

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA**

ALINE PEDROSO

**Análise dos fluxos auxínicos que levam à senescência da raiz
embrionária e a formação das raízes da coroa na espécie modelo
*Setaria viridis***

Piracicaba

2018

ALINE PEDROSO

**Análise dos fluxos auxínicos que levam à senescência da raiz
embrionária e a formação das raízes da coroa na espécie modelo
*Setaria viridis***

Versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011

**Dissertação apresentada ao Centro e
Energia Nuclear na Agricultura da
Universidade de São Paulo para a obtenção
do Título de Mestre em Ciências**

**Área de Concentração: Biologia na
Agricultura e no Ambiente**

**Orientador: Prof. Dr. Francisco Scaglia
Linhares**

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)

Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Pedroso, Aline

Análise dos fluxos auxínicos que levam à senescência da raiz embrionária e a formação das raízes da coroa na espécie modelo *Setaria viridis* / Aline Pedroso; orientador Francisco Scaglia Linhares. - - versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2018.

106 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 da Universidade de São Paulo.

1. Biotecnologia de plantas 2. Desenvolvimento vegetal 3. Dormência em plantas 4. Hormônios vegetais 5. Melhoramento genético vegetal 6. Monocotiledôneas 7. Proteínas de plantas I. Título

CDU 581.144 : 582.542.11

Elaborada por:

Marília Ribeiro Garcia Henyei
CRB-8/3631

Resolução CFB Nº 184 de 29 de setembro de 2017

Aos meus pais Ana Maria e Marco Antonio, meu irmão Murilo pelo amor e apoio incondicional na realização dos meus sonhos. Sem vocês minhas conquistas não seriam possíveis.

Agradeço

Aos meus familiares, amigos e incentivadores, já que tem um pedacinho de cada um de vocês nessas linhas.

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Deus pela saúde e força e nunca me deixar desanimar durante a toda minha vida;

Ao Prof. Francisco pela orientação, pelos ensinamentos, apoio e confiança dedicada a mim;

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura CENA/USP pelas oportunidades cedidas;

Aos meus pais Ana Maria e Marco Antonio, e meu irmão Murilo que tornaram meu sonho possível;

Ao Centro de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica Aplicada a Agricultura (NAP/MEPA – ESALQ) sob coordenação do Prof. Dr. Elliot Watanabe Kitajima que disponibilizou o microscópio estereoscópico de alta resolução;

À técnica Mônica Lanzoni Rossi pela ajuda irrestrita durante a realização das análises de microscopia, pelo apoio incondicional, pelas risadas e momentos de descontração;

Ao técnico Marcelo Favareto Correa pela ajuda irrestrita durante as análises moleculares, nos trabalhos de cultura *in vitro* e pelos conselhos;

À MSc Mayra Camargo Andrade Costa pela amizade, pelos ensinamentos, pela parceria e convivência;

Aos estagiários Mônica Laís Lanzoni Rossi, Kalvin Leonardo de Almeida e Matheus Zampieri pela ajuda ampla e irrestrita na realização dos experimentos e análises;

À bibliotecária Marília pela atenção dedicada e revisão textual;

Aos integrantes e ex-integrantes do Laboratório de Desenvolvimento e Estrutura Vegetal e do Laboratório de Biotecnologia Vegetal Tati, Andrea, Murilo, Igor, Sylvia, Mateus, Brayan, Carol e Sandra pela amizade e convívio;

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

PEDROSO, A. **Análise dos fluxos auxínicos que levam à senescência da raiz embrionária e a formação das raízes da coroa na espécie modelo *Setaria viridis***. 2018. 106 p. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2018.

Setaria viridis tem sido utilizada como organismo modelo para gramíneas com metabolismo C4, buscando elucidar processos biológicos de plantas. A importância das monocotiledôneas com o metabolismo de C4 deve-se ao melhor balanço fotossintético quando comparado às plantas com metabolismo C3 em condições climáticas com altas temperaturas, como as que prevalecem no Brasil. *Setaria viridis* representa um sistema modelo de grande importância para a agricultura brasileira, uma vez que tanto a produção brasileira de biocombustíveis como de alimentos está fortemente relacionada aos organismos C4. Os hormônios vegetais são cruciais no estabelecimento de órgãos complexos desde o zigoto até o desenvolvimento da planta adulta. A auxina em particular, desempenha um papel fundamental na formação de um complexo sistema radicular nas plantas. Sabe-se que o transporte polar desse hormônio concentra a auxina em determinados tecidos, desempenhando um papel essencial na expressão diferencial de genes que modulam o desenvolvimento dos vários órgãos da planta. Monocotiledôneas e em particular Poaceae exibem um complexo sistema radicular que parece ser chave para o seu vasto potencial adaptativo, mas pouco se sabe sobre os fatores que envolvem as respostas sensoriais e de desenvolvimento que guiam a escolha de quais tipos de raiz as plantas elegem. O objetivo deste estudo foi explorar as vias hormonais e abióticas que influenciam a arquitetura das raízes.

Palavras-chave: *Setaria viridis*. Desenvolvimento radicular. Proteínas PIN's. Auxina. Transformação genética.

ABSTRACT

PEDROSO, A. **Analysis of auxin fluxes carrying to senescence of the embryonic root and the formation of crown roots in the species *Setaria viridis***. 2018. 106 p. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2018.

Setaria viridis has been used as a model organism for grasses with C4 metabolism, seeking to elucidate plant biological processes. The importance of monocotyledons with C4 metabolism is due to better photosynthetic balance when compared to plants with C3 metabolism in climatic conditions with high temperatures, such as those that prevail in Brazil. *Setaria viridis* represents a model system of great importance for Brazilian agriculture since both the Brazilian production of biofuels and food is strongly related to C4 organisms. Plant hormones are crucial in the establishment of complex organs from zygote to the adult plant development. Auxin in particular, plays a key role in the formation of a complex radicular system in plants. The polar transport of this hormone is known to concentrate auxin in particular tissues, playing an essential role in the differential expression of genes that will modulate the development of the various plant organs. Monocots and in particular Poaceae display a complex radicular system that seems to be key for its vast adaptive potential, but little is known about the factors involving the sensing and developmental responses that guide the choice of which root types to elect. The aim of this study was to explore the hormonal and abiotic cues that influence the root architecture.

Keywords: *Setaria viridis*. Root development. PIN's protein. Auxin. Genetic transformation.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	17
2.1 <i>Setaria viridis</i>	17
2.2 Importância dos membros da Família Poaceae de metabolismo C4.....	18
2.3 Importância e desenvolvimento radicular na Família Poaceae.....	19
2.4 Auxina no desenvolvimento vegetal	20
2.5 Alteração no padrão espacial das proteínas SvPIN's	21
2.6 Transformação genética de plantas mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	22
3. OBJETIVO GERAL	25
3.1 Objetivos específicos	25
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	26
4.1 Material vegetal	26
4.2 Extração de RNA utilizando o kit Pure Link®	26
4.3 Síntese de cDNA	28
4.4 Extração de DNA (Doyle & Doyle, 1987).....	28
4.5 Relação filogenética das proteínas PIN's	29
4.6 Análise dos PIN's mais expressos nos estágios iniciais do desenvolvimento radicular	29
4.7 Clonagem das proteínas SvPIN's mais expressas nos estágios iniciais do desenvolvimento radicular	30
4.8 Transformação genética de <i>S. viridis</i> via "spike - dip"	31
4.9 Seleção dos transformantes com higromicina e glufosinato de amônio.....	34
4.10 Teste de germinação	35
4.11 Acompanhamento do desenvolvimento das raízes	35
4.12 Acompanhamento do desenvolvimento das raízes separando a inflorescência em diferentes setores	35
4.13 Acompanhamento do desenvolvimento das raízes utilizando hormônios vegetais	36
5. RESULTADOS	37
5.1 Relação filogenética das proteínas PIN's	37
5.1.1 Análise dos SvPIN's mais expressas nos estágios iniciais do desenvolvimento radicular	39
5.1.2 Clonagem das proteínas SvPIN's mais expressas nos estágios iniciais do desenvolvimento radicular	41
5.1.2.1 Fragmento PIN 1B (F) X CLA I PIN 1B (R).....	42

5.1.2.2 Fragmento CLA I PIN 1B (F) X PIN 1B (R)	43
5.1.2.3 Fragmento PIN 347 1 (F) X CLA I PIN 3471 (R)	43
5.1.2.4 Fragmento CLA I PIN 347 1 (F) X PIN 347 1 (R)	44
5.1.2.5 Fragmento PIN 347 2 (F) X CLA I PIN 347 2	44
5.1.2.6 Fragmento CLA I PIN 347 1 (F) X PIN 347 2 (R)	45
5.2 Transformação e seleção dos possíveis transformantes de <i>S. viridis</i> via “spike - dip”	45
5.2.1 DR5 :: RFP	46
5.2.2 pSvPIN1B :: YFP	48
5.2.3 Teste de germinação	51
5.2.3.1 20°C	51
5.2.3.2 27°C	52
5.3 Modificação de enfoque sobre a questão principal.....	52
5.4 Análise da arquitetura radicular em função de fatores abióticos.....	52
5.4.1 Análise da arquitetura radicular em função de diferentes condições de luminosidade	53
5.4.1.1 Primeiro experimento - Escuro completo.....	54
5.4.1.2 Primeiro experimento - Escuro parcial.....	56
5.4.1.3 Primeiro experimento – Claro	57
5.4.1.4 Segundo experimento – Escuro.....	59
5.4.1.5 Segundo experimento – Claro	60
5.4.2 Experimento de divisão da espiguiha em setores com diferentes estágios de maturação.....	62
5.4.2.1 Porção apical – Claro	62
5.4.2.2 Porção medial – Claro.....	63
5.4.2.3 Porção basal – Claro	64
5.4.2.4 Porção apical – Escuro.....	65
5.4.2.5 Porção medial – Escuro.....	65
5.4.2.6 Porção basal – Escuro.....	66
5.4.3 Acompanhamento do desenvolvimento das raízes em condição de carência nutricional para nitrato e fosfato	67
5.4.3.1 Meio Johnson completo	68
5.4.3.2 Meio Johnson menos N.....	68
5.4.3.3 Meio Johnson menos P	69
5.4.3.4 Água, phytigel e cloreto de cálcio	70
5.4.4 Acompanhamento do desenvolvimento da arquitetura radicular utilizando alguns hormônios vegetais	72

5.4.4.1 Controle	73
5.4.4.2 2,4 – D.....	74
5.4.4.3 Zeatina	74
5.4.4.4 GA ₃	75
5.4.4.5 NPA	76
6. DISCUSSÃO	78
6.1 Análise dos SvPIN´s mais expressas nos estágios iniciais do desenvolvimento radicular	79
6.2 Transformação e seleção dos possíveis transformantes de <i>S. viridis</i> via “spike - dip”.....	80
6.3 Teste de germinação	82
6.4 Modificação de enfoque sobre a questão principal	83
6.5 Análise da arquitetura radicular em função de fatores abióticos.....	84
6.6 Acompanhamento do desenvolvimento das raízes utilizando meio Johnson ⁹⁰	
6.7 Acompanhamento do desenvolvimento da arquitetura radicular utilizando alguns hormônios vegetais	92
7. CONCLUSÕES	97
REFERÊNCIAS	99

1. INTRODUÇÃO

As mudanças climáticas que atingem o mundo evidenciaram a necessidade de aumentar a produção de recursos sustentáveis, principalmente os alimentares e energéticos. Nesse contexto, as gramíneas exercem um papel fundamental no cenário agrícola, especialmente em cenários como o brasileiro, já que as espécies desse grupo são os principais vegetais destinados à produção de biocombustíveis. As plantas que apresentam metabolismo fotossintético C4 possuem uma vantagem seletiva na produção de biomassa, em condições climáticas que apresentam clima tropical, posto que as trocas gasosas estão espacialmente desacopladas da incorporação do CO₂ no ciclo fotossintético. Desta forma não existe competição da molécula de O₂ pelo sítio de união ao CO₂ na RuBisCo, portanto em temperaturas acima dos 30°C, não há perda energética devido a fotorrespiração. Esta característica favoreceu a disseminação de plantas com metabolismo fotossintético C4 em climas tropicais, se comparadas com plantas de metabolismo fotossintético C3.

A utilização e o estudo de sistemas modelos tais como *Arabidopsis thaliana* proporcionou uma aceleração significativa de descobertas científicas e permitiu o desvendamento de muitos processos do desenvolvimento vegetal. Em estudos envolvendo a família Poaceae inicialmente o modelo cogitado para estudos genômicos foi o *Brachypodium distachyon*, que possui metabolismo fotossintético C3. Neste contexto a espécie *Setaria viridis* foi proposta recentemente como sistema modelo para tais plantas, posto que possui genoma relativamente pequeno, porte pequeno da planta adulta, ciclo de reprodução rápido e genoma diplóide, apresentando assim características desejáveis para a constituição do organismo como espécie modelo. Deste modo a espécie vem ganhando espaço no contexto de estudos que visam elucidar o desenvolvimento vegetal e os mecanismos moleculares que modulam a formação das Poaceae.

O sistema radicular das Poaceae possui algumas particularidades que o diferenciam das dicotiledôneas. O sistema radicular das monocotiledôneas é composto por três diferentes tipos radiculares, nem sempre presentes em todos os membros da família. Os tipos radiculares são: 1) raiz primária, de origem embrionária, que deriva da radícula. 2) raízes seminais, que se originam em algumas espécies poucos dias depois da germinação a partir de porções embrionárias da

semente. 3) raízes adventícias, que se originam a partir de regiões basais dos tecidos apicais. Os três tipos de raízes são, portanto, formados a partir de três tipos de células, que possuem identidade distinta. Observações realizadas a partir de um pequeno número de plantas de *S. viridis*, preparadas para estudos anatômicos, evidenciaram uma degeneração da raiz embrionária alguns dias após sua formação, e que este mecanismo poderia ocorrer conjuntamente com o desenvolvimento das raízes da coroa. Este processo é coordenado e modulado na maioria das espécies estudadas até hoje através de remanejamento do fluxo polar de auxina. Desta forma, este estudo busca desvendar os mecanismos que levam à senescência da raiz embrionária e o estabelecimento das raízes da coroa na espécie *Setaria viridis* e que postulamos possam estar relacionados aos mecanismos evolutivos ligados ao remanejamento de auxina.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 *Setaria viridis*

O gênero *Setaria*, pertence à família Poaceae (Subfamília Panicoideae), gênero que contém aproximadamente 125 espécies distribuídas ao longo do planeta em ambientes tropicais, subtropicais e zonas temperadas (DIAO et al., 2014, DOUST et al., 2009). Esse gênero apresenta representantes bem diversos, como espécies comuns em muitos ambientes naturais, além de apresentar também espécies invasoras de ambientes agrícolas. Dentre as espécies que compreende o gênero podemos destacar a *Setaria viridis* e sua forma domesticada (*S. itálica*), já que tais espécies apresentam características que as tornam excelentes modelos para estudos genômicos envolvendo plantas com metabolismo C4 (HUANG et al., 2014).

A família Poaceae também abrange membros de grande importância econômica como milho, sorgo, capins forrageiros e a cana-de-açúcar que são amplamente utilizadas tanto na alimentação quanto na produção de biocombustíveis (LI; BRUTNELL, 2011). No cenário agrícola atual há necessidade de se estabelecer organismos vegetais que sirvam de modelo para o entendimento de processos biológicos básicos das espécies vegetais (BRUTNELL et al., 2010).

Dentro desse contexto, a espécie *Setaria viridis* vem sendo considerada uma planta modelo para Poaceae. Algumas características como tamanho relativamente pequeno do genoma, pequeno porte da planta adulta, grande produção de sementes, ciclo de vida curto, condições de cultivo pouco exigentes, contribuíram para o estabelecimento da espécie como planta modelo (HUANG et al., 2014; MARTINS et al., 2015).

Entretanto algumas características de *S. viridis* diferem de outros organismos vegetais bem estabelecidos como organismos modelo, como *Arabidopsis thaliana*, além das espécies de Poaceae como *Brachypodium distachyon* e *Oryza sativa* (BRUTNELL et al., 2010; BENNETZEN; VOGEL, 2015). Dentre as diferenças podemos destacar que *S. viridis* possui metabolismo fotossintético C4, além de possuir genoma compacto e diplóide (ERMAWAR et al., 2015) enquanto que os organismos modelos propostos anteriormente para organismos de metabolismo fotossintético C4, tais como sorgo e outros capins forrageiros, foram considerados

inviáveis quando comparados a *S. viridis* devido principalmente ao fato de possuírem alta taxa de poliploidia, além da planta adulta ser de grande porte (DIAO et al., 2014).

2.2 Importância dos membros da Família Poaceae de metabolismo C4

A capacidade de produzir alimento e energia suficientes para manter a crescente população global é uma das atuais preocupações da agricultura. A utilização de biomassa vegetal para a alimentação e para a obtenção de energia através dos biocombustíveis traz desafios relacionados à capacidade de aumentar a produção de grãos, principalmente em um cenário de mudanças climáticas (BRUTNELL, 2010).

As plantas de metabolismo fotossintético C4, como milho, sorgo, cana-de-açúcar e capins forrageiros, representam uma grande parcela da produção agrícola brasileira já que tais organismos se adaptam melhor em climas tropicais e subtropicais. Em um contexto de mudança climática e de aumento da temperatura global, as plantas com metabolismo fotossintético C3 podem ser desvantajosas, pois apesar do aumento de CO₂ pode ser até benéfico para o crescimento da planta, porém a eficiência fotossintética é diminuída pela fotorrespiração. O fenômeno de fotorrespiração ocorre devido a competição entre O₂ e CO₂ para a ocupação do sítio ativo da RuBisCO (ribulose -1,5-bifosfato carboxilase oxigenase). A fotorrespiração está, portanto, ligada ao aumento de temperatura, pois ao aumentar a temperatura se favorece mais a união do O₂ à RuBisCO, forçando a planta a gastar energia através da fotorrespiração para liberar novamente RuBisCO para a entrada de novos átomos de carbono na fotossíntese. As plantas que apresentam morfologia e metabolismo fotossintético C4 apresentam particularidades anatômicas e metabólicas, que minimizam o fenômeno da fotorrespiração em temperaturas elevadas, conferindo-lhes vantagens adaptativas a climas tropicais e subtropicais. Estas vantagens se devem ao fato das trocas gasosas estarem fisicamente desacopladas da incorporação de CO₂. De fato, as trocas gasosas ocorrem no mesófilo, mas a fixação da CO₂ na RuBisCO ocorre nas células da bainha foliar. A compartimentalização ocorre devido à presença de uma camada de suberina na região apoplástica das células da bainha foliar, impedindo a difusão de CO₂ para fora deste tipo de células, que possuem a RuBisCO. Os átomos de carbono são

providos às células da bainha foliar através da conversão da CO₂ a moléculas de quatro átomos de carbono tais como malato, fumarato e oxalacetato, através de uma enzima presente no mesófilo chamada PEPcarboxilase. Os compostos C₄ são transportados ativamente via simplasto às células da bainha foliar resultando em um microclima rico em CO₂ e privado de O₂, que favorece a fotossíntese mesmo em altas temperaturas. Tal característica confere maior vantagem evolutiva das plantas C₄ quando comparadas as plantas C₃ em climas tropicais, explicando assim o destaque das plantas C₄ na agricultura brasileira (Zhu et al., 2008).

2.3 Importância e desenvolvimento radicular na Família Poaceae

Nas plantas terrestres o sistema radicular tem como uma das principais funções a fixação do vegetal ao substrato, além da absorção de água e de minerais necessários para o desenvolvimento da planta (LAVENUS et al., 2013). O desenvolvimento do eixo hipocótilo-radícula irá originar a raiz primária ou embrionária, já durante a embriogênese. O desenvolvimento da raiz primária posteriormente dará origem também as raízes laterais de origem secundária. Além deste sistema radicular de origem embrionária, algumas Poaceae apresentam também raízes seminais, que se originam a partir de tecido embrionário seminal, e adventícias. Porém as raízes adventícias não se formam a partir de tecido embrionário, mas sim a partir de tecido com identidade de caule. É sabido também que em algumas Poaceae a raiz primária atrofia poucos dias após o início do seu desenvolvimento (ESAU, 1974), e que, portanto, as raízes presentes em monocotiledôneas adultas podem ser de diferentes tipos e origens (SOUZA; FLORES; LORENZI, 2013; ESAU, 1962). Os diferentes tipos de raízes têm sido alvo recorrente de estudos biotecnológicos (ATKINSON et al., 2014), pois esta diversidade de tipos radiculares parece estar ligada a uma maior eficiência na absorção de água e nutrientes presentes em camadas mais profundas do solo, gerando conseqüentemente maior resistência em condições de estresse hídrico e nutricional.

Nas últimas décadas, trabalhos com *A. thaliana* têm demonstrado que poucos sinais hormonais desencadeiam a formação de padrões organizados durante o desenvolvimento vegetal, principalmente àqueles requeridos no decorrer da formação do sistema radicular (SENA et al., 2009). Entretanto, os mecanismos pelos

quais algumas monocotiledôneas possuem estruturas radiculares diversificadas, conferindo assim, melhor adaptabilidade em climas tropicais ainda são pouco conhecidos. Alguns estudos envolvendo modelagens matemáticas (LYNCH; WOJCIECHOWSKI, 2015) evidenciam uma relação direta entre a arquitetura radicular e a capacidade de uma planta de crescer em condições nutricionais limitantes, definindo assim o conceito de ideótipo radicular como a específica arquitetura radicular que confere melhor adaptação a um tipo de condição ambiental do solo. De fato, é sabido que as raízes adventícias da coroa, presentes nas Poaceae, demonstraram ser melhor adaptadas ao estresse hídrico e a algumas carências nutricionais, pois apresentam características de um sistema radicular tubular mais profundo. Já as raízes primárias possuem um sistema radicular ramificado e raso, trazendo ideótipos melhores adaptados a solos com carência de fosfato, posto que tal nutriente possua a tendência de estar acumulado em camadas superiores do solo. Numa realidade de mudanças climáticas a busca pela elucidação do desenvolvimento do sistema radicular nos membros da família Poaceae é de grande importância para os estudos de desenvolvimento, já que poderá proporcionar novas práticas na agricultura trazendo aumento na produção vegetal otimizando a utilização dos recursos naturais (TIAN; DE SMET; DING, 2014).

2.4 Auxina no desenvolvimento vegetal

As plantas, assim como os animais dependem de moléculas sinalizadoras que coordenam seus processos fisiológicos e de desenvolvimento a longa distância, sendo essas moléculas caracterizadas como hormônios. O desenvolvimento das plantas e sua capacidade de responderem ao ambiente indicam provavelmente a complexidade dos mecanismos bioquímicos resultantes desses processos (VANNESTE; FRIML, 2009).

Dentre os hormônios vegetais a auxina possui papel significativo no estabelecimento dos órgãos vegetais desde o zigoto à planta adulta (SMET et al., 2010), incluindo a capacidade de promover alongamento celular (TAIZ, 2004).

A auxina é transportada via fluxo direcionado de transporte (chamado de fluxo polar da auxina) que proporciona a formação de locais de maior/menor concentração hormonal, além da formação de gradientes de concentração, resultando assim em respostas diferenciais (BENKOVA et al., 2009). Portanto, o transporte polar da

auxina exerce influência na expressão diferencial dos genes que irão modular os processos específicos no desenvolvimento de diversos tipos de tecidos vegetais (KEIFFER et al., 2010; SMIT; WEIJERS, 2015).

Estudos com Poaceas como o arroz (*Oryza sativa*) e milho (*Zea mays*) indicam que picos de concentração de auxina são precursores da formação de raízes tanto primárias quanto adventícias (KITOMI et al., 2012; WANG et al., 2014). Estudos envolvendo um bloqueador de transporte de auxina demonstraram que a mesma é muito importante na regeneração dos tecidos da raiz, apresentando-se como hormônio indispensável na organogênese vegetal, principalmente na região meristemática (SENA et al., 2009).

Visando elucidar de forma espaço-temporal mais detalhada o desenvolvimento dos processos biológicos vegetais, foram desenvolvidas algumas técnicas moleculares para a visualização dos efeitos da auxina em plantas e entre estas tem sido dada relevância à utilização de sistemas que reportam a presença da resposta à auxina, tais como o sensor da auxina DR5-GFP (PERRINE-WALKER et al., 2010). Este sensor é um promotor sintético com 5 repetições do domínio de união aos fatores de resposta à auxina ARFs (*Auxin Responsive Factors*) fusionado a um gene reporter GFP. Este sensor, amplamente utilizado na planta modelo *A. thaliana*, permite visualizar os locais de resposta e desencadeamento da transdução do sinal do hormônio auxina (SENA et al., 2009). Este promotor foi também utilizado em gramíneas de interesse econômico como o milho (*Zea mays*) gerando resultados similares (GALLAVOTTI et al., 2008). Esse promotor é visualizado de forma eficiente como indicador de sinalização e distribuição de auxina a nível celular, quando associado a técnicas de microscopia confocal (REYES-OLALDE et al., 2015; CHEN et al., 2013; LI et al., 2015).

2.5 Alteração no padrão espacial das proteínas SvPIN's

A presença da auxina desencadeia respostas complexas através da ligação ao receptor da auxina TIR1, que conjuntamente com uma molécula de ubiquitina ligase, leva à degradação dos inibidores da resposta a auxina AUX/IAA. A degradação destas proteínas irá levar a ativação dos genes responsivos à auxina (genes da família ARF) que modulará a resposta gênica por meio da ativação da transcrição de muitos genes (WOPLERT et al., 2008).

Os fluxos de auxina são fundamentais para a formação dos órgãos vegetais, e os mecanismos que modulam tais fluxos durante os processos de desenvolvimento são amplamente descritos em dicotiledôneas. Por exemplo, logo após a fecundação, quando o embrião ainda se encontra no estágio de duas células, a auxina já se acumula na célula apical devido à atuação das proteínas PIN's. A proteína PIN7 (proteína de efluxo de auxina) irá promover o transporte da auxina das células basais para as células apicais. Este acúmulo de auxina leva à especificação da célula apical que originará a planta adulta, já a célula basal irá ser responsável pela formação do suspensório, cuja função é atender a demanda nutricional do embrião, além de originar as células do centro quiescente radicular. Outro exemplo de como a auxina exerce um papel fundamental na organogênese vegetal é através do acúmulo deste hormônio nos primórdios cotiledonares e posteriormente na raiz embrionária (WOPLERT et al., 2008). Evidenciando assim, a importância do contínuo remanejamento espacial e da expressão das diferentes proteínas PIN's, representando um papel relevante no desencadeamento de respostas complexas, causadas pelo acúmulo de auxina, que estão na base do desenvolvimento vegetal.

2.6 Transformação genética de plantas mediada por *Agrobacterium tumefaciens*

A transformação genética vem sendo amplamente utilizada em estudos de melhoramento vegetal, atualmente também tem ganhado espaço nos estudos de desenvolvimento vegetal. Tal técnica consiste na transferência de sequências nucleotídicas para o genoma de um receptor, gerando de um lado uma mutação insercional no genoma receptor, podendo ou não apresentar novas características fenotípicas e do outro genoma introduzindo uma série de sequências que podem ser lidas como próprias pela maquinaria da planta. A introdução de uma porção nova em um genoma pode ser realizada tanto por processos físicos, quanto biológicos (HANSEN; WRIGHT, 1999). Contudo, a utilização da bactéria *A. tumefaciens* vem sendo empregada, principalmente em plantas modelos de grande importância e em estudos de desenvolvimento vegetal (VALVEKENS; MONTAGU; LIJSEBETTENS, 1988).

A bactéria *A. tumefaciens* infecta naturalmente algumas plantas suscetíveis, tal processo natural deu origem à transformação genética mediada por *A. tumefaciens*. Tal bactéria está presente no solo e é considerada patogênica, pois causa a doença conhecida como “galha da coroa” em dicotiledôneas (CARVALHO et al., 2011). A doença é caracterizada pelo aparecimento de tumores na região do caule ou da raiz aonde houve a infecção. Durante a infecção a bactéria transfere para a planta uma porção do plasmídeo Ti (*tumor inducing*), que ao ser introduzido no genoma da célula hospedeira, induz à produção de hormônios que induzem a formação de tumores e nutrientes específicos que serão utilizados no crescimento e desenvolvimento bacteriano. Para a utilização de *A. tumefaciens* em estudos de transformação genética, foram escolhidas algumas linhagens bacterianas nas quais os genes responsáveis pela produção dos compostos e formação da galha foram deletados, e foi inserida em seu lugar sequência genômicas que codificam características de interesse (TORRES; DUSI; SANTOS, 2007). Portanto essa técnica trouxe inovações importantes tanto para a agricultura, na produção de alimentos e biocombustíveis, quanto para a indústria farmacêutica, já que as plantas transgênicas podem ser utilizadas como ferramentas que visam elucidar mecanismos básicos do desenvolvimento vegetal (HANSEN; WRIGHT, 1999).

Em estudos utilizando dicotiledôneas, inclusive espécies florestais (DIBAX et al., 2010) e *A. thaliana* (VALVEKENS; MONTAGU; LIJSEBETTENS, 1988) a transformação genética de plantas mediada por *A. tumefaciens* é amplamente utilizada, sendo também aplicado em pesquisas envolvendo Poaceae, principalmente àquelas de interesse econômico, como arroz (*Oryza sativa*) (RAINERI et al., 1990) trigo (*Triticum aestivum*) (HU et al., 2003), milho (*Zea mays*) (CHO et al., 2014) e cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) (MAYAVAN et al., 2015).

Boa parte dos protocolos de transformação requer cultura de tecidos e regeneração *in vitro*, que geram dificuldades de transformação em espécies nas quais os protocolos de cultura de tecidos ainda não estão muito bem definidos. Por isso a transformação genética *in planta*, ou seja, utilizando a transformação tecidos germinais de plantas adultas através da infiltração com *A. tumefaciens*, vem eliminando a necessidade de cultivo *in vitro* e posterior regeneração das plantas (BECHTOLD; ELLIS; PELLETIER, 1993). A utilização de inflorescências no processo de transformação *in planta* de *A. thaliana* foi denominada como “floral - dip”,

e esta técnica de transformação tem amplamente substituído os métodos de transformação clássicos, podendo além do mais ser considerada de alta confiabilidade e de fácil realização (CLOUGH; BENT, 1998).

Nesse contexto, a transformação genética mediada por *A. tumefaciens* vem sendo proposta como alternativa para a transformação de Poaceas do gênero *Setaria* também (BRUTNELL et al., 2010). De fato, recentemente foram propostos diferentes protocolos de transformação via “floral/ spike - dip” tanto para *Setaria italica* (WANG et al., 2014) como para *Setaria viridis* (MARTINS et al., 2015; SAHA; BRUMWALD, 2016).

3. OBJETIVO GERAL

Entender a arquitetura radicular da monocotiledônea *S. viridis*, em função da escolha dos tipos radiculares emitidos, distinguindo entre raiz principal e raízes adventícias, e suas relações de crescimento, que levam algumas raízes primárias a apresentar senescência. Entender quais transportadores polares da auxina estão implicados na senescência da raiz embrionária e o estabelecimento das raízes adventícias da coroa em *S. viridis*.

3.1 Objetivos específicos

- Caracterização do perfil transcricional das SvPINs durante o estabelecimento da raiz embrionária até sua senescência utilizando análise semi - quantitativa dos produtos gênicos transcritos;
- Clonagem das proteínas SvPINs expressas durante este remanejamento auxínico e fusão gênica destas com o gene repórter GFP;
- Transformação de plantas silvestres de *S. viridis* com as SvPIN -GFP de interesse.
- **Objetivo adicional:** Entender a relação entre o crescimento e a escolha de tipos radiculares distintos em função de fatores abióticos e de influência materna.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material vegetal

No presente trabalho foram utilizadas sementes da espécie modelo *Setaria viridis* da variedade A10.1, germinadas no Laboratório de Desenvolvimento e Estrutura Vegetal (LabDev) do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP). No caso de crescimento em terra as sementes foram germinadas e colocadas para crescer em uma mistura de substrato Basaplant® e vermiculita (3:1), e mantidas em câmara de crescimento sob condições de 16/8h de luz/escuro, a temperatura de 27°C caso não seja especificado o contrário. Nestas condições a intensidade luminosa constante de 550 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$ utilizando lâmpadas LED de espectro completo (Shenzen Cidly Group).

Nos experimentos de cultura de tecido *in vitro* as sementes de *S. viridis* foram escarificadas manualmente a fim de que fossem retiradas glumas, páleas e lemas. Posteriormente as sementes foram desinfetadas com vapor de cloro. Utilizando um dissecador de vidro no qual foi colocado tubos *Falcon* aberto contendo as sementes previamente dispostas de maneira a formarem uma fileira única, juntamente com um Becker contendo 100 mL de Cloro Gel comercial (2,86% de hipoclorito de sódio) e 3 mL de ácido clorídrico (12M). As sementes foram submetidas ao vapor de cloro durante 1h e 30 minutos, em seguida, as sementes foram ventiladas no fluxo laminar por 4 horas. Após a desinfecção as sementes foram introduzidas no meio de cultura MS ½ (MS meia força) para os sais descritos por Murashige e Skoog (1962), além de 10g/L de ágar ou 4g/L de phytigel. As sementes foram crescidas em sala de crescimento com regime de luz/escuro 16/8h, a uma temperatura de aproximadamente 27 - 29°C e intensidade luminosa constante de 150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$ utilizando lâmpadas fluorescentes frias.

4.2 Extração de RNA utilizando o kit Pure Link®

Os materiais, como almofarizes, cadinhos e/ou pistilos utilizados para a extração de RNA foram tratados com água 0,01% de dietil pirocarbonato (DEPC) ativa durante 2 horas em uma câmara de exaustão, autoclavados durante 20 minutos a 120°C e secos em estufa (80°C). As soluções utilizadas no

procedimento foram preparadas com água 0,01% DEPC inativa (autoclavada) e autoclavadas novamente.

Os ápices de raízes tanto primárias quanto secundárias foram coletados a partir de plantas crescidas em meio de cultura MS $\frac{1}{2}$, já o RNA foi extraído utilizando o protocolo seguindo as orientações do fabricante. Empregando aproximadamente 100 mg de tecido, adicionando 500 μ L da solução lysis buffer, preparado anteriormente com 5 μ L de 2- β mercaptoetanol por amostra. As amostras foram vortexadas por 45 segundos e posteriormente centrifugadas a 2600 g durante 5 minutos a 25°C, o sobrenadante foi coletado e acondicionado em um novo tubo de 2 mL, completando a etapa de lise celular. A etapa de lavagem, ligação e eluição foram iniciadas com a adição de 0,5% do volume do sobrenadante de etanol absoluto, após a adição do etanol as amostras foram submetidas ao vortex até a formação de um precipitado. Posteriormente 700 μ L foram transferidos para uma coluna de purificação com um tubo de coleta acoplado na parte inferior da coluna de purificação. As amostras foram centrifugadas a 12.000 g por 15 segundos a 25°C. A fase líquida contida no tubo de coleta foi descartada. Tais etapas foram repetidas até que toda amostra fosse processada. A etapa de tratamento de DNA foi realizada diretamente na coluna, sendo iniciada com a preparação de uma solução de 8 μ L de DNase Reaction Buffer I 10X com 10 μ L de DNase (aproximadamente 3 U/ μ L) e 62 μ L de água DEPC, com volume final de 80 μ L por amostra. Foram adicionados 350 μ L da solução Wash Buffer I na coluna de purificação contendo o RNA ligado a ela. Posteriormente as amostras foram centrifugadas durante 15 segundos a 25°C. A fase líquida contida no tubo de coleta foi descartada juntamente com o tubo de coleta, ficando somente com a coluna de purificação. A coluna de purificação foi acoplada a um novo tubo de coleta e foram adicionados 80 μ L da solução contendo a DNase diretamente na coluna de purificação, posteriormente as amostras foram incubadas por 15 minutos. Foram adicionados 350 μ L de Wash Buffer I na coluna de purificação seguida de uma centrifugação a 12.000 g por 15 segundos a 25°C, descartando a fase líquida. Foram adicionados 500 μ L do Wash Buffer II na coluna de purificação e uma centrifugação a 12.000 g por 15 segundos a 25°C e insira a coluna em um novo tubo de coleta. As etapas anteriores foram repetidas por duas vezes. As amostras foram centrifugadas a 12.000 g por 1 minuto para que a membrana presente na coluna de purificação contendo o RNA ligado estivesse o mais seca possível, posteriormente a fase líquida foi descartada. A coluna de

purificação foi inserida em um tubo de recuperação, foram adicionados 30 µL de água DEPC no centro da coluna de purificação acoplada à um tubo de recuperação, posteriormente as amostras foram incubadas a 25°C durante a 1 minuto. Posteriormente as amostras foram centrifugadas a 12.000 g durante 1 minuto a 25°C, o RNA presente na fase líquida foi armazenada em ultrafreezer.

4.3 Síntese de cDNA

A síntese de cDNA foi realizada utilizando a enzima *Super Scrip III RT* e 5 ng de RNA (8 µL de RNA), 50 µM *primer* oligo - dT (1 µL); 10 mM de dNTP mix (1 µL), o volume foi completado para 10 µL de volume final. As amostras foram incubadas à 65°C durante 5 minutos e imediatamente transferidas para o gelo e incubadas durante 1 minuto. Posteriormente foram adicionados o tampão da enzima 10X *RT Buffer* (2 µL), 25 mM MgCl₂ (4 µL); 0,1 M DTT (2 µL); *RNAse out* (40 U/ µL) (1 µL) e *Super Scrip III RT* (200 U/ µL) (1 µL). As amostras foram incubadas no termociclador modelo *Veriti Dx* (Applied Biosystems, EUA) por 50 minutos a 50°C e um último ciclo de 85°C durante 5 minutos. As amostras foram tratadas com 1 µL de RNA A durante 30 minutos.

4.4 Extração de DNA (Doyle & Doyle, 1987)

As amostras de DNA genômico foram extraídas de folhas jovens utilizando o protocolo (Doyle, Doyle), foram macerados e congelados aproximadamente 100 mg de tecido vegetal. Foram adicionados 400 µL de tampão CTAB previamente preparado com 2% de CTAB, 1% de PVP, 100 mM de Tris-HCl 1 M pH 8,0 e 25 mM de EDTA 0,5 M pH 8,0 e 2 M de NaCl 5M. As amostras foram agitadas no vortex durante 5 segundos, em seguida foram incubadas a 65°C. Posteriormente foi adicionado 400 µL de CIA 25:24:1 (fenol : clorofórmio : álcool isoamílico) e as amostras foram submetidas à agitação por inversão durante 5 minutos. Posteriormente as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm por 10 minutos. Foram retirados 200 µL da fase aquosa e transferidos para um novo tubo *Eppendorf*, juntamente com 400 µL de álcool de etanol absoluto gelado, posteriormente as

amostras foram submetidas à agitação por inversão durante 1 minuto. Em seguida as amostras foram incubadas a -20°C durante 30 minutos. Posteriormente foi realizada uma centrifugação a 14.000 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante foi descartado, tomando cuidado para que o *pellet* formado não se desprendesse do tubo. Foram adicionados 800 μL de etanol 70% gelado. Posteriormente as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm durante 5 minutos, a fase líquida foi descartada. O *pellet* foi seco durante aproximadamente 1 hora e 30 minutos, e em seguida foi ressuspenso com TE + RNase na concentração de 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$. As amostras foram armazenadas no freezer a -20°C .

4.5 Relação filogenética das proteínas PIN's

A fim de verificar o relacionamento das proteínas PIN's de *S. viridis* com outras espécies presentes em banco de dados foi construída uma árvore filogenética utilizando o método Neighbor - joining. Para tal utilizamos os dados disponíveis nos bancos de dados TAIR (<https://www.arabidopsis.org/>), para extrair as sequências de *Arabidopsis thaliana* e o banco de dados Phytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>), para os organismos: *Brachypodium distachyon*, *Oryza sativa*, *Panicum hallii*, *Setaria italica*, *Setaria viridis*, *Sorghum bicolor*, e *Zea mays*. A ferramenta BLAST foi utilizada para identificar a similaridade entre as sequências proteicas dos organismos.

4.6 Análise dos PIN's mais expressos nos estágios iniciais do desenvolvimento radicular

As amplificações foram seguidas com incubações iniciais de 94°C durante 4 minutos, seguidas de 35 ciclos de 94°C por 30 segundos e entre 59°C e 60°C , 72°C por 30 a 40 segundos de acordo com cada um dos iniciadores (Tabela 1) e 72°C por durante 7 minutos. Posteriormente as amostras foram analisadas em gel de eletroforese.

Tabela 1: Iniciadores utilizados para a análise de expressão semi - quantitativa a partir de RNA de diferentes tecidos de *S. viridis*.

Iniciadores	Sequência <i>Foward</i>	Sequência <i>Reverse</i>	Temperatura de anelamento
PIN 1A	CAAGCTGCCACTCGAAGTAGTAT	CAGGGGACATGCTTAATTTGTAG	59 °C
PIN 1B	GTTCCCTTCAAGCTTTGTACTIONG	CTGAAATCCATCTCCATCCTGT	60 °C
PIN 2	TCTTTGCATGCATCCATCTC	ATCGAGGACGGCCTGAAG	60 °C
PIN 347 1	CCAACGTAGCATGGACAGTAAAT	ACTAATGCTAGCTTCTGGGCTTT	59 °C
PIN 347 2	TTGTGGATATGCACTGTTGTCTC	GGAATTCCATCTCCATACTCTCC	59 °C
SoPIN	CTCACAGACTATGCCATCACAAA	CAACGTTTCATCCTGACATACTGA	59 °C

A expressão dos genes foi normalizada com o gene de referência fosfoglucomutase (Si034613) (*foward* ACGAGAAGGATTCATCCAAGAC; *reverse* CGTGTACTCTTGCATCTTGGAG), sugerido por Lambret–Frotté et al. (2015).

4.7 Clonagem das proteínas SvPIN´s mais expressas nos estágios iniciais do desenvolvimento radicular

Como os fragmentos a serem amplificados continham acima de 5k pares de bases foi utilizado a estratégia de dividir tais fragmentos em dois fragmentos menores contendo entre 2 e 3k pares de bases, utilizando a enzima de restrição contendo um sítio de corte único, a *Clal*. Tais fragmentos foram amplificados utilizando a enzima *Platinum® Taq DNA Polymerase*, enzima específica para long templates e *high – fidelity* e os iniciadores (Tabela 2).

Tabela 2: Iniciadores utilizados na clonagem em 2 fragmentos distintos.

Iniciadores	Sequência <i>Foward</i>	Sequência <i>Reverse</i>	Temperatura de anelamento
PIN 1B	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAG GCTCCAAGAGACAGGGTAAAAGGTC GAG	AAAAATCGATCAGATTCAGATAGA TGTACGCTGCA	51°C
PIN 1B	AAAAATCGATCAAAGCTAGCCCAGCG TACGTATAA	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAG CTGGGTCCAGCCCAAGCAGGAT GTAGTAGACG	54°C
PIN 347 1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAG GCTCCGCTAGCACTAGGAACATGAAG GA	ATCGATTTTTTAGGCCTACACATA TGCGTTT	52°C
PIN 347 1	ATCGATGAACCGAGTCTACTTTGAGT TGACC	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAG CTGGGTCTACTGGTCCCAGTCCA AGAACGATG	49°C
PIN 347 2	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAG GCTCCAAAGGGGTACAAGGACATGAA GT	ATCGATCTCGCAATGCACGAAAG CAAGCAGG	50°C
PIN 347 2	ATCGATCTTTTTGTACGGGAGAAGC CGGCA	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAG CTGGGTCTAGCAGTCCGAGAATG ATATAGTAG	47°C

4.8 Transformação genética de *S. viridis* via “spike - dip”

Para as etapas de transformação genética foram utilizadas duas construções, uma construção para o sensor sintético da auxina DR5-RFP em um vetor compatível com a transformação de monocotiledôneas cedido pelo Prof. David Jackson (CSHL-USA), vetor molde pTF101.1 com modificações, segundo Gallavotti et al. (2008) (Figura 1) e um vetor contendo o promotor da proteína SvPIN1B-YFP cedido pelo Prof. Márcio Alves Ferreira (Departamento de Genética – Universidade Federal do Rio de Janeiro) (Figura 2).

Figura 1: Vetor molde pTF101.1.

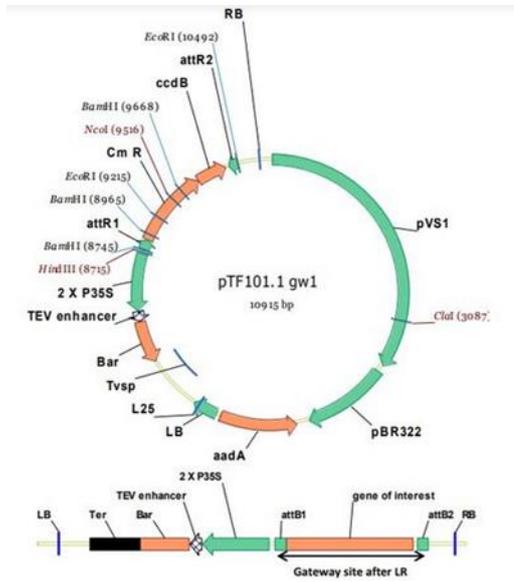
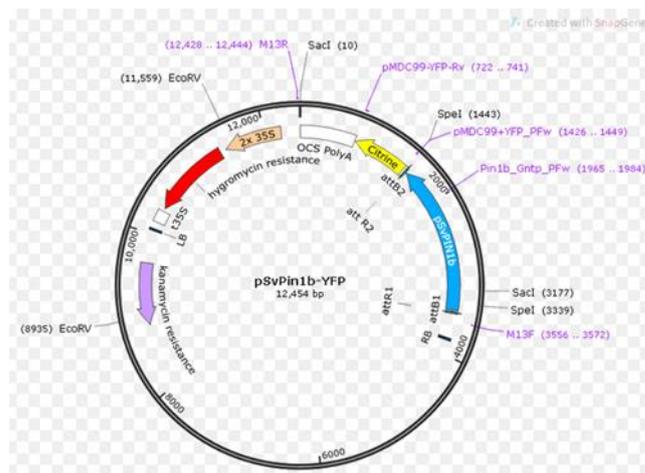


Figura 2: Construção cedida pelo Prof. Márcio Alves Ferreira (Depto Genética – UFRJ) contendo o promotor pSvPIN1B :: YFP.



Para que fosse confirmada o êxito na transferência da construção DR5 :: RFP para a *Agrobacterium tumefaciens* foi realizada PCR de colônia.

A transformação de *S. viridis* do presente trabalho é parte de um projeto de transformação de *S. viridis* utilizando diferentes metodologias, uma descrita por Martins et al. (2015) e outra descrita por Saha e Blumwald (2016). A metodologia descrita por Martins et al. (2015), apresentou algumas dificuldades na obtenção de plantas transformadas, como baixa taxa de germinação, já que *S. viridis*, apresenta dormência intrínseca já descrita na literatura. A obtenção de plantas transformadas sem a necessidade de protocolos de cultura *in vitro* configura um dos grandes avanços nos métodos de transformação, solucionando um dos grandes problemas de métodos de transformação amplamente utilizados para espécies sem protocolos de cultura de tecidos bem estabelecidos.

A introdução do DNA exógeno mediada por *A. tumefaciens* nas plantas de *S. viridis* do presente estudo foi realizada utilizando o protocolo de transformação conhecido como “spike-dip”, descrito por Saha e Blumwald (2016). As plantas de *S. viridis* cresceram em vasos contendo substrato-Basaplant® e vermiculita (3:1), em câmara climatizada, por aproximadamente 28 dias, já que depois de transcorrido esse período já é possível notar o surgimento da panícula.

As bactérias foram crescidas em placas de *Petri* contendo aproximadamente 25 mL de meio YEP sólido, com os antibióticos canamicina (50mg/L) e rifampicina (50 mg/L) para a construção pSvPIN1B :: YFP e espectinomicina (100 mg/L) e rifampicina (50 mg/L) para a construção contendo DR5 :: RFP à 28°C durante 48h. Após o crescimento das bactérias em placa de *Petri*, utilizando uma colônia única as bactérias cresceram em 1 mL de meio YEP líquido com os antibióticos correspondentes durante 24h sob agitação de 180 rpm à 28°C, formando assim um pré-inóculo, posteriormente o pré-inóculo foi adicionado a 100 mL de líquido contendo os antibióticos acima citados para que as bactérias crescessem sob agitação de 180 rpm e à 28°C até atingirem a OD₆₀₀ entre 0,6 e 1,0.

A cultura contendo as bactérias foram centrifugadas a 14.000 rpm durante 20 minutos para que fosse formado o *pellet*, que foi posteriormente ressuspenso em meio de cultura SvSD contendo 10,5g/L de K₂HPO₄, 4,5g/L de KH₂PO₄, 1g/L de (NH₄)₂SO₄, 0,5g/L de citrato de sódio, 4g/L de glicerol, 0,05g/L de MgSO₄, 15g/L de ácido ascórbico, 0,04g/L de MES, 68,5g/L de sacarose e 36g/L de glucose, pH 5,8, suplementado com 100µM de acetoseringona. Posteriormente o meio de

cultura SvSD contendo as bactérias foi submetido à uma indução sob agitação de 180 rpm à 28°C durante 1h.

As panículas das plantas de *S. viridis* foram mergulhadas em uma solução de infiltração contendo 1,95 g/L de MES, 2,46 g/L de MgSO₄ e 0,1% de Silwet-L77 durante 15 minutos. Seguidamente as panículas foram mergulhadas no meio SvSD contendo as bactérias por 20 minutos aproximadamente.

As plantas foram submetidas à câmara úmida por 48h à 20°C aproximadamente, posteriormente o protocolo de produção de sementes clássico (BRUTNELL et al., 2010) foi seguido. Posteriormente as panículas foram embaladas em sacos de papel até que o desenvolvimento fosse completo. Cerca de 30 dias após a transformação as panículas estavam secas e suas sementes foram coletadas e armazenadas em tubos *Falcon*.

4.9 Seleção dos transformantes com higromicina e glufosinato de amônio

A construção pSvPIN1B :: YFP possui como marcador seletivo a higrocinima, já construção contendo a construção DR5 :: RFP, que possui o BASTA® (glufosinato de amônio) como agente de seleção.

Após serem submetidas ao processo de transformação as sementes de *S. viridis* tiveram suas páleas, glumas e lemas retirados, e posteriormente foram desinfetadas seguindo o protocolo acima citado. Tais sementes foram germinadas em placas de *Petri* contendo meio MS ½ e incubadas por 4 dias no escuro. Após esse período as sementes foram introduzidas em placas de *Petri* contendo meio MS ½ e de 30mg/L de higromicina e 40mg/L de BASTA®. Após 7 dias as plantas sobreviventes foram introduzidas em magentas contendo meio MS ½. Posteriormente as plantas foram transplantadas para vasos contendo substrato Basaplant® e vermiculita (3:1) para que atingissem um tamanho adequado para que fosse possível realizar uma PCR de genotipagem para a confirmação da transformação.

4.10 Teste de germinação

Após as sementes terem páleas, lemas e glumas retiradas e serem desinfetadas como citado anteriormente foi realizado o teste de germinação utilizando papel filtro do tipo germitest® e meio de cultura MS ½ e duas temperaturas diferentes 20°C e 27°C.

4.11 Acompanhamento do desenvolvimento das raízes

Após serem escarificadas e desinfetadas, as sementes de *S. viridis* foram colocadas para germinar em tubos de ensaio contendo aproximadamente 30 mL de meio de cultura MS ½ em cada tubo. As sementes foram colocadas de forma diametralmente oposta e adjacente à parede do tubo, foram utilizadas 2 sementes por tubo de ensaio. As sementes foram acompanhadas dia - a - dia quanto ao crescimento e desenvolvimento da raiz primária e da raiz adventícia, com a utilização de um paquímetro para realizar as medições. As tabelas e gráficos foram digitalizadas em planilhas no *software* Microsoft Excel para posterior análise de *Teste t* realizada no mesmo.

4.12 Acompanhamento do desenvolvimento das raízes separando a inflorescência em diferentes setores

Após serem coletadas as inflorescências foram separadas em 3 diferentes setores: base, meio e ápice. Após a coletas as sementes de cada setor foram escarificadas e desinfetadas e colocadas para germinar em placas de *Petri* contendo aproximadamente 25 mL de meio MS ½ sem iluminação durante 4 dias. Após esse período as sementes foram introduzidas em tubos de ensaio contendo aproximadamente 30 mL de meio de cultura MS ½ em cada tubo. As sementes foram avaliadas em sua taxa de germinação e acompanhadas dia-a-dia quanto ao crescimento e desenvolvimento tanto da raiz primária quanto da raiz adventícia.

4.13 Acompanhamento do desenvolvimento das raízes utilizando hormônios vegetais

Após serem escarificadas e desinfetadas, as sementes de *S. viridis* foram colocadas para germinar em placas de *Petri* contendo aproximadamente 25 mL de meio MS $\frac{1}{2}$ sem iluminação durante 5 dias. Após esse período as sementes foram introduzidas em tubos de ensaio contendo aproximadamente 30 mL de meio de cultura MS $\frac{1}{2}$ em cada tubo juntamente com os reguladores vegetais, 1 μ M de 2,4 – D (ácido diclorofenoxiacético), 10 μ M NPA (ácido 1-N-naftilftalâmico); 10 μ M de GA₃ (ácido giberélico) e 0,1 μ M de zeatina. As plântulas foram crescidas em fotoperíodo 16h luz/8h escuro. As sementes foram colocadas de forma diametralmente oposta e adjacente à parede do tubo. As sementes foram acompanhadas dia-a-dia quanto ao crescimento e desenvolvimento tanto da raiz primária quanto da raiz adventícia, ao final do experimento foram coletadas amostras de cada um dos tratamentos e montadas com material fresco em lâminas e lamínulas contendo glicerina 50% e analisadas ao microscópio de luz (Zeiss AXIO Imager D2 – Jena, Germany), sendo as imagens digitalizadas.

5. RESULTADOS

O seguinte projeto foi realizado em duas etapas separadas: na primeira delas, seguindo o objetivo inicial da tese, nos deparamos com dificuldades no processo de transformação de plantas de *S. viridis* utilizando protocolos publicados, o que impediria a realização do trabalho de dissertação. Por este motivo, na segunda etapa o objetivo principal foi modificado, concentrando os esforços na compreensão dos processos fisiológicos relacionados a modulação do sistema radicular, enfrentando o objetivo inicial da dissertação baixo uma ótica diferente. Esta mudança de perspectiva foi realizada com o objetivo de não desperdiçar esforços e os recursos do laboratório, insistindo com uma metodologia que apresenta claros gargalos experimentais, mas sim utilizando recursos para explorar perspectivas relativas a arquitetura radicular ainda desconhecida nesta espécie.

5.1 Relação filogenética das proteínas PIN's

Com o escopo de estabelecer quais transportadores polares da auxina existiriam em *S. viridis* para depois estabelecer quais fossem implicados no estabelecimento da arquitetura radicular, foram feitos alinhamentos e construída a árvore filogenética utilizando ferramentas bioinformáticas BLAST do banco de dados phytozome disponível em: <https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html#!search?show=BLAST> e CLUSTAL Ω disponível em: <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>. A árvore filogenética das proteínas PIN's apresentou a formação de 4 ramos distintos: um contendo a proteína PIN1, que em monocotiledôneas abrange as proteínas PIN 1A e PIN 1B; um contendo a proteína PIN2; outro contendo a proteína SoPIN; e um grande grupo contendo as proteínas PIN's 3,4 e 7 (Figura 3).

Estas análises evidenciaram que a proteína PIN1 de *A. thaliana* (acesso AT1G73590.1) possui dois acessos em *S. viridis* com alto grau de similaridade. De fato, a proteína de *S. viridis*, denominada PIN 1A (acesso Sevir.1G323500.1), é a que apresenta maior índice de similaridade de sequência, apresentando 594 aminoácidos e 67,2% de similaridade, enquanto a proteína denominada

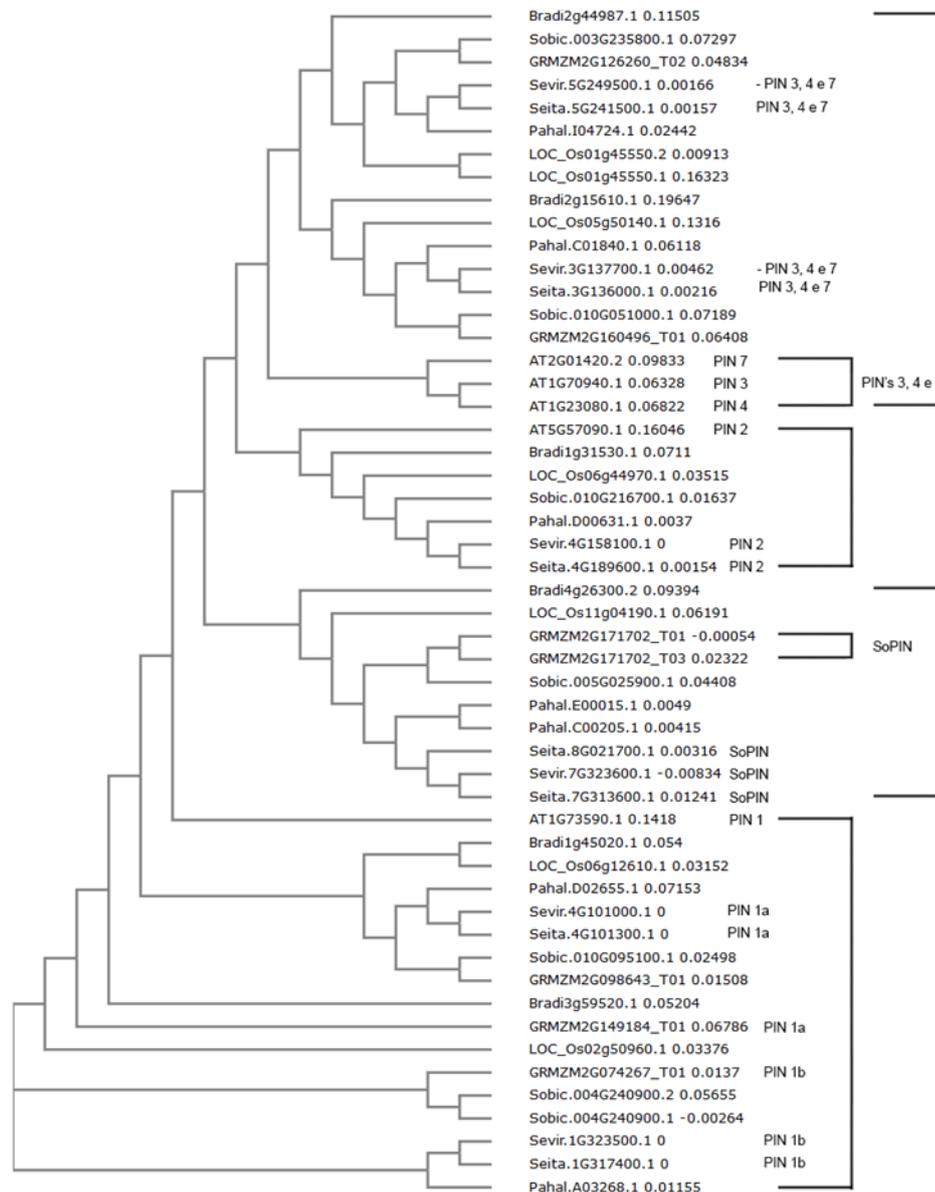
PIN 1B (Sevir.4G101000.1), que possui 597 aminoácidos, apresenta 66,7% de similaridade com a proteína PIN1 de *A. thaliana*. A árvore filogenética gerada entre todas as proteínas PIN's revelou que em monocotiledôneas a proteína PIN1 sofreu uma duplicação, levando à existência de duas proteínas derivantes do ancestral de PIN1, enquanto que esta duplicação não é evidenciada nas dicotiledôneas como *A. thaliana* (GALLAVOTTI et al., 2008).

A proteína PIN2 de *S. viridis*, Sevir.4G158100.1, que possui 629 aminoácidos, tem homologia de sequência com a proteína PIN2 de *A. thaliana*, AT5G57090.1 que possui 647 aminoácidos, com 59,3% de similaridade entre as sequências.

As proteínas PIN's 3,4 e 7 são as que apresentam maior grau de divergência entre monocotiledôneas e *S. viridis*, pois a árvore evidencia uma série de duplicações, que ocorreram de forma diferente em monocotiledôneas e dicotiledôneas (GALLAVOTTI et al., 2008). De fato, dicotiledôneas como *A. thaliana*, sofreram 2 duplicações a partir de um ancestral comum levando à existência de 3 proteínas (PIN 3,4 e 7). Já monocotiledôneas apresentam uma única duplicação, não relacionável a nenhuma das que ocorreram em dicotiledôneas, levando estas espécies a apresentarem 2 homólogos denominados PIN 347 1 e PIN 347 2, que ocorreu antes da divisão das monocotiledôneas.

A análise da árvore filogenética evidenciou também a existência de uma proteína PIN que existe somente em monocotiledôneas, a proteína SoPIN. Analisando as distâncias filogenéticas em nossa árvore evidenciou uma duplicação desta proteína, antes da separação entre monocotiledôneas e dicotiledôneas, apontando a uma maior similaridade com a proteína PIN1.

Figura 3: Relação filogenética das proteínas PIN's nas espécies *Arabidopsis thaliana*, *Brachypodium distachyon*, *Oryza sativa*, *Panicum hallii*, *Setaria italica*, *Setaria viridis*, *Sorghum bicolor*, e *Zea mays*.



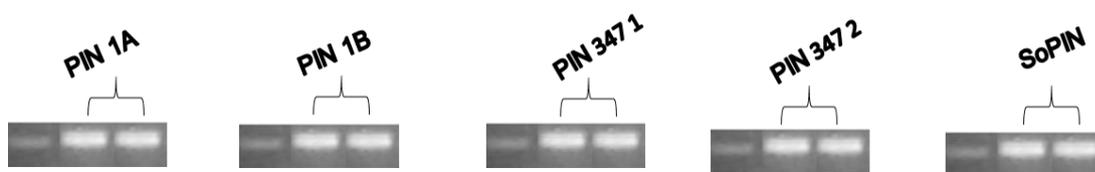
5.1.1 Análise dos SvPIN's mais expressas nos estágios iniciais do desenvolvimento radicular

Com objetivo de analisar quais proteína PIN's estariam expressas ou não nos estágios iniciais do desenvolvimento radicular, avaliamos o nível de expressão dos genes identificados na análise filogenética, através de PCR semi - quantitativa. Para

tal finalidade as sementes foram escarificadas, desinfetadas e germinadas em placas verticais de *Petri* contendo meio MS ½. Após 7 dias de germinação foram coletados os ápices radiculares, caule, espiguiha, semente e folhas. Foi extraído o RNA total das amostras e se realizou síntese de cDNA a partir de iniciadores oligo dT. Os genes PIN 1A, PIN 1B, PIN2, PIN 3457 1, PIN 347 2 e SoPIN foram analisados utilizando os iniciadores da Tabela 1.

Para certificar o correto funcionamento dos iniciadores (Tabela 2), foi realizada inicialmente uma PCR utilizando DNA genômico de *S. viridis* (Figura 4), na qual foi possível obter bandas significativas com todos os iniciadores utilizados.

Figura 4: Expressão das diferentes proteínas PIN's em DNA genômico de *S. viridis*.



Seguidamente foram realizadas PCR's semi - quantitativas com o cDNA extraído de diferentes tecidos de *S. viridis*. A expressão dos genes foi normalizada com o gene de referência fosfoglucomutase (Si034613), sendo assim possível observar que o gene normalizador apresentava um nível de expressão pouco variável em diferentes partes da planta em nossas condições (Figura 5).

Os resultados da PCR semi - quantitativa apontaram que a proteína PIN 1A não se expressava significativamente nas análises realizadas, enquanto a proteína PIN 1B apresentava uma maior expressão na raiz, seguida do caule e folhas, e praticamente não se expressa em tecidos como espiguihas e sementes (Figura 5).

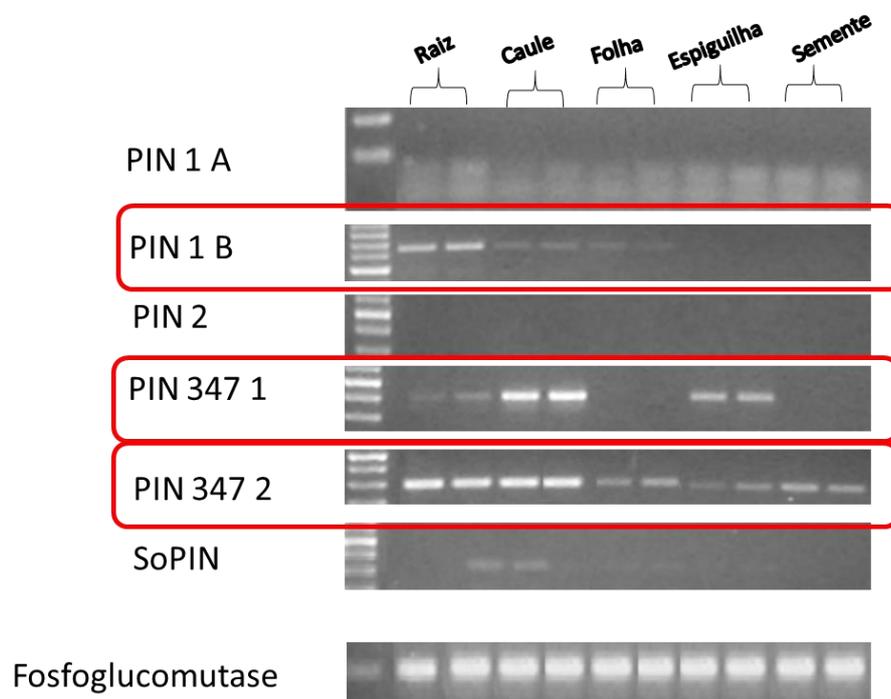
Diferentemente a proteína PIN2 não apresentou expressão nos tecidos analisados (Figura 5).

A proteína PIN 347 1 apresentou uma expressão significativa em tecidos do caule, e gradualmente mais fraca em tecidos da espiguiha, e tecidos radiculares, mas não apresentou expressão em folhas e sementes (Figura 5).

A proteína PIN 347 2 apresentou expressão tanto em tecidos do caule quanto em tecidos radiculares, porém menor expressão em tecidos da folha, espiguiha e semente (Figura 5).

Por último a proteína SoPIN apresentou expressão fraca em tecidos do caule, mas não apresentou expressão nos demais tecidos analisados (Figura 5).

Figura 5: Expressão das diferentes proteínas PIN's em distintos tecidos de *S. viridis*.

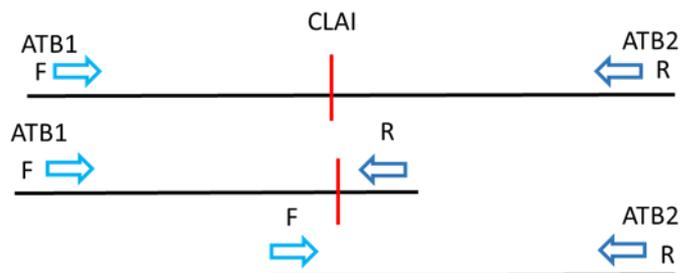


5.1.2 Clonagem das proteínas SvPIN's mais expressas nos estágios iniciais do desenvolvimento radicular

Os genes das proteínas PIN 1B, PIN 347 1 e PIN 347 2 foram escolhidos para a etapa de clonagem já que são os genes que apresentam nos estágios iniciais do desenvolvimento radicular. Primeiramente tentamos clonar estes genes com aprox. 5 - 6 kb de sequência reguladora em um único amplicon, mas mesmo variando diferentes condições tais como concentração de Mg^{+2} , DMSO, concentração de DNA

e temperaturas de anelamento, não obtivemos nenhuma banda de amplificação (dados não mostrados). Devido à notória dificuldade de gerar amplicons de aprox. 5kb de tamanho, optamos por uma estratégia de dividir o amplicon em dois fragmentos, utilizando um sítio de restrição *ClaI* presente em todos os amplicons, para depois juntá-los por digestão enzimática com *ClaI* e ligação (ver estratégia descrita na Figura 6). Os iniciadores utilizados estão descritos na Tabela 2. Foram realizados testes de amplificação via PCR convencional utilizando diferentes concentrações de DMSO (3% e 6%) além de diversas concentrações de $MgCl_2$ (2,5 mM e 4 mM), utilizando as enzimas *Platinum® Taq DNA Polymerase®* da Invitrogen.

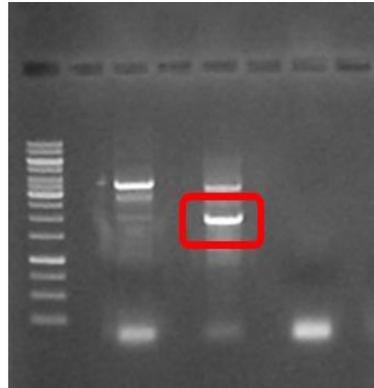
Figura 6: Esquema da clonagem em dois fragmentos.



5.1.2.1 Fragmento PIN 1B (F) X CLA I PIN 1B (R)

O fragmento foi amplificado usando 35 ciclos, 2,5 mM de $MgCl_2$ e temperatura de anelamento de 51°C (Figura 7). Uma banda de tamanho correspondente a 1957 pb foi encontrada, extraída do gel e purificada.

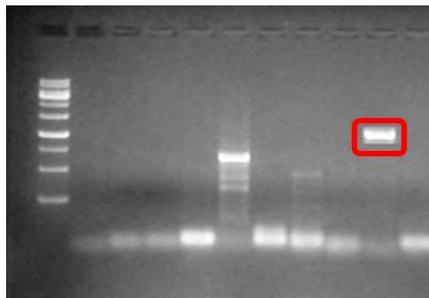
Figura 7: Eletroforese em gel de agarose para a amplificação do fragmento PIN 1B (F) X CLA I PIN 1B (R).



5.1.2.2 Fragmento CLA I PIN 1B (F) X PIN 1B (R)

O fragmento foi amplificado usando 35 ciclos, 2,5 mM de $MgCl_2$ e temperatura de anelamento de $54^{\circ}C$ (Figura 8). Uma banda de tamanho correspondente a 3097 pb foi encontrada, extraída do gel e purificada.

Figura 8: Eletroforese em gel de agarose para a amplificação do fragmento PIN 1B (F) X CLA I PIN1B (R).



5.1.2.3 Fragmento PIN 347 1 (F) X CLA I PIN 3471 (R)

O fragmento foi amplificado usando 35 ciclos, 2,5 mM de $MgCl_2$ e temperatura de anelamento de $51^{\circ}C$ (Figura 9). Uma banda de tamanho correspondente a 2043 pb foi encontrada, extraída do gel e purificada.

Figura 9: Eletroforese em gel de agarose para a amplificação do fragmento PIN 347 1 (F) X CLA I PIN 347 1 (R).



5.1.2.4 Fragmento CLA I PIN 347 1 (F) X PIN 347 1 (R)

O fragmento foi amplificado usando, 35 ciclos 2 mM de $MgCl_2$, 6% de DMSO e temperatura de anelamento de 49°C (Figura 10). A banda de tamanho correspondente a 3840 pb foi encontrada, extraída do gel e purificada.

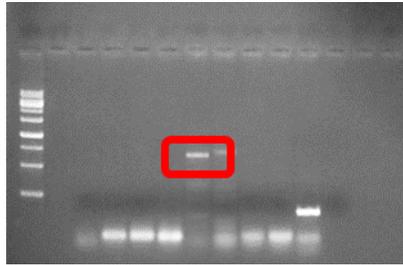
Figura 10: Eletroforese em gel de agarose para a amplificação do fragmento CLA I PIN 347 1 (F) X PIN 347 1 (R).



5.1.2.5 Fragmento PIN 347 2 (F) X CLA I PIN 347 2

O fragmento foi amplificado usando 2 mM de $MgCl_2$, 6% de DMSO e temperatura de anelamento de 47°C (Figura 11). Uma banda de tamanho correspondente a 1289 pb foi encontrada, extraída do gel e purificada.

Figura 11: Eletroforese em gel de agarose para a amplificação do fragmento PIN 347 2 (F) X CLA I PIN 347 2 (R).



5.1.2.6 Fragmento CLA I PIN 347 1 (F) X PIN 347 2 (R)

O fragmento foi amplificado usando 2 mM de MgCl₂ e 6% de DMSO (Figura 12). Uma banda de tamanho correspondente a 3452 pb foi encontrada, extraída do gel e purificada.

Figura 12: Eletroforese em gel de agarose para a amplificação do fragmento CLA I PIN 347 2 (F) X PIN 347 2 (R).



O restante da clonagem não foi levado adiante como descrito posteriormente.

5.2 Transformação e seleção dos possíveis transformantes de *S. viridis* via “spike - dip”

Uma vez que um dos objetivos propostos para este trabalho necessitava da transformação de plantas de *S. viridis*, por transformação direta de tecidos germinais, optamos por utilizar o método de transformação via “spike - dip” descrito por Saha e Blumwald (2016), com pequenas modificações relacionadas ao tempo de contato da inflorescência com a cepa AGL1 *A. tumefaciens* transformada.

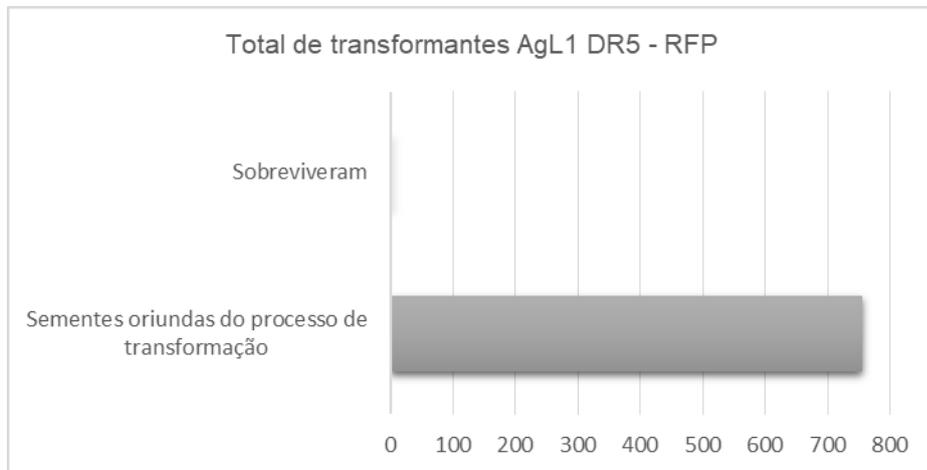
Para testar as eficiências de transformação dos diferentes estágios florais, foram transformados todos os estágios florais que apresentaram taxa de transformação consistente no protocolo descrito por Saha e Blumwald (2016). No processo foram testadas duas construções já presentes no laboratório: DR5-RFP no vetor pTF101.1, que já apresentara resultados positivos enquanto a transformação de plantas de milho, e pSvPIN1B :: YFP no vetor pMD99 que já apresentara resultados positivos na transformação de calos embriogênicos de *S. viridis*.

Foram realizados 5 eventos de transformação distintos, 13/03; 14/03; 16/03; 19/03 e 20/03 gerando um total de mais de 700 sementes possivelmente transformadas para cada construção testada. Foram realizadas modificações nos tempos de contato da espiguiha com o meio contendo *A. tumefaciens* como segue: nas primeiras três transformações realizadas o meio SvSD contendo *A. tumefaciens* ficou em contato com a planta por 20 minutos, já na quarta transformação foram utilizados 15 minutos e na última transformação foram utilizados 40 minutos. As sementes provenientes do processo de transformação descrito acima foram germinadas em meio MS ½ durante 4 dias sem iluminação, após esse período as mesmas foram transferidas para o meio MS ½ contendo os respectivos agentes de seleção durante 7 dias.

5.2.1 DR5 :: RFP

As sementes apresentaram uma taxa de germinação de 98,2% no meio MS ½. Após serem transferidas para o meio com o agente seletivo ®BASTA, as 756 sementes oriundas do processo de transformação foram separadas de acordo com seu estágio de maturação no momento da transformação, sendo S1 o mais jovem e S5 o estágio mais maduro. Ao final dos 7 dias de exposição ao agente seletivo as plantas sobreviventes foram transferidas para a terra. Infelizmente nenhuma planta sobreviveu ao processo de aclimação em terra para que fosse possível realizar a PCR de genotipagem (Figura 13). Em seguida estão detalhadas as taxas de sobrevivência ao antibiótico, divididas por estágio floral.

Figura 13: Número de sementes que passaram pelo processo de transformação e o número de plantas restante após a seleção com @BASTA.



Estágio S1

O estágio de maturação S1 abrangeu o evento de transformação realizado no dia 14/03. Das 102 plantas obtidas no estágio S1, 15 plantas sobreviveram após 7 dias de exposição ao agente seletivo BASTA® e 87 plantas não sobreviveram a exposição, tendo assim uma taxa de sobrevivência inicial de 14,70% (Tabela 3).

Estágio S2

O estágio de maturação S2 abrangeu os eventos de transformação realizados nos dias 13/03 e 20/03. Das 182 plantas obtidas no estágio S2, 19 plantas sobreviveram após 7 dias de exposição ao agente seletivo BASTA® e 163 plantas não sobreviveram a exposição, tendo assim uma taxa de sobrevivência inicial de 10,43% (Tabela 3).

Estágio S3

O estágio de maturação S3 abrangeu os eventos de transformação realizados nos dias 13/03, 16/03 e 20/03. Das 267 plantas obtidas no estágio S3, 48 plantas sobreviveram após 7 dias de exposição ao agente seletivo e 219 plantas não sobreviveram a exposição ao BASTA®, tendo assim uma taxa de sobrevivência inicial de 17,97% (Tabela 3).

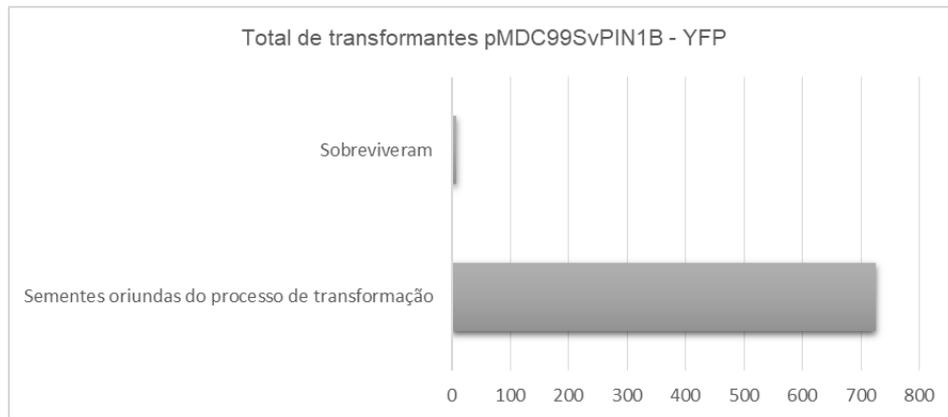
Estágio S4

O estágio de maturação S4 abrangeu os eventos de transformação realizados nos dias 13/03, 16/03 e 20/03. Das 205 plantas obtidas no estágio S4, 30 plantas sobreviveram após 7 dias de exposição ao agente seletivo e 175 plantas não sobreviveram a exposição ao BASTA®, tendo assim uma taxa de sobrevivência inicial de 14,63% (Tabela 3).

5.2.2 pSvPIN1B :: YFP

Para a construção pSvPIN1B :: YFP foram realizados também cinco eventos de transformação independentes, nas seguintes datas: 13/03; 14/03; 16/03; 19/03 e 20/03, além de realizar as modificações em relação aos tempos de contato da espiguiha com as cepas de *A. tumefaciens* transformadas como citado anteriormente. As sementes tiveram uma taxa de germinação de 75% no meio MS ½. Após serem transferidas para o meio com o agente seletivo higromicina, as 726 sementes oriundas do processo de transformação também foram separadas de acordo com seu estágio de maturação no momento da transformação, como acima citado. Ao final dos 7 dias de exposição ao agente seletivo somente 7 plantas sobreviveram. Infelizmente nenhuma planta sobreviveu ao processo de aclimação em terra para que fosse possível realizar a PCR de genotipagem (Figura 14).

Figura 14: Número de sementes que passaram pelo processo de transformação e o número de plantas restante após a seleção com higromicina.



Estágio S1

O estágio de maturação S1 abrangeu o evento de transformação realizado no dia 19/03. Das 86 plantas obtidas no estágio S1, 7 plantas sobreviveram após 7 dias de exposição ao agente seletivo e 79 plantas não sobreviveram a exposição, tendo assim uma taxa de sobrevivência de 8,13% (Tabela 3).

Estágio S2

O estágio de maturação S2 abrangeu os eventos de transformação realizados nos dias 13, 14, 16 e 19/03. Das 124 plantas obtidas no estágio S2, 19 plantas sobreviveram após 7 dias de exposição ao agente seletivo e 105 plantas não sobreviveram a exposição, tendo assim uma taxa de sobrevivência de 15,32% (Tabela 3).

Estágio S3

O estágio de maturação S3 abrangeu os eventos de transformação realizados nos dias 13, 14, 16 e 19/03. Das 464 plantas obtidas no estágio S3, 18 plantas sobreviveram após 7 dias de exposição ao agente seletivo e 446 plantas não sobreviveram a exposição, tendo assim uma taxa de sobrevivência de 3,87% (Tabela 3).

Estágio S4

O estágio de maturação S4 abrangeu o evento de transformação realizado no dia 19/03. Das 9 plantas obtidas no estágio S4, 6 plantas sobreviveram após 7 dias de exposição ao agente seletivo e 3 plantas não sobreviveram a exposição, tendo assim uma taxa de sobrevivência de 66,66% (Tabela 3).

Estágio S5

O estágio de maturação S5 abrangeu o evento de transformação realizado no dia 19/03. Das 43 plantas obtidas no estágio S5, 9 plantas sobreviveram após 7 dias de exposição ao agente seletivo e 43 plantas não sobreviveram a exposição, tendo assim uma taxa de sobrevivência de 20,93% (Tabela 3).

Tabela 3: Total de sementes obtidas ao final do processo de transformação com as construções DR5 :: RFP e pSvPIN1B :: YFP e o total de sementes que sobreviveram ao agente seletivo.

Estágio de transformação	DR5 :: RFP		pSvPIN1B :: YFP	
	Total de sementes	Plântulas que sobreviveram	Total de sementes	Plântulas que sobreviveram
S1	102	15	86	7
S2	182	19	124	19
S3	267	48	464	18
S4	205	30	9	6
S5	-	-	43	9

5.2.3 Teste de germinação

Visto que a dormência é um problema a ser enfrentado para a seleção de possíveis plantas transformadas, realizamos experimentos com o objetivo de averiguar a influência da temperatura de crescimento da planta mãe em relação a dormência de *S. viridis*. Foi realizado um experimento no qual as plantas mãe foram germinadas em duas temperaturas diferentes (20 e 27°C), visando analisar a influência da temperatura da germinação das plantas mãe na pronta germinação da próxima geração de *S. viridis*.

5.2.3.1 20°C

Foram analisadas um total de 1000 sementes oriundas de plantas mãe crescidas em câmara de crescimento regulada para uma temperatura de 20°C. 500 sementes foram germinadas em meio de cultura obtendo uma taxa de germinação de 78,94% das sementes. Outras 500 sementes foram germinadas em papel filtro e neste caso a taxa de germinação foi de 45,2% mostrando assim um decréscimo na germinação de 33,74%.

5.2.3.2 27°C

Como anteriormente foi analisado um total de 1000 sementes oriundas de planta mãe crescidas em câmara de cultivo regulada a 27°C. 500 sementes foram germinadas em meio de cultura obtendo uma taxa de germinação de 65,46% das sementes. Outras 500 sementes foram germinadas em papel filtro e neste caso a taxa de germinação foi de 47,05%, mostrando assim um decréscimo na germinação de 18,41%.

5.3 Modificação de enfoque sobre a questão principal

Devido ao fato de termos encontrado dificuldades em transformar a espécie *S. viridis*, optamos por não clonar os genes referentes às proteínas PIN's mais expressas nos períodos iniciais do desenvolvimento radicular. Preferimos voltar esforços para desvendar as modulações sobre a escolha e desenvolvimento das raízes primárias e adventícias.

5.4 Análise da arquitetura radicular em função de fatores abióticos

Muitos fatores abióticos podem influenciar na arquitetura radicular, dentre eles podemos destacar a luz, além de condições nutricionais. Experimentos realizados anteriormente por nosso grupo apontaram que a luminosidade também poderia influenciar na escolha entre raízes primárias e adventícias na espécie *S. viridis*. Outro fator que foi analisado para entender a possibilidade de que algum fator distribuído diferencialmente na espiguiha foi o posicionamento das sementes no eixo apico-basal da espiguiha. Neste experimento foram utilizadas sementes provenientes de plantas mãe expostas a temperaturas mais amenas (20°C), com a intenção de entender diferenciais de herança materna no estabelecimento da arquitetura radicular. Analisamos também a possibilidade de que carências nutricionais de alguns dos principais macronutrientes influenciasse na arquitetura radicular nos primeiros momentos de estabelecimento da arquitetura radicular. Por último foram analisadas as arquiteturas radiculares de plântulas de *S. viridis*

expostas a concentrações adequadas de alguns dos principais hormônios vegetais, para monitorar se a presença destes reguladores vegetais influenciasse na escolha dos tipos radiculares emitidos nos primeiros momentos pós-germinação.

5.4.1 Análise da arquitetura radicular em função de diferentes condições de luminosidade

Realizamos 2 experimentos utilizando diferentes condições de luz. Dividimos o primeiro experimento em 3 condições analisando 78 plântulas no total, durante os 18 dias após a germinação. Condição 1 - definida como escuro completo: 26 plântulas foram germinadas e permaneceram na condição de escuro completo por 7 dias. Após isto as plantas foram crescidas em condições de claro com fotoperíodo 16h luz/8h escuro, e as medições do tamanho das raízes foram realizadas durante o dia. Condição 2 - definida como escuro parcial: 28 plântulas foram germinadas no escuro, mas desde o primeiro dia após a germinação as medições do sistema radicular foram realizadas em condições de luz, voltando às plântulas seguidamente à condição de escuro até o 7º dia. Após o 7º dia as plântulas foram crescidas em fotoperíodo 16h luz/8h escuro, e as medições do tamanho das raízes foram realizadas durante o dia. Condição 3 – definida como claro: 24 plântulas foram germinadas e crescidas em condições de fotoperíodo 16h luz/8h escuro durante todo o período de análise, realizando as medições das raízes durante o dia. Todas as plântulas foram analisadas quanto à presença da raiz primária, e raiz adventícia, e todos os tipos radiculares foram medidos diariamente. Realizamos também um segundo experimento com um número maior de plântulas (440 plântulas), 220 plântulas no qual utilizamos a condição idêntica à Condição 1 do primeiro experimento - definida como escuro completo, mas que passaram por um período de escuro maior, de 12 dias, para verificar se um período de escuro mais prolongado pudesse aumentar a incidência de um grupo observado específico. Outras 220 plântulas foram germinadas em condições idênticas à Condição 3 do primeiro experimento – definida como claro. A partir dos dados extraídos das plântulas pudemos classificar 4 grupos de plântulas com comportamentos diferentes (Tabela 4).

Tabela 4: Classificação do tipo radicular presente em *S. viridis* e a relação entre os tipos de raízes.

Classificação dos grupos	Tipos de raízes presentes	Relação de crescimento entre as raízes
G1	Não germinou	-
G2	Somente raiz primária	-
G3.1	Raiz primária e adventícia	Raiz primária parou de crescer após o surgimento da raiz adventícia
G3.2	Raiz primária e adventícia	Raiz primária continuou crescendo após o surgimento da raiz adventícia

5.4.1.1 Primeiro experimento - Escuro completo

Foi possível notar que das plântulas que permaneceram no escuro 54% (14 plântulas) apresentaram somente raiz primária (G2), 35% (9 plântulas) apresentaram tanto raiz primária quanto secundária, e que a raiz primária parava de crescer quando a raiz adventícia surgiu, e 12% (3 plântulas) (G3.1), que é o grupo das plântulas que apresentavam tanto raiz primária e adventícia, e em que a raiz primária continuava a crescer mesmo depois do surgimento da raiz adventícia (G3.2) (Figura 16).

Figura 15: A – grupo das sementes que não germinaram (G1); B – grupos das plântulas que apresentaram raízes primárias (G2); C – grupo das plântulas que apresentaram raízes primárias que pararam de crescer após o surgimento da raiz adventícia (G3.1); D – grupo das plântulas que apresentaram raízes primárias que continuou crescendo após o surgimento da raiz adventícia (G3.2) na condição de escuro.

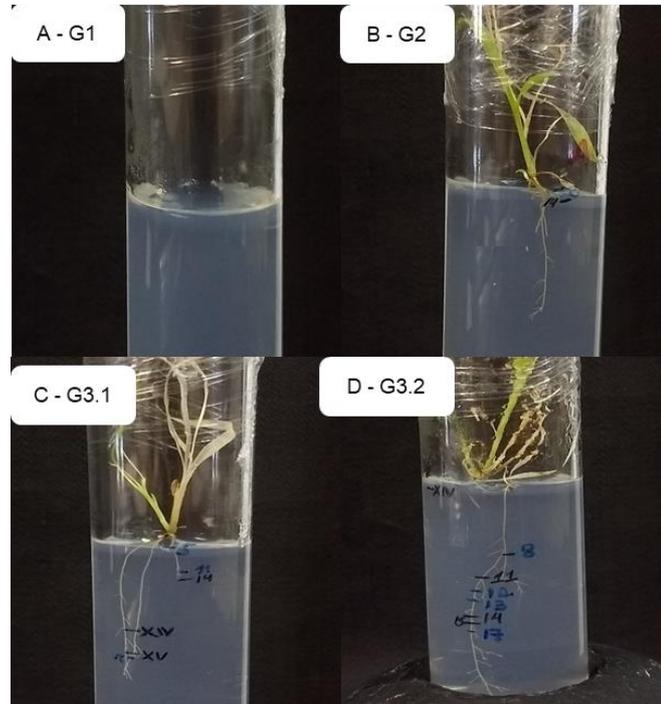


Figura 16: Distribuição geral da classificação dos tipos radiculares em *S. viridis* na condição de escuro.



5.4.1.2 Primeiro experimento - Escuro parcial

Foi possível notar que das plântulas que permaneceram no escuro parcial 71% (20 plântulas) apresentaram somente raiz primária (G2), 25% (7 plântulas) apresentaram tanto raiz primária quanto secundária, mas em que a raiz primária parava de crescer quando a raiz adventícia surgiu (G3.1), e 4% (1 plântula) que é o grupo das plântulas que apresentavam tanto raiz primária e adventícia, e em que a raiz primária continuava a crescer mesmo depois do surgimento da raiz adventícia (G3.2) (Figura 18).

Figura 17: A – grupo das plântulas que não germinaram (G1); B – grupos das plântulas que apresentaram raízes primárias (G2); C – grupo das plântulas que apresentaram raízes primárias que pararam de crescer após o surgimento da raiz adventícia (G3.1); D – grupo das plântulas que apresentaram raízes primárias que continuou crescendo após o surgimento da raiz adventícia (G3.2) na condição de escuro parcial.

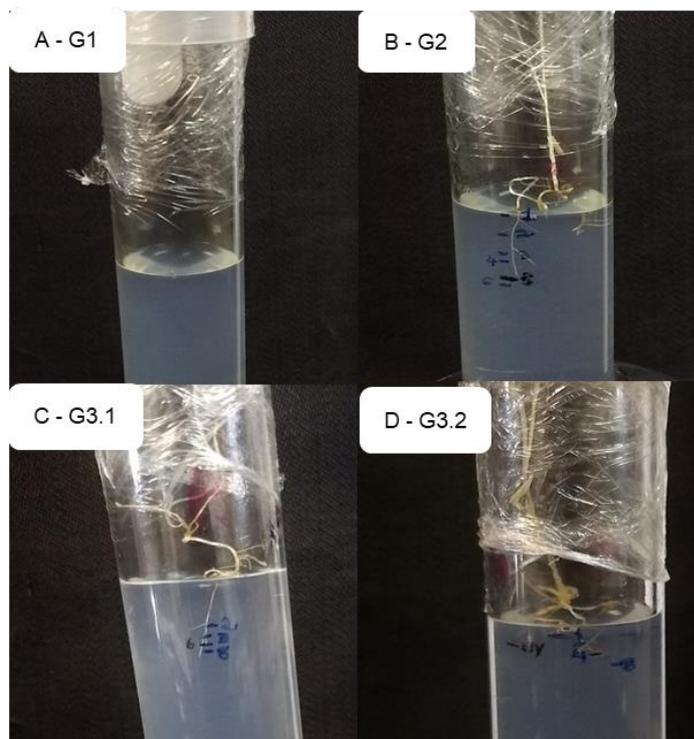
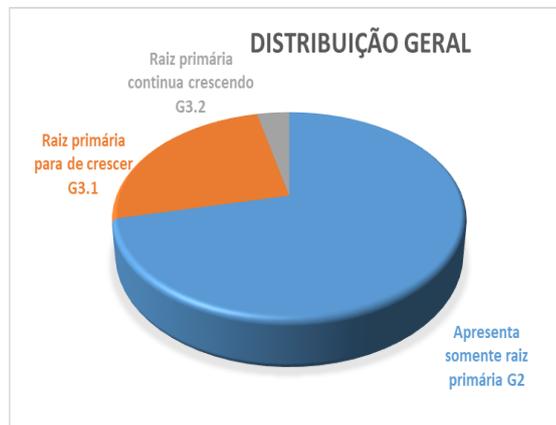


Figura 18: Distribuição geral da classificação dos tipos radiculares em *S. viridis* na condição de escuro parcial.



5.4.1.3 Primeiro experimento – Claro

Foi possível notar que das sementes que receberam luminosidade constante 88% (21 plântulas) apresentaram somente raiz primária (G2), 8% (2 plântulas) apresentaram tanto raiz primária quanto secundária, mas em que a raiz primária parava de crescer quando a raiz adventícia surgiu (G3.1), e 4% (1 plântula) que é o grupo das plântulas que apresentavam tanto raiz primária e adventícia, e em que a raiz primária continuava a crescer mesmo depois do surgimento da raiz adventícia (G3.2) (Figura 20).

Figura 19: A – grupo das plântulas que não germinaram (G1); B – grupos das plântulas que apresentaram raízes primárias (G2); C – grupo das plântulas que apresentaram raízes primárias que pararam de crescer após o surgimento da raiz adventícia (G3.1); D – grupo das plântulas que apresentaram raízes primárias que continuou crescendo após o surgimento da raiz adventícia (G3.2) na condição de claro.

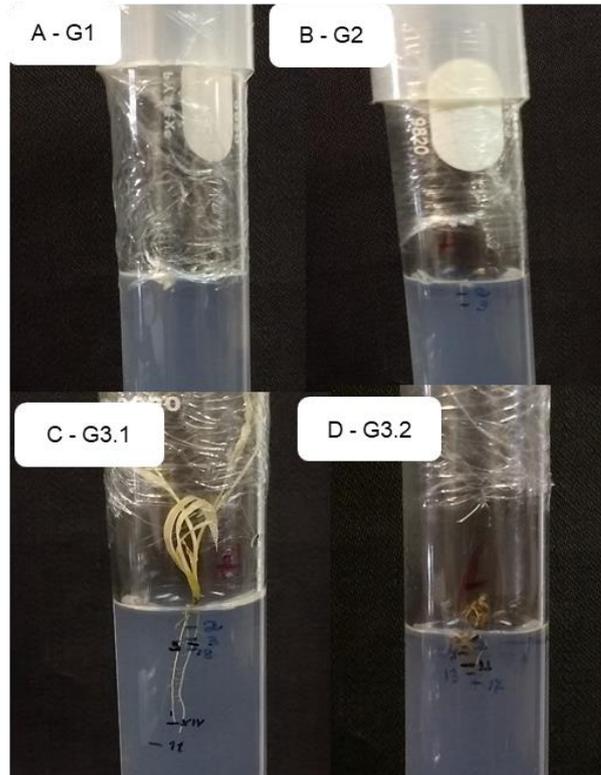


Figura 20: Distribuição geral da classificação dos tipos radiculares em *S. viridis* na condição de claro.



Portanto foi possível notar que nas condições tanto de presença quanto de carência de luz, a presença somente da raiz primária representou a grande maioria das plantas analisadas.

Dentre as sementes que permaneceram no escuro a taxa de germinação foi de 44%, já as sementes que receberam luz no momento das medições, ou seja, sob condição de escuro parcial, foi possível obter uma taxa de germinação de 50%, e as sementes que receberam luminosidade constante apresentou uma taxa de germinação de 41%. Portanto a luz exerceu influência na taxa de germinação, apesar da taxa de germinação ainda continuar sendo baixa. Foi possível notar também que as plântulas deixadas na condição de escuro completo tiveram um maior desenvolvimento das raízes adventícias quando comparadas as plântulas que receberam luz.

O resultado do teste t com $p > 0,05$ revelou que a média das raízes primárias dos grupos G2 e G3.1 das plântulas que cresceram na presença e na ausência de luz não possui diferença estatística significativa, já a médias das raízes primárias do grupo G3.2 das plântulas que cresceram na presença e na ausência de luz apresentaram diferença estatística significativa.

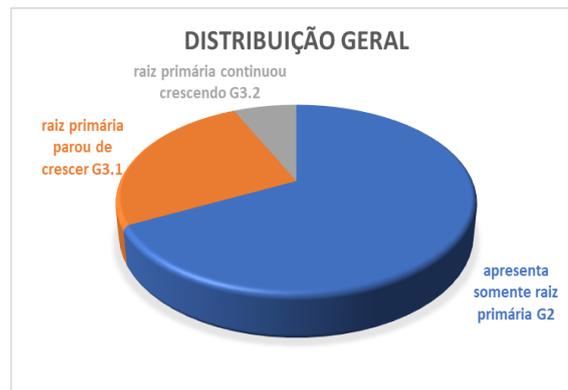
5.4.1.4 Segundo experimento – Escuro

Visto que no primeiro experimento utilizamos um paquímetro para fazer as medições, um sistema com grande margem de erro, optamos por realizar um segundo experimento com maior número de plantas para dar maior robustez estatística as nossas análises. Utilizando 440 sementes, 220 sementes foram crescidas de forma parecida a Condição 1 aumentando o período de escuro completo por 12 dias e 220 sementes foram crescidas de forma idêntica à Condição 3. Devido ao fato de que a condição de escuro parcial poderia afetar a escotomorfogênese através da exposição à luz para as medições, e que apresentou dados em relação à escolha de um tipo radicular intermédio entre a condição de escuro completo e claro, optamos por retirá-la no experimento seguinte.

Das plântulas que ficaram na Condição 1, 68% (79 plântulas) apresentaram somente raiz primária (G2) 26% (30 plântulas) apresentaram raízes primárias e

adventícias, porém a raiz primária parou de crescer após o surgimento da raiz adventícia (G3.1), 7% (8 plântulas) apresentaram raízes primárias e adventícias, porém a raiz primária continuou crescendo após o surgimento da raiz adventícia (G3.2) (Figura 21).

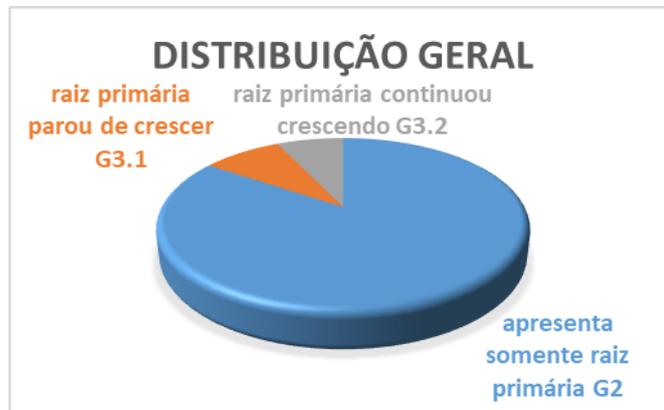
Figura 21: Distribuição geral da classificação dos tipos radiculares em *S. viridis* na condição de escuro.



5.4.1.5 Segundo experimento – Claro

Através deste experimento foi possível notar que a maioria das plântulas 85% (60 plântulas) apresentaram somente raiz primária (G2), 8% (6 plântulas) apresentaram tanto raízes primárias quanto raízes adventícias, porém as raízes primárias pararam de crescer quando a raiz adventícia surgiu (G3.1) e 7% (5 plântulas) apresentaram tanto raiz primária quanto raiz adventícia, porém a raiz primária continuou crescendo após o surgimento da raiz adventícia (G3.2) (Figura 22).

Figura 22: Distribuição geral da classificação dos tipos radiculares em *S. viridis* na condição de claro.



Foi possível notar uma taxa de germinação de 30% nas plântulas que receberam luminosidade constante e 50% para as plântulas que permaneceram no escuro. Foi possível constatar que o crescimento das raízes primárias das plântulas deixadas no escuro, analisando o parâmetro tamanho radicular, foi bem menor do que aquelas que receberam luz. As raízes adventícias das plântulas que foram deixadas na ausência de luz são menores, porém se desenvolveram em maior número quando comparadas com as raízes adventícias das plântulas que receberam luz. As plântulas que ficaram na ausência de luz também apresentaram estiolamento, devido ao tempo na ausência de luz e isso pode ter, potencialmente, prejudicado o crescimento das plântulas. Além disso, as raízes adventícias das plântulas deixadas no escuro se desenvolveram entrelaçadas entre si, dificultando o processo de medição. O período de 12 dias na ausência de luz foi prejudicial as plântulas, acarretando alto índice de mortalidade entre as mesmas.

O resultado do teste t com $p > 0,05$ revelou que a média das raízes primárias do grupo G2 das plântulas que cresceram na presença e na ausência de luz não possui diferença estatística significativa, já a médias das raízes primárias dos grupos G3.1 e G3.2 das plântulas que cresceram na presença e na ausência de luz apresentaram diferença estatística significativa. Já analisando a média das raízes adventícias dos grupos G3.2 e G3.1 das plântulas que cresceram na presença e na ausência de luz não possui diferença estatística significativa.

5.4.2 Experimento de divisão da espiguiha em setores com diferentes estágios de maturação

No decorrer da realização de experimentos de propagação de plantas em nossas câmaras de crescimento foi possível notar que a floração e a maturação das sementes numa mesma espiguiha apresentavam estágios de desenvolvimento diferente em função do posicionamento da flor na espiguiha. As flores da porção medial da espiguiha são consistentemente as primeiras a entrar em antese, seguidas das flores da porção apical e por fim das flores da porção basal. A partir desta observação nos questionamos se o posicionamento da flor e da futura semente na espiguiha poderia exercer algum tipo de influência sobre a escolha do tipo de arquitetura radicular emitido pela semente. A fim de analisar se a diferença na maturação afetava a escolha e o desenvolvimento do sistema radicular realizamos um experimento piloto separando as sementes provenientes da parte apical, medial e basal, ou seja, de diferentes setores da espiguiha da planta mãe. Cabe ressaltar que as plantas mãe analisadas neste experimento foram crescidas a temperaturas de 21°C, por motivos logísticos derivantes de outros experimentos que estavam sendo realizados paralelamente. Os experimentos foram realizados em duas condições: Condição de escuro completo idêntica a Condição 1 dos experimentos anteriores com um período de escuro de somente 4 dias, sem receber iluminação e recebendo luz nos dias posteriores; Condição de claro, idêntica a Condição 3 dos experimentos anteriores.

5.4.2.1 Porção apical – Claro

Foi possível notar que das plântulas que cresceram sob luminosidade constante, 78% (14 plântulas) apresentaram somente raiz primária (G2), 11% (2 plântulas) apresentaram tanto raiz primária quanto adventícia, e que a raiz primária parava de crescer quando a raiz adventícia surgiu (G3.1), e 2% (11 plântulas) apresentavam tanto raiz primária quanto adventícia, mas que a raiz primária continuava a crescer mesmo depois do surgimento da raiz adventícia (G3.2) (Figura 23).

Figura 23: Distribuição geral da classificação dos tipos radiculares oriundas da porção apical de *S. viridis*.



5.4.2.2 Porção medial – Claro

Foi possível notar que das plântulas crescidas sob luminosidade constante, 53% (8 plântulas) apresentaram somente raiz primária (G2), 27% (4 plântulas) apresentaram tanto raiz primária quanto secundária, e que a raiz primária parava de crescer quando a raiz adventícia surgiu (G3.1), e 20% (3 plântulas) apresentavam tanto raiz primária quanto raiz adventícia e que raiz primária continuava a crescer mesmo depois do surgimento da raiz adventícia (G3.2) (Figura 24).

Figura 24: Distribuição geral da classificação dos tipos radiculares oriundas da porção medial de *S. viridis*.



5.4.2.3 Porção basal – Claro

Foi possível notar que das plântulas que cresceram sob luminosidade constante, 63% (5 plântulas) apresentaram somente raiz primária (G2), e 38% (3 plântulas) apresentavam tanto raiz primária quanto adventícia e que a raiz primária continuava a crescer mesmo depois do surgimento da raiz adventícia (G3.2) (Figura 25).

Figura 25: Distribuição geral da classificação dos tipos radiculares oriundas da porção basal de *S. viridis*.



5.4.2.4 Porção apical – Escuro

Foi possível notar que das plântulas que permaneceram sem luminosidade durante 4 dias, 27% (4 plântulas) apresentaram somente raiz primária (G2), 40% (6 plântulas) apresentaram tanto raiz primária quanto secundária, e que a raiz primária parava de crescer quando a raiz adventícia surgiu (G3.1) e 33% (5 plântulas) apresentavam tanto raiz primária quanto raiz adventícia, e que a raiz primária continuava a crescer mesmo depois do surgimento da raiz (G3.2) (Figura 26).

Figura 26: Distribuição geral da classificação dos tipos radiculares oriundas da porção apical de *S. viridis*.



5.4.2.5 Porção medial – Escuro

Foi possível notar que das plântulas que permaneceram sem luminosidade durante 4 dias, 18% (7 plântulas) apresentaram somente raiz primária (G2), 38% (4 plântulas) apresentaram tanto raiz primária quanto secundária, e que a raiz primária parava de crescer quando a raiz adventícia surgiu (G3.1) e 45% (5 plântulas) apresentavam tanto raiz primária quanto adventícia, e que a raiz primária continuava a crescer mesmo depois do surgimento da raiz adventícia (G3.2) (Figura 27).

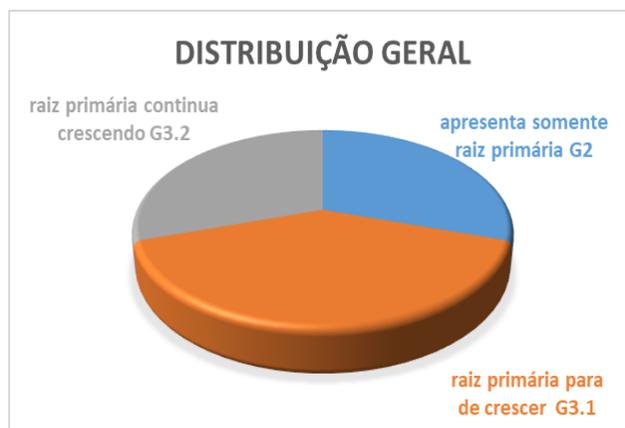
Figura 27: Distribuição geral da classificação dos tipos radiculares oriundas da porção medial de *S. viridis*.



5.4.2.6 Porção basal – Escuro

Foi possível notar que das plântulas que permaneceram sem luminosidade durante 4 dias, 30% (3 plântulas) apresentaram somente raiz primária (G2), 40% (4 plântulas) apresentaram tanto raiz primária quanto secundária, e que a raiz primária parava de crescer quanto a raiz adventícia surgiu (G3.1) e 30% (3 plântulas) apresentavam tanto raiz primária quanto raiz adventícia, que a raiz primária continuava a crescer mesmo depois do surgimento da raiz adventícia (G3.2) (Figura 28).

Figura 28: Distribuição geral da classificação dos tipos radiculares oriundas da porção basal de *S. viridis*.



Neste experimento a taxa de germinação foi de 31% nas sementes oriundas das partes basais da espiguiha, 47% nas sementes oriundas das partes mediais e 46% nas sementes oriundas das partes apicais da espiguiha.

A porção apical apresentou plântulas com raízes primárias nos grupos G2, G3.1 e G3.2 que foram deixadas na ausência de luz foram menores do que as que receberam luz. Quando comparamos as raízes adventícias das plântulas dos grupos G3.1 e G3.2 deixadas no escuro foram maiores do que as que receberam luz.

O resultado do teste t com $p > 0,05$ revelou que a média das raízes primárias do grupo G2 das plântulas que cresceram na presença e na ausência de luz possui diferença estatística significativa. As médias das raízes primárias dos grupos G3.1 e G3.2 das plântulas que cresceram na presença e na ausência de luz apresentaram diferença estatística significativa também. A média das raízes adventícias do grupo G3.1 das plântulas que cresceram na presença e na ausência de luz não possui diferença estatística significativa, e a média das raízes adventícias do grupo G3.2 das plântulas que cresceram na presença e na ausência de luz possui diferença estatística significativa.

5.4.3 Acompanhamento do desenvolvimento das raízes em condição de carência nutricional para nitrato e fosfato

Alguns compostos tais como fosfato e nitrato são essenciais para o desenvolvimento vegetal. Com o objetivo de analisar a influência desses nutrientes na escolha do tipo de arquitetura radicular em *S. viridis* foi realizado um experimento germinando as plântulas em meio completo (+ P, +N), como descrito por Bates e Lynch (1996), usando uma mistura de nutrientes (JOHNSON et al., 1957). Portanto realizamos um experimento de acompanhamento do desenvolvimento radicular de *S. viridis* utilizando o meio Johnson completo, outro em que foi utilizado o mesmo meio Johnson retirando nitrogênio, outro retirando fósforo e um controle negativo, sendo composto de água, phytigel e cloreto de cálcio. Para tal experimento foram analisadas 56 plântulas. As condições de crescimento utilizadas foram de fotoperíodo 16h luz/8h escuro.

5.4.3.1 Meio Johnson completo

Dentre as 12 plântulas que foram germinadas e se desenvolveram no meio Johnson completo, 58% (7 plântulas) apresentaram somente raiz primária (G2), 42% (5 plântulas) apresentaram tanto raiz primária quanto raiz adventícia, porém a raiz primária continuou crescendo após o surgimento da raiz adventícia (G3.2) (Figura 30).

Figura 29: A – Sementes de *S. viridis* do grupo G1; B - plantas do grupo G2; C - plantas do grupo G3.2, germinadas em meio Johnson completo.



Figura 30: Distribuição geral da classificação dos tipos radiculares de *S. viridis* germinadas em meio Johnson completo.



5.4.3.2 Meio Johnson menos N

Dentre as 15 sementes que foram germinadas e se desenvolveram no meio Johnson sem nitrogênio, 40% (6 plântulas) apresentaram somente raiz primária (G2), 13% (2 plântulas) apresentaram tanto raízes primárias quanto adventícias,

porém a raiz primária parou de crescer após o surgimento da raiz adventícia (G3.1) e 47% (7 plântulas) após seu desenvolvimento apresentaram tanto raiz primária quanto raiz adventícia, porém a raiz primária continuou crescendo após o surgimento da raiz adventícia (G3.2) (Figura 32).

Figura 31: A – Sementes de *S. viridis* do grupo G1; B - sementes do grupo G2; C - sementes do grupo G3.1; D - sementes do grupo G3.2, germinadas em meio Johnson menos N.

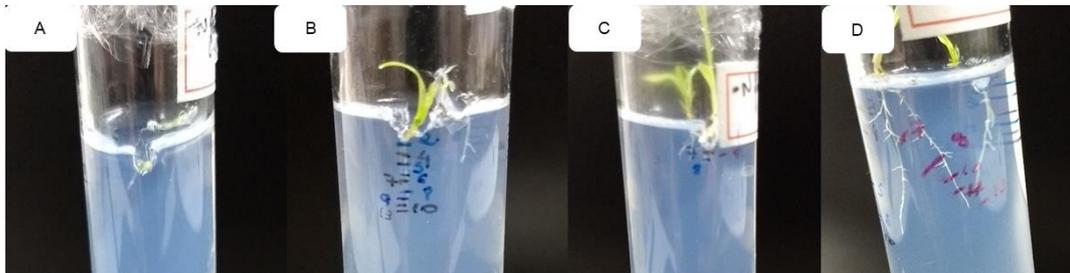


Figura 32: Distribuição geral da classificação dos tipos radiculares de *S. viridis* germinadas em meio Johnson menos N.



5.4.3.3 Meio Johnson menos P

Dentre as 14 sementes que foram germinadas e se desenvolveram no meio Johnson sem nitrogênio, 57% (8 plântulas) apresentaram somente raiz primária (G2), 43% (6 plântulas) apresentaram tanto raiz primária quanto raiz adventícia, porém a raiz primária continuou crescendo após o surgimento da raiz adventícia (G3.2) (Figura 34).

Figura 33: A – Sementes de *S. viridis* do grupo G1; B - plantas do grupo G2; C - plantas do grupo G3.2, germinadas em meio Johnson menos P.

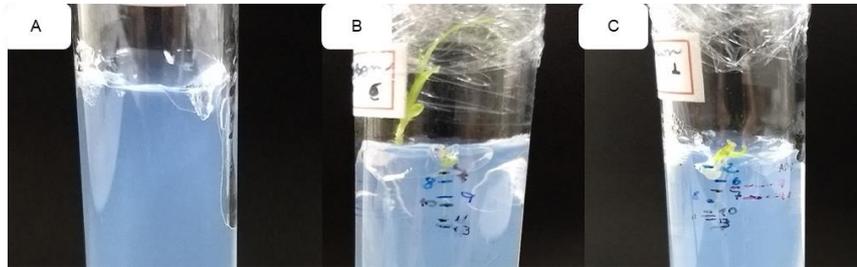


Figura 34: Distribuição geral da classificação dos tipos radiculares de *S. viridis* germinadas em meio Johnson menos P.



5.4.3.4 Água, phytigel e cloreto de cálcio

Dentre as 15 sementes que foram germinadas e se desenvolveram em água, phytigel e cloreto de cálcio, 60% (9 plântulas) apresentaram somente raiz primária (G2), 20% (3 plântulas) apresentaram tanto raízes primárias quanto adventícias, porém a raiz primária parou de crescer após o surgimento da raiz adventícia (G3.1), 20% (3 plântulas) apresentaram tanto raiz primária quando raiz adventícia, porém a raiz primária continuou crescendo após o surgimento da raiz adventícia (G3.2) (Figura 36).

Figura 35: A – Sementes de *S. viridis* do grupo G1; B - sementes do grupo G2; C - sementes do grupo G3.1; D - sementes do grupo G3.2, germinadas em água, phytigel e cloreto de cálcio.

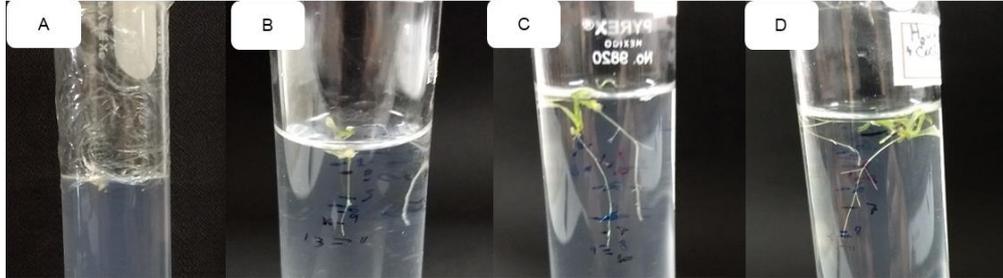


Figura 36: Distribuição geral da classificação dos tipos radiculares de *S. viridis* germinadas em água, phytigel e cloreto de cálcio.



Em relação a taxa de germinação foi possível notar que no meio Johnson completo obtivemos 63,15%, no meio Johnson menos nitrogênio a taxa de germinação foi de 75%, no meio Johnson menos fósforo a taxa de germinação foi de 66,67%, e utilizando água, phytigel e cloreto de cálcio a taxa de germinação foi de 88%.

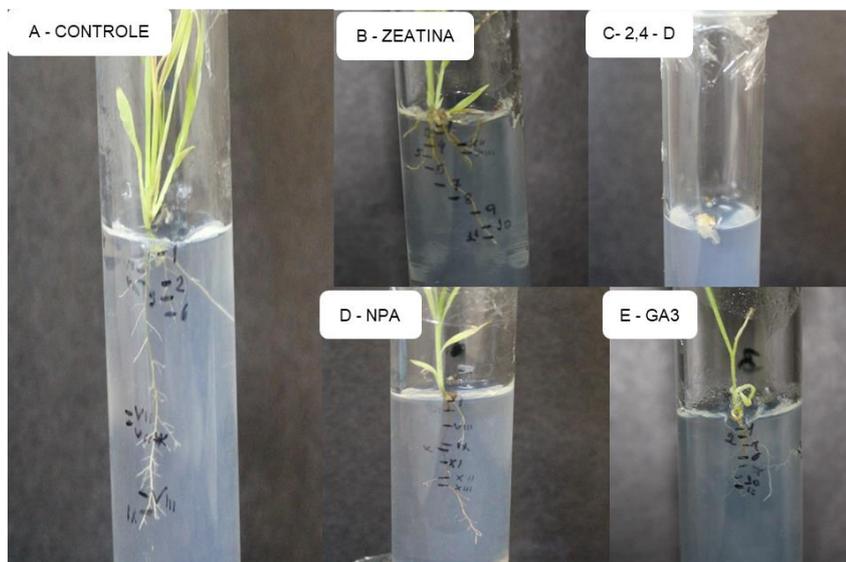
O resultado do teste t com $p > 0,05$ revelou que a média das raízes primárias do grupo G2 das plântulas que cresceram em meio Johnson completo e as plântulas que cresceram em carência de nitrogênio, fósforo e água, phytigel e cloreto de cálcio apresentaram diferença estatística significativa. Tanto a média das raízes primárias quanto a média das raízes adventícias do grupo G3.1 das plântulas que

criaram em carência de nitrogênio e crescidas em água, phytigel e cloreto de cálcio não apresentaram diferença estatística significativa. Tanto a média das raízes primárias quanto a média das raízes adventícias dos grupos G3.2 das plântulas que cresceram em meio Johnson completo e na carência de nutrientes, incluindo assim, água phytigel e cloreto de cálcio possui diferença estatística significativa.

5.4.4 Acompanhamento do desenvolvimento da arquitetura radicular utilizando alguns hormônios vegetais

Foi realizando um experimento utilizando hormônios vegetais, a fim de observar a influência dos mesmos na escolha e no desenvolvimento do sistema radicular. Foi caracterizada a presença da raiz primária, e quando presente a raiz adventícia, e a relação entre elas como acima citado (Figura 37).

Figura 37: A – Plântulas de *S. viridis* germinadas em meio MS ½; B - plântulas germinadas em meio MS ½ contendo 0,1µM de zeatina; C - plântulas germinadas em meio MS ½ contendo 1µM de 2,4-D (ácido diclorofenoxiacético); D - plântulas germinadas em meio MS ½ contendo 10µM de NPA (ácido 1-N-naftilftalâmico) e E - plântulas germinadas em meio MS ½ contendo 10µM de GA3 (ácido giberélico).



5.4.4.1 Controle

As plântulas que se desenvolveram em meio MS $\frac{1}{2}$ sem suplementação de nenhum dos reguladores vegetais, 57% (13 plântulas) apresentaram somente raiz primária (G2), 17% (4 plântulas) apresentam raiz primária que parou de crescer após o surgimento da raiz adventícia (G3.1) e 26% (6 plântulas) apresentam raiz primária que continua crescendo após o aparecimento da raiz adventícia (G3.2) (Figura 38).

Figura 38: Distribuição geral da classificação dos tipos radiculares de *S. viridis* germinadas em meio MS $\frac{1}{2}$.

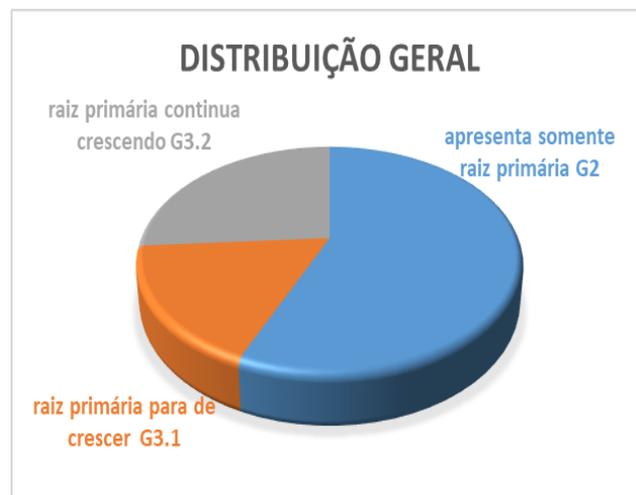
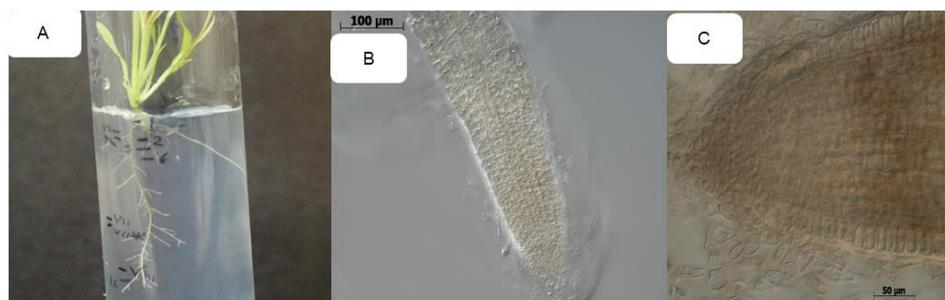


Figura 39: A - Plântulas de *S. viridis* germinadas em meio MS $\frac{1}{2}$; B – Raiz primária de *S. viridis*; C – Raiz adventícia de *S. viridis*.



5.4.4.2 2,4 – D

Nas plântulas que se desenvolveram em meio MS $\frac{1}{2}$ suplementado com 2,4 - D não foi possível realizar as medições, pois se formou uma massa de tecido não diferenciado, sem a formação de tecidos organizados (Figura 37).

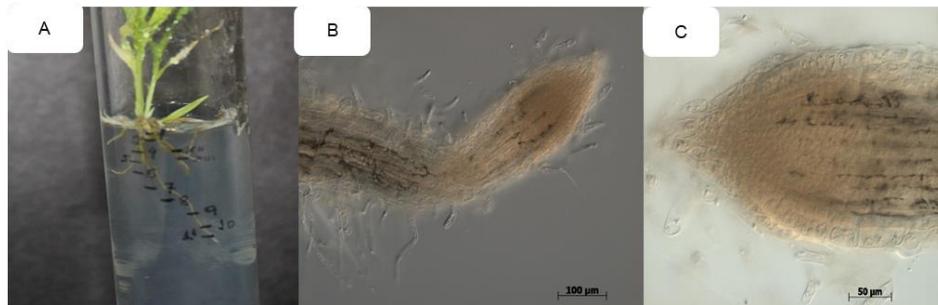
5.4.4.3 Zeatina

As plântulas que se desenvolveram em meio MS $\frac{1}{2}$ suplementado com zeatina em sua grande maioria 89% (17 plântulas) apresentaram somente raiz primária (G2), já os outros 10% estão divididos de forma igual (5% - 1 plântula) que apresentou raiz primária que parou de crescer após o surgimento da raiz adventícia (G3.1); e plântula que apresentam raiz primária que continua crescendo após o aparecimento da raiz adventícia (G3.2) (Figura 40).

Figura 40: Distribuição geral da classificação dos tipos radiculares de *S. viridis* germinadas em meio MS $\frac{1}{2}$ suplementado com zeatina.



Figura 41: A - Plântulas de *S. viridis* germinadas em meio MS ½ suplementado com zeatina; B – Raiz primária de *S. viridis*; C – Raiz adventícia de *S. viridis*.



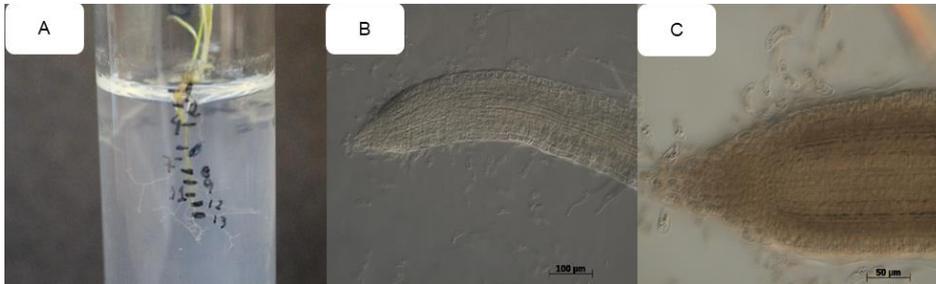
5.4.4.4 GA₃

As plântulas que se desenvolveram em meio MS ½ suplementado com GA₃ em sua grande maioria 55% (11 plântulas) apresentaram somente raiz primária (G2), 25% (5 plântulas) apresentam raiz primária que parou de crescer após o surgimento da raiz adventícia (G3.1) e 20% (4 plântulas) apresentam raiz primária que continuou crescendo após o aparecimento da raiz adventícia (G3.2) (Figura 42).

Figura 42: Distribuição geral da classificação dos tipos radiculares de *S. viridis* germinadas em meio MS ½ suplementado com GA₃.



Figura 43: A - Plântulas de *S. viridis* germinadas em meio MS ½ suplementado com GA₃; B – Raiz primária de *S. viridis*; C – Raiz adventícia de *S. viridis*.



5.4.4.5 NPA

As plântulas que se desenvolveram em meio MS ½ suplementado com NPA 80% (16 plântulas) apresentaram somente raiz primária (G2), 20% (4 plântulas) apresentam raiz primária que parou de crescer após o surgimento da raiz adventícia (G3.1) (Figura 44).

Figura 44: Distribuição geral da classificação dos tipos radiculares de *S. viridis* germinadas em meio MS ½ suplementado com NPA.



Figura 45: A - Plântulas de *S. viridis* germinadas em meio MS $\frac{1}{2}$ suplementado com NPA; B – Raiz primária de *S. viridis*; C – Raiz adventícia de *S. viridis*.



6. DISCUSSÃO

Estudos preliminares realizados em um laboratório parceiro envolvendo germinação de *S. viridis* e posterior análise de microscopia, em um pequeno número de plantas, visando analisar os estágios iniciais da germinação mostravam a presença do coleóptilo e da raiz principal (também chamada de radícula) que possuem a função de romper o tegumento da semente. De forma totalmente diferente daquilo que acontece com as raízes embrionárias de dicotiledôneas como *A. thaliana*, alguns dias após a germinação a raiz principal apresentava um processo que se assemelhava com a senescência, já que apresentava alteração de coloração, passando de uma coloração em tons de verde para tons de marrom. Conversas preliminares com outros grupos de pesquisa que também trabalhavam com *S. viridis* apontavam à provável existência de um mecanismo de desenvolvimento do meristema radicular no qual havia uma senescência da raiz primária favorecendo assim o desenvolvimento das raízes adventícias. O possível mecanismo de senescência da raiz embrionária foi melhor estudado por Mayra C.A. Costa (2018), demonstrando não a senescência da raiz, mas sim um mecanismo de escolha diferencial de arquitetura radicular. Essa dissertação demonstrou que plantas, derivantes da mesma planta mãe apresentavam em alguns casos somente a raiz embrionária, em outros casos a senescência da raiz principal conjuntamente com o desenvolvimento de raízes adventícias, em outros casos com ambas as raízes crescendo conjuntamente. O equívoco relativo a hipótese inicial sobre a senescência da raiz embrionária pode ser interpretada como uma análise de microscopia feita sobre um número muito limitado de plantas, analisadas em condições luminosas diferentes das nossas, mas que não representa a variedade de fenótipos radiculares que podem ser observados em maior escala. De todas as formas a hipótese inicial do presente estudo, que formula que a raiz embrionária apresenta um mecanismo de senescência, sabe-se hoje que é válida somente para uma fração de plantas de *S. viridis*, mas não para todas, e que existe uma estratégia de variação da arquitetura radicular ainda não explorado. Este fato aumenta ainda mais o interesse na compreensão do comportamento dos transportadores polares da auxina na espécie *S. viridis*, envolvidos no estabelecimento do meristema radicular.

6.1 Análise dos SvPIN's mais expressas nos estágios iniciais do desenvolvimento radicular

Realizamos estudos envolvendo a filogenia da família das proteínas PIN's, com o objetivo de transformar as plantas com os genes dos transportadores polares de auxina expressos durante o estabelecimento do sistema radicular, fusionados ao gene repórter GFP. Estudos anteriores envolvendo a filogenia da família das proteínas PIN's em milho apontaram que a filogenia da família das proteínas PIN's apresentam 4 clados distintos, tal estudo envolveu espécies diferentes de membros da família das Poaceae, entretanto tal estudo não incluiu a espécie *S. viridis*. Os resultados obtidos por O'Connor et al. (2014) relatam que em membros da família das Brassicaceae, como *A. thaliana*, o clado dos genes SoPIN's, (Sister - of - PIN) está ausente. Estudos envolvendo monocotiledôneas, como *Brachypodium* e milho, denotam que tal clado guarda uma íntima relação com membros do clado PIN 1A e PIN 1B em espécies de monocotiledôneas, porém estudos de expressão revelam uma distinção nos padrões de expressão desses genes. Tais diferenças sugerem que o gene SoPIN possui funções relacionadas à formação de picos máximos de auxina; já os genes PIN 1A e PIN 1B possivelmente possuam funções relacionadas à padronização dos feixes vasculares, e, portanto, mais aos processos de canalização da auxina. Em monocotiledôneas da família Poaceae, PIN1 apresenta uma duplicação em PIN 1A e PIN 1B, denotando que ocorreu uma duplicação anterior ao ancestral comum das Poaceae; essa duplicação entre PIN 1A e PIN 1B não está presente em Brassicaceae, o que indica que a duplicação aconteceu depois da separação entre dicotiledôneas e monocotiledôneas. Os resultados de filogenia feitos em nosso estudo, e que incluem a família das proteínas PIN's na espécie *S. viridis* corroboram aos resultados descritos anteriormente que dividem a família dos genes PIN's nos mesmos clados, denotando uma conservação de distribuição entre os membros da família Poaceae (O'CONNOR et al., 2014) (Figura 3).

As análises de expressão gênica dos genes PINs de *S. viridis* por PCR semi-quantitativa extraídos de diferentes tecidos vegetais, apontaram que nos momentos iniciais do desenvolvimento radicular os genes PIN 3,4,7 1 e PIN 3,4,7 2, são os mais expressos. O gene PIN 1B também apresentou expressão, mas com níveis mais baixos, possivelmente devido a um fator de diluição da expressão deste no

ápice radicular, posto que este gene está putativamente implicado nos processos de canalização da auxina para a formação de tecido vascular. Mesmo assim, devido ao fato que a canalização da auxina pode exercer um papel mesmo que marginal na formação de novos picos de auxina, necessários para o estabelecimento de novos meristemas radiculares, decidimos clonar PIN 1B, além dos mais expressos PIN 3,4,7 1 e PIN 3,4,7 2 a partir de DNA genômico. O processo de clonagem de uma região promotora de aprox. 3kb, junto ao gene PIN resultava em amplicons com tamanhos maiores de 5kb, e não fomos capazes de amplificar este amplicon em um fragmento único. Portanto foi utilizada uma estratégia de amplificação dos promotores e genes em dois fragmentos separados, que depois seriam unidos por restrição enzimática e ligação. Os fragmentos parciais dos promotores e genes foram amplificados e extraídos com êxito, porém a clonagem não foi levada adiante pelo fato de não conseguirmos transformar plantas de *S. viridis*. Não teria sentido em termos econômicos e de trabalho de dissertação seguir adiante com a clonagem destas construções, fusionadas a GFP, sem ter um processo de transformação eficiente, factível e reproduzível em nossas mãos, assim que os amplicons dos fragmentos de clonagem foram guardados a -80°C na espera de termos capacidade de transformar *S. viridis*.

6.2 Transformação e seleção dos possíveis transformantes de *S. viridis* via “spike - dip”

A transformação genética via “spike - dip”, que foi proposta como método de transformação a ser utilizada nesse trabalho, tem como um dos princípios que a espiguiha da planta mãe seja posta em contato com a cepa super - virulenta AGL1 de *A. tumefaciens* durante a formação do tecido germinal materno. A transformação ocorre em tecido floral em desenvolvimento, quando ainda não protegido pelas etapas sucessivas de maturação das sementes (DESFEUX; CLOUGH; BENT, 2000), permitindo assim que as sementes obtidas ao final do processo de transformação e subsequente fecundação autógama, levassem às futuras gerações as novas características provenientes da inserção do material genético. O processo de transformação via “spike - dip” guarda muitas semelhanças com o processo de transformação via “floral - dip” que é muito utilizado para outras espécies modelo como *A. thaliana* (CLOUGH; BENT, 1988) e *Capsella bursa - pastoris*

(BARTHOLMES; NUT; THEIBEN, 2008); tal processo também é utilizado em monocotiledôneas com cana - de - açúcar (MAYAVAN et al., 2015). As metodologias de transformação através de “spike - dip” em *S. viridis* descritas na literatura são duas: Martins et al. (2015) trabalhou com o genótipo A10.1, com inflorescências em estágios iniciais, com cepas de *A. tumefaciens* da linhagem AGL1, com o vetor pANIC 6A e com o gene marcador para a seleção, a resistência ao antibiótico higromicina, enquanto Saha e Blunwald (2016) trabalharam com 3 genótipos de *S. viridis* diferentes, A10.1, 132, e 98HT - 80, com as inflorescências separadas em 5 estágios diferentes, com cepas diferentes de *A. tumefaciens* (AgL1, EHA105, GV3101, LBA4404), com diferentes vetores e com o gene marcador para a canamicina.

Optamos por utilizar a metodologia descrita por Saha e Brumwald, (2016) já que a metodologia descrita por Martins (2015) já havia sido testada Mayra C.A. Costa (2018) em sua dissertação de mestrado e não havia apresentado resultados positivos. Além de testar esta outra metodologia utilizamos somente as condições que apresentaram melhores resultados (cepa super - virulenta AGL1 e genótipo A10.1) realizando modificações menores em relação ao tempo de contato da espiguiha com *A. tumefaciens* transformada, já que tal modificação não havia sido testada. Porém no presente estudo o tempo de contato não demonstrou influência no sucesso da transformação já que não obtivemos resultados positivos com o processo de transformação em nenhuma condição. Portanto é decepcionante notar que dois protocolos publicados, e que relatam um método simples e eficiente para a transformação de *S. viridis*, não resultaram em plantas transformadas geneticamente. Este processo longo e trabalhoso, que tomou pouco mais que a metade do tempo da dissertação, se revelou em nossas mãos extremamente suscetíveis a parametrização de fatores não descritos na literatura. Uma revisão recente de Joyce Van Eck (2018), sobre o estado do processo de transformação em *S. viridis* tem trazido à tona alguns fatores cruciais, previamente não descritos, em relação a nossos resultados. Este estudo denota a importância da seleção dos vetores, incluindo a composição do cassete genético contendo um gene marcador, além do fato de que diferentes espécies de monocotiledôneas apresentam resultados diferentes em relação a transformação. Construções contendo o gene marcador para a higromicina (hpt), como gene de seleção, dirigidas pelos promotores pMDC e pANIC, utilizando promotores específicos de monocotiledôneas,

são relatados como sendo as construções que apresentaram as maiores eficiências de transformação em *S. viridis*. Apesar de utilizarmos as mesmas cepas e vetores de outros estudos que relataram sucesso no processo de transformação, nossos resultados apontam que a construção pSvPIN1B :: YFP, contendo higromicina, como gene marcador, não apresentou sucesso de transformação. O mesmo aconteceu utilizando a construção DR5 :: RFP, construção que obteve sucesso no processo de transformação de milho, contendo o gene marcador para o BASTA®. Outro fator crucial para a transformação de *S. viridis* descrito por Joyce Van Eck em sua revisão parece estar ligado a um controle estrito das condições ambientais das câmaras de crescimento em que são crescidas as plantas a serem transformadas e que pode levar a um drástico caimento da eficiência de transformação ou até a não obtenção de plantas transformadas. Creditamos a este último fator nossa incapacidade de gerar plantas transformadas, posto que nossas câmaras de cultivo não possuem controle estrito de temperatura e umidade, e que apesar de permitirem um crescimento ideal das plantas não apresentam condições ideais para a transformação genética desta espécie. Acreditamos também que a janela temporal para a transformação via “spike - dip” possa ser muito pequena e crucial para obter resultados positivos, mas este fator ainda não foi descrito e carece de mais estudos para ser esclarecida.

6.3 Teste de germinação

Alguns estudos relacionados a dormência de sementes especialmente em monocotiledôneas, indicam a influência de diversos fatores endógenos e ambientais na quebra de dormência. (MA; BYKOVA; IGAMBERDIEV, 2017). Apesar de alguns estudos reconhecerem que os mecanismos da germinação precisam ser melhor estudados, foi evidenciado que os hormônios possuem um papel relevante na quebra da dormência (NONOGAKI; BASSEL; BEWEL, 2010). Por outro lado, estudos relativos a influência das condições ambientais na qual a planta mãe é crescida, demonstraram que altas temperaturas podem transmitir informações hereditárias relacionadas à mecanismos de dormência para as sementes, favorecendo a dormência (PENFIELD, 2017). Portanto fomos verificar a possível influência da temperatura de crescimento da planta mãe no processo de dormência, posto que as condições ideais para o crescimento de *S. viridis*

são de 31°C durante o dia. Partindo do princípio de que o processo de dormência, instaurado pela planta mãe, pode influenciar a estratégia de germinação da progênie, podemos postular que a instauração da dormência poderia estar ligada as escolhas adaptativas adotadas pela espécie invasiva *S. viridis*, maximizando assim sua sobrevivência em condições ambientais adversas. Estudos envolvendo o gênero *Setaria* relatam a dormência como um processo característico comum, observado também em *S. faberi* (JOVAAG; DEKKER; ATCHISON, 2012). Em nossos experimentos observamos que a taxa de germinação é maior em meio de cultura do que em papel filtro nas duas temperaturas observadas. Em meio de cultura a taxa de germinação apresentou um aumento de 13,48% em sementes oriundas de plantas mãe crescidas a 20°C, se comparadas com sementes oriundas de plantas mãe crescidas a 27°C. Portanto, em condição de meio de cultura a taxa de germinação apresentou um incremento significativo, muito maior que na condição de germinação em papel de filtro. Esta diferença poderia ser explicada por uma limitação na capacidade de manter a umidade constante nos experimentos com papel de filtro, mantendo assim a taxa de germinação entre as duas condições similares. Nossos resultados apontam que fatores ambientais, tais como a temperatura alta durante o crescimento das plantas mãe possa estar relacionados com a dormência das sementes, sugerindo assim algum mecanismo de “memória” que pode estar relacionada com as estratégias adaptativas do gênero *Setaria*. O aumento da taxa de germinação em nossos experimentos foi relativamente baixo, mas é sabido que, por exemplo, a memória epigenética pode se propagar durante mais gerações, portanto para caracterizar melhor esta hipótese serão necessários estudos mais detalhados sobre este aspecto ao longo de mais gerações. Este estudo foi feito com a intenção de aumentar a germinabilidade das sementes transformadas, já que a dormência das plantas T0 constitui um fator que poderia influenciar negativamente a seleção das plantas possivelmente transformadas.

6.4 Modificação de enfoque sobre a questão principal

Devido ao fato que a dissertação da aluna Mayra C.A. Costa (2018) já tinha evidenciado problemas na realização de transformações de tecidos germinais de *S. viridis*, este trabalho começou com duas linhas de trabalho em paralelo. A primeira visou tentar transformar plantas de *S. viridis* com outro protocolo de “spike-dip”

publicado, utilizando dois vetores com construções diferentes já existentes e funcionais em outras monocotiledôneas, para verificar a eficiência de transformação em nossas mãos deste outro protocolo. A segunda linha de trabalho se concentrou na análise de expressão dos genes PIN's nos momentos iniciais de crescimento, com a consequente clonagem dos genes expressos nas raízes nestes primeiros estágios. Porém visto que nem nós, nem muitos outros grupos de pesquisa que trabalham com *S. viridis* (conversas durante o VI Congresso Monocots de 2018) conseguimos replicar as transformações desta espécie com protocolos de “spike-dip”, possivelmente por não possuímos condições de cultivo adequadas para gerar os possíveis transformantes, optamos por parar com o trabalho de clonagem dos genes PIN's. Dado este impedimento experimental até o momento não esperado, e até que fosse possível obter maiores informações em relação a como ter êxito no processo de transformação germinal, decidimos nos concentrar em outros aspectos relacionados ao estabelecimento do sistema radicular. Posto que outra dissertação de nosso laboratório sobre o assunto (COSTA, 2018) tinha evidenciado uma interessante variação da arquitetura radicular decidimos explorar mais detalhadamente este aspecto do estabelecimento de diferentes tipos radiculares, correlacionando tais alterações com variações de fatores abióticos e endógenos. Por este motivo, além de não querer gastar recursos econômicos do laboratório e de tempo de tese em um objetivo que possui claros gargalos experimentais mais afrente, a clonagem dos genes PIN's, fusionados a um gene repórter não foi continuado.

6.5 Análise da arquitetura radicular em função de fatores abióticos

A fim de analisar o desenvolvimento das raízes através da modulação fatores ambientais e endógenos, foram realizados experimentos utilizando fatores ambientais diferentes como presença e ausência de luz, e fatores nutricionais como presença/ausência de nutrientes como fosfatos e nitratos. Trabalhos com outras monocotiledôneas tais como milho indicam a existência de 3 tipos de raízes além da raiz primária: raízes laterais, seminais e adventícias, também chamadas de raízes da coroa (HOCHHOLDINGER; YU; MARCON, 2017). No presente estudo foi possível notar a presença de raízes primárias e raízes adventícias, além das raízes laterais, enquanto as seminais não foram detectadas. Experimentos de acompanhamento e

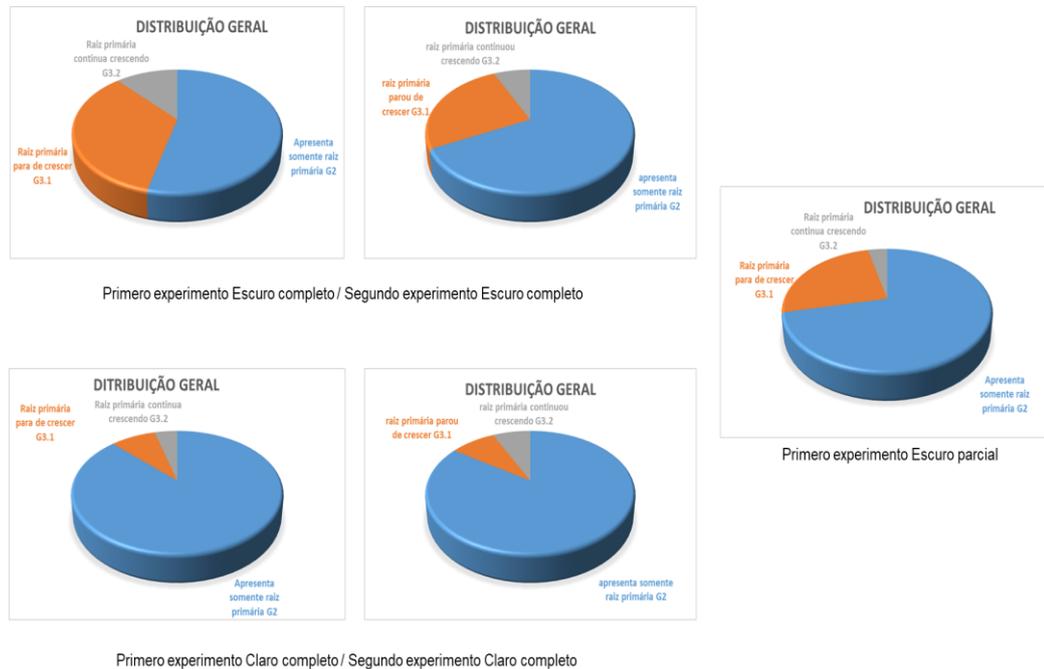
desenvolvimento de raízes em milho (*Zea mays*) e sorgo (*Sorghum bicolor*) relatam diferenças quanto a presença de raízes seminais, em sorgo tal categoria radicular não existe nos estágios iniciais do desenvolvimento (SINGH et al., 2010). Estudos de outro grupo com a Poaceae *S. viridis* (SEBASTIAN; DINNENY, 2016) relatam, porém, a ocorrência ocasional e esporádica de raízes seminais, fato que em nossas condições de germinação e em nossos tempos de crescimento observados não foi nunca observado. A diferença em relação a presença/ausência de raízes seminais observado por outros grupos e não por nosso, podem estar ligadas a diferenças nos processos de escarificação e desinfestação das sementes, mas não foram realizados estudos anteriores a respeito.

Nossas observações em relação a diferenças da arquitetura radicular nos experimentos de crescimento com diferentes condições de luz apontam que, apesar de diferenças variando as condições de luminosidade, a raiz primária é o sistema mais radicular preponderante até o décimo dia após a germinação. A partir do décimo dia a raiz adventícia começa a crescer de forma mais consistente, virando o sistema preponderante a partir do décimo terceiro dia. Curiosamente as condições de claro desde o primeiro dia após a germinação parecem ter um efeito paliativo sobre o crescimento da raiz primária nos primeiros dias, pois este tipo radicular cresce mais lentamente em condições de claro que em condições de escuro parcial e completo até o quinto dia após a germinação (Figura 46). A conclusão mais evidente neste tipo de experimento é que existe uma clara distinção entre os tipos radiculares emitidos no crescimento inicial pós-germinação entre crescimento em claro verso crescimento com escuro inicial. As condições de claro favorecem o estabelecimento do sistema radicular primário enquanto em condições de escuro as raízes adventícias aparecem em um número maior de plantas (Figura 47). Podemos postular que o crescimento em claro favoreça uma maior diferenciação dos tecidos aéreos da parte mais basal do caule, desfavorecendo assim a formação de raízes adventícias nas fases iniciais do crescimento. Porém são necessários estudos mais detalhados que correlacionem o crescimento de raízes primária e adventícia em *S. viridis*, já que muitas variáveis podem influenciar a arquitetura radicular e em nosso entender não há estudos que correlacionem fatores ambientais com o estabelecimento de diferentes arquiteturas radiculares.

Figura 46: Médias dos tamanhos das raízes primárias e adventícias de *S. viridis* em condições de claro e escuro.



Figura 47: Distribuição geral dos tipos radiculares de *S. viridis* nas condições de escuro e claro.



Estudamos também se mecanismos ligados à posição da flor/sememente ao longo do eixo apico/basal da espiguiha poderiam influenciar a escolha e o desenvolvimento da arquitetura radicular. A porção medial apresentou plântulas com raízes primárias na condição escuro nos grupos G2 e G3.2 menores do que as que receberam luz, enquanto que as plântulas do grupo G3.1 crescidas nestas condições apresentaram raízes primárias maiores do que as que receberam luz. As raízes adventícias das plântulas do grupo G3.1 e G3.2 foram maiores do que as que receberam luz.

A porção basal apresentou plântulas com raízes primárias nos grupos G2 e G3.2 crescidas na condição de escuro maiores do que as que receberam luz. As raízes adventícias das plântulas do grupo G3.2 crescidas nas condições de escuro foram menores do que as que receberam luz.

As raízes adventícias das plântulas crescidas nas condições de escuro se desenvolveram em maior número quando comparadas com as raízes adventícias das plântulas que receberam luz. As plântulas que ficaram na ausência de luz também apresentaram estiolamento, porém um estiolamento menor quando comparadas com o experimento anterior, devido a exposições ao escuro por tempos

menores. Supõe-se que o pequeno número de plântulas analisado, além do período de 4 dias na ausência de luz foram insuficientes para inferir se a maturação diferencial numa mesma espiguiha exerce influência na escolha e desenvolvimento das raízes em *S. viridis*. Porém esse estudo corrobora as observações iniciais de que existe uma diferença na escolha do tipo de raiz mediante a influência da luz, já que a distribuição geral da presença dos tipos radiculares mais relevantes foi alterada na ausência de luz quando comparados com a distribuição geral dos tipos radiculares na presença de luz.

Nossos resultados mostram também que existe uma clara distinção de arquitetura radicular escolhida ao longo da espiguiha, e, portanto, é interessante notar que trabalhar com uma única porção poderia trazer uma visão mais consistente do sistema, podendo trazer médias mais constantes (Figura 48). A conclusão mais importante deste tipo de experimento evidencia que a arquitetura radicular de *S. viridis* apresenta uma variação de fenótipos radiculares nas primeiras etapas do crescimento pós-germinação, e que esta pode ser modulada quantitativamente pelo fator abiótico luz. Provavelmente existem também outros fatores ainda não compreendidos que influenciam nesta variação, ou que esta seja parte de uma estratégia adaptativa de uma espécie infestante que tende a maximizar seu *fitness* para qualquer tipo de solo.

Cabe ressaltar também que nos experimentos realizados com diferentes condições de luz, as sementes utilizadas eram oriundas de plantas mãe crescidas a 27°C, enquanto nos experimentos em que a espiguiha foi separada em setores diferentes, as sementes eram oriundas de plantas mãe crescidas a 20°C. Através desta diferença de origem das sementes foi possível notar que a escolha entre os tipos radiculares se modifica; nos experimentos onde as plantas mãe se desenvolveram à 27°C, as plântulas apresentaram em sua maioria a presença somente de raízes primárias; já no experimento em que as plantas mãe se desenvolveram a 20°C, principalmente nas condições de escuro, o número de plântulas que apresentam raízes primárias é muito menor. Esta observação, que deverá ser confirmada através da realização de outras replicatas biológicas futuras, indica que sementes oriundas de plantas mãe crescidas a temperaturas mais baixas podem significar em um aumento da diferença de variação na arquitetura radicular, especialmente nas diferenças entre claro/escuro, facilitando assim as análises estatísticas para a compreensão deste fenômeno (Figura 49).

Figura 48: Médias dos tamanhos das raízes primárias e adventícias de *S. viridis* em condições de claro e escuro separadas em diferentes setores da espiguiha.

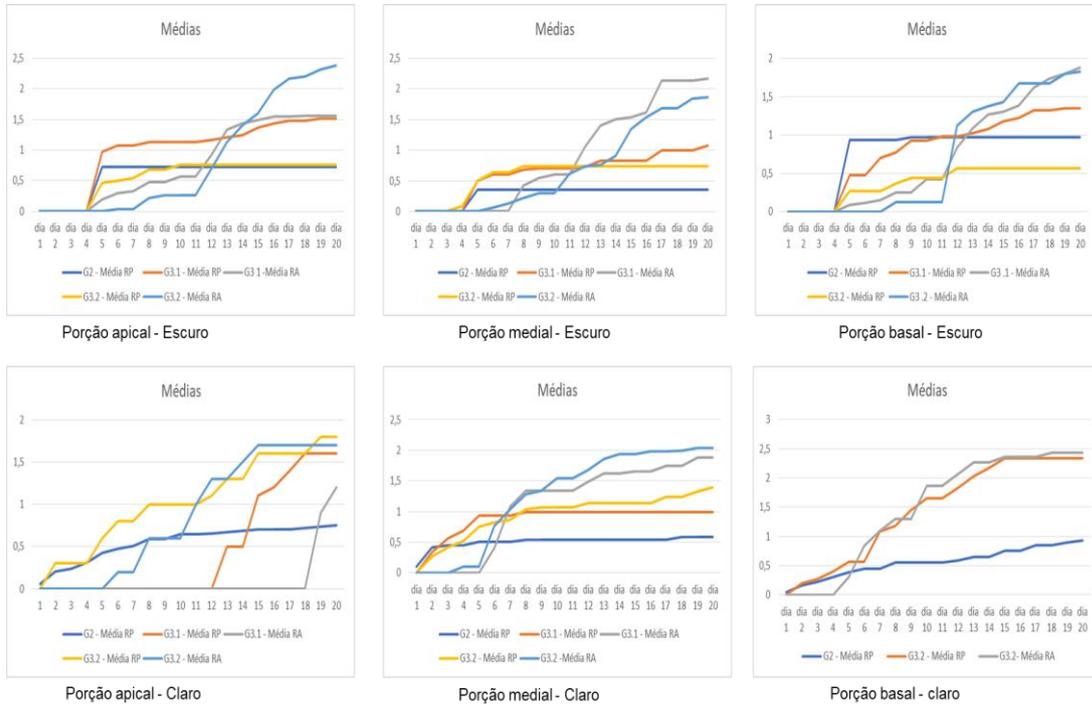
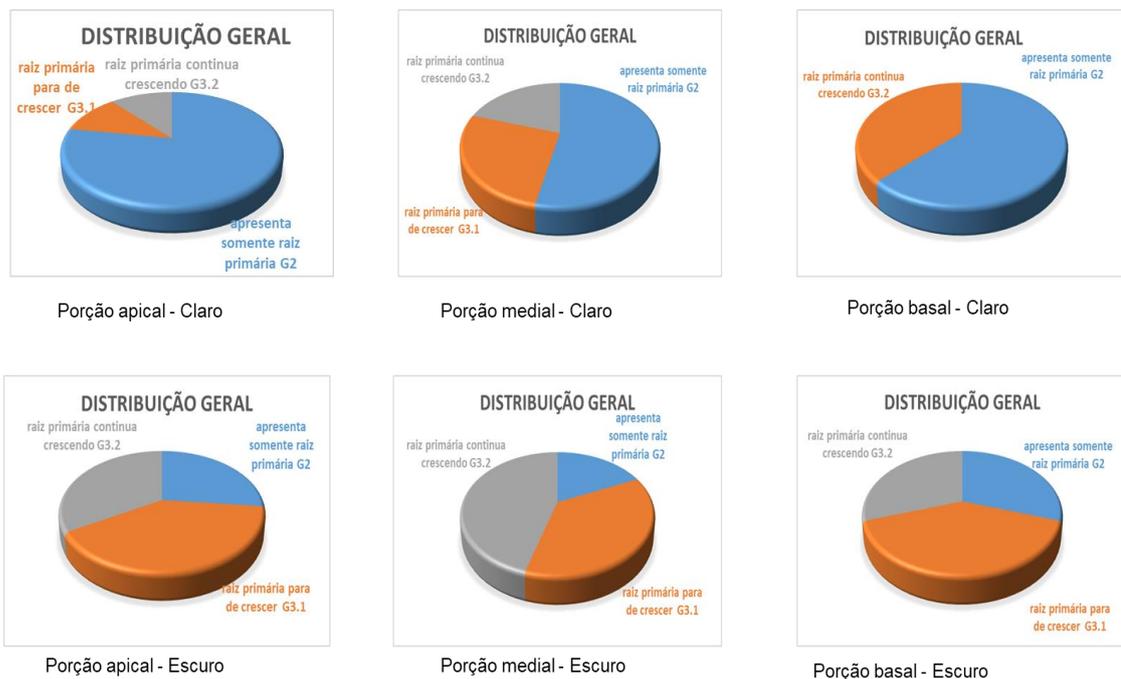


Figura 49: Distribuição geral dos tipos radiculares das plântulas oriundas de diferentes setores da espiguiha de *S. viridis* nas condições de claro e escuro separadas em diferentes setores da espiguiha.



6.6 Acompanhamento do desenvolvimento das raízes utilizando meio Johnson

O grupo de plântulas que apresentou somente raiz primária representou a maioria das plântulas analisadas nas condições de meio Johnson completo, meio Johnson menos fósforo e água, phytigel e cloreto de cálcio. O meio Johnson menos nitrogênio exibiu como grupo de maior representatividade o grupo de plântulas que apresenta tanto raízes primárias quanto adventícias, porém a raiz primária continua crescendo após o surgimento da raiz adventícia, porém a diferença entre o grupo de plântulas que apresenta tanto raízes primárias quanto adventícias, porém a raiz primária continua crescendo após o surgimento da raiz adventícia para o grupo de plântulas que apresenta somente raiz primária foi de 7%.

O meio Johnson menos fósforo exibiu plântulas raízes primárias do grupo G2 de tamanhos semelhantes as raízes das plântulas denominadas controle, que são as plântulas que se desenvolveram em meio Johnson completo. As raízes primárias das plântulas do grupo G3.2 foram menores do que as do grupo controle. Já as raízes adventícias foram menores do que as do grupo controle.

O meio Johnson menos nitrogênio exibiu plântulas dos grupos G2 e G3.2 com raízes primárias menores do que as do grupo controle. Já as raízes adventícias foram maiores do que as do grupo controle.

Estudos envolvendo *A. thaliana* evidenciaram que carências nutricionais também tem grande influência sobre crescimento do sistema radicular. Por exemplo, carências de fosfato no meio de crescimento modificam a relação raiz/parte aérea, favorecendo o crescimento das raízes que são os órgãos necessitam da obtenção deste recurso (RUBIO et al., 2001). Estudos que incluem diferentes espécies apontam que de forma geral a carência de fósforo modifica o sistema radicular, e a maioria das plantas possui a tendência de desenvolver um sistema radicular mais raso, com raízes primárias menores e raízes adventícias com menor densidade, explorando camadas mais rasas do solo, melhor adaptadas para o forrageamento (BELLINI et al., 2014). Por outro lado, estudos em milho indicam que a modulação de nutrientes, como nitrato quando utilizado em concentrações altas podem influenciar positivamente as raízes adventícias, aumentando assim, seu comprimento (JOSHI et al., 2016). Concentrações altas de nutrientes como nitratos e zinco podem inibir o crescimento da raiz primária (CELIS-ARÁMBURO et al., 2011; ZHANG et al., 2018), porém a inibição pode, em alguns casos, promover o

desenvolvimento das raízes laterais (ZHANG et al., 2018). Em análises morfológicas de milho notou-se que a germinação da espécie em condições de deficiência de potássio, existe um aumento do número de raízes laterais tanto em número quanto em tamanho; tal estratégia pode ser atribuída à uma tentativa de espalhar seu sistema radicular aumentando a absorção dos nutrientes (ZHAO et al., 2016). Estudos em trigo denotam o aumento da profundidade das raízes como mecanismo de aumentar a captação de água em profundidades maiores, desenvolvendo assim, mais as raízes adventícias já que raízes primárias são menores, portanto com menor profundidade que as raízes adventícias (WASSON et al., 2012).

Nossos resultados indicam que aparentemente só a carência de nitrogênio pode ter influência no aparecimento de raízes adventícia e na senescência da raiz primária. O que pode ser observado na Figura 32 é que em carência de nitrogênio o grupo que apresenta presença de raízes adventícias (com ou sem raízes primárias) se mostrou como sendo o majoritário, fato que não ocorre nas demais condições. Por outro lado, as condições de carência de nitrogênio, juntamente com a condição sem algum nutriente, são as únicas que apresentam senescência de raiz primária (Figura 51). Cabe por último ressaltar que a utilização do meio Johnson utilizado nesta parte da dissertação possui concentrações mais baixas de nutrientes se comparadas com o meio MS ½ força utilizada nos demais experimentos dessa dissertação, evidenciando assim que estes experimentos não podem ser comparados entre eles. Um dos resultados mais interessantes dessa seção é a observação da média dos tamanhos das raízes. É interessante notar que a condição em que raiz primária que apresentou tamanhos maiores, foi no meio de controle sem nenhum nutriente (Figura 50). Este resultado creditamos ser devido a realocação de nutrientes para a raiz em condição de carência completa, estimulando assim seu maior crescimento, adicionado ao fato que as sementes de *S. viridis* provavelmente possuem muitas reservas nutricionais que lhe permitem sustentar o desenvolvimento da raiz por períodos prolongados. Os resultados, puramente preliminares dessa seção, devem, portanto, ser tomados com cautela devido a que o número de plântulas analisadas é baixo, e para serem confirmadas no futuro precisarão de números maiores e tratamento estatístico adequado.

Figura 50: Médias dos tamanhos das raízes primárias e adventícias de *S. viridis* germinadas em meio Johnson e água, phytigel e cloreto de cálcio.

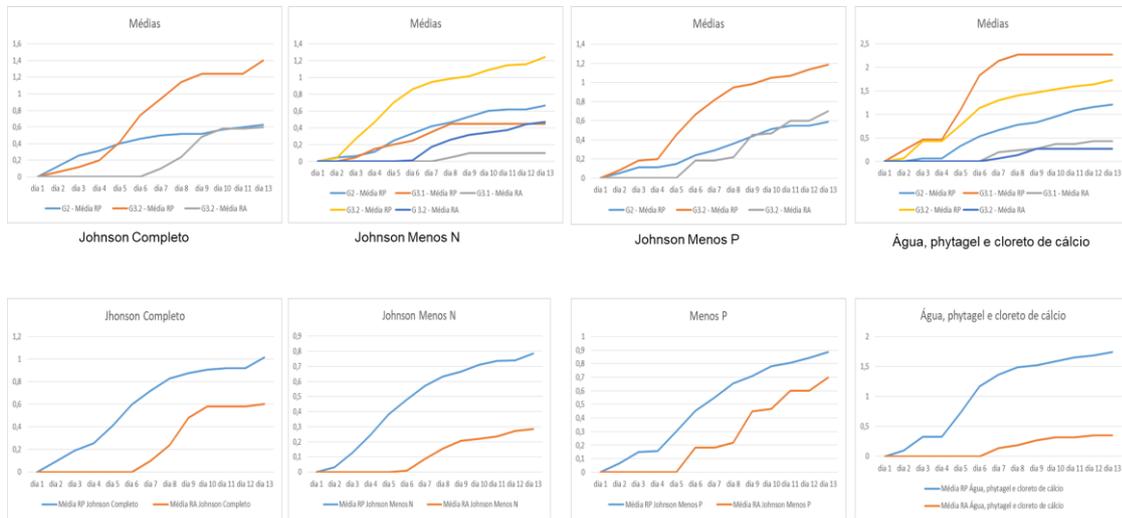


Figura 51: Distribuição geral dos tipos radiculares em *S. viridis* germinadas em meio Johnson e água, phytigel e cloreto de cálcio.



6.7 Acompanhamento do desenvolvimento da arquitetura radicular utilizando alguns hormônios vegetais

Nesta última seção do trabalho utilizamos a aplicação exógena de alguns reguladores hormonais, a fim de ter uma ideia se o comportamento diferencial de escolha das raízes pudesse sofrer influência hormonal. Os resultados do tratamento com a citocinina e zeatina apontam que a suplementação com este hormônio diminui o surgimento de raízes adventícias, favorecendo a que no período de análise a raiz primária seja a única raiz emitida em aprox. 85% das plântulas observadas (Figura 53). De fato, as citocininas são amplamente descritas na literatura por promoverem a

divisão celular. Estudos envolvendo *A. thaliana* denotam que altas concentrações de citocininas suprimem o desenvolvimento de raízes adventícias (LAPLAZE et al., 2007), resultados semelhantes foram encontrados em arroz (RANI DEB et al., 2005) e alfafa (*Medicago sativa*) (GONZALEZ - RIZZO et al., 2006). Estudos envolvendo baixas concentrações de citocininas se apresentam como benéficas em estágios iniciais do desenvolvimento de raízes adventícias de espécies de macieiras (*Malus pumila Mill*) (RICCI et al., 2003), promovendo uma promoção no desenvolvimento desse tipo radicular. Porém estudos envolvendo linhas de mutantes com aumento de expressão do gene CK oxigenase / desidrogenase em *A. thaliana* reduziram os níveis endógenos de citocininas aumentando assim a frequência de raízes adventícias (WERNER et al., 2003). Nosso tratamento não só não favoreceu o surgimento de raízes adventícias, mas diminui também o tamanho do meristema proximal das poucas raízes adventícias (Figura 41), mas contrariamente ao esperado não diminuiu sua taxa de crescimento das raízes primárias (Figura 52). A diminuição do meristema proximal coincide com o fato que as citocininas modulam o posicionamento da zona de transição, descrita previamente em *Arabidopsis thaliana* (DELLO IOIO et al., 2007). O fato que a média de raízes principais tratadas com citocininas apresentou tamanhos maiores que as raízes sem tratamento, enquanto que o contrário acontece com as raízes adventícias, apesar de ter que ser considerado como putativo pelo baixo número de plântulas analisadas é interessante e deverá ser analisado mais detalhadamente no futuro. A explicação que podemos postular é que a citocinina seja percebida de forma diferencial nas raízes primárias e adventícias, favorecendo a manutenção de um meristema proximal normal e ativo nas raízes primárias e pequeno e pouco ativo nas adventícias. Neste sentido vale a pena lembrar que existem dois estereoisômeros da zeatina que atuam nas plantas, a cis-zeatina e a trans-zeatina. A trans-zeatina utilizada em nossos experimentos representa 98% da forma natural em *Arabidopsis thaliana*, mas menos de 20% da forma principal em *S. viridis*, o que nos faz pensar que os dois estereoisômeros possam ter atuação diferencial nos dois tipos radiculares de *Setaria*. A existência de diferentes receptores para o hormônio citocinina poderia significar que isoformas diferentes do hormônio são percebidas por diferentes receptores, atuando assim mecanismos de resposta diferencial totalmente desconhecido até este momento. De todas as formas estes resultados preliminares devem ser tomados com cautela e ser

analisados com replicatas biológicas e com números maiores de plantas para serem clarificados.

Os resultados do experimento utilizando sementes de *S. viridis* germinadas em meio MS ½ suplementado com NPA, nos quais 80% das plantas analisadas apresentaram somente raiz primária reforçam a tese que os fluxos polares de auxina estão associados na formação de picos de auxina no caule, responsáveis pela organização das raízes adventícias. De outra forma o transporte polar da auxina é responsável também pela formação das raízes adventícias, o que coincide com a observação de ausência de raízes adventícias na maioria das plantas analisadas.

Já os resultados do experimento utilizando sementes de *S. viridis* germinadas em meio MS ½ suplementado com 2,4-D, obtidos em nosso estudo, devem ser revistos no que se refere a concentrações totais, pois o 2,4-D é amplamente utilizado como herbicida para dicotiledôneas, mas é sabido que em geral as monocotiledôneas são imunes aos tratamentos de 2,4-D. Nestes experimentos observamos a formação de uma massa tecidual com aparência de “calo”, demonstrando um efeito forte demais para tirar conclusões, sugerindo assim, a necessidade de futuros experimentos com concentrações mais baixas (LIU et al., 1993; HADFI et al., 1998).

Os dados de GA₃ apresentam uma distribuição geral muito parecida ao tratamento controle, e foi possível notar somente um pequeno atraso no crescimento geral das raízes primárias e adventícias com este tratamento. As explicações podem ser muitas, a partir do fato que a biossíntese de ácido giberélico foi relatada na coifa de diferentes espécies de plantas, como *A. thaliana* e arroz (FU; HARBERD, 2003; KANEKO et al., 2003). Estudos envolvendo a aplicação exógena de GA₃ em arroz exibiram resultados que indicam um efeito negativo sobre o desenvolvimento de raízes adventícias (LO et al., 2008).

De forma geral, entre os hormônios utilizados não observamos uma grande variabilidade, entre o comportamento da raiz primária e adventícias com exceção do caso relativo a zeatina descrita acima e que será interessante estudar mais aprofundadamente no futuro (Figura 53).

Figura 52: Médias dos tamanhos das raízes primárias e adventícias de *S. viridis* germinadas em meio completo e/ou suplementado com zeatina, ácido giberélico e o inibidor do transporte polar da auxina NPA.

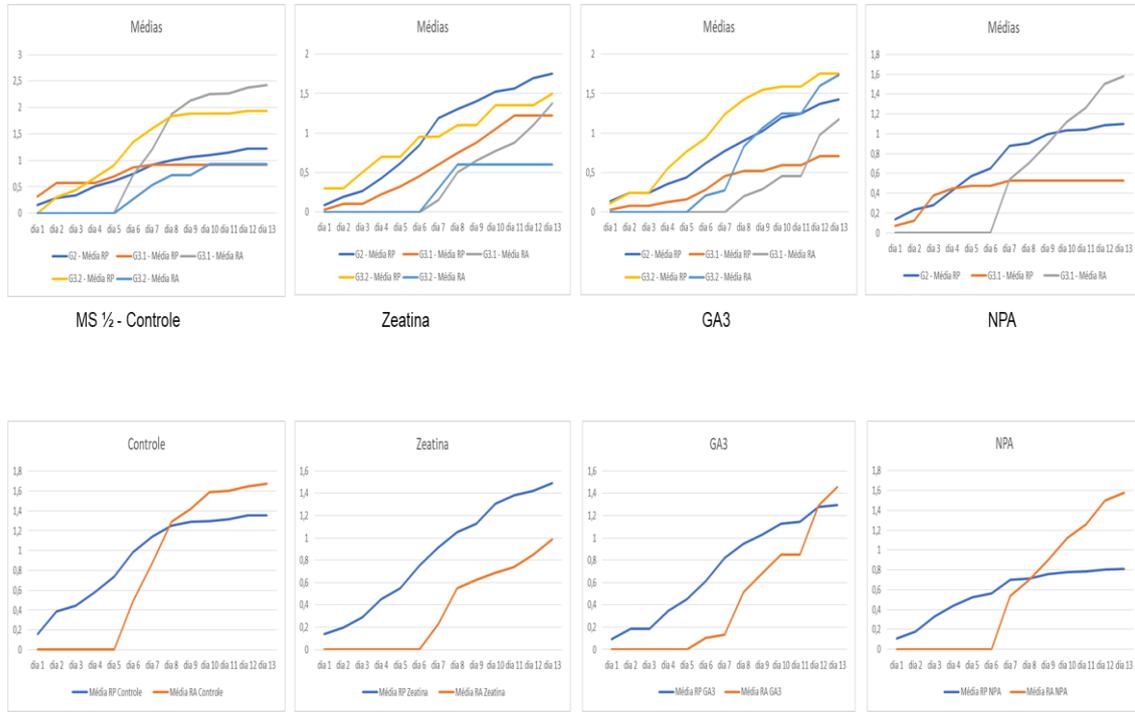


Figura 53: Distribuição geral dos tipos radiculares em *S. viridis* germinadas em meio MS 1/2 e suplementadas com reguladores vegetais.



Cabe, portanto, levantar a hipótese que *S. viridis* sendo uma planta invasora possa atuar com diferentes estratégias que visem diferenciar intrinsecamente o sistema radicular de sua progênie com a finalidade de maximizar a possibilidade de colonizar diferentes ambientes, em que arquiteturas radiculares diferentes possam representar uma vantagem adaptativa.

Por último, é interessante notar que um estudo recente feito sobre a conservação de sequências plastidiais entre muitas espécies vegetais, incluindo também muitas espécies aquáticas, traz fortes evidências de que as monocotiledôneas tenham surgido a partir de plantas aquáticas. Esta derivação até este momento somente suspeitada, mas nunca comprovada cientificamente, explicaria a chamada “síndrome monocotiledônea”. Esta derivação ancestral tão diferente poderia explicar algumas das diferenças tão drásticas observadas entre monocotiledôneas e dicotiledôneas, tais como diferenças na estrutura e desenvolvimento foliar, organização dos feixes vasculares e possivelmente até a origem diferente do sistema radicular embrionário (GIVNISH et al., 2018).

7. CONCLUSÕES

Os eventos de transformação via “sipke-dip” com as construções, DR5 :: RFP e pSvPIN1B :: YFP não resultaram na produção de algum transformante no presente trabalho, apontando assim à necessidade de um maior esforço para a realização de plantas transgênicas nesta espécie, do que até o momento relatado. A incapacidade de produzir plantas transgênicas resultaria na perda de recursos econômicos e de dissertação se continuássemos na perseguição do objetivo de clonagem dos genes PIN's em fusão com o gene repórter GFP, portanto foi decidido realocar os esforços para termos uma melhor compreensão de como acontece a escolha do tipo radicular nas plantas de *S. viridis*.

Esta dissertação aponta também que a progênie de plantas mãe crescidas em temperaturas mais amenas (20°C) apresentaram uma maior taxa de germinação quando comparadas com a progênie de plantas mãe crescidas em temperaturas mais elevadas (27°C).

Relatos de um grupo de pesquisa parceiro de nosso laboratório apontavam a que a raiz embrionária sofresse um processo de senescência precoce durante seu desenvolvimento, mas nosso grupo comprovou que *S. viridis* apresenta na realidade uma variação na escolha de sua arquitetura radicular desde os estágios iniciais de seu desenvolvimento. Nossos estudos demonstraram que existe a possibilidade de alterar sutilmente esta variação de forma quantitativa, mas não qualitativa em função de fatores abióticos tais como luz e nutrientes. Estes estudos apontam também que a variação pode flutuar substancialmente entre um experimento e outro, e que, portanto, outros fatores ainda não tateados possam exercer influência na escolha da arquitetura radicular, além de serem necessários experimentos com números de plântulas analisadas muito grandes.

Os experimentos de acompanhamento e desenvolvimento de raízes em *S. viridis* envolvendo o fator ambiental diferencial luz aponta também que o crescimento contínuo de luz favorece o estabelecimento de um sistema radicular preponderantemente com somente raiz primária, enquanto que um período de germinação no escuro favorece o desenvolvimento de um maior número de raízes adventícias.

Nossos experimentos com a divisão da espiguiha em diferentes setores apontam que existe um comportamento diferencial, no que se refere ao tipo de arquitetura radicular escolhida, entre as diferentes partes da espiguiha, mas que para comprovar esta hipótese são necessários experimentos com números mais significativos de plantas.

Nossos experimentos em relação à temperatura em que a planta mãe é crescida apontam que temperaturas de crescimento mais baixas para as plantas mãe resultam em um incremento de quebra de dormência nas sementes filhas.

Os resultados obtidos no presente estudo mostram aspectos relativos a escolha inicial de tipos radiculares, ainda muito pouco explorada. A variação de fenótipos radiculares exibidos por plantas de *S. viridis* parece estar regulada por muitos fatores ao mesmo tempo, dificultando assim a catalogação dos tipos radiculares. Portanto a identificação de fatores abióticos e hereditários, que influenciam a variação de fenótipos radiculares é fundamental para a compreensão deste fenômeno ainda pouco explorado. A compreensão deste fenômeno pode consolidar a espécie como espécie modelo para as gramíneas de metabolismo C4, e estabelecer bases sólidas para a modulação da arquitetura radicular em função de diferentes solos e/ou fatores abióticos, transferindo conhecimento de base à produção agrícola brasileira.

REFERÊNCIAS

- ATKINSON, J.A.; RASMUSSEN, A.; TRAINI, R.; VOß, U.; STURROCK, C.; MOONEY, S.J.; WELLS, D.M.; BENNETT, M.J. Branching out in roots: uncovering form, function, and regulation. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 166, p. 538-550, 2014.
- BARBERO, A.P.P.; BARROS, F.; SILVA, E.A.; SUZUKI, R.M. Influência do déficit hídrico na germinação de sementes e no desenvolvimento inicial de três espécies de Pleurothallidinae (*Orchidaceae*). **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 34, p. 593-601, 2011.
- BASTIANI, M.O.; LAMEGO, F.P.; NUNES, J.P.; MOURA, D.S.; WICKERT, R.J.; OLIVEIRA, J.I. Germinação de sementes de capim-arroz submetidas a condições de luz e temperatura. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 33, n. 3, p. 395-404, 2015.
- BATES, T.R.; LYNCH, J.P. Stimulation of root hair elongation in *Arabidopsis thaliana* by low phosphorus availability. **Plant, Cell & Environment**, Oxford, v. 19, n. 5, p. 529-538, 1996.
- BARTHOLMES, C.; NUTT, P.; THEIBEN, 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.
- BAYUELO-JIMÉNEZ, J.S.; GALLARDO-VALDÉZ, M.; PÉREZ-DECCELIS, V.A.; MAGDALENO-ARMAS, L.; OCHOA, I.; LYNCH, J.P. Genotypic variation for root traits of maize (*Zea mays* L.) from the Purhepecha Plateau under contrasting phosphorus availability. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 121, n. 3, p. 350-362, 2011.
- BECHTOLD, N.; ELLIS, J.; PELLETIER, G. *In planta Agrobacterium* mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. **Comptes Rendus de l'Académie des Sciences. Série 3, Sciences de la Vie**, Paris, v. 316, p. 1194-1199, 1993.
- BENKOVA, E.; IVANCHENKO, M.G.; FRIML, J.; SHISHKOVA, S.; DUBROVSKY, J.G. A morphogenetic trigger: is there an emerging concept in plant developmental biology? **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 14, p. 189-193, 2009.
- BENNETZEN, J.L.; VOGEL, J.P. *Brachypodium distachyon* and *Setaria viridis*: Model Genetic Systems for the Grasses. **Annual Review in Plant Biology**, Palo Alto, v. 66, p.465-485, 2015.
- BRUTNELL, T.P.; WANG, L.; SWARTWOOD, K. *Setaria viridis*: a model for C4 photosynthesis. **The Plant Cell**, Rockville, v. 22, p. 2537-2544, 2010.
- 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.

CELIS-ARÁMBURO, T. de J.; CARRILLO-PECH, M.; CASTRO-CONCHA, L.A.; MIRANDA-HAM, M. de L.; MARTÍNEZ-ESTÉVEZ, M.; ECHEVARRÍA-MACHADO, I. 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.

CHEN, Y.; YORDANOV, Y.S.; STRAUSS, S.; BUSOV, V. DR5 as a reporter system to study auxin response in *Populus*. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 32, p. 453-463, 2013.

CHO, M.J.; WU, E.; KWAN, J.; YU, M.; BANH, J.; LINN, W.; JONES, T.J. 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 Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**, Oxford, v. 16, n. 6, p. 735-743, 1998.

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

DEBI, B.R.; TAKETA, S.; ICHII, M. Cytokinin inhibits lateral root initiation but stimulates lateral root elongation in rice (*Oryza sativa*). **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 162, n. 5, p. 507-515, 2005.

DELLO IOIO, R.; LINHARES, F.S.; SCACCHI, E.; CASAMITJANA-MARTINEZ, E.; HEIDSTRA, R.; COSTANTINO, P.; SABATINI, S. Cytokinins determine *Arabidopsis* root-meristem size by controlling cell differentiation. **Current Biology**, London, v. 17, n. 8, p. 678-682, 2007.

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

DIAO, X.; SCHNABLE, J.; BENNETZEN, J.; LI, J. Initiation of *Setaria* as a model plant. **Frontiers of Agricultural Science and Engineering**, Beijing, v.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.

DI MAMBRO, R.; DE RUVO, M.; PACIFICI, E.; SALVI, E.; SOZZANI, R.; BENFEY, P.N.; MARÉE, A.F. Auxin minimum triggers the developmental switch from cell division to cell differentiation in the *Arabidopsis* root. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 114, n. 36, p. E7641-E7649, 2017.

DOUST, A.N.; KELLOGG, E.A.; DEVOS, K.M.; BENNETZEN, J.L. Foxtail millet: a sequence-driven grass model system. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 149, p. 137-141, 2009.

DOUST, A.; DIAO, X. (Ed.). **Genetics and genomics of Setaria**. Heidelberg: Springer, 2017.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. CTAB DNA extraction in plants. **Phytochemical Bulletin**, v. 19, p. 11-15, 1987.

ERMAWAR, R.A.; COLLINS, H.M.; BYRT, C.S.; HENDERSON, M.; O'DONOVAN, L.A.; SHIRLEY, N.J.; BURTON, R.A. Genetics and physiology of cell wall polysaccharides in the model C 4 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 planta com sementes**. São Paulo: Edgard Blücher, 1974.

FU, X.; HARBERD, N.P. Auxin promotes *Arabidopsis* root growth by modulating gibberellin response. **Nature**, London, v. 421, n. 6924, p. 740-743, 2003.

GALLAVOTTI, A.; YANG, Y.; SCHMIDT, R.J.; JACKSON, D. The relationship between auxin transport and maize branching. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 147, p. 1913-1923, 2008.

GIVNISH, T.J.; ZULUAGA, A.; SPALINK, D.; SOTO GOMEZ, M.; LAM, V.K.Y.; SAARELA, J.M.; SASS, C.; ILLES, W.J.D.; SOUZA, D.J.L.; LEEBENS-MACK, J.; CHRIS PIRES, J.; ZOMLEFER, W.B.; GANDOLFO, M.A.; DAVIS, J.I.; STEVENSON, D.W.; dePAMPILIS, C.; SPECHT, C.D.; GRAHAM, S.W.; BARRETT, C.F.; ANÉ, C. Monocot plastid phylogenomics, timeline, net rates of species diversification, the power of multi-gene analyses, and a functional model for the origin of monocots. **American Journal of Botany**, Baltimore, v. 105, n. 11, p. 1888-1910, 2018.

GONZALEZ-RIZZO, S.; CRESPI, M.; FRUGIER, F. The *Medicago truncatula* CRE1 cytokinin receptor regulates lateral root development and early symbiotic interaction with *Sinorhizobium meliloti*. **The Plant Cell**, Rockville, v. 18, n. 10, p. 2680-2693, 2006.

HADFI, K.; SPETH, V.; NEUHAUS, G. Auxin-induced developmental patterns in *Brassica juncea* embryos. **Development**, Cambridge, v. 125, n. 5, p. 879-887, 1998.

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.; WOLL, K.; SAUER, M.; DEMBINSKY, D. 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, 2004.

HU, T.; METZ, S.; CHAY, C.; ZHOU, H.P.; BIEST, N.; CHEN, G.; FRY, J. 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.; FELDMAN, M.; SCHODER, S.; BAHRI, B.A.; DIAO, X.; ZHI, H.; ESTEP, M.; BAXTER, I.; DEVOS, K.M.; KELLOGG, E.A. Population genetics of *Setaria viridis*, a new model system. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 23, p. 4912–4925, 2014.

JOHNSON, C.M.; STOUT, P.R.; BROYER, T.C.; CARLTON, A.B. Comparative chlorine requirements of different plant species. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 8, n. 4, p. 337-353, 1957.

JOSHI, M.; FOGELMAN, E.; BELAUSOV, E.; GINZBERG, I. Potato root system development and factors that determine its architecture. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 205, p. 113-123, 2016.

KANEKO, M.; ITOH, H.; INUKAI, Y.; SAKAMOTO, T.; UEGUCHI-TANAKA, M.; ASHIKARI, M.; MATSUOKA, M. Where do gibberellin biosynthesis and gibberellin signaling occur in rice plants? **The Plant Journal**, Oxford, v. 35, n. 1, p. 104-115, 2003.

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

KITOMI, Y.; INAHASHIA, H.; TAKEHISAB, H.; SATOB, Y.; INUKAIA, Y. OsIAA13-mediated auxin signaling is involved in lateral root initiation in rice. **Plant Science**, Shannon, v. 190, p. 116-122, 2012.

LAMBRET-FROTTÉ, J.; ALMEIDA, L.C.S.; MOURA, S.M.; SOUZA, F.L.F.; LINHARES, F.S.; ALVES-FERREIRA, M. Validating internal control genes for the accurate normalization of qPCR expression analysis of the novel model plant *Setaria viridis*. **PLoSOne**, San Francisco, v. 10, n. 8, p. e0135006, 2015. doi: 10.1371/journal.pone.0135006.

LAPLAZE, L.; BENKOVA, E.; CASIMIRO, I.; MAES, L.; VANNESTE, S.; SWARUP, R.; OFFRINGA, R. Cytokinins act directly on lateral root founder cells to inhibit root initiation. **The Plant Cell**, Rockville, v. 19, n. 12, p. 3889-3900, 2007.

LAVENUS, J.; GOH, T.; ROBERTS, I.; GUYOMARC'H, S.; LUCAS, M.I.; SMET, I. DE; FUKAKI, H.; BEECKMAN, T.; BENNETT, M.; LAPLAZE, L. Lateral root development in *Arabidopsis*: fifty shades of auxin. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 18, n. 8, p. 450-458, 2013.

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

LI, L.; HE, Y.; WANG, Y.; ZHAO, S.; CHEN, X.; YE, T.; WU, Y.; WU, Y. *Arabidopsis* PLC2 is involved in auxin-modulated reproductive development. **The Plant Journal**, Oxford, v. 84, p. 504–515, 2015.

LI, Z.; XU, C.; LI, K.; YAN, S.; QU, X.; ZHANG, J. Phosphate starvation of maize inhibits lateral root formation and alters gene expression in the lateral root primordium zone. **BMC Plant Biology**, London, v. 12, n. 1, p. 89, 2012.

LIU, C.M.; XU, Z.H.; CHUA, N.-H. Auxin polar transport is essential for the establishment of bilateral symmetry during early plant embryogenesis. **The Plant Cell**, Rockville, v. 5, n. 6, p. 621-630, 1993.

LO, S.F.; YANG, S.Y.; CHEN, K.T.; HSING, Y.I.; ZEEVAART, J.A.; CHEN, L.J.; YU, S.M. A novel class of gibberellin 2-oxidases control semidwarfism, tillering, and root development in rice. **The Plant Cell**, Rockville, v. 20, n. 10, p. 2603-2618, 2008.

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**, Beijing, v. 5, n. 6, p. 459-477, 2017.

MARTINS, P.K.; NAKAYAMA, T.J.; RIBEIRO, A.P.; CUNHA, B.A.D.B.; NEPOMUCENO, A.L.; HARMON, F.G.; KOBAYASHI, A.K.; MOLINARI, H.B.C. *Setaria viridis* floral-dip: A simple and rapid *Agrobacterium*-mediated transformation method. **Biotechnology Reports**, Amsterdam, v. 6, p. 61–63, 2015.

MAYAVAN, S.; SUBRAMANYAM, K.; JAGANATH, B.; SATHISH, D.; MANICKAVASAGAM, M.; GANAPATHI, A. *Agrobacterium*-mediated in planta genetic transformation of sugarcane setts. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 34, n. 10, p. 1835-1848, 2015.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 473-497, 1969.

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

O'CONNOR, D.L.; RUNIONS, A.; SLUIS, A.; BRAGG, J.; VOGEL, J.P.; PRUSINKIEWICZ, P.; HAKE, S. A division in PIN-mediated auxin patterning during organ initiation in grasses. **PLoS Computational Biology**, San Francisco, v. 10, n. 1, p. e1003447, 2014.

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

PERRINE-WALKER, F.; DOUMAS, P.; LUCAS, M.; VAISSAYRE, V.; BEAUCHEMIN, N.J.; BAND, L.R.; CHOPARD, J.; CRABOS, A.; CONEJERO, G.; PERET, B.; KING, J.R.; VERDEIL, J.L.; HOCHER, V.; FRANCHE, C.; BENNETT, M.J.; TISA, L.S.; LAPLAZE, L. Auxin carriers localization drives auxin accumulation in plant cells infected by Frankia in *Casuarina glauca* Actinorhizal nodules. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 154, p. 1372-1380, 2010.

RAINERI, D.M.; BOTTINO, P.; GORDON, M.P.; NESTER, E.W. Agrobacterium-mediated transformation of Rice (*Oryza sativa* L.). **Nature Biotechnology**, New York, v. 8, n. 1, p. 33, 1990.

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

RICCI, A.; CARRA, A.; ROLLI, E.; BERTOLETTI, C.; BRANCA, C. N, N'-bis-(2, 3-methylenedioxyphenyl) urea and N, N'-bis-(3, 4-methylenedioxyphenyl) urea interact with auxin in enhancing root formation of M26 apple (*Malus pumila* Mill.) stem slices. **Plant Growth Regulation**, The Hague, v. 40, n. 3, p. 207-212, 2003.

RUBIO, V.; LINHARES, F.; SOLANO, R.; MARTÍN, A.C.; IGLESIAS, J.; LEYVA, A.; PAZ-ARES, J. A conserved MYB transcription factor involved in phosphate starvation signaling both in vascular plants and in unicellular algae. **Genes Development**, Cold Spring Harbor, v. 15, n.16, p. 2122-2133, 2001.

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

SENA, G.; WANG, X.; LIU, H.Y.; HOFHUIS, H.; BIRNBAUM, K.D. Organ regeneration does not require a functional stem cell niche in plants. **Nature**, London, v. 457, p. 1150-1154, 2009.

SEBASTIAN, J.; DINNENY J. *Setaria viridis*: A model for understanding Panicoid Grass Root Systems. In: DOUST, A.; DIAO, X. **Genetics and genomics of Setaria**. Heidelberg: Springer International Publishing, 2016. doi: 1-1007/978-3-319-45105-3_11.

SEBASTIAN, J.; WONG, M.K.; TANG, E.; DINNENY, J.R. Methods to promote germination of dormant *Setaria viridis* seeds. **PLoS One**, San Francisco, v. 9, n. 4, e95109, 2014.

SMET, S.D.; CUYPERS, A.; VANGRONSVELD, J.; REMANS, T. Gene networks involved in hormonal control of root development in *Arabidopsis thaliana*: A framework for studying its disturbance by metal stress. **International Journal of Molecular Sciences**, Base, v. 16, n. 8, p. 19195-19224, 2015.

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.

SINGH, V.; VAN OOSTEROM, E.J.; JORDAN, D.R.; MESSINA, C.D.; COOPER, M.; HAMMER, G.L. Morphological and architectural development of root systems in sorghum and maize. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 333, n. 1-2, p. 287-299, 2010.

SOUZA, V.C.; FLORES, T. B.; LORENZI, H.; **Introdução à botânica: morfologia**. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2013.

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

TIAN, H.; SMET, I.D.; DING, Z. Shaping a root system: regulating lateral versus primary root growth. **Plant Science**, Shannon, v. 19, p. 426-431, 2014.

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

VAN ECK, J. The status of *Setaria viridis* transformation: Agrobacterium-mediated to floral dip. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 9, p. 652, 2018. doi: 10.3389/fpls.2018.00652.

VANNESTE, S.; FRIM, J. Auxin: A trigger for change in plant development. **Cell**, Cambridge, v. 136, n. 6, p. 1005-1016, 2009.

VALVEKENS, D.; VAN MONTAGU, M.; VAN LIJSEBETTENS, M. Agrobacterium tumefaciens-mediated 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. 5536-5540, 1988.

WANG, L.; CHU, H.; LI, Z.; WANG, J.; LI, J.; QIAO, Y.; FU, Y.; MOU, T.; CHEN, C.; XU, J. Origin and development of the root cap in rice. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 166, p. 603-613, 2014.

WASSON, A.P.; RICHARDS, R.A.; CHATRATH, R.; MISRA, S.C.; PRASAD, S.S.; REBETZKE, G.J.; WATT, M. 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.

WERNER, T.; MOTYKA, V.; LAUCOU, V.; SMETS, R.; VAN ONCKELEN, H.; SCHMÜLLING, T. Cytokinin-deficient transgenic *Arabidopsis* plants show multiple developmental alterations indicating opposite functions of cytokinins in the regulation of shoot and root meristem activity. **The Plant Cell**, Rockville, v. 15, n. 11, p. 2532-2550, 2003.

WOLPERT, L.; JESSELL, T.; LAWRENCE, P.; MEYEROWITZ, E.; ROBERTSON, E.; SMITH, J. **Princípios de biologia do desenvolvimento**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed. 2008. 576 p.

XUE, T.; LIU, Z.; DAI, X.; XIANG, F. 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.

ZHANG, P.; SUN, L.; QIN, J.; WAN, J.; WANG, R.; LI, S.; XU, J. 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.

ZHAO, X.H.; QIU, H.Y.; WEN, J.; WANG, X.G.; DU, Q.; WANG, J.; WANG, Q. 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.

ZHU, XIN-GUANG; LONG, STEPHEN P.; ORT, DONALD R. What is the maximum efficiency with which photosynthesis can convert solar energy into biomass?. **Current Opinion in Biotechnology**, Amsterdam, v. 19, n. 2, p. 153-159, 2008.