bioenergy grasses. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 128, n. 1, p. 1–14, 2015.

NAKAMURA, A. T.; SCATENA, V. L. Desenvolvimento pós-seminal de espécies de Poaceae (Poales). Acta Botanica Brasilica, Belo Horizonte, v. 23, n. 1, p. 212–222, 2009.

NÉE, G.; XIANG, Y.; SOPPE, W. J. The release of dormancy, a wake-up call for seeds to germinate. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 35, p. 8–14, 2017.

NONOGAKI, H.; BASSEL, G. W.; BEWLEY, J. D. Germination-still a mystery. **Plant Science**, Shannon, v. 179, n. 6, p. 574–581, 2010.

OVERVOORDE, P.; FUKAKI, H.; BEECKMAN, T. Auxin control of root development. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, Woodburry, v. 2, n. 6, p. 1–16, 2010.

PAULUZZI, G. et al. Surfing along the root ground tissue gene network. **Developmental Biology**, New York, v. 365, n. 1, p. 14–22, 2012.

PENFIELD, S. Seed dormancy and germination. **Current Biology**, London, v. 27, n. 17, p. R874–R878, 2017.

PERRETA, M. et al. Descriptive characters of growth form in Poaceae-An overview. **Flora: Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants**, Jena, v. 206, n. 4, p. 283–293, 2011.

PI, L. et al. Organizer-Derived WOX5 Signal Maintains Root Columella Stem Cells through Chromatin-Mediated Repression of CDF4 Expression. **Developmental Cell**, Cambridge, v. 33, n. 5, p. 576–588, 2015.

RAINERI, D.M.; BOTTINO, P.; GORDON, M.P.; NESTER, E. . Agrobacterium– Mediated Transformation of Rice (*Oryza sativa* L.). **Nature Biotechnology**, New York, v. 8, p. 33–38, 1990.

RATANASUT, K.; ROD-IN, W.; SUJIPULI, K. In planta Agrobacterium-Mediated transformation of rice. **Rice Science**, Hangzhou, China, v. 24, n. 3, p. 181–186, 2017.

REYES-OLALDE, J. I.; MARSCH-MARTÍNEZ, N.; DE FOLTER, S. Imaging early stages of the female reproductive structure of arabidopsis by confocal laser scanning microscopy. **Developmental Dynamics**, New York, v. 244, n. 10, p. 1286–1290, 2015.

ROMINGER, J. M. **Taxonomy of Setaria (Gramineae) in North America**. Urbana: University of Illinois Press, 1962. p. 1–132. (Illinois Biological Monographs, 29).

SAHA, P.; BLUMWALD, E. Spike-dip transformation of Setaria viridis. **Plant Journal**, Oxford, v. 86, n. 1, p. 89–101, 2016.

SARKAR, A. K. et al. Conserved factors regulate signalling in Arabidopsis thaliana shoot and root stem cell organizers. **Nature**, London, v. 446, n. 7137, p. 811–814, 2007.

SCHERES, B. et al. Embryonic origin of the Arabidopsis primary root and root meristem initials. **Development**, Cambridge, v. 2487, p. 2475–2487, 1994.

SEBASTIAN, J. et al. Methods to promote germination of dormant Setaria viridis seeds. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 9, n. 4, p. 1–7, 2014.

SEGATTO, A. L. A. et al. MAEWEST expression in flower development of two Petunia species. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 14, n. 7, p. 13796–13807, 2013.

SENA, G. et al. Organ regeneration does not require a functional stem cell niche in plants. **Nature**, London, v. 457, n. 7233, p. 1150–1153, 2009.

SINGH, V. et al. Morphological and architectural development of root systems in sorghum and maize. **Plant and Soil**, The Hague, v. 333, n. 1, p. 287–299, 2010.

SMIT, M. E.; WEIJERS, D. The role of auxin signaling in early embryo pattern formation. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 28, p. 99–105, 2015.

SOUZA, V.C.; FLORES, T.B.; LORENZI, H. **Introdução à botânica**: morfologia. Nova Odessa: Instituto de Zootecnia, 2013.

TIAN, H.; DE SMET, I.; DING, Z. Shaping a root system: Regulating lateral versus primary root growth. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 19, n. 7, p. 426–431, 2014.

TORRES, A. C.; DUSI, A. N.; SANTOS, M. D. M. **Transformação genética de plantas via Agrobacterium – Teoria e prática**. 1. ed. Brasília, DF: Embrapa Hortaliças, 2007.

VALVEKENS, D.; MONTAGU, M.; LIJSEBETTENS, M. Agrobacterium tumefaciensmediated transformation of Arabidopsis thaliana root explants by using kanamycin selection. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 85, n. 15, p. 5536–40, 1988.

WANDERLEY, M. G. L.; SHEPPERD, G. J.; GIULIETTI, A. M. (Coord.) Flora fanerogâmica do Estado de São Paulo. São Paulo: FAPESP, 2002.

WANG, M.; PAN, Y.; LI, C.; LIU, C.; ZHAO, Q.; AO, G.; YU, J. Culturing of immature inflorescences and Agrobacterium-mediated transformation of foxtail millet (Setaria italica). **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 10, n. 73, p. 16466–16479, 2011.

WANG, K. Agrobacterium protocols. New York: Springer, 2015.

WANG, L. et al. Origin and development of the root cap in rice. **Plant Physiology**, Rockville, v. 166, n. 2, p. 603–613, 2014.

WASSON, A. P. et al. Traits and selection strategies to improve root systems and water uptake in water-limited wheat crops. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 63, n. 9, p. 3485–3498, 2012.

WEIGEL, D.; GLAZEBROOK, J. Glufosinate ammonium selection of transformed Arabidopsis. **Cold Spring Harbor Protocols**, Cold Spring Harbor, v. 2006, n. 7, pii: pdb.prot4670, 2006. doi: 10.1101/pdb.prot4670.

XU, J. et al. Superoxide-responsive gene expression in Arabidopsis thaliana and Zea mays. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 117, p. 51–60, 2017.

XUE, T. et al. Primary root growth in Arabidopsis thaliana is inhibited by the miR159 mediated repression of MYB33, MYB65 and MYB101. **Plant Science**, Shannon, v. 262, p. 182–189, 2017.

YANG, S. et al. The Arabidopsis SWI2/SNF2 Chromatin Remodeling ATPase BRAHMA Targets Directly to *PINs* and Is Required for Root Stem Cell Niche Maintenance. **The Plant Cell**, Rockville, v. 27, n. 6, p. 1670–1680, 2015.

ZHANG, D.; LUO, X.; ZHU, L. Cytological analysis and genetic control of rice anther development. **Journal of Genetics and Genomics**, Beijing, v. 38, n. 9, p. 379–390, 2011.

ZHANG, P. et al. cGMP is involved in Zn tolerance through the modulation of auxin redistribution in root tips. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v. 147, p. 22–30, 2018.

ZHANG, X. et al. Genome-wide analysis of WOX gene family in rice, sorghum, maize, arabidopsis and poplar. **Journal of Integrative Plant Biology**, Beijing, v. 52, n. 11, p. 1016–1026, 2010.

ZHAO, S. et al. Characterization and expression analysis of WOX5 genes from wheat and its relatives. **Gene**, Amsterdam, v. 537, n. 1, p. 63–69, 2014.

ZHAO, X. et al. Response of root morphology, physiology and endogenous hormones in maize (Zea mays L.) to potassium deficiency. **Journal of Integrative Agriculture**, Beijing, v. 15, n. 4, p. 785–794, 2016.

ZHOU, L. Z.; JURANIĆ, M.; DRESSELHAUS, T. Germline development and fertilization mechanisms in maize. **Molecular Plant**, Oxford, v. 10, n. 3, p. 389–401, 2017.